

Introducción a la Inmunooncología.

Angel Alonso, Santiago R. Rodríguez, Krikor Mouchián, Julio F. Albónico.

Div. Alergia e Inmunología – Hospital de Clínicas – Depto. Microbiología – Fac. Medicina UBA – SCA – ANCBA.

Resúmen : se exponen los mecanismos inmunológicos antitumorales así como las estrategias de escape de las neoplasias; se presentan diversas alternativas terapéuticas y sus limitaciones.

Summary : different antitumor mechanisms are exposed; tumoral resistance is described; new immunobiological therapeutic alternatives are exposed.

Palabras clave : linfocitos NK ; anticuerpos; fenómeno de escape; vacunoterapia.

Key words : natural killer cells; antibodies; scape phenomenon; vaccines.

Introducción.

El **cáncer** es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad, ya sea en adultos o en niños, y constituye una de las 3 causas de muerte más frecuente en el mundo. Se lo podría definir como un conjunto de enfermedades, en las que nuestro cuerpo produce, al igual que otros sistemas biológicos, u otras especies, exceso de células, que derivan de tejidos normales que sufrieron transformaciones, mutaciones y divisiones con una proliferación incontrolada, cambios del metabolismo y la diferenciación celulares, originándose una masa denominada **tumor**. Esas células transformadas pueden invadir tejidos vecinos y colonizar sitios distantes al tejido de origen, desplazándose a otras partes del cuerpo, en un proceso llamado **metástasis**. Diariamente se generan en el organismo células que sufren mutaciones las cuales pueden llegar a desencadenar un proceso **neoplásico**, pero eficientes mecanismos de control, inducen la apoptosis de la propia célula, por la llamada **vigilancia inmunológica**. Los resultados de algunos experimentos cuestionan la existencia de la **inmuno-vigilancia**, cuya función varía de acuerdo a los distintos tipos de tumores. De todas maneras, es evidente que el sistema inmune reacciona frente a ellos, y se investiga como poder llegar a magnificar estas reacciones para destruir a los cánceres de una manera específica.

Características generales.

La proliferación y diferenciación de las células de los organismos pluricelulares siguen un programa genético que está regulado por estímulos extracelulares. Alteraciones en este sistema de regulación, que no se conocen completamente, parecen constituir la base genética del cáncer, que se entiende como una acumulación de mutaciones que afectan a las células somáticas durante la vida de un organismo y hacen que estas proliferen de forma incontrolada. Varios pasos serían necesarios para transformar una célula normal en una célula cancerosa. La mayoría de los cánceres comienzan en una sola célula, la cual, ha tenido que acumular mutaciones en varios genes diferentes antes de llegar a formar un cáncer, tales como errores en la duplicación celular del ADN, la acción de ciertos agentes químicos o ionizantes, factores hereditarios, e interacción de ciertos agentes virales con el genoma de la célula huésped, entre los más conspicuos. El término **neoplasia** significa de acuerdo a su etimología; "tejido de nueva formación". Esto nos dice poco sobre su naturaleza biológica. Entre las definiciones explicativas, la más aceptada es la que formuló Ewing en 1930, según la cual, es un crecimiento proliferativo, relativamente autónomo de un tejido. Esta definición contiene 3 elementos esenciales: 1): el carácter de **crecimiento proliferativo**, 2): el carácter **tisular** y 3): el carácter

de **autonomía** relativa. El **crecimiento proliferativo** implica un aumento en el número de células debido a una tasa mayor de división y/o a una tasa menor de muerte que la de los tejidos normales. El **tisular** significa que el término neoplasia es definido para entidades pluricelulares. De este modo, por esta definición, los organismos unicelulares estarían libres de esta enfermedad. El carácter de **autonomía** hace referencia a que las células neoplásicas se dividen sin estar sujetas o reguladas por los mecanismos que controlan la división de las células normales en el mismo organismo. El adjetivo “relativo” aplicado al término **autonomía** suaviza su carácter, destacando que si bien las células que proliferan no se ajustan por completo al control de los mecanismos reguladores de los organismos, ello no significa que desconozcan todas las señales que en él operan. Hay casos en los cuales el carácter autónomo de una neoplasia es muy tenue y solo relativo al tejido en el cual ha surgido. El carácter de **autonomía** relativa es el rasgo distintivo de las neoplasias por el que se diferencian de otras proliferaciones como las inflamaciones, las regeneraciones y las hiperplasias. Los **crecimientos proliferativos** compensadores como las regeneraciones o inflamaciones, contribuyen a la preservación y a la defensa del organismo, por lo que no son ajenos a las reglas que controlan la proliferación celular y la organización del individuo. Las hiperplasias constituyen una respuesta a una carencia de tejido o a una mayor demanda de él, o a un efecto de una alteración hormonal. En cualquier caso, la hiperplasia **no** posee el carácter de **autonomía**, ya que depende de un estímulo funcional para su aparición y desaparece cuando aquél desaparece. De acuerdo a sus características y a su comportamiento en el organismo se pueden diferenciar 2 tipos de neoplasias, las benignas o tumores benignos y las malignas o cánceres. Las primeras permanecen localizadas estrictamente en su tejido de origen y, en la mayoría de los casos, no amenazan la vida del individuo y pueden ser removidas por la cirugía. Por otro lado, las neoplasias malignas tienen la capacidad de invadir tejidos distintos al de origen, ya sean éstos contiguos o distantes; en este último caso, cuando el tumor se ha diseminado a tejidos distantes, sin contigüidad con el tejido de origen, se habla de **metástasis**.

Tipos de cánceres.

Las neoplasias malignas o cánceres pueden ubicarse en 3 grupos diferentes de acuerdo a su origen histológico: carcinomas, sarcomas y leucemias y/o linfomas. Los **carcinomas** tienen su origen en los epitelios, es decir en las capas de células que recubren la superficie del cuerpo, las mucosas y las diversas glándulas. Se trata sin duda del tipo de cáncer más común y responsable del mayor número de muertes, siendo los más frecuentes, los de pulmón, mama, colon, próstata, vejiga, etc. Los **sarcomas** son cánceres menos frecuentes que tienen su origen en las estructuras de sostén derivadas del mesodermo, como los huesos, músculos, vasos sanguíneos, etc. Si el sarcoma tiene su origen en el hueso se llama sarcoma osteogénico u osteosarcoma; si deriva de un cartílago se denomina condrosarcoma, y si se origina en el tejido fibroso se llama fibrosarcoma. Los **leucemias y los linfomas** tienen su origen en las células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea. Hay clasificaciones mucho más específicas y rigurosas de los tipos de cánceres, en los cuales se toma como criterio el órgano en el cual se originó y el tipo de células implicadas dentro de este órgano. De acuerdo a estas clasificaciones, hay aproximadamente unas 200 variedades de la enfermedad. 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**”. Estos tumores, como también los tumores benignos, tienen 2 componentes básicos en su estructura: las células neoplásicas proliferantes que constituyen el parénquima, y, su estroma de sostén, constituido por el tejido conectivo y los vasos sanguíneos. El estroma es esencial para el crecimiento y la propagación del tumor dado que le provee de nutrientes, factores de crecimiento y citoquinas. Se sugirió que el estroma podría actuar como una barrera para la presentación antigénica y el

reconocimiento por parte del sistema inmune.

Qué es un tumor: descripción.

Un tumor se podría definir como un conjunto de células que crecen y se dividen con una velocidad mayor que las normales rompiendo el equilibrio ^[1]. Hay tumores benignos y malignos. Los primeros no son invasivos, suelen estar encapsulados y al crecer sus células no se dirigen hacia otros tejidos; por lo tanto, operándolos desaparecen totalmente del organismo. Por otro lado, las células de los tumores malignos presentan hiper-proliferación, y al crecer, invaden y destruyen otros tejidos, evadiendo la apoptosis, creando su propia red vascular y, en algunos casos varias de sus células se desprenden de él, viajan por el torrente sanguíneo o por los vasos linfáticos, y se depositan en otros tejidos. A este fenómeno se le conoce como metástasis. Una vez que un tumor maligno se ha metástasizado, se encuentra en varias partes del organismo, y la mayoría de las veces las metástasis no pueden ser detectadas por métodos clínicos debido a su tamaño, siendo esta una de las razones por las cuales estos tumores son muy difíciles de erradicar por completo del cuerpo, pues sólo son clínicamente detectables si alcanzan la acumulación de 10^8 células aproximadamente. Fue Hipócrates (460-370 BC), padre de la Medicina, quien utilizó por primera vez los vocablos griegos "karkinos y karkinoma" (que significa cangrejo) para este tipo de tumor, pues su morfología le recordaba a dicho animal; luego el médico romano Celsius (28-50 BC) lo tradujo al latín como cáncer. Aunque el nombre se le atribuye a Hipócrates, este tipo de tumor ya se había observado antes, pues hay registros del cáncer de mama en los papiros egipcios. Las evidencias demuestran que los tumores malignos se originan a partir de la acumulación de mutaciones en una sola célula^[1]. La carcinogénesis está ligada a un cambio en la secuencia del ADN (mutagénesis), la que se da por factores físicos, químicos, genéticos y ambientales del individuo, por ejemplo, el cigarrillo, el alcohol, la obesidad, la vejez, el contacto con químicos carcinogénicos (asbesto, arsénico), la exposición a las radiaciones (rayos X o UV), los virus (del papiloma humano o VPH, de las hepatitis B o C, de Epstein-Barr), etc. En los tumores cancerosos se conocen 3 estadios ^[2]: el avascular, el vascular y el metastásico. Un tumor avascular, es aquel que se desarrolla en ausencia de vasos sanguíneos. En los experimentos in vitro estos tumores se asemejan a agregados esféricos, pero las razones de esto no son muy claras. Obtienen sus nutrientes y se deshacen de sus desechos metabólicos por medio de un transporte difusivo; cuando el tumor es pequeño, este proceso es suficiente para que a toda célula le llegue alimento, y así, el agregado crece exponencialmente ^[3], pero al crecer, los nutrientes, en especial el oxígeno, son absorbidos por sus capas más externas y el proceso difusivo no es suficiente para proveer las sustancias a las células del interior del tumor, lo que da como resultado 3 regiones bien diferenciadas: las células del centro, al no tener alimento mueren, formando una capa interna llamada núcleo necrótico; las células inactivas que se encuentran en el medio del tumor crean la capa quiescente, y, más externamente están las células que se dividen de la capa proliferante. (Fig. 1).

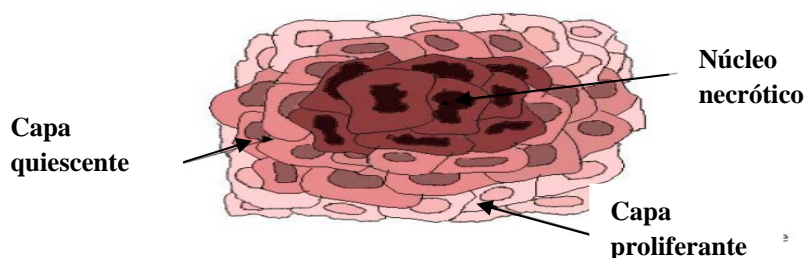


Fig 1. Capas del tumor avascular Debido a que los nutrientes llegan al tumor avascular por medio del transporte difusivo, al aumentar su tamaño, este proceso no es suficiente para suministrar de nutrientes a sus células más internas y se forman 3 capas o regiones: núcleo necrótico, capa quiescente y capa proliferante.

Estos agregados crecen hasta alcanzar un tamaño de 1 a 2 mm de diámetro, el cual está dado por el balance entre las células muertas del interior y las células proliferantes. Con ese tamaño, el tumor entra en latencia y deja de expandirse^[7], aunque es metabólicamente activo; el tiempo que permanece en este estado depende del tipo de cáncer del que se trate. Fue Folkman (1933-2009), quien a principios de 1960, trabajando con tumores cancerosos en los laboratorios de la marina estadounidense, se percató que los tumores en cultivos in vitro, sólo crecían hasta un determinado tamaño y se morían, a diferencia de los tumores implantados en ratones, los cuales crecían desmesuradamente.

La diferencia entre unos y otros, era que los segundos habían sido capaces de generar su propia red vascular a partir de los capilares existentes en los tejidos vecinos, obteniendo así el medio para su alimentación y excreción (fase vascular del cáncer), y los primeros, al estar en un medio artificial, no tenían como obtener nutrientes para seguir creciendo. Así, Folkman y su equipo, propusieron en 1971, al Instituto Nacional de Cancerología de EEUU, su hipótesis, en la que sostenía que el crecimiento de los tumores cancerosos dependía de la red vascular que ellos generaban, y por lo cual, al inhibir este proceso conocido como **angiogénesis**, se podría combatir el cáncer. Para la comunidad científica esta hipótesis parecía ridícula, y no fue aceptada; para ese tiempo ya era conocido que los tumores presentaban **angiogénesis**, pero se suponía que ésta era dependiente de la inflamación, y no del tumor mismo^[4].

A pesar de esto, Folkman y sus colegas, entre ellos Gimbrone^[10], siguieron realizando experimentos para demostrar la veracidad de su supuesto. Algunos de ellos consistían en injertar un tumor en la córnea de los ratones, y observar la respuesta de los vasos sanguíneos de los alrededores. Así, valoraron en detalle el proceso de la **angiogénesis** tumoral, pues al estar el tumor implantado en este tejido permitía que los vasos sanguíneos fueran más visibles. Luego de 10 años de que Folkman sugirió su hipótesis, los científicos empezaron a darle credibilidad, pues fue el primero en aislar una **proteína** segregada por el tumor que estimulaba el desarrollo de una red vascular, a partir de los vasos sanguíneos proximales. Así se demostró que la vasculatura que adquiere el tumor es dependiente del tumor mismo y de los vasos cercanos. Hoy en día, los científicos dedicados al estudio del cáncer aceptan lo propuesto por Folkman y sus colaboradores. Por último, la etapa metastásica, es la fase en la que las células cancerosas invaden otros tejidos y vasos, por la interrupción de los mecanismos de adhesión que mantienen juntas a las células del tumor, permitiendo que se desprendan de éste, son capaces de atravesar la membrana basal, la matriz extracelular y la capa de células endoteliales para llegar hasta un vaso sanguíneo o linfático penetrándolo. (Fig.2.)

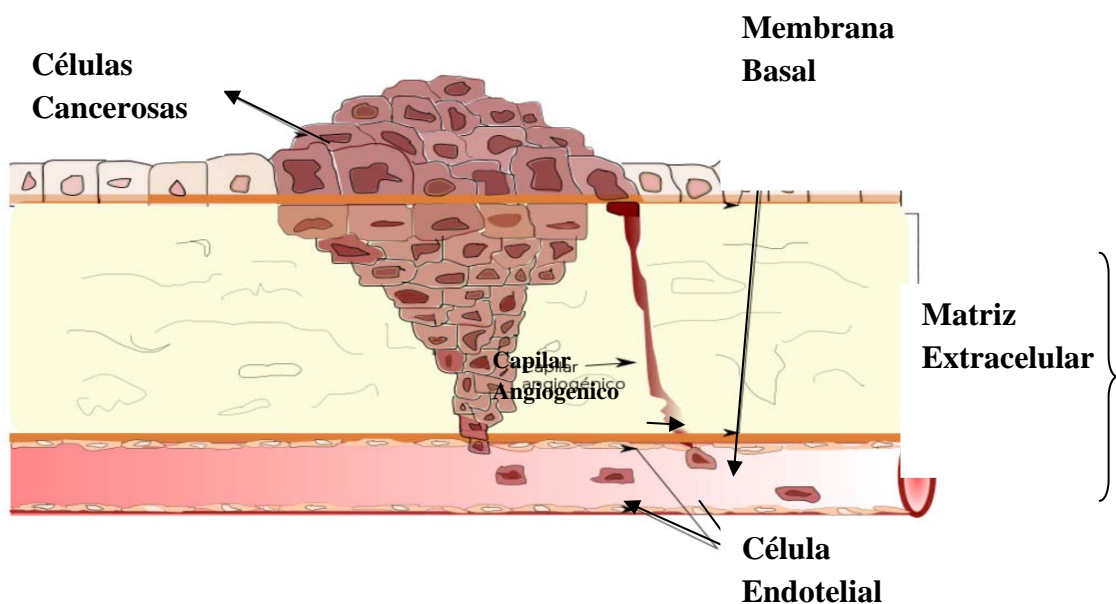


Fig 2. Las células del tumor atraviesan la membrana basal, la matriz extracelular y la capa de células endoteliales logrando así penetrar un vasosanguíneo o linfático, liberándose a la circulación.

Al llegar al vaso, las células se liberan a la circulación sanguínea o linfática, y así viajan por el organismo deteniéndose en órganos preferenciales, dependiendo del tipo de cáncer del que se trate (aún no se sabe que determina esa preferencia). Cuando llegan al órgano se adhieren a través de las moléculas de adhesión^[9], atraviesan su endotelio por medio de enzimas y penetran en él. Ahí forman un pequeño conglomerado de células llamado micro-metástasis. Finalmente, estas células proliferan (como la célula madre de la cual provienen), colonizando este nuevo tejido^[6]. Al tumor formado se le conoce como tumor secundario o **metástasis**, y al tumor del cual provienen se le conoce como tumor primario.

Las **metástasis** llegan a otras partes del organismo no solo por los vasos sanguíneos y linfáticos sino que se pueden propagar por las membranas o por simple contacto entre los órganos. (Fig.3).

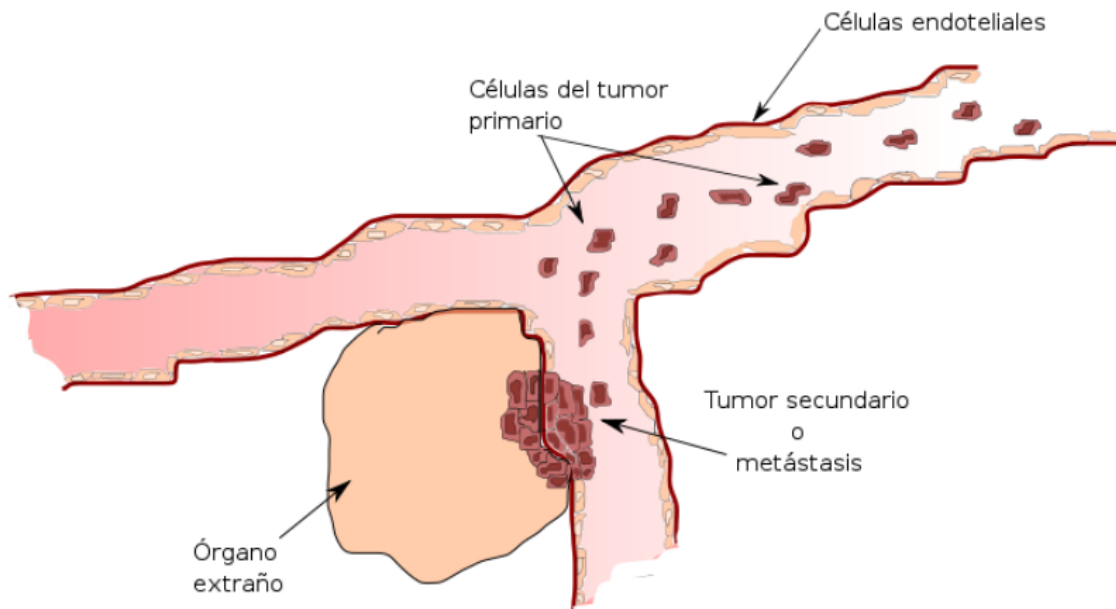


Fig 3. Las células que se desprenden del tumor primario viajan por el torrente sanguíneo adhiriéndose a órganos por medio de las moléculas de adhesión; atraviesan su endotelio, proliferan y forman un nuevo agregado de células cancerosas conocido como tumor secundario o metástasis.

Para metastatizar, las células tienen propiedades muy específicas (sólo el 0,1 % de las que salen a los vasos linfáticos o sanguíneos lo logran); por un lado, ser como “células madre”, que tengan la capacidad de dividirse indefinidamente, y por el otro, ser hábiles para establecerse y sobrevivir en un ambiente diferente al de su origen. No dependen de señales extracelulares para crecer y dividirse como pasa con las células normales. Solo son pocas las que logran colonizar y el tiempo en el que lo logran es indefinido, al igual que la causa por la cual se establecen en sitios muy diferentes a su tejido de origen. Al establecerse en algún tejido comienzan un proceso análogo al del tumor primario, es decir, pasan por las mismas etapas hasta lograr vascularizarse.

Esta etapa es peligrosa, pues el tumor es capaz de invadir no solo tejidos locales, sino también aquellos distantes, y si está vascularizado, esos nuevos vasos son una ruta de escape para las

metástasis. Por eso es tan importante la inhibición de la **angiogénesis** para minimizar la diseminación.

Qué es la angiogénesis?

Es la formación de nuevos vasos sanguíneos partir de la vasculatura existente y al intento de inhibir este proceso se lo llama terapia anti-angiogénica. No sólo se observa en los tumores, sino también en la cicatrización de las heridas, en una inflamación tisular, en el ciclo menstrual, en la formación embrional y en algunas enfermedades como las retinopatías y las placas arterioescleróticas. Las células endoteliales son fundamentales en este proceso al igual que la membrana basal y la matriz extracelular con fibroblastos y miocitos.^[6] El endotelio reconstruye, repara y renueva los vasos, proliferando y migrando a los sitios dañados.

La **angiogénesis** comienza con la quimiotaxis (movimiento celular controlado por el gradiente de algún químico difusivo), que tienen las células endoteliales ante ciertas señales químicas, segregadas por células en estado de hipoxia; la falta de oxígeno en casi cualquier tipo de célula provoca un incremento intracelular de la contracción del factor hipoxia-inducible (HIF-1), que estimula la secreción extracelular de proteínas ^[6], como por ejemplo, el **factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF)**.

En el tumor avascular latente, las células se hallan en hipoxia porque no llega suficiente oxígeno por difusión, y segregan factores de crecimiento, o **factores o señales angiogénicas tumorales (FAT)**. Hay más de 30 factores, que se difunden en el tejido circundante actuando sobre las células endoteliales de los vasos más cercanos; ellas responden quimio-tácticamente a esas proteínas, secretando enzimas que degradan la membrana basal del vaso capilar o vaso parental o progenitor. Al ser degradada la membrana basal del vaso, quedan espacios que permiten el paso a pseudópodos (extensiones de la superficie de las células endoteliales) hacia la matriz extracelular. Estos guían la dirección en la que se va a desarrollar el nuevo vaso y poco a poco, la membrana basal permite el paso a células endoteliales completas, las que migran a la matriz extracelular formando columnas celulares o brotes que van a dar origen a la nueva vasculatura. (Fig. 4). En un tejido normal, estos vasos crecen hasta alcanzar a otro vaso sanguíneo y así forman una red para el torrente sanguíneo; pero en el caso del cáncer, estos vasos llegarán hasta él, penetrándolo y proveyéndole su propio sistema circulatorio.

Según Folkman^[5], es a una determinada distancia de la punta de los nuevos brotes donde las células endoteliales comienzan a proliferar; algunos de los brotes cercanos, al crecer, fusionan sus puntas formando lazos o bucles, durante un proceso conocido como anastomosis. (Fig. 5).

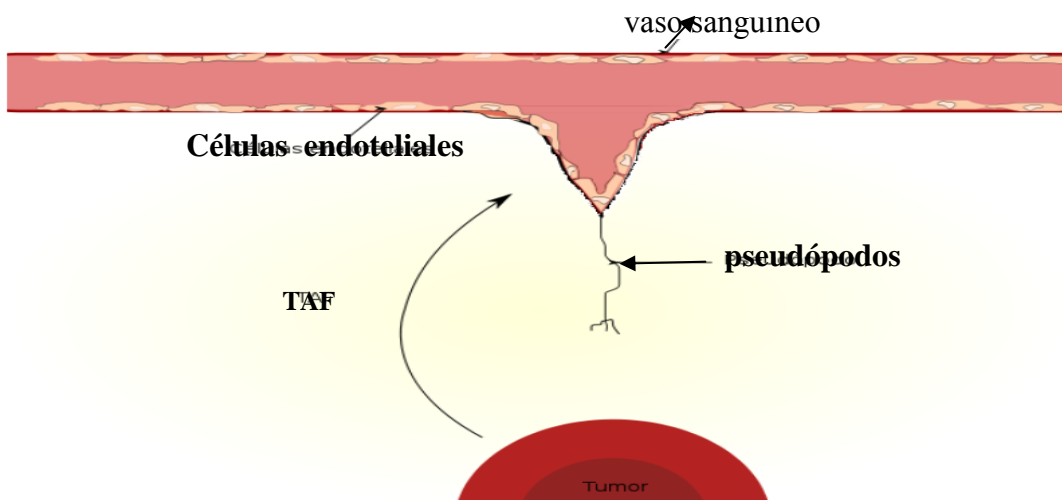


Fig 4. Pseudópodos. Extensiones de la superficie de las células endoteliales, las que guían la dirección en la que se va a desarrollar un nuevo vaso sanguíneo.

En estas anastomosis se vuelve a dar el proceso de **angiogénesis**, que induce nuevos vasos capilares. Estos derivan del vaso parental, sus estructuras suelen ser diferentes, pues tienen formas irregulares debido a la excesiva proliferación de las células endoteliales. A veces están incompletos, torcidos y tienen una circulación sanguínea lenta, lo que facilita la diseminación de las metástasis^[9] y dificultan la llegada al tumor de ciertos químicos de las terapias antitumorales. El tumor segrega antígenos, factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos, que determinan si habrá o no **angiogénesis**. La progresión del tumor avascular al estado vascular se conoce como el “switch” del fenotipo angiogénico, pues cuando segrega más factores pro-angiogénicos, pasa del estado latente al vascular, y cuando segrega más anti-angiogénicos, permanece inactivo.^[8] La terapia anti-angiogénica pretende inhibir la vascularización del tumor, manteniendo la latencia, y, eventualmente, la necrosis total. Esta es una terapia nueva, que Folkman propuso en 1971, y que recién en 2004, se implementó en pacientes con cáncer colono-rectal. La tasa de mutación de las células cancerosas es muy alta y desarrollan resistencia a la mayoría de las terapias existentes, lo cual es uno de los principales obstáculos para curarlo por completo. A diferencia de ellas, el principal objetivo de la terapia anti-angiogénica son las células endoteliales, las cuales son genéticamente más estables, pocas veces se dividen y tienen una tasa baja de mutación.



Fig 5. Anastomosis de vasos capilares. Algunos de los brotes capilares que se forman, al crecer fusionan sus puntas formando “loops” o ciclos, durante un proceso conocido como anastomosis.

La terapia anti-angiogénica se dirige a las células endoteliales de 2 formas: **indirecta** y **directa**. Los inhibidores **indirectos** son aquellos que bloquean los receptores de los productos segregados por el tumor. Por ejemplo, algunos de ellos bloquean o neutralizan a los receptores de las células al VEGF. Los inhibidores **directos**, son los que bloquean la proliferación y migración de las células endoteliales. Son de 3 tipos: 1) los sintéticos, diseñados para interferir en alguno de los pasos del proceso angiogénico (metaloproteinasas); 2) moléculas de bajo peso molecular (caplostatina) y 3) inhibidores endógenos o naturales, aquellos que son segregados por el tumor mismo o por las células que se encuentran a sus alrededores (endostatina y angiostatina). Debido a la naturaleza del modelo matemático que se quiere estudiar, sólo nos concentraremos en los inhibidores **directos endógenos**.

Bouck fue el primero en demostrar que el cáncer produce inhibidores angiogénicos como la trombospondina. La angiostatina, es una proteína que detiene el crecimiento de los tumores primarios, pues inhibe la proliferación y la migración de las células endoteliales de una forma dosis-dependiente, es decir, a mayor concentración mayor inhibición. Promueve que los tumores regresen a su estado de latencia por el balance entre las células apoptóticas y las proliferantes, aumentando la apoptosis sin que se modifique el índice de proliferación.

Un proceso muy peculiar en el que participa la angiostatina, es el de la **paradoja del tumor primario**. Este fenómeno fue descrito en los tumores de mama, de colon y en los sarcomas osteogénicos, en los cuales extirpando el tumor, después de un tiempo (meses o años), se inicia un crecimiento exponencial de las micro-metástasis presentes en el organismo, pero ocultas por su tamaño al momento de remover el tumor primario. Por ello, se desarrollaron estudios para demostrar que el tumor primario en el organismo era el que **detenía** el crecimiento de los tumores secundarios o micro metástasis.

Así, Folkman y sus colaboradores, en un modelo murino del carcinoma pulmonar de Lewis, implantaron sus células por vía subcutánea en el dorso como tumor primario en 2 grupos de ratones. Después de unos días, al primer grupo se le **extirpó** el tumor primario y observaron una vascularización total en las metástasis que hace este carcinoma en el pulmón. Al segundo grupo, en el cual **no** se le extirpó el carcinoma de Lewis, encontraron que sus metástasis **no** presentaban vascularización. Fue así que al hacer el análisis del suero de los ratones de este grupo pudieron aislar, por primera vez, a la angiostatina, que se encontraba en altas concentraciones. Para demostrar que la presencia del tumor primario inhibía directamente la **angiogénesis**, Folkman implantó en la córnea del ojo de ratones un polímero bio-compatible (desarrollado por Langer y Folkman), el que liberaba constantemente factores angiogénicos, simulando la actividad de un tumor. Tiempo después, la vascularización alrededor de este material fue evidente.

A otros ratones se les administraron inyecciones subcutáneas de angiostatina humana después de 48 horas, y se observó que a diferencia de los anteriores, en este grupo se podría valorar una notable inhibición de la **angiogénesis**.

Con este experimento concluyeron que el efecto inhibitorio de la **angiogénesis** de las metástasis está directamente relacionado a la presencia del tumor primario en el organismo. La inhibición **indirecta** de las metástasis tiene lugar porque mientras el tumor primario estimula su propia vascularización también segrega los factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos; como ambos son secretados a la circulación, permanecen en el torrente sanguíneo durante su vida media, siendo la del VEGF de 3 minutos y la de la angiostatina de 2,5 días, y al alcanzar esta última a los tumores secundarios, inhibe su proceso de **angiogénesis**.

Para que este efecto inhibitorio exista, el tumor primario debe poseer un tamaño umbral, ya que éste se correlaciona con la potencia angiogénica que tenga sobre los secundarios, es decir, mientras más grande es el tumor más angiostatina segrega, y por lo tanto, la **angiogénesis** de las metástasis se inhibe más. La angiostatina no sólo inhibe la neo-vascularización de las metástasis, sino también hace que éstas permanezcan en estado de latencia. Debido a su alto potencial anti-angiogénico, se incorporó a la terapia anti-angiogénica, después de haber extraído el tumor, para simular la presencia del mismo, y así detener el crecimiento exponencial de los secundarios.

La endostatina es otro potente inhibidor natural de la **angiogénesis**, y como la angiostatina, es un inhibidor específico de la proliferación de las células endoteliales y fue descubierto por Folkman de la misma forma que la angiostatina. Se observó que, al ser suministrada en ratones con carcinoma pulmonar de Lewis, la endostatina inhibía el crecimiento de las metástasis, manteniéndolas en estado microscópico, así como el crecimiento del tumor primario regresándolo a un tamaño de menos de 1 mm³. Fue usada en el tratamiento de los tumores malignos humanos, tales como melanomas, fibrosarcomas y hemangio-endoteliomas, implantados en ratones.

Estas observaciones sugirieron a Folkman, que una de las posibles formas y quizás exitosa para atacar al cáncer era viéndolo en términos de 2 distintas poblaciones celulares: las cancerosas y las endoteliales.

Hoy en día, la terapia anti-angiogénica es utilizada para erradicar el cáncer humano, pero es importante señalar que, en muchos casos no es suficiente, y tiene que ser complementada con quimioterapia y radioterapia.

Breve reseña histórica de la Inmunidad Anti-Tumoral (IAT).

A principios del siglo XX, Loeb, Jensen y Erlich, iniciaron una serie de experimentos, trasplantando tumores en animales de laboratorio. Observaron que los animales sanaban espontáneamente del tumor trasplantado, y que resistían la incorporación de un inóculo

posterior de dichas células tumorales. Se interpretó que el animal se había inmunizado contra el tumor por la presencia de **antígenos** específicos presentes en sus células. Ese optimismo decayó dado que si bien un animal puede hacerse inmune contra un tumor trasplantado, no era porque se detectaban **antígenos** específicos, sino porque se reconocían antígenos de histocompatibilidad del animal donante del tumor que eran distintos de los propios.

Luego, Main y Prehn, en 1957, publicaron un trabajo donde utilizaban cepas endocriadas de ratones (son ratones estandarizados con características genéticas y sanitarias definidas, y con el correcto cumplimiento de los principios éticos y de bienestar animal), y fibrosarcomas inducidos por metil-colantreno, un hidrocarburo aromático policíclico (agente carcinogénico), con fórmula $C_{21}H_{16}$, que es una sustancia de color amarillo que se cristaliza del benceno y del éter.

Se vio que a los ratones que les habían implantado y luego extirpado un tumor eran capaces de resistir implantes posteriores de células del mismo tumor. Lo contrario ocurría cuando se inoculaban células de un tumor distinto, que crecían sin oposición. Los resultados demostraron que la respuesta inmune desarrollada contra estos tumores estaba dirigida contra **antígenos** presentes en las células tumorales, que no solo diferían de los antígenos normales, sino de los presentes en otro tumor inducido por el mismo carcinógeno químico. Klein años más tarde, demostró que el pre-tratamiento con células tumorales muertas por radiación, inmunizaba contra el fibrosarcoma inducido por el metil-colantreno con la misma eficiencia que lo hacía la implantación y extirpación del tumor. Ambos métodos son considerados los 2 procedimientos clásicos de vacunación contra los tumores. A partir de allí, se llevaron a cabo gran cantidad de experimentos en ratas, ratones, y hámsters, con sustancias químicas como la nitrosamina, el dimetil-benzatraceno, y el metil-colantreno, por métodos físicos como los rayos X, los ultravioletas y agentes virales, como los herpes y los retrovirus. Se formularon diversas teorías y se fue construyendo la base de la **IAT**.

Los ratones que eran inmunizados contra un tumor, podían transferir esa inmunidad por los **LT**, pero no por los anticuerpos; esto es así para los tumores del ratón, salvo en las leucemias donde los anticuerpos cumplen una función antineoplásica. En segundo lugar, se realizaron ensayos in vitro destinados a determinar la antigenicidad de los tumores en cultivos, y por último, Thomas y Burnet editaron su teoría de la inmuno-vigilancia ("surveillance") en 1957. Esta sostiene que el sistema inmune, con sus **LT**, protege y patrulla el organismo en la búsqueda de las células tumorales para eliminarlas antes de que se manifiesten como tumores clínicos, además de proteger contra los patógenos externos como los virus, las bacterias, los hongos y los parásitos. Esta teoría funcionó bien en ratones y en pacientes inmuno-deficientes, que sufrían un número mayor de tumores que los normales; por ende, los que aparecían en un sistema inmune normal deberían ser el producto de una falla específica del sistema de vigilancia.

En 1976, Hewitt, empleó tumores de origen espontáneo, a diferencia de los que usaban tumores inducidos por dosis masivas de agentes químicos o biológicos. Observó que estos tumores no presentaban inmunogenicidad detectable, en contraposición a los anteriores. En 1981, Middle y Embleton, llegaron a la misma conclusión que Hewitt, con los tumores espontáneos de rata. Estos hechos marcaron el fracaso de la formulación de la teoría anterior, si bien, los pacientes y animales inmuno-deficientes mostraban una mayor proporción de tumores, éstos eran derivados del sistema linfo-reticular, pero no eran los más comunes, como los del pulmón, la mama, etc.

Si la teoría de la inmuno-vigilancia hubiera sido el mecanismo universal antitumoral propuesto todos esos tumores deberían haber aumentado su frecuencia en individuos inmuno-suprimidos.

Otro hecho fue la comprobación de que los ratones nude, genéticamente timo-privos no mostraban una mayor frecuencia de tumores espontáneos que los ratones convencionales, lo que demostraba que la vigilancia inmunológica no estaba mediada por los **LT**, como se había postulado.

Así, la **IAT** entró en descrédito que perduró desde 1980 hasta la década siguiente. En los 90, se reactivó la **IAT**, debido al conocimiento de los pasos moleculares del reconocimiento antigénico y de la activación de la respuesta inmune celular a través de cascadas enzimáticas y producción de citoquinas pro-inflamatorias. La importancia de la célula dendrítica (**CD**) como célula presentadora de antígenos, amplió el concepto de vigilancia inmunológica más allá de considerar a los **LT** y a las **NKC**. Los ratones knock-out para diferentes componentes del sistema inmune, permitieron reconsiderar ciertos aspectos de la teoría de Thomas y Burnet, ya

que ratones privados de uno u otro componente de la respuesta inmune, evidenciaba la aparición de tumores que no se restringía sólo a los hematopoyéticos. Ello reavivó la posibilidad de que el cáncer pudiera ser abordado –también– por medio de terapias inmunológicas.

Como se evidencia el sistema inmune en la defensa frente a los tumores:

La historia natural de un tumor incluye la fase de crecimiento in situ, invasión, extravasación y metástasis. Durante esas fases, las células tumorales interactúan con su microambiente tolerogénico, endotelio vascular y con el sistema inmune. Los estudios histopatológicos, demuestran que los tumores están rodeados por infiltrados linfoides, y por diferentes tipos de células, como los macrófagos (**M**), **LB** y **LT**, **NKT**, **NKC** y mastocitos. Se ha asociado a estos últimos con factores de la inflamación crónica y la progresión tumoral, mientras que el infiltrado de sub-poblaciones de **LB** y **LT**, células **NKT**, **NKC** y **CD** se relaciona con el control de la enfermedad, y **mejor pronóstico** en el melanoma, la mama, el ovario, el linfoma no Hodgkin, el de cuello uterino, el carcinoma urinario y el de colon, al igual que el hallazgo de **LT** proliferando en los ganglios linfáticos drenantes. Las recaídas luego de 15 a 20 años del tratamiento inicial, demuestra que hasta entonces la **IAT** había sido capaz de bloquear el crecimiento tumoral.

Hay remisiones de tumores malignos comprobadas histológicamente, como la regresión espontánea, la regresión después de remover el primario, y la regresión post-quimioterapia.

Con antelación se citó la respuesta protectora en ratones pintados con metil-colantreno (MCA), así como, la no-respuesta al inocular a ratones singeneicos. El **LT** procedente del ratón portador del tumor pueden transferir la **IAT** frente al tumor a otro animal sin neoplasia. Así, tienen las propiedades que definen a la **RIA**, de especificidad y memoria. La inoculación del suero de un ratón que se ha recuperado de un tumor, inhibe el crecimiento del mismo tumor en otros ratones. (Fig 5.) Se ha avanzado mucho en el conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares que determinan las **RIC** y **RIA**, por lo que los modelos experimentales se han ido perfeccionando, y no cabe duda de la importancia del sistema inmune en la **IAT**.

La teoría de la inmuno-vigilancia ya no es suficiente para describir las relaciones entre el sistema inmune (**SI**) y el tumor. Se pensó que la inmuno-vigilancia cumplía una función de protección hacia el organismo, a través del sistema adaptativo, en las etapas, muy tempranas del cáncer. Se sabe hoy que tanto la **inmunidad connatural (RIC)** como la **inmunidad adaptativa (RIA)** participan en el proceso y protegen al hospedador contra el desarrollo de tumores y su inmunogenicidad, por lo que, se propuso una denominación más abarcativa o “**inmuno-edición**” del cáncer para marcar este papel doble de la inmunidad, en el rearrreglo de la enfermedad neoplásica y además en la prevención. La “**inmuno-edición**” del cáncer representa la ampliación de la hipótesis original de la inmuno-vigilancia. La “**inmuno-edición**” contempla las 3 etapas del tumor, como Dunlo describió en 2004, llamando “Las Tres E” de la “**inmuno-edición**”: **Eliminación, Equilibrio y Escape** .

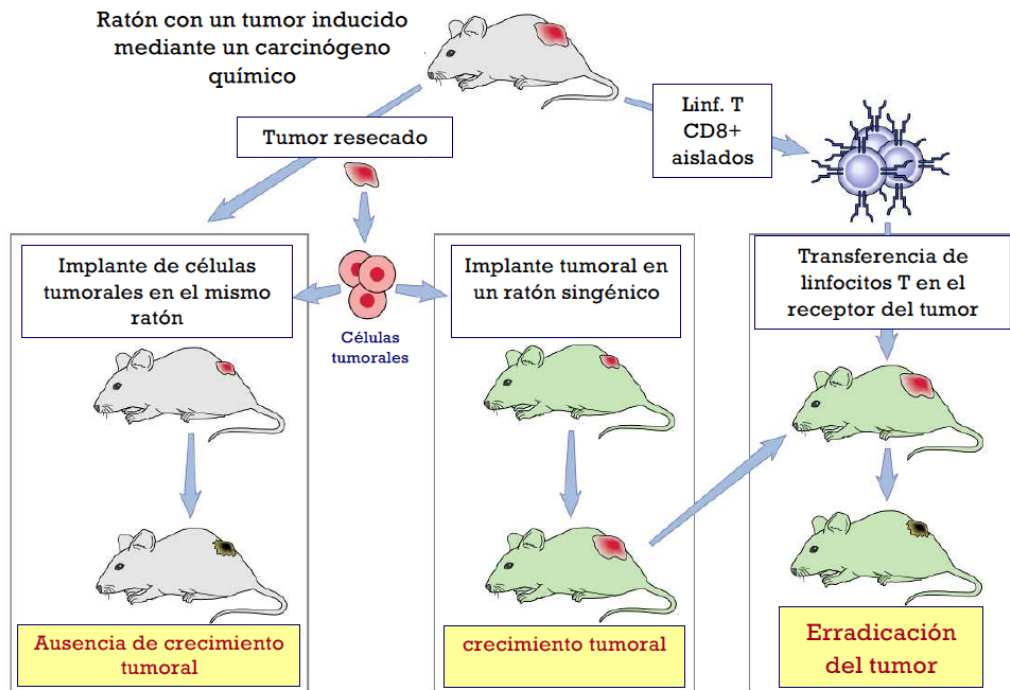


Fig 5. Los ratones curados quirúrgicamente de un tumor provocado por MCA rechazan trasplantes posteriores del mismo tumor, el tumor trasplantado crece en otro ratón singénico. También rechazan el tumor los ratones en que se realiza una transferencia adoptiva de LT procedentes del animal en que se desarrolló originalmente el tumor.

Eliminación: en esta etapa se representa el concepto original de la inmuno-vigilancia (Fig.6 A y Fig.7), aquí el SI reconoce y erradica las células tumorales originadas, representa al proceso de inmuno-edición sin llegar a la progresión y las fases subsiguientes. El rechazo inmunológico de un tumor en desarrollo, como la defensa contra un micro-organismo, requiere de un acto integral, que participen del mismo, la RIC y la RIA. El primer paso de una respuesta IAT (Fig. 6 A) ocurre cuando las células de la RIC se activan por la presencia de un tumor en desarrollo, debido a los cambios del tejido local. Durante el proceso de angiogénesis e invasión produce moléculas pro-inflamatorias que, junto con las citoquinas generadas por las células tumorales convocan a las células del SI mediante las señales de daño local. Las células de la RIC, reclutadas por la masa tumoral, o células NKT, NKC y M reconocen ciertas moléculas en el tumor inducidas por la inflamación o por los procesos de transformación celular.

Luego, (Fig. 7 B), los productos generados por los M que han infiltrado el tumor, con bajas cantidades de IL-12, estimulan a las NKC, del mismo infiltrado y que liberan bajas cantidades de INF- γ , que a su vez activan a los M a producir más IL-12, lo que aumenta la producción de INF- γ generado por las NKC. Este sistema autocrino por retroalimentación activa una serie de mecanismos dependientes del INF- γ , tales como efectos anti-proliferativos, pro-apoptóticos y anti-angiogénicos, que tienden a eliminar parte de la masa tumoral. Así, se generan células tumorales muertas, liberando una fuente de antígenos disponible para ser procesada por el SI.

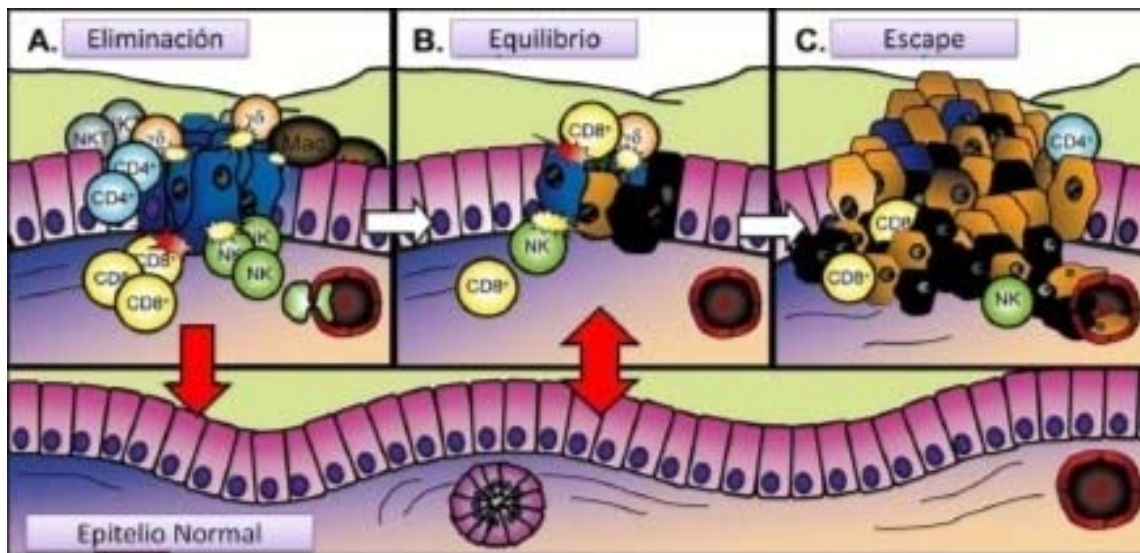


Fig 6: Las tres E de la immuno-edición del cáncer: eliminación, equilibrio y escape. Las flechas rojas indican que tanto en la fase de eliminación como de equilibrio el SI puede eliminar el tumor, retornando al epitelio normal.

Luego, (Fig. 7 C), los **antígenos** liberados del tumor por los efectos de la **RIC** genera una **RIA** específica. En el 3° paso se reclutan **CDs** y **CDi** (células dendríticas inmaduras) en el tumor y se activan por citoquinas o por las **NKC** que han infiltrado el mismo. Las **CD** endocitan los **antígenos** de las células muertas o por los complejos de **HSP-antígenos** tumorales (proteínas del estrés térmico), y luego las **CDs** migran hacia el ganglio drenantes, donde activan a los **LTCD4-Th1** y **LTCD8**. En el último paso (Fig. 7D) los **LTCD4** y **LTCD8** se dirigen al tumor para su destrucción. La eliminación es un proceso que se repite a medida que aparecen **antígenos** tumorales distintos, por eso el cáncer aparece con más frecuencia en la ancianidad donde la inmuno-vigilancia del **SI** comienza a ser menos efectiva.

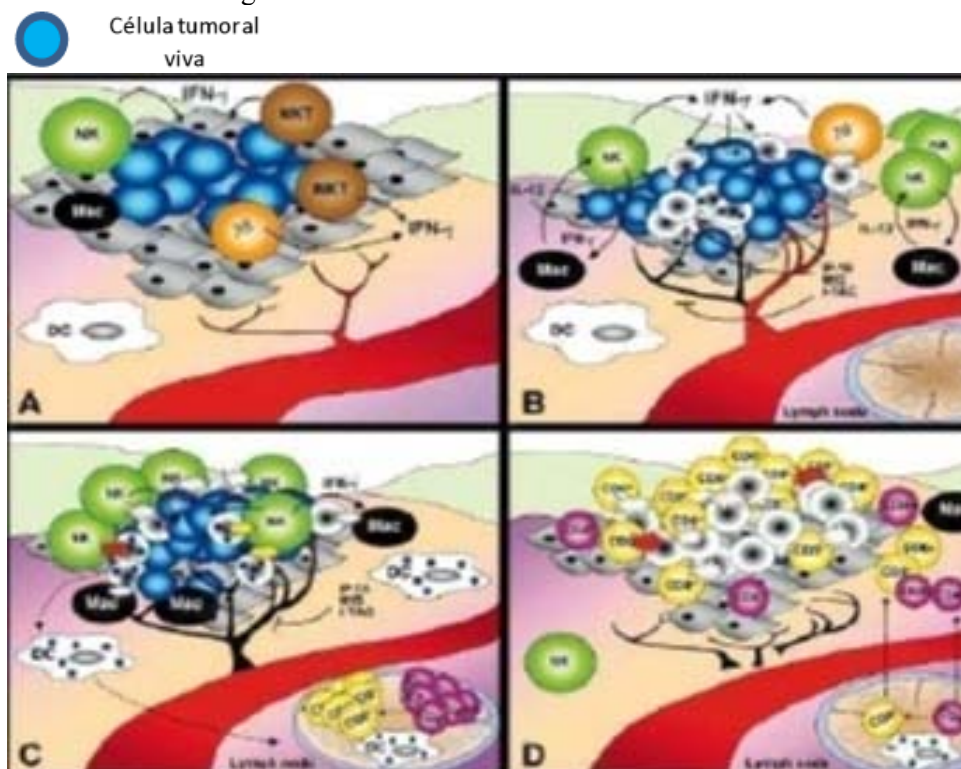


Fig 7: Modelo propuesto para la fase de eliminación de la hipótesis de la immuno-edición. Los eventos de la figuras son descritos en el texto. **CD**: células dendríticas, **M**: macrófagos, **NKC**: natural killer, **NKT**: natural killer-tipo LT.

Equilibrio: en esta fase (Fig.6B), las células tumorales que han sobrevivido entran en un equilibrio dinámico con el **SI**. Esta fase es la más larga y puede durar años. El **SI** podría seleccionar y/o promover variantes de células tumorales que sobrevivan al control inmunológico.

Escape: en esta fase (Fig.6), el tumor, por mecanismos de resistencia evade al **SI**, evitando que lo destruyan. La progresión desde el equilibrio hasta el escape se debe a cambios por mutaciones genéticas celulares. Por la selección Darwiniana, las células tumorales son capaces de crecer progresivamente. Al saber como los tumores escapan a la detección del **SI**, será posible desarrollar métodos y diseñar estrategias para que el **SI** ataque al tumor.

Las células mediadoras, efectoras e inflamatorias. Citoquinas, quimioquinas y moléculas en la IAT.

La función esencial del **SI** es proteger al organismo, ya sea de agentes infecciosos del ambiente, como de vigilar el crecimiento descontrolado de las células propias, que proliferan siguiendo un programa genético regulado por estímulos extracelulares, que al alterarse podría ser la base genética del cáncer con una acumulación de mutaciones celulares.

Este crecimiento progresivo incontrolado y autónomo, no obedece a las leyes que controlan la multiplicidad celular de un organismo, se caracteriza por la mono-clonalidad, la anaplasia, la autonomía y la agresividad. Ante estas situaciones extrañas el organismo se defiende de 2 formas: 1): defensa inespecífica o **RIC**, donde las células tumorales son lisadas por las células epiteliales, **CDs**, **M**, neutrófilos, **NKC**, **NKT**, moléculas del sistema complemento y citoquinas. Las células están equipadas con receptores de reconocimiento de patrones **PRR** que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos **PAMP** y señales endógenas asociadas a daño tisular **DAMP**. La **RIC** es capaz de activarse únicamente frente a estas señales de peligro detectadas por los **PRR**, que son las primeras barreras defensivas y no generan memoria inmunológica, formando parte de esta barrera, la piel, las mucosas y las funciones anti-microbianas de los tejidos. Las **NKC** son las células de la **RIC** más relacionadas con la respuesta anti-tumoral, ya que demostraron la capacidad de erradicar tumores.

2) : la segunda defensa específica o **RIA**, mediada por componentes celulares (**LT**, **LB**) y humorales (anticuerpos), genera respuestas **antígeno**-específicas, y confiere memoria inmunológica tras el primer contacto con el **antígeno (Ag)**.

Las células presentadoras de **Ag** (**CPA**), y en especial las **CD** y los **M**, son la conexión entre la **RIC** y la **RIA**, ya que son las responsables de procesar y presentar **Ag** a los **LT** en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (**CMH**) presentes en su superficie. En consecuencia, la **RIC** tiene como segunda función estimular y polarizar la respuesta **RIA** con el objeto de optimizar la eliminación de la célula tumoral. El **SI** está compuesto por gran variedad de células funcionalmente distintas que derivan de células hematopoyéticas que se renuevan a si mismas y dan lugar a células progenitoras mieloides (**CPM**) y linfoides (**CPL**), y que dan origen a granulocitos, **M**, **CD** y mastocitos, **LB**, **LT**, **NKC** y **NKT**.

De la interrelación entre las células inflamatorias, las citoquinas y las quimioquinas surge un hecho clave que define el destino del tumor. El reclutamiento de los leucocitos en el sitio del tumor es consecuencia de un balance entre la **IAT** que desarrolla el huésped y los mediadores inflamatorios que pueden inducir y facilitar la invasión del tumor primario.

Las células involucradas en el rechazo tumoral directamente son las **LTCD8+** específicas, **NKC**, **NKT**, y en menor proporción **LB**→plasmocitos productores de anticuerpos específicos y **M** citotóxicos. En algunos tumores conjuntamente con las células mediadoras y efectoras de la **IAT**, se observan **M** y polimorfonucleares que son característicos de la inflamación existente.

La necrosis libera factores pro-inflamatorios y activadores de la coagulación, con liberación del tromboxano A_2 , de la IL-8 y de la actividad como quimio-atractivo del complemento. Se generan citoquinas, y se produce la **angiogénesis** que contribuye a la reparación del daño. Así, se establece el tumor, su velocidad de crecimiento, su necrosis y daño celular junto con la reparación del tejido dañado. La fibrosis y la **angiogénesis**, son señales para las células inflamatorias, factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas, que son favorecidas por la célula tumoral, por producir también citoquinas quimio-atractivas, de bajo peso molecular, que regulan la respuesta de los leucocitos.

Las células inflamatorias presentes en los tumores.

Neutrófilos: los poli-morfonucleares (**PMN**), son leucocitos del tipo granulocito. Miden de 9 a 12 μm y es el más abundante de la sangre del ser humano, representando el 60-70 % de los mismos. Al igual que los **M**/monocitos y **LT** activados, desarrollan el fenómeno del “rolling” o rodamiento o desplazamiento sobre el endotelio vascular para migrar así, desde el torrente sanguíneo hacia el sitio de la inflamación/infección, por medio de la unión entre las moléculas de adhesión presentes en sus membranas y las del endotelio de las vénulas post-capilares. Citoquinas como, la IL-1 y el TNF, y las quimioquinas de la matriz extracelular (fibrina y fibronectina) que promueven la expresión de la selectina E, se unen con baja afinidad a los hidratos de carbono de las vellosidades de la membrana plasmática del **PMN**. Se expresan ligandos para las integrinas, como la VCAM-1, la VLA-4, la LFA-1 y el Mac-1. Esa baja afinidad que posibilitaba la unión y la desunión facilitando así el “rolling” leucocitario, se transforma en una alta afinidad, obligando así al **PMN** a permanecer cerca del foco inflamatorio, y no ser llevado por el torrente circulatorio, lo que implica una adhesión estable con un cito-esqueleto organizado, que es el prelude de su migración trans-endotelial siguiendo un gradiente de concentración química tisular que no se hallaba en la circulación. Así, tanto el **PMN** como el monocito-**M** se acumulan rápidamente alrededor de los patógenos y tienden a erradicar la infección. El sistema mononuclear fagocítico deriva de la célula toti-potencial de la médula ósea que se diferencia en monoblasto, monocito sanguíneo, y por fin, en **M** tisular, con estratégicas localizaciones por las que fue rebautizado como células de Küpffer en el hígado, osteoclasto en el hueso, microglia en el sistema nervioso central y **M** alveolar en el pulmón. Miden unos 15 μm y exhiben un núcleo en forma de C o arriñonado, no poli-lobulado como el **PMN** o eosinófilo. Posee lisosomas, vacuolas fagocíticas (fago-lisosomas) y filamentos cito-esqueléticos. Gracias a ellos, el ingreso de un microorganismo es incorporado a una vesícula como prerequisite para su destrucción. Los **PMN** y los **M** expresan en sus membranas una serie de receptores que se unen al patógeno y facilitan su ingreso a la intimidad celular; también activan a las células a producir citoquinas y péptidos microbicidas. El cito-esqueleto del fagocito despliega un papel importante en rodear al patógeno con 2 brazos membranosos para facilitar su ingreso al mismo, componiendo así la vesícula o fagosoma, que luego se separa de la membrana plasmática y permanece en el interior del citoplasma. A ese fagosoma se le une un lisosoma y componen el fago-lisosoma donde se despliegan los mecanismos microbicidas. Los fagocitos convierten el oxígeno molecular en intermediarios reactivos del oxígeno (**IRO**) y dan origen así a un proceso que se ha bautizado como el “estallido respiratorio”. El principal generador de radicales libres es el sistema de la oxidasa del fagocito, que, con sus numerosas subunidades se ensambla en el fago-lisosoma, reduce al oxígeno molecular en **IRO**, como los radicales de super-óxido, de manera tal que la forma reducida del NADPH (fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido) actúe como cofactor. El super-óxido se dismuta enzimáticamente en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que emplea a la mielo-peroxidasa en la conversión de los iones haluro no reactivos en ácido hipohaloso reactivo, y muy tóxico para las bacterias. Además de los **IRO**, los **M** producen intermediarios activos del nitrógeno (óxido nítrico) por la actividad de una enzima, la sintetasa del óxido nítrico inducible (**iNOS**), que no se halla en el citosol del **M** en reposo sino cuando éste está activado por lipo-polisacáridos, y por el INF- γ . La **iNOS** convierte a la citrulina en arginina liberando gas de óxido nítrico muy difusible. En los fago-lisosomas, el óxido nítrico se puede combinar con el H_2O_2 o super-óxido, producidos por la oxidasa del fagocito, e inducir radicales de peroxi-nitrito muy tóxicos para los patógenos. Otra enzima proteolítica, muy importante para eliminar microorganismos, presente tanto en los **PMN** como en los **M** es la elastasa. Estas sustancias tan eficaces en la destrucción de patógenos, pueden lesionar a los tejidos normales del huésped si llegan al ambiente

extracelular, generando más respuesta inflamatoria y daño tisular. La liberación de los **PMN** desde los vasos sanguíneos está condicionada por la liberación de histamina (liberada por mastocitos) y TNF- α (liberado por **M**). El TNF- α y la histamina actúan sobre las células del endotelio del vaso, haciendo que se active mediante la expresión de la selectina-E. Los **PMN** activados mediante la IL-8 se unen a la selectina-E mediante su ligando glucídico. Así, están presentes en los tejidos en 5 horas después de empezar la infección.

Los PMN relacionados con el crecimiento y propagación del cáncer.

Se demostró que aquellos funcionan como "primera respuesta" en la inflamación aguda, promueven el crecimiento de los vasos sanguíneos en los tejidos normales y sanos, y también lo hacen en los tumores malignos y en la propagación de las células tumorales por los vasos de neo-formación. La evidencia señala que los **PMN** desempeñan un papel importante durante las primeras etapas del desarrollo del tumor, y serían *una de las primeras células inflamatorias en la escena*. Se resalta la capacidad angiogénica y la actividad de la metalo-proteínasa-9 o **MMP-9**. Las metalo-proteinasas son endo-peptidasas con una función degradativa contra la matriz extracelular (**MEC**). Todas las metalo-proteinasas contienen un péptido señal, un pro-péptido y un dominio catalítico amino-terminal que contiene el sitio fijador del zinc. En la piel, se evidencia un aumento de la producción de metalo-proteinasas en la reparación de las heridas, en el envejecimiento cutáneo, en las enfermedades ampollares, en la fibrosis dérmica y en la invasión tumoral. Los **PMN** poseen mayores cantidades de **MMP-9** pre-sintetizada que los demás leucocitos, lo cual establece su vínculo con el crecimiento y propagación del tumor. Experimentos en embriones de pollos y ratones, demostraron que la **MMP-9**, con o sin inhibidores, estaba relacionada con la **angiogénesis** tumoral. Trataron de bloquear la formación de nuevos vasos con un anti-inflamatorio como el ibuprofeno, pero sólo se logró reducir la **angiogénesis** con la **MMP-9**. La neutralización de la IL-8, también reduce la afluencia de **PMN**, por ende, la no-formación de los vasos, reduciendo y limitando la propagación de las células cancerosas a otras áreas del cuerpo. Se concluye que, al actuar sobre los **PMN**, se reduce la agresividad del tumor, y que, la **MMP-9**, juega un papel fundamental en su desarrollo. Al utilizar cultivos celulares y modelos de cáncer en ratones se observó que existía una relación entre una infección, la inflamación y las metástasis. Una red de "trampas extracelulares" (**NETs**) es producida por los **PMN** en respuesta a una infección, para matar a los patógenos. En los animales con cáncer, la red de **PMN** (**NETs**), también atrapa a las células cancerosas, pero en lugar de matarlas, las activan y las hacen más propensas a desarrollar metástasis. Sería útil romper la red de **PMN** mediante el uso de medicamentos. Los **NETs** son filamentos extracelulares de cromatina nuclear asociados a proteínas citoplasmáticas granulares, liberadas por los **PMN** activados. Los **NETs** son capaces de :1) : inducir la maduración fenotípica de las **CDs**; 2): determinar el perfil madurativo de las **CDs** y regular la producción de sus citoquinas, estimuladas o no, por agonistas convencionales y agentes sensibilizantes de contacto; 3): inducir la capacidad de las **CDs** de orientar el perfil de diferenciación de los LT CD4+ en diferentes perfiles efectoras, y 4): caracterizar las vías de señalización activadas en **CDs** estimuladas por los **NETs**. Los **PMN** se purifican a partir de sangre de voluntarios por métodos convencionales. Las **CDs** se obtienen de monocitos cultivados con GM-CSF e IL-4 por 7 días. Los **NETs** se aíslan por digestión con enzimas de restricción y se caracterizan por proteómica. Descriptos en 2004, se forman por un proceso de muerte celular denominado netosis. En ella, la cromatina se descondensa luego de la dé-iminación de los residuos de arginina de las histonas y su transformación en citrulina no cargada, gracias a la PAD-4 (peptidil-arginina-deaminasa). Luego, se desintegra la membrana nuclear y las organelas intracelulares permiten a la cromatina fijar proteínas citoplasmáticas o granulares, enzimas y moléculas microbicidas. La etapa final de la netosis es la expulsión extracelular de esta cromatina recubierta de proteínas,

definiendo a los **NETs**, como la etapa final de una muerte celular diferente de la necrosis y de la apoptosis. No depende de la activación de las caspasas y no implica la fragmentación del ADN ni la exposición de fosfatidil-serinas en la superficie celular. No sólo se observa en los **PMN**, pues se describió en los eosinófilos y en los mastocitos.

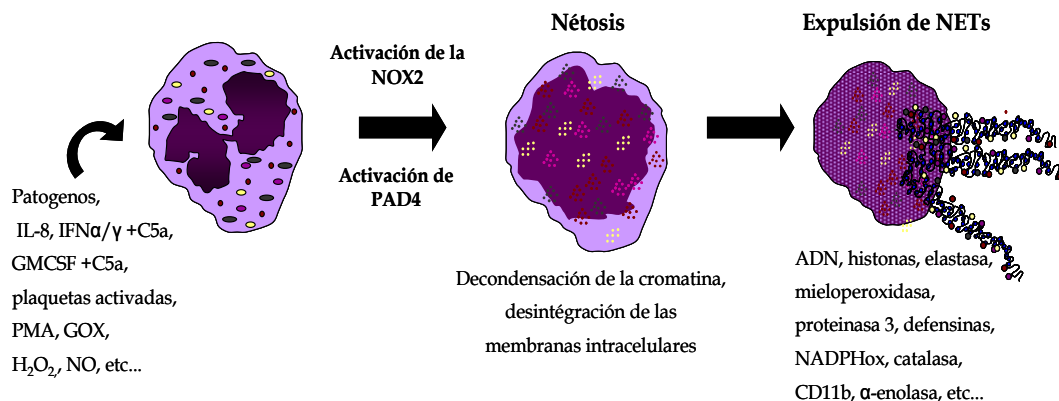


Fig. 8: Pasos moleculares de la Netosis en los PMN.

La estructura central de los **NETs** se compone del ADN asociado a las histonas. Ésta estructura es destruida por un tratamiento con la desoxirribonucleasa (ADNasa), pero queda intacta frente a la acción de las proteasas. En la actualidad, numerosas proteínas han sido identificadas asociadas a la superficie de los **NETs**, que son enumeradas en la Tabla 1, donde se las clasifica según su origen o función.

Origen/Función	Proteínas	Origen/Función	Proteínas
Núcleo	<i>Histonas: H2A, H2B, H3 et H4</i> <i>MNDA</i> <i>HMGB1</i>	Gránulos	<i>Elastasa</i> <i>Lactoferrina</i> <i>Azurocidina</i> <i>Catepsina G</i> <i>MPO</i> <i>PR3</i> <i>Lisozima C</i> <i>Defensina 1 y 3</i> <i>Gelatinasa</i> <i>LL-37</i> <i>BPI</i>
Citoplasma	<i>S100 calcium-binding protein A8, A9 et A12</i>		
Membrana	<i>β2-integrina CD11b</i>		
Citoesqueleto	<i>Actina β y γ</i> <i>Miosina-9</i> <i>α-actina 1 y 4</i> <i>Plastina-2</i> <i>Citokeratina-10</i>		
Enzimas glicolíticas	<i>α-énolasa</i> <i>Trasquelotasa</i>		
		Peroxisomal	<i>Catalasa</i>

Tabla 1. Componentes de los NETs identificados.

La extrusión de los **NETs** expone a una alta concentración local de proteínas anti-microbianas. Empleando la línea celular mieloide humana PLB-985 diferenciada a **PMN**, se demostró que la *Escherichia coli* entérica (DAEC Afa / Dr) activa la producción de **NETs** que median, a través de sus proteasas, la pérdida de la integridad del epitelio intestinal, demostrado en el modelo celular Caco2-T. Las histonas liberadas son tóxicas para el ambiente celular y su toxicidad se ve disminuida por el activador de la proteína C, una molécula utilizada en el tratamiento de la sepsis grave. Numerosos estímulos pro-inflamatorios activan la netosis: bacterias, hongos,

parásitos, lipo-polisacáridos (LPS), el ácido forbol-mirístico (PMA), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), los donantes de óxido nítrico (NO), las plaquetas activadas, la IL-8, el GM-CSF o el componente C5a después de una pre-activación por el IFN- γ . La integridad de la NADPH-oxidasa (NOX2) es necesaria, pues los **PMN** deficientes en uno de sus componentes no producen **NETs**, como es el caso de los niños con Enfermedad Granulomatosa Crónica, o bien la línea celular PLB-985 gp91phox^{-/-}. Durante la netosis, numerosos componentes intracelulares se liberan al medio extracelular, lo que sugiere que no sólo tendría una acción microbicida, sino también inmuno-modulatoria. Es interesante pensar en la posibilidad de que los propios **NETs** representen señales de alarma para el sistema inmune y pudiesen ser reconocidos como **DAMPs** (*danger-associated molecular patterns*). En la autoinmunidad, los **NETs** jugarían un papel en la etiopatogenia de la vasculitis con anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA), en la nefritis lúpica, y en la artritis reumatoide inducida por exposición de auto-antígenos citrulinados. Es probable que los **NETs** puedan interactuar con las células presentes en los sitios de inflamación, en particular con las **CDs**. Las pacientes con cáncer de mama que poseen un alto número de **PMN**, tienen mayor riesgo de desarrollar metástasis. Si las células del sistema inmunitario deben proteger nuestro cuerpo, no se entiende porqué los altos niveles de **PMN** se relacionan con una peor evolución. El tumor envía moléculas que actúan como «señalizadores» que hacen que el **SI** produzca un gran número de **PMN**, que se comportan distinto y bloquean a los **LT**. La interleuquina-17 (**IL-17**) es crucial para el aumento de la producción y cambio de conducta de los **PMN**. La inhibición de la **IL-17** por medicamentos, sería una estrategia segura, para tratar la psoriasis, el reumatismo y las metástasis. Investigadores que han revisado más de 440 artículos científicos de la investigación oncológica, llegaron a la conclusión que debería cambiarse el paradigma imperante pues el control del crecimiento tumoral lo haría el **RIC**, y no el **RIA** (linfocitos e inmunoglobinas). El crecimiento de los tumores sólidos (la gran mayoría de los tipos de cáncer, a excepción de las leucemias y los linfomas), según un modelo matemático y su meta-análisis, señala que si la inflamación, es aguda, puede ser quien controle el crecimiento de estos tumores hasta llegar incluso a su eliminación, no así si la inflamación es crónica.

Los mastocitos (MC) : Son células conectivas receptoras/secretoras de monoaminas y fueron sospechadas como “paraneuronas” (Fujita, 1977 y Kitamura 1979). Se asocian con las fibras nerviosas en los tejidos normales y con las células de Schwann. En los urodeles (*Triturus pyrogaster*) poseen dendritas, que son abundantes en el sistema nervioso central humano cerca de los capilares, las meninges y los ventrículos, donde se detectan ambos tipos de **MC** (Tc y MTc) con gránulos unidos a los sacos membranosos del Golgi. Se acepta su origen mesenquimático a partir de la célula stem o hemocitoblasto o célula reticular primitiva (CD34+) siendo su factor de crecimiento (SCF) o factor stem-cell producido por fibroblastos y células endoteliales. El kit-ligando o factor steel es el receptor para el SCF y es una tirosina-kinasa c-kit (CD117) que lo expresa durante toda su vida a diferencia del basófilo que lo pierde al diferenciarse. La circulación y acumulación de **MC** depende de su interacción con el endotelio por moléculas de adhesión (integrina $\alpha 4\beta 7$, la adhesina-Mad-CAM-1, la VCAM-1 y receptores de la familia del super-gene de las inmunoglobulinas). La serotonina es quimiotáctica para los **MC** lo que aconseja el empleo de fármacos antiserotoninicos (ciproheptadina). Nobleza obliga citar los trabajos pioneros de la década de 1970 de Pedro A. Colombi (1909-1975) y Angel Alonso, con difenilhidramina, ciproheptadina, el maleato de methyl-piperidylidene-thioxantene (HS592) y el “antamínico” clemastine (BP400) como inhibidores de la histamina, la serotonina, la bradiquinina y la SRS-A (sustancia de reacción lenta) o leucotrienes. Está demostrada la acción de la IL-3, el RANTES, la MCP-1, las C-X-C, el PF-4, la laminina, la vitronectina y la

fibronectina sobre los **MC**. Participan en la RIC pues pueden fagocitar bacterias (*Salmonella typhi*) estimulados por el LPS a través de los receptores Toll, activan el complemento por la vía alterna, e incorporan virus y parásitos, que quedan a merced de sus proteasas, prostanoïdes, citoquinas y catelicidinas líticas para Gram-positivos y negativos. También deterioran toxinas de los venenos de Hymenópteros y de ofidios. Activan la síntesis del colágeno y contribuyen a la tolerancia de los aloinjertos. Son muy sensibles al NGF (nervogrowth factor) que es importante en el estrés humano. El nivel sérico del NGF está aumentado en la queratoconjuntivitis vernal, en el asma bronquial y en la urticaria aguda. Se correlaciona con el infiltrado celular de **MC**, eosinófilos y linfocitos, y, también con alteraciones psicológicas como la ansiedad, la agresividad, el alcoholismo y la abstinencia a drogas. El NGF desgranula violentamente al **MC**, aumenta su supervivencia y estimula su proliferación y su síntesis en un feed-back positivo para ejercer efectos más distantes sobre los **LB** de memoria y otras células hematopoyéticas. Los valores del NGF descienden en el estrés crónico pues se sintetizan auto-anticuerpos que lo anulan por un mecanismo aún desconocido. Similares efectos se constataron con la SP, lo que refuerza el efecto de los neuropéptidos (NPO) sobre los **MC** sin mediar un anticuerpo específico, lo cual explicaría las desgranulaciones explosivas ante agentes “inespecíficos” (cuadros anafilactoïdes por medios de contraste yodado, ciertos fármacos, aditivos alimentarios, algunos cosméticos y elementos industriales). Se podría señalar que el estrés agudo jugaría un papel destacado en la RIC mientras que el crónico no, y, por el contrario, en la RIA sería preponderante el estrés crónico y no el agudo. Quizás el tiempo necesario para producir cambios bioquímicos sea la clave para el diferente impacto del estrés sobre el sistema inmune. Por otro lado, el estrés crónico podría tener algún efecto sobre el estado atópico habida cuenta de la actividad sostenida de numerosos NPO sobre los **MC** y otras células involucradas. De ahí la preferencia de fármacos con acción central que minimizan a los NPO mientras que los que no la tienen inhiben sólo a las IL-4, IL-6, IL-8, IL-13 y P-selectina, y no a los NPO. La acumulación de **MC** se describió en varias inflamaciones incluyendo la artritis reumatoïde, desórdenes alérgicos como el asma, el aumento de crecimiento de algunos tumores y su capacidad invasiva. En el laboratorio se observó que el número de **MC** peri-tumorales aumenta a medida que el tumor progresa, pero su papel se desconoce. La principal función de los **MC** es regular las funciones vasculares al iniciarse la respuesta inflamatoria, y activar a otras células. Los **MC** son una de las principales células efectoras del sistema inmune, y tienen un papel clave en la fase aguda de las reacciones alérgicas mediadas por la IgE. Además de ello, los **MC** intervienen en la remodelación de tejidos, cicatrización de heridas, condiciones fibróticas, formación de vasos sanguíneos, respuesta del hospedador a parásitos y desórdenes inflamatorios crónicos y agudos. Cuando los **MC** son activados, liberan sus gránulos citoplasmáticos que contienen mediadores inflamatorios y otros compuestos, que inducen la vasodilatación, la permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso bronquial. La activación de los **MC** y la subsecuente exocitosis de los gránulos, es seguida por la producción y secreción de citoquinas que dirigen la infiltración leucocitaria y la inflamación local.

El papel de los MC y de la heparina (H) en la angiogénesis:

Los **MC** se acumulan en situaciones normales y patológicas donde se desarrollan procesos angiogénicos y su migración quimiotáctica al sitio de la neo-vascularización es inducida por los factores de crecimiento como el SCF (factor de crecimiento de células progenitoras), el VEGF (factor de crecimiento vascular-endotelial), el EGF (factor de crecimiento epidérmico), el bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico), y el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas). Las proteasas liberadas por los **MC**, degradan la matriz del tejido conectivo y proveen un espacio para la formación de nuevos vasos. Existen evidencias que mediadores de

los **MC**, como la histamina, la heparina, las enzimas colagenolíticas (quinasa, triptasa y **MMPs**) que degradan la **MEC**, y las potentes citoquinas pro-angiogénicas (4 isoformas del VEGF, bFGF, TGF-beta, TGF-alfa e IL-8), pueden, individual o sinérgicamente, estimular la **angiogénesis**. La **angiogénesis** tumoral disminuye en ratones deficientes de **MC** (W/W^v) implantados con células del melanoma B16BU6, con una correlación entre el número de **MC** y la densidad de micro-vasos tumorales. Kessler y Folkman, implantaron tumores en la membrana corio-alantoidea del embrión de pollo y encontraron incrementada 40 veces la cantidad de **MC**, en torno al tumor implantado, antes de que arribaran nuevos capilares. Azizkhan y Zetter, hallaron que el lisado de **MC** estimuló la locomoción de las células endoteliales *in vitro*. Todos los productos de los **MC** fueron testeados y sólo la **H** pudo estimular esa locomoción y sustituir al lisado de **MC**. Si pequeñas cantidades de **H** (6-25 pg) se agregan al embrión de pollo, el crecimiento capilar (estimulado por el extracto tumoral) aumenta significativamente. Una fracción no coagulante de la **H** tuvo un efecto similar. Por estos experimentos se sospecha que parte de la molécula de **H** actúa como un regulador positivo de la **angiogénesis**. Klagsbrun y Shing, encontraron que la **H** puede unir en la superficie de las células endoteliales vasculares, a mitógenos celulares que son también angiogénicos. Estudios de Vlodavsky (1990), demostraron que la actividad angiogénica de la **H** es mediada por la interacción con el FGF. La **H** puede liberar bFGF de la **MEC**, y este factor de crecimiento actúa como un fuerte mitógeno de las células endoteliales.

La activación del MC:

Son activados por compuestos inmunológicos y no inmunológicos. La desgranulación inmunológica y no inmunológica presenta una apariencia similar, pero la cinética y la cantidad de los productos liberados varía, dependiendo de la estimulación inicial. La vía clásica de activación de los **MC** ocurre cuando un alérgeno interactúa con un anticuerpo IgE específico, que se une con alta afinidad al receptor-IgE (RFcεI) anclado en el **MC**, iniciando la señalización intracelular. Este acoplamiento produce la desgranulación y la transcripción de citoquinas inflamatorias. Se demostró que además de la IgE, también la IgG puede activar la desgranulación de los **MC** humanos por unión al RFcεI, y ser activados por neuropéptidos, factores del complemento, C3a y C5a, a través de los C3aR y C5aR (CD88). El NGF también activa a los **MC** a través de su receptor TrkA, como así también las lectinas por unión a la región Fc del RFcεI. Los receptores Toll-like (TLR), que son críticos en la activación de la respuesta inflamatoria pueden activar a los **MC**. Por interacciones entre los TLR con lipopolisacáridos (LPS) y proteoglicanos (PGN), los **MC** son directamente activados por bacterias, y contribuyen con la primera línea de defensa contra las infecciones bacterianas. (Fig.9)

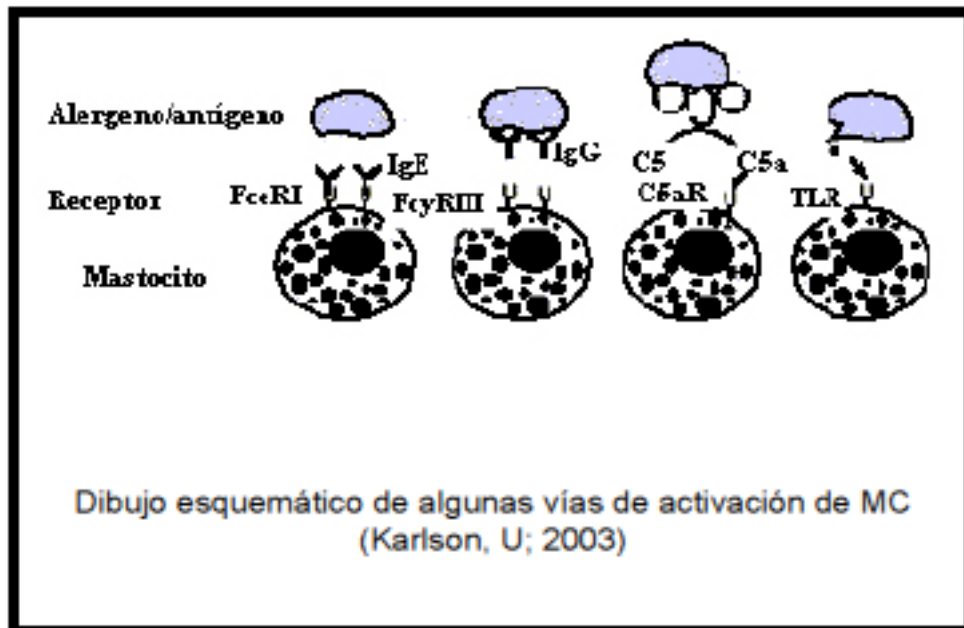


Fig.9: Esquema de la activación del MC.

La **H** es importante en la progresión tumoral ya que aumenta la **angiogénesis** in vivo, y la migración y proliferación de las células endoteliales in vitro. Además, la **H** libera activador del plasminógeno del endotelio pudiendo contribuir a la lisis de la membrana basal, permitiendo así la migración de las células tumorales. Las proteasas de los **MC** del ratón incluyen 5 quinasas y 3 triptasas. Una de las proteasas presente en los **MC** (**Tc**) es la carboxi-peptidasa A, que es una metalo-proteasa dependiente del Zn^{2+} con actividad de exo-peptidasa. Los **MC** humanos contienen triptasa, quinasa y carboxi-peptidasa A, todas unidas con la **H** en los gránulos. Además, los gránulos secretorios contienen metalo-proteasas de matriz (**MMPs**).

Las proteasas de los **MC** degradan la **MEC**, facilitando la migración de las células endoteliales, y la liberación de factores de crecimiento unidos a la **H** que actúan como compuestos pro-angiogénicos (como los VEGF, cFGF, y TGF-beta) y anti-angiogénicos (como las trombospondina-1, angiostatina y endostatina). Además, la quimasa y triptasa actúan directamente como factores pro-angiogénicos. La **MMP-9** de los **MC** regula la **angiogénesis** y promueve la progresión tumoral. Se detectó en los **MC** una nueva proteasa relacionada con la granzima-B de los **LT**, la rMCP-8 (rat-mast-cell-protease-8), pero aún no se conoce su especificidad.

Tabla 2. Mediadores de los MC.

Mediadores preformados	
Asociados a gránulos	Eluidos rápidamente
Heparin/condroitin sulfato	Histamina
Triptasas	Serotonina (en algunas especies)
Quimasas	Factores quimiotácticos para macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos
Metaloproteasas de matriz: MMP-2, MMP-9, y MMPs adicionales	
Elastasa	
Carboxipeptidasa	
AExoglicosidasas	
Activador de Plasminógeno	
Ariilsulfatasa A	
Heparanasa	
Mediadores sintetizados de novo:	
<u>Prostaglandinas:</u> PGD ₂ , PGE ₂	<u>Citoquinas:</u> TNF-alfa, GM-CSF, SCF, IL-1-beta, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-14, IFN-gamma. BFGF, VEGF
Tromboxanos	
HETEs (Hidroxiecosatrienoicos)	
HPETEs(Hidroperoxieicosatrienoicos)	<u>Quimioquinas:</u> MIP-1-alfa, MIP-beta, MCP-1, infotactina.
<u>Leucotrienos:</u> LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ , PAF (factor activador de plaquetas).	

El papel de los MC en la progresión tumoral:

Los MC se asociaron con los cánceres humanos, aunque su papel en el desarrollo tumoral es controvertido, pero hay unanimidad en el hecho de que su número umenta durante la progresión tumoral. Varios tipos de células tumorales expresan SCF y otros factores, que son quimio-atractivos para los MC, lo cual explicaría la asociación.

En la invasión y metástasis están involucrados la proliferación celular, la neo-vascularización, y la degradación de la MEC. En cada uno de ellos, los MC intervienen modificando el crecimiento tumoral, potenciando la **angiogénesis** o facilitando la invasión por las proteasas que clivan al colágeno tipoIV, la fibronectina, la elastina y los proteoglicanos o activando la pro-colagenasa de los fibroblastos y estimulando su secreción. Experimentos basados en la manipulación de los niveles del SCF demostraron que los MC están ligados con la **angiogénesis**. El incremento en la expresión de SCF por las células tumorales produjo una acumulación de MC, la cual indujo la aparición de nuevos vasos sanguíneos y del crecimiento tumoral. Ratones deficientes en MC (W/Ww) presentan una disminución de la **angiogénesis** asociada al tumor. En contraste, los MC participan en la defensa anti-tumoral inflamatoria por exhibir una citotoxicidad natural contra las células tumorales. Ratones deficientes en MC (W/Ww) muestran un incremento de metástasis e incidencia tumoral. Por ende, mientras que algunos investigadores no encuentran ninguna correlación entre el pronóstico tumoral y la infiltración de MC, otros señalan una correlación con valor pronóstico positivo o negativo. Por ejemplo, los carcinomas de mama con gran número de MC, tienen mayor supervivencia; sin embargo, el carcinoma de intestino con una plétora de MC presenta metástasis. En el caso del pulmón, un elevado número de MC presenta un pronóstico menos favorable. Contrariamente, muchos MC en el carcinoma cervical se asocia con una mayor supervivencia. La histopatología de los sarcomas muestra que los poco agresivos poseen gran número de MC. Dos hipótesis tratan de explicar esta controversia:

1) : los MC promueven una reacción de defensa del organismo contra el tumor:

Los MC peri-tumorales se interpretan como una respuesta anti-tumoral del hospedador. Así, los MC como sus productos de desgranulación, tendrían un efecto protector del organismo contra los tumores o serían citotóxicos para los tumores in vitro. El TNF α - es citotóxico y es

synthesized by the **MC**, and would be responsible for such reaction. It was pointed out that the incidence of tumors induced experimentally in mice genetically deficient in **MC** (W/W^w) is significantly higher than in mice that have a normal number of **MC**, as is the case of the lung metastases of the melanoma B16 in the deficient of **MC** and not in the normals. Other experiments show that the **MC** increase during the tumor progression and inhibit the growth in vitro, and the incidence of tumor in vivo of an adenocarcinoma mammary murine. There are evidences that the **H**, secreted by the **MC**, would be responsible for the observed effects, since it was demonstrated that the tumor cells possess specific receptors for it, and this is capable of inhibiting its proliferation.

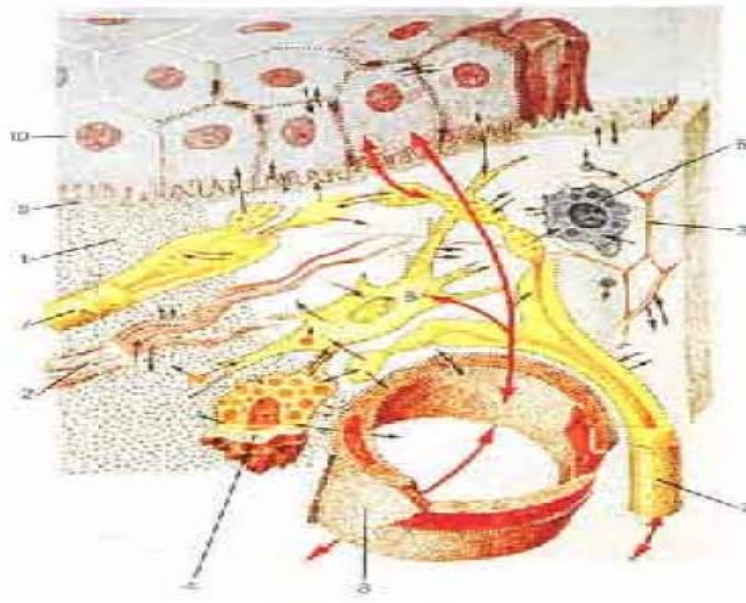
2): los MC promueven el crecimiento tumoral y las metástasis:

It is postulated that the tumor cells alter the reactivity of the **MC**, obtaining advantages from them, altering the **MEC**, favoring migration and neo-vascularization. The **MC** activated by the tumors release substances that would promote their growth. In vitro studies show that the products of the **MC** increase the proliferation of the tumor cells. These observations are supported by experiments performed in vivo with adenocarcinomas of rat that show that a pharmacological suppression of the activity of the **MC** results in a significant inhibition of tumor growth. On the other hand, the **MC** are characterized by their ability to synthesize and release numerous active molecules. Thus, through their mediators, the **MC** can act directly on some critical steps of tumor development such as neo-vascularization, invasion and metastasis.

La matriz extracelular (MEC):

The **MEC** is a fibrillar organized network, which serves as a substrate for cell adhesion and migration. It maintains tissue integrity, regulates molecular diffusion and transfer of stimuli. It forms a dynamic cellular microenvironment, which plays an important role in the determination of the cellular phenotype. It is formed by collagen, glycoproteins of adhesion such as fibronectin and laminin, proteoglycans and glycosaminoglycans. It carries information from and to the cells, modulating the function of growth factors/cytokines and regulatory factors such as the production of enzymes and their inhibitors. The **MEC** includes the basal membrane (**MB**) and the interstitial stroma. This is formed by connective tissue cells such as fibroblasts, osteoblasts, chondrocytes, and **M**. It presents a network of collagen and elastin embedded in an amorphous substance. The **MB** separates the layers of epithelial and endothelial cells from the underlying cells of the stroma. At the electron microscope it is formed by 3 lamellar layers: the one adjacent to the cells or lamina rara or lucida, the second layer or lamina densa and a third layer or lamina fibro-reticular, with collagen fibrils, which continues with the interstitial stroma. The 4 types of molecules of the **MB** are the type IV collagen, the perlecan (proteoglycan of heparan-sulfate) the laminin and the entactin. In normal conditions, the **MB** and the interstitial stroma, form an impermeable barrier to cells and macromolecules. In the site of contact of the **MEC** with an invasive tumor, it is digested by proteases released by the tumor, allowing the passage of cells and macromolecules. In the transition of carcinoma in situ to invasive, the neoplastic cells penetrate the **MB** and enter the interstitial stroma. From there, they have access to the lymphatic and blood vessels, to disseminate. A hypothesis of 3 steps describes the sequence of biochemical events that occur during the invasion of the tumor cells to the **MEC**. The first step is the anchorage of the tumor cells by their surface receptors, to the laminin and fibronectin. Then, the tumor cells anchored, secrete hydrolases (or induce the host cells to secrete them) that degrade the **MEC** (including the degradation of anchorage components). This lysis is localized in a region close to the tumor cell. Finally, the third and last step is the migration of the tumor cells towards the region of the **MEC** modified by proteolysis. These steps are reiterated cyclically during the invasion and are crucial in the metastatic dissemination of the tumor cells.

Fig.10: Estructura de la MEC.



Matriz extracelular

1) glucosaminoglucanos, proteoglucanos y glicoproteínas; 2) fibras de colágeno; 3) elastina; 4) mastocito; 5) macrófago; 6) fibroblasto; 7) axones terminales; 8) capilar; 9) membrana basal; 10) células epiteliales.

Las alteraciones en la expresión de las moléculas de adhesión :

En la invasión de las células tumorales, la pérdida de contacto entre ellas es por la interrupción de las uniones célula-célula y célula-MEC. La pérdida de la cohesividad se debe a la alteración de la expresión y función de las moléculas de adhesión. Estas impiden la migración e invasión de células dentro del estroma circundante por la adhesión célula-célula y célula-MEC. La familia de los receptores de las integrinas, las cadherinas y la super-familia de las inmunoglobulinas, tiene un papel importante en la migración de las células tumorales y contribuyen a las metástasis. Por ello, las moléculas de adhesión son el blanco para las terapias anti-neoplásicas. No sólo son importantes en el diagnóstico como marcadores de malignidad, sino que son relevantes en el tratamiento, al inhibir la formación de las metástasis.

Las cadherinas:

Son glicoproteínas de membrana, que median la adhesión célula-célula en forma Ca^{2+} dependiente. Se expresan en la superficie de células adyacentes y se unen entre sí (unión homotípica), para mantener las células juntas y conservar la arquitectura tisular. Participan en el desarrollo de órganos y vasos, y en la cicatrización de las heridas. Se las bautizó de acuerdo a su ubicación: E-cadherina de las células epiteliales, la N-cadherina del tejido neural, y la P-cadherina de la placenta. La región citoplasmática (COOH-terminal) está conectada al citoesqueleto de actina por proteínas de la familia de las cateninas. Los complejos cadherina-catenina, favorecen la adhesión entre células, y, generan señales que regulan la proliferación y migración. En ratas, las células tumorales con baja expresión de E-cadherina y catenina aumentan su capacidad de penetrar en la circulación vascular y de generar metástasis. La expresión reducida de E-cadherina en el carcinoma de mama es un indicador de baja supervivencia; en los carcinomas colorrectal y gástrico, una expresión reducida de E-cadherina y catenina se relaciona con mayor invasividad de las células tumorales. Se afirma que la **supresión** de la expresión de la E-cadherina es uno de los principales eventos moleculares responsables de la disfunción en la adhesión célula-célula. Los tumores tienen una arquitectura celular anormal, y pierden la integridad tisular lo cual dirige la invasión local. La pérdida de la proteína supresora del tumor E-cadherina se correlaciona con mayor invasividad y metástasis tumoral, por lo cual el gen que la codifica es referido como un gen supresor de la invasión.

Las integrinas:

Son glicoproteínas de superficie que funcionan como receptores para moléculas de la MEC o como moléculas de adhesión célula-célula. Están formadas por 2 subunidades trans-membrana, (heterodímero), una α (con 16 tipos diferentes) y una β (con 8 tipos diferentes) en una unión no

covalente. Las selectinas y los proteoglicanos también intervienen en la fijación. La subunidad α está dividida en 2 segmentos que se mantienen juntos por una unión bisulfuro. Participan en la agregación plaquetaria, la inflamación, la respuesta inmune, la cicatrización de las heridas y en la patogénesis de las metástasis tumorales. La especificidad del ligando es el resultado de la combinación de los dominios extracelulares de ambas cadenas. Las integrinas reconocen moléculas de la MEC como la laminina, el colágeno, la fibronectina y la vitronectina; la secuencia peptídica Arg-Gly-Asp (RGD) de estas moléculas es uno de los sitios de unión. Otras integrinas participan en la adhesión célula-célula, por moléculas de la super-familia de las inmunoglobulinas. Al regular la adhesión, participan en el proceso de metastatización.

La super-familia de las inmunoglobulinas:

Son glicoproteínas que tienen en su porción extracelular, múltiples dominios parecidos a los de las inmunoglobulinas. Participan en las interacciones célula-célula, ya sea manteniendo unidas a células de igual o distinta estirpe. Los cambios en su expresión durante la oncogénesis favorecen la formación de agregados celulares y/o interfieren en la adhesión de células tumorales con leucocitos, alterando la respuesta inmune. Las más importantes son la N-CAM y la I-CAM. La primera o molécula de adhesión de las células neurales es mediadora de la adhesión homotípica, manteniendo unidas células que expresan N-CAM. Hay isoformas de ella, producidas por «splicing» alternativo a partir de un mismo gen; las principales son las de 180 kDa, de 140 kDa (trans-membrana) y de 120 kDa (soluble). Kibeelaar investigó la expresión de N-CAM en carcinomas de pulmón resecaos quirúrgicamente con el uso de anticuerpos contra epítopes de N-CAM. Sólo el 20% de los carcinomas de células no pequeñas expresaron N-CAM, y el tiempo de supervivencia fue menor en los pacientes N-CAM positivos, que en los pacientes N-CAM negativos. Como estos carcinomas expresan N-CAM, esta molécula se ha propuesto como marcador diagnóstico. (Ledermann JA, et al., 1994).

La molécula de adhesión intercelular 1, (ICAM-1), se expresa en **LB**, **LT**, fibroblastos, keratinocitos, y células endoteliales. En las neoplasias pulmonares la expresión del ICAM-1 depende del tipo histológico. En líneas celulares provenientes de carcinomas epidermoides y de carcinomas de células grandes se expresa ICAM-1 en su superficie, mientras que en las provenientes de carcinomas de células pequeñas no se expresa. Así, la disminución en la expresión del ICAM-1 favorece el proceso de metástasis. Esto explicaría la supervivencia mayor en los pacientes con carcinoma pulmonar de células no pequeñas. Una forma soluble de ICAM-1 (sICAM-1) existe en el suero de los sujetos sanos. En las neoplasias pulmonares, la expresión de sICAM-1 exhibe niveles más altos que en los controles sanos. En el carcinoma pulmonar de células no pequeñas existe una correlación positiva entre la concentración sérica de sICAM-1 con: a) el tamaño del tumor primario; b) la etapa clínica; y c) el potencial metastático. Melis, investigó la actividad de sICAM-1 en fluidos pleurales de pacientes con cáncer. Halló que sICAM-1 es liberada de la superficie celular antes de ser sintetizada de novo. La expresión de sICAM-1 está regulada por **M** que liberan sICAM-1 por un mecanismo dependiente del TNF α . Además, sICAM-1 tiene un papel clave en la inmunosupresión, al inhibir la adhesión de **LTCD8+** a las células tumorales.

Las selectinas:

Poseen una estructura unitaria homóloga con las inmunoglobulinas. Median las interacciones hetero-típicas entre las células endoteliales y los **PMN**, que se requieren para la extravasación al tejido blanco durante el proceso inflamatorio. La familia de las selectinas consta de 3 miembros: la E-selectina, la L-selectina, y la P-selectina. Las E-selectinas aparecen en el endotelio vascular por estimulación de las citoquinas. Las L-selectinas se expresan en casi todos los **PMN**. Las P-selectinas si bien, se encontraron en las plaquetas activadas, su expresión es inducida en el endotelio vascular, son almacenadas como proteínas trans-membrana preformadas en gránulos citoplasmáticos, y son translocadas a la superficie celular bajo estimulación. Los ligandos para las L-selectinas están en las células endoteliales mientras que los ligandos para las E- y P-selectinas se hallan en los **PMN**. La E-selectina participa en la adhesión de las células del cáncer de colon al endotelio vascular. Los vasos sanguíneos de las lesiones tumorales invasoras expresan E-selectina y P-selectina, y también ICAM-1. El aumento de los niveles séricos de E-selectina augura un pronóstico desfavorable en el cáncer de mama, y, en el pulmonar de células pequeñas.

El citoesqueleto de actina:

El cito-esqueleto de actina es una red de polímeros de actina y de proteínas asociadas. Participa en el citoplasma generando fuerzas mecánicas dentro de la célula en respuesta a señales extracelulares. Está involucrado en la regulación de la forma, la motilidad y la adhesión celular, por lo que alteraciones en su función contribuyen a la transformación maligna. Interacciona tanto con moléculas intracelulares como con los receptores de adhesión, conectando así el micro-ambiente externo con el interior de la célula. Los cambios en el cito-esqueleto modulan la actividad de los receptores de adhesión y de los oncogenes, participando así de la progresión tumoral. En las células normales, los micro-filamentos de actina son muy estables, y por ello, las células tienen muy poco movimiento; en las células cancerosas la desorganización del cito-esqueleto de actina impide la formación de contactos célula-célula y facilita la migración. En el cáncer de pulmón hay cambios en el cito-esqueleto y en las proteínas asociadas a éste.

Desde 1995, se sabe que los carcinomas pulmonares metastásicos tienen la actina polimerizada (F-actina) disminuida y un decremento en la integridad del cito-esqueleto. Las funciones de la actina del cito-esqueleto son moduladas por vías de señalización iniciadas en la membrana plasmática, sobre receptores de proteínas tirosina-kinasa que activan a Ras. La super-familia de proteínas Ras, que incluye la familia de proteínas Rho, son parte de las vías de señalización. Algunas de las proteínas de esta super-familia o de sus reguladores son oncogénicas, y, las mutaciones o sobre-expresión de éstas se hallan implicadas en distintos tipos de cáncer.

Las proteasas: clasificación y su importancia en la invasión tumoral.

La degradación de la MEC y la migración de la célula tumoral son eventos complejos que requieren la producción, liberación y activación de enzimas degradantes de la MEC. Está probada la sobre-expresión de enzimas en todas las células del microambiente hospedador-tumor. Para el proceso de invasión, es necesaria una producción de enzimas por las células tumorales y por las células de los tejidos adyacentes, y una extensa lisis de los componentes de la MEC. Así, la célula tumoral invasora usa la proteólisis de manera organizada, espacial y temporalmente. La degradación tisular normal y de ciertas enfermedades es similar a la que ocurre en el cáncer. Pero, las células tumorales además: **1)** inducen la producción de proteasas en las células vecinas, por la secreción de citoquinas y/o factores de crecimiento, y también de sustratos para las proteasas, como las formas latentes de TGF- β , que son activadas proteolíticamente por **MMP-2** y **MMP-9**; **2)** producen y secretan ellas mismas sus proteasas, o bien, **3)** producen factores que inhiben o activan proteasas locales.

Las proteasas se agrupan en 4 familias:

1.-Las serino-proteasas:

Comprende a los activadores del plasminógeno, que lo convierten en plasmina y desempeñan un papel importante en el proceso de coagulación. La activación del plasminógeno es una cascada proteolítica que, con otras enzimas, participa en la degradación de la MEC durante la remodelación tisular normal y patológica, incluyendo la invasión metastática. Hay 2 tipos genética e inmunológicamente diferentes de estas enzimas: el tipo urokinasa -uPA- (Urokinase-type-plasminogen-activator) y el tipo tisular -tPA- (tissue-plasminogen-activator).

La uPA es una enzima que cataliza la conversión de plasminógeno en plasmina activa. La plasmina, una proteinasa neutra de amplia especificidad, se une a receptores de las células tumorales (Miles LA, Plow EF, 1988), y desarrolla una amplia actividad fibrinolítica catalizando la degradación de componentes de la MEC incluyendo fibrina, fibronectina, colágeno tipo IV, vitronectina y laminina. La plasmina activa a otras proteasas, amplificando la reacción. Así, por la activación de la uPA se produce la ruptura de muchas proteínas de la MEC. La uPA se sintetiza y secreta por las células tumorales y estromales en forma de una pro-enzima inactiva (pro-uPA), que se une a receptores específicos de la superficie de las células tumorales. Tras esa unión, la pro-enzima es activada por la plasmina, la calicreína o las catepsinas B y L. De este modo, los receptores de la uPA son esenciales en la migración de la célula tumoral, al permitir la regulación de la actividad proteolítica en los contactos celulares mediante las diferentes localizaciones de la uPA y sus inhibidores. Se sugiere que la uPA desempeña un papel en la progresión de los carcinomas humanos. Los valores intra-tumorales elevados de la uPA se asocian con una menor supervivencia de los pacientes con cáncer de

mama y de colon. (Mulcahy A, 1994), gástrico (Nekarda H, 1994), pulmonar (Pedersen H, 1994), vejiga (Hasui Y, 1992) y gliomas (Hsu D., 1995). La actividad resultante de la uPA dependerá del equilibrio con su inhibidor natural específico PAI-1 (plasminogen-activator-inhibitor), producido por las células tumorales. Los valores intra-tumorales del receptor para la enzima son importantes en el proceso de invasión tumoral. Se demostró la significación pronóstica de los inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAI-1).

Así, en relación con el inhibidor de la uPA (PAI-1) se detectó que, los valores elevados del éste están asociados con un mal pronóstico en el cáncer de mama (Jänicke F, 1991) y en el del cérvix uterino (Kobayashi H, 1994). También se señaló que los valores elevados del inhibidor del tPA (PAI-2) se asocian a un mejor pronóstico en el cáncer mamario (Foekens JA, 1994). A pesar de la discordancia, son mayores los efectos de los inhibidores de las proteasas en la patología tumoral. El PAI-1 tiene un papel importante en la **angiogénesis**, como un factor adverso de los tumores (Montesano R, 1990). La liberación del PAI-1 sería importante en la reimplantación de las células tumorales, ya que el nuevo estroma en las metástasis, requiere el bloqueo de la degradación de la MEC ocasionado por la uPA.

2.-Las cisteíno-proteasas:

Son dependientes de la cisteína, como las catepsina B y L. Participan en la invasión de las metástasis. La catepsina B que es lisosomal, está en la membrana plasmática de las células tumorales, y en el medio de líneas celulares cultivadas in vitro. Es importante para degradar proteínas de la MEC, y para convertir el pro-uPA inactivo, en un uPA-uPAR, o uPA, enzimáticamente activo de las células tumorales. Por su parte, la catepsina L que degrada a las proteínas de la MEC, como el colágeno, la laminina y la elastina, posee actividad proteolítica más alta que la de la catepsina B, pues también activa al pro-uPA.

3.-Las aspártico-proteasas:

Son dependientes del aspartato, como la catepsina D, que es una enzima lisosomal. Johnson, en 1993, halló una correlación entre la catepsina D y la conducta invasiva de líneas celulares mamarias. La sobre-expresión de la catepsina D estimula la proliferación celular de focos de micro-metástasis en ratones (Liaudet E, Derocq, A, 1995). Facilitaría el crecimiento de las células tumorales en sitios distantes por: 1): la inactivación de los inhibidores del crecimiento, 2): la activación de los factores del crecimiento, ó 3): por su interacción con receptores para los factores del crecimiento .

4.- Las métalo-proteasas:

Denominadas proteasas de la matriz (**MMPs**), son enzimas dependientes del Zn^{2+} que degradan moléculas de la MEC. Las métalo-proteasas son producidas por muchas células y son secretadas en forma inactiva (pro-métalo-proteasas). Originariamente, las **MMPs** fueron consideradas en la invasión y en las metástasis; pero, estudios recientes revelaron que las **MMPs** están involucradas en la progresión tumoral. Estas enzimas regulan el crecimiento de las células tumorales, la diferenciación, la apoptosis, la migración e invasión, la regulación de la **angiogénesis** tumoral y la vigilancia inmune.

La familia de las métalo-proteasas de la matriz (MMPs):

Más de 21 **MMPs** humanas y sus homólogas de otras especies, clivan cualquier componente de la MEC. Históricamente, se dividieron en colagenasas, gelatinasas, estromelisininas y matrilisininas, en base a su especificidad por los componentes de la MEC. Pero, como los sustratos de las **MMPs** han crecido, se adoptó para su denominación un sistema secuencial de numeración, y las **MMPs** son ahora agrupadas de acuerdo a su estructura. Existen 8 clases diferentes de **MMPs**: 5 son secretadas y 3 son **MMPs** de tipo membrana (**MT-MMPs**). Estas están covalentemente unidas a la membrana celular, pero las **MMPs** secretadas, pueden localizarse en la superficie celular unidas a integrinas, al CD44, o a proteoglicanos heparan-sulfato, al colágeno tipo IV o al inductor de **MMPs** (**EMMPRIN**) el cual estimula la síntesis de **MMPs** en los fibroblastos.

La regulación y activación de las MMPs:

Se sabe que las **MMPs** tienen diferentes sitios de regulación: a) a nivel transcripcional a través de factores de crecimiento y citoquinas, b) a nivel post-transcripcional, por cambios en la estabilidad del ARNm, y c) a nivel post traduccional, a través de la activación de la forma

latente secretada. Pueden ser inhibidas por los inhibidores endógenos de las metalo-proteasas (**TIMPs**). La regulación transcripcional es el punto más importante para la expresión de la metalo-proteasa latente. Hay mecanismos reguladores extracelulares que controlan el nivel de degradación de la **MEC**. La activación de la enzima es auto-catalítica y da lugar a la pérdida de un péptido amino terminal. Las **MMPs** se activan in vitro por agentes como los detergentes, los compuestos órgano-mercuriales y las enzimas como la plasmina, la tripsina, la calicreína y la estromelina. El agente activador inducirá un cambio conformacional en la molécula de la proenzima para que pueda interactuar con el Zinc²⁺ y así activarse.

Los sustratos de las MMPs:

El clivaje de la **MEC** por las **MMPs** genera fragmentos con nuevas funciones. Así, el clivaje de la laminina-5 y el colágeno tipo IV da lugar a la exposición de sitios crípticos que promueven la migración. Las **MMPs** tienen como sustratos a los receptores de los factores de crecimiento y las moléculas de adhesión. El receptor 1 del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR-1) es clivado por la **MMP-2**. Los dominios extracelulares de los receptores son liberados, y funcionan como receptores señuelos para sus respectivos ligandos. El clivaje de la E-cadherina y del CD44 libera los fragmentos de los dominios extracelulares de estas moléculas de adhesión, y produce un aumento del comportamiento invasivo. También el clivaje de la subunidad αV de la integrina por la **MMP-14** aumenta la migración de las células tumorales. Finalmente, las **MMPs** clivan y activan a sus propias formas inactivas, y a otras **MMPs** e inhibidores de proteasas como las serpinas.

El sistema de inhibición de las MMPs:

Las **MMPs** son reguladas por inhibidores de metalo-proteasas o **TIMPs** del microambiente celular. Inhiben formas activas de **MMPs**, y hasta formas latentes de **MMPs**. La alteración de este balance conduce a patologías tisulares. Las **MMPs** activas son inactivadas por β -macroglobulinas, como la β -2-macroglobulina. Los **TIMPs** son moléculas producidas por las células que sintetizan las **MMPs** o por células vecinas, lo que permite controlar la proteólisis pericelular en situaciones normales. Los inhibidores de las **MMPs** son: el **TIMP-1**, el **TIMP-2**, el **TIMP-3** y el **TIMP-4**. Los 2 primeros se los vincula con la invasión y las metástasis. Los inhibidores se unen con alta afinidad en una relación molar 1:1 a **MMPs** activas, lo que origina una pérdida de la actividad proteolítica. El papel de los **TIMPs** en la invasión y metástasis se discute, ya que en algunos casos los **TIMPs** favorecen la progresión del tumor: **TIMP-1** y **-2** inhiben la apoptosis de la célula tumoral, **TIMP-2** y **-3** promueven el crecimiento de la célula tumoral, y **TIMP-1** promueve la **angiogénesis**. Los altos niveles de **TIMP-1** y **TIMP-2** son de mal pronóstico, pues son mitógenos para muchas células y se unen en la superficie celular.

Los monocitos:

Se originan en la médula ósea a partir de un precursor mielóide y se liberan al torrente sanguíneo, donde constituyen un 10% de los leucocitos humanos^[11]. Tienen una vida media corta (24-72 horas), y renuevan a los **M** y **CD**. Son heterogéneos en morfología, marcadores de superficie y capacidad fagocítica, y exhiben gran plasticidad en su diferenciación. Así, el fenotipo y las funciones de los **M** residentes en los tejidos (**M** alveolares, células de Kupffer, microglía, osteoclastos) varían considerablemente. Por ejemplo, los **M** son inducidos a adquirir propiedades fenotípicas y funcionales de **CD**, mientras que las **CD** derivadas de monocitos (**MDDC**) in vitro, pierden sus funciones efectoras al retirar las citoquinas que promueven su generación.^[13] Dicha plasticidad se valora en la resolución de la inflamación, donde células apoptóticas facilitan la transformación de **M** citotóxicos/pro-inflamatorios en promotores de crecimiento/anti-inflamatorio para reparar y limitar el daño tisular asociado.

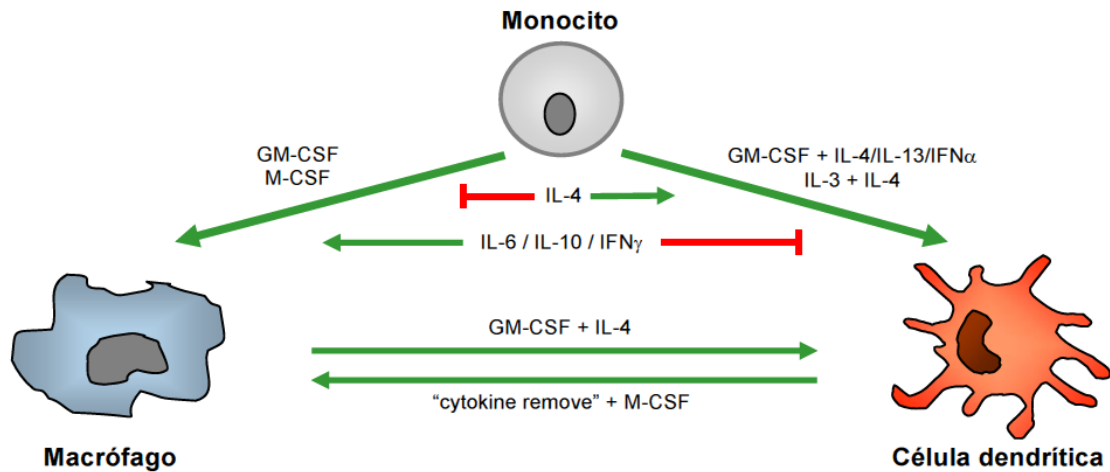


Fig. 11: Diferenciación in vitro de monocitos. Esquema ilustrativo de la plasticidad y la estímulo-dependencia de la diferenciación de monocitos de sangre periférica.

Las citoquinas son el estímulo para que los monocitos progresen hacia su diferenciación. La diferenciación in vitro de monocitos a **M** o **CD** es un ejemplo de dicha dependencia. (Fig. 11). Las citoquinas empleadas para generar **MDDC** in vitro, son las GM-CSF e IL-4, mientras que los **M** se diferencian con los GM-CSF o M-CSF. En humanos, IL-4 favorece la diferenciación a **CD** e impide la generación de **M**, mientras que la IL-6 limita su generación y promueve a los **M** dependientes del M-CSF.^[12] Los factores de transcripción, el PU.1 junto con C/EBP α , RUNX1 y AP-1, son críticos en la diferenciación monocítica, pues los ratones deficientes en PU.1 carecen de linaje mielo-monocítico, por su papel esencial en la regulación de los genes que codifican los receptores de los GM-CSF, M-CSF y G-CSF.

Las células dendríticas (CD):

Son células de linaje mieloide, que junto a los monocitos-**M** y a los **LB**, constituyen el grupo de las células presentadoras y procesadoras de los antígenos (**CPA**), y son el primer eslabón de la **RIA**. Estas **CPA** clivan a los antígenos (Ag) nativos en péptidos pequeños que son presentados en el contexto del CMH a los **LT** específicos. Las **CD** son importantes en la respuesta inmune primaria dado que son las únicas CPA que presentan Ag a los **LT** vírgenes. Los **LB** y los monocitos-**M** sólo presentan el Ag a los **LT** de memoria. Las **CD** son un componente minoritario de los mononucleares periféricos en humanos^[15], y son las estimuladoras más potentes en los cultivos leucocitarios mixtos y en la activación de los **LTCd8+**. Poseen moléculas de clase II del CMH, receptores para el Fc de las inmunoglobulinas, y para el factor C3 del sistema complemento. Las **CD** presentan antígenos exógenos en el contexto del CMH-II y CMH-I ("cross-priming"), e inducen respuestas inmunitarias primarias o promover tolerancia.⁽¹⁶⁾ Aún más, las **CD** determinan la polarización de los **LTh** naive hacia Th1 (productores de IFN- γ y eficaces en la eliminación de patógenos intracelulares), Th2 (productores de IL-4 y efectivos en la eliminación de patógenos extracelulares), Th17 (productores de IL-17 e implicados en respuestas autoinmunes) o **LT-reg** (o **LT** reguladores-inmunosupresores).^[17]

Las **CD** humanas se clasifican en 2 grupos: las **CD** mieloides y las **CD** plasmocitoides. Las mieloides (**CD11c+** **CD123-**), se distribuyen en todos los tejidos y se denominan por su localización en células de Langerhans (en epidermis y mucosas), **CD** dérmicas, **CD** tímicas, **CD** intersticiales, etc. Las **CD** mieloides circulantes son un 0.5% del total. Por el contrario, las **CD** plasmocitoides o linfoides (**CD11c-** **CD123+**) proceden de progenitores del timo y de áreas T de los órganos linfoides secundarios, y residen en ganglios linfáticos, bazo, timo, médula ósea y sangre periférica. Son mediadoras de la inmunidad anti-viral, produciendo cantidades de IFN- α al ser estimuladas. Las **CD** mieloides se originan en la médula ósea, que generan precursores circulantes cuya extravasación a los tejidos da lugar a las **CD** inmaduras residentes (**CDi**).

(Fig.12). Las células inmaduras, en ausencia de inflamación y de respuesta inmune, se encuentran "patrullando" los tejidos periféricos, el sistema sanguíneo y linfático y los órganos

linfoides secundarios. Las **CDi** responderán frente al reconocimiento de PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) o por receptores Fc y/o receptores del complemento. Se activarán al reconocer señales de alerta en el micro-ambiente, tales como mediadores de la respuesta inflamatoria (TNF- α , IL-1 β , PGE-2, etc.) o moléculas intracelulares provenientes de células necróticas o dañadas (HSP, ATP, UTP, ácido úrico). En respuesta a estas señales, las **CDs** se diferencian, madurando y convirtiéndose en (**CPA**) profesionales para activar a **LT** vírgenes. La maduración implica: 1): expresión de los receptores de quimioquinas y migración de las **CDs** a los órganos linfáticos, 2): baja notable de su capacidad endocítica, 3): aumento de la expresión de moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86, y, 4): incremento en la expresión de complejos péptido-antigénico/CMH clases I y II. Su capacidad fagocítica les permite captar y procesar antígenos que son unidos a las moléculas del CMH. La detección de “señales de peligro” por los receptores Toll (TLR) y proteínas NOD, hace que las **CD** maduren y migren a los órganos linfoides secundarios. En las áreas T de los ganglios linfáticos, las **CD** interactúan con los **LT** que portan un RcT específico para los antígenos que las **CD** capturaron en los tejidos de origen, iniciando así la **RIA**. Las **CD** maduras presentan antígenos a los **LT CD8+** y **CD4+**, y éstos a su vez regulan a otras células, como **LTCD8** y **LB** específicos de antígeno, o células inespecíficas como **M**, eosinófilos y **NKC**. Recientemente, se ha planteado la discusión si las **CD** no constituyen una población celular diferente de los **M**. Las **CDs** funcionan como nexo entre la **RIC** y la **RIA**. La producción de citoquinas contribuye a la homeostasis generando una estimulación eficiente. Las **CDs** producen citoquinas, que están vinculadas con funciones especializadas, siendo la IL-12 y el TNF- α , las más conspicuas. La IL-12 es esencial para la activación/maduración de las **CDs**, promoviendo la producción de IFN- γ de los **LT**, que juega un papel en la respuesta del tipo Th1. La habilidad de las **CDs** de producir o no IL-12, depende de muchos factores, siendo uno de ellos, la activación del CD40 por un estímulo microbiano.

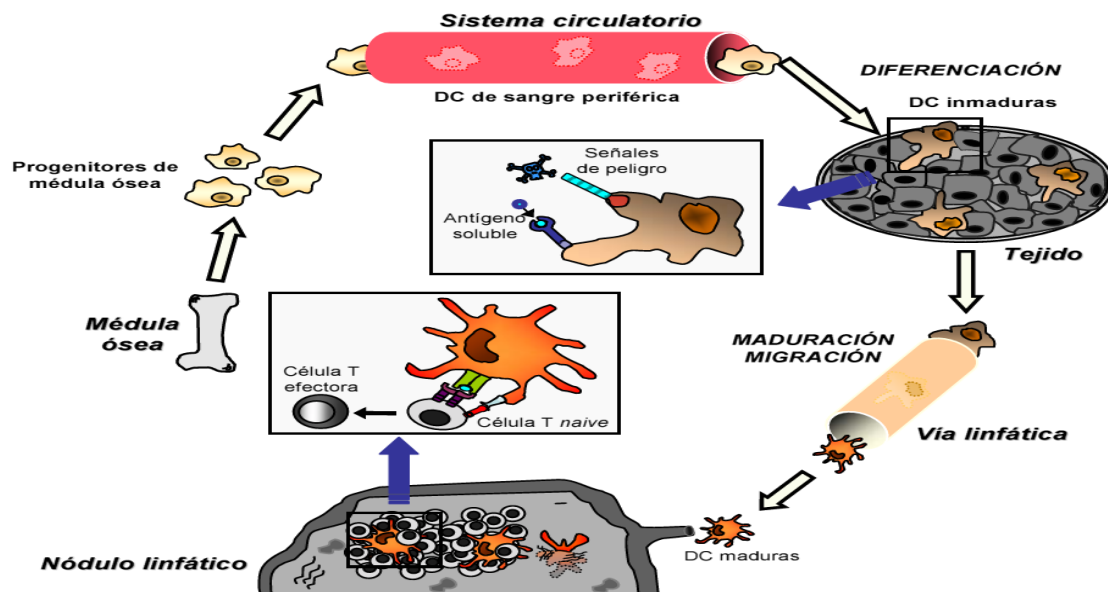


Fig. 12: - “Ciclo vital” de las **CD**. Se diferencian a partir de progenitores de médula ósea que llegan a los tejidos a través del sistema circulatorio, donde residen como **CD** inmaduras hasta que reciben señales que promueven su migración y maduración. Las **CD** maduras migran a los ganglios linfáticos, donde activan y polarizan a los **LT** naive hacia los tipos de células **T**.

La expresión de IL-12 por las **CDs** estimuladas es modulada por otras citoquinas, como, las IL-4, IL-10, IL-13, GM-CSF, IFN- γ , CCL2 y TGF- β . La activación de las **NKC** depende de la IL-12 de las **CDs**. Otras citoquinas de la familia de la IL-12, son las IL-23 e IL-27. El TNF- α es una citoquina pro-inflamatoria que actúa en las **RIC** y **RIA**. Su expresión por las **CDs** es una respuesta a la maduración / activación. Cumple una función tanto autócrina como parácrina,

pues induce la migración de las **CDs** desde los tejidos periféricos a los ganglios drenantes. Las **CDs** producen IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IFN- γ , y quimioquinas.

Como actúan las CDs en la respuesta inmune. La activación de los LT.

La interacción de las **CDs** con los **LT** vírgenes perfilan la respuesta hacia diferentes fenotipos e incluso inducen tolerancia de los **LT**. Esto dependerá de: 1) el subtipo de **CDs**, ; 2) los receptores estimulados; 3) el tipo y la dosis del antígeno, 4) la vía de inmunización y 5) el micro-ambiente circundante a la **CPA**. El **LT**, en contacto cercano con la **CDs** madura, requiere 2 señales para activarse: **señal 1**, dada por el reconocimiento del péptido antigénico presentado por el CMH I y II, a través del RcT, que involucra a sitios no polimórficos de las moléculas del CMH I y II por parte de los receptores de CD8 y CD4; la **señal 2**, es provista por moléculas co-estimuladoras en las **CDs** (CD80 y CD86), que interactúan con sus ligandos, expresados en el **LT** (CD28). Si bien las TNF- α e IL-12 no se mencionan como señales para una activación de las **CDs** hacia los **LT** vírgenes, son de importancia, para la maduración/activación de las **CDs**, como para la proliferación y activación de los **LT**. La presentación antigénica ocurre cuando un fragmento peptídico en el CMH-II, en la membrana de la **CD** contacta al **LT-CD4** virgen a través de su RcT para el antígeno. Las **CDs** son 100-300 veces más eficientes que cualquier otra célula presentadora de antígenos. Esta capacidad de las **CDs** mieloides para activar a los **LT**, in vivo, ha sido demostrada en experimentos de transferencia celular en ratones. Así, la reinyección en la almohadilla plantar o por vía intravenosa, de **CDs** estimuladas, in vitro, con antígenos proteicos, induce respuestas de **LT** específicas del antígeno. Si durante el proceso de maduración de **CDs** resulta ser inmunogénica, los clones T se diferenciarán a **LT** cooperadores o helper (Th) o **LT CD4**, y a **LT** citotóxico (CTL) o **LTCD8**. Estos actúan en la erradicación o control de las infecciones virales y en la respuesta inmune anti-tumoral. Los **LTh**, no constituyen una población homogénea y pueden diferenciarse en Th1, Th2 y Th17, a las cuales se ha sumado la población Th9.

Estas subpoblaciones difieren en la forma de inducción, los patrones de circulación, el perfil de citoquinas que producen y los mecanismos efectores que activan. Si la **CDs** produce IL-12 en ausencia de IL-4 o citoquinas inmunosupresoras, los **LTCD4** se diferenciarán hacia un perfil Th1, productores de IFN- γ , IL-2 y linfotóxina- β y son esenciales en la respuesta inmune mediada por células fagocíticas, frente a patógenos intra-vesiculares. El IFN- γ producido por los LTh1 estimula la actividad microbicida de las células fagocíticas, y la destrucción intracelular de los micro-organismos. El IFN- γ estimula la síntesis de anticuerpos IgG y fijadores del complemento, que facilitan la fagocitosis. Los LTh1, por la interacción CD40-CD40L (ligando), aumentan la capacidad de las **CDs** de estimular a los **LTCD8** facilitando la respuesta citotóxica.

En la diferenciación hacia un perfil Th2 es crítica la presencia de IL-4 (producida por las células **NKT** y los **Mc**), donde las **CDs** estimulan al **LTCD4** en ausencia de IL-12. Esta respuesta emerge por los helmintos y alérgenos, que producen una estimulación crónica de los **LT**, donde participan la IgE, los eosinófilos y los **Mc**. Los **LTCD4**-Th2 colaboran con los **LB** promoviendo la diferenciación a plasmocitos generadores de anticuerpos, importantes en la erradicación de helmintos y patógenos extracelulares. Las **CDs** inducen la diferenciación a **LT** de memoria que persistirán por largos períodos, para responder ante una re-exposición al antígeno. Así, en ausencia de colaboración de los **LT-CD4** con las **CDs**, la memoria en la respuesta **LT-CD8** se halla comprometida.

El papel de las CDs en la tolerancia central y periférica.

Las **CDs** son importantes en la inducción y mantenimiento de tolerancia, tanto central como periférica. En la primera, las **CDs** de la médula del timo, y las células del epitelio tímico poseen una función crítica en la selección negativa, presentando antígenos propios a los timocitos. Como la tolerancia central no es totalmente eficiente, la periférica es necesaria a los fines de complementarla. La tolerancia periférica implica procesos como: **1**) : la anergia clonal, donde la presentación del antígeno en el contexto de las moléculas del CMH induce una eficiente estimulación del RcT (**señal 1**), pero en ausencia de una co-estimulación suficiente (**señal 2**) de la **CDs**, producirá la inhibición de las funciones efectoras, y **2**) : **LT-reg** con

actividad supresora, generadas en el timo (**LT-reg**; CD4+CD25+Foxp3+) o en la periferia inducidas por las **CDs** tolerogénicas.

El otro comportamiento de las CDs.

Las **CDi** residentes en los tejidos periféricos migran hacia los ganglios linfáticos en ausencia de inflamación; estas células se presentan en forma inmadura, semi-madura o en estado estacionario. Las **CD**, semi-madura posee niveles reducidos de CD40, de CD80 y de CD86, una capacidad limitada de IL-12 y un aumento de IL-10. La presentación antigénica por parte de estas **CDs** conduce al silenciamiento del clon activado (anergia clonal). Las **CDs** semi-maduras inducen la expresión de las moléculas inhibitorias PD-1 (programmed-death-1) y CTLA-4 (cytotoxic-T-lymphocyte associated-antigen-4) para promover tolerancia periférica en los **LT-CD8**. Se acepta que la dosis de Ag, el linaje de las **CDs**, su estado de maduración y la estimulación de las **CDs** por derivados de patógenos y/o citoquinas, determinará si la respuesta de los **LT** será inmunogénica o tolerogénica. Otras **CDs** son las tolerogénicas (**CDT**), que en diferentes estadios de maduración y activación inhiben la respuesta inmune hacia perfiles inflamatorios, y facilitan la proliferación de **LT-reg** naturales o **LT-reg** inducibles CD4+CD25+Foxp3+ (**iTreg**), de los **LTh3** productores de TGF- β a nivel de mucosas y de las células **LT-r1** o T-regulatorias relevantes en auto-inmunidad, cáncer e infecciones, productoras de IL-10. Esta citoquina disminuye la expresión de las moléculas co-estimuladoras y de citoquinas pro-inflamatorias en la **CPA**, e inhibe a la IL-2 y al TNF- α en los **LTCD4**. Las **CD** tolerogénicas inducen tolerancia periférica por **LT-reg**, a través del TGF- β , por el contacto célula-célula o por ambos. Tanto las T-reg como el tumor, liberan IL-10, TGF- β , y expresan **IDO** (indolamina 2,3-dioxigenada), generando aun más **CDs** tolerogénicas, que si no poseen moléculas co-estimuladoras o expresan niveles del ligando PD-1 favorecen la diferenciación de **iT-reg**. Las **CDs** al endocitar cuerpos apoptóticos inducen niveles de TGF- β , que favorecen la diferenciación de **iT-reg**.

Las células tumorales expresan factores que estimulan a las **CDs** a producir TGF- β , y así, desvían su maduración y provocan la proliferación de las **T-reg**. Las quimioquinas de las células tumorales reclutan **T-reg** dentro del lecho tumoral. Las **T-reg** representan el 5-10% de los **LTCD4** en roedores, y expresan moléculas de superficie asociadas con la activación/memoria (CD25, CD45R-blow, CD62L, CD103, CTLA-4 y GITR), así como el factor de transcripción Foxp3. En condiciones normales, las **T-reg** están en estado de anergia, ya que no proliferan o producen IL-2 en respuesta al estímulo de los **LT**. Esta anergia puede ser eludida por la adición de altas dosis de IL-2, anti-CD28 o expuestas a las **CDs** maduras, que pueden inhibir la función inhibitoria de las **T-reg**. En los humanos, los **LT-reg** se acumulan en el tumor, ganglio drenante y sangre, al igual que en los tumores murinos. Los **LT-reg** impiden una respuesta por **LT** efectores por citoquinas supresoras, como la IL-10 y el TGF- β o por contacto célula-célula a través del CTLA-4. Este es el receptor inhibitorio principal de los **LT** activados y se une a B7.1 y B7.2 (CD80 y CD86) en **CDs** con mayor afinidad que su receptor de activación, CD28. Por lo tanto, las **T-reg** inhiben la expresión de las moléculas CD80 y CD86 vía CTLA-4 y/o LFA-1 (lymphocyte-function-associated-antigen-1). Por la vía del CTLA-4, las **T-reg** aumentan la actividad de la enzima **IDO** en las **CDs**. La disminución del triptófano, causa en los **LT CD4** un aumento en la producción de IL-10 y TGF- β , y consecuente supresión de la respuesta inmune.

Los macrófagos (M):

Actúan como primera defensa, al detectar y eliminar partículas “extrañas”(micro-organismos, macromoléculas tóxicas, células propias o tumorales dañadas o muertas) mediante fagocitosis o secreción de enzimas, citoquinas o producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS). Durante la **RIA** los **M** presentan antígenos a los **LT** en el contexto del **CMH-I** y/o **CMH-II**, y colaboran con la respuesta humoral en la eliminación de agentes extraños. Además, los **M** actúan en la reparación de heridas y resolución de la inflamación, reclutando otras células inflamatorias, remodelando la **MEC** y la **angiogénesis**.

Como se diferencian los M:

Se originan en células madre hematopoyéticas, y derivan de monocitos circulantes que se extravasan a los tejidos por citoquinas y quimioquinas^[14]. A pesar de ello, un 5 % de los **M** derivan de la división local de mononucleares en los tejidos^[42]. Las citoquinas que determinan

su supervivencia, diferenciación y quimiotaxis son el GM-CSF, el M-CSF y la IL-3. El M-CSF es sintetizado por los **M**, células endoteliales, fibroblastos, osteoblastos y células del estroma, y su concentración en el suero oscila entre de 3-8 ng/ml. Su producción es inducida por la activación de células hematopoyéticas y fibroblastos por los GM-CSF, TNF α , IL-1 e IFN- γ . La síntesis del M-CSF es regulada de manera tejido-específica, y sus niveles son elevados en estados de inmunosupresión (embarazo, tumores), siendo importante en la tolerancia materna hacia el embrión^[47]. El GM-CSF, es fundamental en el desarrollo mieloide, ya que los ratones M-CSF^{-/-} exhiben una generación deficiente de **M**, mientras que los ratones GM-CSF^{-/-} sólo muestran alterada la maduración de **M** alveolares. El receptor de M-CSF de alta afinidad (CSF-1R, M-CSFR, c-fms, CD115) se expresa en monocitos, **CD**, **M** y sus precursores. El GM-CSF es producido por los **LT**, **LB**, **M**, **Mc**, eosinófilos, **PMN** y células endoteliales^[43]. En condiciones normales, el GM-CSF tiene una concentración sérica de 20-100 pg./ml, y, es producido por las células tumorales, requiriendo activación de las células productoras. Promueve la viabilidad, proliferación y maduración de los **PMN**, eosinófilos y **M**, y sus funciones dependen de su concentración. Sus efectos biológicos están mediados por un receptor que, a diferencia del receptor homo-dimérico del M-CSF (M-CSFR), está compuesto por una cadena α de unión a GM-CSF, y una cadena β necesaria para la transducción de señales^[51].

Los **M** generados en presencia de los GM-CSF y M-CSF:

Los GM-CSF y M-CSF presentan una modulación cruzada de sus actividades funcionales. Mientras que el M-CSF aumenta la generación de los **M** en presencia de bajos niveles del GM-CSF, altas concentraciones de éste, impiden el desarrollo de los **M** mediado por el M-CSF, debido a la acción inhibitoria del GM-CSF sobre la expresión del M-CSFR. Aunque los **M** humanos derivados de monocitos (MDM), diferenciados en presencia de los GM-CSF o M-CSF in vitro, se consideran equivalentes a los **M** residentes en condiciones homeostáticas^[9], ambas citoquinas se usan en la generación in vitro de MDM, dando lugar a poblaciones fenotípica y funcionalmente diferentes.^[14] En presencia del GM-CSF se generan **M**, denominados **M1**, que producen citoquinas pro-inflamatorias (IL-23, IL-12, IL-1 β , IL-6, TNF α) en respuesta a Mycobacterium, y promueven inmunidad del tipo Th1 (pro-Th1). Por otro lado, los inducidos por el M-CSF se llaman **M2**, y secretan IL-10, inhiben las respuestas Th1, e inducen tolerancia. Los **M2** actúan como moduladores de la auto-inmunidad, pues inducen **LT-reg** e inhiben la diferenciación de **LTh1** y **LTh17**.^[58] Así, los **M1** y **M2** juegan papeles opuestos durante la respuesta inmune, y son considerados como **M** pro- y anti-inflamatorios. (Fig.13). Igualmente, los GM-CSF y M-CSF se emplean para la generación “in vitro” de **M** a partir de precursores de la médula ósea del ratón, y sus propiedades pro- y anti-inflamatorias se ajustan a las de los **M1** y **M2** derivados de monocitos humanos^[59, 60].

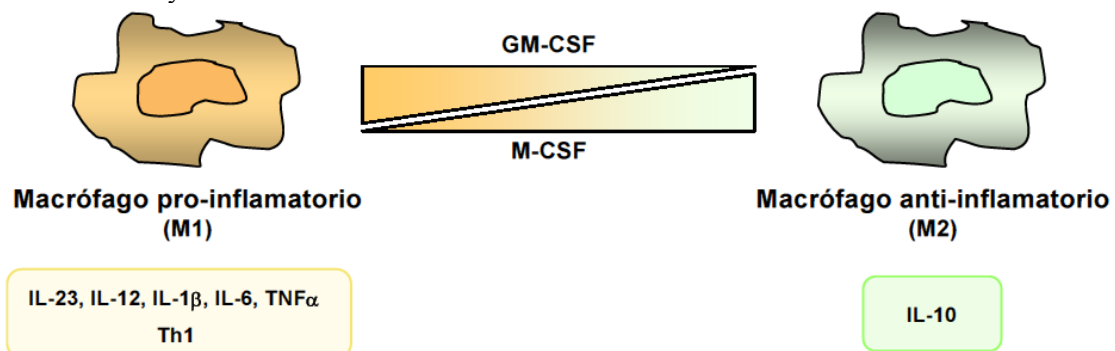


Fig. 13.- Macrófagos diferenciados con GM-CSF y M-CSF. Esquema ilustrativo de los macrófagos generados en presencia de GM-CSF (**M1** o pro-inflamatorios) o de M-CSF (**M2** o anti-inflamatorios) y sus diferencias en la respuesta inmune.

Las características fenotípicas y funciones de los **M1** y **M2**:

Se denomina activación clásica del **M** a la inducida por el IFN- γ , el TNF- α , o a ligandos de los receptores Toll (TLR) (CpG DNA, poli (I:C), LPS, péptido-glicano y HSP de 60 y 70 kDa).

Los **M** activados clásicamente, o **CAM \emptyset** , **M1**, son capaces de detonar mecanismos como la

muerte de parásitos intracelulares, la lisis de células tumorales, la producción y secreción de las IL-1 β e IL-6, los altos niveles de IL-12, IL-23, IL-18, TNF- α , CCL3 y CCL9, y los bajos niveles de IL-10 en respuesta al *Mycobacterium*, con fuerte acción del LTh1 y CXCL10, producción de ROS, generación de ON en ratas, cambios fago-lisosomales y aumento en la expresión del CMH-II y del CD86 y presentación antigénica al LTh1. (Fig. 14).

El IFN- γ producido por los LTh1, LT-CD8+ y NKC, otorga a los M capacidad citotóxica, microbicida y anti-proliferativa. No hay una definición clara de “activación alternativa,” porque la IL-4 generaría un fenotipo de M activado olvidando a los inducidos por las IL-13 e IL-10, los glucocorticoides y el TGF- β , que algunos autores los consideran como “activadores alternativos”. In vitro, los efectos, de extensión y dirección (activantes o desactivantes), están influenciados por la estimulación (señales y concentraciones del tratamiento), la especie, el tejido, y el estado de diferenciación. Algunos atribuyen la desactivación a la IL-10 y al TGF- β , pero otros creen que estas citoquinas no son sólo inhibitorias, pues el análisis de la expresión génica evidenció que poseen genes compatibles con el perfil alternativo. Es importante notar que el IFN- γ y la IL-4 son los agentes ejecutores de efectos antagonistas sobre los M: la expresión de los CD16, CD32 y CD64 es inducida por el IFN- γ , pero inhibida por IL-4; la expresión del MMR receptor de manosa y la 15-lipooxigenasa es inducida por la IL-4, pero inhibida por el IFN- γ . La expresión y síntesis de las citoquinas pro-inflamatorias como las IL-1, IL-6 y el TNF- α , son inhibidos por la IL-4, pero inducidos por el IFN- γ . Definiendo una nomenclatura para los “activados alternativamente”, M2, MØ2, tipo II, (AAMØ) se propone el uso de M2 como nombre genérico para las formas alternativas de activación que, además, comparten propiedades funcionales involucradas en respuestas tipo II, como inmuno-regulación y remodelación del tejido. Se propone denominar como M2a a la inducida por IL-4 e IL-13, M2b a la promovida por la exposición a complejos inmunes y agonistas de los TLRs y M2c a la estimulada por la IL-10 y los glucocorticoides. Esta clasificación no incluye el TGF- β como activador alternativo, pero induciría el fenotipo M2c. No se sabe si un M al ser estimulado adquiere un fenotipo que conserva durante su vida funcional, caso en el cual existirían in vivo subpoblaciones de M con estados de activación definidos, o si su patrón de activaciones errático por los estímulos que encuentre, lo que generaría un amplio rango de fenotipos no estables representantes de una continua activación.

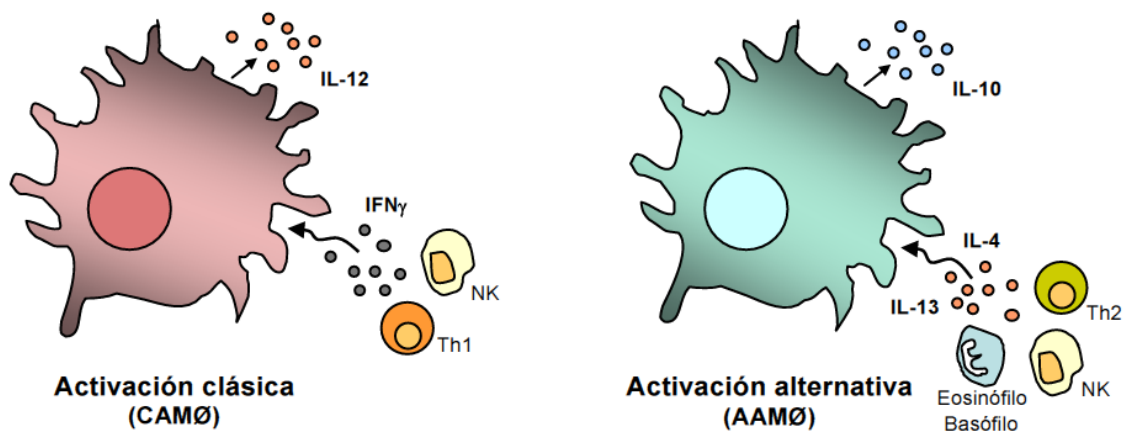


Fig 14.- Tipos de activación de los macrófagos. Representación esquemática de la activación mediante estimulación con IFN- γ (activación clásica) o citoquinas Th2 como IL-4 e IL-13 (activación alternativa).

Las vivencias inflamatorias y citotóxicas de los M activados apoyaron la idea de que sólo las citoquinas Th1 promovían su activación, mientras que las del tipo Th2 las bloqueaban o desactivaban. Pero, además de inhibir respuestas Th1, las Th2 aumentan las funciones de presentación antigénica, reparación tisular y capacidad endocítica. Así, los que inhiben la generación y actividad de los CAMØ (IL-4, IL-13, IL-10 y el TGF- β , glucocorticoides y la vitamina D3), e incluso las células apoptóticas, se responsabilizaron de una forma “alternativa” de activación (AAMØ, M2). Estos, producen la IL-10 y el TGF β , y muy poca IL-12 bajo estimulación, y presentan funciones inmunosupresoras e inhiben la proliferación de LT. Las diferencias en las funciones de CAMØ y AAMØ se demostraron en ensayos in vitro, donde

los **AAMØ** inducen proliferación celular y deposición de colágeno de fibroblastos, e inhiben la proliferación de **LT** inducida por mitógenos. Al mismo tiempo, los **AAMØ** contribuyen a la vascularización in vivo y exhiben actividad angiogénica in vitro, similar a la de MDDC maduras en presencia de la IL-10, el TGF- β , y glucocorticoides. Los **AAMØ** activados por la IL-4 son esenciales en la eliminación y control de la infección por patógenos extra-celulares. La sigla **AAMØ** fue propuesta para identificar a los activados por las IL-4/IL-13, que sería una activación “no clásica.” (Fig.15).

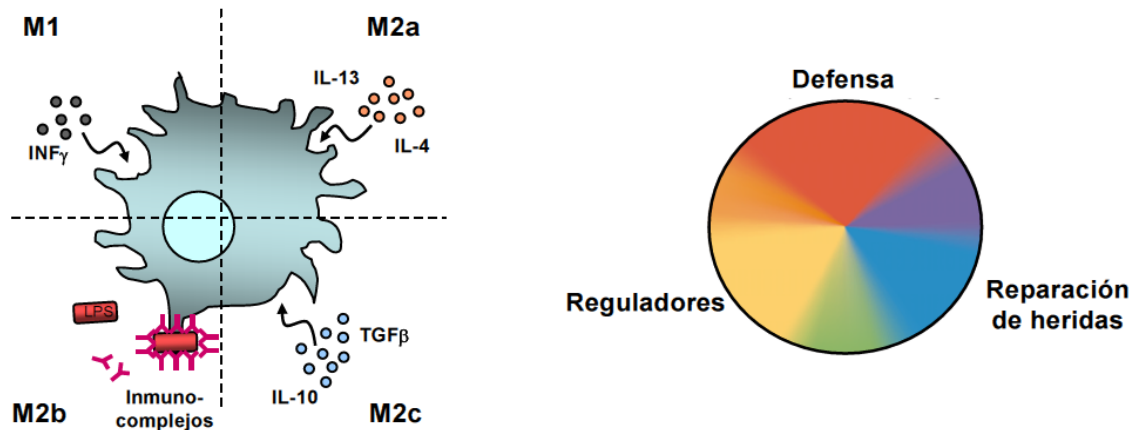


Fig. 15.- Propuestas de clasificación de los macrófagos activados. Los macrófagos polarizados se clasifican en función del estímulo de activación (izquierda) o de su función efectora primordial (derecha). Los tres colores primarios (rojo, amarillo, azul) representan las 3 poblaciones definidas, mientras que los colores secundarios representan macrófagos con funciones intermedias.

Los **M2a** y **M2b** exhiben niveles de expresión de moléculas de adhesión (CD11a, CD54, CD58) y co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86) similares a los **CAMØ**, la activación alternativa en respuesta a las IL-4 e IL-13, con un repertorio de receptores fagocitarios característicos. Estos receptores dotan a los **M2a** de actividades endo-citotóxicas y fagocíticas, y son destacables:

- 1) el receptor de manosa (MR1, CD206), cuya señalización intracelular está asociada a la producción de IL-10, la expresión de IL-1Ra, y a la inhibición de la producción de IL-12 en respuesta a la endotoxina;
- 2) el receptor “scavenger”-1 (MSR1, CD204), con un papel en el reconocimiento y eliminación de lipoproteínas;
- 3) el receptor de β -glucanos-Dectin-1, con especificidad por glucanos β -1,3 y β -1,6, de hongos y bacterias, y que colabora con el TLR2 en la respuesta anti-fúngica; y
- 4) DC-SIGN, con un amplio espectro de reconocimiento de patógenos. (Fig.16).

Otros marcadores de la activación alternativa son el DCIR y el DCL-1, el CD23 y el receptor “scavenger” CD163.

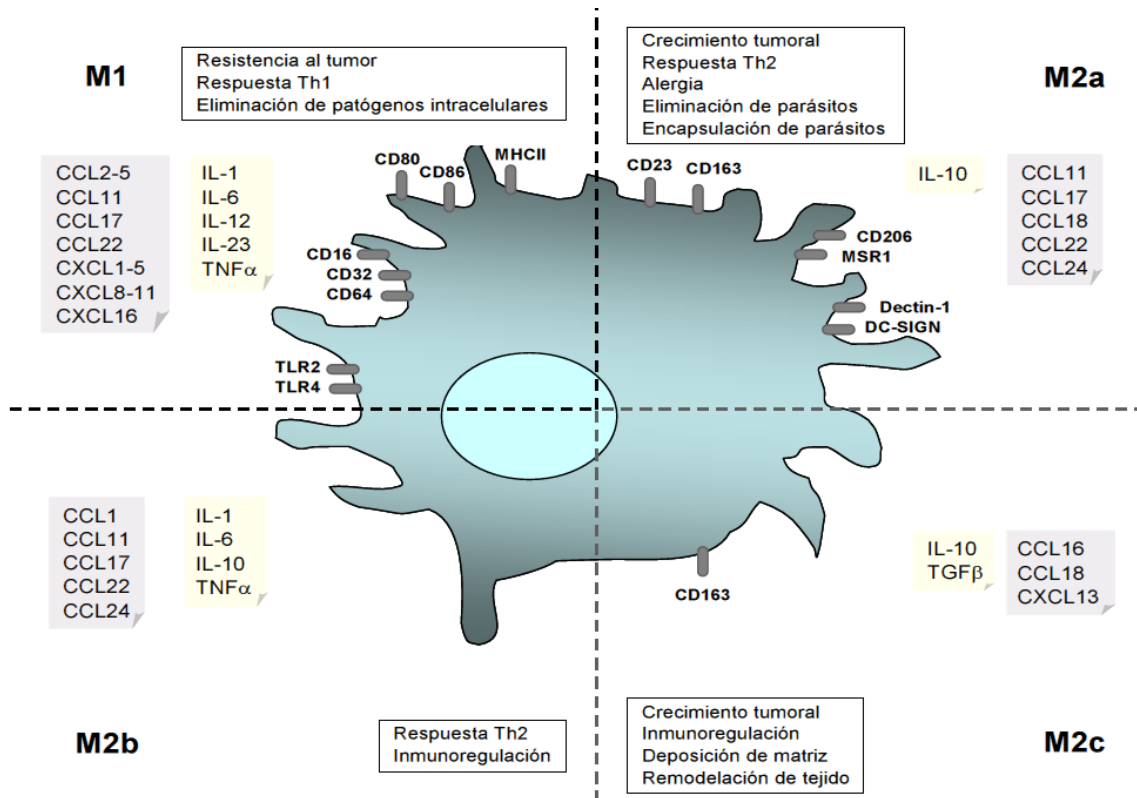


Fig. 16.- Características fenotípicas y funcionales de macrófagos polarizados en función del estímulo de activación. Se representan las principales características fenotípicas (secreción de quimioquinas (cuadro gris) y citoquinas (cuadro más claro), y expresión de receptores de membrana), así como las características funcionales que diferencian los diversos estadios de polarización de los macrófagos.

La expresión de genes que controlan el metabolismo celular se utiliza para discernir entre los diferentes tipos de activación. Así, la expresión de genes que participan en el metabolismo de la arginina, diferencia **CAM \emptyset** y **AAM \emptyset** en ratón, pero no en los humanos. La arginasa 1 (Arg1) es un marcador prototípico de activación alternativa, pues su expresión es dependiente de IL-4/IL-13, mientras que la óxido nítrico sintetasa (iNOS) es inducida por el IFN- γ . Los **CAM \emptyset** metabolizan arginina vía iNOS, generando óxido nítrico, que es microbicida. La expresión de la Arg1 permite a los **AAM \emptyset** producir poliaminas y prolina, esenciales para la proliferación celular y la producción de colágeno. Otros marcadores de **AAM \emptyset** en ratón, sin homólogos en humanos, son los miembros de la familia quitinasa Ym1 y Ym2 (Chi-313 y Chi-314), y Fizz-1, involucrado en el metabolismo de los lípidos.^[99] La polarización hacia un fenotipo alternativo asocia un aumento de genes relacionados con el metabolismo de lípidos, implicados en la captación y oxidación de los ácidos grasos.^[100] Así, Fizz-1, Stab-1 y la lipoxigenasa ALOX-15 poseen mayor expresión en los **AAM \emptyset** .^[77, 93] A diferencia de **AAM \emptyset** , los **CAM \emptyset** sobre-expresan genes involucrados en el metabolismo del colesterol como ABCA-1 y apo-lipoproteínas L (APOL1-3,6), involucrados en su transporte y en el desarrollo de aterosclerosis. Los genes que codifican para las enzimas del metabolismo lipídico (eicosanoides, leucotrienos, esfingosina y ceramida) se expresan diferente entre **CAM \emptyset** y **AAM \emptyset** . La expresión de la COX-2 está asociada con el metabolismo del ácido araquidónico en **CAM \emptyset** , mientras que las esfingosina y ceramida-quinasa, que catalizan el equilibrio ceramida-esfingosina, están expresadas en **CAM \emptyset** y **AAM \emptyset** .^[93] El receptor PPAR- γ , y uno de sus genes diana (FABP-4), se incluyen en los genes con mayor expresión en los **AAM \emptyset** , ya que IL-4 es un inductor de este receptor y de sus activadores metabólicos. Los ratones deficientes en PPAR- γ tienen disminuidos los niveles del ARNm y la actividad de la Arg1, no presentan **M** con fenotipo alternativo y, por su papel en el metabolismo graso, son más obesos^[103]. PPAR- γ es un regulador negativo de la activación clásica del **M**^[104] y regula las respuestas dependientes de la IL-4, para mantener el fenotipo alternativo en los **M** activados^[103]. La activación de los

factores NFκB, STAT-1 y AP-1 son esenciales para la polarización clásica del **M**^[105]. Estímulos inflamatorios como LPS, activan rutas de señalización dependientes del MyD88, que llevan a la activación de NFκB y AP-1, y rutas independientes de este adaptador intracelular, con la activación de IRF3 y STAT-1^[106]. Por el contrario, la IL-10 liberada por los **AAMØ** inhibe la activación del NFκB y mantiene su fenotipo inmunosupresor^[107-109]. De hecho, la pérdida de expresión de IRF3, STAT-1 y NFκB en los **M** de médula ósea del ratón está asociada con la supresión de la polarización pro-inflamatoria^[110]. Los **M2**, son anti-inflamatorios, inhiben al IFN-γ, antagonizan sus respuestas, incluida la activación del **M1**, y son inducidos por otros mediadores.

Los **M2a**.

Son promovidos por las IL-4 e IL-13, que inducen fenotipos solapados con una estructura tridimensional similar, y sus receptores comparten la cadena IL-4Rα. La unión de las IL-4 e IL-13 causa la activación de JAK1 y Tyk2, la fosforilación de tirosinas en la cadena IL-4Rα, el reclutamiento del STAT-6, su fosforilación, dimerización, translocación al núcleo y activación transcripcional. El STAT-6 secuestra moléculas co-activadoras de STAT-1 y NFκB, suprimiendo la activación de genes inducidos por LPS e IFN-γ. Hay diferencias en la respuesta a las IL-4 e IL-13 acorde al grado de diferenciación de los mononucleares, pues la configuración de sus receptores varía en los heterodímeros que forman la cadena del IL-4Ra con las cadenas γ del IL-13Rα1, que afecta la activación de STAT-6. Las IL-4 e IL-13 activan la vía de señalización del sustrato del receptor de insulina 2 (IRS2) y disminuyen la expresión de los CD14, CD64, CD32 y CD16, aumentan el CD23, incrementan la expresión de las subunidades de integrinas y receptores de complemento CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD49e (VLA5), de la amino-peptidasa N (CD13) y del CMH-II, para la presentación antigénica. La IL-13 regula la expresión de los genes que codifican a CD1-b, -c, -e y una lectina tipo C (CLEC-SF6), lo que puede favorecer la presentación antigénica de lípidos y glicolípidos.

Las IL-4 e IL-13 estimulan la expresión en membrana y la actividad de receptores no opsónicos, como el MMR, y el receptor de β-glucano, dectina-1, pero regulan negativamente la expresión de CD163 en monocitos, favoreciendo el reconocimiento de carbohidratos de microorganismos y disminuyendo el de cuerpos apoptóticos. Ambas citoquinas aumentan la expresión in vitro de las lectinas 1 y 2 tipo C de galactosa (mMGL1 y mMGL2) en **M** peritoneales inducidos con tioglicolato. En monocitos humanos, IL-4 regula la expresión de lectinas hMGL, lo que favorece el reconocimiento de glicoproteínas galactosiladas en las células cancerosas y de compuestos glicosilados de la superficie de helmintos.

En los **M2a** hay una fuerte regulación del sistema IL-1, lo que contrarresta sus acciones pro-inflamatorias. Las IL-4 e IL-13 incrementan la expresión del receptor IL-1R-I y del pseudo-receptor, IL-1R-II, inducen la producción del receptor IL-1ra e inhiben la producción de IL-1, como efecto de la regulación negativa sobre la caspasa-1 y la **MMP9**, enzimas que procesan la pro-IL-1β. La producción de las IL-1α/β, IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL-12p35, IL-12p40, MIP-1α, GM-CSF, G-CSF, PGE2, IFN-α y TNF-α, promovidas por los LPS es inhibida por las IL-4 e IL-13. El pre-tratamiento de mononucleares de sangre periférica con las IL-4 e IL-13 aumenta la síntesis de IL-12p35, IL-12p40 y de TNF-α, por la estimulación con LPS o *Staphylococcus aureus*. Las IL-4 e IL-13 incrementan la producción de CCL17, CCL22, CCL18 y los receptores de IL-8, CXCR1 y CXCR2 en monocitos⁽¹¹³⁾, e inducen la producción de CCL24 en **M**, pero la inhiben en monocitos. La IL-4, más no la IL-13, regula la expresión de CCL2 en ratas, y la de CCL13 en monocitos y **M** humanos e inhibe las quimioquinas de los **M1**, como las CXCL10, CCL5, CXCL9, CCL3 y CCL4.⁽¹⁰⁴⁾

Este sub-grupo de quimioquinas se asocia con respuestas Th2, con la remodelación y reparación tisular, alergia, resistencia a los helmintos y la progresión tumoral. La IL-4 inactiva el estallido respiratorio, estimula al activador tisular del plasminógeno, suprime la función pro-coagulante, y limita la formación de fibrina. Las IL-4 e IL-13 modulan a la 15-lipoxigenasa, inhiben la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, la expresión de la óxido nítrico sintetasa (NOS2), la transcripción de la IL-2, como inhibición indirecta de la proliferación de LT por la IL-4^(123,125).

También estimulan la expresión de Arg1 in vitro, anulando el sustrato de NOS2 e inhibiendo la liberación de ON. Los productores de Arg1 actúan en procesos de reparación

tisular, fibrogénicos, en la síntesis del colágeno y son anti-inflamatorios por la producción de poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) que inhiben a la NOS2 y la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias en monocitos humanos. ^(128,129,131-134)

La regulación del balance entre los NOS2-Arg1, sugiere que los niveles de ON y del Arg1 en poblaciones de **M** reflejaría su estado de activación ⁽¹³⁵⁾ y aunque esta dicotomía sirve en ratas, en humanos las IL-4 e IL-13 no inducen al Arg1, ni de la de su homólogo Ym1, por eso estos marcadores no se usan para diferenciar **M1** y **M2a**. La IL-21 y su receptor (IL21R) son amplificadores de los **M2a**. El IL-21R posee una alta homología con el IL-4R, y los animales deficientes en IL21R infectados con *Schistosoma mansoni* y *Nippostrongylus brasiliensis* poseen una leve inflamación granulomatosa y fibrosis hepática, con bajas IL-4 e IL-3.

Los **M2b**.

Denominados tipo II, se generan por la exposición a complejos inmunes, agonistas del CD64 opsonizado con IgG con eritrocitos, OVA y *Haemophilus influenzae* muerto por calor, como primera señal, y a ligandos de los TLRs, como los LPS o el ácido lipoteicoico (LTA), y del CD40 (aCD40) ó CD44 (como el ácido hialurónico de bajo peso molecular), como segunda señal estimuladora que produce citoquinas. Los **M2b** son muy diferentes a los **M2a** y **M2c**, por la expresión de IL-10 y poca IL-12, los altos niveles del TNF- α , las IL-1 β e IL-6, no expresan Arg1 y, sólo expresan la quimioquina, CCL1, que recluta **LT-reg** y eosinófilos. Expresan los CD11a, CD40, CD54, CD58, CD80 y CD86, como los **M2a** y **M1**, y moléculas del CMH-II.

Promueven la diferenciación Th2, exacerbando patologías como el asma, las infecciones por helmintos, la muerte y encapsulación de parásitos, y el cambio de isotipode IgG \rightarrow IgG1.

Los **M2b** rescatan a los ratones de la endotoxemia por los LPS, por la IL-10. En ratas, se vio similitud mayor entre los **M2b** y los **M1**, que entre los **M2a** y **M2b**, aunque los patrones de IL-12 e IL-10 fueran diferentes. Los **M2b** y los **M2a** producen mucho ON y escaso Arg1, regulan al CD86, y son **CPA** eficientes. Se caracterizaron 2 marcadores bioquímicos que se usan para identificar a los **M2b** en el tejido: la esfingosina-quinasa 1 (SPHK1), que cataliza a la esfingosina-1-fosfato que regula flujos de Ca²⁺, y la molécula co-estimuladora LIGHT, o TNFSF14, que activa a los **LT** a través de los receptores TR2 y TR6.

Los **M2c**.

Aunque la IL-10, el TGF- β y los glucocorticoides son inductores del **M2c**, no tienen igual señalización intracelular y regulación génica. La IL-10 inhibe a las citoquinas pro-inflamatorias, a la liberación del ON y del ROS, y a las actividades anti-microbianas. Los glucocorticoides frenan la síntesis de las IL-6, IL-1 β , TNF- α y PGE-2, y sinergizan con la IL-4. El TGF- β es dual en la modulación del **M2c**, ya que actúa como activador pro-inflamatorio estimulando la transcripción de los PDGF, FGF β , IL-6, TNF- α e IL-1 β ⁽¹⁵⁵⁻¹⁶⁰⁾, mientras que en otras inhibe la producción del TNF- α , IL-1 α , IL-1 β y GM-CSF ^(33,161), y también antagoniza la producción de ROS y RNIS. Esto depende de la diferenciación del mononuclear; en estadios tempranos de la inflamación, el TGF- β actúa como pro-inflamatorio por la activación de monocitos no activados; en la resolución de la inflamación predominan sus acciones anti-inflamatorias debido a que los monocitos diferenciados a **M** regulan negativamente la expresión del TGF β -R y disminuyen su sensibilidad al TGF- β . La IL-10 induce la expresión de quimioquinas como las CCL2 ⁽¹⁶⁴⁾, CCL12 ⁽¹⁶⁵⁾, CCL18 ⁽¹⁶⁶⁾, CCL16 ⁽¹⁶⁷⁾, en monocitos y **M** humanos, y con los LPS la de la CXCL13 en los monocitos. Regula la producción de los receptores de las quimioquinas CCR1, CCR2 y CCR5. La IL-10 inhibe la expresión de las CCL22 ⁽¹¹⁰⁾, CXCL8, y, como la IL-4, la de las CXCL10, CCL5, CXCL9, CCL3 y CCL4, que inducen los TLRs y el IFN- γ .

Los glucocorticoides suprimen a la CXCL10, en los **M** tratados con IFN- γ a través de la inhibición del STAT-1, ⁽¹⁷²⁾ modulan negativamente la expresión de las CCL13, CCL17 y CCL18, aunque sinergizan con la IL-4. La IL-10, el TGF- β y los glucocorticoides inhiben a la CCL2 inducida por los LPS y la IL-1 β . El TGF- β inhibe la liberación de la CCL3, por regulación negativa de la c-Jun/AP-1 ^(155,175), pero induce una respuesta quimio-atractiva en los monocitos, promoviendo su reclutamiento a los sitios de inflamación. La IL-10 y los glucocorticoides regulan negativamente la expresión del CMH-II, el CD80 y el CD86, atenuando la presentación antigénica. No estimula la expresión ni del CD32 ni del CD16, si del

CD64, y de la regulación negativa de los 3 RFcypromovida por IL-4. El TGF- β induce la expresión del CD16, lo que permite el reconocimiento de la IgG unida, favoreciendo la fagocitosis y remoción de restos celulares. Los glucocorticoides, al contrario de la IL-4, inhiben la expresión del CD23 y del activador tisular del plasminógeno, que induce la deposición de la fibrina en la inflamación; sinergizan con esta citoquina la regulación de la estabilina-1 y de su receptor SI-CLP. El TGF- β incrementa las integrinas como LFA-1, el ligando endotelial del ICAM-1, receptores $\alpha 3\beta 1$ que unen el monocito a la fibronectina, colágeno y laminina, y del receptor de fibronectina $\alpha 5\beta 1$. El TGF- β y la IL-10 regulan la expresión del IL-3R en los monocitos humanos. La dexametasona incrementa la expresión y actividad del MMR, pero la IL-10 tiene efectos variables sobre éste receptor y reduce su endocitosis. Por otro lado, ambos regulan positivamente la expresión del CD163, más en **M** que en monocitos, y la del receptor hMARCO, pero disminuyen la expresión y la actividad de la dectina-1; el TGF- β inhibe la expresión del CD163 mientras que induce la de la dectina-1. La IL-10 inhibe la expresión de los IL-1RI e IL-1RII en monocitos estimulados con las IL-4 e IL-13 e induce la del IL-1R α , que antagoniza la dexametasona. El TGF- β induce la síntesis y expresión de la IL-1 β y luego la del IL-1R α en monocitos humanos. Además de la liberación del IL-1R α , la actividad anti-inflamatoria de la IL-10 aumenta por la liberación de receptores del TNF- α como el TNF-R2. La IL-10 incrementa los niveles totales de los Arg1 y 2 en mononucleares. El TGF- β induce la síntesis y secreción de las MMP2 y MMP9, que disuelven la membrana vascular basal, que posee colágeno tipo IV, fibronectina y laminina. La fagocitosis de las células apoptóticas genera **M2c**.⁽²⁰³⁾ La unión y/o ingestión de **PMN** apoptóticos inhibe la producción de las IL-1 α , IL-8, IL-10, GM-CSF y TNF- β , e incrementa los niveles de los TGF- β 1, PGE2 y del PAF en los MDM humanos estimulados con LPS, involucrados en la inhibición de la producción de citoquinas.⁽¹⁶¹⁾ El TGF- β 1 liberado por **M**, que fagocitaron células apoptóticas tiene efectos anti-inflamatorios en peritoneo y pulmones⁽²⁰⁶⁾. Los efectos supresores de los glucocorticoides, las IL-10, IL-4 y IL-13, en la expresión de citoquinas Th1, la inflamación y la activación inmune se explican por la regulación negativa de los NF- κ B y STAT-1^(56,177). La inhibición del NF- κ B se explica por la activación de la leucina y glucocorticoides que suprimen funciones del AP-1 e inhiben la expresión de TLRs⁽¹⁷⁷⁾.

Los **M** asociados a los tumores (**MAT**):

Son un ejemplo de la plasticidad de la activación de los **M**. En los tumores hay una infiltración de **PMN**, cuyo estado de maduración determina su influencia sobre el tumor. Los **M** son mayoritarios en el infiltrado tumoral^[112], y son un ejemplo de activación alternativa patológica de los **M**. Los **MAT** provienen de monocitos de sangre periférica reclutados hacia el tumor, por factores como los M-CSF, MCP-1, VEGF y Angiopoietina-2.^[113-117] (Fig.17).

La diferenciación intra-tumoral da lugar a **M** con niveles reducidos de receptores de quimioquinas, lo que evita su migración desde los tejidos tumorales. Los **MAT** regulan pasos en el desarrollo del tumor, y su abundancia se correlaciona con la progresión tumoral, remodelación de la MEC, la proliferación, migración e invasión de las células cancerosas, e inhibición de la **RIA** (inmunosupresión).^[117] La elevada densidad de **M** en las metástasis, y ganglios linfoides regionales, favorece el crecimiento del tumor.^[113] El fenotipo y función de los **MAT** está dado por factores micro-ambientales del tumor^[118, 119] (Fig 7). Citoquinas y factores de crecimiento del tumor (los IL-10, TGF- β , M-CSF, VEGF, MCP-1) aumentan la generación de **M** y reducen la diferenciación de las **CD** y, determinan los niveles de CPA en el tumor y en los tejidos cercanos. Junto con el TGF- β , el M-CSF es el responsable del ambiente inmunosupresor intra-tumoral^[111].

En el carcinoma mamario espontáneo, los ratones M-CSF-/- presentan una progresión tumoral más lenta que los ratones normales^[120]. La IL-10 del tumor induce en los **MAT** funciones asociadas a los **M2**. Por ello, los **MAT** sintetizan pocas moléculas anti-tumorales (los TNF α , IL-1, ROS, NO) y citoquinas (las IL-12, IL-1 β , TNF α , IL-6), y no activan al NF κ B.^[111]

La producción de mediadores inmunosupresores (las prostaglandinas, IL-10 y TGF- β) permite a los **MAT** inducir la diferenciación de **LT-reg**, que suprimen la actividad de los **LT** efectores, favoreciendo el crecimiento tumoral. La actividad angiogénica del tumor es favorecida por la acumulación de **MAT** en regiones de hipoxia poco vascularizadas, a las que se adaptan por los

factores HIF-1 y HIF-2 ^[125]. Los **MAT** promueven **angiogénesis** por los factores de crecimiento (VEGF, FGF y HGF), metalo-proteasas (**MMP-9**) y el activador de plasminógeno (uPA), que degradan la **MEC**, facilitando la migración e invasión de las células tumorales. (Fig. 7).

Los marcadores de los **M2** se observan en los **MAT** procedentes del fibrosarcoma y del linfoma con el fenotipo alternativo de estos **M**.^[127, 128] En ese mismo modelo se observan también altos niveles de quimioquinas Th1, como las CCL5, CXCL9 y CXCL10, lo que sugiere un cambio de las propiedades de los **M2**^[127]. Los **MAT** son **M** con fenotipo anti-inflamatorio por sus citoquinas y la deficiente activación del NFκB, contribuyen a la **angiogénesis** y crecimiento tumoral por la secreción de mediadores de los **M1** y reguladores del NFκB, como los TNFα, IL-1β y **MMP-9**.

En un estado tumoral avanzado, los **MAT** de ratón expresan NOS2 y Arg1 que, implicados en el metabolismo de la arginina, producen liberación de NO y aumento en la producción de ROS (O₂- y H₂O₂) y RNS (ONOO-), deteniendo la proliferación y, provocando la muerte del **LT**.^[116] Los **MAT** expresan características pro-inflamatorias y supresoras, con un equilibrio en su polarización fenotípica **M1** y **M2**. Esta versatilidad de los **TAM** es debida al dinamismo del micro-ambiente tumoral, y está regulada por mecanismos moleculares, como la modulación del NFκB o las vías de señalización activadas por la hipoxia. En los casos que la presencia de **MAT** se correlaciona con un buen pronóstico del tumor, el GM-CSF podría ser responsable de la adquisición de un fenotipo citotóxico por los **M** intra-tumorales.^[130]

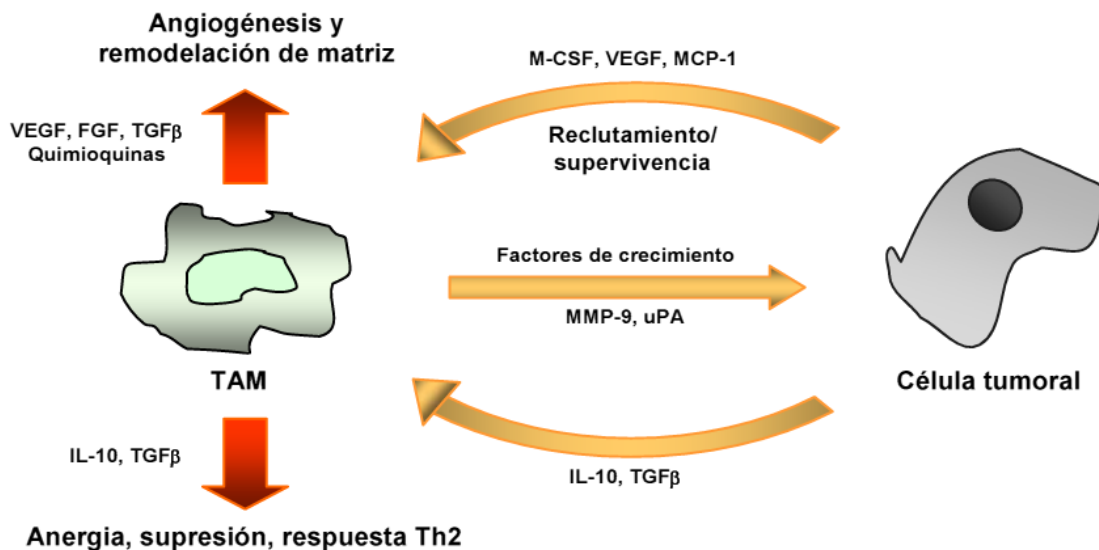


Fig.17.- Interacción entre macrófagos y células tumorales. Las células tumorales secretan factores que atraen y determinan la polarización de los macrófagos en los tumores. A su vez, los MAT producen factores de crecimiento que promueven la angiogénesis y la remodelación del tejido, y contribuyen a la progresión y diseminación del tumor.

Los linfocitos “natural killer” o NKC :

Los linfocitos asesinos o citolíticos naturales o **LGL** (linfocitos grandes granulares), son una subpoblación que destruyen a las células infectadas por virus y patógenos intracelulares, y que ya no expresan moléculas del CMH-I. Derivan de precursores de la médula ósea, pero no son ni **LB** ni **LT**, pues no tienen receptores específicos ni manifiestan mutación somática. Se hallan en la sangre circulante y en el bazo, constituyendo entre un 5 a un 20% de los mononucleares presentes. Su activación está regulada por un equilibrio entre las señales emitidas por los receptores activadores e inhibidores. Los primeros, de discutible estructura, pero relacionados en la transmisión de señales con los ITAM (ricos en tirosina en las colas citoplasmáticas) se expresan en muchas células y en sustancias microbianas. Si ambos receptores están ocupados

por su ligando, predomina la acción de los inhibidores y la **NKC** no se activa, lo cual evita la destrucción de células normales del huésped. Los segundos vinculados con los ITIM, fosforilan los residuos de tirosina y se unen a la tirosina-fosfatasa (SHP-1), que a su vez, des-fosforilan a intermediarios de señalización de las vías de activación. Participan en un fenómeno de defensa inmunológica que aúna las **RIC** y **RIA**, como lo es, la ADCC o citotoxicidad celular anticuerpo dependiente, ya que posee la habilidad de reconocer al receptor CD16 o para el Fc γ -IIIa de baja afinidad para los fragmentos Fc de las IgG₁ e IgG₃, que se hallen en la membrana del patógeno. Las **NKC** son estimuladas por las IL-12, IL-15 e IL-18. La IL-12 de origen **M** es una inductora de la síntesis del INF- γ , y por ende de la actividad de la **NKC**, a la que se suma el efecto de la IL-18, potenciadora de la IL-12. La IL-15, estimula el crecimiento de la **NKC**, como se demostró en murinos carentes del gen respectivo, y con un número escaso de **NKC**. La citólisis por la **NKC** es similar a la de los **LTCD8+**; así, los gránulos citoplasmáticos con perforinas, producen poros en las membranas de las células diana, y las granzimas, o complejos enzimáticos de alto peso molecular, penetran por esos poros e inducen la rápida apoptosis de la célula blanco. Así ejercen su agresividad contra células infectadas por virus y/o bacterias intracelulares causantes de enfermedades humanas. Las **NKC** y los **LTCD8+** inducen la muerte por apoptosis con 2 mecanismos. En el primero, o mecanismo secretorio, las células citotóxicas reconocen y movilizan sus gránulos secretorios hacia las células blanco. Estos gránulos con la granzima B, una serino-proteasa capaz de activar caspasas y la perforina, una proteína desestabilizante de membranas.⁽¹³⁾ En los gránulos, la granzima B forma un complejo con la perforina y una tercera proteína denominada serglicina que actúa como proteína transportadora. Este complejo se libera en la zona de contacto entre las 2 células donde es endocitado por la célula blanco, por el receptor de manosa 3-fosfato (MPR).

La internalización forma una vacuola de pH ácido que activa a la perforina, que desestabiliza la membrana de la vacuola endocítica, permitiendo que la granzima B acceda al citosol activando al sistema de caspasas que induce la muerte por apoptosis.⁽¹⁵⁾ En el segundo proceso, o no secretorio participa el factor de necrosis tumoral (TNF- α), el ligando de Fas (Fas-L), y en forma secundaria en las **NKC**, TRAIL.⁽¹⁶⁾ Una vez activadas, las células citotóxicas comienzan a expresar Fas-L en su superficie, lo que les permite unirse a las células que expresen su receptor CD95 (Fas). La interacción entre Fas y Fas-L induce la trimerización de Fas en la célula blanco promoviendo el reclutamiento de proteínas al dominio de muerte de Fas, con una cascada de caspasas que involucra a la caspasa 8 y conduce a la apoptosis de la célula blanco.

Las **NKC** y los **LT-CD8+** son los efectores más eficientes en la batalla contra los tumores. Las **NKC** no sólo son citotóxicas contra los tumores, sino que, por las citoquinas y el diálogo cruzado con las **CDs**, son capaces de regular la **RIA**, cuali y cuantitativamente.^(17, 18)

Además de la IL-15, la IL-7, el SCF (stem-cellfactor) y el flt3-L (ligando de flt3) juegan un papel relevante en su maduración.^(19, 20) Ella puede ocurrir en ausencia de un timo funcional tanto en humanos como en ratones. Las **NKC** comparten un precursor común con los **LT** (diferente del de los **LB** y granulocitos/**M**), que se diferencia a un linaje **T** o **NK** por el microambiente.⁽²²⁾ Las **NKC** fueron descritas por lisar células tumorales o células infectadas con virus que no expresaban moléculas del CMH-I. Así nació la hipótesis del “missing-self”, que proponía que las **NKC** monitoreaban los niveles de expresión del CMH-I sobre la célula, y destruían a aquéllas que habían dejado de expresar niveles normales de clase-I, generalmente células tumorales o infectadas con virus. Se las asoció con el fenómeno de vigilancia inmunológica, pues el reconocimiento de células con niveles bajos o nulos del CMH-I, implicaba la existencia de receptores/activadores de la citotoxicidad que disparasen su actividad biológica. Las moléculas del CMH-I no son siempre necesarias para proteger de la lisis de las **NKC**. Estas son incapaces de rechazar tejidos no hematopoyéticos deficientes en moléculas del CMH-I, e in vitro no pueden lisar fibroblastos de ratones deficientes en β 2-microglobulina que no expresan CMH-I.⁽²³⁾ La inhibición de la unión del CMH-I no es siempre suficiente para prevenir la citotoxicidad por parte de las **NKC**. Algunas células infectadas con virus que expresan CMH-I en la superficie son lisadas eficientemente por las **NKC** autólogas. Además, **NKC** activadas con IL-2 aumentan su actividad lítica comparada con **NKC** no estimuladas, y lisar blancos resistentes. La unión de receptores/activadores a moléculas de membrana de células blanco no solo desencadena la citotoxicidad sino que promueve la producción de

citoquinas, la migración de las **NKC**, su activación y proliferación. Cada **NKC** expresa su propio repertorio de receptores/activadores e inhibidores (entre 3 y 4 de cada tipo) de manera que la citotoxicidad se encuentra regulada por un balance de señales provenientes de receptores inhibidores que interactúan con el CMH-I y de receptores activadores que reconocen moléculas relacionadas con el CMH-I en las células blanco. El papel de las **NKC** como “citotóxicas naturales” está siendo revisado, pues hay **NKC** en la sangre periférica fenotípicamente maduras, pero con baja actividad citotóxica contra células blanco susceptibles. Las **NKC** poseen distintos pasos de activación, regulados por receptores y citoquinas para ser citotóxicas para las células blanco, que no son totalmente conocidas. Evidencias recientes señalan que las **CDs** y/o los monocitos y **M** serían los responsables de tal activación o de una interacción bidireccional que resulta en la maduración, activación o apoptosis de las **CDs**, dependiendo del estado de activación de ambos tipos celulares. Este reconocimiento es mediado por el receptor activador NKp30 en la **NKC**⁽³²⁾. La interacción in vivo entre **CDs** y **NKC**, es importante en la respuesta inmune eficiente contra células infectadas por virus y células tumorales. Así, las **CDs** adquieren capacidad de presentadoras de antígeno profesionales (CPAs que expresan las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86) pues las **NKC** promueven su maduración. Las **NKC** se convierten en una fuente de IFN- γ necesaria para generar una respuesta del perfil Th1.

Esta diferenciación es iniciada por la IL-12 de las **CDs** maduras y requiere del factor de transcripción T-bet⁽³⁶⁾. El IFN- γ polariza hacia el perfil Th1, y por un lado, aumenta la IL-12 por **CDs**, y por otro, sinergiza las señales traducidas desde el RcT para maximizar la expresión de T-bet, y del receptor de IL-12 en **LT** naive. Eric Vivier, propuso una definición actualizada para estas células, teniendo en cuenta nuevos ensayos funcionales y análisis genómicos. Según el autor, “una **NKC** es un linfocito NKp46+ CD3- presente en todos los mamíferos”, que depende de la IL-15 y responde a la IL-12. Luego de su maduración, las **NKC** son una fuente de IFN- γ , y lisan células que perdieron la expresión del CMH-I, y que expresan moléculas inducibles por estrés (ej: los ligandos del receptor activador NKG2D -NKG2DLs-) o moléculas microbianas (ej: el m157 del citomegalovirus murino o agonistas del TLR-3)”. En los humanos hay 2 subpoblaciones de **NKC**, con funciones especializadas diferentes. El 90% expresa bajos niveles del CD56 (CD56dim), y altos niveles del receptor para el Fc- γ de la IgG o CD16 (CD16bright). Estas células lisan células tumorales, in vitro e in vivo, y producen citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). No expresan CCR7 ni L-selectina (CD62L), pero expresan LFA-1 y otras moléculas de adhesión, por lo que migran a los tejidos periféricos donde ejercen su actividad⁽³⁸⁾. El 10% restante, expresa altos niveles de CD56 (CD56bright), y niveles bajos o nulos de CD16 (CD16dim o CD16-). Constituye una fuente de citoquinas inmuno-regulatorias (IFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-10, IL-13, GM-CSF) con un papel importante en la **RIC** y en la **RIA**. Expresa CCR7 y L-selectina (CD62L), lo que les confiere la habilidad de migrar y anidar en ganglios linfáticos, donde liberan las citoquinas que regularan la respuesta de los **LT** y **LB**.⁽³⁸⁾

Los receptores de las **NKC**:

La identificación de sus receptores contribuyó a entender su reactividad y especificidad. A diferencia de los **LT** y **LB**, las **NKC** no emplean un único receptor para reconocer a las células blanco. Por el contrario, expresan receptores asociados a cascadas de señalización intracelular específicas, que se dividen en inhibidores y activadores de la citotoxicidad. Desde el punto de vista genético, existen 2 grupos de receptores: 1): el complejo de receptores leucocitarios o LRC (leukocyte-receptor-complex), y, 2): el complejo de receptores de la citotoxicidad natural. El grupo de los LRCs con 2 familias de genes se encuentran en el cromosoma 19 humano: los receptores de tipo KIR (killer-immunoglobulin-like receptor), y los receptores ILT (immunoglobulin-like-transcripts) o LIR (leukocyte-inhibit-receptors). Por otra parte, los genes del **NKC** mapean en el cromosoma 12 humano y están compuestos por la familia de genes NKG2 (CD94/NKG2A,-B).⁽⁴⁶⁾

Los receptores inhibidores:

Desde que las **NKC** se descubrieron quedó claro que destruyen a sus células “blanco” que no expresan CMH-I. Los tumores murinos que carecen del CMH-I, son atacados de por las **NKC**,

in vitro y/o in vivo. Así, las células “blanco” susceptibles de ser destruidas por las **NKC** tienen expresión defectuosa de uno o más alelos de CMH-I. Esta pérdida ocurre en malignidades o en la infección por virus. Por ello, líneas tumorales como la K562 (de la leucemia mielocítica crónica), la Molt4 (de la leucemia linfoblástica aguda) o la Daudi (del linfoma de Burkitt), son usadas como “blanco” para ensayos con **NKC**, porque no expresan CMH-I. En los humanos y en los ratones, las **NKC** no destruyen células con el CMH-I normal, pero en los ratones transgénicos con CMH-I y con células deficientes en $\beta 2$ -microglobulina son destruidas por las **NKC**. Las **NKC** humanas destruyen líneas celulares linfoblásticas que tienen CMH-I deficiente, pero las **NKC** son incapaces de matar estos “blancos” cuando son transfectados con genes HLA-B y HLA-C normales. Los receptores inhibidores poseen en su colaplasma un dominio ITIM (motivo de inhibición basado en tirosina, cuya secuencia es V/IxYxxL/V), que luego de fosforilarse recluta fosfatasa de la familia SHP-1, que previene funciones efectoras de las **NKC**. El porqué de los efectos inhibidores del CMH-I en la actividad de las **NKC**, propuso la hipótesis de “un receptor inhibidor”, donde las **NKC** expresan receptores para el CMH-I, que discriminan a sus alelos, y que dan señales que inhiben los mecanismos de lisis de las **NKC**. Los ligandos para los receptores activadores de las **NKC** se expresan en las células sanas bajo un estricto control negativo por sus receptores inhibidores polimórficos, que reconocen a los alelos CMH-I, y evitan la destrucción de las células normales. Aunque las **NKC** poseen receptores para el CMH-I propio y para el CMH-I ajeno, todos expresan un receptor inhibidor del CMH-I, en las células propias, asegurando que puedan ser reconocidos y protegidos de lisis. Un receptor inhibidor de las **NKC**, no interactúa con todos los CMH-I, por lo que cada receptor identifica a un grupo de antígenos CMH-I que comparte una región antigénica. Los más importantes son los receptores Ly49, KIR, CD94/NKG2 y KLRE-1. **Los receptores KIR:** Originalmente definidos como las moléculas p50 y p70, fueron bautizados como KIR (killer-immunoglobulin-like receptor), y juegan un papel en el reconocimiento del CMH-I propio para proteger a las células normales de la lisis por las **NKC**. Los KIR son glicoproteínas de la super-familia de las Igs, y como el CMH-I muestran un alto polimorfismo genético. Se codifican en el cromosoma humano 19, y son 10 los miembros de la familia KIR aunque sólo 2 de ellos han sido identificados. En las **NKC**, el reconocimiento de los alelos HLA-A, -B y -C está mediado por miembros de la familia KIR (CD158), codificados en el LRC. La subfamilia KIR-3D contiene 3 dominios, mientras que la subfamilia KIR-2D contiene 2. A su vez, los dominios citoplasmáticos de los KIR pueden ser largos (L) o cortos (S), de acuerdo con su función de receptor inhibitorio o activador. Los KIR inhibitorios contienen 1 ó 2 ITIM en sus dominios citoplasmáticos. Los receptores activadores no señalizan directamente, sino que se asocian no covalentemente con moléculas adaptadoras ITAM, que traducen señales. Es una excepción, el receptor KIR-2DL4, que posee un dominio citoplasmático largo, con un ITIM, con función activadora. En general, los KIR-3D reconocen alelos HLA-A, y -B, mientras que los receptores KIR-2D reconocen alelos HLA-C. Los KIR inhibitorios se expresan en los LT activados. **Los receptores ILT (o LIR):** La familia ILT/LIR son 13 genes que codifican proteínas con 2 ó 4 dominios extracelulares de la super-familia de las Igs. Estos receptores están en los monocitos, M, CD8, LB y **NKC**. La presencia del ITIM en el citoplasma de los ILT 2, 4, 5 y 8, sugiere que actuarían como receptores inhibitorios, como los KIRs. El ILT2 (LIR-1), se une al CMH-I, incluyendo la molécula no clásica HLA-G. El ILT2 se expresa en los monocitos, M, LB, CD8 y **NKC**, y modula sus funciones efectoras. **El Ly49 (KLR):** También llamado Ly49A, fue el primer receptor de la **NKC**, responsable del reconocimiento del CMH-I en el ratón. Confiere un reconocimiento específico del CMH-I en el H-2Dd, que inhibe a las **NKC**. Con anticuerpos bloqueadores y la transfección del CMH-I, el Ly49A es un receptor específico para el CMH-I del ratón para los haplotipos d y k (H-2Dd y H-2Dk). Más aún, células diferentes a las **NKC**, transfectadas con un ADNc, Ly49A se adhirió a las células blanco transfectadas H-2Dd. Los receptores murinos Ly49 son glicoproteínas de membrana tipo II, de la super-familia de la lectina tipo C, codificados por 9 genes relacionados que se encuentran en el cromosoma 6 del ratón, denominado “gen del complejo NK”. Se expresan en la superficie de las **NKC** y LT como homodímeros. El receptor Ly49 interactúa con H-2Dd uniendo los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y requiere la asociación de $\beta 2$ -microglobulina. La composición de los

péptidos H-2-Dd no parece afectar el reconocimiento Ly49A, aunque se sustituya una alanina. Los Ly49A, Ly49C, Ly49G2 y Ly49I, contienen inhibidores ITIM, para la citólisis de las **NKC** contra la célula “blanco”. El Ly49A reconoce moléculas H2-Dd y 2-Dk, mientras que Ly49C es más amplio para el CMH-I, incluyendo haplotipos d, b, k y s. El Ly49G es un receptor específico para Dd y Ld. En contraste, Ly49D carece de sitios ITIM, y se considera más bien un receptor activador de la citotoxicidad, y destruye células asociado al DAP12.⁽⁴⁵⁾ Los Ly49A, Ly49C y Ly49G2 son expresados en las **NKC**, en un 20% 40% y 45%, respectivamente, en ratones B6 (C57BL/6J, H-2Db). Cerca del 80% de las **NKC** expresan al menos uno de estos 3 receptores, sugiriendo que los **NKC** expresarían un miembro de la familia Ly49. En las ratas, los genes homólogos de ratón Ly49 están en el cromosoma 4. En los humanos, los genes homólogos del Ly49, no han sido aún identificados. **El CD94/NKG2**

(KLR):

Se expresan en las **NKC** humanas y en los **LT**, son miembros de la super-familia de las lectinas tipo C. Difieren de los KIR en estructura y especificidad, pero inhiben la función de las **NKC** de una manera similar. Es una glicoproteína relacionada con el reconocimiento de haplotipos HLA-A, B o C. La cola citoplasmática del CD94 es de 7 aminoácidos de largo, sin una función de señalamiento, además de que carece de los sitios de fosforilación ITIM o ITAM. El CD94 se asocia con el NKG2 y forma un receptor que da la señal intracelular. Son heterodímeros unidos por enlaces disulfuro, con una unidad que no varía, que es el CD94 unido a una glicoproteína codificada por el gen NKG2. El CD94 es codificado por un solo gen y la familia NKG2 con 4 genes llamados: NKG2A, NKG2C, NKG2E y NKG2D/F, además del NKG2B (una variante del NKG2A). El CD94 y el NKG2 se expresan por genes ubicados en el cromosoma 12p del llamado “gen del complejo **NKC**” humano, el cual tiene su contraparte en el ratón en el cromosoma 6 y en la rata en el cromosoma 4. Los NKG2 son incapaces de ser expresados en la membrana celular, al menos que se unan al CD94. Así, la función primaria del CD94 es servir de “chaperón” para el transporte del NKG2 a la superficie celular, para estabilizar la molécula. El CD94/NKG2A reconoce al HLA-E. La lisis de las **NKC** sobre las **CDs** autólogas inmaduras (baja expresión del CMH), mediada por este receptor, pone de manifiesto la interfase entre la **RIC** y la **RIA**. Varios receptores NKG2 contienen ITIM, a excepción del NKG2C que carece de ITIM o ITAM. Se considera que el CD94/NKG2 podría ser el homólogo humano del Ly49; se han clonado homólogos de los CD94 y NKG2 humanos en rata. Estos genes están en el cromosoma 4 de la rata o “gen del complejo **NKC**”⁽¹⁰⁾. **El KLRE1:** Es un receptor de las **NKC** de las lectinas tipo C codificado en la rata y el ratón. Es una proteína trans-membrana tipo II con un dominio como lectina COOH-terminal. No contiene ITIM ni un aminoácido cargado positivamente en el dominio trans-membrana, pero recluta SHI-P para generar un receptor inhibitorio en las **NKC**. **Los receptores activadores:** Para su activación las **NKC** necesitan la unión de sus receptores activadores con el ligando de la célula “blanco”. Esta interacción es el estímulo para la producción de sus citoquinas y de su actividad citotóxica. El proceso es regulado por receptores inhibidores y citoquinas que aumentan, limitan o terminan la respuesta. Los activadores contienen residuos cargados en sus dominios trans-membrana, que les permiten interactuar con moléculas de señalamiento intracelular, como son: RFcε, CD3z y DAP12^(11, 12). Entre los activadores más importantes de las **NKC**, se encuentran: CD16, CD2, CD28 y CD161, que, no señalizando directamente, sino que se asocian no covalentemente con otras moléculas adaptadoras con motivos ITAM que sirven como transducción de señales. **El**

CD16: Es un receptor de membrana plasmática que con el CD56 sirven para diferenciarlas de los **LT**, los que son CD16- CD56+. Es de la familia del super-gen de las Igs, con baja afinidad y se conoce como RFcγIII o RFcγIIIa o como Ly-17. El CD16 es un polipéptido glicosilado con 21 aminoácidos en su tallo citoplasmático, y expresado en el 80% a 90% de las **NKC** humanas y de ratón; se expresa en **M** activados y en **PMN**. En el humano esta glicoproteína está codificada en el cromosoma 1. El CD16 permite la ADCC que destruye a la célula “blanco” cubierta de IgG.^(9, 13) Después de ligar a su “blanco”, el CD16 inicia la transducción de señales, con un incremento del Ca²⁺ intracelular y una cascada de la activación, que resulta en la secreción del TNFα, perforinas, granzimas y granulolisinas, con capacidad citolítica. **El CD2:** Conocido como el LFA-2 o Ly-37, es una glicoproteína de membrana del super-gen de las Igs

expresado en las **NKC** y **LT**. Su ligando es la glicoproteína CD58. Esta tiene funciones de activación/co-estimulación y adhesión, por lo que CD2 es un receptor co-estimulador que aumenta, pero no inicia la activación, ya que ratones "knock-out", el CD2 tiene una función normal en las **NKC**. **El CD28**: Esta glicoproteína es un homodímero con enlaces disulfuro de la familia del super-gen de las Igs, y se une a los ligandos CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2). Es un receptor de señalización intracelular para proliferación, producción de IFN γ y destrucción de células tumorales. **El CD 161 (NKR-P1)**: Tres genes que lo codifican se identificaron en el ratón y la rata, y se conocen como NKR-P1A, NKR-P1B, NKR-P1C. Sólo uno de ellos está en las **NKC** humanas.⁽¹⁰⁾ Pertenece a la super-familia de las lectinas-C, u homodímeros, de 80 kDa, unidos por enlaces disulfuro en las **NKC** y **LT**. Se hallan en el cromosoma 6 del ratón, en el 12 del hombre y en el 4 de la rata, en la región del "gen del complejo **NKC**". Los NKR-P1C o CD161c son conocidos como NK1.1 o Ly-55. Con anticuerpos monoclonales (moAb) para NKR-P1 de las **NKC** humanas se demostró que podrían existir iso-formas. Por ejemplo, NKR-P1B contiene ITIM, que son inhibidores, por lo cual, la familia NKR-P1 podría inhibir y no activar a las **NKC**. **Receptores de la citotoxicidad natural de las NK: CD94/NKG2**. Los genes que codifican para el CD94/NKG2 están en el complejo **NKC**. La subunidad CD94 del receptor es invariante y está codificada por un solo gen. La NKG2 es una familia multigénica de 5 proteínas, llamadas NKG2A (y su variante por splicing alternativo NKG2B), NKG2C, NKG2D y NKG2E.^(53, 54) Los dominios extracelulares de unión al ligando de NKG2A/B, -C y -E, comparten un alto grado de homología. Los dominios citoplasmáticos son largos (NKG2A/B) o cortos (NKG2C y E), correspondientes a iso-formas inhibitorias o activadoras.^(47, 55) Los heterodímeros CD94/NKG2A o B, poseen ITIM en su cola citoplasmática. El heterodímero CD94/NKG2C se asocia por su cola con la proteína adaptadora DAP12, que señala a la cadena CD3 ζ por la activación de tirosina-quinasa luego de la fosforilación del ITAM del citoplasma. Los heterodímeros CD94/NKG2A, B y C, son receptores para la molécula no clásica del CMH-I, el HLA-E cuya expresión en la superficie celular requiere de un péptido de la secuencia líder de cadenas α del CMH-I (HLA-A, -B, -C y -G). La disminución en la síntesis del CMH-I reduce la expresión del HLA-E por una menor disponibilidad del péptido necesario para el ensamblaje, estabilización y transporte a la superficie celular del HLA-E. La expresión de los niveles normales del HLA-E, es un indicador de la biosíntesis del CMH-I. Los CD94/NKG2 monitorean la integridad de la vía de síntesis del CMH-I y detectan alteraciones inducidas por proteínas codificadas en el genoma de diferentes virus. **Receptores no específicos de las moléculas del CMH-I**: Algunos receptores no específicos del CMH-I son activadores. Entre ellos se encuentran proteínas adaptadoras con ITAM, tales como el CD16 y los receptores activadores de citotoxicidad (NCR). Otro grupo está compuesto por proteínas adaptadoras sin motivos ITAM. Aquí hallamos los CD2, CD2-2B4, CRACC, NTB-A, DNAM-1, NKp80 y al NKG2D, muy estudiado actualmente. **Los NCR**: Son 3 receptores activadores de la citotoxicidad de las **NKC**. Pertenecientes a la super-familia de las Igs, y fueron denominados NKp46⁽⁶⁸⁾, NKp44^(69, 70) y NKp30⁽⁷¹⁾ y son un grupo emergente llamado NCR (Receptores de Citotoxicidad Natural). Son glicoproteínas trans-membrana de 46,44 y 30 kDa, y están involucrados en el reconocimiento y la lisis de las células tumorales humanas⁽⁴³⁾. El NKp46 es expresado por todas las **NKC** (en reposo y activadas), por lo que se sugiere como un excelente marcador de las **NKC**.⁽²⁸⁾ Su porción citoplasmática no contiene ITAM, pero la región trans-membrana tiene un aminoácido cargado positivamente (R), que está involucrado en la estabilización de la interacción con las proteínas adaptadoras CD3 ζ y RFc ϵ I. El NKp44 está restringido a las **NKC** activadas por la IL-2, mientras que está ausente en **NKC** no activadas de sangre periférica. En su región trans-membrana posee un aminoácido cargado positivamente, que se asocia al DAP12.⁽⁶⁹⁾ El NKp30 se expresa en todas las **NKC**, y se une al CD3 ζ , a través de un aminoácido cargado positivamente de la región trans-membrana. Los NKp44 y NKp46 son sialilados, y se unen a la hemaglutinina del virus de la influenza, y así, reconocen células infectadas con el virus y activan la función citotóxica de las **NKC**.^(72, 73) El NKp30 reconoce a las **CDs**⁽³²⁾. Además, los NKp30, NKp44 y NKp46, reconocen y lisan a las células tumorales⁽⁷⁴⁾. Se demostró que los proteoglicanos del heparan-sulfato en la superficie de las células blanco están involucrados, los ligandos reconocidos de estas

células por los NKp30, 44 y 46, son aún desconocidos.^(75, 76)

El NKp 80: El NKp80⁽⁶⁵⁾ es una lectina de tipo C y se expresa como homodímero sólo en la superficie de las **NKC**. Su ligando es el AICL, específico de las células mieloides, monocitos, **M** y **PMN**. Hay pruebas que demuestran que la interacción entre el NKp80 y el AICL, actúa en las **NKC** y las células mieloides, e influye en la respuesta inmune.

El NKG2 D: Fue identificado en 1991 por Houchins, con un ADNc expresado por las **NKC** humanas⁽⁵⁴⁾. Es una molécula de trans-membrana del tipo II de la familia de las lectinas del tipo C. A diferencia de otros NKG2, NKG2D no se asocia con el CD94, y se expresa como homodímero en la superficie celular en todas las **NKC** y LT $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$ y LTCD8+. Este homodímero se une a la proteína DAP10 en humanos y a DAP12 o DAP10 en ratones^(78, 79). La DAP10 no contiene ITAM, pero tiene un motivo YxxM, que se une a la subunidad p85 de la fosfatidil-inositol 3 quinasa (PI3K) y a Grb, mientras que DAP12 contiene un ITAM citoplasmático que activa a las tirosina-quinasas Syc o ZAP-70, que desemboca en la citotoxicidad. Por otra parte, su expresión aumenta por efecto de la IL-12 y del IFN- α en las **NKC**, y por la IL-15 en los **LT-CD8**^(41, 78, 81, 82). El NKG2D es co-estimulador en las **NKC**, cuando éstas son activadas por los NKp30, NKp44, NKp46 o NKp80, o como ligandos sobre células blanco.⁽⁶⁷⁾ Esta función dual hace que el NKG2D sea muy versátil^(79, 83, 84), y clave durante las **RIC** y **RIA**. La estimulación de las **NKC** a través del NKG2D gatilla una señal tan intensa que sobrepasa a la señal inhibitoria disparada por el CMH-I y por los receptores inhibitorios KIRs conduciendo a la lisis de la célula blanco.

Los ligandos del NKG2D: El NKG2D del ratón reconoce a las proteínas Rae1⁽⁸⁵⁾, H60⁽⁸⁵⁾ y MULT1⁽⁸⁶⁾. Este se expresa en tejidos normales, pero Rae1 y H60 se expresan en tumores murinos. En los humanos, el NKG2D reconoce a las moléculas UL16 binding-proteins (ULBP)-1, ULBP-2 y ULBP-3^(87, 88). Este grupo de moléculas ancladas al GPI (glicosil-fosfoinositol), de tejidos normales, también se observan en tumores de diversos fenotipos^(87, 88). En los humanos, y otros mamíferos, pero no en ratón, existe otro grupo de ligandos del NKG2D (NKG2DL). Estas moléculas son proteínas de membrana llamadas MICA y MICB.⁽⁷⁷⁾ (Fig.18).

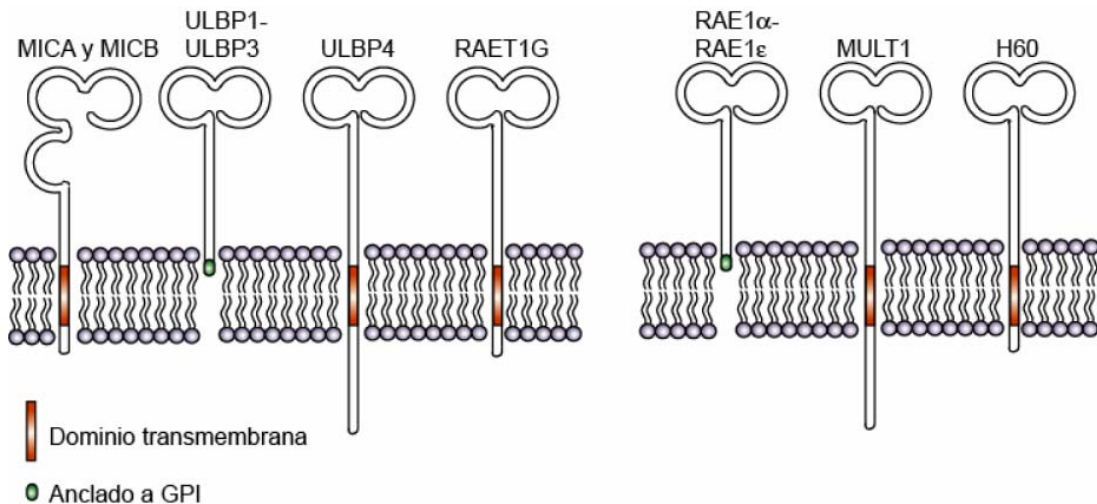


Fig.18 : Representación esquemática de los ligandos del NKG2 D. Tanto en los humanos (izquierda) como en el ratón (derecha) algunas de estas moléculas están ancladas a GPI y otras poseen dominios trans-membrana.

Los genes MIC:

Estos fueron identificados en 1994 por el grupo de Spies. Esta familia se compone de 2 genes (MICA y MICB) y 4 pseudo-genes⁽⁹⁰⁻⁹²⁾, cuya ubicación se muestra en la figura 19.

Los genes MIC están conservados en los mamíferos, pero no en el genoma murino. Los genes MICA y MICB, de 11,7 kpb y 12,9 kpb, son largos comparados con los genes del CMH, que

tienen una longitud promedio de 3,5 kpb^(95, 96). Pero, la estructura genómica general semeja a la de los genes del CMH-I, donde distintos dominios están codificados por distintos exones⁽⁹⁷⁾. MICA posee un primer intrón muy largo⁽⁹⁰⁾, donde existen sitios de unión para factores de transcripción como NFκB⁽⁹⁸⁾. El gen de MICA codifica para un ARNm de 1.382 nucleótidos (nt) que contiene un marco de lectura abierta de 1.149 nt, originando un poli-péptido de 383 aminoácidos con un peso molecular de 43 kDa⁽⁹⁰⁾. Esta longitud varía de acuerdo al número de repeticiones de alanina del segmento trans-membrana de diferentes alelos. El gen de MICB genera un transcrito de 2.376 nt y un marco de lectura abierto de la misma longitud que MICA, con quien comparte un 83% de similitud de secuencia amino-acídica⁽⁹⁶⁾. La homología entre MICA y otros genes del CMH-I es muy baja, siendo del 15 al 21% en el dominio α1, del 19 al 30% en el dominio α2 y del 32 al 36% en el dominio α3.⁽⁹⁰⁾ Esta baja homología entre los genes MIC y los genes del CMH-I es reflejo de una diversificación muy temprana en la evolución. La presencia de 8 sitios de N-glicosilación en MICA y 5 en MICB, contrasta con el único sitio de glicosilación del CMH-I, el que a su vez está ausente en MICA y MICB⁽⁹⁰⁾. La proteína MICA nativa está altamente glicosilada, lo que incrementa su peso molecular de 43 (péptido desnudo) a 65 kDa (proteína madura)⁽¹⁰⁰⁾. Además, no requiere de la β2-microglobulina ni del procesamiento antigénico o de las proteínas TAP para su expresión en superficie^(101, 102). Al igual que los genes del CMH-I, MICA y MICB son polimórficos y codominantes⁽¹⁰⁴⁾, conociéndose más de 60 alelos de MICA⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁸⁾ y 30 alelos de MICB⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾. La mayoría de los sitios polimórficos varían en posiciones nucleotídicas no redundantes, con predominancia en los dominios α2 y α3.

La gran divergencia entre MICA y MICB reside dentro de los exones del segmento trans-membrana. A diferencia de MICB, MICA posee variaciones en el número de repeticiones de la secuencia en tándem GCT, que codifica para diferente número de alaninas. Los alelos más frecuentes en los grupos étnicos son MICA* 008, seguido por MICA* 002, MICA* 004 y MICA* 010, dependiendo de las poblaciones. Los genes MIC parecen no ser esenciales para la vida, pues por una delección en la región del CMH-I, el 0,1024% de la población japonesa carece completamente del gen de MICA y el gen de MICB contiene un codón de terminación prematuro⁽¹¹⁶⁾. A diferencia de las graves consecuencias de la ausencia de los genes funcionales del CMH-I, los individuos MIC son normales. Esto se debe a que existe redundancia en los NKG2DL, y si las proteínas MICA y MICB están ausentes, su función se reemplaza por otro ligando, como los ULBPs.

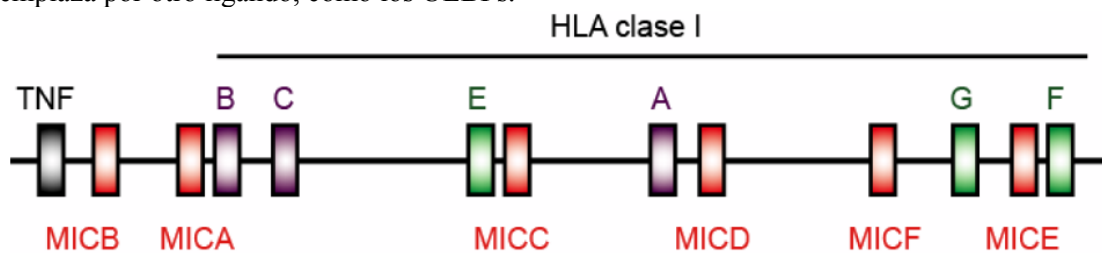


Fig 19 : Ubicación de los genes de la familia MIC en la región del CMH-I. Se muestran los genes para las moléculas de clase I HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F y HLA-G, así como los 2 genes (MICA y MICB) y 4 pseudo-genes (MICC, MICE y MICF).

Donde y cómo se expresa MICA:

Tiene un patrón de expresión restringido a las células endoteliales, los fibroblastos, los queratinocitos, los monocitos y el epitelio gastrointestinal, pero no se expresa en LT o LB en reposo^(100, 102, 117). En la región 5' del gen de MICA hay un elemento regulador del estrés térmico, similar al que se encuentra en el gen de la proteína del estrés térmico de 70 kDa (HSP 70).⁽¹⁰⁰⁾ La expresión de MICA es regulada por el estrés térmico⁽¹⁰⁰⁾ y el estrés oxidativo. También se vio en los fibroblastos y las células endoteliales infectadas in vitro con el citomegalovirus (CMV).⁽¹¹⁹⁾ Las células infectadas con CMV escapan al reconocimiento de los LT debido a que expresan productos virales que impiden el procesamiento de antígenos y la expresión del CMH-I.⁽¹²⁰⁾

Al inducir la expresión de MICA, el virus facilita el reconocimiento por el NKG2D, lo que aumenta la respuesta de los LTCD8+ específicas del virus.⁽⁵⁰⁾ El aumento de los NKG2DL se ve contrarrestado pues la proteína viral UL16 produce una disminución en la expresión de MICB y los ULBP - 1 y - 2. ^(121, 122) . Además, el CMV es capaz de inducir la degradación de MICA. ⁽¹²³⁾ . El alelo MICA* 008 (que posee una inserción que genera un codón stop-prematuro y una proteína truncada que carece de la porción citoplasmática, pero que mantiene su capacidad de estimular a las NKC), es resistente a esta degradación mediada por el virus. ⁽¹²³⁾

Causas y tratamiento de los distintos tipos de cánceres.

Un gran número de agentes físicos -como los rayos X o γ o la luz ultravioleta, y químicos como el metil-colantreno, el metano, las nitrosaminas, el arsénico, los componentes del humo del tabaco, y muchos otros, se asocian etiológicamente a diversos cánceres, tanto en el hombre como en los animales. Debe agregarse también, la capacidad oncogénica de diversos virus sobre todo en mamíferos (incluidos primates) y en aves. En los humanos hay virus que se consideran asociados causal o co-causalmente a los tumores malignos. El virus de Epstein Barr al linfoma de Burkitt y al carcinoma nasofaríngeo, el virus del papiloma humano a cánceres urogenitales, el virus de la hepatitis B a los tumores hepáticos, el virus HTLV (human T leukemia virus) a la leucemia de células T en adultos, etc. (Lajery von Buchwald ; Tsai, WL, 2010).

Las células cancerosas pueden sufrir cambios genéticos que conduzcan a la pérdida de los antígenos asociados al cáncer, evadiendo la respuesta de los LTCD8+ y NKC. Como resultado de esto, aun cuando el sistema inmunitario reconozca como amenaza a un cáncer en crecimiento, el cáncer puede todavía escaparse ante un ataque del sistema inmunitario ⁽⁸⁾.

Las vacunas son medicinas que refuerzan la habilidad natural del sistema inmunitario para proteger al cuerpo contra “invasores foráneos”, principalmente de agentes infecciosos que puedan causar enfermedades. Cuando un microbio infeccioso invade al cuerpo, el sistema inmunitario lo reconoce como foráneo, lo destruye, y “recuerda” impedir otra infección en caso que el mismo microbio lo invada de nuevo. La mayoría de las vacunas se producen con versiones inocuas de microbios— destruidos o debilitados, o partes de ellos— que no causan enfermedad, pero que estimulan una respuesta inmunitaria, con la producción de anticuerpos y células muy específicas que los eliminan. Las vacunas contra el cáncer son una clase de sustancias que modifican la respuesta inmunológica.

Hay 2 tipos de vacunas contra el cáncer. 1. **Vacunas preventivas (o profilácticas)**, las cuales tratan de impedir que se presente el cáncer en gente sana, y, 2.- **Vacunas terapéuticas**, las cuales tienen como objeto reforzar la respuesta inmunitaria natural del cuerpo (inmunoterapia) contra el cáncer. Dos tipos de vacunas preventivas (contra el virus del papiloma humano y contra el virus de la hepatitis B) están disponibles, y otras 2, de tratamiento (para el cáncer metastásico de próstata y el melanoma) están en avanzada fase experimental. Las vacunas preventivas se dirigen a sustancias infecciosas que causan o contribuyen a que se forme el cáncer ⁽¹⁰⁾. Son semejantes a las vacunas tradicionales, las cuales ayudan a impedir enfermedades infecciosas, como el sarampión o la polio, al proteger al cuerpo contra la infección. Tanto las vacunas de prevención de cáncer como las vacunas tradicionales están basadas en antígenos que son relativamente fáciles de reconocer como foráneos por el sistema inmunitario. La mayoría de las vacunas de prevención, incluso las que se dirigen a virus que causan cáncer (virus de la hepatitis B y virus del papiloma humano), estimulan la producción de anticuerpos que se unen a microbios específicos y bloquean su habilidad para causar infecciones.

Vacuna contra el papiloma humano (VPH). Las infecciones persistentes por tipos de VPH de alto riesgo pueden causar cáncer de cuello uterino, cáncer de ano, cáncer de orofaringe y cánceres de vagina, de vulva y de pene. Tres vacunas están aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para prevenir la infección por VPH: Gardasil®, Gardasil 9® y Cervarix®. Gardasil y Gardasil 9 están aprobadas para usarse en mujeres de 9 a 26 años de edad para la prevención de los cánceres de cuello uterino, de vulva, vagina y de ano causados por VPH, de lesiones precancerosas de cuello uterino, de vulva,

vagina y de ano, y de verrugas genitales. Gardasil y Gardasil 9 fueron aprobadas también para usarse en hombres para la prevención de cáncer de ano causado por VPH y para lesiones precancerosas de ano y verrugas genitales. Gardasil fue aprobada para usarse en hombres de 9 a 26 años de edad, y Gardasil 9 fue aprobada para usarse en hombres de 9 a 15 años de edad. Cervarix fue aprobada para usarse en mujeres de 9 a 25 años de edad para la prevención del cáncer cervical (o cuello uterino) causado por VPH.

Vacunas contra el virus de la hepatitis B (VHB). La infección crónica por el virus de la hepatitis B puede conducir al cáncer de hígado. La FDA ha aprobado muchas vacunas que protegen contra la infección por el VHB. Dos vacunas, Engerix-B y Recombivax HB, protegen sólo contra la infección por VHB. Ambas vacunas están aprobadas para usarse en individuos de todas las edades. Algunas otras vacunas protegen contra la infección por VHB así como por otros virus. Twinrix protege contra el VHB, y contra el virus de la hepatitis A, y Pediarix contra el VHB, contra el poliovirus, y la bacteria que causa difteria, tétanos y coqueluche. Twinrix está aprobado para usarse en personas de 18 años y más. Pediarix está aprobado para usarse en infantes cuyas madres no tienen el antígeno de superficie de VHB (HBsAg) y se administra desde las 6 semanas de edad hasta los 6 años. La vacuna original contra el VHB fue aprobada por la FDA en 1981, y así fue la primera vacuna de prevención de cáncer en ser producida y comercializada con éxito. Hoy en día, la mayoría de los niños están vacunados contra el VHB al poco tiempo después de nacer. Las vacunas de tratamiento del cáncer se usan para tratar cánceres que ya se han formado; la intención es que retrasen o detengan el crecimiento; que se reduzca el tumor; impedir que regrese el cáncer; o eliminar las células cancerosas que no hayan sido destruidas por otras formas de tratamiento. Las vacunas para tratar el cáncer se diseñan para que funcionen activando a los LTCD8+ y a las NKC, para que reconozcan y actúen contra tipos específicos de cáncer o para inducir la producción de anticuerpos. Dichos antígenos propios del tumor, causan una respuesta inmunitaria que resulta en la activación de las células T o en la producción de anticuerpos, que reconocen y se unen a los antígenos en la superficie de las células cancerosas, mientras que las NKC y los LTCD8+, detectan antígenos del cáncer dentro de las células cancerosas. La producción de vacunas efectivas de tratamiento ha resultado más difícil y problemática que la formulación de vacunas preventivas del cáncer ⁽¹²⁾. Para ser efectivas, las vacunas para tratamiento necesitan lograr 2 propósitos. Primero, como las vacunas preventivas, las vacunas de tratamiento, deben estimular respuestas inmunitarias específicas dirigidas al blanco correcto. Segundo, las respuestas inmunitarias deben tener la potencia suficiente para traspasar las barreras que usan las células cancerosas para protegerse de los ataques de las NKC y LTCD8+. En abril de 2010, la FDA aprobó la primera vacuna para tratamiento del cáncer. Esta vacuna, sipuleucel-T (Provenge®), está aprobada para usarse en algunos hombres con cáncer metastático de próstata. Está diseñada para estimular una respuesta inmunitaria a la fosfatasa ácida prostática (PAP), un antígeno que se encuentra en la mayoría de las células cancerosas de la próstata. En estudios clínicos, sipuleucel-T aumentó cerca de 4 meses la supervivencia de los pacientes. ⁽¹³⁾ Al contrario de algunas otras vacunas de tratamiento, sipuleucel-T se ajusta a cada paciente. Se formula al aislar células dendríticas de la sangre de un paciente por un procedimiento llamado leucocitoféresis. Estas células se cultivan junto con una proteína llamada PAP-GM-CSF. Esta proteína consiste de PAP unida a un factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). El GM-CSF estimula al sistema inmunitario y mejora la presentación de antígenos. Las células dendríticas cultivadas con PAP-GM-CSF forman el componente activo de sipuleucel-T, que se inyecta al paciente. Ellos reciben 3 tratamientos, con una separación de 2 semanas, y cada ronda de tratamiento requiere el mismo proceso de fabricación. Aunque no se conoce el mecanismo preciso de acción de sipuleucel-T, parece que las células dendríticas con el o PAP-GM-CSF estimulan a las NKC y LTCD8+ para que destruyan las células tumorales que expresan PAP. En octubre de 2015, la FDA aprobó la primera terapia oncolítica con virus, talimogene o herparepvec (T-VEC, o Imlygic®) para el tratamiento de pacientes con melanoma metastático que no pueden ser operados quirúrgicamente. Además de infectar y de causar lisis en las células cancerosas cuando se inyecta directamente en el melanoma, T-VEC induce respuestas en lesiones en donde no se inyectó, lo que sugiere que desencadena una respuesta inmunitaria contra el tumor, más amplia, semejante a las de otras vacunas anticancerosas. Todas las vacunas preventivas aprobadas por

la FDA hasta la fecha se han producido mediante el uso de antígenos de microbios que causan o contribuyen a la formación de cáncer. Esto incluye a antígenos de VHB y a tipos específicos de VPH. Estos antígenos son proteínas que ayudan a formar la superficie externa de los virus. Ya que solo se usa una parte de los microbios, las vacunas resultantes no son infecciosas y, por lo tanto, no pueden causar enfermedades. Investigadores están creando también versiones sintéticas de antígenos en el laboratorio para usarse en vacunas preventivas. Para hacer esto, se modifica la estructura química de los antígenos para estimular respuestas inmunitarias que son más fuertes que las causadas por los antígenos originales ⁽¹⁴⁾. En forma semejante, las vacunas de tratamiento se crean usando antígenos asociados al cáncer o versiones modificadas de ellos. Los antígenos que se han usado hasta ahora incluyen proteínas, carbohidratos, glucoproteínas o glucopéptidos (combinaciones de carbohidratos y proteína), y gangliósidos (combinaciones de carbohidratos y lípidos). Las vacunas de tratamiento se formulan mediante el uso de células cancerosas debilitadas o muertas que llevan antígeno(s) específicos o células inmunitarias modificadas para presentar tal antígeno(s) en su superficie. Estas células pueden originarse en el paciente mismo (llamada vacuna autógena, como con sipuleucel-T) o en otro paciente (llamada vacuna alógena). Algunas vacunas para el cáncer en su estadio tardío usan virus, levaduras o bacterias como vehículos (vectores) para depositar un antígeno o más en el cuerpo ⁽¹⁵⁾. Estos mismos vectores son inmunogénicos naturalmente (es decir, pueden estimular una respuesta inmunitaria), pero están modificados para que no puedan causar enfermedades.

Otros tipos de vacunas de tratamiento son las hechas con moléculas de ADN o de ARN que contienen instrucciones genéticas para antígenos asociados al cáncer. El ADN o el ARN, pueden inyectarse solos en un paciente como vacuna de “ácido nucleico desnudo”, o empacada dentro de un virus inocuo. Después de que se inyecta el ácido nucleico desnudo o virus en el cuerpo, el ADN o ARN es absorbido por las células, las cuales empiezan a producir los antígenos asociados con el tumor. Los investigadores esperan que las células producirán suficientes antígenos asociados con el tumor para estimular una fuerte respuesta inmunitaria. Ahora se usan varios antígenos diferentes asociados al tumor para hacer vacunas experimentales de tratamiento. Algunos de estos antígenos se encuentran en la mayoría de los tipos de células cancerosas o dentro de ellas. Otros son únicos a tipos específicos de cáncer ^(1, 5, 6, 13, 16-19). Sustancias conocidas como adyuvantes se añaden con frecuencia a las vacunas para reforzar su habilidad de inducir fuertes respuestas inmunitarias contra el cáncer ⁽²⁰⁾. Los adyuvantes usados para vacunas para cáncer se originan de muchas fuentes diferentes. Algunos microbios, como el bacilo Calmette-Guérin (BCG), pueden servir como adyuvante ⁽²¹⁾.

Sustancias producidas por bacterias, como el Detox B (una emulsión aceitosa en forma de gotas de monofosforil lípido A y un esqueleto micobacteriano de pared celular) se usan con frecuencia también como adyuvantes. Productos biológicos derivados de organismos que no son microbios pueden usarse también como adyuvantes. Un ejemplo es la hemocianina de lapa californiana (KLH), la cual es una proteína grande producida por un molusco marino. Los antígenos que se pegan a la KLH han mostrado que aumentan su habilidad para estimular las respuestas inmunitarias. Alguna sustancia no biológica, como un aceite emulsificado conocido como montanide ISA-51, puede usarse como adyuvante.

Las citocinas naturales o sintéticas pueden usarse también como adyuvantes. Algunas aumentan la actividad de los LB y de los LTCD8+, mientras que otras suprimen sus actividades. Las citocinas usadas con frecuencia en las vacunas de tratamiento del cáncer o que se dan junto con ellas son la interleucina 2 (IL-2), el interferón alfa (INF- α), y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, conocido también como sargramostim) ⁽²²⁾. Antes de autorizar cualquier vacuna, la FDA debe verificar que sea segura y efectiva. Las vacunas que tienen el fin de prevenir o de tratar el cáncer tienen perfiles de seguridad comparables a los de otras vacunas ⁽⁶⁾. Sin embargo, los efectos secundarios de las vacunas para el cáncer pueden variar entre las formulaciones de las vacunas y de una persona a otra.

El efecto secundario que se notifica con más frecuencia es la inflamación en el sitio de la inyección, incluso enrojecimiento, dolor, inflamación, calentamiento de la piel, comezón y ocasionalmente una erupción cutánea. Algunas personas experimentan síntomas como de gripe después de recibir la vacuna, incluso fiebre, escalofríos, debilidad, mareos, náuseas, vómitos,

dolor muscular, fatiga, dolor de cabeza y ocasionalmente dificultad para respirar. La presión arterial puede afectarse también. Estos efectos secundarios, que en general duran sólo por un corto tiempo, indican que el cuerpo está respondiendo a la vacuna con una respuesta inmunitaria, como lo hace cuando se expone a un virus. Otros problemas de salud más graves se han notificado en menos personas después de recibir una vacuna. Estos problemas pueden haber sido causados por la vacuna o no. Los problemas reportados han incluido asma, apendicitis, enfermedad inflamatoria pélvica y ciertas enfermedades auto-inmunitarias, incluso artritis y lupus eritematoso sistémico. Las vacunas que usan células o microbios pueden tener efectos secundarios adicionales. Por ejemplo, los efectos secundarios de sipuleucel-T son la infección cerca del sitio de inyección y la hematuria. Reacciones graves de hipersensibilidad (alérgicas) a ingredientes específicos de vacunas han ocurrido después de una vacunación.

¿Pueden combinarse las vacunas de tratamiento con otros tipos de terapia contra el cáncer?

Sí. En muchos de los estudios clínicos de vacunas de tratamiento de cáncer que están ahora en curso, las vacunas se administran con otras formas de terapia para el cáncer. Las terapias que se han combinado con vacunas de tratamiento de cáncer incluyen

la cirugía, la quimioterapia, radioterapia, y algunas formas de terapia dirigida, incluso terapias que tienen como objeto reforzar las reacciones del sistema inmunitario contra el cáncer.

Varios estudios han sugerido que las vacunas de tratamiento de cáncer pueden ser más efectivas cuando se administran en combinación con otras formas de terapia para cáncer ^(18,23). Por ejemplo, estudios preclínicos y estudios clínicos en fase inicial han demostrado que la radioterapia puede intensificar la eficacia de las vacunas de tratamiento de cáncer ⁽²⁴⁾. Además, en algunos estudios clínicos, las vacunas de tratamiento de cáncer han parecido aumentar la efectividad de otras terapias para cáncer ^(18,23).

Evidencia adicional sugiere que la extirpación quirúrgica de tumores grandes puede intensificar la efectividad de las vacunas de tratamiento de cáncer ⁽²³⁾. En pacientes con enfermedad extensa, el sistema inmunitario puede verse abatido por el cáncer. La extirpación quirúrgica del tumor puede facilitar que el cuerpo presente una respuesta inmunitaria efectiva.

Los investigadores están diseñando también estudios clínicos para responder a cuestiones tales como si las vacunas de tratamiento de cáncer funcionan mejor cuando se administran antes, después o al mismo tiempo que otras terapias ⁽⁷⁾. Las respuestas a tales preguntas pueden no solo proveer información acerca de cómo usar mejor una vacuna específica de tratamiento de cáncer sino también revelar principios básicos adicionales que guíen la creación futura de terapias de combinación que incluyen vacunas.

Avances recientes en el conocimiento de cómo las células cancerosas evitan ser reconocidas y atacadas por el sistema inmunitario proporcionan a los investigadores la información necesaria para diseñar vacunas de tratamiento contra el cáncer que puedan lograr ambos objetivos ^(16,25).

Aunque los investigadores han identificado muchos antígenos asociados con cáncer, estas moléculas varían mucho en su habilidad para estimular una fuerte respuesta inmunitaria contra el cáncer. Dos campos principales de investigación están asignados a responder a este problema. Uno implica la identificación de antígenos novedosos asociados con cáncer, o neo-antígenos, que pueden resultar más efectivos en estimular respuestas inmunitarias que los antígenos que ya se conocen. Por ejemplo, un planteamiento de vacuna personalizada que se basa en neo-antígenos que está en pruebas clínicas en fase inicial comprende la identificación y puesta en el blanco de antígenos mutados específicos a los pacientes para crear vacunas de tratamiento para pacientes con glioblastoma y melanoma ^(26,27). El otro campo principal de investigación comprende la creación de métodos para incrementar la habilidad de los antígenos asociados con cáncer para estimular al sistema inmunitario. Hay también investigación en curso para determinar cómo combinar muchos antígenos con una sola vacuna de tratamiento de cáncer para producir respuestas inmunitarias óptimas contra el cáncer ⁽²⁸⁾.

Mejorar nuestro entendimiento de la biología básica como fundamento de cómo interactúan las células del sistema inmunitario y las células cancerosas será muy importante para concebir vacunas contra el cáncer. Como parte de este programa, se están creando nuevas tecnologías.

Por ejemplo, un nuevo tipo de tecnología con imágenes permite a los investigadores observar las células T citotóxicas y las células cancerosas interactuando dentro del cuerpo ⁽²⁹⁾. Los investigadores están tratando también de identificar mecanismos por los que las células cancerosas evaden o suprimen las respuestas inmunitarias contra el cáncer. Al comprender mejor en qué forma las células cancerosas manipulan el sistema inmunitario se podría llegar a la formulación de fármacos que bloquean esos procesos, lo que mejoraría la efectividad de las vacunas de tratamiento de cáncer ⁽³⁰⁾.

Por ejemplo, algunas células cancerosas producen señales químicas que atraen glóbulos blancos conocidos como células T reguladoras, o Tregs, al sitio del tumor. Las Tregs liberan con frecuencia citocinas que suprimen la actividad de las células T citotóxicas ^(18, 31). La combinación de una vacuna de tratamiento de cáncer con un fármaco que impide la inactivación de las células T citotóxicas puede mejorar la efectividad de la vacuna al generar respuestas fuertes de las células T citotóxicas contra el tumor.

Los moduladores inmunitarios de puntos de control pueden también mejorar la efectividad de las vacunas contra cáncer ⁽³²⁾. Estos moduladores se apuntan a otro mecanismo inmunitario regulador usado por las células cancerosas para evadir la destrucción, uno que implica las proteínas de puntos de control inmunitarios como el PD-1, el cual se expresa en la superficie de las células T. La unión de PD1 a proteínas específicas (o ligandos), llamadas PD-L1 y PD-L2, en la superficie de algunas células normales o células cancerosas crea una señal de “apagado” que dice a la célula T que no lance una respuesta inmunitaria contra esas células. (Esta unión hace que el sistema inmunitario no se exceda al actuar contra las células normales e impida la autoinmunidad). Algunas células tumorales expresan altas concentraciones de PD-L1, lo cual causa que las células T se “apaguen” y ayuda a las células cancerosas a evadir la destrucción inmunitaria. Los anticuerpos que bloquean la unión de una proteína de punto de control inmunitario a su ligando en una célula cancerosa eliminan esta señal de “apagado” y permiten que haya una respuesta inmunitaria contra las células cancerosas.

Varios de esos anticuerpos han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de algunos cánceres y están mostrando efectos prometedores en otros cánceres ⁽³³⁾. Ya que estas sustancias permiten que las células T sean más efectivas contra el cáncer, se espera que ellas también mejorarán la efectividad de las vacunas contra el cáncer. En verdad, se ha encontrado que sí lo hacen en modelos animales, y hay estudios clínicos en curso que combinan una vacuna con inhibición de PD1 o de PD-L1 ⁽³⁴⁾.

Actualmente están en preparación varias vacunas diseñadas para tratar cánceres específicos ⁽³⁵⁻³⁸⁾. Estas incluyen vacunas con células dendríticas para carcinoma metastático de células renales, glioblastoma y cáncer de próstata metastático refractario a hormonas; vacunas autólogas de células tumorales para cáncer colorrectal y linfoma folicular; vacunas anti-idiotípicas para linfomas y algunos tumores sólidos; vacunas diseñadas para estimular una respuesta inmunitaria contra hormonas requeridas para el crecimiento y supervivencia de malignidades gastrointestinales; vacunas alogénicas para cáncer de pulmón; y vacuna con base en el ADN para cáncer metastático de seno.

Muchos tipos de cáncer están en evaluación en estudios clínicos activos de prevención o de tratamiento por medio de vacunas. Las descripciones de estudios clínicos en curso que están probando vacunas para la prevención o el tratamiento de cáncer pueden obtenerse al buscar la lista de estudios clínicos de cáncer del NCI en su sitio web. La lista del NCI de estudios clínicos de cáncer incluye todos los estudios clínicos financiados por el NCI que se llevan a cabo en Estados Unidos y en Canadá, así como en el mundo.

Levy es pionera en el campo de la inmunoterapia contra el cáncer, en la que los científicos tratan de aprovechar el sistema inmunitario para combatir el cáncer. La investigación en su laboratorio condujo al desarrollo de rituximab, uno de los primeros anticuerpos monoclonales aprobados para su uso como tratamiento anticancerígeno en humanos.

Algunos enfoques de inmunoterapia dependen de la estimulación del sistema inmune en todo el cuerpo; otros se dirigen a puntos de control naturales que limitan la actividad anticancerígena de las células inmunes. Aún otros, como la terapia de células T CAR recientemente aprobada para tratar algunos tipos de leucemia y linfomas, necesitan que las células inmunológicas de un paciente se eliminen del cuerpo y se modifiquen genéticamente para atacar las células

tumorales.

Muchos de estos enfoques han sido exitosos, pero tienen desventajas, desde efectos secundarios difíciles de manejar hasta tiempos de preparación o tratamiento de alto costo. "Todos estos avances en inmunoterapia están cambiando la práctica médica -señala Levy-. Nuestro enfoque utiliza una sola aplicación de cantidades muy pequeñas de dos agentes para estimular las células inmunes solo dentro del tumor. En los ratones, vimos efectos sorprendentes en todo el cuerpo, incluida la eliminación de tumores en todo el animal".

Los cánceres a menudo existen en un extraño tipo de limbo con respecto al sistema inmune y las células inmunes como las células T reconocen las proteínas anormales que a menudo están presentes en las células cancerosas y se infiltran para atacar el tumor. Sin embargo, a medida que el tumor crece, suele diseñar formas de suprimir la actividad de las células T.

El método de Levy funciona para reactivar las células T específicas para el cáncer inyectando cantidades de microgramos de dos agentes directamente en el sitio del tumor. Uno de ellos, un tramo corto de ADN llamado oligonucleótido CpG, funciona con otras células inmunes cercanas para amplificar la expresión de un receptor activador llamado OX40 en la superficie de las células T. El otro, un anticuerpo que se une a OX40, dispara las células T para dirigir la carga contra las células cancerosas. Debido a que los dos agentes se inyectan directamente en el tumor, solo se activan las células T que se han infiltrado en él. Estas células T son "preseleccionadas" por el cuerpo para reconocer solo proteínas específicas del cáncer.

Algunas de estas células T activadas por tumores dejan el tumor original para encontrar y destruir otros tumores idénticos en todo el cuerpo. El enfoque funcionó sorprendentemente bien en ratones de laboratorio con tumores de linfoma de ratón trasplantados en dos sitios en sus cuerpos. Inyectar en un sitio del tumor los dos agentes causó la regresión no solo del tumor tratado, sino también del segundo tumor no tratado. De esta manera, se curó el cáncer en 87 de 90 ratones. Aunque el cáncer recidivó en tres de los ratones, los tumores retrocedieron nuevamente después de un segundo tratamiento. Los investigadores observaron resultados similares en roedores con tumores de mama, colon y melanoma.

Los animales genéticamente modificados para desarrollar espontáneamente cánceres de mama en las diez almohadillas mamarias también respondieron al tratamiento. El tratamiento del primer tumor que surgió a menudo evitó la aparición de futuros tumores y elevó significativamente la esperanza de vida de los animales.

Finalmente, Sagiv-Barfi exploró la especificidad de las células T trasplantando dos tipos de tumores a los ratones. Trasplantó las mismas células cancerosas de linfoma en dos lugares y una línea celular de cáncer de colon en un tercer lugar. El tratamiento de uno de los sitios de linfoma causó la regresión de ambos tumores de linfoma, pero no afectó al crecimiento de las células de cáncer de colon. El sistema inmune [nos libra del cáncer](#) continuamente. Además de encargarse de rechazar las invasiones de microbios que amenazan nuestra salud, es capaz de destruir células tumorales antes de que se conviertan en un problema e incluso puede eliminar tumores ya formados. Lo que se podría ver como una curación milagrosa puede ser una buena reacción de las propias defensas ante el cáncer, pero no siempre son suficientes. Desde hace más de un siglo, se intuye el potencial de azucar al sistema inmune contra los tumores, pero hasta la última década no se habían logrado éxitos importantes en la tarea. La situación ha cambiado.

Ahora, según explican en la Universidad de Stanford, Levy y su equipo quieren reunir a 15 pacientes con linfoma para poner a prueba este nuevo enfoque. Si tuviese éxito, Levy cree que este tratamiento podría tener muchas aplicaciones. Por un lado, la inyección de sus dos agentes podría ser un complemento con el que tratar a pacientes antes de que se les extirpase su tumor primario con cirugía. Esta técnica serviría para eliminar también tumores secundarios que hubiesen surgido a partir del principal y que podrían haber pasado desapercibidos. Los autores plantean incluso la posibilidad de diseñar tratamientos que bloqueen el crecimiento futuro de tumores que surgen por mutaciones genéticas, como los BRCA1 y 2 en mama.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] : Bruce A : Molecular Biology of the Cell. Garland Science, 5 ed., 2008.
- [2] :Tiina R, Chapman J.: Mathematical models of avascular tumor growth, SIAM Rev., 2007, 49 ; 179 - 208.
- [3] :Jones D.S., Sleeman B.D. : Differential equations and mathematical biology. In :Mathematical Biology and Medicine Series, Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, FL, USA, 2003.
- [4]: Tsai W.L. : Viral hepato-carcinogenesis. Oncogene, 2010 ; 29: 2309-2324.
- [5] :Hahn, W. C. , Weinberg R.A. : Rules for making human tumor cells." N Engl J Med, 2002 ; 347(20): 1593-1603.
- [6] :Ausprunk D.H, Folkman J : Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. Microvas. Res. 1974;.14 :. 53 - 65.
- [7] :Chaplain M.A.J., Stuart A. : A mathematical model for the diffusion of tumor angiogenesis factor into the surrounding host tissue. J. Math Appl. Med. Biol.,1991;8 :191-220.
- [8]: Darren W.D, Herbst R.S., Abbruzzese J.L. : Antiangiogenic Cancer Therapy, CRC Press, 1a ed., 2008.
- [9]: Gonzalez Baron M., Ordonez A., Feliu J., Zamora P., De Castro J. : Oncologia Clinica, vol. 1, 1998.
- [10]: Naumov G.N., Heymach J., Dr. Folkman's legacy : a life of angiogenesis research, Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica, 2008; 116; 89 - 92.
- [11]. Gordon, S., Taylor P.R. : Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol, 2005 ; 5(12): 953-64.
- [12]. Tacke, F., Randolph G.J: Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. Immunobiology, 2006, 211(6-8): 609-18.
- [13]. Zou, W. : Macrophage-derived dendritic cells have strong Th1-polarizing potential mediated by beta-chemokines rather than IL-12. J. Immunol, 2000. 165 (8): . 4388-96.
- [14]. Akagawa, K.S., Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte derived macrophages. Int J Hematol, 2002. 76(1): 27-34.
- [15]. Van Voorhis, W.C.:, Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. J Exp Med, 1982. 155(4): 1172-87.
- [16]. Kubach, J.: Dendritic cells: sentinels of immunity and tolerance. Int J Hematol, 2005. 81 (3): 197-203.
- [17]. Banchereau, J.: Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol, 2000; 18: 767-811.
- [18]. Nakano, H., Yanagita, M. : CD11c(+) B220 (+) Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med, 2001. 194(8): 1171-8.
- [19]. van Furth, R., Origin and turnover of monocytes and macrophages. Curr Top Pathol, 1989. 79: 125-50.
- [20]. Barreda, D., Hanington P. and Belosevic M : Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. Dev Comp Immunol, 2004. 28(5): 509-54.
- 21.-Pardoll D. Cancer immunology. In: Abeloff M, Armitage J, Niederhuber J, Kastan M, McKenna W, eds. *Abeloff's Clinical Oncology*. 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2008.
- 22.-Murphy KM, Travers P, Walport M, editors. *Janeway's Immunobiology*. 7th ed. New York: Garland Science, 2007.
- 23.-Waldmann TA.: Effective cancer therapy through immunomodulation. *Annual Review of Medicine* 2006; 57:65–81.
- 24.-Emens LA. : Cancer vaccines: on the threshold of success. *Expert Opinion on Emerging Drugs* 2008; 13(2):295–308.
- 25.-Sioud M. : An overview of the immune system and technical advances in tumor antigen discovery and validation. *Methods in Molecular Biology* 2007; 360:277–318.
- 26.-Pazdur MP, Jones JL.: Vaccines: an innovative approach to treating cancer. *Journal of Infusion Nursing*, 2007; 30 (3): 173-178.

- 27.-Butterfield LH. : Cancer vaccines. *British Medical Journal*, 2015; 350: h 988.
- 28.-Rivoltini L, Canese P, Huber V.: Escape strategies and reasons for failure in the interaction between tumour cells and the immune system: how can we tilt the balance towards immune-mediated cancer control? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2005; 5 (4): 463-476.
- 29.-Lollini PL, Cavallo F, Nanni P, Forni G. : Vaccines for tumour prevention. *Nature Reviews Cancer*, 2006; 6 (3): 204–216.
- 30.-Frazer IH, Lowy DR, Schiller JT.: Prevention of cancer through immunization: prospects and challenges for the 21st century. *European Journal of Immunology*, 2007; 37 (Suppl 1): S 148–S 155.
- 31.- U.S. Centers for Disease Control and Prevention. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part 1: immunization of infants, children, and adolescents. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2005; 54 (No. RR–16):1–31.
- 32.- Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. : Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature Medicine* 2004; 10 (9): 909–915.
- 33.- Kantoff PW, Higano CS, Shore ND : Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 2010; 363 (5): 411-422.
- 34.- Berzofsky JA, Wood LV, Terabe M. : Cancer vaccines: 21st century approaches to harnessing an ancient modality to fight cancer. *Expert Review of Vaccines*, 2013; 12 (10):1115-8.
- 35.- Larocca C, Schlom J. : Viral vector-based therapeutic cancer vaccines. *Cancer Journal*, 2011; 17 (5): 359-71.
- 36.- Parmiani G, Russo V, Marrari A.: Universal and stemness-related tumor antigens: potential use in cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 2007; 13 (19): 5675–5679.
- 37.-Parmiani G, De Filippo A, Novellino L, Castelli C. : Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. *Journal of Immunology*, 2007; 178 (4): 1975–1979.
- 38.-Finn OJ.: Cancer immunology.: *New England Journal of Medicine*, 2008; 358 (25): 2704-2715.
- 39.-Curigliano G, Spitaleri G, Dettori M.: Vaccine immunotherapy in breast cancer treatment: promising, but still early. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2007; 7 (9): 1225–1241.
- 40.-Chiarella P, Massi E, De Robertis M, Signori E, Fazio VM. : Adjuvants in vaccines and for immunisation: current trends. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2007; 7 (10): 1551–1562.
- 41.-Herr HW, Morales A. : History of Bacillus Calmette-Guérin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *The Journal of Urology*, 2008; 179 (1): 53–56.
- 42.-Berzofsky JA, Terabe M, Wood LV. : Strategies to use immune modulators in therapeutic vaccines against cancer. *Seminars in Oncology*, 2012; 39 (3): 348-57.
- 43.-Emens LA. : Chemotherapy and tumor immunity: an unexpected collaboration. *Frontiers in Bioscience*, 2008; 13: 249–257.
- 44.-Garnett-Benson C, Hodge JW, Gameiro SR.: Combination regimens of radiation therapy and therapeutic cancer vaccines: mechanisms and opportunities. *Seminars in Radiation Oncology*, 2015; 25 (1): 46-53.
- 45.-Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G.: A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunology and Immunotherapy* , 2001; 50 (1): 3–15.
- 46.-Duan F, Duitama J, Al Seesi S.: Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity. *Journal of Experimental Medicine*, 2014; 211 (11): 2231-48.
- 47.-Kreiter S, Vormehr M, van de Roemer N. : Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* 2015; 520 (7549): 692-6.
- 48.-Schlom J, Arlen PM, Gulley JL. : Cancer vaccines: moving beyond current paradigms. *Clinical Cancer Research*, 2007; 13 (13): 3776–3782.
- 49.-Nag LG, Mrass P, Kinjyo I, Reiner SL, Weninger W.: Two-photon imaging of effector T-cell behavior: lessons from a tumor model. *Immunological Reviews*, 2008; 221: 147–162.
- 50.-Garnett CT, Greiner JW, Tsang KY.: TRICOM vector based cancer vaccines. *Current Pharmaceutical Design*, 2006; 12 (3): 351–361.

- 51.-Zou W. : Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* , 2006; 6 (4): 295–307.
- 52.-Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ.: The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology*, 2007; 8 (3): 239-45.
- 53.-Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR. : Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *New Engl Journal of Medicine*, 2012; 366 (26): 2443-54.
- 54.-Kleponis J, Skelton R, Zheng L. : Fueling the engine and releasing the break: combinational therapy of cancer vaccines and immune checkpoint inhibitors. *Cancer Biology and Medicine*, 2015; 12 (3): 201-8.
- 55.-Liu JK. : Anti-cancer vaccines - a one-hit wonder? *Yale Journal of Biology and Medicine*, 2014; 87 (4): 481-489.
- 56.-Singh BH, Gulley JL.: Therapeutic vaccines as a promising treatment modality against prostate cancer: rationale and recent advances. *Therapeutic Advances in Vaccines* 2014; 2 (5): 137-148.
- 57.-Freeman-Keller M, Goldman J, Gray J.: Vaccine immunotherapy in lung cancer: Clinical experience and future directions. *Pharmacology & Therapeutics*, 2015; 153: 1-9.
- 58.-Tiriveedhi V, Tucker N, Herndon J. : Safety and preliminary evidence of biologic efficacy of a gammaglobin-a DNA vaccine in patients with stable metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 2014; 20 (23): 5964-5975.