

Tesis Doctoral

Rol de la inflamación sistémica en la patología generada por tumores murinos

Bruzzo Iraola, Juan

2014-04-24

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:

Bruzzo Iraola, Juan. (2014-04-24). Rol de la inflamación sistémica en la patología generada por tumores murinos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Bruzzo Iraola, Juan. "Rol de la inflamación sistémica en la patología generada por tumores murinos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-04-24.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Rol de la inflamación sistémica en la patología generada por tumores murinos

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Licenciado Juan Bruzzo Iraola

Director de tesis: Dr. Raúl A. Ruggiero
Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Arzt

Lugar de trabajo: Instituto de Medicina Experimental, Academia Nacional de
Medicina de Buenos Aires

Buenos Aires, 2013

Rol de la inflamación sistémica en la patología generada por tumores murinos.

Resumen

La asociación entre cáncer e inflamación en un órgano o tejido se encuentra sólidamente establecida. En efecto, se sabe que ciertos tumores, tienen una mayor probabilidad de originarse en sitios de inflamación crónica y que procesos inflamatorios locales pueden acelerar el crecimiento de tumores preexistentes en animales y seres humanos. Por otro lado, la relación entre cáncer e inflamación sistémica no ha sido particularmente estudiada. En esta tesis, demostramos que durante el crecimiento de 4 tumores murinos, de diferente origen, estirpe histológico e inmunogenicidad y de un tumor humano creciendo en ratones nude, se generaron 2 picos temporalmente separados de inflamación sistémica. El primer pico fue relativamente pequeño y transitorio ya que fue detectado durante la primera semana luego de la inoculación del tumor. Tal vez represente, en parte, una respuesta del organismo al trauma mecánico de la inoculación de elementos extraños, ya que la inoculación de fibroblastos murinos normales también produjo una manifestación de inflamación sistémica, aunque menor, que la observada después de la inoculación de células tumorales. Por otro lado, el inicio del segundo pico de inflamación sistémica fue observado cuando el volumen tumoral fue mayor que 500 mm³ y coincidente con el inicio del crecimiento exponencial de cada tumor. Este segundo pico de inflamación sistémica fue significativamente más prominente que el primero y su intensidad aumentó en relación directa con el incremento de la masa tumoral. Estos resultados sugieren que la inflamación sistémica podría ser un fenómeno general de la patología neoplásica y su importancia se puso de manifiesto en el hecho de que, en nuestra colección de tumores, se observó, sorpresivamente, una correlación directa entre la magnitud de la inflamación sistémica generada por cada tumor y su agresividad, correlación que no se observó con la capacidad de generar metástasis. Esto indica, al menos en los tumores analizados por nosotros, que la capacidad de generar una potente respuesta inflamatoria sistémica, produce más efectos deletéreos sobre el organismo que la propia capacidad metastásica, disminuyendo de este modo la sobrevida. En este sentido, se encontró gran infiltración de neutrófilos y alteraciones estructurales en diferentes órganos, que son

compatibles con disminución y aún pérdida de función, independiente de la capacidad metastásica de cada tumor. La inflamación sistémica generada por el tumor exacerba el propio crecimiento tumoral estableciendo un circuito de retroalimentación positivo entre ambos, al menos en parte por la activación del receptor TLR-4. Además, la disminución de las manifestaciones de inflamación sistémica mejoró los efectos anti-tumorales obtenidos con quimioterapia y radioterapia, aunque estos resultados fueron relativamente modestos. Esto se debe a que el tumor cuando supera los 1500 mm³, comienza un crecimiento exponencial, generando un fenómeno de inflamación sistémica progresivo, a pesar de que se continúan administrando las drogas antiinflamatorias, que hasta ese momento habían sido bastante efectivas para limitar la naciente inflamación sistémica y para retardar el crecimiento tumoral. En cambio, un excelente resultado terapéutico fue alcanzado cuando se realizó el tratamiento antiinflamatorio junto con la escisión quirúrgica de tumores > 2000 mm³. En este caso, la eliminación quirúrgica de la fuente principal de inflamación sistémica y de posible refractariedad, permitió al tratamiento antiinflamatorio tener muchas más chances de actuar, contra la inflamación sistémica residual, pero aún deletérea, que perdura al menos 2 semanas después de la extirpación del tumor. Si esta condición inflamatoria sistémica fuera una característica distintiva de muchos cánceres avanzados, un conocimiento más preciso de los mecanismos por los cuales esta inflamación sistémica promueve el crecimiento tumoral y produce múltiples daños en el organismo y la búsqueda de sustancias antiinflamatorias más efectivas y con menores efectos adversos, serían muy importantes para complementar y mejorar las terapias actuales contra el cáncer.

PALABRAS CLAVE: CANCER, INFLAMACION SISTEMICA, INMUNOSUPRESION, CAQUEXIA, QUIMIOTERAPIA, RADIOTERAPIA

Systemic inflammation role in the pathogenesis of murine tumors.

Abstract

The link between cancer and inflammation in an organ or tissue has firmly been established on the basis that cancer tends to occur at sites of chronic inflammation and that local inflammatory processes can accelerate the growth of preexisting tumors in both animals and human beings. In contrast, the relationship between cancer and systemic inflammation has been less studied. In this work, we demonstrated that during the growth of 4 murine tumors of different origin, histological type and immunogenicity and 1 human tumor in nude mice, two temporally separate peaks of systemic inflammation were detected. The first peak was relatively small and transient detected during the first week after tumor inoculation. It probably represented, at least in part, the response of the organism to the mechanical trauma of inoculation of foreign bodies, because the inoculation of normal fibroblasts produced a rather similar manifestation of systemic inflammation than that observed after the inoculation of tumor cells. On the other hand, the onset of the second peak was observed when the tumor was 500 mm³, coincidental with the beginning of the exponential tumor growth. This second peak of systemic inflammation was significantly more prominent than the first one and its magnitude increased progressively in parallel with the increase of tumor mass. These results suggest that systemic inflammation could be a general phenomenon of neoplastic pathology and its importance became manifest in the fact, that in our tumor collection, was observed, surprisely, a direct correlation between the magnitude of systemic inflammation generated by each tumor and its aggressiveness. On the other hand, in our tumor models, tumor aggressiveness did not correlate to the tumor's ability to disseminate or metastasize, suggesting that the magnitude of systemic inflammation rather than the metastatic ability produce more deleterious effects in the organism, diminishing survival. In fact, was observed a large number of PMN and damage in tissues and organs, that are compatible with impair function, independtly of tumor's metastatic ability. The systemic inflammation generated by tumor enhance tumor growth, establishing a positive feedback between both, at least in part, by activation of TLR-4 receptor. In addition, the attenuation of the manifestations of systemic inflammation improves the anti-tumor effects obtained

with radiotherapy and chemotherapy. However, these results were relatively modest. This is probably due to the fact that when tumors surpass 1500 mm³, they begin an exponential growth, generating a systemic inflammation whose magnitude increases progressively, even though the continuous inoculation of anti-inflammatory drugs. Instead, an excellent therapeutic result was obtained when the anti-inflammatory treatment schedule was combined with surgery. In this case, the surgery eliminated the main source of systemic inflammation and in consequence an anti-inflammatory treatment had a better chance to act against the residual, but still deleterious, systemic inflammation. If a systemic inflammatory condition were a hallmark of many advanced cancers, a more accurate knowledge of the underlying mechanisms by which systemic inflammation promotes tumor growth and produces multiple deleterious effects on the organism and the search for new more effective and with lesser side effects anti-inflammatory factors will help to design new strategies to complement and to improve the current therapies against cancer.

KEY WORDS: CANCER, SYSTEMIC INFLAMMATION, IMMUNOSUPPRESSION,
CACHEXIA, CHEMOTHERAPY, RADIOTHERAPY

AGRADECIMIENTOS

Para comenzar me gustaría aclarar que en estos años es mucha la gente que estuvo acompañándome y probablemente este listado no sea suficiente para agradecer a todos.

A mis viejos que siempre me apoyaron y me siguen apoyando. A mis hermanos y al resto de la familia.

A mis amigos de Pringles, incondicionales, que siempre están ahí cada vez que voy, a pesar de que no llamo casi nunca. A mis compañeros de ruta que encontré en la ANM, Andy, Noe, Gaby, Damián, Juli por tanto aguante. A, Alejandra, la otra Gaby, Romi, Gabo, Tito, Ceci, Jime, Pilar, por los momentos compartidos. Espero no olvidarme a ninguno aunque es lo más probable.

La tesis es fruto del trabajo de un equipo de personas. Fue solo posible con la asistencia de Raúl, mi director y de Oscar, con los cuales tuve largas discusiones científicas, que me permitieron crecer científicamente. De Paula, que siempre me ofreció ayuda. De la gente del laboratorio de Inmunología, de Vero que siempre estuvo bien dispuesta para hacerme algún ELISA y de los Dres. Roberto Meiss y Silvia Vanzulli del servicio de patología.

Le quiero agradecer al Personal del CETRO, especialmente a Víctor Palacios y a Hernán López que siempre estuvieron bien dispuestos para irradiar células y ratones.

También a toda la gente de Medicina experimental. A los que pasaron y a los que quedaron. A los que hacen e hicieron posible el trabajo allí. A la “colo”, Isabel, Irene, Tito. A la Dra Pasqualini.

A Conicet por permitirme llegar hasta acá.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis integran las siguientes publicaciones y comunicaciones:

Publicaciones

J. Bruzzo, P. Chiarella, G. Fernandez, O.D. Bustuoabad, R.A. Ruggiero. "*Cáncer experimental e inflamación sistémica en un modelo murino*". Medicina (Bs As) 2007; 67: 469-74.

Congresos

Bruzzo, Juan; Chiarella, Paula; Bustuoabad, Oscar; Ruggiero, Raúl. "*Crecimiento tumoral e inflamación sistémica en un modelo experimental*". XXII Jornadas de Oncología "Un Enfoque Multidisciplinario" Instituto Angel Roffo, 2006.

Bruzzo J, Chiarella P, Bustuoabad OD, Ruggiero RA. "*Crecimiento tumoral e inflamación sistémica en un modelo experimental*". LI Reunión Científica de la SAIC y LIV Reunión Científica de la SAI Mar del Plata, 2006.

Bruzzo J, Chiarella P, Maglioco AF, Camerano GV, Dran GI, Bustuoabad OD, Ruggiero RA. "*Atenuación de la respuesta inmune como parte del mecanismo de exacerbación tumoral inducida por inflamación sistémica*". LII Reunión Científica de la SAIC y LV Reunión Científica de la SAI Mar del Plata, 2007.

Bruzzo, Juan; Chiarella, Paula; Ruggiero, Raúl. "*Increased tumor growth due to attenuation of the immune response by tumor-induced systemic inflammation*". 1er congreso Franco-Argentino, Buenos Aires, 2010.

Bruzzo J, Chiarella P, Landoni V, Meiss R, Vanzulli S, Maglioco A, Ruggiero RA. "*Systemic inflammation can promote tumor growth and counteract conventional therapies against cancer*". The Role of Inflammation during Carcinogenesis, Dublín, 2012.

Bruzzo J, Chiarella P, Meiss R, Ruggiero RA. "*La inmunosupresión asociada al crecimiento del tumor MC-C no es debida a cambios intrínsecos de la célula tumoral*". LVII Reunión Anual de la SAIC y LX Reunión anual de la SAI, Mar del Plata, 2012.

INDICE

RESUMEN	-----	2
ABSTRACT	-----	4
ABREVIATURAS	-----	13
INTRODUCCIÓN	-----	15
1. Cáncer	-----	16
1.a Características generales de las neoplasias benignas	-----	17
1.b Características generales de los tumores malignos	-----	17
1.1 Tratamientos del cáncer	-----	19
2. Inflamación	-----	19
2.1 Agentes inflamatorios	-----	20
2.2 Inflamación aguda	-----	21
2.2a Respuesta de los vasos linfáticos	-----	23
2.2b Modificaciones leucocitarias	-----	23
2.3 Mediadores de la inflamación	-----	24
2.3a Metabolitos del ácido araquidónico	-----	24
2.3b Aminas vasoactivas: histamina y serotonina	-----	24
2.3c Citoquinas	-----	25
2.3d Factor activador de plaquetas (PAF)	-----	26
2.3e Oxido nítrico (NO)	-----	26
2.3f Especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS)	-----	26
2.3g Constituyentes de los lisosomas de los leucocitos	-----	27
2.3h Neuropeptidos	-----	28
2.3i Mediadores derivados de proteínas plasmáticas	-----	28
2.4 Efectos sistémicos de la inflamación	-----	29
2.5 Inflamación sistémica	-----	29
2.6 Resolución de la respuesta inflamatoria aguda	-----	30
2.7 Inflamación crónica	-----	30
2.7.1 Características	-----	31
3. Sistema inmune	-----	32
3.1 Generalidades y activación del sistema inmune	-----	32
3.2 Regulación del sistema inmune	-----	35
4. Relación entre inflamación y cáncer	-----	37

5. Relación entre cáncer y sistema inmune	41
OBJETIVOS	43
MATERIALES Y MÉTODOS	46
Animales	47
Modelos tumorales	47
Cálculo del volumen, peso, agresividad y capacidad metastásica del tumor	47
Dosis tumoral 50	48
Suero	48
Marcadores de inflamación sistémica	48
Marcadores de contra-inflamación	48
Estudios histopatológicos	49
Extracción de RNA	49
RT-PCR	49
Medio de cultivo	49
Obtención de suspensiones celulares	49
Obtención de medio condicionado con GM-CSF murino	50
Diferenciación de células dendríticas	50
Medio condicionado de Tumor MC-C	50
Citometría de flujo	51
Ensayo de inmunización	51
Test de Winn	51
Citotoxicidad mediada por células	52
Ensayo de inmunidad concomitante	52
Tratamientos pro- y antiinflamatorios	52
Tratamientos convencionales contra el cáncer	52
Análisis estadístico de los datos	53
RESULTADOS	54
1 Crecimiento de diferentes tumores y la emergencia de una condición inflamatoria sistémica	55

1.1 Relación entre inflamación sistémica y agresividad tumoral -----	56
1.2 Características generales del tumor MC-C -----	58
1.3 Manifestaciones de inflamación sistémica asociadas al crecimiento del tumor MC-C -----	60
1.4 Persistencia de la inflamación sistémica luego de la extirpación tumoral -----	65
1.5 Origen de las manifestaciones de inflamación sistémica asociadas al crecimiento tumoral -----	66
1.6 Contra-inflamación sistémica compensatoria asociada al crecimiento del tumor MC-C -----	70
Conclusión parcial -----	73
 2 La inflamación sistémica promueve el crecimiento tumoral -----	75
2.1 Efectos de tratamientos antiinflamatorios sobre el crecimiento tumoral -----	76
2.2 Efectos de un tratamiento pro-inflamatorio sobre el crecimiento tumoral -----	80
2.3 Mecanismos moleculares asociados al efecto promotor de la inflamación sistémica sobre el crecimiento tumoral -----	83
Conclusión parcial -----	84
 3 Influencia de la inflamación sistémica sobre la inmunidad anti-tumoral-----	86
3.1 Características de la inmunogenicidad del tumor MC-C -----	87
3.2 Inicio y decaimiento de la inmunidad anti-tumoral durante el crecimiento progresivo del tumor MC-C -----	88
3.3 Ciclos de inmunogenicidad-inmunosupresión durante diferentes pasajes s.c. del tumor MC-C -----	90
3.4 El tratamiento antiinflamatorio revierte parcialmente la inmunosupresión generada por el tumor MC-C -----	93
3.5 Una condición experimental de inflamación sistémica bloquea la respuesta inmune anti-tumoral -----	96
Conclusión parcial -----	97

4 La inhibición de la inflamación sistémica mejora la efectividad de las terapias convencionales -----	99
Conclusión parcial -----	104
5 Limitaciones de los tratamientos anti- inflamatorios -----	105
5.1 Limitaciones de los tratamientos anti- inflamatorios -----	106
5.2 Posibles causas de la refractariedad a los tratamientos antiinflamatorios -----	109
Conclusión parcial -----	111
DISCUSIÓN -----	113
CONCLUSION -----	124
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	125

ABREVIATURAS

AA: Acido araquidónico

AINE: Antiinflamatorio no esteroideo

CD: Célula dendrítica

CDs: Células dendríticas

COX: Ciclooxygenasa

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño

DT₅₀: Dosis tumoral 50

DX: Dexametasona

e.v: Inoculación endovenosa

F.D.: Flanco derecho

F.I.: Flanco izquierdo

GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos

H&E: Hematoxilina y eosina

HIF: Factor inducido por hipoxia

HPETE: Acidos de hidroxiperoxieicosatetraenoicos

i.p.: Inoculación intraperitoneal

IFM: Intensidad de fluorescencia media

IFN- γ : Interferón γ

IL-10: Interleuquina 10

IL-1 β : Interleuquina 1 β

IL-6: Interleuquina 6

ILM: Intervalo libre de metástasis

Indo: Indometacina

iNOS: Oxido nítrico sintetasa inducible

LOX: Lipooxygenasa

LPS: Lipopolisacáridos bacterianos

MDSC: Células mieloides supresoras

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NO: Oxido nítrico

OLS: Organos linfáticos secundarios
PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR: Proteína C reactiva
PMN: Neutrófilos polimorfonucleares
RNS: Especies reactivas del nitrógeno
ROS: Especies reactivas del oxígeno
s.c.: Subcutáneo
SAA: Proteína A amiloide
SF: Solución fisiológica
TG: Tioglicolato
TGF- β : Factor de crecimiento tumoral β
TLR-4: Receptor de tipo Toll 4
TNF- α : Factor de necrosis tumoral α
Treg: Linfocitos T regulatorios

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

Una neoplasia es una alteración de la proliferación y, muchas veces, de la diferenciación celular, que se manifiesta por la formación de una masa anormal de tejido o tumor, producida por multiplicación de algún tipo de células que es descoordinada con los mecanismos que controlan la multiplicación celular en el organismo (Pitot 1978, Agius 2005). Si bien se dice, que estos tumores, una vez desarrollados, son autónomos, es decir, continuarían creciendo aunque dejen de actuar las causas que los originaron, muchas veces, estas causas son realmente desconocidas. Por otro lado, condiciones que participan en la carcinogénesis, como el caso de una respuesta inflamatoria crónica, pueden permanecer aún en presencia del tumor.

Las neoplasias se clasifican, según su evolución, en benignas o malignas.

Las neoplasias benignas producen sólo alteración local, generalmente de orden mecánico y rara vez ocasionan la muerte, aunque dependiendo de factores topográficos o funcionales de la propia neoplasia, pueden ser letales. Algunos ejemplos son: el meningioma por compresión del cerebro y el adenoma paratiroideo por hipercalcemia.

Las neoplasias malignas producen destrucción local y en sitios alejados y ocasionan trastornos metabólicos generales. Provocan la muerte si no son tratadas adecuadamente. Reciben en conjunto el nombre de cáncer.

Una célula normal se convertiría progresivamente en una célula neoplásica a través de la adquisición de nuevas habilidades (Hanahan and Weinberg 2011):

- 1) independencia de factores de crecimiento
- 2) insensibilidad frente a señales inhibitorias de crecimiento
- 3) evasión de la muerte celular programada
- 4) potencial replicativo indefinido
- 5) capacidad angiogénica
- 6) invasión de tejidos y metástasis

Recientemente se incluyó una nueva característica particular de las células tumorales: evitar la vigilancia inmunológica. Las células tumorales escapan al sistema inmune volviéndose una variante no inmunogénica o suprimen (Dunn et al 2004, Smyth et al 2006), activamente la respuesta inmune. Este punto será detallado oportunamente.

1.a Características generales de las neoplasias benignas:

- 1) Crecimiento lento: (meses o años).
- 2) Crecimiento expansivo.
- 3) Tumores redondeados, a veces encapsulados, bien delimitados: Pueden ser extirpados quirúrgicamente por completo, sin que vuelvan a aparecer, es decir no hay recidivas.
- 4) Células típicas del tejido en que se originan, o sea células muy bien diferenciadas.
- 5) Mitosis escasas o ausentes.

1.b Características generales de los tumores malignos:

- 1) Crecimiento rápido: (semanas a meses), puede haber mitosis abundantes; necrosis, por crecimiento discordante entre parénquima y estroma. En las neoplasias malignas de superficies cutáneas o mucosas la necrosis puede dar origen a úlceras.
- 2) Crecimiento infiltrativo, invasor y destructor: tumores mal delimitados, irregulares según la resistencia relativa de los diversos tejidos: el tejido conectivo laxo y el lumen de pequeños vasos linfáticos ofrecen poca resistencia a la invasión; las paredes arteriales, el hueso y el cartílago ofrecen mayor resistencia, pero pueden también ser invadidos. Cuando producen diseminación e invasión en órganos diferentes del original se llaman metástasis.
- 3) Células heterotípicas: aunque las células del tumor son parecidas a las del tejido de origen, presentan variaciones (heterotipía). Estas variaciones se encuentran en las células parenquimatosas de una misma neoplasia y en células de distintas neoplasias del mismo tipo.

Clínicamente, se agrupan bajo la denominación de cáncer distintas enfermedades que pueden originarse en diferentes tejidos del organismo y que difieren en su tasa

de crecimiento, incidencia por edad y sexo y respuesta al tratamiento (American Cancer Society 2010).

Las neoplasias son una caricatura del órgano en que se producen. Están constituidas por parénquima y estroma. El parénquima de una neoplasia está formado por la estirpe celular que prolifera y es el componente neoplásico propiamente dicho, tiende a asumir una disposición arquitectural similar a la del órgano de origen en neoplasias bien diferenciadas. El estroma neoplásico es el tejido conectivo que incluye fibroblastos, matriz extracelular, vasos sanguíneos, células inflamatorias, etc donde se sustentan y proliferan las células neoplásicas y está proporcionado en parte por el organismo y en parte por tejido neoforado a partir de señales originadas en la misma neoplasia.

Según el punto de vista de la biología celular y molecular, el cáncer es causado por genes defectivos cuyos productos proteicos alterados, aumentados o ausentes perturban una serie de señales intracelulares responsables de la conducta celular (Bonfil and Scharosky 2003, Hannahan and Weinberg 2011).

Según el origen histológico, los cánceres pueden ubicarse en tres grupos diferentes: los carcinomas, los sarcomas y las leucemias y linfomas (Cairns 1976, Cairns 1978, American Cancer Society 2010).

- Los carcinomas tienen su origen en los epitelios, es decir en las capas de células que recubren la superficie del cuerpo, revisten las cavidades o forman parte de diversas glándulas. Se trata del tipo de cáncer más común en humanos y responsable del mayor número de muertes, calculándose que alrededor de un 85% de los procesos malignos son carcinomas (Maugh 1975, Horner et al 2009).
- Los sarcomas son cánceres menos frecuentes que tienen su origen en las estructuras derivadas del mesodermo, como huesos, músculos, vasos sanguíneos. Dependiendo del origen se denominan osteosarcoma (hueso), condrosarcoma (cartílago) y fibrosarcoma (tejido fibroso), entre otros.
- Las leucemias y linfomas son neoplasias malignas que tienen su origen en las células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea.

A diferencia de las leucemias, que crecen en forma diseminada, los carcinomas, sarcomas y linfomas crecen como una masa relativamente compacta, por lo que se los denomina tumores “sólidos”.

1.1 Tratamientos del cáncer

En la actualidad existen tres tratamientos convencionales contra el cáncer: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. La aplicación de los dos primeros se restringe a tumores localizados. Por el contrario, cuando las células tumorales se han diseminado desde su lugar de origen, estos métodos pierden eficacia, por lo que se requiere de un procedimiento que destruya las células cancerosas donde sea que se encuentren. Es aquí donde se recurre a la quimioterapia. No obstante los procedimientos de esta práctica son, en mayor o menor medida, tóxicos para las células normales, ya que actúa sobre las células que tienen alta tasa de división. Asimismo, existen células tumorales que se encuentran en estado de reposo. Esto significa que si bien la quimioterapia es útil, tiene la limitación de que no es especialmente eficiente ni específica contra las células tumorales. Un problema adicional lo constituye el hecho de que tarde o temprano los tratamientos quimioterapéuticos terminan seleccionando variantes tumorales resistentes a esas drogas (Bailar and Gornik 1997, Nakanishi et al 2003, Westwood et al 2010).

Por otro lado, basándose en la relación entre el sistema inmune y el cáncer, otro tipo de terapias, las inmunoterapias, están siendo ampliamente estudiadas y algunas ya empleadas en la clínica.

2. Inflamación

La inflamación es un proceso fisiológico inespecífico que el organismo elabora frente a fenómenos de daño tisular y/o infección por microorganismos. Tiene un rol clave en la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa frente a las agresiones del medio, y está inducida por diferentes agentes denominados genéricamente “agentes inflamatorios”. La respuesta inflamatoria ocurre sólo en tejidos conectivos vascularizados y surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así

como reparar el tejido u órgano dañado. Habitualmente, se dice que es un mecanismo de inmunidad innata, en contraste con la reacción inmune adaptativa, específica para cada tipo de agente infeccioso. En realidad, es una respuesta fisiológica extremadamente compleja que involucra múltiples sistemas, entre ellos, al sistema inmune, nervioso, vascular, etc.

El mayor problema que surge de la inflamación es que se dirige tanto hacia agentes dañinos como no dañinos, de manera que puede provocar lesión en tejidos u órganos.

2.1 Agentes inflamatorios:

Se clasifican en:

- ❖ Agentes biológicos: bacterias, virus, parásitos, hongos. Las células de mamíferos disponen de receptores que reconocen a éstos -entre los receptores más importantes están los receptores de tipo Toll- y desencadenan vías de señalización que estimulan la producción de diferentes mediadores inflamatorios (citoquinas, quimioquinas, etc);
- ❖ Agentes que provocan injurias en tejidos u órganos: producen muerte celular (necrosis) y liberan moléculas que son potentes activadoras de la respuesta inflamatoria, entre estos agentes están:
 - Agentes físicos: radiaciones, frío, calor, rayos UV;
 - Agentes químicos: venenos, toxinas, aceites, otros (ej. tioglicolato, carragenina);
 - Traumatismos y cuerpos extraños: además de producir injurias a los tejidos (necrosis), pueden potencialmente ser fuente de infecciones oportunistas;
 - Alteraciones vasculares: como por ejemplo, isquemia-reperfusión;
- ❖ Alteraciones inmunitarias: en las respuestas de hipersensibilidad o las enfermedades autoinmunes, la activación del sistema inmune contra el propio individuo, induce inflamación local, siendo ésta la causa principal del daño tisular.

Actualmente se pueden reconocer sus 5 signos cardinales, que son:

Tumefacción. Aumento del líquido intersticial formando el edema, debido al aumento en la permeabilidad vascular en la zona afectada.

Rubor. Enrojecimiento, debido principalmente a fenómenos de vasodilatación local.

Calor. Aumento de la temperatura de la zona inflamada, debido al aumento de flujo sanguíneo por vasodilatación y al incremento del consumo local de oxígeno.

Dolor. El dolor aparece como consecuencia de la liberación de sustancias que activan los nociceptores, tales como las prostaglandinas y por aumento de presión local por el edema.

Pérdida o disminución de la función. Llamado 5º signo de Virchow (function laesa).

Dependiendo de las características temporales de la inflamación existen dos tipos de respuesta, inflamación aguda e inflamación crónica.

2.2 Inflamación aguda

La fase aguda de la inflamación está dominada por la reacción inmune innata. Se distinguen tres puntos clave: cambios hemodinámicos, alteración de la permeabilidad vascular y modificaciones leucocitarias.

El tejido conjuntivo contiene macrófagos y mastocitos residentes, que son los principales iniciadores de la respuesta inflamatoria, ya que son células centinelas capaces de reconocer la presencia de microorganismos, células muertas o cuerpos extraños. Cuando reconocen estos elementos, liberan mediadores químicos pro-inflamatorios que inducen vasodilatación en las arteriolas y da lugar a la apertura de nuevos lechos capilares en la zona de la lesión (aumento de flujo sanguíneo). La hiperemia en las arteriolas es la causa de la aparición de eritema (rubor) en el sitio de la inflamación, que es la causa del enrojecimiento y el aumento de la temperatura. Además producen aumento en la permeabilidad microvascular con extravasación de líquido, proteínas y células de la sangre hacia los tejidos extravasculares generando un exudado inflamatorio rico en proteínas (llamado

edema). Este exudado provoca un aumento de la viscosidad sanguínea en los vasos de menor calibre, debido al aumento de la concentración de los glóbulos rojos disminuyendo el flujo sanguíneo, que es lo que se denomina estasis (congestión venosa). En estas condiciones hemodinámicas, los leucocitos se redistribuyen en posición periférica, un fenómeno denominado marginación y pavimentación. Las células endoteliales son activadas por los mediadores de la inflamación, expresando moléculas en sus membranas que favorecen la adhesión de los leucocitos, fundamentalmente los neutrófilos polimorfonucleares (PMN), a continuación, estos ruedan sobre la superficie del endotelio (rodamiento), estableciendo contactos transitorios con las células endoteliales. Finalmente, se adhieren firmemente al endotelio, antes de iniciar la migración a través de los capilares por "diapédesis" y dirigirse al intersticio. Esta extravasación de leucocitos (PMN en primer lugar, seguidos por los macrófagos) forma el infiltrado inflamatorio.

Los PMN que han atravesado los capilares se dirigen hacia la zona afectada por quimiotaxis. Una vez allí, fagocitan los microorganismos, los destruyen y entran en apoptosis. Posteriormente, arriban los macrófagos que fagocitan los neutrófilos apoptóticos y los restos de tejido. Una vez eliminados, los macrófagos y los linfocitos proceden a la reparación del tejido dañado por la inflamación aguda. El daño tisular está producido generalmente por los PMN, que son muy numerosos y liberan enzimas hidrolíticas y radicales libres que dañan los tejidos. La reparación se produce gracias a los macrófagos, que estimulan a los fibroblastos a sintetizar colágeno y a las células endoteliales a generar nuevos vasos, mediante la secreción de factores de crecimiento. Sin embargo, la reparación puede ser incompleta, y no recuperarse la estructura original: en este caso, queda una zona fibrótica en lugar del parénquima (ej, cicatriz, fibrosis hepática).

La naturaleza de los leucocitos infiltrados varía según el momento de la respuesta inflamatoria y el tipo de estímulo. En la mayor parte de los casos de inflamación aguda, los PMN predominan durante las primeras 6-24h, y luego son reemplazados por monocitos en 24-48h. La rápida aparición de los PMN se debe a que son más abundantes en la sangre (en humanos), responden más rápido a las quimioquinas y se adhieren más fuertemente a las moléculas de adhesión que aparecen en las células endoteliales activadas, como las selectinas E y P. Sin embargo, después de

entrar en los tejidos, los PMN tienen una vida media corta: sufren apoptosis y desaparecen después de 24-48h. Los monocitos, aunque responden tardíamente, no sólo sobreviven en los tejidos, sino que además proliferan y se diferencian dando lugar a los macrófagos. De esta manera, se convierten en la población dominante en las reacciones inflamatorias crónicas.

Posteriormente, continúa la fase de reparación (“fase no inflamatoria”) que sigue a la inflamación aguda, formándose el tejido de granulación donde se produce abundante angiogénesis. Esta fase no inflamatoria, curiosamente, se asemeja a la inflamación crónica.

2.2a Respuesta de los vasos linfáticos

En condiciones normales, el sistema linfático filtra y controla las pequeñas cantidades de líquido extravascular que se ha perdido en los capilares. Durante la inflamación, la cantidad de líquido extracelular aumenta, y el sistema linfático participa en la eliminación del edema. Asimismo, en este caso una mayor cantidad de leucocitos, restos celulares y microbios pasa a la linfa. Como ocurre con los vasos sanguíneos, los linfáticos también proliferan en los procesos inflamatorios, para atender al incremento de la demanda. Puede ocurrir que los vasos linfáticos se inflamen de forma secundaria (linfangitis), o que se inflamen los ganglios (linfadenitis), a causa de la hiperplasia de los folículos linfoides y al mayor número de linfocitos y macrófagos.

2.2b Modificaciones leucocitarias

Una de las funciones más características e importantes de la inflamación es el aporte de leucocitos a la zona de la lesión. Estos fagocitan a los patógenos, destruyen a las bacterias y a los microorganismos, y degradan el tejido necrótico, pero también pueden inducir lesión tisular al liberar enzimas, mediadores químicos y especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Los dos grupos de leucocitos más importantes en un proceso de inflamación son los PMN y los macrófagos.

2.3 Mediadores de la inflamación:

Los mediadores pertenecen a diversos grupos de moléculas que incluyen lípidos (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxano), aminoácidos modificados (histamina, serotonina) y proteínas (citoquinas, quimioquinas, proteínas de fase aguda, factores de crecimiento) que representan información destinada a las células capaces de utilizarla gracias a la presencia de receptores específicos en sus membranas plasmáticas.

2.3a Metabolitos del ácido araquidónico

El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso que se encuentra normalmente esterificado en las membranas celulares. En células activadas, estresadas o necróticas, es liberado por las fosfolipasas y luego puede metabolizarse por dos vías (Figura I):

- las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) producen prostaglandinas (PGD₂ producido por mastocitos, PGE₂ por macrófagos y células endoteliales, entre otros) y tromboxanos (TXA₂, el principal metabolito del AA generado por las plaquetas); el endotelio vascular carece de tromboxano sintetasa, pero posee una prostaciclina sintetasa, y por tanto genera prostaciclina (PGI₂);

- las lipooxigenasas (LOX) generan intermediarios de los leucotrienos y las lipoxinas.

Estos metabolitos del AA (denominados eicosanoides) sirven como señales intra o extracelulares en una gran variedad de procesos biológicos, entre ellos la inflamación y la hemostasis. Sus efectos principales son: vasodilatación, vasoconstricción, aumento de la permeabilidad vascular, inhibición y activación de la agregación plaquetaria, dolor y fiebre, quimiotaxis y activación de PMN.

2.3b Aminas vasoactivas: histamina y serotonina

Histamina y serotonina son las dos principales aminas vasoactivas. Se almacenan en gránulos, dentro de las células que los producen, por lo que son mediadores precoces de la inflamación. El principal productor de histamina son los mastocitos, aunque también se produce por los basófilos y las plaquetas. La histamina se libera por desgranulación, en respuesta a diferentes tipos de estímulos (ej, traumatismos, frío o calor, citoquinas inflamatorias, unión de anticuerpos a los mastocitos en reacciones alérgicas y unión de elementos del sistema del complemento denominados anafilotoxinas [C3a, C5a]).

La histamina dilata las arteriolas y aumenta la permeabilidad de las vénulas. Es el principal mediador del aumento transitorio inmediato del flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular, produciendo espacios interendoteliales en las vénulas que favorecen la salida del exudado plasmático. Este efecto se realiza a través de receptores H1 presentes en las células endoteliales.

La serotonina produce efectos similares. Está presente en las plaquetas y en ciertas células neuroendocrinas, por ejemplo en el tracto gastrointestinal. La liberación de serotonina (e histamina) se activa cuando las plaquetas se agregan en contacto con el colágeno, la trombina, ADP y complejos antígeno-anticuerpo.

2.3c Citoquinas

Las citoquinas son pequeñas proteínas (entre 5 y 20 kD) de señalización entre las diferentes células durante el proceso de inflamación, la hematopoyesis y las respuestas inmunes.

Las citoquinas liberadas por los macrófagos durante la inflamación afectan a las células endoteliales, a los PMN (durante la fase aguda) y después a los fibroblastos y de nuevo las células endoteliales durante la fase de reparación. Actúan a través de receptores específicos. Las funciones de las citoquinas son múltiples (acción pro-inflamatoria, migración, proliferación, diferenciación, apoptosis) y redundantes, asegurando la transmisión de la información. Entre las principales se encuentran el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y las interleuquinas 1 β y 6 (IL-1 β e IL-6).

2.3d Factor Activador de las Plaquetas (PAF)

El PAF es otro mediador derivado de fosfolípidos. Se encuentra en plaquetas, mastocitos, basófilos, PMN, monocitos, macrófagos y células endoteliales. Sus acciones principales son: agregación de las plaquetas, vasoconstricción y broncoconstricción, adhesión leucocitaria al endotelio, quimiotaxis, degranulación y estallido oxidativo y activación de la síntesis de eicosanoides.

2.3e Óxido nítrico (NO)

El NO, producido en algunas neuronas, macrófagos y células endoteliales, actúa de forma paracrina sobre las células diana, provocando la relajación del músculo liso (vasodilatación). La vida media del NO es muy corta, por lo que sólo actúa sobre las células muy próximas al lugar de producción.

2.3f Especies reactivas del Oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS)

Los ROS pueden liberarse al medio extracelular por leucocitos después de que hayan sido activados por la presencia de microorganismos, citoquinas, complejos inmunes, o después de la fagocitosis. Las principales especies producidas intracelularmente son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($*OH$). El O_2^- puede combinarse con el NO para formar RNS. Estas sustancias son muy reactivas y oxidan biomoléculas (ADN, proteínas, lípidos) provocando la posterior pérdida de función de las moléculas afectadas.

La liberación extracelular de estas sustancias activa quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión, amplificando la respuesta inflamatoria. Están implicados en: daño de las células endoteliales y aumento de la permeabilidad vascular por adhesión de los PMN al endotelio. Provoca también daño a otras células, como glóbulos rojos o células del parénquima e inactiva anti-proteasas, como la α 1-antitripsina, lo cual provoca un incremento de la destrucción tisular.

El plasma, los fluidos tisulares, las células y compuestos de origen alimentario poseen mecanismos anti-oxidantes para neutralizar los ROS.

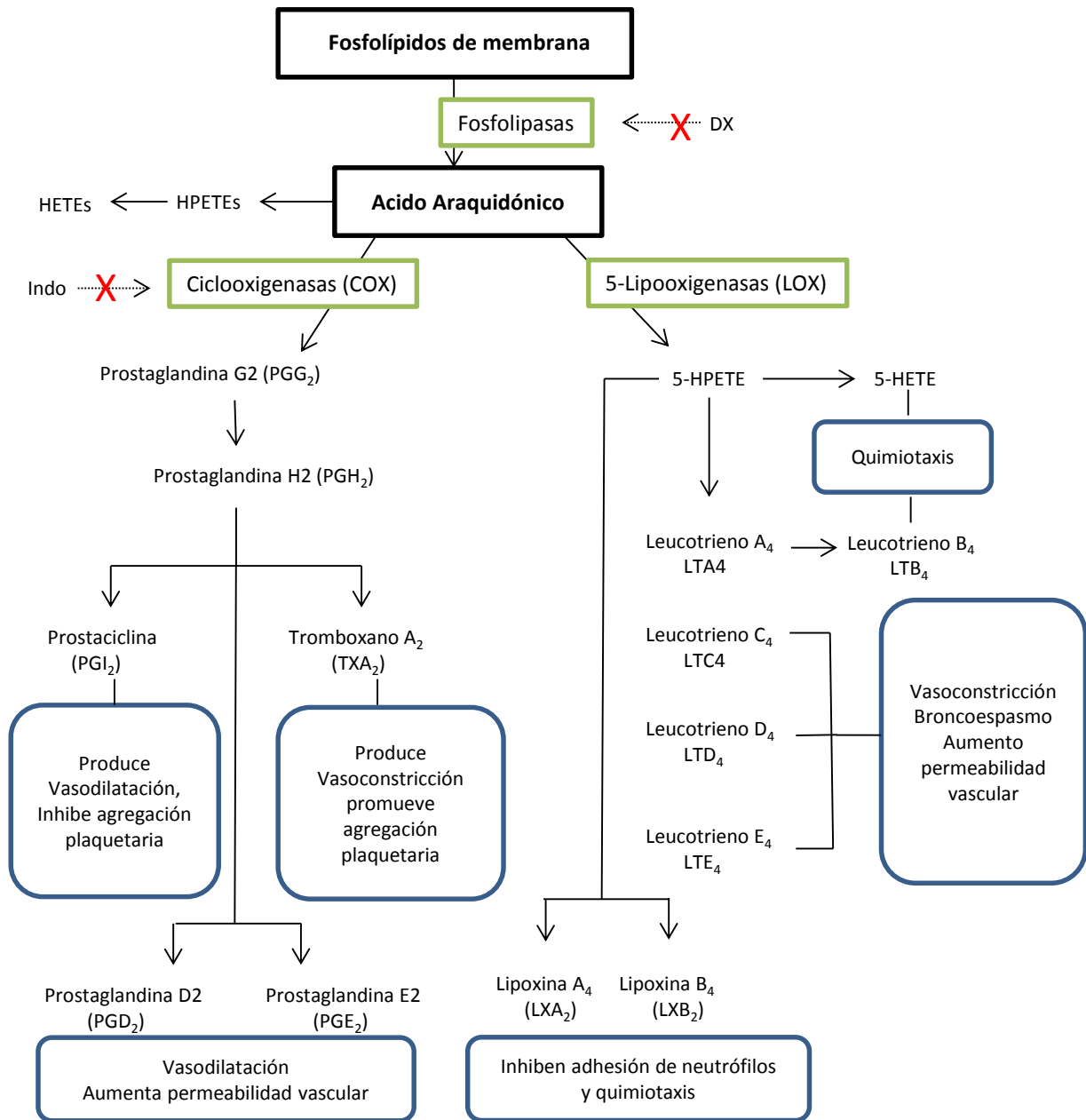


Figura I: Generación de metabolitos del ácido araquidónico y sus papeles en la inflamación. Las dianas de acción de fármacos antiinflamatorios están indicadas por una X. (Adaptado de Robbins 2000).

2.3g Constituyentes de los lisosomas de los leucocitos

Los neutrófilos y los monocitos contienen gránulos lisosomales necesarios para la digestión de los materiales fagocitados. Si estos compuestos (elastasas, colagenasas, proteasas) se vierten al exterior, pueden amplificar la respuesta inflamatoria. Para contrarrestar su efecto, existen antiproteasas en el suero, como la α 1-antitripsina y la α 2-macroglobulina.

2.3h Neuropéptidos

Los neuropéptidos, segregados por los nervios sensoriales y varios tipos de leucocitos, participan en la propagación de la respuesta inflamatoria. Entre sus funciones se encuentran: transmisión de las señales dolorosas, regulación de la presión sanguínea, estimulación de la secreción de las células endocrinas y aumento de la permeabilidad vascular.

2.3i Mediadores derivados de proteínas plasmáticas

Una gran variedad de fenómenos que participan en la respuesta inflamatoria están mediados por cascadas de proteasas plasmáticas, que pertenecen a tres sistemas interrelacionados:

- El sistema del complemento: Estas proteínas están presentes en el plasma de forma inactiva y al activarse, se convierten en enzimas proteolíticas que degradan otras proteínas del complemento, formando una cascada. Los elementos que participan en el proceso inflamatorio son C3a, C5a y en menor medida C4a. Denominadas anafilotoxinas, estimulan la liberación de histamina por los mastocitos y producen vasodilatación; además, C5a tiene capacidad quimiotáctica y activa la lipooxigenasa, generando leucotrienos, a partir del AA.
- El sistema de la coagulación: La inflamación aumenta la producción de algunos factores de la coagulación y convierte al endotelio en trombogénico. En contrapartida, la trombina promueve la inflamación por diferentes respuestas: movilización de selectina-P, producción de quimioquinas y citoquinas, expresión de receptores para integrinas en el endotelio, inducción de COX-2 con producción de prostaglandinas, NO y PAF, y cambios en la forma endotelial.
- El sistema de quininas: Son péptidos vasoactivos derivados de proteínas plasmáticas, denominadas quinínógenos. La activación de enzimas específicas permiten la conversión de precalicreína en calicreína. Esta, a su vez, genera bradiquinina, que aumenta la permeabilidad vascular y causa contracción del músculo liso, dilatación de los vasos y dolor. Por otro lado, la calicreína tiene efecto quimiotáctico, convierte C5 del sistema del complemento en C5a (también

quimiotáctico) y convierte el plasminógeno en plasmina para degradar el coágulo secundario.

2.4 Efectos sistémicos de la inflamación

Las citoquinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 producidas por las células inflamatorias, actúan sobre el conjunto del organismo para movilizar todos los recursos disponibles para luchar contra el agente infeccioso, y reparar la herida. Producen aumento de ácidos grasos y glucosa en circulación provenientes de tejido graso y de músculo esquelético donde también agotan la provisión de glucógeno por aumento del metabolismo catabólico. En particular, su acción sobre el hipotálamo permite elevar la temperatura, lo que compromete la supervivencia bacteriana. Su acción sobre el hígado, permite aumentar la síntesis de las proteínas de fase aguda (proteína C reactiva y A amiloide) y las del sistema del complemento. La hematopoyesis y la movilización de los PMN a partir de la médula ósea y su activación son efectos decisivos, así como la activación de los fibroblastos y macrófagos durante la fase reparadora.

2.5 Inflamación sistémica

Si la respuesta inflamatoria local aguda, es sostenida y de gran magnitud o no es limitada por mecanismos antiinflamatorios (por ej, en ciertas infecciones, sepsis, politraumatismos), se produce una respuesta inflamatoria sistémica. Esta respuesta se caracteriza por activación endotelial generalizada, vasodilatación y aumento en la permeabilidad de capilares y vénulas post-capilares, hipovolemia, aumento en el número tanto de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) como de precursores mieloides circulantes y alta concentración sérica de varias citoquinas pro-inflamatorias y proteínas de fase aguda (Eckersall 2000, Gill et al 2011). Esta activación generalizada no solo mantiene el proceso inflamatorio, sino que lo amplifica. Culmina en infiltración leucocitaria con daño en varios tejidos del organismo, pudiendo desencadenar caquexia, falla multi-orgánica y eventualmente la muerte.

2.6 Resolución de la respuesta inflamatoria aguda

Aunque una respuesta inflamatoria aguda es un mecanismo fisiológico destinado a la conservación de la homeostasis, puede producir daños importantes en los tejidos del huésped, y eventualmente en todo el organismo, si no es mantenida bajo un estricto control. En parte, la inflamación desaparece simplemente porque los mediadores se producen mientras persiste el estímulo, tienen vidas medias cortas, y son degradados tras su liberación. Los neutrófilos también tienen vida media corta y mueren por apoptosis horas después de extravasarse. No obstante, dado que la respuesta inflamatoria se amplifica por señales de retroalimentación positivas entre diversos sistemas, es fundamental para su control una serie de moléculas antiinflamatorias que inducen las respuestas opuestas a los mediadores inflamatorios. Esto se logra por la interacción de dos tipos celulares (biosíntesis transcelular), produciendo un nuevo tipo de mediadores lipídicos producidos por las enzimas COX y LOX, cambiando los leucotrienos y prostaglandinas pro-inflamatorias, por las lipoxinas, resolvinas y protectinas antiinflamatorias. La indometacina, al igual que otros AINES (drogas antiinflamatorias no esteroideos), inhiben las COX y por tanto las prostaglandinas, pero no afecta la actividad de las LOX (Figura 1). La dexametasona (y otros corticoides), son potentes antiinflamatorios, ya que, no sólo inhiben las fosfolipasa A2 (Goppelt-Struebe et al 1989, Lin et al 1997) que libera al AA (Figura 1), sino que además, disminuye la expresión de genes tales como, NF- κ B (factor de transcripción que induce a las citoquinas pro-inflamatorias) (Mukaida et al 1994, Auphan et al 1995, Scheinman et al 1995, Newton et al 1998) e iNOS (óxido nítrico sintetasa inducible) (De vera et al 1997, Li et al 2000, Li et al 2009). Por otro lado, los macrófagos y otras células liberan citoquinas antiinflamatorias, como TGF- β e IL-10.

2.7 Inflamación crónica

Cuando la inflamación aguda no es resuelta y por lo tanto, se mantiene durante un tiempo prolongado (semanas o meses), se habla de inflamación crónica, en la que coexisten el daño tisular y los intentos de reparación, en diversas combinaciones. Este tipo de inflamación, es el responsable del daño tisular de algunas

enfermedades humanas, como la artritis reumatoide, la aterosclerosis, la tuberculosis o la fibrosis pulmonar. Además, es importante en el desarrollo del cáncer y en enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer.

Entre las causas de la inflamación crónica se pueden distinguir:

Infecciones persistentes: Es el caso de microorganismos difíciles de erradicar, como micobacterias, ciertos hongos, virus y parásitos. Pueden dar lugar a la formación de granulomas.

Enfermedades mediadas por el sistema inmune: En ciertas circunstancias, una respuesta inmune adaptativa se puede producir de manera exagerada o inapropiada en relación al agente desencadenante. Esto genera una inflamación crónica que juega un papel importante en la patología de estas enfermedades, no produciendo beneficio, sino daño. En este tipo de enfermedades, se suelen producir brotes repetidos de inflamación, por lo que se pueden observar características mixtas de la inflamación aguda y crónica.

Exposición prolongada a agentes tóxicos: Pueden ser exógenos o endógenos. Los primeros, por material inerte y no degradable, como el polvo de sílice que inhalado por periodos prolongados puede producir la enfermedad inflamatoria de los pulmones conocida como silicosis. Los segundos, por la acumulación de lípidos tóxicos (ej lipoproteína de baja densidad [LDL]) en los vasos sanguíneos, produce una inflamación crónica de los mismos, causando aterosclerosis.

2.7.1 Características

La inflamación crónica se caracteriza por infiltración predominante de leucocitos mononucleares, destrucción de tejidos, debido a la persistencia del agente y/o de las células inflamatorias, e intentos de regeneración, reemplazando el tejido dañado con tejido conectivo, con extensa proliferación de vasos sanguíneos (angiogénesis) y linfáticos y, sobre todo, fibrosis.

Los macrófagos son el tipo celular dominante en la inflamación crónica. Pueden activarse por microorganismos a través de receptores específicos de tipo Toll o por

citoquinas como el interferón- γ (IFN- γ), una molécula segregada por los linfocitos T activados y por las células NK. Los productos de los macrófagos activados eliminan microorganismos e inician el proceso de reparación tisular, y son los responsables de la mayor parte de los daños tisulares en la inflamación crónica. Existen diferentes fenotipos de macrófagos activados, en función del tipo de activación que hayan sufrido.

Los linfocitos se movilizan en la respuesta específica del sistema inmune y se activan produciendo anticuerpos o células capaces de identificar y destruir el patógeno. Los macrófagos segregan citoquinas y quimioquinas capaces de activar y reclutar linfocitos. Las interacciones entre linfocitos y macrófagos son bidireccionales, ya que los linfocitos a su vez segregan citoquinas (sobre todo IFN- γ) con una potente capacidad de activar macrófagos. De manera que una vez que los linfocitos se activan, la inflamación tiende a agravarse, pudiéndose convertir en crónica, si los microorganismos no son erradicados.

Los eosinófilos y mastocitos son abundantes en reacciones inflamatorias mediadas por inmunoglobulina E (IgE) y en infecciones por parásitos. Los eosinófilos tienen gránulos que contienen la proteína básica principal, una proteína catiónica muy básica que es tóxica tanto para los parásitos como para los tejidos. Tienen por ello un papel importante en la destrucción de tejidos en reacciones inmunes, como las alergias.

Por último, los PMN si bien son característicos de la inflamación aguda, pueden detectarse también en inflamación crónica, bien debido a la persistencia de la infección o a mediadores producidos por los linfocitos.

3. Sistema inmune

3.1 Generalidades y activación del sistema inmune

El sistema inmune, es uno de los sistemas más importantes en la respuesta inflamatoria. El sistema inmune adaptativo es el encargado de reaccionar y eliminar

específicamente, todo aquello que considera ajeno al organismo. Los linfocitos recirculan continuamente con patrones de tráfico definidos entre la sangre, los órganos linfáticos secundarios (OLS) y la linfa. Los linfocitos vírgenes maduros, pasan a la circulación sanguínea para luego extravasarse en los OLS (ganglios linfáticos, bazo, placas de Peyer, amígdalas y adenoides). El antígeno puede llegar al ganglio linfático al ser captado en los tejidos periféricos por una célula dendrítica (CD) que lo transportará hacia el ganglio más cercano donde será presentado a los linfocitos T vírgenes. Asimismo, el sistema de drenaje linfático transporta antígenos hacia los órganos linfáticos secundarios drenantes para permitir su reconocimiento por los linfocitos B específicos que se hayan extravasado. Los linfocitos T y B que reconocen antígenos y reciben señales coestimuladoras apropiadas se activan, sufren expansión clonal y adquieren funciones efectoras particulares con patrones de migración característicos: los Th1, Th2 y Th17 pasan a circulación para extravasarse en tejidos periféricos; las células Th foliculares permanecen en los OLS para cooperar con los linfocitos B que desencadenarán respuestas humorales y los linfocitos T regulatorios ejercerán sus funciones tanto en los OLS como en los tejidos periféricos. La mayoría de los linfocitos T que han proliferado mueren en semanas y sólo una pequeña proporción permanece como células de memoria. Los linfocitos B activados en los OLS originan plasmoblastos y células B de memoria; los plasmoblastos pueden permanecer en los OLS y producir anticuerpos o abandonarlos y por torrente circulatorio llegar a sitios distantes como médula ósea y mucosas. Las células B de memoria también recircularan entre la sangre, los OLS y la linfa.

Las CDs cumplen la función de “centinelas” capaces de detectar la entrada de patógenos en un contexto de inflamación, iniciando la respuesta inmune innata y adquirida (Asselin-Paturel et al 2001, Matzinger 2002, Skoberne 2004). También participan en el balance entre inmunidad y tolerancia inmunológica (Quah and O’neill 2005). Representan una población celular heterogénea que se encuentra distribuida en la mayoría de los tejidos periféricos, en particular en sitios de interfase con el medio ambiente (piel y mucosas [Banchereau 2000]). El mejor marcador para las CDs murinas es la integrina CD11c (Steinman 2001). Una vez en contacto con el antígeno, las CDs inmaduras lo internalizan por diversas vías, como la endocitosis mediada por receptor y la endocitosis no específica de partículas y solutos

(fagocitosis y macropinocitosis) (Sallusto et al 1995). Luego comienza un complejo proceso de maduración funcional que conduce a una potente actividad inmunoestimuladora (Guernonprez et al 2002). Varios eventos forman parte de este proceso: reorganización del citoesqueleto, adquisición de motilidad celular, migración a los tejidos linfoides, presentación de complejos péptido antigénico-complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la superficie celular, aumento de la capacidad de activación de células T y desarrollo de extensiones citoplasmáticas o “dendritas”, aumento de la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD40), moléculas de adhesión e integrinas (Adams et al 2005, Quah and O’neill 2005). Asimismo, produce un patrón de citoquinas que depende del tipo de estímulo madurativo, el subtipo de CDs estimulado y su origen.

Los linfocitos B son las células responsables de la producción de anticuerpos, pero también tienen un rol importante como células presentadoras de antígenos (CPA). El receptor de células B (BCR) reconoce antígenos proteicos en forma nativa con alta afinidad y los presenta en el contexto de MHC-II (Batista et al 2001), junto con la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 y la activación de linfocitos T (Mond et al 1995). Existe una población de linfocitos B que generan respuestas humorales en presencia de antígenos T-independientes (polisacáridos y lípidos), es decir no necesitan de la interacción con linfocitos T CD4 para activarse.

Los linfocitos T que emigran del timo son células maduras que expresan un único tipo de TCR y la molécula de CD4 o CD8 en su superficie. Circulan por la sangre en estado de reposo (*naïve*) hasta extravasarse en los órganos linfáticos secundarios. Allí los linfocitos T CD4 se activarán al reconocer antígenos en el contexto de MHC-II y los linfocitos T CD8 se activarán por el reconocimiento de péptidos presentados en contexto de MHC-I.

El linfocito T para activarse necesita recibir dos señales diferentes, el reconocimiento a través del TCR del péptido antigénico presentado por las moléculas de histocompatibilidad y el reconocimiento a través del CD28 de las moléculas coestimuladoras expresadas por la célula presentadora de antígeno (CD80 y CD86).

Las células T CD8+, en ganglios linfáticos en un contexto de infección o de inflamación, se activan al contactar con las CDs maduras con la participación de

células *T helper*. Durante la activación, se produce la expansión clonal y las células adquieren dos funciones efectoras críticas: la capacidad de inducir la muerte celular por apoptosis de la célula blanco y de secretar citoquinas (Chowdhury and Liebermann 2008). Los mecanismos de muerte celular comprenden la liberación de moléculas preformadas de perforina y granzimas (mecanismo secretorio) o la vía de FAS/FASL. Las células T CD8 activadas migran al tejido inflamado y secretan IFN- γ , TNF- α y quimioquinas inflamatorias, luego de la interacción con el complejo MHCII-antígeno. De esta manera, reclutan diferentes células inmunitarias y contribuyen con la respuesta inflamatoria local (Slifka and Whitton 2000).

Los linfocitos T CD4+ convencionales controlan la inmunidad adaptativa mediante la activación, de modo antígeno- específico, de otras células efectoras tales como células T citotóxicas CD8, células B y macrófagos. Debido al patrón de citoquinas que secretan y al tipo de respuestas en las que colaboran, se distinguen dos grandes grupos de células: Th1 (IL-2, IFN γ , TNF α) que inducen respuesta celular y Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) (Mosmann and Coffman 1989) que promueven la respuesta inmune humoral.

3.2 Regulación del sistema inmune

El sistema inmune posee un complejo sistema regulatorio que impide el ataque de las células efectoras a las células somáticas. Esta regulación se da por dos fenómenos: la tolerancia central y la periférica. En la tolerancia central, se produce la delección clonal de las células que reaccionan frente a antígenos propios. En la tolerancia periférica, aquellas células que son reactivas a antígenos propios son eliminadas o mantenidas anérgicas en la periferia. El balance entre inmunidad y tolerancia determina el resultado de una reacción inmune.

Dentro de los tipos celulares supresores de la respuesta inmune se encuentran las células T regulatorias (Treg). Su actividad es esencial para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica y la homeostasis del sistema inmune. Son una pequeña población de células T con una potente actividad supresora (Sakaguchi et al 1995). El factor de transcripción Foxp3 es el regulador crítico del desarrollo, función y

homeostasis de las células regulatorias (Hori et al 2003, Fontenot et al 2003) y es el marcador más específico del linaje Treg en ratón. En humanos no hay un marcador específico, siendo CD4⁺CD25^{high} la caracterización más aceptada (Baecher-Allan et al 2001). Hay numerosos subtipos de células T regulatorias. Se pueden clasificar en dos tipos según su origen: las naturales (nTregs) de origen tímico y las inducidas (iTregs) originadas en periferia a partir de células T convencionales mediante estimulación antigénica bajo determinadas condiciones (IL-10, TGFβ). Las nTreg están presentes en el ratón, en ausencia de cualquier tipo de afección y son importantes tanto en el mantenimiento de la autotolerancia inmunológica (Shevach 2000, 2006) como en infecciones, tumores (Liyanage et al 2002), trasplantes (Wood and Sakaguchi 2003) y reacciones de injerto contra huésped (Shimizu et al 1999). Una población con fenotipo y función similar ha sido identificada en humanos (Dieckmann et al 2001, Jonuleit et al 2001).

Como todas las células T, las células Treg expresan en su superficie un receptor T (TCR) que permite el reconocimiento específico de péptidos antigénicos en el contexto de moléculas de MHC de clase II y para su activación requieren además una señal coestimuladora por parte de las CPAs (Wing et al 2005). Asimismo las Treg expresan constitutivamente moléculas de superficie (CD25 (Robb et al 1981), CTLA-4 (Walunas et al 1994), GITR (Nocentini et al 1997) y LAG-3 (triebel et al 1990) que han sido descritas también en células activadas. Los mecanismos de supresión pueden agruparse bajo cuatro categorías: 1) liberación de citoquinas inhibitorias (IL-10, TGFβ, IL-35) (Vignali et al 2008, Tang and Bluestone 2008, Sojka et al 2008) 2) apoptosis mediante la liberación de granzima A y B (Gondek et al 2005, Cao et al 2007) 3) interferencia con funciones metabólicas de las células T convencionales (deprivación de IL-2, activación del receptor de adenosina 2A, transferencia de AMPc a las células T convencionales) (Chen et al 2005, Tang and Bluestone 2008, Sojka et al 2008) y 4) modulación de la maduración y función de las CDs (inducción deIDO) (Mellor and Munn 2004, Chen et al 2005, Tang and Bluestone 2008, Sojka et al 2008).

Por otro lado, las células mieloides inmaduras pertenecen a diferentes poblaciones celulares que abarcan todos los estadios de diferenciación de la mielopoyesis (proceso de generación, desarrollo y maduración de los componentes mieloides de la sangre). Pueden dar lugar a eritrocitos, monocitos, macrófagos, CDs y granulocitos

(eosinófilos, basófilos y neutrófilos). En condiciones fisiológicas estas células se encuentran en médula ósea, pero en condiciones inflamatorias agudas o crónicas se pueden encontrar en circulación, ganglios y bazo (Ostrand-Rosenberg and Sinha 2009). En los últimos años se ha descrito un importante rol en la inmunosupresión, de ahí el nombre células supresoras derivadas de línea mieloide (MDSC) (Gabrilovich and Nagaraj 2009). En ratones están caracterizadas por la co-expresión del antígeno de diferenciación del linaje mieloide GR1 y CD11b (MAC1) (Kusmartsev et al 2004), mientras que en humanos, son comúnmente caracterizadas como CD14⁻ CD11b⁺ (Almand et al 2001). Estas células, cuando se activan en un contexto patológico, producen NO y ROS. A su vez diferentes poblaciones pueden utilizar diferentes mecanismos de supresión de la respuesta inmune. Sin embargo, mecanismos comunes incluyen aumento de expresión de arginasa e iNOS privando de L-arginina necesaria para la proliferación de células T (Bronte and Zanovello 2005, Rodriguez and Ochoa 2008), inducción de Treg (Huang et al 2006) y expresión de CTLA-4 (Yang et al 2006).

4. Relación entre inflamación y cáncer

Desde 1863, cuando Virchow observó por primera vez infiltrados de leucocitos en tejidos tumorales, se ha ido acumulando evidencia clínica y experimental que muestra que la incidencia de ciertos tumores es mucho mayor en sitios de inflamación crónica, y ésta es reducida con el uso prolongado de drogas antiinflamatorias (Duperron and Castonguay 1997, Smalley and DuBois 1997, Reddy et al 1999, Balkwill and Mantovani 2001, Coussens and Werb 2002, Shacter and Weitzman 2002, Yao et al 2003, Nohiri et al 2013). En efecto, el cáncer de colon es común en individuos con enfermedades inflamatorias del intestino tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa crónica (Fornaro et al 2009, Rogler 2013, Adams and Bromermann 2013), el cáncer gástrico está asociado a gastritis resultado de la infección con *Helicobacter pylori* (Blaser et al 1995, Ernst and Gold 2000, Ladeira et al 2004 Correa and Piazuelo 2011); el carcinoma de vejiga es más frecuente en pacientes afectados por cistitis crónica producida por esquistosomiasis o por catéter urinario permanente (Kaufman et al 1977, Groah et al 2002, Nair et al 2011) y el carcinoma hepatocelular ocurre más a menudo en el contexto de

inflamación crónica del hígado, generada por infecciones virales crónicas, consumo de alcohol, enfermedades autoinmunes del hígado y hemocromatosis (Harrison and Bacon 2005, Sohal and Sun 2011, Ellerwick et al 2012). Asimismo, en algunos animales portadores de tumor en un sitio anatómico determinado, la aplicación de inflamógenos, exagera el crecimiento tumoral y la aplicación de antiinflamatorios lo disminuye. De hecho, muchos tumores generan por sí mismos un ambiente pro-inflamatorio compuesto de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, estroma activado, metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular y agentes que inducen daño en el ADN, lo cual podría ampliar un proceso inflamatorio pre-existente que a su vez generaría un mayor crecimiento y malignidad del tumor (Muller and Scherle 2006, Le et al 2007).

Muchos modelos experimentales han sido explorados para entender la relación entre inflamación y cáncer, tanto la establecida previamente, como la inducida por el propio tumor. Por ejemplo, algunos tumores murinos muestran un crecimiento acelerado, tanto, cuando células tumorales son mezcladas ex-vivo con células inflamatorias y luego la mezcla es inoculada en el ratón (Prehn 2007), como cuando agentes pro-inflamatorios son inoculados en el ratón portador de tumor. De manera similar, en pollos, los tumores inducidos por el virus del sarcoma de Rous típicamente se forman en el sitio de inoculación viral pero no en sitios distantes. La inflamación asociada con la herida producida por la inyección del virus parece ser un requerimiento necesario para el crecimiento del tumor, ya que tumores adicionales pueden ser inducidos en sitios distantes, simplemente produciendo heridas en las aves infectadas; este requerimiento de inflamación parece ser mediado por factores producidos por células inflamatorias (Kenny and Bissel 2003). De la misma manera, señales inflamatorias tales como quimioquinas, han sido experimentalmente estudiadas en la regulación del espectro de metástasis, en un modelo murino de carcinoma de mama en el cual el patrón de metástasis ha sido atribuido a interacciones específicas entre la quimioquina CXCL12 –altamente expresada en órganos target del cáncer de mama - y su receptor CXCR expresado en las células del carcinoma mamario (Muller et al 2001).

Por otro lado, se debe recordar que la inflamación es, en principio, un proceso fisiológico auto-limitante que el organismo elabora frente a fenómenos de daño tisular apuntado a regenerar el tejido afectado (Mantovani et al 2008) y tiene un rol

clave en la activación de la respuesta inmune adaptativa, destinada a eliminar patógenos, en forma específica y eventualmente a mediar el rechazo de los tumores inmunogénicos (Nathan 2002, Muller and Scherle 2006, Siegemund and Zeitz 2011).

El balance entre estos dos roles contrapuestos de la inflamación puede inclinarse a veces hacia el lado del rechazo tumoral, como ocurre en ratones inmunizados contra ciertos tumores inducidos por dosis masivas de carcinógenos químicos o virales, en los cuales la expresión de fuertes antígenos tumorales junto con señales inflamatorias y de daño (por ejemplo, heat shock proteins) pueden inducir la maduración de CD8, representando el primer paso de una respuesta inmune anti-tumoral dependiente de células T (Hellström et al 1978, Garg et al 2010). En otras situaciones, como vimos arriba, el balance puede inclinarse hacia el lado de la exacerbación tumoral, como ocurre, cuando la respuesta inflamatoria no es resuelta y los mecanismos inflamatorios tales como, las interacciones selectina-ligando, la producción de metaloproteinasas y la función de quimioquinas están dirigidas para promover el crecimiento neoplásico y las metástasis o para evadir los mecanismos de defensa del huésped (Ver Punto 5) (Rossi and Zlotnik 2000, Homey et al 2002, Nelson and Ganss 2006, van Kempen et al 2006). Esta puede ser la razón por la que históricamente no se ha encontrado correlación entre intensidad de infiltrado inflamatorio con un pronóstico definido en diferentes cánceres humanos (Bröker et al 1984, Torres and Sánchez 1988, Gallo et al 1991, Paun et al 2003, Sconocchia et al 2011), dado que el pronóstico dependería de qué tipo de infiltrado (si relacionado a rechazo o exacerbación tumoral) predomina en el tumor. Por lo tanto los estudios destinados a comprender los mecanismos celulares y moleculares que subyacen el interjuego entre estas dos fuerzas opuestas en el espacio de un órgano o tejido podrían contribuir a desarrollar nuevas estrategias para restringir el cáncer en esos sitios anatómicos.

Sin embargo, la inflamación local no es suficiente para explicar los efectos sistémicos adversos producidos por el tumor, que son, en definitiva los que llevan a la muerte. Estas pueden ser las causas por las cuales no se le otorgó a la inflamación la debida importancia en la clínica. Hay una creencia generalizada de que estos efectos sistémicos están asociados a la diseminación metastásica. Nosotros no cuestionaremos esta creencia. No obstante, sugerimos, basados en

datos previos de nuestro laboratorio, que la inflamación sistémica, también podría, al menos en algunos casos, jugar un rol significativo en la patología general del cáncer (Chiarella et al 2008), ya que su desregulación puede generar alteraciones de la homeostasis con graves consecuencias para el paciente. En este sentido, se podrían entender algunos de los efectos adversos del cáncer, tales como, alteraciones metabólicas, funcionales y tisulares que pueden conducir a caquexia y a falla multiorgánica, que no siempre pueden explicarse como resultado de metástasis.

Además, un número variado de patologías no oncológicas tales como insuficiencia cardiaca, artritis reumatoidea, insuficiencia renal, fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), obesidad mórbida, diabetes (Hasper et al 1998, Vernooy et al 2002, Gan et al 2004, Vidt 2006, Faintuch et al 2007, Cirillo et al 2009, Oztürk et al 2013) tienen como factor común la presencia de un estado inflamatorio crónico sistémico, que en algún punto de su evolución, puede desencadenar en el síndrome de caquexia.

El síndrome de caquexia se caracteriza por astenia, pérdida de peso, anorexia y atrofia de la masa muscular, que a pesar de un correcto aporte calórico y nutricional no se logra revertir (Sanz et al 2004, Sanz-Ortiz 2004). Además, los pacientes con caquexia exhiben alteraciones deletéreas en médula ósea, hígado, tejido adiposo, riñón, músculo y células endoteliales (Reid and Li 2001, De Larichaudy et al 2012

A pesar de lo expuesto y diferente de lo que ocurrió con la inflamación local, la relación entre cáncer e inflamación sistémica ha sido, hasta hoy, relativamente poco estudiada. Una posible explicación de este hecho podría estar relacionada con la creencia generalizada de que la inflamación sistémica es más una excepción en vez de una regla en la biología del cáncer. Sin embargo, recientes ensayos clínicos parecen cuestionar esta creencia. En efecto, en los últimos años, algunos parámetros aislados de inflamación sistémica han sido asociados con varias neoplasias humanas y han sido correlacionados con pérdida de peso, hipermetabolismo, anorexia, caquexia y mal pronóstico (Mc Ardle et al 2006, Lamb et al 2006, Mc Millan 2008, Deans et al 2009, McMillan 2009, Neal et al 2009, Pierce et al 2009, Mc Ardle et al 2010, Meng et al 2013, Hall et al 2013), aunque esos marcadores aislados no fueron, en general, integrados con otros para definir, en

pacientes con cáncer, la presencia de la entidad conocida como inflamación sistémica. Sin embargo, a pesar de estas observaciones clínicas, pocos estudios experimentales apuntados a evaluar la presencia de inflamación sistémica y sus efectos sobre el crecimiento tumoral y sobre el organismo portador, han sido llevados a cabo. Kamate reportó que el crecimiento del mastocitoma P815 subcutáneo en los ratones singeneicos DBA/2, fue acompañado por un fenómeno de inflamación sistémica temprana comenzando al día 5 después de la inoculación tumoral, que desaparece rápidamente después de que el tumor se ha implantado (Kamate et al 2002). Sin embargo, los autores no analizaron lo que ocurría más tarde, después de que el tumor iniciaba su crecimiento exponencial.

Otros autores han mostrado que la inflamación sistémica inducida por inyección intravenosa de lipopolisacáridos (LPS) significativamente aumentó el potencial metastásico del carcinoma de Lewis en ratones, pero sin evaluar si una condición de inflamación sistémica fue naturalmente producida durante el crecimiento tumoral (Mc Donald et al 2009).

5. Relación entre cáncer y sistema inmune

La relación entre cáncer y sistema inmune, también lleva más de un siglo de historia. Paul Ehrlich en 1909, propuso la existencia de antígenos tumorales capaces de despertar una respuesta inmune contra el tumor. La teoría de la inmunovigilancia fue extendida por Thomas y Burnet en 1957. Utilizando ratones knock-out se ha visto que la trasplantabilidad de tumores inducidos por carcinógenos químicos o virales, suele ser mayor en ratones deficientes en su respuesta inmune (nude, SCID) (Kaplan et al 1998). Asimismo, en ratones y seres humanos inmunosuprimidos (trasplantados, VIH) se ha visto un aumento significativo en la incidencia de ciertos cánceres. En contraposición, en estos mismos estudios, otros tipos de tumores tienen una incidencia igual o incluso menor que la observada en individuos normales (Sheil 1986, Penn 1998, Bosshof and Weiss 2002, Biggar et al 2007, van Leeuwen et al 2010). Esto indica que diferentes tumores murinos y humanos pueden ser inmunogénicos, o por el contrario, exhibir una inmunogenicidad débil o indetectable (Hewitt et al 1976, Ruggiero et al 1985, Franco et al 1996, Speiser et al 1997), con lo

cual la inmunovigilancia podría no ser un fenómeno universal. Los tumores susceptibles a inmunovigilancia tienen que vencer al sistema inmunológico para evitar ser reconocidos y eliminados. Esto lo pueden lograr por dos vías diferentes: Por un lado, se han reportado mecanismos asociados directamente a la célula tumoral, incluyendo la pérdida o cambios de expresión de antígenos tumorales o la disminución de MHC clase-I. Estos mecanismos se podrían englobar en el concepto establecido por la teoría de la inmunoección. Por otro lado, la progresión tumoral puede inducir una falla en la respuesta inmune innata o adaptativa mediante la secreción de factores inhibitorios como IL-10 y TGF- β (Waldman 2003; Zheng, Koropatnick et al. 2006; Lin et al. 2007), y la expansión de poblaciones celulares supresoras (Treg [CD4/CD25/Foxp3] y MDSC [Gr1/CD11b]; (Gabrilovich and Nagaraj 2009) que interfieren con la respuesta anti-tumoral. Estos últimos mecanismos se podrían asociar a otro concepto que es el de inmunomodulación. Esto sugiere que bajo ciertas circunstancias el sistema inmune podría esculpir o editar al tumor seleccionando clones de células tumorales menos inmunogénicas y bajo otras circunstancias, la progresión tumoral podría editar o esculpir al sistema inmune, alterando la respuesta inmune anti-tumoral.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

El objetivo general de esta Tesis, es evaluar si el crecimiento de diferentes tumores, es acompañado por manifestaciones de inflamación sistémica y si, eventualmente estas manifestaciones pueden inducir mecanismos contra-inflamatorios compensadores. Sobre esta base procuraremos determinar cuál es el efecto de la inflamación sistémica sobre la cinética tumoral y la respuesta inmune inducida en el organismo contra el tumor, y cuál es su relación con las fallas multiorgánicas y las alteraciones metabólicas conocidas en su conjunto como caquexia, que no pueden ser explicables fácilmente como resultado de la localización del tumor primario ni de sus metástasis. Si, efectivamente, la inflamación sistémica contribuye significativamente a la patología generada por el tumor, nuestra propuesta sería combinar drogas antiinflamatorias con tratamientos convencionales contra el cáncer. De este modo atacando no sólo a la célula maligna, sino también a la inflamación sistémica, podríamos tal vez, obtener mejores resultados terapéuticos que los observados hasta hoy. Discutiremos además, sobre la base de estudios en ratones knock out para ciertos componentes de la respuesta inflamatoria, los posibles mecanismos moleculares asociados al efecto promotor de la inflamación sistémica sobre el crecimiento tumoral y por último, consideraremos la limitaciones de los tratamientos antiinflamatorios en organismos portadores de tumor.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Estudiaremos las manifestaciones de inflamación sistémica asociadas al crecimiento de 4 tumores murinos, de diferente origen, estirpe histológico e inmunogenicidad y de 1 tumor humano creciendo en ratones nude y evaluaremos la relación entre el grado de inflamación sistémica inducida por cada tumor y su agresividad. Determinaremos, además, si las manifestaciones de inflamación sistémica son acompañadas por una respuesta contra-inflamatoria sistémica y el origen de ambas respuestas (Capítulo 1).

- b) Como ejemplo de la relación entre la agresividad tumoral y la inflamación sistémica, evaluaremos su influencia sobre el síndrome caquético y sobre el crecimiento tumoral y exploraremos posibles mecanismos moleculares asociados a esta influencia. Para este fin utilizaremos ratones knock out para el receptor TLR-4, sobre la base de que la activación de este receptor, a través de las vías de señalización P38 y JNK MAPK, ha sido postulada como un evento importante en la inflamación asociada a carcinogénesis (Capítulo 2).
- c) Estudiaremos la relación entre inflamación sistémica e inmunosupresión asociada al crecimiento de un tumor murino inmunogénico, como una de las formas en que la inflamación sistémica contribuye a la agresividad tumoral (Capítulo 3).
- d) Investigaremos si la atenuación de la inflamación sistémica puede mejorar la efectividad de tratamientos convencionales contra el cáncer (Capítulo 4).
- e) Por último evaluaremos las posibles limitaciones de los tratamientos antiinflamatorios destinados a contrarrestar la inflamación sistémica asociada al crecimiento tumoral (Capítulo 5).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales:

Se utilizaron ratones convencionales y knock out para el receptor de tipo Toll 4 (TLR-4) de la cepa BALB/c, criados en el bioterio de la división de Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires. Los ratones nude fueron obtenidos de la Comisión de energía atómica (CONEA). Los animales fueron equiparados por sexo y edad en cada experimento y su cuidado se realizó según las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de Laboratorio, del National Health Institute (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

Modelos tumorales:

Tumor MC-C: Fibrosarcoma fuertemente inmunogénico inducido en un ratón de la cepa BALB/c por la administración del carcinógeno 3-metilcolantreno y mantenido por pasajes singeneicos en forma subcutánea (s.c.) en ratones hembras de 2-4 meses de edad. Se utilizaron los pasajes del 5 al 20. No genera metástasis.

Tumor LB: Linfoma T espontánea surgida en un ratón macho de la cepa BALB/c y mantenido por pasajes s.c. en ratones singeneicos. No es inmunogénico y presenta una temprana diseminación en múltiples órganos.

Tumor CEI: Carcinoma epidermoide indiferenciado espontáneo no inmunogénico mantenido por pasajes en s.c. en ratones singeneicos. Presenta limitada capacidad metastásica.

Tumor C7HI: Adenocarcinoma de mama no inmunogénico, inducido con medroxiprogesterona (MPA) en un ratón hembra de la cepa BALB/c y mantenido por pasajes s.c. en ratones singeneicos. Produce abundantes metástasis en pulmón e hígado.

Tumor PC3: Línea de carcinoma de próstata humano mantenido por pasajes de cultivo.

Cálculo del volumen, peso, agresividad y capacidad metastásica del tumor:

Los diámetros tumorales fueron medidos con calibre y el volumen tumoral se calculó según la fórmula de Attia y Weiss: Volumen tumoral = $0.4 (a \times b^2)$, donde a y b son los diámetros mayor y menor respectivamente. Se registró el volumen y el peso de 10 tumores de distinto tamaño y se realizó una regresión lineal. El resultado fue la

fórmula: volumen tumoral = $861,61 \times \text{peso del tumor} - 511$, donde un tumor de 1000 mm³ pesa 1,75 gramos.

La agresividad tumoral fue calculada como la inversa de la mediana de supervivencia de los ratones inoculados con un número definido de células tumorales. La capacidad de metastizar fue calculada como la inversa del intervalo libre de metástasis (ILM). Experimentalmente, el ILM fue definido como el día después de la inoculación tumoral al cual el 50% de los ratones muestran crecimiento metastásico.

Dosis tumoral 50:

La dosis tumoral 50 (DT₅₀) es definida como el número de células tumorales capaz de crecer en el 50% de los ratones. Se la calcula utilizando el método de Reed y Muench. Cada tumor tiene una DT₅₀ característica.

Suero

Se extrajo sangre de ratones normales y portadores de tumor. La sangre se mantuvo 1 h a temperatura ambiente para que coagule. El suero obtenido después de la centrifugación se almacenó a -20°C hasta ser utilizado.

Marcadores de inflamación sistémica:

El recuento total de leucocitos en sangre periférica se determinó utilizando una cámara de Neubauer, luego de diluir (1/10) la sangre en una solución de ácido acético 2% (TURK). La fórmula leucocitaria se contó en frotis preparados en portaobjetos, que se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa. La concentración sérica de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6 y IFN- γ (RD Systems, Minneapolis, MN, USA) y de la proteína de fase aguda proteína A amiloide (SAA, Biosource International, Camarillo, CA, USA) se midió mediante kits de ELISA.

Marcadores de contra-inflamación:

Se midió la concentración sérica de las citoquinas antiinflamatorias IL-10 y TGF- β (BD Biosciences Pharmigen, San Diego, CA, USA) y del glucocorticoide corticosterona (MP Biomedicals RIA kit) a través de kits de ELISA y RIA, respectivamente.

Estudios histopatológicos:

Para el estudio histopatológico de tumores subcutáneos y de distintos órganos, el material a analizar se fijó en formol y se incluyó en parafina. Se obtuvieron cortes seriados de 5 µm que fueron teñidos con la técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E).

Extracción de RNA:

El RNA total fue extraído de forma aséptica de tejidos normales y tumorales. Se agregó 50-100 mg de tejido congelado en 1 ml de buffer de lisis SV y se homogeneizó con un homogenizador Polytron. Después de la dilución en agua destilada libre de RNAsa, la concentración de RNA fue cuantificada por espectrofotometría y la calidad chequeada por electroforesis en gel.

RT-PCR:

Se incubó RNA total (1 g) con 5x AMV/Tfl buffer de reacción, 1µl de 10 mM dNTP, 2,5 µl de 25 mM MgSO₄, 50 pmol de primers, 1 µl de AMV transcriptasa reversa (5 U/µl), 1 µl de Tfl DNA polimerasa (5 U/µl) y agua libre de nucleasa hasta completar un volumen final de 50 µl y una gota de aceite mineral por 45 min a 42°C para generar la primera hebra de cDNA. Siguiendo esto, la reacción de PCR fue realizada en el mismo tubo en el termociclador. Se realizaron experimentos preliminares para determinar el número correcto de ciclos para amplificar el cDNA de cada producto génico durante la fase exponencial de PCR.

Medio de cultivo:

Para todos los experimentos se utilizó RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA). Cuando fue necesario, el medio fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (Natocor, Argentina), 2 mM de L-glutamina, 1% de antibiótico (penicilina / estreptomycin / anfotericina B) y 5x10⁻⁵ M de 2-mercaptoetanol (Gibco Grand Island, NY, USA) (medio completo).

Obtención de suspensiones celulares:

La médula ósea, el tumor, el bazo o el hígado se extrajeron de forma estéril, se disgregaron mecánicamente en RPMI, primero con tijeras y luego a través de una malla metálica. El sobrenadante de tumor o de hígado se obtuvo a través de la homogeneización de 1 gramo de tejido en 10 ml de RPMI, luego de la centrifugación

a 6000 x g por 10 minutos y filtrado en poros de 0,2 μm . Se guardó a -20°C para su posterior uso. Las células polimorfonucleares (PMN) fueron aisladas a partir de sangre periférica, utilizando un gradiente de ficoll hypaque (δ 1,099 g/cm^3).

Obtención de medio condicionado con GM-CSF murino:

Se empleó la línea celular J558 (Chiarella et al 2008) que proviene de células del mieloma X63-Ag8 transfectadas con el vector de expresión BCMGNeo y que contiene el ADNc que codifica para el factor estimulador de colonias de granulocito-macrófago (GM-CSF) murino. Las células se cultivaron en IMDM suplementado con penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 59 μM y 10% SFB (IMDM-10). Periódicamente se realizó una selección positiva del stock de células J558 con G418 (sigma), ya que el vector transfectado incluye un casete de resistencia a dicho compuesto. El cultivo de selección se realizó en IMDM-10 conteniendo 1mg/ml de G418. El stock de J558 se preservó alicuotando en ampollas en N_2 líquido sin G418 en una mezcla de 1/10 partes de dimetilsulfóxido (DMSO) en SFB. Para la preparación periódica de medio condicionado, se descongelaron ampollas de stock, y se cultivaron en suspensión en IMDM-10 en presencia del factor de selección en botellas de cultivo de 25 cm^2 (Corning). Luego de 72 hs de cultivo, las células se repicaron en botellas de 75 cm^2 en una concentración de 2×10^5 células/ml de medio sin G418 y 72 hs más tarde (fase estacionaria) se recolectó el suero de cultivo. El medio condicionado así obtenido fue fraccionado y conservado a -80°C hasta su utilización.

Diferenciación de células dendríticas:

Las células de médula ósea se extrajeron del fémur o tibia de ratones BALB/c y se resuspendieron en RPMI conteniendo 1% de SFB. Luego de lisar los eritrocitos con cloruro de amonio (0.14M), las células se lavaron y se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 células/ml en medio completo conteniendo $5 \times 10^{-5}\text{M}$ de mercaptoetanol y 15% de sobrenadante de cultivo de la línea J588 productora del factor de crecimiento-granulocito-macrófago (GM-CSF). Al cabo de 8 días de cultivo, se obtiene una población con más del 80% de células dendríticas (CD11c⁺).

Medio condicionado de tumor MC-C:

Para obtener medio condicionado del tumor MC-C, primero se extrajo quirúrgicamente y luego fue disgregado en Mesh. Las células obtenidas fueron resuspendidas en medio completo y centrifugadas por 10 min a 1200 rpm a 4°C. El pellet de células fue resuspendido nuevamente en medio completo y cuantificado su concentración. En placas de petri (Corning) se sembraron a razón de 5×10^5 células/ml. A las primeras 24 hs y luego cada 48 hs la mitad el medio fue reemplazado por medio completo fresco. En cada recambio, el medio extraído fue centrifugado a 15 min a 1500 rpm a 4°C y el sobrenadante fue alicuotado y guardado a -80°C para su posterior uso.

Citometría de flujo:

Se estudió mediante citometría de flujo el fenotipo de leucocitos de ratones portadores de tumor y de precursores de médula ósea mediante alguno de los siguientes anticuerpos acoplados a FITC o a PE: anti-CD11c (marcador de células dendríticas), anti-Gr1 y anti-Mac1 (células mieloides inmaduras) y anti-MHC-I. Se evaluó la liberación de especies reactivas del oxígeno, por fluorescencia de 123-dihidrorodamina. Las células se analizaron usando un citómetro FACS (BD Biosciences) y el programa FCS Express (De novo software, Los Angeles, USA).

Ensayo de inmunización:

Implantación-extirpación: Los tumores fueron extraídos quirúrgicamente de los ratones cuando el volumen fue de 400 mm^3 . Dos semanas más tarde, los ratones se desafiaron en el flanco opuesto con células tumorales vivas.

Dosis sub-letales: Los ratones que luego de una primera dosis baja de células tumorales ($\leq 5 \times 10^4$ células vivas de MC-C) no presentaron crecimiento tumoral, fueron re-inoculados con 2×10^5 células del mismo tumor.

Células tumorales irradiadas: Suspensiones celulares de MC-C se irradiaron con 90 Gy en una placa de plástico. Los rayos X fueron generados en un aparato de radioterapia Philips 250/15 a 220 Kv, 14 mA y filtrados con 1 mm de aluminio. Los animales fueron pre-tratados con dos dosis subcutáneas (s.c.) de $3-4 \times 10^6$ de células tumorales irradiadas, 7 y 14 días antes del desafío con células vivas del tumor MC-C.

Test de Winn:

La actividad anti-tumoral de esplenocitos fue investigada con el test de Winn mezclándolas *in vitro* con células tumorales en una proporción célula de bazo/célula tumoral de 100/1 e inmediatamente después inoculando la mezcla en ratones donde se evaluará el crecimiento tumoral.

Citotoxicidad mediada por células:

0.1 ml de células tumorales de cultivo marcadas con cromo se incubaron con el mismo volumen de suspensiones celulares de bazo en una proporción célula de bazo/célula tumoral de 100/1 durante 4 h en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. Transcurridas las 4 h las células fueron centrifugadas y la radioactividad del sobrenadante fue medida en un contador gama (Beckman). El porcentaje de lisis específica fue calculado como: $(\text{cpm experimental} - \text{cpm normal}) / (\text{cpm máximo} - \text{cpm normal}) \times 100$.

Ensayo de inmunidad concomitante:

Grupos de ratones recibieron un implante s.c. de MC-C en el flanco derecho seguido a distintos intervalos por un implante subcutáneo del mismo tumor en el flanco izquierdo. Los ratones controles recibieron solo el implante en el flanco izquierdo. El título de inmunidad concomitante fue definido como el cociente entre la DT₅₀ del desafío secundario en ratones portadores de tumor y la DT₅₀ en ratones controles.

Tratamientos pro- y antiinflamatorios:

El agente pro-inflamatorio tioglicolato (Lab. Britania, Bs. As., Argentina) al 4% diluido en agua destilada, fue inoculado por la vía intraperitoneal (i.p.). Por otro lado, se usaron distintos esquemas de inoculación de las drogas antiinflamatorias indometacina (Indo, I.M. 75 Montpellier; 0,5 mg/Kg) y dexametasona fosfato sódico (DX; Decadron shock, Sidus; 0,75 mg/Kg) por la vía i.p.. También se utilizaron por la misma vía, las siguientes drogas antiinflamatorias: losartán (1 mg/kg), prometazina (1 mg/kg), clorpromazina (1,2 mg/kg), ácido nordihidroguayarático (NDGA; 5 mg/kg), fenidona (5 mg/kg), L-NAME (25 mg/kg).

Tratamientos convencionales contra el cáncer:

Cirugía: Se realizó la escisión quirúrgica del tumor bajo la anestesia pentobarbital, como fue descrito previamente (Franco et al 1996).

Radioterapia: Los ratones portadores de tumor fueron irradiados con 2000 cgrades en la zona tumoral, en un aparato de radioterapia Philips 250/15 a 220 Kv, 14 mA.

Quimioterapia: Se utilizó la droga quimioterapéutica vincristina (1 mg/kg de peso) por vía i.p. en ratones portadores de tumor. Vincristina es un tratamiento estándar de fibrosarcomas murinos.

Análisis estadístico:

Los valores se expresan como la media \pm error estándar (ES). Para analizar la significación de los resultados se utilizaron los test de Student, Chi cuadrado (χ^2) de dos colas y Log Rank Test y correlación de Pearson. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Capítulo 1:

Crecimiento de diferentes tumores y la emergencia de una condición inflamatoria sistémica

1.1 Relación entre Inflamación sistémica y agresividad tumoral.

Evaluamos la inflamación sistémica en ratones portadores de 4 tumores murinos de diferente estirpe histológica, grado de inmunogenicidad, y origen: Linfoma no inmunogénico LB de origen espontáneo; fibrosarcoma inmunogénico MC-C inducido por metilcolantreno; carcinoma indiferenciado no inmunogénico CEI de origen espontáneo y carcinoma de mama no inmunogénico C7HI inducido por medroxiprogesterona. Adicionalmente analizamos un carcinoma de próstata humano (PC3) inoculado en ratones nude. Nuestros resultados revelaron que los 5 tumores estudiados generaron, durante su crecimiento, dos picos de inflamación sistémica cuya intensidad varió de tumor a tumor. La intensidad de la inflamación sistémica fue evaluada por el número de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y precursores mieloides en sangre periférica (y en diferentes órganos) y por la concentración de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6 y de la proteína de fase aguda SAA. Por simplicidad, en la Figura 1 solo se registraron los valores de PMN circulantes como una medida de inflamación sistémica, dado que este parámetro se corresponde de manera muy confiable con los otros marcadores: la cinética detallada de todos los marcadores de inflamación sistémica durante el crecimiento de un tumor (MC-C) utilizado como ejemplo representativo se muestra más adelante en la Figura 5. Al comparar los 5 modelos tumorales, observamos sorprendentemente, que la agresividad tumoral (calculada como la inversa de la supervivencia de ratones inoculados con un dado tumor) se correlacionó directamente con la magnitud de la inflamación sistémica inducida por cada tumor, más que con la habilidad de cada tumor de diseminar o metastatizar en órganos distantes (Figura 2). Esto sugiere que la magnitud de inflamación sistémica podría ser, en algunos casos, un indicador más confiable de agresividad tumoral, incluso que la habilidad de generar metástasis. Por ejemplo, el tumor C7HI, que induce el fenómeno de inflamación sistémica de menor magnitud, de nuestra colección de tumores, tiene el mejor pronóstico, a pesar del hecho de que induce un enorme número de metástasis pulmonares y hepáticas. Por otro lado, el tumor MC-C, que exhibe una fuerte inflamación sistémica, se comporta de una forma muy agresiva, a pesar de que no induce metástasis durante todo su crecimiento.

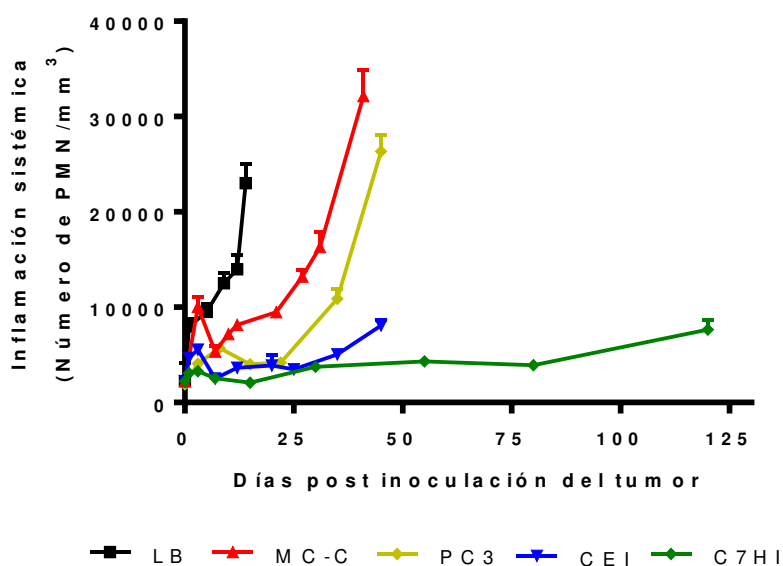


Figura 1: Eje x: Días post inóculo tumoral realizado con 5×10^5 células para todos los tumores murinos (LB, n = 12; MC-C, n = 10; CEI, n = 4; y C7HI, n = 5) y 3×10^6 células para el tumor humano (PC3, n = 3). Eje y: Neutrofilia (PMN) en los ratones portadores de los diferentes tumores como medida de inflamación sistémica. Se observan los dos picos de inflamación sistémica de diferente intensidad asociado al crecimiento de los diferentes tumores. Cada punto representa la media \pm error estándar de 3-10 ratones. LB y MC-C: p < 0,0001 en todos los días respecto del control; PC3: p < 0,02 días 3, 15 y 22 vs control; p < 0,01 días 8 y 35; p < 0,001 día 45; CEI: p < 0,05 días 12 y 25; p < 0,01 días 1, 3 y 35; p < 0,001 día 45. C7HI: p < 0,05 días 1, 30 y 80; p < 0,01 días 3, 55 y 120.

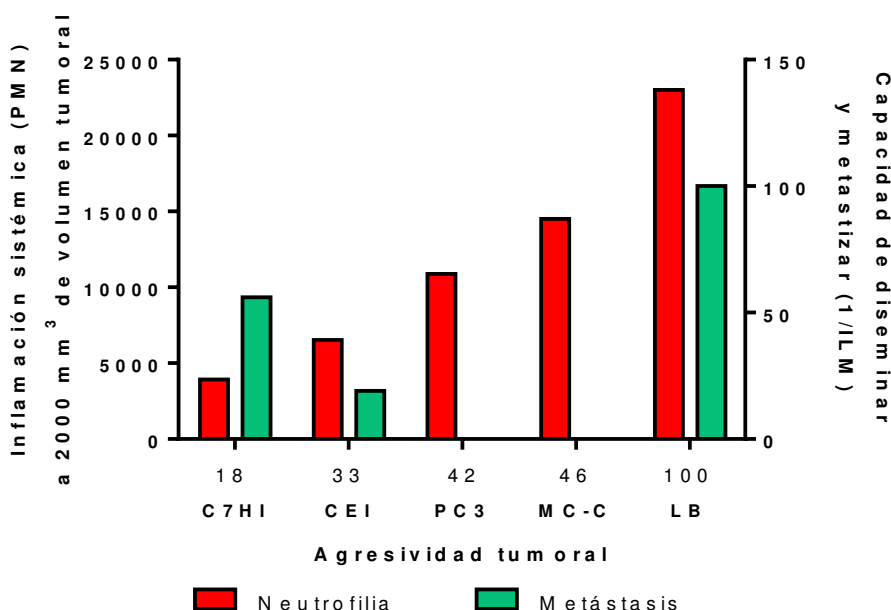


Figura 2: Correlación entre agresividad tumoral (eje x; recíproca de la supervivencia, tomando como 100% al tumor LB que muestra la mayor agresividad) e inflamación sistémica, medida por el número de PMN circulantes, en los ratones portadores de los diferentes tumores de 2000 mm³ (eje y₁) correlación de "Pearson" $p < 0,01$. Correlación entre agresividad tumoral y capacidad para diseminar o metastatizar (eje y₂; recíproca del intervalo libre de metástasis: 1/ILM definiendo ILM como el día después de la inoculación tumoral en que el 50% de los ratones muestran crecimiento metastático, tomando como 100% al tumor LB que muestra la mayor capacidad para diseminar y/o metastatizar) p : N.S..

1.2 Características generales del tumor MC-C.

Como modelo principal de esta Tesis, utilizamos el fibrosarcoma MC-C, ya que presenta una respuesta inflamatoria sistémica de gran intensidad y a su vez no genera metástasis que pueden interferir con la interpretación de los resultados. Para evaluar las características generales de MC-C, se estudió la cinética de crecimiento y se realizó el análisis histopatológico del tumor a diferentes tiempos. Para esto, se inocularon 24 ratones con 5×10^5 células tumorales MC-C por vía subcutánea (s.c.) en el flanco derecho. Como se observa en la Figura 3 el crecimiento de dicho tumor fue relativamente lento al comienzo hasta el día 15 (500 mm³ aproximadamente), después de lo cual exhibió una brusca aceleración hasta el día 35. A partir de dicho día, el tumor continúa su crecimiento de forma más lenta hasta producir la muerte del animal. Este tipo de curva -llamada Gompertziana- es común a una gran variedad de tumores. La supervivencia de los ratones portadores del tumor MC-C fue de $45,5 \pm 2,2$ días (media \pm error estándar, ES). La Figura 4 muestra el análisis histopatológico del fibrosarcoma MC-C inoculado en forma subcutánea donde se observan células fusiformes neoplásicas con numerosas figuras mitóticas (Figura 4A-B). En tumores más avanzados se observan áreas necróticas con presencia de vasos congestivos y una significativa cantidad de PMN (Figura 4C-D).

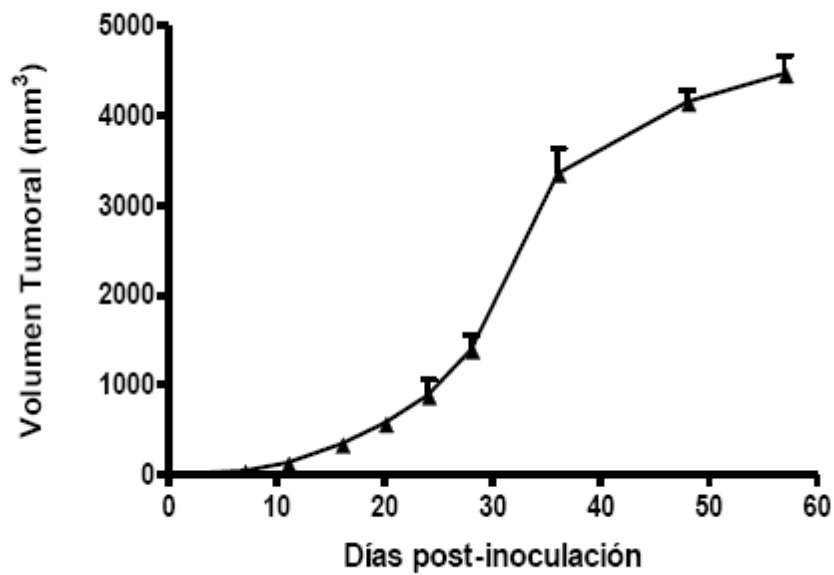


Figura 3: Cinética de crecimiento del tumor MC-C en función del tiempo (días) luego de la inoculación de 5×10^5 de células tumorales MC-C por vía subcutánea (s.c.) en el flanco derecho, mostrando una curva Gompertziana.

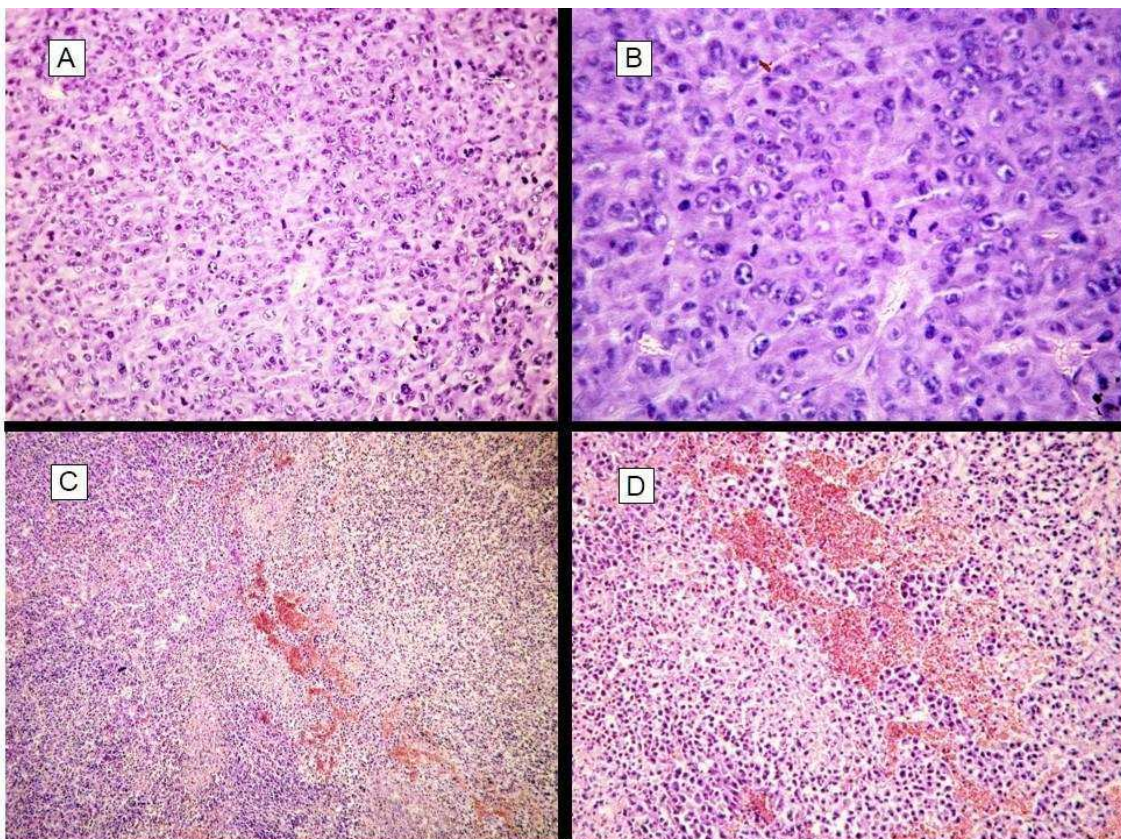


Figura 4: Cortes histológicos del fibrosarcoma murino MC-C, donde se observa un tumor viable fuscicelular con elevado número de mitosis y escasa necrosis (tumor

menor a 500 mm³) A) 100x B) 400x. En tumores avanzados (día 30, 2000 mm³) se observan extensas áreas necróticas y vasos congestivos y una significativa cantidad de PMN C) 100x D) 400x. (H&E).

1.3 Manifestaciones de inflamación sistémica asociadas al crecimiento del tumor MC-C.

Como vimos en 1.1) el tumor MC-C genera, al igual que todos los tumores analizados, dos picos de inflamación sistémica. En la Figura 5 se grafican todos los marcadores de inflamación sistémica analizados. El primer pico es relativamente pequeño y transitorio, ya que fue sólo detectado durante la primera semana luego de la inoculación s.c. de 5×10^5 células del tumor MC-C. Por otro lado, el segundo pico se observó a partir del día 14 después de la inoculación tumoral, cuando el tumor alcanzó los 500 mm³ y comenzó su crecimiento exponencial. Este pico fue, en general, más prominente que el primero y su intensidad fue proporcional al tamaño del tumor (Figura 5). Asimismo, se analizaron las poblaciones de leucocitos circulantes en ratones portadores de tumores de 1500 mm³ (día 25 post-inoculación tumoral, donde la inflamación sistémica ya estaba establecida) y revelaron, no solo un alto número de PMN maduros e inmaduros, sino también un alto número de precursores mieloides en diferentes estadios de diferenciación. Esta población de células heterogéneas, llamadas células mieloides supresoras (MDSC; Gabrilovich and Nagaraj 2009) por su acción fuertemente inmunosupresora, co-purificó con los PMN en el gradiente de Ficoll-Hypaque. Estas células exhibieron el fenotipo GR1⁺, MAC1⁺ (CD11b⁺), son de mayor tamaño que los PMN observados en los ratones normales o portadores de tumores chicos (Figura 6A), y exhiben un alto grado de activación, asociada a la liberación de grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Figura 6B). De manera similar a lo que ocurrió en circulación, hubo un marcado aumento de estas células mieloides inmaduras con alta expresión de Gr1⁺ Mac1⁺ en bazo de ratones portadores de tumores grandes (1500 mm³); en contraste, el porcentaje de células dendríticas, fue significativamente menor (Figura 7).

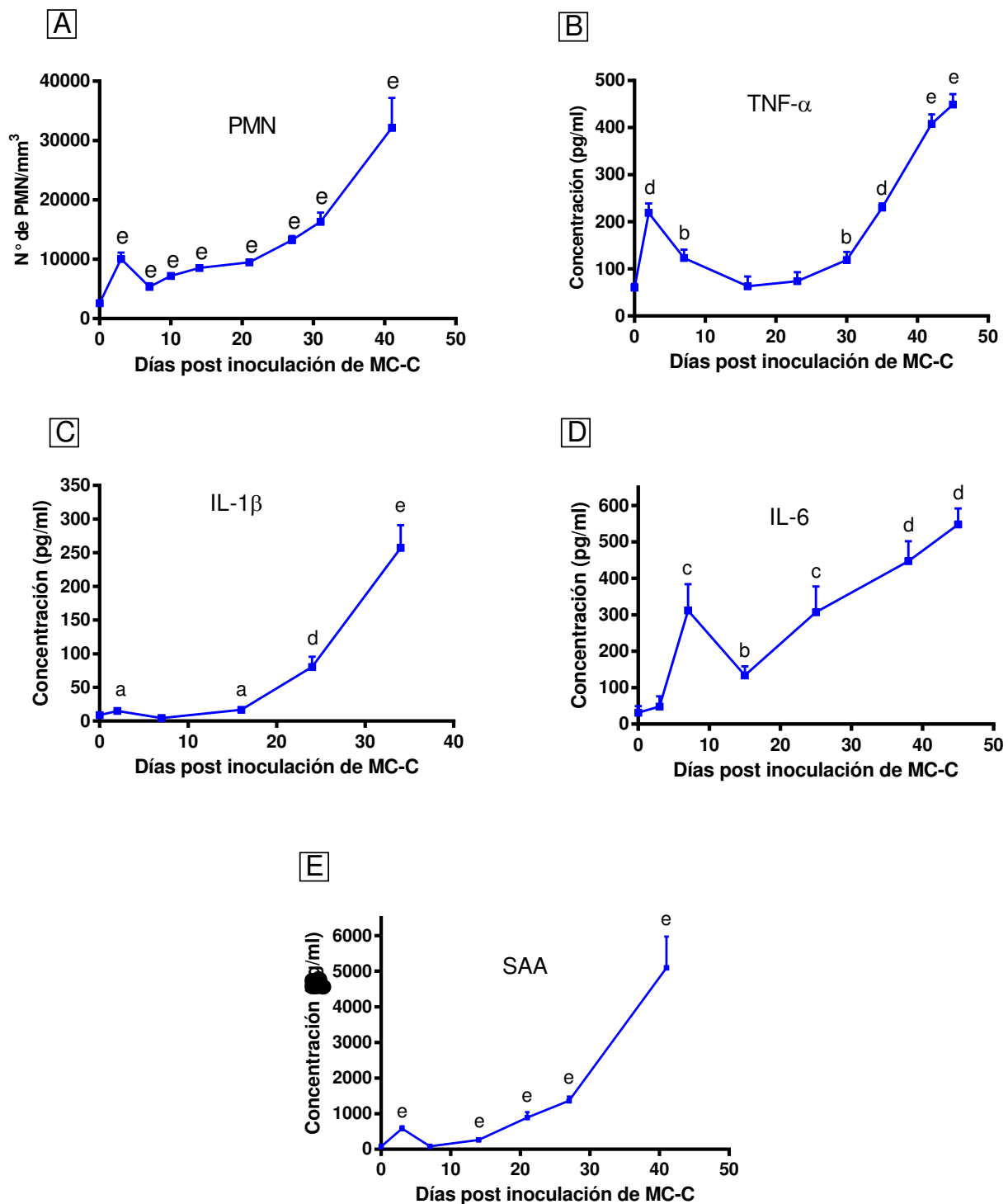


Figura 5: El crecimiento del tumor MC-C está asociado a una condición de inflamación sistémica evidenciada por un aumento en la concentración sérica de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6 y de la proteína de fase aguda SAA y por el número de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) en sangre periférica de ratones portadores del tumor MC-C. Cada punto representa la media \pm error estándar de 3-6 determinaciones para las citoquinas y las proteínas de fase aguda y 10 determinaciones para el recuento de PMN. a: $p < 0,05$; b: $p < 0,02$; c: $p < 0,01$; d: $p < 0,001$; e: $p < 0,0001$.

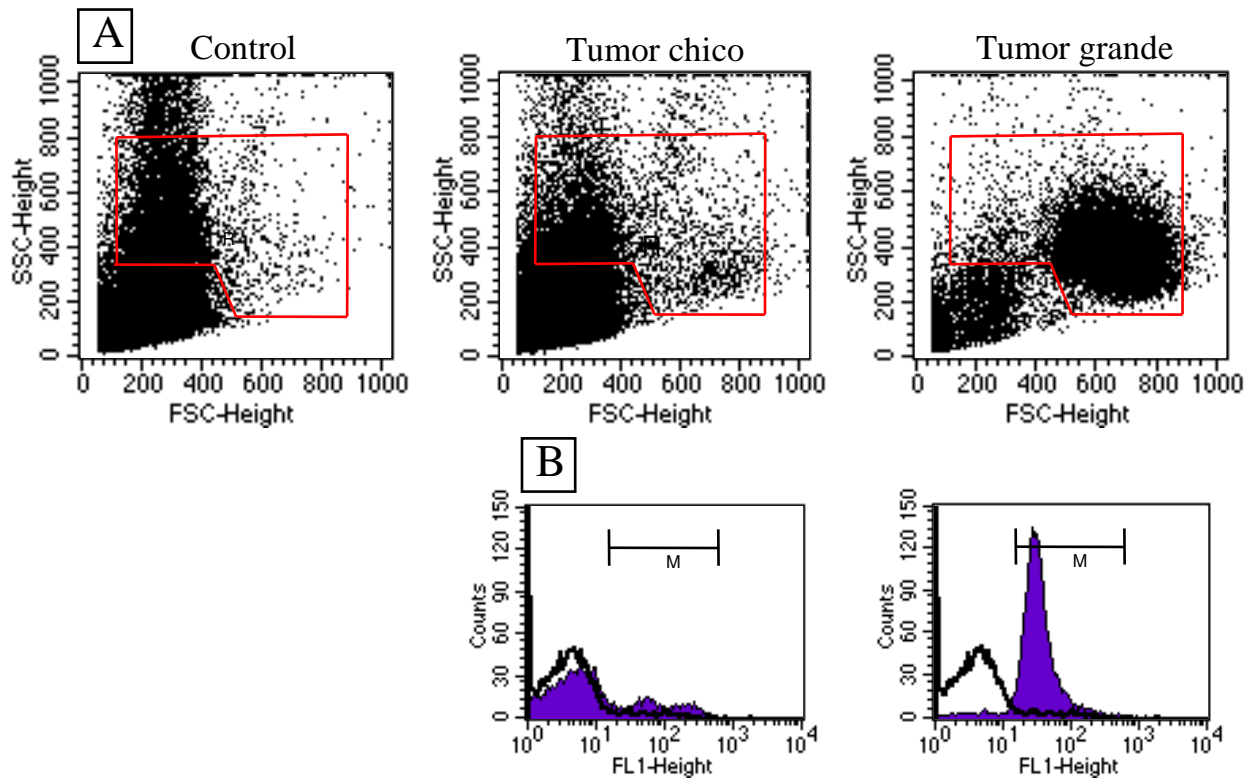


Figura 6: A) Análisis morfológico por citometría de flujo de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y células mieloides inmaduras (MDSC) circulantes provenientes de ratones normales (control), portadores de tumor MC-C chico (menor de 500 mm³), y de tumor MC-C grande (1500 mm³). B) Histograma que muestra activación de estas poblaciones celulares en ratones normales, portadores de tumor chico y portadores de tumor grande por fluorescencia del cromóforo 123-Dihidrorodamina (123-DHR). Figura representativa de 3 experimentos independientes.

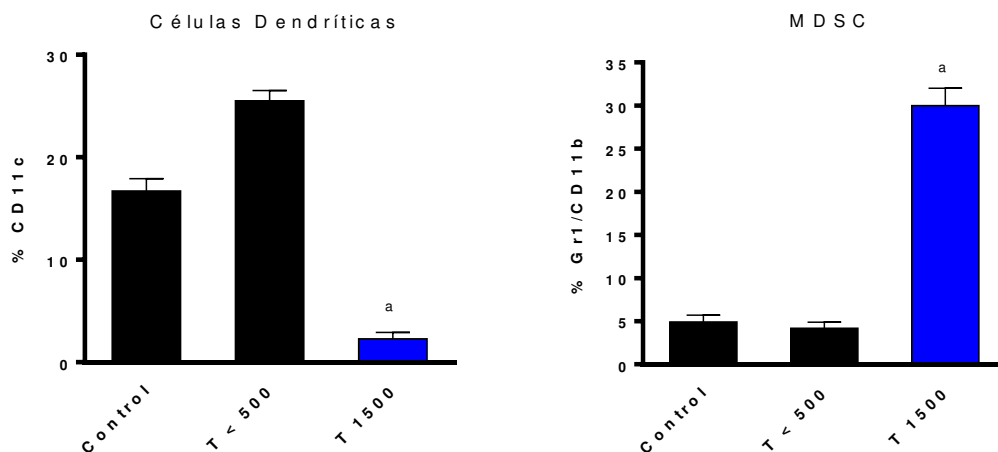


Figura 7: Porcentaje de las poblaciones esplénicas de células dendríticas y mieloides inmaduras (MDSC) obtenidas de ratones normales (Control), ratones con tumor MC-C chico (volumen < 500mm³; T < 500) y ratones con tumor MC-C grande (volumen = 1500 mm³ T 1500). Los resultados representan la media ± error estándar de 4 experimentos independientes. La estadística se realizó comparando los ratones normales vs. Los portadores de tumor. a: p<0,001.

La existencia de un proceso inflamatorio sistémico que afecta a todo el organismo portador del tumor MC-C, fue confirmado histopatológicamente, a través de la observación de una extensa infiltración de PMN y de los daños ocasionados en distintos órganos tales como hígado, riñón, bazo, pulmón y colon, algunos de los cuales, especialmente riñón e hígado, son compatibles con disminución y aún pérdida de función normal y eventualmente causa posible de muerte (Figura 8). Es importante destacar que ningún foco metastásico fue encontrado en los órganos mencionados, por lo cual el daño no pudo ser atribuido a metástasis. También se observó infiltración de PMN en los órganos de ratones portadores de los otros tumores analizados, compatible con la inflamación sistémica inducida por estos tumores, aunque en algunos ratones portadores de ciertos tumores hay importantes focos metastásicos que complican la interpretación de los resultados (datos no mostrados).

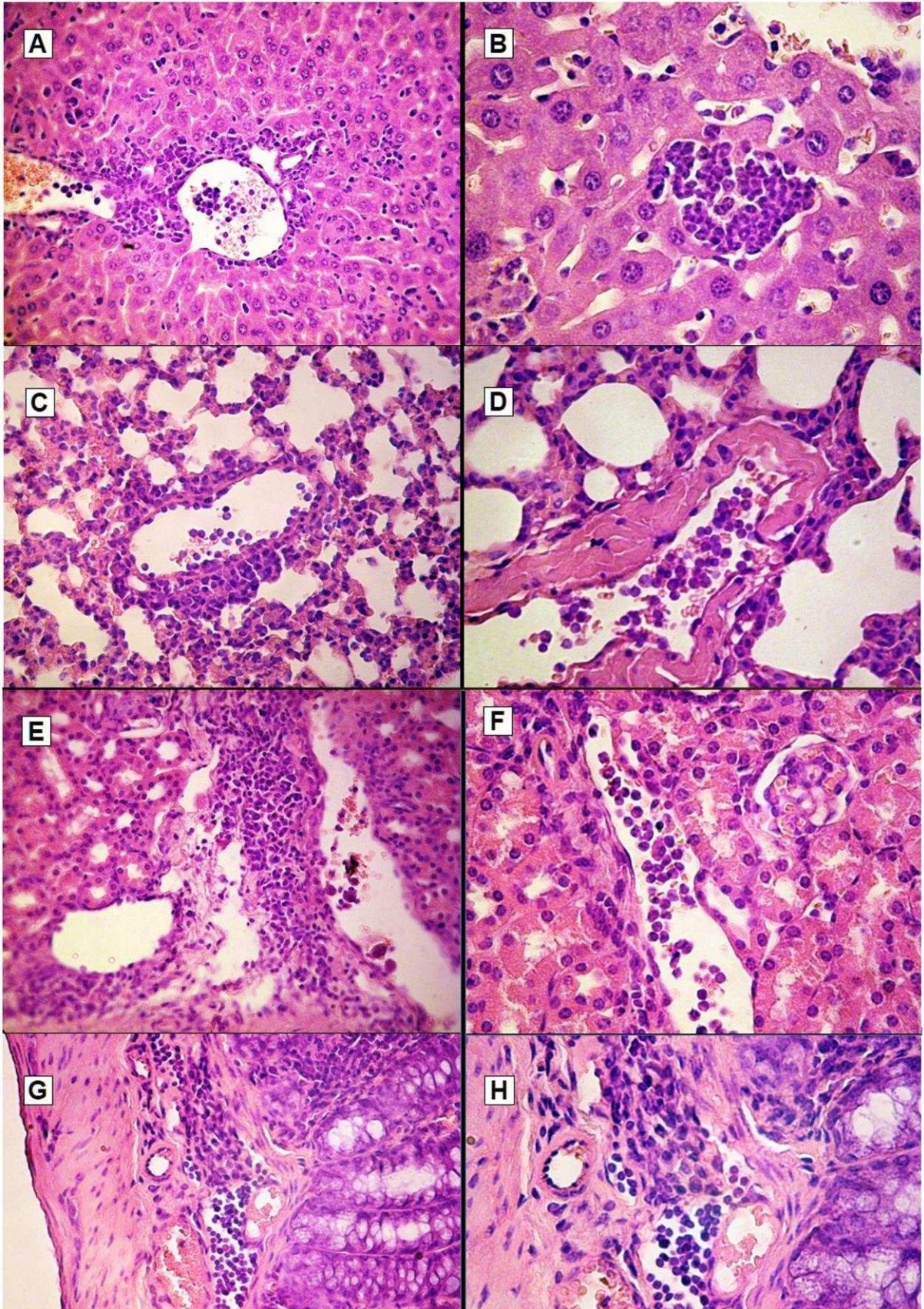


Figura 8: Se observa congestión vascular generalizada en todos los órganos de ratones portadores del tumor MC-C de 2000 mm³. A) (x25) y B) (x40) Hígado que muestra focos inflamatorios en parénquima y alteración difusa de hepatocitos. C)

(x25) y D) (x40) Pulmón con abundante infiltrado leucocitario intravascular y en tejido periférico. E) (x25) y F) (x40) Riñón, con foco inflamatorio y alteraciones del epitelio tubular con presencia de cilindros hialinos intra-luminal y daño glomerular. G) (x25) y H) (x40) Colon con infiltrado intravascular en submucosa. (H&E).

1.4 Persistencia de la inflamación sistémica luego de la extirpación tumoral.

Es de hacer notar que, luego de la extirpación quirúrgica de tumores MC-C de más de 2000 mm³, los parámetros de inflamación sistémica se van reduciendo progresivamente, aunque, permanecen significativamente más altos que los valores controles durante al menos 2 semanas después de la cirugía (Figura 9). Lo mismo ocurrió con la infiltración de PMN y los daños asociados en los distintos órganos (datos no mostrados). Esta observación será importante cuando discutamos la aplicación de tratamientos antiinflamatorios junto con terapias convencionales contra el cáncer (ver Capítulo 4).

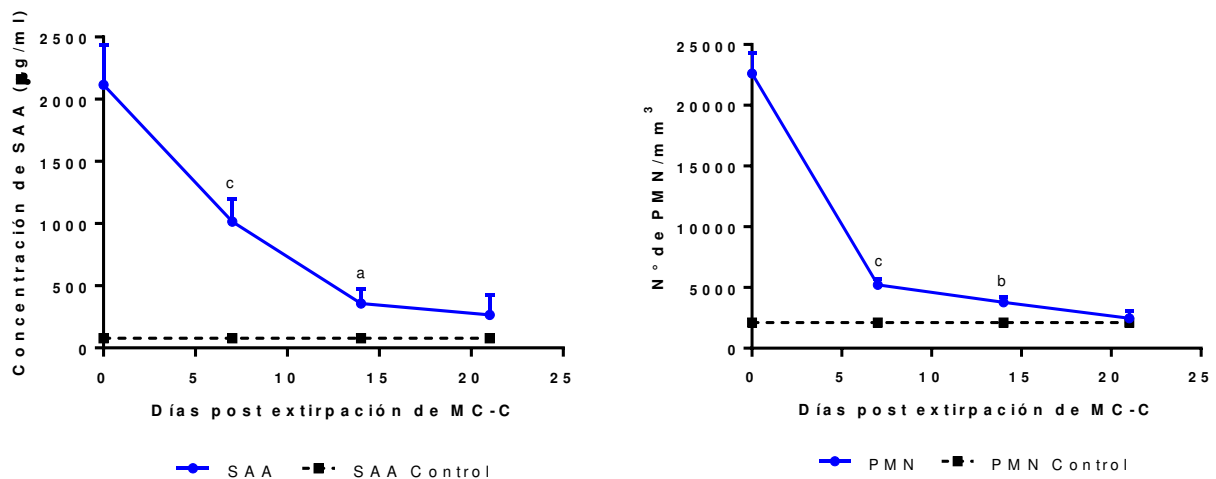


Figura 9: Disminución progresiva de parámetros de inflamación sistémica luego de la extirpación quirúrgica de tumores MC-C de más de 2000 mm³. Cada punto representa la media ± error estándar de 9 ratones. a: p < 0,02; b: p < 0,01; c: p < 0,001.

1.5 Origen de las manifestaciones de inflamación sistémica asociadas al crecimiento tumoral.

Con el objetivo de determinar si la inflamación sistémica es originada a partir de una inflamación local en la zona tumoral, se analizó la presencia de citoquinas inflamatorias en los tumores MC-C y C7HI (elegidos como modelos tumorales que inducen mucha y poca inflamación sistémica, respectivamente). Se observó la presencia de mRNA y proteína de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en el área tumoral por RT-PCR y por ELISA, respectivamente (Figura 10). Al igual que lo ocurrido en circulación, MC-C produce mayor cantidad de citoquinas que el tumor C7HI. El hecho de que la concentración de estas citoquinas en la zona tumoral sea mayor que la concentración en sangre, sugiere que éstas pueden ser generadas principalmente en el tumor, y liberadas a circulación. Allí podrían estimular la producción de proteínas de fase aguda en el hígado. El hígado de ratones portadores de tumor MC-C - pero no el de portadores de C7HI - también produce citoquinas pro-inflamatorias aunque su nivel parece ser menor al observado en la zona tumoral. Por otro lado, el análisis de cortes histológicos del tumor MC-C, mostraron que al primer día post-inoculación tumoral, hubo una extensa inflamación local, con abundante edema y gran infiltración de PMN en la zona peri-tumoral que lentamente fue disminuyendo su intensidad: poco después, al día 3, se detectó el primer pico de inflamación sistémica. Luego, entre los días 5 y 14, el tumor incipiente fue infiltrado principalmente por linfocitos y macrófagos. Posteriormente, a medida que aumentaba el tamaño de los tumores, se produjo un nuevo fenómeno de inflamación local aguda que iba aumentando progresivamente, con mayor infiltrado de PMN y edema (Figura 11). Esta infiltración se da en su gran mayoría en la zona peri-tumoral. Subsecuentemente había un aumento progresivo de estas células circulantes y en bazo (ver Figuras 6 y 7, respectivamente).

Es de hacer notar que, aunque la magnitud total de la inflamación local a los días 30-40 después del implante tumoral, es muy superior a la observada al día 1, dada la enorme masa de los tumores en aquellos días, la intensidad del infiltrado inflamatorio por campo o por unidad de masa es mayor al día 1. Esto tendrá importancia teórica cuando discutamos la aparente inconsistencia que se ha observado históricamente entre infiltrado inflamatorio y agresividad tumoral.

El análisis histopatológico de los otros tumores también mostró infiltración de PMN en la zona tumoral, proporcional a la magnitud de la inflamación sistémica generada por cada tumor (datos no mostrados). El tumor C7HI es el que muestra menor infiltración de PMN coincidente con la menor concentración de citoquinas pro-inflamatorias.

Con el fin de comprobar si la inversión entre el número de CD y MDSC en bazo de ratones portadores de tumor MC-C (ver Figura 7) está relacionada a una inapropiada diferenciación de precursores de médula ósea debido a factores producidos por el propio tumor y liberados a circulación, realizamos los siguientes experimentos:

En el primero, se cultivaron precursores de médula ósea de ratones normales durante 8 días en presencia de GM-CSF en medio normal o en medio condicionado del tumor MC-C. Como se observa en la Figura 12, ocurrió la esperada diferenciación a células dendríticas en el medio normal, mientras que en el medio condicionado de tumor, la diferenciación a células dendríticas fue dramáticamente inhibida, obteniéndose un alto número de MDSC. Resultados similares fueron observados cuando precursores de médula ósea fueron cultivados con suero de ratones portadores de tumor pero no con suero normal (datos no mostrados). Estos experimentos indican, que factores liberados por el propio tumor a circulación podrían alterar la diferenciación de precursores de médula ósea, afectando la diferenciación de células dendríticas, explicando el alto número de MDSC.

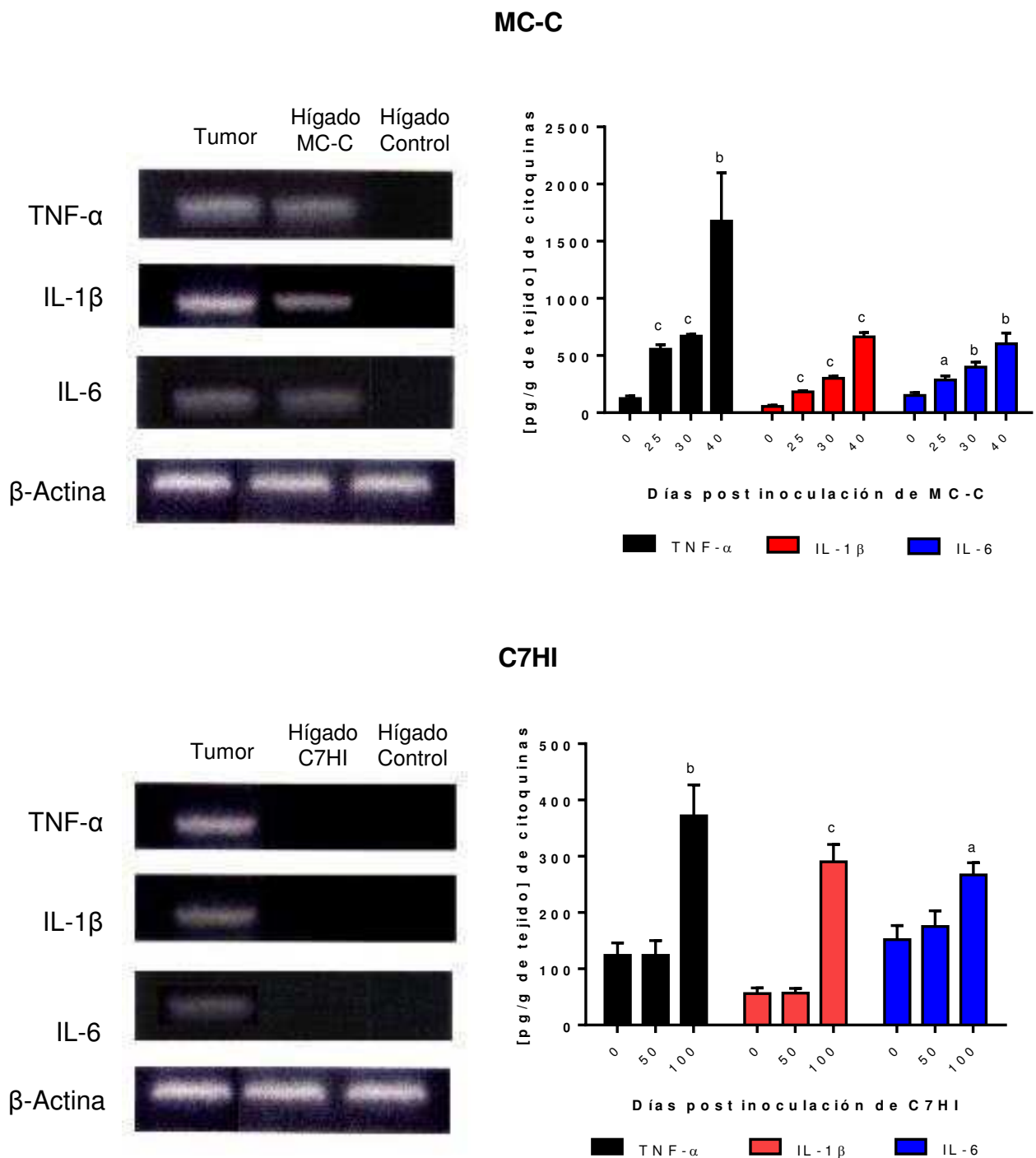


Figura 10: Los niveles de TNF- α , IL-1 β e IL-6, se analizaron por RT-PCR y ELISA en la zona tumoral y en hígado de ratones portadores de tumor de 2000 mm³ tanto de MC-C (n = 4), como de C7HI (n = 4). El control negativo fue hígado de ratón normal (n = 5). Las concentraciones de RNA fueron controladas usando mRNA de β -actina. a: p < 0,05 vs Control; b: p < 0,01 vs Control y c: p < 0,001 vs Control.

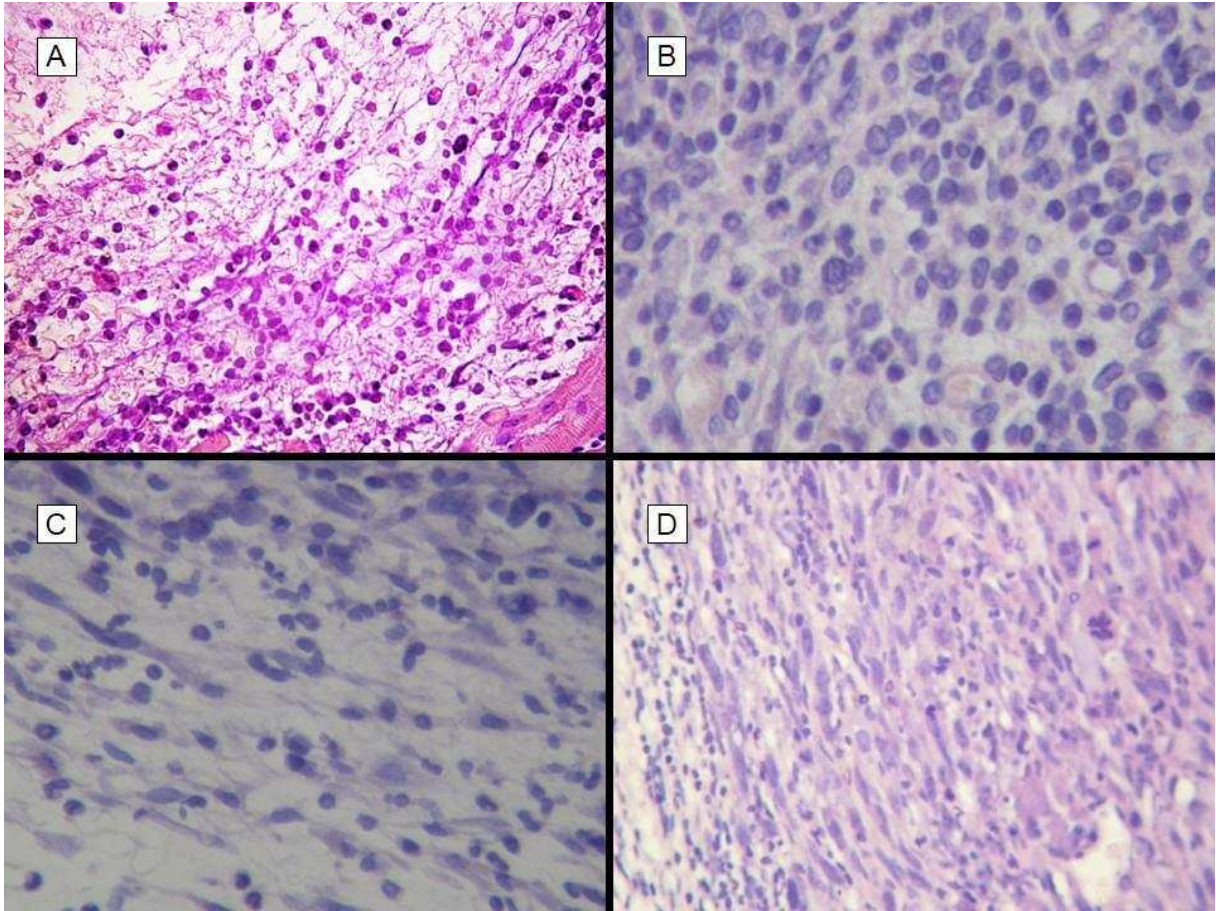


Figura 11: Cortes histológicos del tumor MC-C: A) El infiltrado peri-tumoral al día 1 es abundante con mayoría de PMN y extensas zonas edematosas. B) En tumores pequeños ($<500 \text{ mm}^3$, día 7) el infiltrado está preferentemente compuesto por linfocitos. A medida que aumenta el tamaño de los tumores hay más infiltración de PMN (C; 1100 mm^3 , día 25) y especialmente de células mieloides inmaduras en tamaños avanzados (D; 2500 mm^3 , día 35)(X400) (H&E).

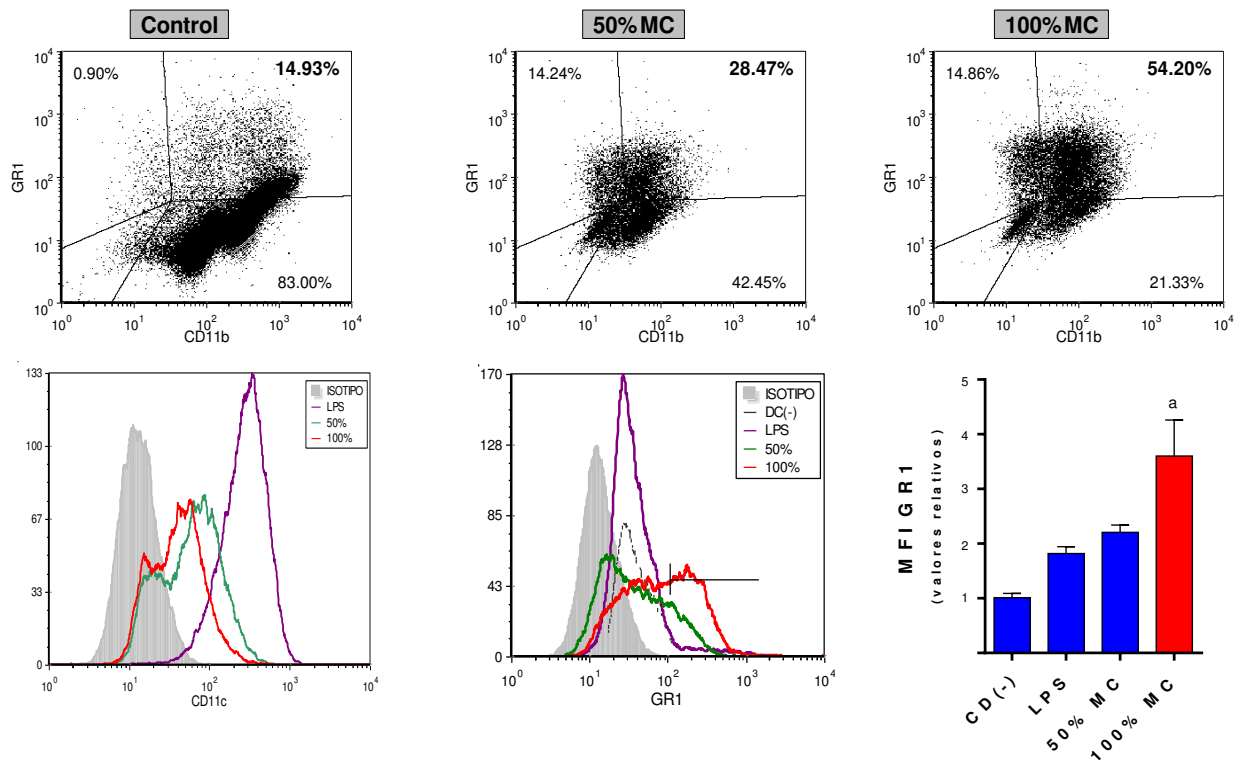


Figura 12: Diferenciación de precursores de MO en presencia de medio normal (Control), en presencia de 50% de medio condicionado de tumor MC-C (50% MC) o en 100% de medio condicionado (100% MC) tras 8 días de cultivo con GM-CSF y maduras luego con LPS por 24 hs. Las células fueron marcadas con los anticuerpos monoclonales GR1 y MAC1 (CD11b). Los porcentajes de las distintas poblaciones celulares fueron analizadas de una región enriquecida en células CD11c⁺. Además se muestra un histograma de GR1 con su respectivo grafico de barras. Tanto el Dot Plot como el histograma son representativos de 5 experimentos independientes. a: p<0,05; (100% MC vs LPS).

1.6 Contra-inflamación sistémica compensatoria asociada al crecimiento del tumor MC-C.

La condición inflamatoria sistémica asociada con el crecimiento del tumor MC-C genera un mecanismo contra-inflamatorio sistémico destinado a restaurar la homeostasis. Está caracterizado por un aumento de la concentración sérica de TGF- β , IL-10 y corticosterona (Figura 13). Sin embargo, este aumento fue relativamente modesto o transitorio, comparados con los niveles de los marcadores de inflamación sistémica, que continuaron aumentando progresivamente. Por otro lado, también se

demostró un estado contra-inflamatorio sistémico con la inhibición de la migración leucocitaria, en particular PMN, a un sitio de inflamación experimental inducido por la inoculación i.p. con tioglicolato (TG; agente pro-inflamatorio), en ratones portadores de tumores entre ambos picos de inflamación sistémica (600-1000 mm³, días 15-20). Es decir, en este punto, predomina la respuesta contra-inflamatoria y explicaría la disminución de los parámetros de inflamación sistémica observada en estos ratones. Por otro lado, los ratones portadores de tumores concomitantes con el 2º y más conspicuo pico de inflamación sistémica, mostraron un deterioro de la respuesta contra-inflamatoria, ya que la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal, fue similar que en los ratones controles (Figura 14). En este punto, la respuesta contra-inflamatoria no es capaz de inhibir una respuesta inflamatoria adicional. Otra evidencia funcional de que la respuesta contra-inflamatoria está exhausta, está dada por el hecho de que, cuando inoculamos 2 µg de lipopolisacáridos bacterianos (LPS), se produjo la muerte del 100% de ratones portadores de tumores de más de 1500 mm³, mientras que 150 µg fueron necesarios para matar a ratones normales. Es de hacer notar que la sensibilidad al LPS de los ratones portadores de tumores grandes es similar a la observada en ratones adrenalectomizados, lo que se compadece con el hecho de que los ratones portadores de tumores grandes muestran una hipotrofia de la corteza adrenal, especialmente de la zona fascicular que es la responsable de la producción de glucocorticoides, indicando una disminuida función adrenal. El tratamiento antiinflamatorio con dexametasona previo a la inoculación del LPS rescató de la muerte en todos los casos.

En conjunto, todos los indicadores de esta reacción anti-inflamatoria compensatoria muestran una magnitud mucho menor que la respuesta inflamatoria sistémica, y no alcanzan a compensarla o atenuarla.

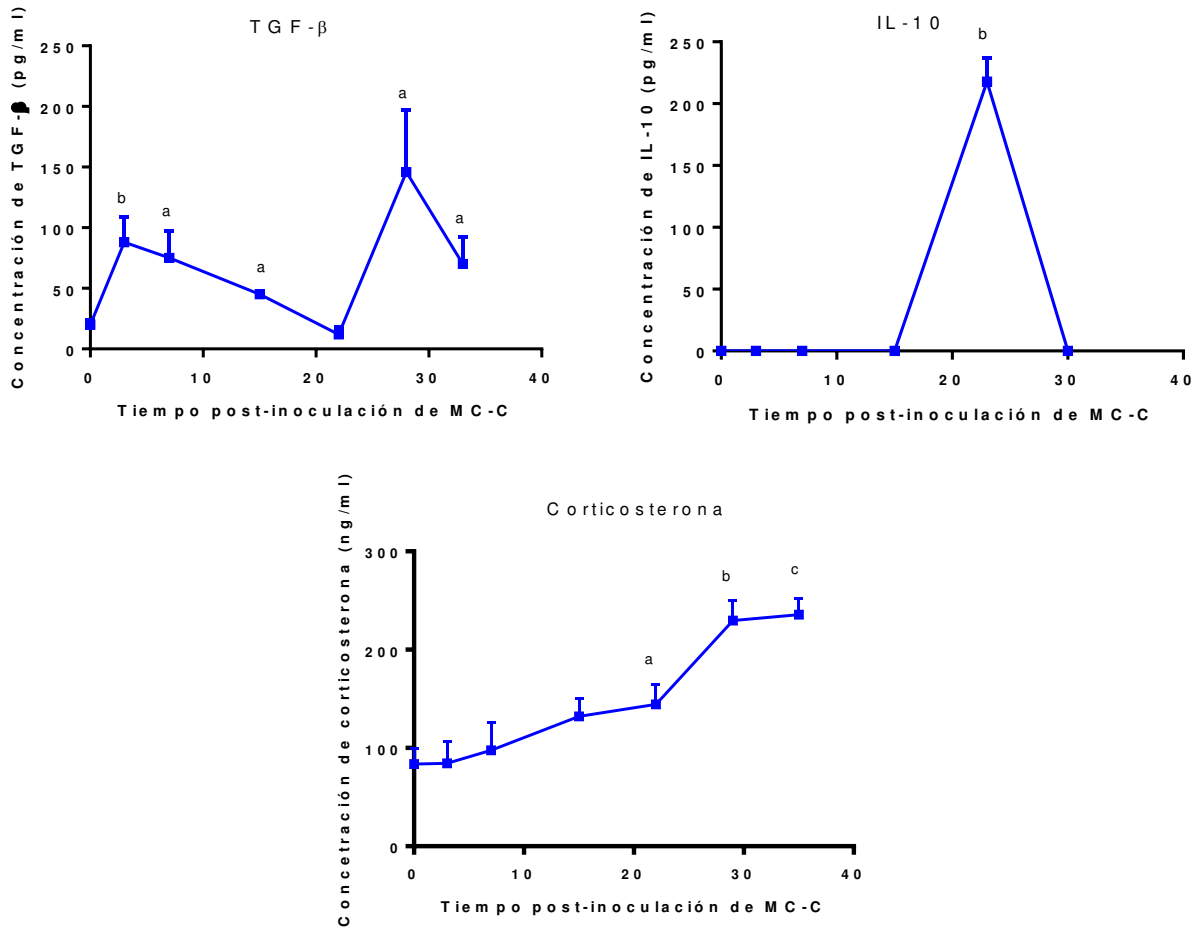


Figura 13: Contra-inflamación sistémica caracterizada por un aumento de la concentración de las citoquinas antiinflamatorias TGF-β e IL-10 y de corticosterona en sangre periférica de ratones portadores del tumor MC-C. Cada punto representa la media ± error estándar de 3-6 determinaciones. a: $p < 0,05$; b: $p < 0,02$; c: $p < 0,01$.

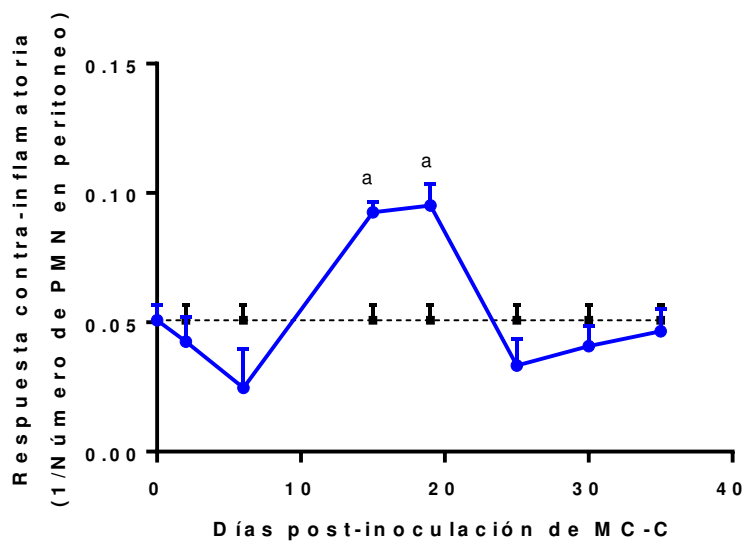


Figura 14: Respuesta contra-inflamatoria medida por la inversa del número de PMN infiltrantes en la cavidad peritoneal luego de la inoculación i.p. de tioglicolato en ratones portadores de tumor MC-C de diferentes tamaños. Cada punto representa la media \pm error estándar de 3-4 ratones. a: $p < 0,05$ respecto del control.

Conclusión parcial

El análisis de la inflamación sistémica generada por el crecimiento de cuatro tumores murinos de diferente estirpe histológica, origen y grado de inmunogenicidad y por el de un tumor humano creciendo en ratones nude, sugiere que este fenómeno, podría ser un componente muy importante de la patología neoplásica. En efecto, en todos los casos, se encontraron 2 picos de inflamación sistémica evidenciados por un aumento de la concentración sérica de citoquinas pro-inflamatorias y proteínas de fase aguda y por un incremento del número de PMN y de precursores mieloides en diferentes estadios de diferenciación (MDSC). El primer pico fue pequeño y transitorio, mientras que el 2° fue observado cuando el volumen de los diferentes tumores fue mayor que 500 mm^3 coincidente con el inicio del crecimiento exponencial de cada tumor. Este segundo pico de inflamación sistémica fue significativamente más prominente que el primero y su intensidad aumentó en relación directa con el incremento de la masa tumoral y sus manifestaciones perduraron bastante tiempo después de la extirpación quirúrgica del tumor. Cuando se comparó la magnitud de inflamación sistémica generada por cada tumor y su agresividad, sorpresivamente, se observó una correlación directa entre ambas variables. En contraste, no se observó correlación entre agresividad tumoral y capacidad de generar metástasis. Esto indica que, al menos en nuestra serie de tumores, la capacidad de generar una potente respuesta inflamatoria sistémica es más predictiva de progresión tumoral, que la propia capacidad de generar metástasis. Confirmando el proceso sistémico, se observaron múltiples daños e infiltrado leucocitario en diferentes órganos compatibles con disminución de función normal, asociada a la inflamación sistémica inducida por cada tumor. La correlación hallada entre la concentración de citoquinas pro-inflamatorias en la zona tumoral y en circulación, sugiere que la inflamación sistémica tiene su origen en el propio tumor. Por otro lado, esta condición inflamatoria

sistémica fue acompañada por una contra-inflamación sistémica caracterizada por un aumento de la concentración sérica de TGF- β , IL-10 y corticosterona. Sin embargo, la magnitud de esta reacción fue modesta y/o transitoria, y no alcanzó para compensar la creciente inflamación sistémica generada por el tumor.

Capítulo 2:

La inflamación sistémica promueve el crecimiento tumoral

Como vimos en el capítulo anterior, la inflamación sistémica asociada al crecimiento tumoral podría afectar dramáticamente la salud de los organismos portadores de tumor a través de la generación de fallas multiorgánicas o podría convertir al organismo en un blanco más sensible para traumas o infecciones como fue demostrado por la extrema sensibilidad que exhibieron los ratones portadores de tumor a la inoculación con LPS. En este capítulo estudiaremos otro potencial efecto deletéreo de la inflamación sistémica, a saber, si la inflamación sistémica generada por cada tumor, puede exacerbar el propio crecimiento tumoral, estableciendo un circuito de retroalimentación positiva entre ambos. Con el objetivo de demostrar esta proposición, compararemos el crecimiento de cada tumor en ratones no tratados con el observado en ratones que recibieron tratamientos antiinflamatorios (2.1) y en ratones que recibieron un tratamiento pro-inflamatorio (2.2).

2.1 Efectos de tratamientos antiinflamatorios sobre el crecimiento tumoral.

En primer lugar, se atenuó el estado de inflamación sistémica asociado al crecimiento de los tumores LB, MC-C, CEI, C7HI y PC3 mediante la inoculación periódica por vía i.p. de indometacina (Figura 15). El resultado de este tratamiento antiinflamatorio fue, en todos los casos, una disminución significativa del crecimiento tumoral, comparado con ratones controles que solo recibieron solución fisiológica (Figura 16). Para confirmar este hecho utilizando otras sustancias antiinflamatorias, comparamos el crecimiento del tumor MC-C (tomado como ejemplo representativo) en ratones que recibieron los siguientes tratamientos antiinflamatorios en forma periódica: dexametasona (dosis no inmunosupresora), indometacina + dexametasona, ácido nordihidroguayarático sólo o en combinación con indometacina, prometazina, clorpromozina, fenidona, L-NAME y losartán. En todos los casos se observó una disminución del crecimiento tumoral en aquellos ratones que habían recibido el tratamiento antiinflamatorio, aunque la magnitud de este efecto varió en cada caso particular (datos no mostrados). El tratamiento antiinflamatorio más efectivo para reducir conjuntamente el crecimiento tumoral, la inflamación sistémica y la caquexia, fue la combinación periódica y alternada durante todo el crecimiento tumoral, de la combinación de indometacina y dexametasona por vía i.p. (Figura 17). El nivel de caquexia fue evaluado por disminución del peso del

ratón, atribuible a pérdida de masa muscular [peso total - peso del tumor] (los valores se muestran en la Figura 17) y por disminución de la ingesta calórica (datos no mostrados).

La afirmación de que el efecto inhibitorio de las sustancias antiinflamatorias sobre el crecimiento tumoral fue directamente relacionado a la inhibición de la reacción inflamatoria asociada al tumor es sugerida por 2 hechos. Primero, ninguna de estas sustancias inhibe la proliferación *in vitro* de las células tumorales. Segundo, Hay una buena correlación entre los efectos anti-tumorales de diferentes concentraciones de estas drogas antiinflamatorias y la magnitud de la inhibición de la inflamación sistémica (datos no mostrados).

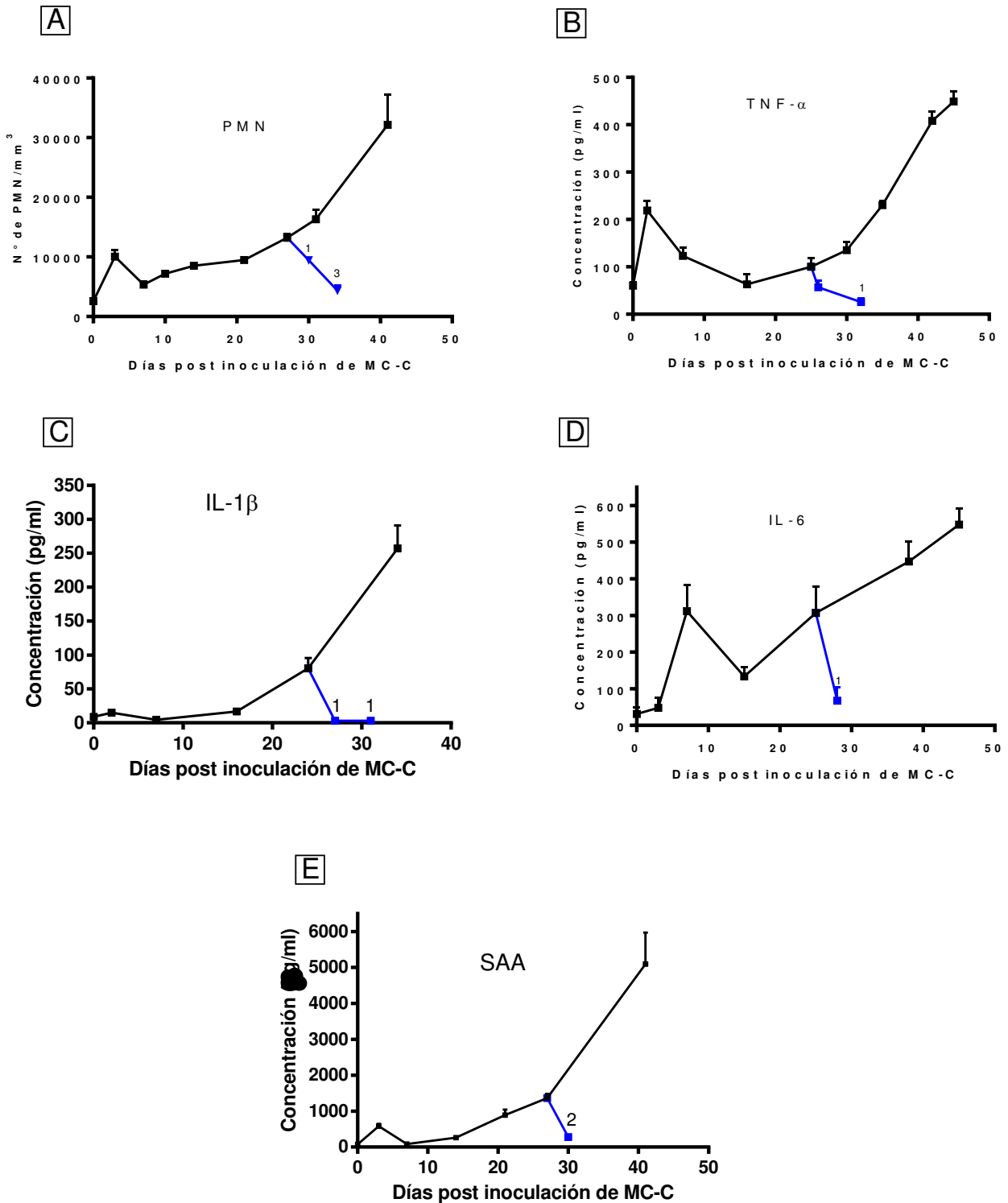


Figura 15: Efecto de una sola dosis de indometacina (0,5 mg/kg ratón) vía i.p. sobre los parámetros de inflamación sistémica (líneas negras) asociada al tumor MC-C (tomado como ejemplo representativo). Las líneas en color azul representan los valores observados luego del tratamiento con indometacina. El tratamiento con dexametasona dio resultados parecidos; no se muestran por razones de simplicidad. Cada punto representa la media \pm ES de 2-4 determinaciones de citoquinas y proteínas de fase aguda y la media \pm ES de 3-10 determinaciones de conteo de

PMN. Comparación entre grupo control y el grupo con el tratamiento son: 1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$, 3 $p < 0,001$.

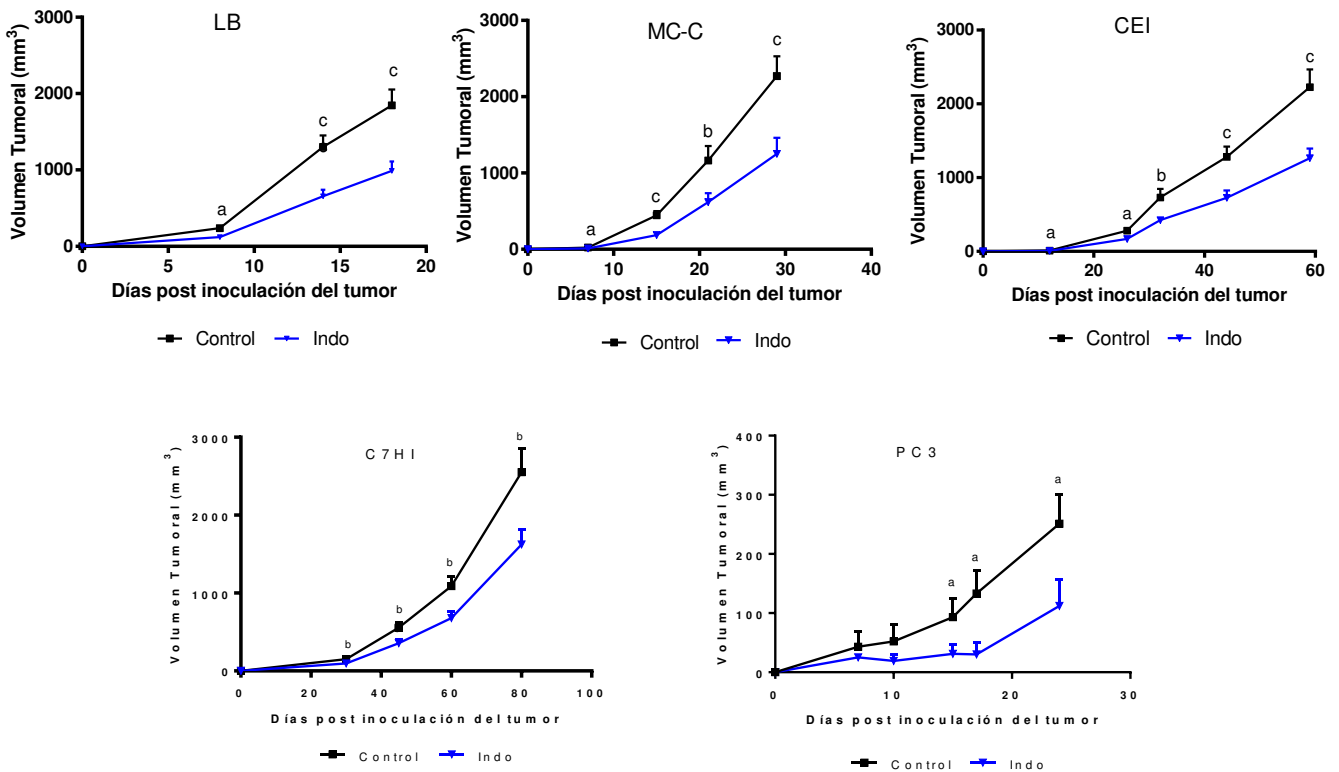


Figura 16: Cinética de los diferentes tumores en ratones tratados con indometacina (Indo) o con solución fisiológica (S.F.; Control). La Indo fue inoculada i.p. cada 3 días después del inóculo tumoral con 5×10^5 células para los tumores murinos (LB, $n = 20$; MC-C, $n = 18$; CEI, $n = 14$; y C7HI, $n = 13$) y 3×10^6 para el tumor humano (PC3, $n = 3$) (día 0). a: $p < 0,05$; b: $p < 0,02$; c: $p < 0,01$; d: $p < 0,001$.

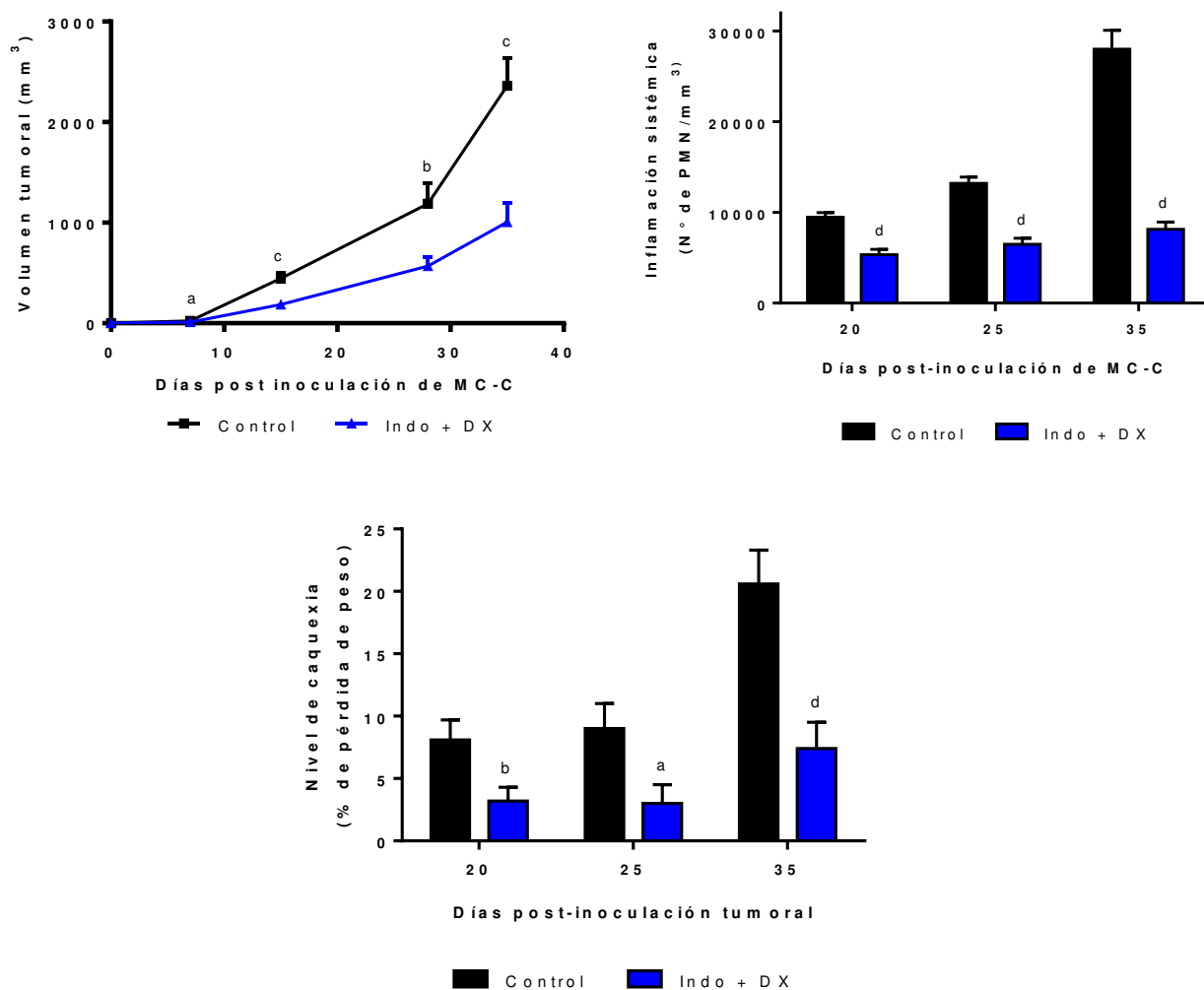


Figura 17: Cinética tumoral, inflamación sistémica (evaluada por N° de PMN circulantes) y caquexia (evaluada por pérdida de peso) en ratones portadores de tumores que recibieron S.F. (Control; n = 15) o un tratamiento antiinflamatorio periódico combinado de Indometacina (Indo) y dexametasona (DX) durante todo el crecimiento del tumor MC-C (Indo + DX; n = 16). a: p < 0,05; b: p < 0,02; c: p < 0,01 y d: p < 0,001.

2.2 Efectos de un tratamiento pro-inflamatorio sobre el crecimiento tumoral.

Para evaluar esta posibilidad, generamos deliberadamente, una condición de inflamación sistémica que dura al menos 5 días (demostrada por SAA y PMN circulantes [Figura 18]), mediante la inoculación de dos dosis i.p. de tioglicolato, llevadas a cabo 2 y 1 día antes de la inoculación de los tumores LB, MC-C, CEI, C7HI y PC3. El crecimiento de los diferentes tumores fue acelerado bajo el

tratamiento con tioglicolato, y este efecto fue prevenido cuando indometacina fue co-inoculada con tioglicolato (Figura 19). Para determinar si un efecto pro-inflamatorio podía exacerbar, no solo el implante tumoral, sino un tumor ya establecido (como se supone que exacerba el crecimiento tumoral la propia inflamación sistémica generada por el tumor), evaluamos el crecimiento del tumor MC-C en ratones controles y en aquellos que recibieron una dosis i.p. de tioglicolato 10 días después de la inoculación tumoral, cuando el 1° pico de inflamación sistémica generado por el tumor había decaído y el 2° pico no era aún manifiesto. Como se muestra en la Figura 20, el tratamiento con tioglicolato exacerbó el crecimiento del tumor MC-C previamente establecido.

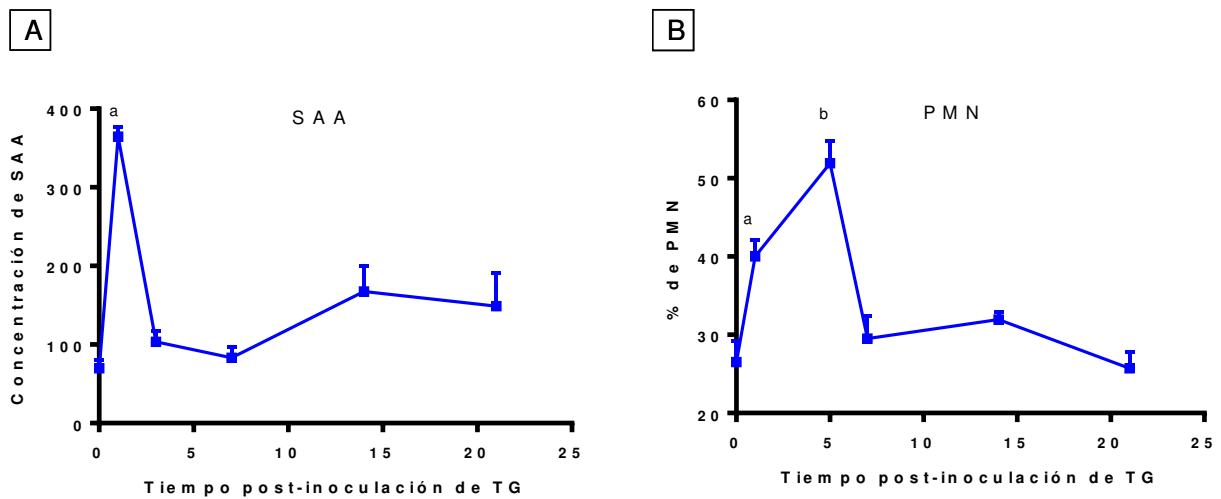


Figura 18: Una condición experimental de inflamación sistémica fue generada por una sola dosis de 1 ml de tioglicolato (TG) i.p. evidenciada tanto, por un aumento en la concentración sérica de SAA (A) como del porcentaje de PMN circulantes (B). Cada punto representa la media \pm error estándar de 2-5 determinaciones; a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$ respecto del control.

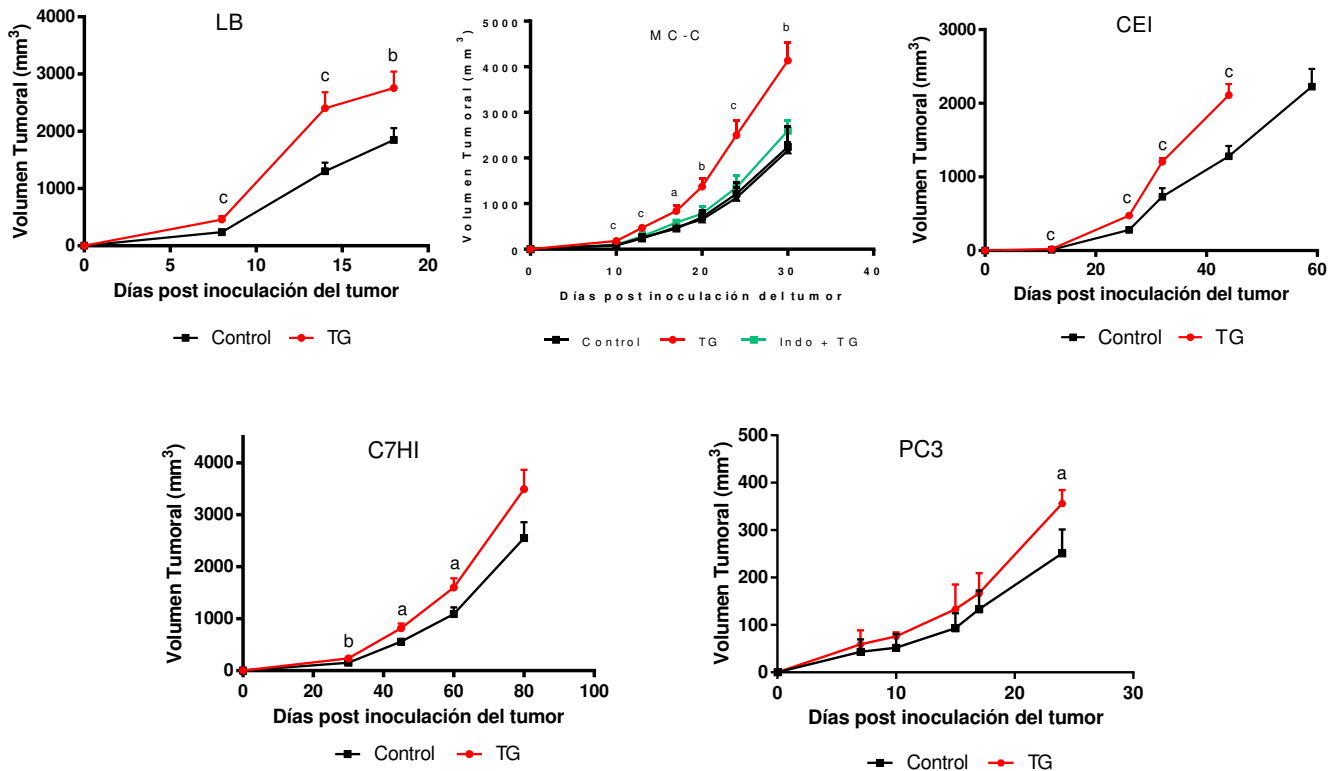


Figura 19: Cinética de los diferentes tumores en ratones tratados con tioglicolato (TG) o con solución fisiológica (S.F.; Control). El TG fue inoculado dos veces i.p. antes del inóculo tumoral con 5×10^5 células para los tumores murinos (LB, $n = 18$; MC-C, $n = 18$; CEI, $n = 12$; y C7HI, $n = 12$) y 3×10^6 para el tumor humano (PC3, $n = 3$) (día 0). En todos los casos el crecimiento tumoral fue acelerado bajo el tratamiento con TG, y este efecto fue prevenido cuando indometacina fue co-inoculada con TG en los ratones portadores del tumor MC-C (Indo + TG, $n = 6$). a: $p < 0,05$; b: $p < 0,02$; c: $p < 0,01$.

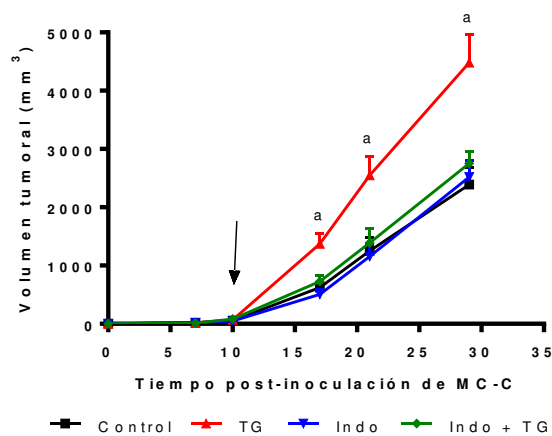


Figura 20: Una condición experimental de inflamación sistémica fue generada por una sola inoculación i.p. de 1 ml de tioglicolato (TG; flecha; $n = 13$) 10 días después

de la inoculación s.c. de 5×10^5 células del tumor MC-C al tiempo cuando el primer pico de inflamación sistémica había decaído y el 2º pico asociado con el crecimiento exponencial del tumor MC-C todavía no era aparente. El crecimiento tumoral fue acelerado bajo el tratamiento con TG, y este efecto fue prevenido cuando indometacina fue co-inoculada con TG (Indo + TG, n = 6). a: $p < 0,01$ respecto del control.

2.3 Mecanismos moleculares asociados al efecto promotor de la inflamación sistémica sobre el crecimiento tumoral.

En este Capítulo hemos demostrado que la inflamación sistémica puede exacerbar el crecimiento tumoral tanto de tumores inmunogénicos como no inmunogénicos. En este ítem exploraremos posibles mecanismos moleculares de este efecto exacerbante, utilizando los tumores murinos MC-C y LB, elegidos como ejemplos de tumores inmunogénicos y no inmunogénicos, respectivamente, y ratones knock out para el receptor TLR-4, sobre la base de que la activación de este receptor, a través de las vías de señalización P38 y JNK MAPK, ha sido postulada como un evento importante en la inflamación asociada a carcinogénesis (Lee et al 2010). Como se muestra en la Figura 21, el crecimiento tumoral, está dramáticamente disminuido en estos ratones, que a su vez muestran marcadores de inflamación sistémica muy reducidos respecto de ratones convencionales y exhiben un retardo significativo en la aparición de los signos de caquexia. Esto sugiere que la inflamación sistémica mediaría, al menos en parte, su efecto promotor del crecimiento tumoral, común sobre tumores inmunogénicos y no inmunogénicos, a través de la vía de señalización del TLR-4.

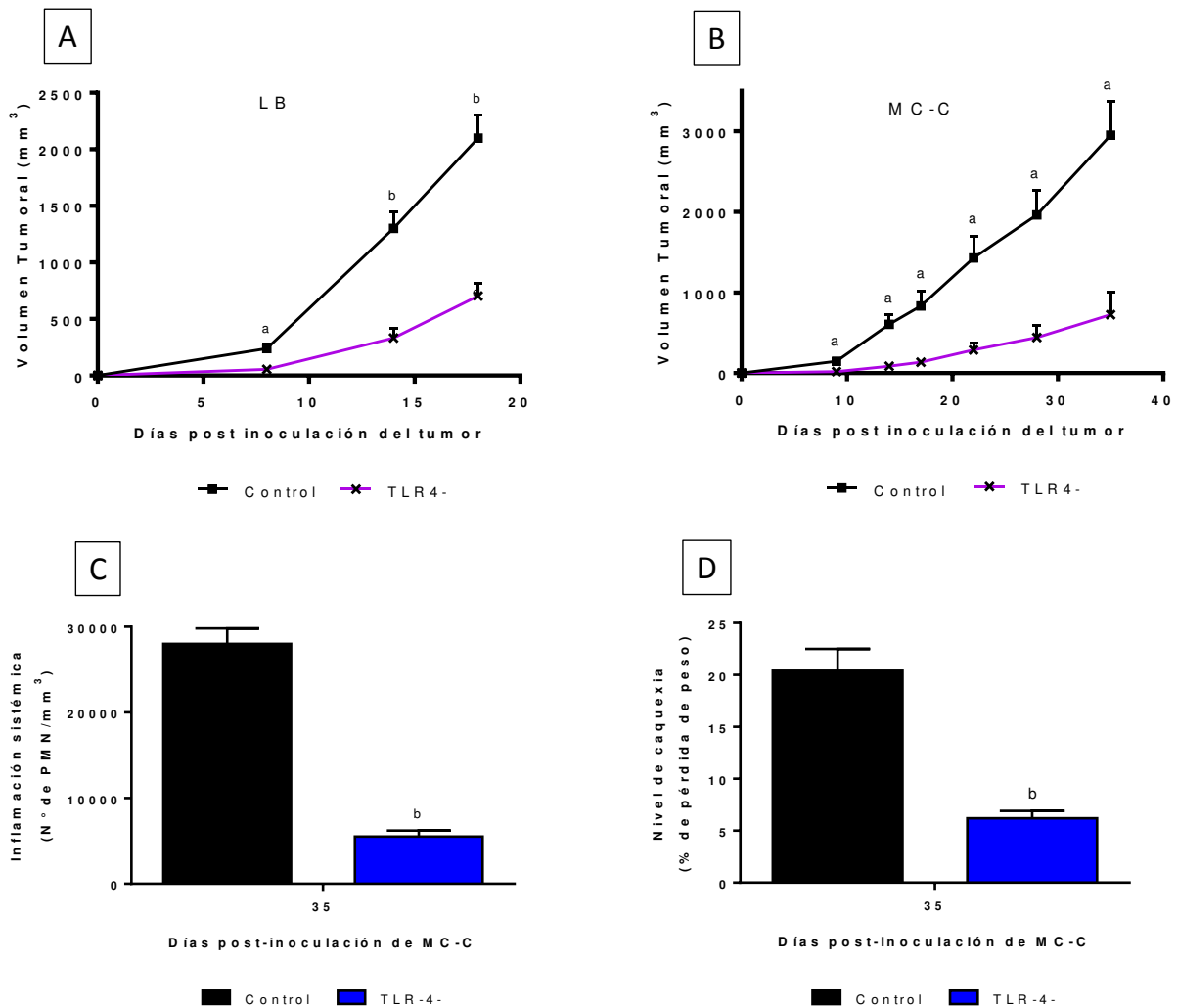


Figura 21: Cinética de los tumores LB (A) y MC-C (B) creciendo en ratones convencionales (Control, n = 5) o en ratones knock out para TLR-4 (TLR-4-, n = 5). Inflamación sistémica (C) y nivel de caquexia (D) en los ratones convencionales y knock out portadores del tumor MC-C. a: p < 0,01; b: p < 0,001.

Conclusión parcial

El tratamiento antiinflamatorio con indometacina, bajó todos los parámetros de inflamación sistémica y retardó el crecimiento de todos los tumores analizados. Resultados similares fueron obtenidos utilizando una gran variedad de sustancias antiinflamatorias. En efecto, en todos los casos se observó una disminución del crecimiento tumoral en aquellos ratones que habían recibido el tratamiento antiinflamatorio, aunque la magnitud de este efecto varió en cada caso particular. El tratamiento más efectivo fue la combinación alternada y periódica con indometacina y dexametasona por vía

i.p. durante todo el crecimiento tumoral. Este tratamiento además redujo la respuesta inflamatoria sistémica y la caquexia por más tiempo. Recíprocamente, la actividad irritativa del tioglicolato inoculado por vía i.p., generó una condición inflamatoria sistémica que produjo una aceleración significativa del crecimiento de estos tumores ya sea cuando el tioglicolato fue inoculado antes de la implantación tumoral, como cuando los tumores ya estaban establecidos. Cuando esta inflamación exógena fue prevenida por la inoculación de indometacina, se bloqueó la capacidad estimuladora de tioglicolato. Los resultados anteriores junto con los estudios en ratones knock out para TLR-4, sugieren que la inflamación sistémica generada por cada tumor, exagera a su vez, el propio crecimiento tumoral, tanto de tumores inmunogénicos como no inmunogénicos, a través de vías de señalización dependientes de la activación del receptor TLR-4.

Capítulo 3:

Influencia de la inflamación sistémica sobre la inmunidad anti-tumoral

En el Capítulo anterior mostramos que la inflamación sistémica generada por cada tumor, promueve el propio crecimiento tumoral, sobre la base de que agentes que inhibían la inflamación sistémica retardaban el crecimiento tumoral mientras que agentes que generaban inflamación sistémica lo exacerbaban. Dado que estos efectos se observaron tanto sobre tumores inmunogénicos como no inmunogénicos, es plausible que mecanismos no inmunológicos comunes a todos los tumores, estén en la base de estos efectos. Además, es también posible que para el caso de tumores inmunogénicos, mecanismos de inmunodepresión inducidos por la inflamación sistémica, puedan participar del efecto promotor de ésta sobre el crecimiento tumoral. En este Capítulo, para evaluar esta posibilidad, utilizamos el tumor murino inmunogénico MC-C, cuyas características histológicas y cinética de crecimiento fueron ya descritas en el Capítulo 1.

3.1 Características de la inmunogenicidad del tumor MC-C .

La inmunogenicidad del tumor MC-C fue evaluada mediante la realización de diferentes estrategias activas de inmunización: implantación y extirpación del tumor, pre-tratamiento con dosis subletales de células tumorales y pre-tratamiento con células tumorales irradiadas. El propósito de estas técnicas es impedir el crecimiento de un futuro implante de células tumorales vivas de MC-C. Se midió la dosis tumoral 50 (DT₅₀) (definida como el número de células tumorales inoculadas s.c. capaces de crecer en el 50% de los ratones) tanto en ratones inmunizados como en ratones controles. En la Tabla 1 se muestran los resultados de los distintos ensayos de inmunización, que revelaron que el tumor MC-C es fuertemente inmunogénico dado que los diferentes métodos de vacunación empleados fueron capaces de impedir el desarrollo de implantes de MC-C, incluso cuando el número de células tumorales implantadas fue muy alto (5×10^6 células).

Tabla 1: Inmunogenicidad del fibrosarcoma murino MC-C expresado como aumento de la DT₅₀ en ratones pre-tratados con diferentes procedimientos de inmunización respecto de la DT₅₀ observada en ratones controles.

Ensayos de inmunización	DT ₅₀ (n) ^a	DT ₅₀ tratados/control ^b
Estrategias de vacunación		
-Implantación-extirpación	> 5x10 ⁶ (4)*	> 100
-Células irradiadas con rayos X	> 5x10 ⁶ (4)*	> 100
-Dosis sub-letales	> 5x10 ⁶ (4)*	> 100
Control	5x10 ⁴ (6)	1

a: DT₅₀: Número de células tumorales inoculadas s.c. capaces de crecer en el 50% de los ratones; (n)= número de experimentos; en cada experimento hubo 12-24 ratones controles y 12-24 ratones que recibieron el procedimiento de inmunización, que luego fueron desafiados con diferentes dosis s.c. de células tumorales MC-C, con lo cual se calculó la DT₅₀ en cada caso. El error estándar (ES) nunca excedió el 10% del valor medio.

b: Relación o cociente entre: DT₅₀ del grupo tratado/ DT₅₀ del grupo control

*: $p < 0,001$ comparado con el control

3.2 Inicio y decaimiento de la inmunidad anti-tumoral durante el crecimiento progresivo del tumor MC-C.

Al comienzo de su crecimiento (iniciado por la inoculación s.c. de 5x10⁵ células tumorales), el tumor MC-C genera una respuesta inmune anti-tumoral que se incrementa progresivamente durante las primeras dos semanas después de su inoculación. Posteriormente, cuando el tumor supera aproximadamente los 500 mm³ esta respuesta inmune desaparece bruscamente, y entra en una etapa de inmunosupresión conocida como “eclipse inmunológico” (Figura 22) coincidente con el 2º pico de inflamación sistémica.

Esta inmunidad anti-tumoral que se desarrolla durante el crecimiento del tumor MC-C fue evaluada usando diferentes ensayos:

- Capacidad de un ratón portador de tumor de inhibir el crecimiento de un segundo implante (Inmunidad Concomitante, Figura 22A).

- Habilidad de células esplénicas para contrarrestar la capacidad tumorigénica de células tumorales cuando las células esplénicas son mezcladas con células tumorales *in vitro* y luego inoculadas en ratones normales (Test de Winn, Figura 22B).
- Habilidad de células esplénicas para matar específicamente a células tumorales marcadas con ^{51}Cr *in vitro*. (Citotoxicidad mediada por células, Figura 22C).

Como se observa en la Figura 22, cada uno de los parámetros anteriores, se expresa y luego decae después de que el tumor ha superado los 500 mm^3 aproximadamente. La temprana y transitoria respuesta anti-tumoral demostró ser específica de tumor y fue observada en ratones eutímicos pero no en nude (Franco et al. 1996) lo cual significa que es un mecanismo dependiente de células T.

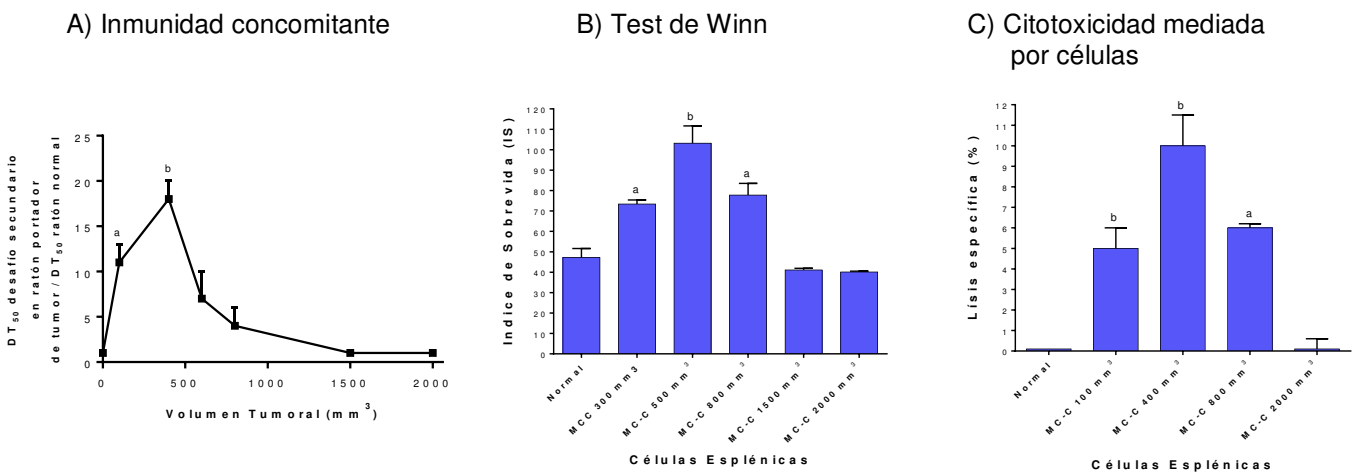


Figura 22: A) Inmunidad concomitante: expresada como la DT_{50} de un tumor secundario MC-C en ratones portadores de tumor MC-C/ DT_{50} en animales controles. El eje de abscisa indica el volumen del tumor primario al momento del desafío del tumor secundario. Cada punto representa la media \pm ES de 5 experimentos. a: $p < 0,002$ comparado con ratones controles y ratones portadores de tumor MC-C de 1500 y 2000 mm^3 ; $p < 0,05$ comparados con ratones portadores de tumor MC-C de 800 mm^3 . b: $p < 0,001$ comparado con ratones controles y ratones portadores de tumor MC-C de 800 , 1500 y 2000 mm^3 ; $p < 0,02$ y $p < 0,05$ comparados con ratones portadores de tumor MC-C de 600 mm^3 y 100 mm^3 , respectivamente. B) Test de Winn: 50×10^6 células esplénicas de ratones normales o de ratones portadores de tumor de diferente tamaño fueron mezclados *in vitro* con 5×10^5 células tumorales MC-C y luego la mezcla inoculada s.c. en ratones naïve. Cada barra representa la media \pm ES de 5 experimentos. a: $p < 0,001$ comparado con ratones controles y ratones portadores de tumor MC-C de 1500 y $> 2000\text{ mm}^3$. b: $p < 0,001$ comparado con ratones controles y ratones portadores de tumor MC-C de 1500 y $> 2000\text{ mm}^3$; p

< 0,002 y $p < 0,01$ comparado con ratones portadores de tumor MC-C de 300 mm³ y 800 mm³, respectivamente. C) Citotoxicidad mediada por células. Se midió la actividad citotóxica de 2×10^6 células esplénicas de ratones normales o ratones portadores de tumor de diferente tamaño sobre 2×10^4 células tumorales marcadas con ⁵¹Cr. Cada barra representa la media \pm ES de 4 experimentos. a: $p < 0,01$ comparado con ratones controles y ratones portadores de tumor MC-C de > 2000 mm³. b: $p < 0,001$ comparado con ratones controles y ratones portadores de tumor MC-C de > 2000 mm³ y $p < 0,05$ comparado con ratones portadores de tumor MC-C de 100 y 800 mm³.

3.3 Ciclos de inmunogenicidad-inmunosupresión durante diferentes pasajes s.c. del tumor MC-C.

Para determinar si esta inmunosupresión asociada al crecimiento de MC-C era resultado de inmunoedición o inmunomodulación, realizamos el estudio de la inmunogenicidad comparando la respuesta inmune anti-tumoral obtenida en el pasaje 5 con aquella obtenida en el pasaje 20 utilizando los mismos métodos descritos en 3.1. Como se ve en la Tabla 2, no hay diferencias significativas en la inmunización de tumores provenientes del pasaje 5 vs aquella obtenida del pasaje 20, demostrando que la capacidad del tumor MC-C de generar una respuesta inmune anti-tumoral no se pierde a lo largo de varios pasajes. Es de hacer notar que los pasajes sucesivos de tumor en ratones singeneicos se realizan habitualmente con fragmentos o células provenientes de tumores grandes mayores a 2000 mm³ (donde una fuerte inmunosupresión era generada). Por lo tanto, si hubiera habido inmunoedición y la respuesta inmune hubiera “esculpido” el perfil del tumor que tiene ≥ 2000 mm³, se habrían seleccionado variantes no inmunogénicas, en estos tumores grandes, y el rasgo “inmunogenicidad” se hubiera perdido ya en el 1º pasaje. Es evidente que esto no ha ocurrido, ya que como se muestra en la tabla 2, se detecta el mismo tenor de inmunogenicidad en los pasajes 5 y 20. Idéntico resultado se obtuvo cuando los sucesivos pasajes se hicieron con fragmentos o células provenientes de tumores < de 500 mm³, es decir, con tumores de ratones que no habían entrado todavía en el estadio de inmunosupresión. Confirmando las conclusiones anteriores, la expresión de MHC-I, cuya regulación negativa ha sido postulada como un importante mecanismo de escape tumoral, es igual, tanto en tumores menores de 500 mm³, como en mayores a 2000 mm³ (Figura 23A). Asimismo, tampoco hubo diferencias significativas cuando se analizó la citotoxicidad

tanto *in vitro* como *in vivo*, de esplenocitos inmunes, sobre células tumorales provenientes de tumores pequeños (< 500 mm³) o grandes (2000 mm³) (Figura 23B-C). Esto demuestra que esta caída en la inmunidad anti-tumoral no se debe a un cambio intrínseco de las células tumorales que “downregulan” MHC-I o esconden o cambian antígenos y en consecuencia dejan de ser reconocidas por el sistema inmune (teoría de la inmunomodulación), sino por el contrario, se trata de una activa inhibición de los mecanismos inductores y/o efectores de la respuesta inmune anti-tumoral montada en cada nuevo pasaje del tumor MC-C, debido a la presencia del tumor (inmunomodulación).

Tabla 2: Inmunogenicidad del fibrosarcoma murino MC-C proveniente de diferentes pasajes, expresado como aumento de la DT₅₀ en ratones pre-tratados con diferentes procedimientos de inmunización respecto de la DT₅₀ observada en ratones controles.

Ensayos de inmunización	Tumor de pasaje 5		Tumor de pasaje 20	
	DT ₅₀ (n) ^a	DT ₅₀ tratados/control ^b	DT ₅₀ (n) ^a	DT ₅₀ tratados/control ^b
Implantación y excisión	> 5x10 ⁶ (4) ^c	> 100	> 5x10 ⁶ (4) ^c	> 100
Dosis subletales de tumor	> 5x10 ⁶ (4) ^c	> 100	> 5x10 ⁶ (4) ^c	> 100
Células tumorales irradiadas con rayos X	> 5x10 ⁶ (4) ^c	> 100	> 5x10 ⁶ (4) ^c	> 100
Control	5x10 ⁴ (6)	1	5x10 ⁴ (6)	1

Tumor de pasaje 20 (2000 mm³): tumor obtenido luego de 20 pasajes provenientes de tumores de 2000 mm³.

a: DT₅₀: Número de células tumorales inoculadas s.c. capaces de crecer en el 50% de los ratones; (n)= número de experimentos; en cada experimento hubo 10-20 ratones controles y 10-20 ratones que recibieron el procedimiento de inmunización, que luego fueron desafiados con diferentes dosis s.c. de células tumorales MCC, con lo cual se calculó la DT₅₀ en cada caso. El error estándar (ES) nunca excedió el 10% del valor medio.

b: Relación o cociente entre: DT₅₀ del grupo tratado/ DT₅₀ del grupo control

c: p < 0,001 comparado con el control.

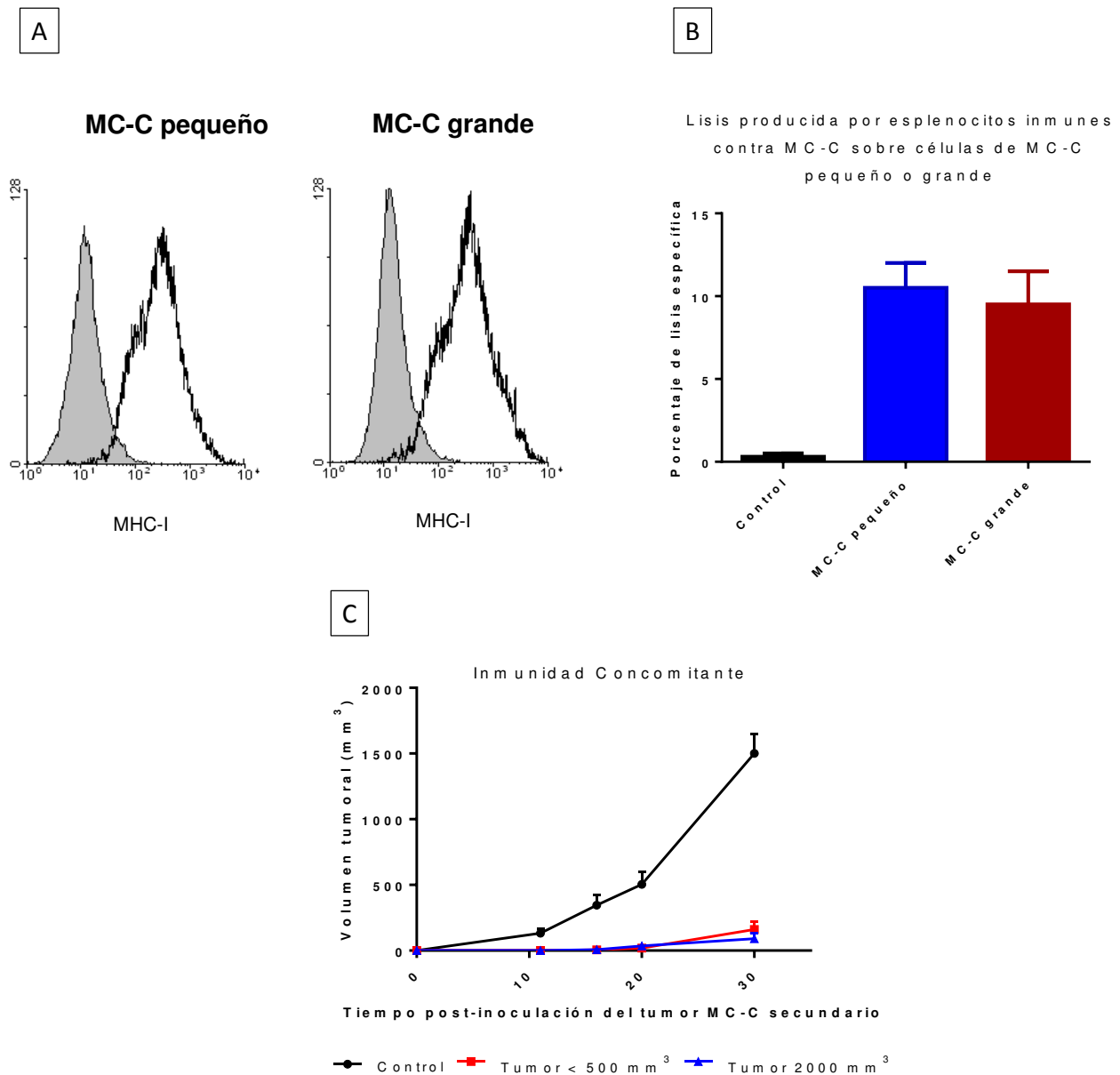


Figura 23: A) Expresión de MHC-I en tumores pequeños ($< 500 \text{ mm}^3$) y en tumores grandes (2000 mm^3). Histograma representativo de 3 experimentos independientes. B) Lisis específica producida por esplenocitos inmunes contra MC-C sobre células tumorales provenientes de tumores pequeños ($< 500 \text{ mm}^3$) y de tumores grandes (2000 mm^3). Cada barra representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. C) Inmunidad concomitante generada por un tumor primario pequeño ($< 500 \text{ mm}^3$) contra desafíos secundarios realizados con 5×10^5 células provenientes de tumores pequeños (Tumor $< 500 \text{ mm}^3$; $n = 7$) o de tumores grandes (Tumor 2000 mm^3 ; $n = 10$). Se grafica el crecimiento de los tumores 2° y de tumores controles (inoculados en ratones no portadores de tumores primarios). P: N.S. entre Tumor pequeño vs Tumor grande.

3.4 El tratamiento antiinflamatorio revierte parcialmente la inmunosupresión generada por el tumor MC-C.

Como se demostró previamente, la inmunosupresión llamada históricamente “eclipse inmunológico” (Gorelik et al 1983), es debida a una alteración de la respuesta inmune anti-tumoral y una clara asociación entre el 2° pico de inflamación sistémica y el eclipse inmunológico es sugerida por los siguientes hechos: En primer lugar, la correlación temporal entre ambos fenómenos. En este sentido, la concentración sérica de IFN- γ , que es una citoquina asociada a la respuesta inmune adaptativa, a excepción de los otros parámetros inflamatorios, baja rápidamente después del pico al día 15, coincidente con la inmunosupresión (Figura 24). En segundo lugar, la dramática expansión de MDSC observada durante el crecimiento de MC-C y la disminución de CD en bazo (al menos en parte, por la incapacidad de precursores mieloides de diferenciarse a CD8; [capítulo 1]) (Figura 25). Esto indudablemente deteriora la capacidad del animal portador del tumor para mantener una efectiva respuesta inmune antitumoral. Asimismo, las células MDSC parecen ejercer, según datos de diversos laboratorios, un significativo efecto inmunosupresor a través de la inhibición de células CD8 citotóxicas, la inducción de Treg y también como consecuencia de su habilidad para diferenciarse en TAM (macrófagos inmunosupresores asociados al tumor). En tercer lugar, la inhibición de la proliferación de esplenocitos inmunes contra el tumor MC-C incubados con antígenos tumorales por co-cultivo con suero de ratones portadores de tumores MC-C grandes, que mostraban una alta concentración de citoquinas pro-inflamatorias y proteínas de fase aguda, pero no con suero normal o suero de ratones portadores de tumores MC-C pequeños (Tabla 3).

De hecho, el tratamiento de los ratones portadores de tumor MC-C grande (1500 mm³), con una sola dosis de DX, por la ruta i.p., redujo significativamente los parámetros de inflamación sistémica y el número de MDSC, mientras que aumentó el número de las células dendríticas esplénicas (Figura 25) y revirtió el efecto inhibitorio del suero de ratones portadores de tumor sobre la proliferación de esplenocitos (Tabla 3); Los efectos máximos fueron observados al día 3 y continuaron hasta el día 7 después del tratamiento.

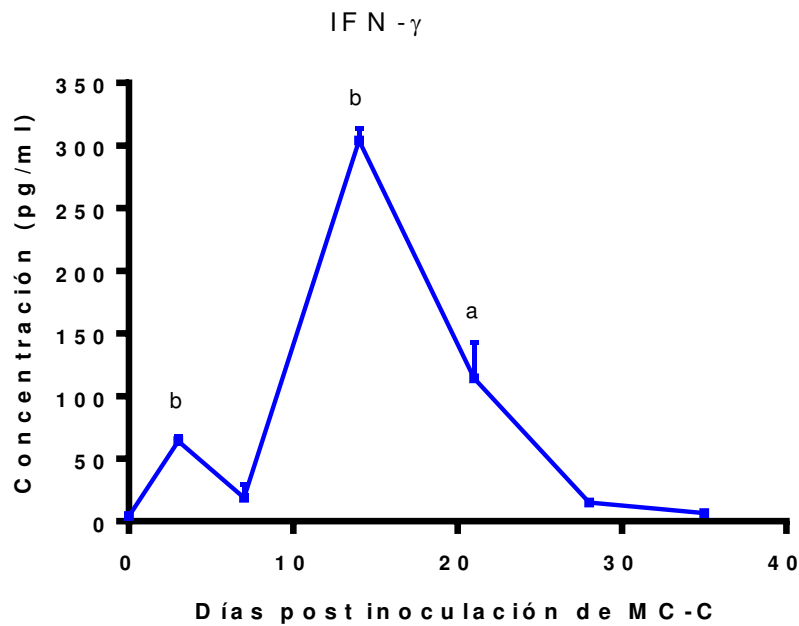


Figura 24: Cinética de la concentración sérica de IFN- γ , donde muestra dos picos coincidentes con la inflamación sistémica, aunque baja rápidamente después del pico del día 15, coincidente con la inmunosupresión. Cada punto representa la media \pm error estándar de 5 determinaciones. a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$.

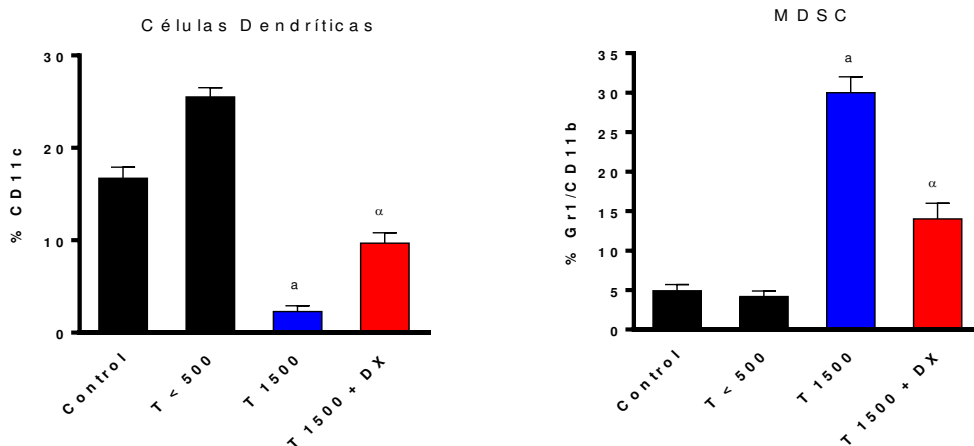


Figura 25: Porcentaje de las poblaciones esplénicas de células dendríticas y mieloides inmaduras (MDSC) obtenidas de ratones normales (Control), ratones con tumor pequeño (volumen $< 500\text{mm}^3$; T < 500), ratones con tumor grande (volumen 1500mm^3 ; T 1500) y ratones con tumor grande en donde 3 días antes de la extracción del bazo se les aplicó una dosis de dexametasona (T 1500 + DX). Los resultados representan la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes. La estadística se realizó comparando los ratones normales vs los portadores de

tumor grande, y los de tumor grande vs. el grupo de ratones que recibió dexametasona. $a = p < 0,001$ y $\alpha = p < 0,01$.

Tabla 3: Efecto del suero de ratones portadores de tumores MC-C grandes sobre la proliferación in vitro de esplenocitos inmunes activados con lisados tumorales.

<i>Toma de 3[H] timidina por esplenocitos (c.p.m. \pm s.e.)^a</i>					
Dilución de suero final	MC-C 1500 mm ³	Normal	MC-C 1500 mm ³ + DX -3	MC-C 1500 mm ³ + DX -7	Medio solo
---	---	---	---	---	22117 \pm 981
1:2	3757 \pm 749 ^a	8507 \pm 730	10389 \pm 213	3107 \pm 217 ^e	
1:4	6072 \pm 691 ^b	13688 \pm 1267	14543 \pm 1324	4567 \pm 234 ^f	
1:8	9707 \pm 1014 ^c	15048 \pm 1219	14340 \pm 677	11245 \pm 1005 ^g	
1:16	10184 \pm 784 ^d	15367 \pm 533	15485 \pm 1248	13034 \pm 1369	
GIU ₅₀ /ml	> 160	28.1	22.9	78.5	

^aCada valor es la media de triplicados a sextuplicados excepto para el Medio solo (n=12) y para dilución 1:2 de MC-C 1500 mm³ y MC-C 1500 mm³ + DX -3 (n=2)

^a $p < 0,05$ vs normal (misma dilución) y $p < 0,02$ vs MC-C 1500 mm³ + DX-3 (misma dilución)

^b $p < 0,001$ vs normal y MC-C 1500 mm³ + DX-3

^c $p < 0,05$ vs normal y $p < 0,01$ vs MC-C 1500 mm³ + DX-3

^d $p < 0,001$ vs normal y $p < 0,05$ vs MC-C 1500 mm³ + DX-3

^e $p < 0,001$ vs normal y MC-C 1500 mm³ + DX-3

^f $p < 0,01$ vs normal y MC-C 1500 mm³ + DX-3

^g $p < 0,05$ vs MC-C 1500 mm³ + DX-3

El eclipse inmunológico se evidencia por un pérdida de inmunidad concomitante que se observa cuando se inocula un desafío tumoral secundario a ratones portadores de tumores grandes (1500 mm³; grupo Eclipse), y este desafío crece en forma similar a tumores controles (grupo control). Considerando los experimentos anteriores, evaluamos si un tratamiento antiinflamatorio es capaz de revertir ese eclipse inmunológico. Cuando se inoculó indometacina (grupo Eclipse + Indo) o dexametasona (grupo Eclipse + DX) antes del implante del tumor secundario a ratones portadores de tumores grandes (1500 mm³) se produjo una significativa restauración de la inmunidad concomitante, evidenciada por la inhibición parcial del tumor secundario (Figura 26). En el grupo Pre-eclipse (desafío secundario a ratones portadores de tumor MC-C de menos de 500 mm³), se observa una respuesta inmune anti-tumoral evidenciada por la capacidad de inhibir específicamente el crecimiento de un implante tumoral secundario (grupo Pre-eclipse).

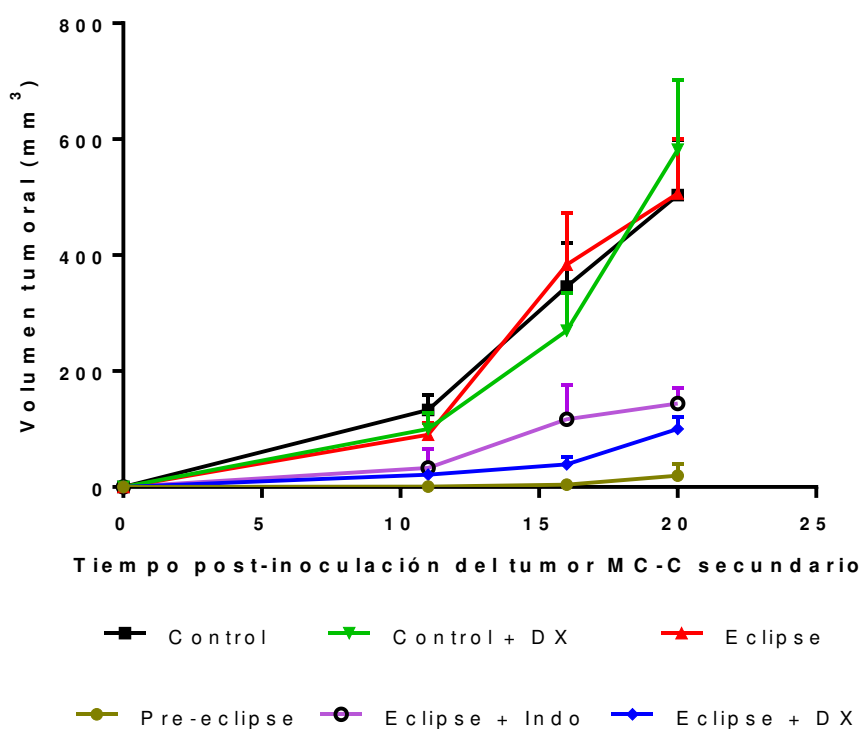


Figura 26: Reversión del eclipse inmunológico por tratamientos antiinflamatorios. Crecimiento de un implante secundario de tumor MC-C (5×10^5 células) realizado en el flanco izquierdo (F.I.) de ratones portadores de tumor MC-C primario (en flanco derecho; F.D.) de 1500 mm^3 , que recibieron solución fisiológica (S.F.; Eclipse; $n = 11$), indometacina (Eclipse + Indo; $n = 10$) o dexametasona (Eclipse + DX; $n = 13$) 3 días antes del inóculo tumoral. Como control positivo, se analizó el crecimiento de un implante tumoral en F.I. en ratones no portadores de tumor primario que recibieron S.F. (Control; $n = 15$) o dexametasona (Control + DX; $n = 10$) 3 días antes del inóculo tumoral. Como control positivo de inhibición tumoral por inmunidad concomitante se midió el crecimiento de un implante tumoral en F.I. en ratones portadores de un tumor primario (en F.D.) de menos de 500 mm^3 (Pre-eclipse; $n = 7$). Comparación de Eclipse + DX con los otros grupos: Día 16: $p < 0,001$ vs todos los otros grupos. Día 20 $p < 0,01$ vs Control y $p < 0,002$ vs Control + DX y vs Eclipse. Día 16 y 20 $p < 0,05$ Eclipse + Indo vs Control.

3.5 Una condición experimental de inflamación sistémica bloquea la respuesta inmune anti-tumoral.

En el ítem 3.4 demostramos que el estado de inmunosupresión observado en ratones portadores de MC-C que superaban los 500 mm^3 , era parcialmente revertido, utilizando un tratamiento antiinflamatorio, lo que sugirió que la inflamación sistémica generaba el estado de inmunosupresión. En este ítem evaluaremos la

proposición recíproca, a saber, si una condición inflamatoria sistémica, deliberadamente creada con un agente externo, puede disminuir la respuesta inmune anti-tumoral. Con este objetivo, se inoculó tioglicolato i.p. en ratones portadores de tumores MC-C pequeños ($< 500 \text{ mm}^3$), que generan inmunidad concomitante contra implantes de tumor secundarios y en ratones inmunizados con células irradiadas (inmunidad convencional o sinecomitante) (Figura 27). La inmunidad antitumoral, generada tanto por el tumor primario pequeño (Figura 27A) como, por la pre-inmunización con células tumorales irradiadas (Figura 27B) fue bloqueada por la inoculación sistémica de tioglicolato. En ambos casos, esta inmunidad fue restaurada cuando indometacina fue inoculada junto con tioglicolato (Figura 27).

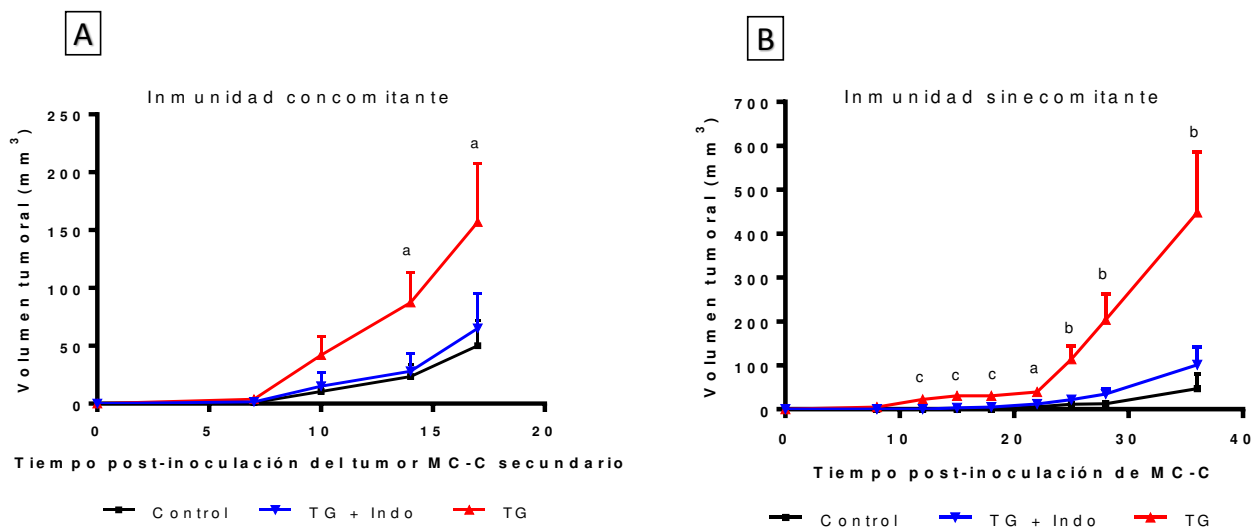


Figura 27: A) Cinética del tumor secundario MC-C (iniciado por 5×10^5 células) en ratones tratados con tioglicolato (TG, $n = 15$), o con solución fisiológica (S.F.; Control, $n = 16$). El tumor secundario y el TG fueron inoculados 10 días después (día 0) del implante del tumor primario (cuando este tenía menos de 500 mm^3). B) Cinética del tumor MC-C en ratones inmunizados con células tumorales irradiadas y tratados con tioglicolato (TG, $n = 16$) o con solución fisiológica (Control, $n = 13$). $3\text{-}4 \times 10^6$ células tumorales irradiadas fueron inoculadas 14 (día -14) y 7 días antes (día -7) y el TG fue inoculado 2 días (día -2) y 1 día antes (día -1) del inóculo tumoral (día 0). a: $p < 0,05$; b: $p < 0,02$; c: $p < 0,01$ respecto del control.

Conclusión parcial

El fibrosarcoma MC-C es un tumor fuertemente inmunogénico, ya que en 1º lugar, puede vacunarse preventivamente contra él, y en 2º lugar, porque

despierta una respuesta inmune anti-tumoral durante las primeras etapas de su crecimiento. Esta inmunidad comienza a desaparecer cuando el tumor supera los 500 mm³, e ingresa en una etapa de inmunosupresión anti-tumoral conocida históricamente como “eclipse inmunológico” que coincide cronológicamente con el 2º pico de inflamación sistémica. Los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que la inmunosupresión inducida por MC-C, no se debe a un cambio intrínseco de la célula tumoral (inmunoedición), sino a la alteración de la respuesta inmune del hospedador en cada nuevo pasaje inducida por la presencia del tumor (inmunomodulación). La atenuación de la inflamación sistémica en ratones portadores de tumor de 1500 mm³ revirtió parcialmente la inmunosupresión, lo que se demostró por la restauración de la capacidad de estos ratones para inhibir un implante tumoral secundario. En contraposición, la inoculación de un agente pro-inflamatorio (tioglicolato) bloqueó parcialmente la inmunidad anti-tumoral, tanto la montada durante el crecimiento tumoral (inmunidad concomitante), como la generada por vacunación con células tumorales irradiadas (inmunidad convencional o sinecomitante). Estos resultados sugieren que para el caso de tumores inmunogénicos, mecanismos de inmunosupresión inducidos por la inflamación sistémica, que le permitirían al tumor evadir la respuesta inmune originalmente dirigida contra él, también participarían del efecto promotor de ésta, sobre el crecimiento tumoral.

Capítulo 4:

La inhibición de la inflamación sistémica mejora la efectividad de las terapias convencionales

Dado que la inflamación sistémica contribuye significativamente a la patología asociada al crecimiento del tumor, puede predecirse que si en lugar de atacar solo a la célula maligna, también se atacara a la inflamación sistémica, disminuyendo la inmunosupresión y los daños multiorgánicos asociados a esa condición, los individuos portadores de tumor podrían ser menos sensibles a los efectos secundarios de la cirugía, radio y quimioterapia, obteniendo mejores resultados con terapias convencionales contra el cáncer. Con el objetivo de evaluar dicha predicción, hemos comparado el crecimiento de tumores MC-C en ratones que fueron tratados con cirugía, radioterapia y quimioterapia con ratones portadores de tumor que recibieron esos tratamientos junto con un esquema antiinflamatorio sistémico.

Cirugía: La escisión quirúrgica del tumor MC-C es generalmente curativa cuando el volumen tumoral es menor a 2000 mm^3 . En contraste, cuando el tumor es $\geq 2000 \text{ mm}^3$, la extirpación del tumor es a menudo seguida por recurrencias locales exhibiendo un mayor grado de malignidad que el tumor original. Para probar el impacto de un tratamiento antiinflamatorio sobre el procedimiento quirúrgico (de otra forma inefectivo), ratones portadores de tumores grandes ($2886 \pm 114 \text{ mm}^3$) fueron divididos en dos grupos: en el primero, los tumores fueron sólo extirpados quirúrgicamente; en el segundo grupo, los ratones recibieron un tratamiento antiinflamatorio con indometacina y dexametasona 3 días antes de la cirugía y una vez por semana después de la cirugía hasta el final del experimento. Como se muestra en la Figura 28A, el tratamiento antiinflamatorio no solo redujo significativamente el número de recurrencias de tumor (recidivas) y prolongó la supervivencia de todos los ratones más de 4 veces, sino que también redujo el crecimiento y prolongó la supervivencia de los ratones que exhibieron recidivas (Figura 28B-C). Cuando una sola dosis del tratamiento antiinflamatorio fue llevada a cabo antes o después de la extirpación, no se observó un efecto significativo (datos no mostrados). La acción benéfica del tratamiento antiinflamatorio combinado con cirugía, estaría asociado al hecho de que, como observamos en el Capítulo 1.4, los parámetros de inflamación sistémica no desaparecen inmediatamente después de la extirpación del tumor, sino que permanecen relativamente elevados al menos durante 2 semanas luego de la cirugía. Esta inflamación sistémica remanente podría naturalmente, ejercer efectos deletéreos sobre el organismo y promover el

crecimiento de las eventuales recidivas, efectos que serían limitados por el tratamiento antiinflamatorio.

Radioterapia: 2 grupos de ratones portadores del tumor MC-C de entre 200 a 300 mm³ recibieron irradiación local en la zona del tumor. Uno de estos grupos recibió un tratamiento antiinflamatorio adicional con indometacina y dexametasona 2 veces por semana comenzando 1 día antes de la irradiación (grupo Radio + Anti), mientras que el otro grupo recibió solución fisiológica (grupo Radio). Un tercer grupo, lo constituyeron ratones portadores de tumor que no recibieron ningún tratamiento (grupo Control). Como se muestra en la Figura 29) el tratamiento antiinflamatorio retardó el crecimiento tumoral y prolongó la sobrevida de los ratones, con respecto de los que habían recibido sólo radioterapia. Naturalmente los ratones del grupo sin tratar exhibieron un crecimiento tumoral más acelerado y una menor sobrevida que los ratones tratados.

Quimioterapia: Ratones portadores de tumor MC-C de entre 200-300 mm³ fueron divididos en 3 grupos. El 1° grupo no recibió tratamiento alguno (grupo Control). El 2° grupo recibió la droga quimioterapéutica vincristina (1mg/kg por peso de ratón) por la vía i.p., 1 vez por semana hasta el fin del experimento (grupo Quimio). El 3° grupo recibió quimioterapia 1 vez a la semana, e indometacina y dexametasona 2 veces a la semana hasta el fin del experimento (grupo Quimio + Anti). Como se muestra en la Figura 30, el tratamiento combinado, antiinflamatorio más quimioterapia retardó el crecimiento tumoral y prolongó la sobrevida de los ratones con respecto a los que habían recibido solo quimioterapia. Naturalmente los ratones del grupo sin tratar exhibieron un crecimiento tumoral más acelerado y una menor sobrevida que los ratones tratados.

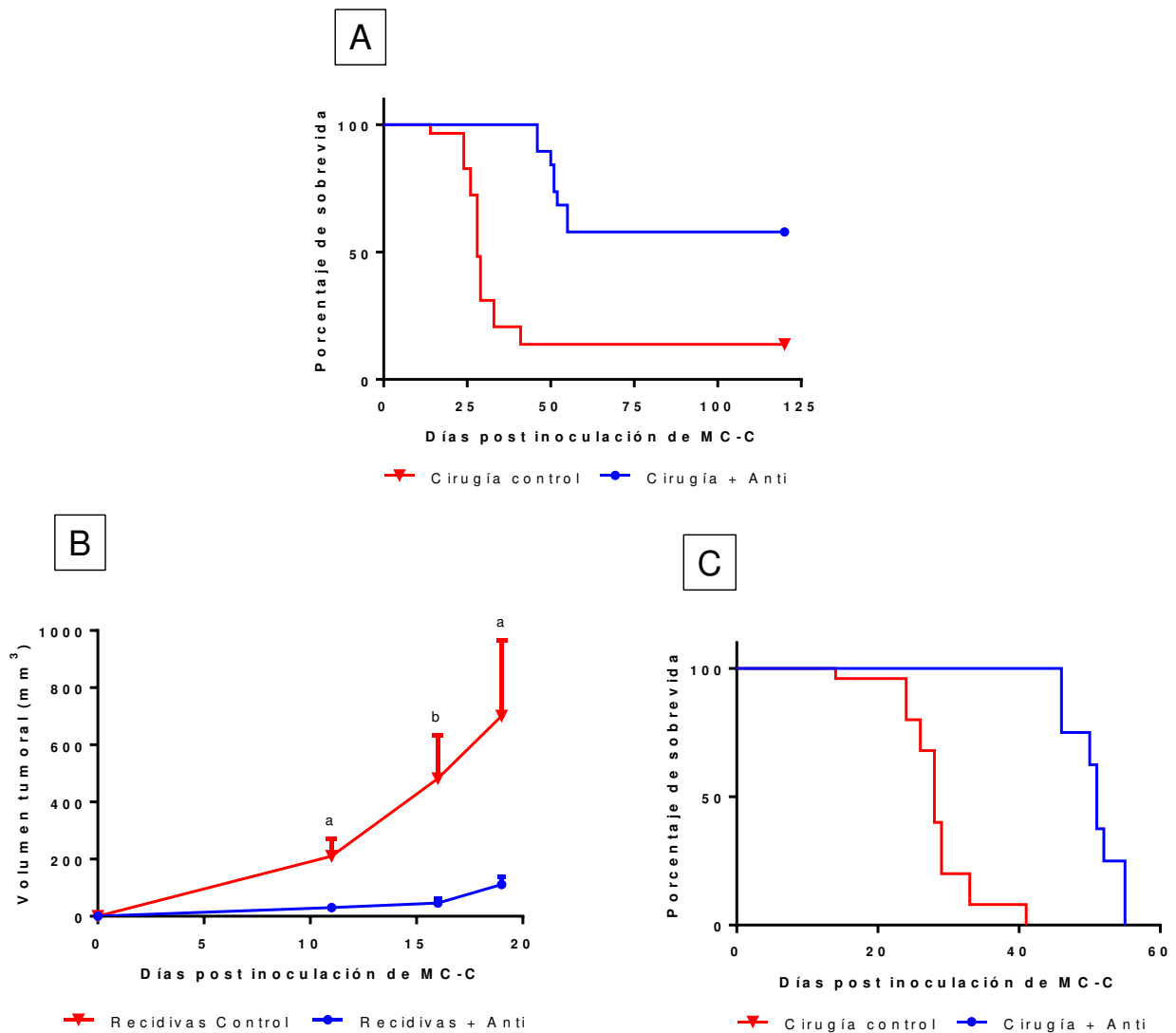


Figura 28: A) Supervivencia de todos los ratones portadores de tumor MC-C, tratados sólo con cirugía o con cirugía y un tratamiento antiinflamatorio. Los ratones que permanecieron vivos hasta el fin del experimento no mostraron recidivas (4/29 para el control y 11/19 para los ratones tratados con un tratamiento antiinflamatorio adicional). B) Crecimiento de las recidivas luego de la escisión del tumor MC-C, en ratones que recibieron S.F. (Recidivas Control, n = 24) y en ratones que recibieron un tratamiento antiinflamatorio adicional (Recidivas + Anti, n = 8). C) Supervivencia de los ratones que exhibieron recidivas. a: $p < 0,02$; b: $p < 0,01$. Supervivencia cirugía control vs cirugía + Anti $p < 0,0001$ en ambos casos.

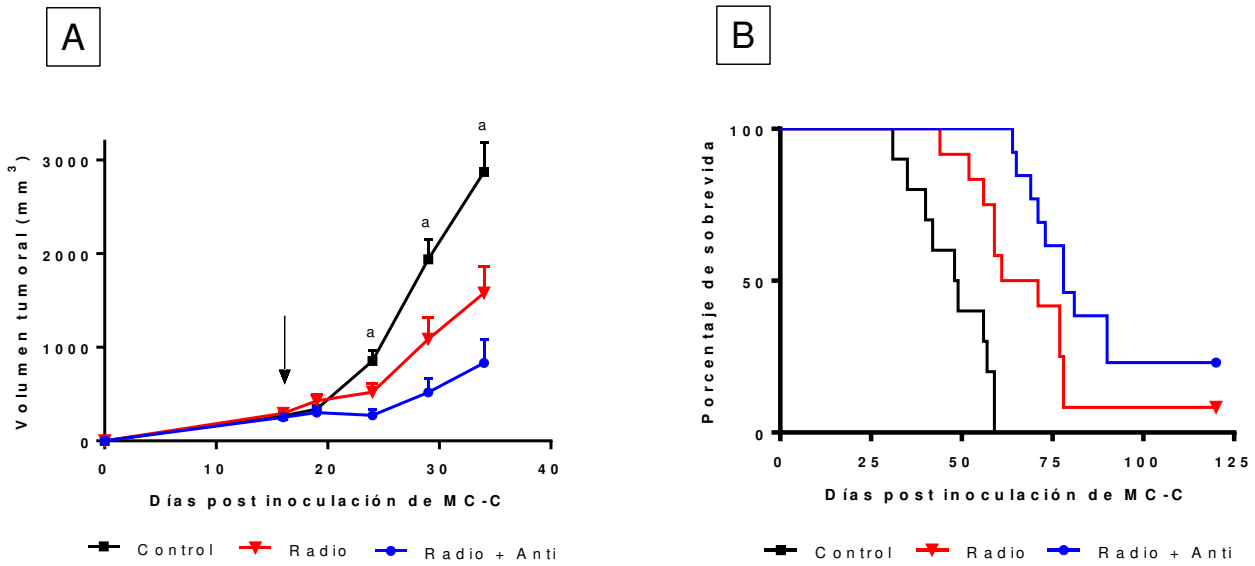


Figura 29: A) Crecimiento del tumor MC-C en ratones controles (Control; n = 14), en ratones que recibieron una irradiación terapéutica en el área tumoral (Radio; n = 12) o en ratones que recibieron tanto la irradiación como tratamiento antiinflamatorio (Radio + Anti; n = 13); La flecha indica la radioterapia (día 16). B) Sobrevida de estos ratones. El crecimiento tumoral fue menor con el tratamiento antiinflamatorio. a: p < 0,01 respecto del control. Sobrevida Radio control vs Radio + Anti p < 0,05.

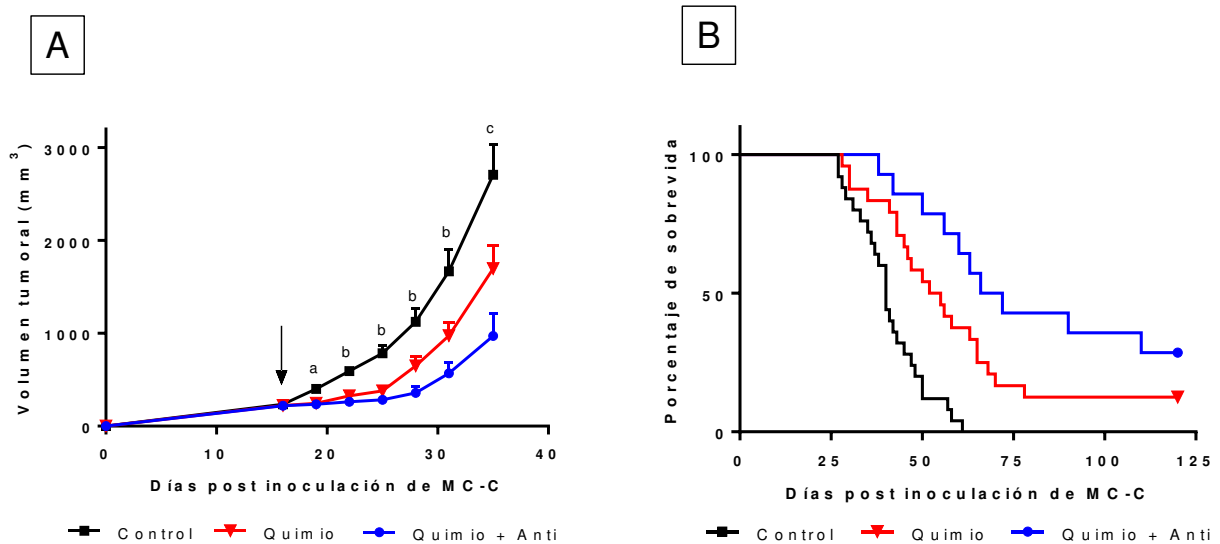


Figura 30: A) Crecimiento de MC-C en ratones controles (Control; n = 25), en ratones tratados solamente con vincristina (Quimio; n = 24) o en ratones tratados con vincristina y un tratamiento antiinflamatorio (Quimio + Anti; n = 16); La flecha indica la quimioterapia (día 16). B) Sobrevida de estos ratones. El crecimiento tumoral fue menor con el tratamiento antiinflamatorio. a: p < 0,05; b: p < 0,02; c: p < 0,01 respecto del control. Sobrevida Quimio Control vs Quimio + Anti p < 0,05.

Conclusión parcial

El tratamiento del fibrosarcoma MC-C con quimio y radioterapia produce una esperable disminución del crecimiento tumoral. Un tratamiento antiinflamatorio añadido a estos protocolos convencionales mejoraron los resultados terapéuticos de aquellos tratamientos, produciendo una inhibición más profunda del crecimiento tumoral. Sin embargo el aumento de la sobrevida con estos tratamientos solo fue moderado. En cambio un excelente resultado terapéutico se obtuvo cuando un tratamiento antiinflamatorio complementó la extirpación quirúrgica del tumor, logrando una dramática reducción del número de recidivas y un altamente significativo aumento de la sobrevida de los ratones que exhibieron recidivas. Todo lo anterior significa que, la atenuación o eliminación de la inflamación sistémica asociada al crecimiento tumoral puede hacer más efectivas las terapias convencionales contra el cáncer

Capítulo 5:

Limitaciones de los tratamientos antiinflamatorios

5.1 Limitaciones de los tratamientos antiinflamatorios.

En los Capítulos anteriores hemos mostrado que la inflamación sistémica observada en ratones portadores de tumor era, en buena medida, el resultado de fenómenos inflamatorios locales acaecidos en el área tumoral. Pero a su vez, nosotros también mostramos, que la inflamación sistémica era mucho más deletérea que la inflamación local, ya que afectaba dramáticamente la salud de los organismos portadores de tumor generando caquexia y fallas multiorgánicas y promoviendo el propio crecimiento tumoral, estableciendo un circuito de retroalimentación positivo entre tumor e inflamación sistémica. Muy significativamente hemos mostrado que, al menos en nuestra serie de tumores, la inflamación sistémica era un marcador más confiable de agresividad tumoral que la propia capacidad del tumor para generar metástasis. Sin embargo, el beneficio de múltiples tratamientos antiinflamatorios para extender la sobrevivencia de los ratones portadores de tumor fue relativamente modesto, ya sea que estos tratamientos fueron aplicados solos o en combinación con radio o quimioterapia. ¿Significa esto que la inflamación sistémica no es tan importante para la patología del cáncer como habíamos supuesto? La respuesta a este interrogante comenzó a develarse cuando observamos que los tratamientos antiinflamatorios parecen dejar de ser efectivos cuando el tumor supera cierto volumen crítico. En efecto, cuando ratones portadores del tumor MC-C (tomado como modelo), recibieron un tratamiento antiinflamatorio periódico, tanto la inflamación sistémica como el crecimiento tumoral y los signos de caquexia, se mantuvieron significativamente bajos hasta que el tumor alcanzó los 1000-1500 mm³ aproximadamente (ver Figura 17, Capítulo 2). Pero a partir de este punto, el crecimiento tumoral, la inflamación sistémica y los signos de caquexia exhibieron un abrupto incremento a pesar de que los ratones siguieron recibiendo el mismo tratamiento antiinflamatorio que hasta ese momento había sido tan efectivo para controlar estas variables (Figura 31). En la Figura 32 se grafica, la pérdida progresiva de la eficacia de los tratamientos antiinflamatorios sobre distintos parámetros de la inflamación sistémica, tales como PMN, TNF- α , IL-1 β e IL-6 circulantes. Es de hacer notar que esta pérdida de eficacia de los tratamientos antiinflamatorios fue aún más precoz sobre los PMN que infiltraban los distintos órganos (datos no mostrados), sugiriendo que hay variables de inflamación sistémica que pueden ser más difíciles de eliminar o atenuar con tratamientos

antiinflamatorios. Sobre la base de estos resultados podemos explicar el aparente contrasentido entre la importancia atribuida a la inflamación sistémica en la patología del cáncer y los escasos beneficios de los tratamientos antiinflamatorios en términos de ganancia de sobrevida. En efecto, los tratamientos antiinflamatorios no son relativamente ineficientes en prolongar la sobrevida porque la inflamación sistémica sea irrelevante a la patología neoplásica, sino porque aquellos tratamientos se tornan ineficaces para reducir la inflamación sistémica después de que el tumor ha superado cierto volumen crítico. Queda por determinar cuáles serían las causas de esta refractariedad a los tratamientos antiinflamatorios.

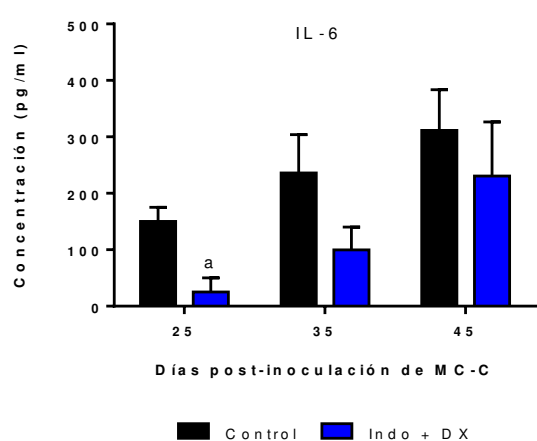
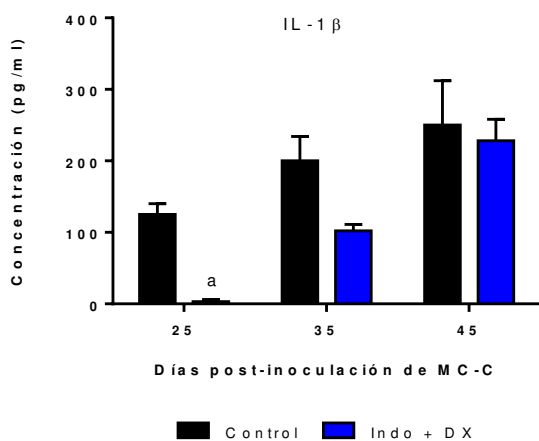
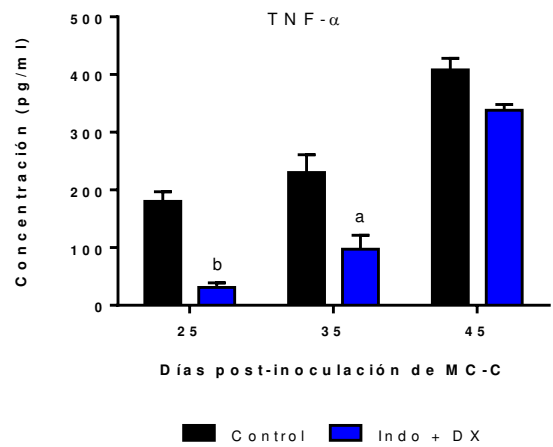
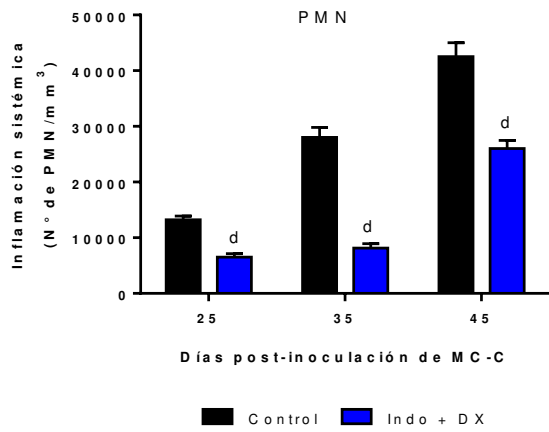
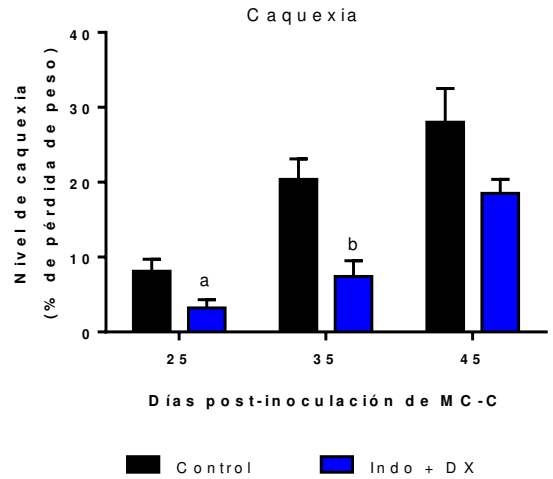
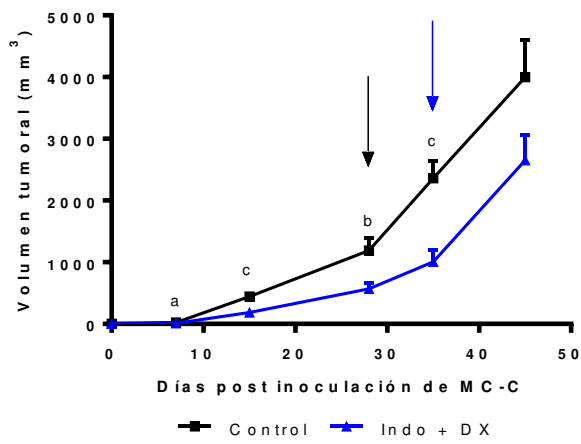


Figura 31: Evolución de diferentes parámetros de inflamación sistémica (caquexia, PMN, TNF- α , IL-1 β e IL-6) en ratones portadores de tumor MC-C que no recibieron tratamiento (Control; n = 15) o que recibieron indometacina y dexametasona cada 3 días durante todo el crecimiento tumoral (Indo + DX, n = 16). La flecha negra indica

el comienzo del crecimiento exponencial del control y la azul de los tratados. a: $p < 0,05$; b: $p < 0,02$; c: $p < 0,01$ y d: $p < 0,001$.

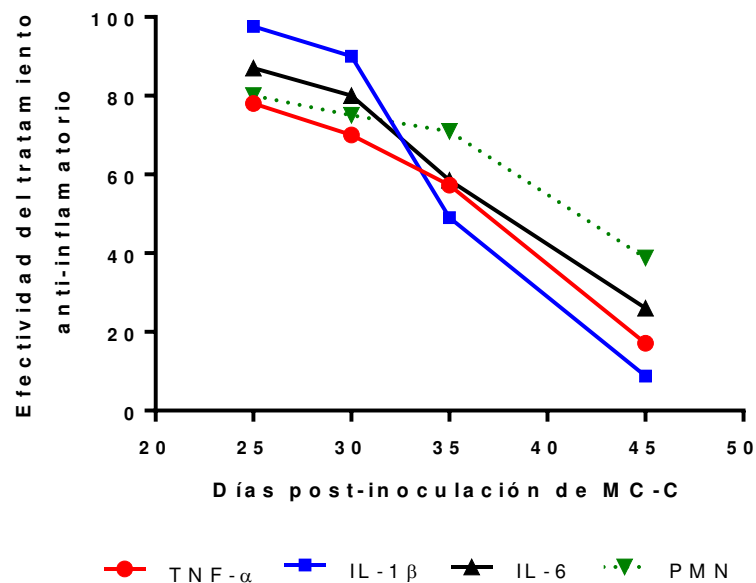


Figura 32: El grado de eficacia de un tratamiento antiinflamatorio sobre una variable inflamatoria, se mide por el porcentaje de disminución de esa variable con respecto al valor basal, tomando como 100% la diferencia entre el valor basal y el valor experimental de esa variable.

5.2 Posibles causas de la refractariedad a los tratamientos antiinflamatorios.

El hecho de que los tratamientos antiinflamatorios se hacen ineficientes para disminuir la inflamación sistémica generada por el tumor después de que este ha superado cierto volumen crítico, puede deberse a muchas causas no excluyentes entre sí.

Por ejemplo, la relativamente baja concentración de las moléculas contra-inflamatorias observada cuando el tumor supera los 1500 mm³ (ver Capítulo 1.6), podría contribuir a la creciente expansión de las citoquinas pro-inflamatorias y a la ineficacia de los tratamientos antiinflamatorios.

También podría ocurrir que la resistencia a los tratamientos antiinflamatorios sea mediada por mecanismos similares a los observados en pacientes con EPOC, asma severa e infección latente con adenovirus. En estos pacientes la resistencia al tratamiento con corticoides se basa principalmente en la drástica reducción de la actividad de la enzima histona deacetilasa que media la inhibición, por corticoides, de la expresión de genes pro-inflamatorios (Barnes 2006, Marwick et al 2007). La inactivación de esta enzima ha probado ser dependiente de mediadores del estrés oxidativo que estarían presentes no solo en los órganos blanco de aquellas patologías, sino también en el propio tumor especialmente cuando éste ha superado los 1500 mm³. En efecto, según hemos visto en el Capítulo 1, en estas condiciones el tumor es infiltrado profusamente por PMN y precursores mieloides con fenotipo GR1 MAC1 que generaban grandes cantidades de ROS (ver Figura 6). Esta producción de ROS podría así afectar la actividad de las histonas deacetilasas promoviendo la resistencia a dexametasona observada en ratones portadores de tumor.

En el Capítulo 2 hemos mostrado, utilizando ratones knock out para TLR-4, que las vías de señalización dependientes de la activación de ese receptor, mediarían una parte importante de los efectos pro-tumorales de la inflamación sistémica. En efecto, estos ratones exhiben una muy baja inflamación sistémica y un crecimiento tumoral significativamente inhibido respecto del observado en ratones convencionales. Sin embargo, una vez que el tumor superó cierto tamaño crítico, la inflamación sistémica comenzó a crecer abruptamente en paralelo con el crecimiento exponencial del tumor y el establecimiento de un estado caquéctico (Figura 33). Esto revela que vías de señalización pro-inflamatorias alternativas a la activación de TLR-4, que podrían ser poco sensibles a los tratamientos antiinflamatorios utilizados, comenzarían a hacerse operativas, una vez que el tumor supera cierto tamaño crítico.

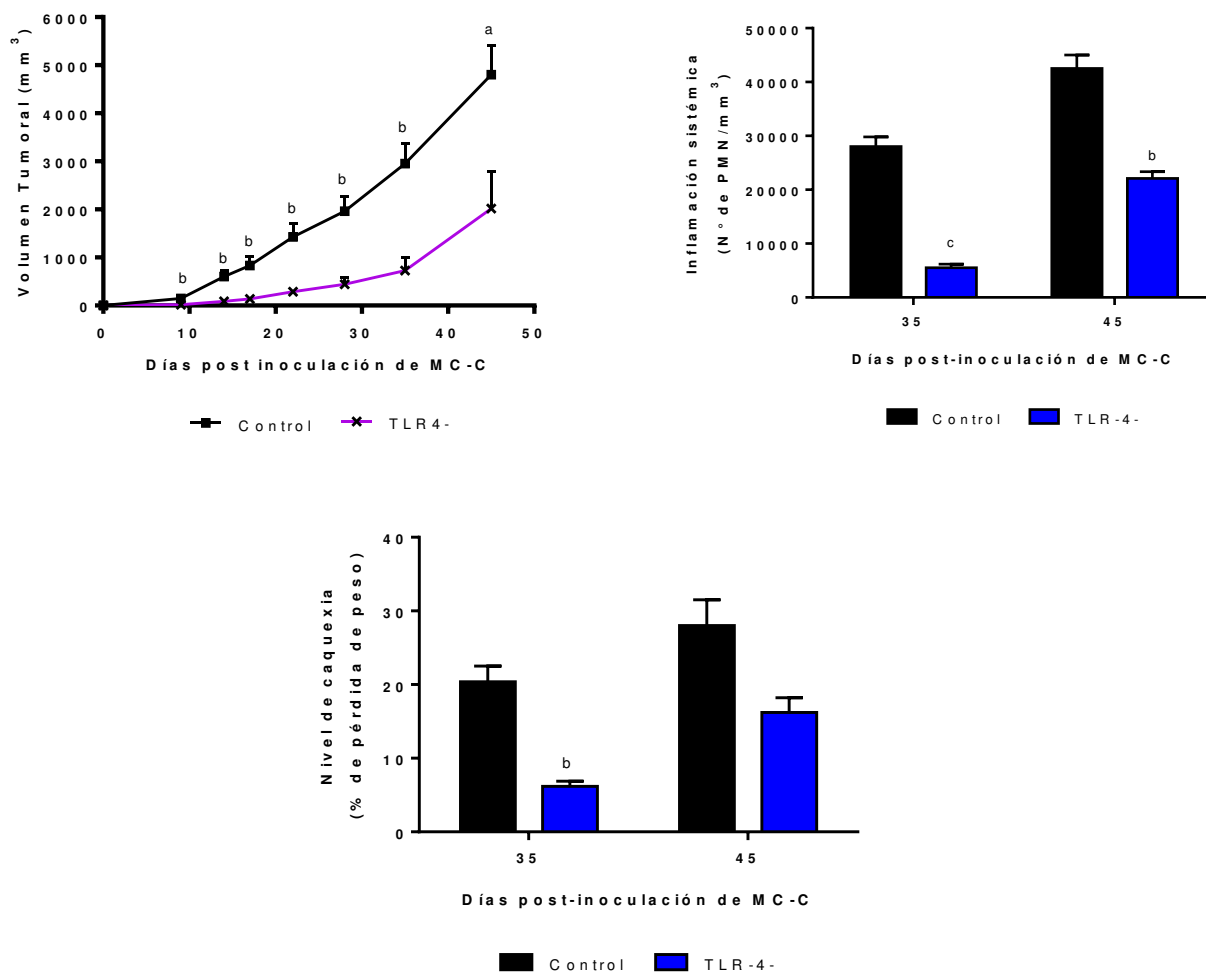


Figura 33: Inicio del crecimiento exponencial del tumor MC-C, el establecimiento de la inflamación sistémica (medida por neutrofilia) y la caquexia (medida por pérdida de peso) en ratones knock out para TLR-4 (TLR-4-, n = 5) muy retrasados respecto del mismo tumor creciendo en ratones convencionales (Control, n = 5). a: p < 0,05; b: p < 0,01; c: p < 0,001.

Conclusión parcial

La inflamación sistémica afecta drásticamente a todo el organismo portador de tumor generando caquexia, fallas multiorgánicas y promoviendo el propio crecimiento tumoral, estableciendo un circuito de retroalimentación positivo entre tumor e inflamación sistémica. Asimismo hay una correlación entre la magnitud de esta inflamación sistémica y la agresividad tumoral. Sin embargo,

el beneficio de múltiples tratamientos antiinflamatorios para prolongar la supervivencia de ratones portadores de tumor fue relativamente modesto. Este aparente contrasentido entre la importancia atribuida por nosotros a la inflamación sistémica y los escasos beneficios de los tratamientos antiinflamatorios en términos de ganancia de supervivencia, pueden explicarse sobre la base de que después de que el tumor supera cierto volumen, aquellos tratamientos se hacen ineficaces para disminuir el crecimiento tumoral, la inflamación sistémica y los signos de caquexia. Esto puede deberse a muchas causas no excluyentes entre sí. Por ejemplo, la concentración relativamente baja de citoquinas contra-inflamatorias observada cuando el tumor superó los 1500 mm³, podría ser ineficiente para atenuar la creciente inflamación sistémica y por ende contribuir a la ineficacia de los tratamientos antiinflamatorios. También podría ocurrir que la gran cantidad de ROS liberados por los PMN y precursores mieloides que infiltran la zona tumoral, inactiven las histonas deacetilasas que median la inhibición por corticoides de genes pro-inflamatorios, como ha sido reportado en pacientes con enfermedades donde la inflamación juega un rol determinante. Por último, vías compensatorias a las inhibidas por los tratamientos antiinflamatorios, podrían explicar esta falta de eficacia. En este sentido, similar a lo observado en ratones portadores de tumor tratados con antiinflamatorios, los ratones knock out para TLR-4 portadores de tumor, exhiben un crecimiento exponencial en paralelo con el abrupto incremento de la inflamación sistémica y el estado caquético después de que los tumores superaron cierto volumen crítico. Esto sugiere que la inflamación sistémica puede establecerse por posibles vías compensatorias a las inhibidas tanto por tratamientos antiinflamatorios exógenos como por mutación genética.

DISCUSIÓN

Durante los últimos 150 años muchos investigadores han sospechado la existencia de una relación entre inflamación y cáncer. Sin embargo, históricamente, sólo en alrededor del 15% de los cánceres humanos, se ha demostrado que un proceso inflamatorio puede ser promotor del crecimiento tumoral y sólo un bajísimo porcentaje se incluye en los llamados tumores inflamatorios, que exhiben una extraordinariamente profusa infiltración intra-tumoral de células inflamatorias. Por otro lado, estudios clínicos recientes han revelado que algunos parámetros aislados de inflamación sistémica, tal como proteína C reactiva (PCR) circulante, estaban presentes en un alto porcentaje de pacientes con cáncer, especialmente en aquellos con peor pronóstico (Hall et al 2013), sugiriendo la posibilidad de que la participación de la inflamación sistémica en la progresión del cáncer podría ser mucho más significativa de lo que se ha pensado previamente. Sin embargo, a pesar de lo expuesto, y diferente de lo que ha ocurrido con el estudio de la inflamación local, la relación entre cáncer e inflamación sistémica no ha sido hasta hoy particularmente analizada.

En esta Tesis, hemos demostrado que durante el crecimiento de 4 tumores murinos, de diferente origen, estirpe histológica e inmunogenicidad y de un tumor humano creciendo en ratones nude, se detectaron 2 picos temporalmente separados de inflamación sistémica. El primer pico fue relativamente pequeño y transitorio ya que fue detectado durante la primera semana luego de la inoculación del tumor. Tal vez este primer pico, represente, en parte, una respuesta del organismo al trauma mecánico de la inoculación de elementos extraños, ya que la inoculación de fibroblastos murinos normales también produjo una manifestación de inflamación sistémica, aunque menor, que la observada después de la inoculación de células tumorales. Este primer pico fue muy similar, tanto en duración e intensidad, a aquel descrito previamente por Kamate durante el crecimiento inicial del mastocitoma murino P815 (Kamate et al 2002). Por otro lado, de acuerdo con nuestro conocimiento, el segundo pico de inflamación sistémica no ha sido descrito previamente y menos aún investigado en modelos experimentales. En nuestros modelos tumorales, el inicio del segundo pico de inflamación sistémica fue observado cuando el volumen tumoral fue mayor que 500 mm³ y coincidente con el inicio del crecimiento exponencial de cada tumor. Este segundo pico de inflamación sistémica fue significativamente más prominente que el primero y su intensidad

aumentó en relación directa con el incremento de la masa tumoral. Estos resultados sugieren que la inflamación sistémica podría ser un fenómeno general de la patología neoplásica y su importancia se puso de manifiesto en el hecho de que, en nuestra colección de tumores, se observó, sorpresivamente, una correlación directa entre la magnitud de la inflamación sistémica generada por cada tumor y su agresividad, correlación que no se observó con la capacidad de generar metástasis. Esto indica, al menos en los tumores analizados por nosotros, que la capacidad de generar una potente respuesta inflamatoria sistémica, produce más efectos deletéreos sobre el organismo que la propia capacidad metastásica, disminuyendo de este modo la sobrevida. Por ejemplo, el tumor MC-C, exhibe una fuerte inflamación sistémica y se comporta de un modo muy agresivo, y los ratones portadores de este tumor exhiben una gran infiltración de leucocitos y daño de tejidos en diferentes órganos, especialmente hígado y riñón, que son compatibles con disminución y aún pérdida de función normal, a pesar de que no se encontró ningún foco metastásico en dichos órganos, por lo cual el daño no pudo ser atribuido a metástasis. Por otro lado, el tumor C7H1, exhibe el fenómeno de inflamación sistémica de menor magnitud, de nuestra colección de tumores, y los ratones portadores de este tumor muestran la mayor sobrevida exhibiendo una relativamente escasa infiltración de leucocitos y daños en diferentes tejidos y órganos, a pesar de que genera un enorme número de metástasis pulmonares y hepáticas.

Las manifestaciones de inflamación sistémica parecen tener su origen en el propio tumor. En efecto, nosotros demostramos utilizando RT-PCR y ELISA que las citoquinas pro-inflamatorias circulantes TNF- α , IL-1 β e IL-6 observadas en ratones portadores de tumor, son producidas, principalmente, cerca o en el sitio del tumor, por células tumorales, por células del estroma o por ambas, ya que su concentración fue mayor a la encontrada en sangre. Una vez liberadas a la circulación general inducen al hígado a producir la proteína de fase aguda sérica SAA. De manera similar, hemos demostrado que factores inflamatorios y derivados del tumor estimulan la mielopoyesis promoviendo la expansión de PMN circulantes maduros e inmaduros como así también células mieloides en diferentes estadios de diferenciación. Esta expansión de la población mieloide ha sido típicamente observada en muchos ratones portadores de tumores de diferente estirpe y también en muchos pacientes con cáncer (Movahedi et al 2008). Estudios histológicos en la

zona tumoral revelaron que el patrón de leucocitos en circulación y la inflamación sistémica, fueron cambiando en paralelo con la infiltración tumoral. En efecto, al día 1 post-inoculación tumoral, hubo una muy intensa respuesta inflamatoria, con abundante infiltración de neutrófilos y edema, en la zona peri-tumoral, que lentamente fue disminuyendo de intensidad. Posteriormente, se detectó el primer pico de inflamación sistémica. Luego el infiltrado tumoral fue principalmente de linfocitos, macrófagos y pocos PMN y cuando el tumor superó los 1000 mm³, se produjo un nuevo fenómeno de extensa inflamación local aguda con presencia predominante de PMN. En este caso se hizo sostenida e iba incrementando su intensidad en correlación con el segundo y prominente pico de inflamación sistémica hasta la muerte del individuo. Esto indica que durante el crecimiento tumoral hay una importante reacción inflamatoria en la zona del tumor, que a pesar de ser “crónica” en el tiempo, tiene las características de una inflamación aguda, con una continua llegada de neutrófilos, con aumento en el daño celular y aumento de necrosis.

Como hemos visto en nuestros modelos tumorales, la inflamación sistémica puede ser consecuencia de una inflamación local aguda sostenida y progresiva. Esto puede ser el resultado de la invasión del tumor a los tejidos adyacentes. Esto iría produciendo un daño cada vez mayor (por el crecimiento expansivo), al producir injuria liberando metaloproteasas, aumentando la permeabilidad vascular y reclutando células inflamatorias. Recíprocamente, la inflamación favorecería la progresión tumoral, ya que cuando se produce ésta, hay secreción de factores de crecimiento, angiogénesis, especies reactivas del oxígeno, que inducen proliferación y diferenciación de células endoteliales, epiteliales, mesenquimáticas e incluso de las propias células tumorales (Moldawer et al 1992, Rudnick et al 2001), y se produce más daño reiniciando el ciclo, atrayendo más células inflamatorias a las inmediaciones del tumor, tales como macrófagos y neutrófilos, que a su vez sintetizan y secretan más citoquinas, quimioquinas y metaloproteasas, afectando la relación entre las células tumorales y el estroma, facilitando la invasión del tumor a otros sitios y promoviendo la angiogénesis. Asimismo, la angiogénesis en el tumor es ineficiente y se producen zonas hipóxicas y anóxicas. Las células tumorales en estas condiciones pueden entrar en apoptosis, expresando el factor inducible por hipoxia (HIF), citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento (Hung et al 2004, Crisostomo et al 2008) e incluso sufrir necrosis celular,

estimulando fuertemente una nueva reacción inflamatoria, en una retroalimentación positiva cada vez mayor. En los tumores de crecimiento lento y menos invasivos, esta injuria sería menor y por lo tanto, no tendrían tanta inflamación local y por ende tanta inflamación sistémica. Esto fue observado en el crecimiento del tumor C7HI que generó la respuesta inflamatoria local y sistémica de menor intensidad. La participación de la inflamación local y sistémica en el origen y desarrollo tumoral podría ser más que una mera coincidencia y de hecho, es posible que esté basada en la naturaleza íntima del tumor. Años atrás, Dvorak postuló, que el cáncer podría ser considerado como una herida que no cierra, por la similitud de los procesos fisiológicos que se observan en unos y otros, tales como aumento en la permeabilidad vascular, extravasación de proteínas plasmáticas (fibrinógeno, fibronectina, plasminógeno) y células inflamatorias, expresión de genes pro-inflamatorios, formación de matriz-gel de fibrina, formación de tejido de granulación (proliferación de fibroblastos, células endoteliales y angiogénesis) y finalmente reemplazo por matriz de colágeno (Dvorak 1986, Riss et al 2006). La notable similitud entre un tumor y una herida que nunca cierra en la que procesos inflamatorios cumplen un rol pivotal, ha sido integrada recientemente en una hipótesis general en la que el crecimiento de células cancerosas es considerado como un intento (fallido) para restaurar una injuria en un órgano compuesto por células “normales” que han perdido su capacidad regenerativa (Ruggiero and Bustuoabad 2006).

En los modelos tumorales que hemos estudiado en esta Tesis, una reacción contra-inflamatoria sistémica fue detectada acompañando o siguiendo las manifestaciones de inflamación sistémica asociada con el crecimiento tumoral, evaluada por la capacidad funcional del organismo para inhibir la migración de PMN a un sitio de inflamación experimental y por la presencia en circulación de corticosterona y de las citoquinas IL-10 y TGF- β . Sin embargo, la capacidad contra-inflamatoria se fue perdiendo a medida que el tumor crecía y la concentración de las moléculas contra-inflamatorias cayó a valores normales o se mantuvo modestamente elevada durante el crecimiento tumoral, mientras que al mismo tiempo, los marcadores de inflamación sistémica continuaron incrementándose progresivamente. Esto sugiere que mecanismos regulatorios de la inflamación sistémica y de la contra-inflamación son alterados durante el crecimiento tumoral. Esta pérdida de mecanismos contra-

inflamatorios se puso en evidencia cuando ratones portadores de tumores grandes (durante el 2º pico de inflamación sistémica) no pudieron responder a una dosis mínima adicional de inflamación sistémica cuando recibieron 2 µg de LPS por vía i.p., y murieron en el 100% de los casos. En efecto, estos ratones portadores de tumor, tienen una hipotrofia severa de la corteza adrenal, y de hecho, presentan una sensibilidad al LPS similar a la observada en ratones adrenalectomizados. Es importante recordar que 150 µg de LPS fueron necesarios para matar al 100% de los ratones normales. Se podría pensar que un quantum de inflamación sistémica es lo que determina la muerte de los ratones portadores de tumor, ya que para, ratones portadores de tumores chicos, en el primer pico de inflamación sistémica, 2 µg de LPS no provocó el deceso en ningún ratón y fueron necesarios 50 µg de LPS para producir la muerte de todos los animales. Un tratamiento antiinflamatorio previo a la inoculación del LPS rescató de la muerte en todos los casos. Tomados en conjunto, estos experimentos demuestran que durante el crecimiento tumoral se genera una respuesta contra-inflamatoria sistémica cuya intensidad es mucho menor que la reacción inflamatoria sistémica inducida por el tumor y por lo tanto es incapaz de neutralizar sus efectos deletéreos. Esta situación es claramente diferente a la observada durante el shock séptico o no séptico, donde después de un abrupto incremento de la concentración sérica de citoquinas pro-inflamatorias, una rápida respuesta contra-inflamatoria es establecida asociada a altos valores de moléculas contra-inflamatorias circulantes que inducen la desaparición de las citoquinas pro-inflamatorias.

Como hemos visto, la inflamación sistémica inducida por el tumor puede afectar la salud de los organismos portadores de tumor a través de la inducción del síndrome de caquexia y fallas en diferentes tejidos y órganos o puede convertir al organismo en un blanco más sensible para traumas o infecciones, como se mostró con la gran sensibilidad de ratones portadores de tumor a la inoculación con LPS. Adicionalmente, hemos mostrado que la inflamación sistémica asociada al crecimiento tumoral podría exacerbar el propio crecimiento tumoral estableciendo un circuito de retroalimentación positiva entre ambos. Esta proposición fue demostrada utilizando 2 estrategias diferentes y complementarias. En 1º lugar, el tratamiento sistémico con un agente pro-inflamatorio -tioglicolato-, al tiempo que la inflamación sistémica generada por el propio tumor era indetectable, exacerbó el crecimiento

tumoral, y esta exacerbación fue contrarrestada con indometacina. En 2° lugar, un tratamiento periódico y sistémico con las drogas antiinflamatorias indometacina y/o dexametasona, retardó significativamente los parámetros de inflamación sistémica, los signos de caquexia y el crecimiento tumoral.

Para evaluar los posibles mecanismos, del impacto de la inflamación sistémica sobre el crecimiento tumoral, utilizamos ratones knock out para el receptor TLR-4 sobre la base de que la inflamación asociada a carcinogénesis, ha sido atribuida primariamente a vías de señalización dependientes de la activación de este receptor. El crecimiento tumoral fue drásticamente inhibido en estos ratones, que a su vez exhibían una significativamente baja expresión de mediadores de inflamación sistémica. Esto sugiere que el efecto promotor de la inflamación sistémica sobre el crecimiento tumoral, estaría al menos en parte, relacionado a mecanismos moleculares asociados a la activación de TLR-4.

Los efectos promotores de la inflamación sistémica sobre el crecimiento tumoral mediados a través de la activación del receptor TLR-4 fueron observados tanto sobre tumores inmunogénicos como no inmunogénicos, sugiriendo la existencia de mecanismos compartidos por ambos tipos de tumores. Además de esos mecanismos comunes, nosotros demostramos que para el caso de tumores inmunogénicos una parte de ese efecto pro-tumoral podía atribuirse a mecanismos de inmunodepresión, que le permitirían al tumor evadir la respuesta inmune dirigida contra él. En efecto, los tumores murinos inmunogénicos inducen, en general, una potente respuesta anti-tumoral sistémica dependiente de linfocitos T, que aumenta progresivamente en etapas tempranas del crecimiento tumoral y que es suficiente para inhibir el crecimiento de implantes tumorales secundarios (inmunidad concomitante), pero no el crecimiento del tumor primario. Sin embargo, cuando el tumor sobrepasa el volumen crítico de 500 mm³, esa respuesta inmune anti-tumoral es “down-regulada” y desaparece estableciéndose un estado de tolerancia inmunológica que es históricamente conocido como “eclipse inmunológico” (Gorelik 83) coincidente con el comienzo del 2° pico de inflamación sistémica. En esta Tesis demostramos que el escape del tumor MC-C (tomado como modelo de tumor inmunogénico) a la respuesta inmune no es por inmunoedición, ya que no hay selección de variantes tumorales que dejan de ser reconocidas por el sistema

inmune, sino por una alteración de la respuesta inmune del huésped (inmunomodulación) que es inducida por la inflamación sistémica. Esta relación causal fue demostrada utilizando 2 estrategias complementarias. En 1° lugar, diferentes tratamientos antiinflamatorios restauraron, al menos en parte, la respuesta inmune anti-tumoral durante la fase del eclipse inmunológico. En 2° lugar, el tratamiento con agentes pro-inflamatorios bloqueó la inmunidad anti-tumoral tanto en ratones pre-inmunizados como en ratones portadores de tumor que exhibían inmunidad concomitante. Este efecto inhibitorio fue contrarrestado con el tratamiento antiinflamatorio. Los mecanismos que subyacen los efectos inhibitorios de la inflamación sistémica sobre la respuesta inmune anti-tumoral, podrían estar asociados con la presencia en circulación de moléculas antiinflamatorias compensadoras que han sido descritas como inmunosupresoras tales como IL-10, TGF- β y corticosterona. Aunque la concentración de estas moléculas inmunosupresoras es relativamente baja o transitoria durante el crecimiento tumoral, es posible que estas citoquinas tengan una función crítica a nivel local, tanto en los ganglios linfáticos drenantes, como en el propio tumor. Por otro lado, una población heterogénea de células mieloides inmaduras denominadas MDSC, que se expanden dramáticamente durante el crecimiento tumoral y también detectadas en respuestas inflamatorias, podría ser otra de las causas del eclipse inmunológico, dada su capacidad de suprimir respuestas T en ganglios linfáticos (directamente o a través de la inducción de Treg) y/o su habilidad para diferenciarse, en la zona tumoral, en macrófagos asociados al tumor (TAM) que son altamente inmunosupresores. Otra de las posibles causas del eclipse es la drástica disminución de células dendríticas en bazo de ratones portadores de tumor como consecuencia de la diferenciación anómala de precursores mieloides inducida por factores liberados por el tumor a circulación.

A pesar de que la relación entre cáncer e inflamación ha sido estudiada por más de un siglo y que en la última década marcadores aislados de inflamación sistémica han sido considerados un factor de mal pronóstico en pacientes con cáncer en varios estudios clínicos, todas estas observaciones no han sido transferidas hasta hoy, a la práctica oncológica de rutina, y pocos estudios experimentales destinados a correlacionar la patología del cáncer con fenómenos inflamatorios sistémicos han sido realizados. Probablemente esta falta de transferencia y de estudios en el tema

se deban a dos circunstancias principales. A) La inconsistencia de la correlación entre pronóstico e infiltrado inflamatorio intra- y/o peri-tumoral y B) El escaso beneficio terapéutico del uso de drogas antiinflamatorias en pacientes oncológicos.

A) Nosotros creemos que la inconsistencia entre pronóstico e infiltrado inflamatorio intra y/o peri-tumoral, se debe al menos, a dos hechos diferentes: En 1º lugar, a que no se tienen en cuenta las poblaciones principales y el fenotipo particular de las células inflamatorias que infiltran el tumor. Por ejemplo, los linfocitos, pueden ser inmunes y atacar las células tumorales y de hecho, abundante infiltrado inflamatorio de linfocitos CD4 o CD8 es frecuente en tumores presumiblemente inmunogénicos y son marcadores de buen pronóstico en estos pacientes (Väyrynen et al 2013, Goeppert et al 2013). Pero también los linfocitos infiltrantes podrían ser Treg que son inmunosupresores y en este caso podrían conferir peor pronóstico. Del mismo modo, los macrófagos que infiltran el tumor pueden ser citotóxicos contra las células tumorales o TAM (siglas en inglés de macrófagos asociados al tumor) que son inmunosupresores y por lo tanto el pronóstico podría ser favorable o no, respectivamente, de acuerdo a qué fenotipo expresen estas células. Asimismo, infiltrados principalmente compuestos de neutrófilos o de leucocitos que expresan ciertos genes relacionados con una respuesta inflamatoria, tales como COX-2 o la metaloproteasa de matriz 2 (MMP-2), confieren, según algunos autores, peor pronóstico independiente del estadio (Khang et al 2008, Zhou et al 2012, Zhao et al 2012, Rao et al 2012, Ao et al 2013). En 2º lugar, a que en nuestra experiencia, si bien la magnitud total de la inflamación local correlaciona con la magnitud de la inflamación sistémica inducida por cada tumor, la intensidad del infiltrado inflamatorio local, por unidad de masa o campo - que es en definitiva lo que ve el patólogo - no necesariamente correlaciona con la magnitud de la inflamación sistémica. Por ejemplo, en nuestros experimentos con el tumor MC-C, al día 1 post-implantación del tumor, hay una densa infiltración de neutrófilos en la zona peri-tumoral, que es aún mayor que la observada al día 30, por unidad de masa tumoral. Sin embargo, la magnitud total de la inflamación local al día 30 es muy superior a la del día 1, habida cuenta de que la masa del tumor al día 30 es de alrededor 2500 mm³, mientras que al día 1 es menor a 1 mm³. Este hecho ejemplifica los posibles errores de apreciación cometidos al considerar sólo la presencia inflamatoria local en el tumor sin considerar la inflamación sistémica, ya que la magnitud de esta última

puede estar subvalorada sobre la base de la magnitud de inflamación local computada por unidad de masa tumoral. De hecho el tumor MC-C que exhibe una inflamación sistémica de gran magnitud, se presenta en el estudio histológico, como un tumor con una respuesta inflamatoria local ligera o moderada similar a la típicamente encontrada en muchos tumores humanos (Gao et al 2005).

B) Los efectos deletéreos que la inflamación sistémica produce sobre el organismo portador de tumor, que hemos demostrado en esta Tesis, podrían prevenir o disminuir los beneficios terapéuticos de terapias anti-tumorales convencionales. Sin embargo, el tratamiento antiinflamatorio solo o combinado con radio o quimioterapia, aunque retardó el crecimiento tumoral, produjo solo un moderado aumento de la sobrevida. Resultados similares han sido descritos en la clínica. Este beneficio relativamente escaso en sobrevida obtenido con el uso de drogas antiinflamatorias parece contradecir la importancia que le hemos atribuido a la inflamación sistémica en la patología del cáncer. Es decir, un tratamiento antiinflamatorio debería tener, en principio, un impacto mucho más profundo en la sobrevida de los ratones portadores de tumor, siendo la inflamación sistémica un marcador de malignidad tumoral. Sin embargo, una vez que el tumor ha superado los 1000-1500 mm³ durante su crecimiento exponencial - retrasado en ratones tratados con antiinflamatorios respecto del control - produce un fenómeno de inflamación sistémica creciente a pesar de que se continúan administrando las drogas antiinflamatorias, que hasta ese momento, habían sido bastante efectivas para limitar la naciente inflamación sistémica y para retardar el crecimiento tumoral. En esta Tesis, hemos observado esta pérdida de eficacia, tanto con un corticoide sintético (dexametasona), como con un AINE (Indometacina), como con la combinación de ambos. También obtuvimos resultados similares, utilizando otras sustancias antiinflamatorias (ácido nordihidroguayarático sólo o en combinación con indometacina, prometazina, clorpromozina, fenidona, L-NAME y losartán). La aparente refractariedad de los tumores a mecanismos antiinflamatorios, después de que han superado cierto volumen crítico, también fue observado en los ratones knock out para TLR-4. En efecto, en estos ratones, los marcadores de inflamación sistémica permanecieron muy bajos durante las primeras semanas después de la inoculación tumoral, lo que fue correlacionado a un crecimiento del tumor significativamente inferior al observado en ratones convencionales. No obstante, después de que el tumor superó

cierto volumen crítico, la inflamación sistémica comenzó a crecer abruptamente en paralelo con el crecimiento exponencial del tumor. Esto revela que vías de señalización pro-inflamatorias alternativas a la activación de TLR-4 comenzaban a ser operativas en estos ratones.

El hecho de que los tratamientos antiinflamatorios se hacen ineficientes para disminuir la inflamación sistémica generada por el tumor, después de que éste ha superado un cierto volumen crítico, puede deberse a muchas causas no excluyentes entre sí. Por ejemplo, la magnitud y la variedad de vías involucradas en la respuesta inflamatoria generada por el tumor pueden ser exageradamente grandes para cualquier tratamiento antiinflamatorio que hemos empleado, habida cuenta de que las dosis máximas que pueden utilizarse de éstos -sin daño colateral o daños menores- son limitadas. En este sentido, la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios pleiotrópicos (o combinación de inhibidores específicos para diferentes vías), más potentes y con menos efectos adversos, podría ayudar a disminuir la inflamación generada por el crecimiento progresivo del tumor. Por otro lado, también podría ocurrir que más allá de los 1500 mm³ el tumor se haga refractario a los tratamientos antiinflamatorios, como ocurre en ciertas enfermedades, como en EPOC y colitis ulcerosa, que son refractarias al tratamiento con corticoides (Barnes and Adcock 1995, Travis et al 1996, Hearing et al 1999, Culpitt et al 2003). En este sentido, la búsqueda de los mecanismos moleculares de esta posible refractariedad, por ejemplo, investigando la estimulación o inactivación de las histonas deacetilasas que inhiben la expresión de genes pro-inflamatorios y cuya inactivación podría estar en la base de la refractariedad de los glucocorticoides en los pacientes con EPOC, podría ser útil para contrarrestar la inflamación sistémica generada por el tumor. Por último, en nuestros modelos tumorales, hemos visto que las citoquinas antiinflamatorias (IL-10 y TGF- β) eran “downreguladas” cuando el tumor superaba los 1500 mm³ y esto podría contribuir a la creciente expansión de las citoquinas inflamatorias, contribuyendo a la ineficacia de los tratamientos antiinflamatorios. En este sentido, el estudio de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de IL-10 y TGF- β en portadores de tumor, podría también ser útil para comprender las causas de esta ineficacia. En definitiva, el relativamente escaso beneficio terapéutico obtenido con la aplicación de tratamientos antiinflamatorios solos o combinados con radio o quimioterapia, no se

debería a que la inflamación sistémica no es importante en la patología tumoral, sino que esa inflamación sistémica no pudo ser contrarrestada una vez que el tumor superó cierto tamaño crítico. Por otro lado, obtuvimos un excelente resultado terapéutico cuando el tratamiento antiinflamatorio se realizó junto a la escisión quirúrgica de tumores \geq a 2000 mm³. En este caso, la eliminación quirúrgica de la fuente principal de inflamación sistémica y de posible refractariedad, permitió al tratamiento antiinflamatorio tener más chances de actuar contra la inflamación sistémica residual, pero aún deletérea, que perdura al menos 2 semanas después de la extirpación del tumor. Dos semanas puede parecer poco tiempo, pero en la vida de un ratón equivalen a aproximadamente 2 años en la vida de un ser humano. En este sentido y del mismo modo, en ensayos clínicos, el uso del antiinflamatorio ketorolac junto con cirugía y quimioterapia, ha demostrado recientemente un profundo impacto en la sobrevida de pacientes con cáncer de mama, eliminando la aparición de metástasis típicamente observada alrededor del 2° año después de la cirugía (Retsky et al 2012).

Conclusión

En esta tesis, hemos demostrado que la capacidad de un tumor para generar inflamación sistémica puede ser considerada, al menos en algunos casos, un indicador de mayor agresividad más confiable que la capacidad para generar metástasis. En este sentido, un conocimiento más preciso de los mecanismos por los cuales la inflamación sistémica promueve el crecimiento tumoral, afecta a todo el organismo y éste se hace refractario a los tratamientos antiinflamatorios, y la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios que exhiban mayor eficacia y menos efectos adversos, probablemente ayude a diseñar nuevas estrategias que complementen y mejoren las terapias actuales contra el cáncer.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Adams SM, Bornemann PH. Ulcerative colitis. *Am Fam Physician* 2013; 87:699-705.
- ❖ Adams, S., D. W. O'Neill, and N. Bhardwaj. Recent Advances in dendritic cell biology. *J. Clin. Immunol* 2005; 25: 177.
- ❖ Agius, L. Paracrine transformation to autocrine autonomy in tumor cell proliferation and spread. Is the neoplastic blood supply a functional determinant of clonality in inducing biologic tumor progressiveness?. *Int. J Mol Med Adv Sciences* 2005; 1: 317-23.
- ❖ Almand B, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients. A mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 2001; 166: 678-89.
- ❖ American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures*. Atlanta, GA: American Cancer Society 2010.
- ❖ Ao R, Du YQ, Wang Y, Chen YS, Wang BY. MMP-2 and DcR3 expression in esophageal cancer tissue and correlation with patient survival. *Int J Clin Exp Med* 2013; 6: 700-5.
- ❖ Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere, and G. Trinchieri. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol* 2001; 2: 1144.
- ❖ Auphan N, Di Donato J, Rosette C y col. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 1995; 270: 286-90.
- ❖ Baecher-Allan, C., J. A. Brown, G. J. Freeman, and D. A. Hafler. CD4+CD25high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *J Immunol* 2001; 167: 1245.
- ❖ Bailar, J. C., 3rd and H. L. Gornik. Trends in cancer mortality: perspectives from Italy and the United States. *Med Lav* 1997; 88: 274-86.
- ❖ Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539.
- ❖ Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol* 2000; 18: 767.
- ❖ Barnes PJ, Adcock IM. Steroid resistance in asthma. *QJM* 1995; 88: 455-68.
- ❖ Barnes PJ. Reduced histone deacetylase in COPD: clinical implications. *Chest* 2006; 129: 151-5.
- ❖ Batista FD, Iber D, Neuberger MS. B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* 2001; 411: 489.
- ❖ Biggar RJ, Chaturvedi AK, Goedert JJ, Engels EA. HIV/AIDS Cancer Match Study. AIDS-related cancer and severity of immunosuppression in persons with AIDS. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 962.
- ❖ Blaser MJ, Chyou PH, Nomura A. Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk. *Cancer Res* 1995; 55: 562-5.
- ❖ Bonfil D y Scharovsky G, *Oncología Molecular y Celular*. Ed Dunken p40 2003.
- ❖ Boshoff C, Weiss R. AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 373-82.
- ❖ Bröcker EB, Kolde G, Steinhausen D, Peters A, Macher E. The pattern of the mononuclear infiltrate as a prognostic parameter in flat superficial spreading melanomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 1984; 107: 48-52.

- ❖ Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 641-54.
- ❖ Burnet F M. Cancer – a biological approach. *Br Med J* 1957; 1: 841.
- ❖ Cairns J. El problema del Cáncer. *Investigación y Ciencia* 1976; 1: 88.
- ❖ Cairns J. *Cancer: Science and Society*. WS Freeman & Co, San Francisco, USA 1978.
- ❖ Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, Ley TJ Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007; 27: 635.
- ❖ Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von BH, Khazaie K Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 419.
- ❖ Chiarella p, Vulcano M, Bruzzo J, Vermeulen M, Vanzulli S, Maglioco A, Camerano G, Palacios V, Fernández G, Brando RF, Isturiz MA, Dran GI, Bustuoabad OD, Ruggiero RA. Anti-inflammatory pretreatment enables an efficient dendritic cell-based immunotherapy against established tumors. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57:701-18.
- ❖ Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 389.
- ❖ Cirillo P, Sautin YY, Kanellis J, Kang DH, Gesualdo L, Nakagawa T, Johnson RJ. Systemic inflammation, metabolic syndrome and progressive renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 1384-7.
- ❖ Correa P, Piazuelo MB. Helicobacter pylori Infection and Gastric Adenocarcinoma. *US Gastroenterol Hepatol Rev* 2011; 7: 59-64.
- ❖ Coussens L Werb Z Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860.
- ❖ Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- α , LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF κ B- but not JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294: C675–C682.
- ❖ Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, De Matos C, Russell RE, Donnelly LE, Barnes PJ. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 24-31.
- ❖ De Lerichaudy J, Zufferli A, Serra F, Isidori AM, Naro F, Desalle K, Desgeorge M, Piraud M, Cheillan D, Vidal H, Lefai E, Némoz G. TNF- α - and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism. *Skeletal Muscle* 2012; 2:2.
- ❖ De Vera ME, Taylor BS, Wang Q, Shapiro RA, Billiar TR, Geller DA. Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by upregulating I-kappa B alpha and inhibiting NF-kappa B. *Am J Physiol*. 1997; 273:1290-6.
- ❖ Deans DAC, Tan BH, Wigmore SJ, Ross JA, de Beaux AC, Paterson-Brown S, Fearon KCH. The influence of systemic inflammation, dietary intake and stage of disease on rate of weight loss in patients with gastro-oesophageal cancer. *Br J Cancer* 2009; 100: 63-9.
- ❖ Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger, and G. Schuler. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med* 2001; 193: 1303.
- ❖ Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 329.

- ❖ Duperron C, Castonguay A. Chemopreventive efficacies of aspirin and sulindac against lung tumorigenesis in A/J mice. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1001-6.
- ❖ Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986; 315: 1650-9.
- ❖ Ehrlich P, Ueber den jetzigen Stand der Karzinom-forschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 1 pp. 273 1909.
- ❖ Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Risk of cancer by transferrin saturation levels and haemochromatosis genotype: population-based study and meta-analysis. *J Intern Med* 2012; 271: 51-63.
- ❖ Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 615–40.
- ❖ Faintuch J, Horie LM, Barbeiro HV, Barbeiro DF, Soriano FG, Ishida RK, Ceconello I. Systemic inflammation in morbidly obese subjects: response to oral supplementation with alpha-linolenic acid. *Obes Surg* 2007 17: 341-7.
- ❖ Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol* 2003; 4: 330.
- ❖ Fornaro R, Frascio M, Denegri A, Stabilini C, Impenatore M, Mandolino F, Lazzara F, Gianetta E. [Chron's disease and cancer]. *Ann Ital Chir* 2009; 80: 119-25.
- ❖ Franco, M., O. D. Bustuoabad, et al. A serum-mediated mechanism for concomitant resistance shared by immunogenic and non-immunogenic murine tumours. *Br J Cancer* 1996; 74: 178-86.
- ❖ Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 162–174.
- ❖ Gallo O, Libonati GA, Gallina E, Fini-Storchi O, Giannini A, Urso C, Bondi R. Langerhans cells related to prognosis in patients with laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991; 117: 1007-10.
- ❖ Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59: 574-80.
- ❖ Gao JF, Arberman G, Wadhra TI, Zhang H, Sun XF. Relationships of tumor inflammatory infiltration and necrosis with microsatellite instability in colorectal cancers. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2179-83.
- ❖ Garg AD, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: An emerging amalgamation. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1805: 53–71.
- ❖ Gill R, Ruan X, Menzel CL, Namkoong S, Loughran P, Hackam DJ, Billia TR. Systemic Inflammation and Liver Injury Following Hemorrhagic Shock and Peripheral Tissue Trauma Involve Functional TLR9 Signaling on Bone Marrow-Derived Cells and Parenchymal Cells. *Shock* 2011; 35:164-70.
- ❖ Goeppert B, Frauenschuh L, Zucknick M, Stenzinger A, Andrulis M, Klauschen F, Joehrens K, Warth A, Renner M, Mehrabi A, Hafezi M, Thelen A, Schirmacher P, Weichert W. Prognostic impact of tumour-infiltrating immune cells on biliary tract cancer *Br J Cancer* 2013; doi: 10.1038/bjc.2013.610. [Epub ahead of print].
- ❖ Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 2005; 174: 1783.

- ❖ Goppelt-Struebe M, Wolter D, and Resch K. Glucocorticoids inhibit prostaglandin synthesis not only at the level of phospholipase A2 but also at the level of cyclo-oxygenase/PGE isomerase. *Br J Pharmacol* 1989; 98: 1287-95.
- ❖ Gorelik E. Resistance of tumor-bearing mice to a second tumor challenge. *Cancer Res* 1983; 43:138-45.
- ❖ Groah SL, Weitzenkamp DA, Lammertse DP, Whiteneck GG, Lezotte DC, Hamman RF. Excess risk of bladder cancer in spinal cord injury: evidence for an association between indwelling catheter use and bladder cancer. *Arch Phys Med Rehabil* 2002; 83: 346-51.
- ❖ Guermonprez, P, J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery, and S. Amigorena. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 621.
- ❖ Hall WA, Nickleach DC, Master VA, Prabhu RS, Rossi PJ, Godette K, Cooper S, Jani AB. The association between C-reactive protein (CRP) level and biochemical failure-free survival in patients after radiation therapy for nonmetastatic adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 2013; 119: 3272-9.
- ❖ Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646.
- ❖ Hasper D, Hummel M, Kleber FX, Reindl I, Volk HD. Systemic inflammation in patients with heart failure. *Eur Heart J* 1998; 19: 761-65.
- ❖ Hearing SD, Norman M, Probert CS, Haslam N, Dayan CM. Predicting therapeutic outcome in severe ulcerative colitis by measuring in vitro steroid sensitivity of proliferating peripheral blood lymphocytes. *Gut* 1999; 45: 382-8.
- ❖ Hellström KE, Hellström I, Brown JP. Unique and common tumor-specific transplantation antigens of chemically induced mouse sarcomas. *Int J Cancer* 1978; 21: 317-22.
- ❖ Hewitt, H. B., E. R. Blake, et al. A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. *Br J Cancer* 1976; 33: 241-59.
- ❖ Homey B, Muller A, Zlotnik A. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nature Rev Immunol* 2002; 2: 175–84.
- ❖ Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057.
- ❖ Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, National Cancer Institute, Bethesda 2009.
- ❖ Huang B, et al. 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; 66: 1123–31.
- ❖ Hung TH, Charnock-Jones DS, Skepper JN, Burton GJ. Secretion of Tumor Necrosis Factor- α from Human Placental Tissues Induced by Hypoxia-Reoxygenation Causes Endothelial Cell Activation *in Vitro*. *Am J Pathol* 2004; 164: 1049–61.
- ❖ Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, and A. H. Enk. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001; 193: 1285.
- ❖ Kamate C, Baloul S, Grootenboer S, et al. Inflammation and cancer, the mastocytoma P815 tumor model revisited: triggering of macrophage activation *in vivo* with pro-tumorigenic consequences. *Int J Cancer* 2002; 100: 571-9.

- ❖ Kang CH, Chiang PH, Huang SC. Correlation of COX-2 expression in stromal cells with high stage, high grade, and poor prognosis in urothelial carcinoma of upper urinary tracts. *Urology* 2008; 72: 153-7.
- ❖ Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7556.
- ❖ Kaufman JM, Fam B, Jacobs SC, Gabilondo F, Yalla S, Kane JP, Rossier AB. Bladder cancer and squamous metaplasia in spinal cord injury patients. *The Journal of Urology* 1977; 118: 967-71.
- ❖ Kenny PA, Bissell MJ. Tumor reversion: correction of malignant behavior by microenvironmental cues. *Int J cancer* 2003; 107: 688-95.
- ❖ Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI. Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol* 2004; 172: 989-99.
- ❖ Ladeira MS, Rodrigues MA, Salvadori DM, Queiroz DM, Freire-Maia DV. DNA damage in patients infected by *Helicobacter pylori*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 631-37.
- ❖ Lamb GW, Mc Millan DC, Ramsey S, Aitchison M. The relationship between the preoperative systemic inflammatory response and cancer-specific survival in patients undergoing potentially curative resection for renal clear cell cancer. *Br J Cancer* 2006; 94: 781-4.
- ❖ Lee CH, Wu CL, Shiau AL. Toll-like receptor 4 signalling promotes tumor growth. *J Immunother* 2010; 33: 73-82.
- ❖ Li L, Whiteman M, Moore PK. Dexamethasone inhibits lipopolysaccharide-induced hydrogen sulphide biosynthesis in intact cells and in an animal model of endotoxic shock. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 2684-92.
- ❖ Li YH, Yan, ZQ and Brauner A. Activation of Nuclear Factor κB and Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase by *Ureaplasma urealyticum* in Macrophages. *Infect Immun* 2000; 68: 7087-93.
- ❖ Lin J, Juhn SK, Adams GL, Giebink GS, Kim Y. Dexamethasone inhibits mucous glycoprotein secretion via a phospholipase A2-dependent mechanism in cultured chinchilla middle ear epithelial cells. *Acta Otolaryngol* 1997; 117: 406-13.
- ❖ Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Immunol* 2002; 169: 2756.
- ❖ Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet* 2008; 371: 771-83.
- ❖ Marwick JA, Ito K, Adcock IM, Kirkham PA. Oxidative stress and steroid resistance in asthma and COPD: pharmacological manipulation of HDAC-2 as a therapeutic strategy. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 745-55.
- ❖ Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296: 301.
- ❖ Maugh, T. H., 2nd. Leukemia: a second human tumor virus. *Science* 1975; 187: 335-6.
- ❖ Mc Ardle PA, Mir K, Almushatat ASK, Wallace AM, Underwood MA, Mc Millan DC. Systemic inflammatory response, prostate-specific antigen and survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urol Int* 2006; 77: 127-9.

- ❖ Mc Donald B, Spicer J, Giannais B, Fallavollita L, Brodt P, Ferri LE. Systemic inflammation increases cancer cell adhesion to hepatic sinusoids by neutrophil mediated mechanisms. *Int J Cancer* 2009; 125: 1298-305.
- ❖ Mc Millan DC. Systemic inflammation, nutritional status and survival in patients with cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; 12: 223-6.
- ❖ McArdle PA, Qayyum T, McMillan DC. Systemic inflammatory response and survival in patients with localized prostate cancer: 10-year follow-up. *Urol Int* 2010; 84: 430-5.
- ❖ McMillan DC. An inflammation-based prognostic score and its role in the nutrition-based management of patients with cancer. *Proc Nutr Soc* 2008; 67: 257-62.
- ❖ Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 762.
- ❖ Meng YQ, Cao X, Wen ZS, Liu QW, Tan ZH, Duan H, Ma GW, Lin P. Preoperative level of serum amyloid A is superior to C-reactive protein in the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2013; doi: 10.1111/dote.12128. [Epub ahead of print].
- ❖ Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell independent antigen type 2. *Ann Rev Immunol* 1995; 13: 665.
- ❖ Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145.
- ❖ Movahedi K, Guilliams M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 2008; 111: 4233.
- ❖ Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y et al. Novel mechanism of glucocorticoid mediated gene repression. Nuclear factor kappa B is target for glucocorticoid mediated interleukin 8 gene repression. *J Biol Chem* 1994; 269: 13289-95.
- ❖ Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastases. *Nature* 2001; 410: 50-6.
- ❖ Nair SS, Bommana A, Bethony JM, Lyon AJ, Ohshiro K, Pakala SB, Rinaldi G, Keegan B, Suttiprapa S, Periago MV, Hotez PJ, Brindley PJ, Kumar R. The metastasis-associated protein-1 gene encodes a host permissive factor for schistosomiasis, a leading global cause of inflammation and cancer. *Hepatology* 2011; 54: 285-95.
- ❖ Nakanishi, T., J. E. Karp, et al. Quantitative analysis of breast cancer resistance protein and cellular resistance to flavopiridol in acute leukemia patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3320-8.
- ❖ Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002; 420: 846-52.
- ❖ Neal CP, Mann CD, Sutton CD, Garcea G, Ong SL, Steward WP, Dennison AR, Berry DP. Evaluation of the prognostic value of systemic inflammation and socioeconomic deprivation in patients with resectable colorectal liver metastases. *Eur J Cancer* 2009; 45: 56-64.
- ❖ Newton R, Hart LA, Stevens DA. Effect of dexamethasone on interleukin-1beta-(IL-1beta)-induced nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and kappaB-dependent transcription in epithelial cells. *Eur J Biochem.* 1998; 254: 81-9.
- ❖ Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, Krausz LT, Bartoli A, Moraca R, Migliorati G, Riccardi C. A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor

- receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6216.
- ❖ Nojiri A, Toyoda T, Tanaka T, Yoshida T, Tatematsu M, Tsukamoto T. Inflammation enhanced X-irradiation-induced colonic tumorigenesis in the Min mouse. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14: 4135-9.
 - ❖ Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *J Immunol.* 2009 ; 182: 4499-506.
 - ❖ Oztürk ZA, Kuyumcu ME, Yesil Y, Savas E, Yıldız H, Kepekçi Y, Ariogul S. Is there a link between neutrophil-lymphocyte ratio and microvascular complications in geriatric diabetic patients?. *J Endocrinol Invest* 2013; 36: 593-9.
 - ❖ Păun I, Pop F, Mogoș D, Vasile I, Tenovici M, Păun M, Florescu M, Dumitrelea D, Teodorescu M, Vâlcea D, Gâlcă F. [Tumour-host interaction and prognosis in patients with gastric cancer]. *Chirurgia (Bucur)* 2003; 98: 243-8.
 - ❖ Penn I. Occurrence of cancers in immunosuppressed organ transplant recipients. *Clin Transpl* 1998: 147.
 - ❖ Pierce BL, Ballard-Barbash R, Bernstein L, Baumgartner RN, Neuhaus ML, Wener MH, Baumgartner KB, Gilliland FD, Sorensen BE, Tiernan A, Ulrich CM. Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3437-44.
 - ❖ Pitot, HC. Interactions in the natural history of aging and carcinogenesis. *Fed Proc* 1978; 37: 2841-7.
 - ❖ Prehn RT. Immunostimulation and immunoinhibition of premalignant lesions. *Theor Biol Med Mod* 2007; 4: 6.
 - ❖ Quah, B. J. and H. C. O'Neill. Maturation of function in dendritic cells for tolerance and Immunity. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 643.
 - ❖ Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and INMunity. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 307.
 - ❖ Rao HL, Chen JW, Li M, Xiao YB, Fu J, Zeng YX, Cai MY, Xie D. Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PLoS One* 2012; 7: e30806. doi: 10.1371/journal.pone.0030806.
 - ❖ Reddy BS, Kawamori T, Lubet RA, Steele VE, Kelloff GJ, Rao CV. Chemoprotective efficacy of sulindac sulfone against colon cancer depends on time of administration during carcinogenic process. *Cancer Res* 1999; 59: 87-91.
 - ❖ Reid MD, Li YP. Tumor necrosis factor- α and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res* 2001; 2: 269-72.
 - ❖ Retsky M, Rogers R, Demicheli R, Hrushesky WJ, Gukas I, Vaidya JS, Baum M, Forget P, Dekock M, Pachmann K. NSAID analgesic ketorolac used perioperatively may suppress early breast cancer relapse: particular relevance to triple negative subgroup. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134: 881-8.
 - ❖ Riss J, Khanna C, Koo S, Chandramouli GVR, Yang HH, Hu Y, Kleiner DE, Rosenwald A, Schaefer CF, Ben-Sasson SA, Yang L, Powell J, Kane DW, Star RA, Aprelikova O, Bauer K, Vasselli JR, Maranchie JK, Kohn KW, Buetow KH, Linehan WM, Weinstein JN, Lee MP, Klausner RD, Barrett JC. Cancers as Wounds that Do Not Heal: Differences and Similarities between Renal Regeneration/Repair and Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res* 2006; 66: 7216-24.

- ❖ Robb RJ, Munck A, Smith KA. T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity, and biological relevance. *J Exp Med* 1981; 154: 1455.
- ❖ Robbins S, Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Patología estructural y funcional*. 6 ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, 2000.
- ❖ Rodriguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev* 2008; 222:180-91.
- ❖ Rogler G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Lett* 2013; pii: S0304-3835(13)00552-1. doi: 10.1016/j.canlet.2013.07.032. [Epub ahead of print]
- ❖ Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 217-42.
- ❖ Rudnick DA, Perlmutter DH, Muglia LJ. Prostaglandins are required for CREB activation and cellular proliferation during liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 8885-90.
- ❖ Ruggiero RA, Bustuoabad OD. The biological sense of cancer: a hypothesis. *Theor Biol Med Model* 2006; 15: 3:43.
- ❖ Ruggiero, R. A., O. D. Bustuoabad, et al. "Concomitant immunity" in murine tumours of non-detectable immunogenicity. *Br J Cancer* 1985; 51: 37-48.
- ❖ Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M. Immunologic tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of selftolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol* 1995; 155: 1151.
- ❖ Salatino M, Croci DO, Bianco GA, Ilarregui JM, Toscano MA, Rabinovich GA. Galectin-1 as a potential therapeutic target in autoimmune disorders and cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8: 45.
- ❖ Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995; 182: 389.
- ❖ Sanz J, Rivera F, López-Vega JM, López C, López A, Vega ME. El síndrome anorexia caquexia. *Psicooncología* 2004; 1: 101-6.
- ❖ Sanz-Ortiz J. Anorexia treatment in the oncological patient. *Rev Clin Esp* 2004; 204: 542-4.
- ❖ Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM et al. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappaB by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 943-53.
- ❖ Sconocchia G, Zlobec I, Lugli A, Calabrese D, Iezzi G, Karamitopoulou E, Patsouris ES, Peros G, Horcic M, Tornillo L, Zuber M, Drosner R, Muraro MG, Mengus C, Oertli D, Ferrone S, Terracciano L, Spagnoli GC. Tumor infiltration by Fc γ RIII (CD16)⁺ myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 2011; 128: 2663-72.
- ❖ Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology* 2002; 16: 217–26.
- ❖ Sheil AG. Cancer after transplantation. *World J Surg* 1986; 10: 389.
- ❖ Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 423.
- ❖ Shevach, E. M. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006; 25: 195.

- ❖ Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 1999; 163: 5211.
- ❖ Siegmund B, Zeitz M. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 3178-83.
- ❖ Skoberne, M., A. S. Beignon, and N. Bhardwaj. Danger signals: a time and space continuum. *Trends Mol Med* 2004; 10: 251.
- ❖ Slifka MK, Whitton JL. Antigen-specific regulation of T cell-mediated cytokine production. *Immunity* 2000; 12: 451.
- ❖ Smalley W. E., DuBois R. N. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol* 1997; 39: 1-20.
- ❖ Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 2006; 90: 1.
- ❖ Sohal DP, Sun W. Hepatocellular carcinoma: prevention and therapy. *Curr Oncol Rep* 2011; 13: 186-94.
- ❖ Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 2008; 124: 13.
- ❖ Speiser, D. E., R. Miranda, et al. Self antigens expressed by solid tumors do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *J Exp Med* 1997; 186: 645-53.
- ❖ Steinman, R. M. and M. Dhodapkar. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int J Cancer* 2001; 94: 459-73.
- ❖ Steinman, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 271.
- ❖ Steinman, R. M., S. Turley, I. Mellman, and K. Inaba. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000; 191: 411.
- ❖ Tang Q, Bluestone JA .The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 2008; 9: 239.
- ❖ Thomas I. Delayed hypersensitivity in health and disease. In cellular and humoral aspects of the hypersensitive states, Lawrence H (ed) Horber Harper: new York 529 1959.
- ❖ Torres SM, Sánchez JL. Cutaneous plasmacytic infiltrates. *Am J Dermatopathol* 1988; 10: 319-29.
- ❖ Travis SP, Farrant JM, Ricketts C, Nolan DJ, Mortensen NM, Kettlewell MG, Jewell DP. Predicting outcome in severe ulcerative colitis. *Gut* 1996; 38: 905-10.
- ❖ Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, Hercend T. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med* 1990; 171: 1393.
- ❖ van Kempen LC, de Visser KE, Coussens LM. Inflammation, proteases and cancer. *Eur J Cancer* 2006; 42: 728-34.
- ❖ van Leeuwen MT, Webster AC, McCredie MRE, Stewart JH, McDonald SP, Amin J, Kaldor JM, Chapman JR, Vajdic CM, Grulich AE. Effect of reduced immunosuppression after kidney transplant failure on risk of cancer: population based retrospective cohort study. *BMJ* 2010; 340: c570.
- ❖ Väyrynen JP, Sajanti SA, Klintrup K, Mäkelä J, Herzig KH, Karttunen TJ, Tuomisto A, Mäkinen MJ. Characteristics and significance of colorectal cancer associated lymphoid reaction. *Int J Cancer* 2013; doi: 10.1002/ijc.28533. [Epub ahead of print].

- ❖ Vernooy JH, Küçükaycan M, Jacobs JA, Chavannes NH, Buurman WA, Dentener MA, Wouters EF. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1218-24.
- ❖ Vidt DG. Inflammation in renal disease. *Am J Cardiol* 2006; 97: 20A-27A.
- ❖ Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 523.
- ❖ Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994; 1: 405.
- ❖ Westwood, J. A., L. J. Berry, et al. Enhancing adoptive immunotherapy of cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10: 531-45.
- ❖ Wing, K., E. Suri-Payer, A. Rudin. CD4+CD25+-regulatory T cells from mouse to man. *Scand J Immunol* 2005; 62: 1.
- ❖ Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199.
- ❖ Yang R, et al. CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer Res* 2006; 66: 6807–6815.
- ❖ Yao M, Kargman S, Lam EC, Kelly CR, Zheng Y, Luk P, Kwong E, Evans JF, Wolfe MM. Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice. *Cancer Res* 2003; 63: 586-92.
- ❖ Zhao JJ, Pan K, Wang W, Chen JG, Wu YH, Lv L, Li JJ, Chen YB, Wang DD, Pan QZ, Li XD, Xia JC. The prognostic value of tumor-infiltrating neutrophils in gastric adenocarcinoma after resection. *PLoS One* 2012; 7(3):e33655 doi: 10.1371/journal.pone.0033655.
- ❖ Zhou SL, Dai Z, Zhou ZJ, Wang XY, Yang GH, Wang Z, Huang XW, Fan J, Zhou J. Overexpression of CXCL5 mediates neutrophil infiltration and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012; 56: 2242-54.