

**REEVALUACION DE LA
INMUNOLOGIA TUMORAL**

Simposio Internacional
Academia Nacional de Medicina
Buenos Aires, 27 de agosto de 1996

MEDICINA (Buenos Aires) 1996; 56 (Supl. I): 3-12

VISION RETROSPECTIVA DE LA INMUNIDAD TUMORAL

CHRISTIANE DOSNE PASQUALINI*

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Resumen En la antigüedad, el cáncer era considerado "contrario a la naturaleza", concepto que apoyó Ehrlich a principio de siglo al asentar los cimientos de la inmunología: la definió como la defensa contra todo intruso, incluso el cáncer, y la protección de "lo propio". Este concepto se acentuó aun mas cuando Burnet propuso la teoría de la vigilancia inmunológica que implicaba una destrucción de toda célula neoplásica por los linfocitos T. Surgió entonces la inmunoterapia de los tumores con BCG, levamisol y otros adyuvantes. La aparición del ratón *nude*, atímico, que contrariamente a lo esperado no desarrollaba tumores espontaneos hizo surgir un nuevo paradigma, la teoría de la red, que fuera propuesta por Jerne. Se generó así el concepto de homeostasis inmunológica que implica que tanto lo "propio" como lo "no-propio" puede ser aceptado o rechazado. A partir de la década del 70 se sucedieron varios descubrimientos, tales como la transcriptasa reversa, el oncogen celular y luego los anti-oncogenes que dieron una explicación nueva a la transformación neoplásica. Al aparecer los anticuerpos monoclonales resurgió la esperanza de una lucha selectiva contra el "antígeno tumoral" de muy difícil aplicación. Luego, se amplió el concepto de homeostasis inmunológica con la subdivisión de linfocitos T en Th1 y Th2. Los Th1 favorecen el rechazo (tumoral, fetal o de transplante) a través de la producción de IL-2, interferón y TNF mientras que los Th2 favorecen su tolerancia o aceptación en base a IL-4, IL-5 y IL-10: ambas funciones se neutralizan estableciendo un equilibrio "normal" Th1 vs Th2. Así se podría explicar "el estado de tumores dormidos" o tumores *in situ* los que serían relativamente frecuentes: que cualquier estímulo inmunológico pueda favorecer su proliferación es la base de la teoría de la inmunoestimulación propuesta por Prehn y apoyada por las observaciones clínicas de Stewart. Estos nuevos conceptos han llevado a proponer que en lugar de destruir las células neoplásicas se trate de "domarlas" y mantenerlas en el estado de tumor dormido, en adecuada convivencia con las células normales. El problema es muy complejo y es de esperar que el surgimiento de nuevos paradigmas en un futuro próximo lleve a una inmunoterapia mas efectiva.

Hace 200 años de uno de los experimentos mas trascendentes para la humanidad: la vacuna contra la viruela. Edward Jenner inoculando a un niño el correspondiente virus vacuno de donde la palabra "vacuna" - lo protegió contra la virue-

la¹. Esta vacuna significó la erradicación mundial de la viruela a partir de 1980. Pero además, el hecho en sí presenta muchas enseñanzas para nuestro tema. En primera instancia, Jenner no tenía ningun conocimiento del sistema inmune y su vacuna surgió de un hecho que le llamó la atención: las jovenes que ordeñaban las vacas no se enfermaban de viruela, vale decir que supo sacar provecho de lo que no sólo él sino muchos ya habían observado; ésto es indudable-mente una de las cualidades del investigador. Segundo,

* Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Dirección postal: Dra. Christiane Dosne Pasqualini, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Las Heras 3092, 1425 Buenos Aires, Argentina

el trabajo original describiendo la vacuna fue rechazado por una revista pidiendo más casos; hoy diríamos que esto fue porque describía algo "chocante" por lo nuevo, lo que obviamente es lo típico de los descubrimientos. Esto se repite a menudo por lo cual se ha catalogado a la ciencia como conservadora, por paradójico que parezca. Finalmente, se llegó a la tercera característica de un descubrimiento: una vez aceptada, la vacuna se convirtió en "dogma", en la solución obligada para todas las enfermedades infecciosas y por qué no para todo lo demás, incluso el cáncer. La historia de la investigación - incluyendo al cáncer se desarrolla en una similar tricotomía: observación de lo nuevo; rechazo por "demasiado" nuevo; aceptación hasta convertirse en dogma, o paradigma según la terminología de Kuhn². Luego, se sigue investigando, acumulando datos nuevos hasta que se retorna al principio con muchas "nuevas" observaciones que no concuerdan con el dogma y eventualmente lo derriban, instalándose un nuevo paradigma³.

Esta historia es fácilmente aplicable a la investigación en cáncer y en especial a su relación con la inmunología, la virología y la genética. La lucha contra el cáncer tuvo sus períodos de optimismo seguidos de otros de pesimismo, marcados por cambios de hipótesis, pasando de un paradigma a otro en base a una innumerable cantidad de experimentos que dieron lugar a *breakthroughs*, o descubrimientos, que fueron galardonados con una treintena de Premios Nobel (Tabla 1); tal "ebullición" del tema resulta fascinante para los investigadores que sueñan en alcanzar un día la "conquista del cáncer".

En la antigüedad

El cáncer ha intrigado a los médicos desde el tiempo de Hipócrates quien en el año 400 antes de Cristo dejaba esta enseñanza: Es preferible no tratar el cáncer oculto, porque si se trata los pacientes mueren rápidamente mientras que sin tratamiento se mantienen vivos por largo tiempo⁴. Si bien el enfoque hipocrático era empírico, sugería que cualquier "estimulación terapéutica" podía empeorar la situación. Claudius Galeno (138-201) también opinaba que en casos de cáncer no había que intervenir, atribuyéndolo a un exceso de bilis negra (*atrabilis*)⁴. Habló de los tumores como "contrarios a la naturaleza" (*tumo-*

res praeter naturam) dando lugar a un concepto, o hasta dogma, que perduró casi hasta nuestros días según connotación que en 1977 adoptó el reconocido epidemiólogo norteamericano, Michael Shimkin, para el título de su importante monografía sobre la historia del cáncer⁴.

El ratón

Al inicio de nuestro siglo surgió la "gran vedette del cáncer experimental": el ratón. En 1904, Leo Loeb hizo el primer trasplante de un tumor en un grupo de ratones conocidos como *Japanese Waltzing mice*; estos tumores no se rechazaban: en realidad, por serendipismo, o sea al azar, había caído en los primeros ratones endocriados: eran ratones con un defecto cerebelar recesivo que se criaban seleccionando el defecto con el objeto de exhibirlos en circos⁵. En cambio, cuando se transplantaban tumores de un ratón cualquiera a otro, los rechazos eran lo más frecuente generando el primer entusiasmo de un posible "ataque del organismo contra el cáncer". Se hicieron un sinnúmero de trasplantes de tumores en ratones con fluctuaciones de 0 a 100% de rechazos, lo que llevó a Woglom⁶ a escribir en 1929 una revisión de "inmunidad tumoral" impresionante por sus 600 referencias. Toda esta confusión fue parcialmente aclarada por Bittner⁷, tres años más tarde, al encontrar "altos y bajos respondedores" en los cuales crecía o no el injerto tumoral, respectivamente. Estos experimentos lo llevaron a descubrir en las hembras "alta respondedoras" un "factor leche" correlacionado con la incidencia de tumores de mama; no se atrevió en aquel entonces a hablar de "un virus" pero de hecho había descubierto el MMTV (*murine mammary tumor virus*)⁸.

Ya en 1910, Peyton Rous escribía: "¿No será que la resistencia de un ratón al tumor transplantado se deba simplemente a la expresión de una resistencia a los tejidos en general? y luego concluía "todos los neoantígenos tumorales son compartidos con tejidos normales"⁵. Rous fue un pionero no sólo en estas apreciaciones sino que fue el descubridor en 1911 del virus del sarcoma que lleva su nombre, sarcoma de Rous, al conseguir transplantar ese tumor de un ratón a otro con extractos libres de células⁹. Este descubrimiento del "virus de Rous", agente causal del tumor, era tan inesperado que lo asom-

bró a él mismo, por lo cual sólo retomó el tema años después, lo que le valió el Premio Nobel en 1966, 55 años más tarde (Tabla 1).

Fue recién en la década del 30, que Little, Snell, Strong¹⁰ y otros en el Jackson Memorial Laboratory iniciaron la endocría programada, estableciendo distintas cepas "singeneicas" al cruzar estrictamente hermano con hermana por más de 20 generaciones. Esto abrió la posibilidad de llevar a cabo experimentos en un número grande de animales singeneicos (genéticamente iguales) comparándolos con los correspondientes controles. Gorer¹¹ mapeó los antígenos de histocompatibilidad del ratón, el sistema H-2, y demostró que no se rechazaban los tumores transplantados no sólo en ratones singeneicos sino también en los de cepas que compartían el mismo H-2.

Nacimiento de la inmunología

La inmunología hizo su aparición a principio de siglo con Paul Ehrlich¹², quien la definía como la defensa del organismo contra todo intruso (o agente *no-propio*) en oposición a la protección de los tejidos normales que eran *lo-propio* con la connotación *horror autotoxicus*; incluía al tumor dentro de la denominación de *no-propio* o intruso - *de nuevo*, lo consideraba contrario a la naturaleza.

Inmunogenicidad de los tumores

En las décadas del 40 y 50 aparecieron las primeras evidencias experimentales a favor de la inmunogenicidad de los tumores. Tanto Gross como Foley como Baldwin⁵ y especialmente Prehn y Main¹³ demostraron que los tumores inducidos por carcinógenos químicos, como el metilcolantreno, eran rechazados en ratones singeneicos previamente inmunizados o "vacunados" con el mismo tumor, pero que no había inmunidad cruzada entre un tumor y el otro. En cambio en los tumores inducidos por virus había una fuerte inmunidad cruzada entre tumores inducidos por el mismo virus, por ejemplo, con el virus de Rous. En 1960, Klein y cols¹⁴ demostraron que el tumor autóctono podía inmunizar a su huésped: es decir, al extirpar el tumor y reimplantarlo en el mismo animal no llegaba a desarrollarse. Se habló entonces de antígenos tumor-

específicos en contraposición a antígenos tumor-asociados (con tejidos normales). Sin embargo, años más tarde Hewitt¹⁵ al estudiar una larga serie de tumores nacidos espontáneamente en ratones y ratas comprobó que éstos tumores no eran inmunogénicos, hallazgo que reabrió la discusión.

Tolerancia inmunológica

En la década del 50, Medawar¹⁶ y Burnet (Tabla 1) introdujeron el concepto de tolerancia inmunológica, demostrando que ratones recién nacidos no rechazaban la piel, ni el tumor, de otra cepa. El concepto de inmunodeficiencia del neonato se convirtió en un dogma, el cual hoy también se cuestiona: comparando distintas dosis de antígenos el neonato también es capaz de montar una respuesta inmune, y por otra parte, el adulto también puede presentar tolerancia según la vía de presentación y dosis del antígeno^{17, 18}.

Exacerbación tumoral

En 1958, Kaliss^{19,20} demostró que el pretratamiento de un ratón con extracto acelular del tumor inoculado 10 días después conducía a una exacerbación tumoral (*tumor enhancement*), obviamente un efecto opuesto al rechazo. Esta observación en la época de inicio de nuestro laboratorio, condujo paulatinamente y por serendipismo al "modelo del cilindro de vidrio". La implantación subcutánea de ese cuerpo extraño en la vecindad de un trasplante tumoral permitía la proliferación de tumores en ratones alogeneicos (en los cuales no crecían en ausencia del cilindro de vidrio). Este modelo dió origen a un gran número de experimentos convirtiéndose en un sistema de balanza que permitía el estudio de factores tanto de rechazo como de exacerbación tumoral^{21, 23}. Lo llamativo fue que el día 14 después del implante tumoral resultó ser el momento clave en que 50% iban al rechazo mientras que los demás proliferaban rápidamente²⁴. Estos experimentos nos llevaron a postular que si bien el huésped era capaz de rechazar un injerto tumoral también era capaz de ayudar activamente a su desarrollo. Esto último apoyaba la teoría de la innoestimulación tumoral propuesta por Prehn^{25,26}.

TABLA 1

PREMIOS NOBEL DE MEDICINA EN ONCOLOGIA, INMUNOLOGIA, VIROLOGIA Y GENETICA

Año	Premiado(s)	Editoriales*	Tema(s)
1901	von Behring		suero anti-diférico
1905	Koch		tuberculosis
1908	Ehrlich, Metchnikoff		inmunidad
1912	Carrel		cultivo de tejido
1913	Richet		anafilaxis
1919	Bordet		interacciones antígeno-anticuerpo
1927	Fibiger		<i>Spirotera neoplásica</i>
1930	Landsteiner		grupos sanguíneos humanos
1951	Theiler		vacuna contra la fiebre amarilla
1957	Bovet		antihistaminas
1960	Burnet, Medawar		tolerancia inmunológica
1962	Watson, Crick	1a*	estructura del DNA
1965	Jacob, Lwoff, Monod		el operón
1966	Rous, Huggins		virus de Rous; hormonas y cáncer
1969	Delbruck, Hershey, Luria		fagos y plásmides
1972	Porter, Edelman		química de los anticuerpos
1975	Dulbecco, Temin, Baltimore	2a	transcriptasa reversa
1976	Blumberg, Gajdusek	3a	antígeno australiano; virus lentos
1977	Yalow (Guillemin, Schally)	4a	radioinmunoensayos
1978	Arber, Smith, Nathans	5a	enzimas de restricción
1979	Hounsfield, Cormack	6a	tomografía computada
1980	Snell, Benacerraf, Dausset	7a	antígenos de histocompatibilidad
1983	McClintock	8a	transposones
1984	Milstein, Köhler, Jerne	9a, 10a	anticuerpos monoclonales; teoría de la red
1987	Tonegawa	11a	genes de inmunoglobulinas
1988	Ellon, Hitchings, Black	12a	quimioterapia
1989	Bishop, Varmus	13a	oncogenes celulares
1990	Murray, Thomas	14a	transplante de médula
1992	Krebs, Fischer	15a	fosforilaciones protéicas
1993	Sharp, Roberts	16a	intrones
1994	Rodbell, Gilman	17a	transducciones de señales
1995	Lewis, Nüsslein-Volhard, Wieschaus	18a	desarrollo embrionario

* Editoriales sobre los Premios Nobel de Medicina y Fisiología publicados en *Medicina (Buenos Aires)*

- 1a. Pasqualini CD. De la doble hélice a la terapia génica. *Medicina (Buenos Aires)* 1993;53:185-6
- 2a. Pasqualini CD. Virus oncogénicos. Premio Nobel de Medicina y Fisiología, 1975. *Medicina (Buenos Aires)* 1975;35:646-7
- 3a. Editorial. Premio Nobel de Medicina 1976. *Medicina (Buenos Aires)* 1976;36:622-3
- 4a. Pasqualini RQ. Premio Nobel de Medicina 1977. *Medicina (Buenos Aires)* 1977;37:586-8
- 5a. Jaim Etcheverry G. Manipulando el material genético. Premio Nobel de Medicina 1978. *Medicina (Buenos Aires)* 1978;38:731-3
- 6a. Lanari CF. Premio Nobel de Medicina 1979. *Medicina (Buenos Aires)* 1979;39:853-4
- 7a. Pasqualini CD. Premio Nobel de Medicina 1980. Inmunogenética. *Medicina (Buenos Aires)* 1980;40:890-1
- 8a. Rabasa SL. Premio Nobel de Medicina 1983: los transposones. *Medicina (Buenos Aires)* 1983;43:892-3
- 9a. Stoppani AOM. Premio Nobel de Medicina 1984. *Medicina (Buenos Aires)* 1985;45:77-8
- 10a. Pasqualini CD. Un paralelo entre la inmunología y la lingüística. *Medicina (Buenos Aires)* 1985;45:587-8
- 11a. Piazzón I, Pasqualini CD. Premio Nobel de Medicina 1987;48:97-9
- 12a. Adler Graschinsky E. Premio Nobel de Medicina 1988: pioneros en la investigación de drogas. *Medicina (Buenos Aires)* 1988;48:707-8
- 13a. Pasqualini CD. Premio Nobel de Medicina 1989: oncogenes y anti-oncogenes en la transformación neoplásica. *Medicina (Buenos Aires)* 1989;49:629-31
- 14a. Firmat J, Sanchez Avalos JC. Premio Nobel de Medicina 1990. Aplicación clínica de los trasplantes. *Medicina (Buenos Aires)* 1991;51:177-8
- 15a. Torres HN. Premio Nobel de Medicina 1992: Edwin Krebs y Edmond Fischer. Las fosforilaciones protéicas y un verano caliente. *Medicina (Buenos Aires)* 1993;53:81-4
- 16a. Kornblith AR. La inesperada complejidad de los genes eucariotas. Premio Nobel de Medicina 1993, Philip Sharp y Richard Roberts. *Medicina (Buenos Aires)* 1993;53:563-5
- 17a. Flawia MM. Premio Nobel de Medicina 1994: Martin Rodbell y Alfred Gilman. Transducción de señales. *Medicina (Buenos Aires)* 1995;55:75-80
- 18a. Jaim Etcheverry G. Premio Nobel de Medicina 1995: Edward B. Lewis, Christiane Nusslein-Volhard, Eric Wieschaus. Las moscas y las claves del desarrollo embrionario. *Medicina (Buenos Aires)* 1995;55:715-17

Surveillance inmunológica

En 1970, Burnet lanzó la teoría de la *surveillance* o vigilancia inmunológica, término acuñado por Lewis Thomas^{27,28}. Tal vigilancia implicaba que el sistema inmune a través de sus linfocitos T eliminaba toda célula cancerosa naciente: era el policía que rechazaba al "intruso, al no propio, al contrario a la naturaleza". Esta teoría se convirtió rápidamente en dogma, mas que todo por un fenómeno de *wishful thinking* - uno quisiera que fuera así.

Surgió entonces el interés por la inmunoterapia de los tumores: había que aumentar la respuesta inmune de los pacientes, la de los linfocitos T; se empleó la escarificación con BCG (*Bacilo Calmette-Guérin*), se administraron *Corynebacterium parvum*, levamisol y otros adyuvantes²⁹. A pesar de todos los intentos de reforzar la respuesta del organismo contra el tumor, éste seguía proliferando; por lo tanto hubo que buscar otras explicaciones. Tal falta de rechazo tumoral significaba una falla de la vigilancia inmunológica y ello llevó a involucrar, entre otros, a linfocitos supresores y anticuerpos bloqueantes, ambos conceptos hoy obsoletos.

Finalmente, la aparición de los ratones atímicos o *nude* (la mutación incluye alopecia) sin linfocitos

T, fue el golpe de gracia que derribó al dogma de la vigilancia inmunológica: estos ratones no desarrollaban tumores espontáneos a pesar de que no rechazaban el injerto de tumores alo y xenogénicos (humanos)³⁰.

Virus oncogénicos

En 1971, Nixon firmó el *National Cancer Act*. Los americanos querían librar una guerra contra el cáncer (*the conquest of cancer*) con el razonamiento que "si pudimos llegar a la luna, al disponer de la misma cantidad de dinero podremos vencer al cáncer". Se había vencido a la poliomielitis y Sabin proponía hacer lo mismo con el lema "un cancer, un virus, una vacuna". El hecho era que se había demostrado que los virus eran agentes causales de sarcomas y leucemias a lo largo de la escala animal; ¿porqué no iba suceder lo mismo en el hombre? El resultado fue un enorme esfuerzo en experimentos y subsidios, y una secuencia de descubrimientos que hicieron tambalear paradigmas que luego fueron reemplazados por otros.

Después del descubrimiento del virus de Rous⁹, inductor del sarcoma de Rous, se descubrieron una serie de virus asociados a tumores de ratón²³: el virus de Moloney, de Friend, de Graffi

etc..cada uno aislado de un tumor (y en general una sólo vez) en el laboratorio y mantenido por pasajes seriados en ratones singeneicos. De una leucemia originada espontáneamente, Gross pudo aislar un virus que lleva su nombre (virus de Gross). También se descubrió que los rayos X inducían leucemias en las cuales se aislaba un virus (virus de Kaplan). Esto se pudo confirmar en nuestro laboratorio, no sólo con rayos X sino también con la administración de fósforo radioactivo^{31, 32}. Era evidente que estos últimos virus no eran exógenos, sino endógenos, lo que apoyaba la "teoría del oncogen" propuesta por Huebner y Todaro³³, la que decía: toda célula tiene incorporado en su genoma un virus capaz de producir un cancer, el cual normalmente no se expresa. Cuando Temin y Baltimore³⁴ demostraron que el virus de Rous (virus RNA) se copiaba a DNA mediante la transcriptasa inversa (en contra del dogma) para luego incorporarse en el genoma en forma de provirus, esta teoría se afirmó y nació la retrovirología. Al recibir el Premio Nobel por ese descubrimiento, Temin³⁵ decía " si podemos encontrar la proteína codificada por el provirus de Rous y hacer un anticuerpo contra ella, tendremos (la vacuna) que solucionara el problema del cáncer"; se encontró esa proteína, la pp60, pero no fue la solución. La razón la dieron Bishop y Varmus^{36,37} cuando demostraron que el oncogen del virus de Rous (v-src) pertenecía al genoma celular (c-src) y que el retrovirus no era más que el vector capaz de transportarlo de un sitio a otro. Se habló entonces de retrotransposones (DNA a RNA a DNA) en contrapartida de transposones (DNA a DNA) descritos por Barbara McClintock (Tabla 1). Se demostraba de esta manera la enorme flexibilidad del genoma celular. Paulatinamente se fueron encontrando la copia celular (onc-c) de todos los oncogenes virales (onc-v) descritos anteriormente en aves, ratones, etc.. Se encontraron varias copias de onc-c expresadas en tumores humanos³⁸. En cuanto a la transformación neoplásica de células normales se la pudo obtener in vitro mediante su transfección secuencial con dos o mas oncogenes³⁹. Ya no quedaba duda de que la célula neoplásica era "propia" del organismo y que dejaba de ser considerada como "contraria a la naturaleza".

Vacunar contra el cáncer

En modelos murinos se hicieron muchos intentos de inmunizar o "vacunar" contra los sarcomas y leucemias inducidos por virus.

En nuestro laboratorio, trabajando con el Sarcoma 180 (S-180) en ratones Swiss, se comprobó que los animales que habían rechazado el tumor desarrollaban una leucemia inducida por un virus (L-180) con antigenicidad cruzada entre S-180 y L-180^{40,41}. Luego, Basombrío y cols⁴² con el intento de "vacunar" contra una leucemia inducida por el virus de Moloney, inmunizaron ratones con pseudotipos virales para luego desafiarnos con distintos implantes de células leucémicas: estos últimos no crecieron, se había conseguido vacunar, pero sólo a corto plazo, ya que inesperadamente este procedimiento incrementó la aparición de leucemias "espontáneas"⁴³. Estos resultados tan frustrantes para una posible vacuna contra el cáncer, abrieron, sin embargo, la posibilidad de una vacuna contra la enfermedad de Chagas⁴⁴.

Homeostasis inmunológica

Al cuestionarse la surveillance inmunológica, surgió un nuevo paradigma. En 1974, Jerne⁴⁵ propuso "la teoría de la red" cuyo *leit motiv*, *contraria sum complement* (los opuestos se complementan), implicaba aceptación y rechazo tanto de lo ajeno como de lo propio. La teoría de la red dice que para cada antígeno hay un anticuerpo, y que cada anticuerpo a su vez genera un anticuerpo: esto se debe a que cada anticuerpo tiene en su región hipervariable un determinante antigénico (idiotipo) capaz, a su vez, de generar otro anticuerpo (anti-idiotipo). De esta manera se forma una red de reacciones y contrarreacciones que tiende a mantener un equilibrio, es decir, una homeostasis inmunológica. Al recibir el Premio Nobel en 1984 (Tabla 1), Jerne⁴⁵ trazó una interesante analogía entre la inmunología y la lingüística, concluyendo que el sistema inmune era capaz de responder a cualquier "frase antigénica" por nueva que fuera.

Este concepto de homeostasis inmunológica fue paulatinamente reemplazando el de la vigilancia inmunológica. Ya no se hablaba sólo de re-

chazo de lo no-propio sino de su aceptación "activa"; de la misma manera, se borraba el *horror autotoxicus* aceptando el rechazo de lo propio y se establecía un equilibrio entre rechazo y aceptación. En cuanto al tumor, el organismo podía tanto rechazarlo como exacerbar su crecimiento; así la comparación entre la relación huésped-tumor y materno-fetal se acentuaba. Nuestros experimentos apoyaban esta teoría: habíamos demostrado que existía una hiperestimulación de los linfocitos T necesaria tanto para el inicio del trasplante tumoral⁴⁷ como para el inicio de la preñez^{48,49}.

Los anticuerpos monoclonales

Cada linfocito B produce un sólo anticuerpo: esto es uno de los dogmas de la inmunología. La hibridación entre un linfocito productor de un anticuerpo determinado y una célula transformada (mieloma) llevó a Milstein y Kohler⁵⁰ a la producción de anticuerpos monoclonales. Este descubrimiento (Tabla 1) despertó gran entusiasmo, el cual perdura hasta el día de hoy, generando intentos para lograr un antígeno tumoral, producir el anticuerpo monoclonal correspondiente y emplearlo para el tratamiento del paciente con cáncer; esto se ha conseguido en contados casos de linfoma y de melanoma pero tiene inconvenientes serios, no sólo porque los antígenos tumorales son en general tumor-asociados (compartidos con antígenos normales) sino que por definición la teoría de la red implica una metabolización rápida de todo nuevo antígeno⁵¹.

Los oncogenes y las anti-oncogenes

Si bien la década del 80 fue llamada la década del oncogen, la del 90 se inició con la presentación del anti-oncogen. Harris y cols⁵² habían demostrado que la fusión de una célula normal con una neoplásica muchas veces daba un híbrido normal, lo que sugería que a la célula transformada le faltaba algo. Esto se confirmó cuando se descubrió que el retinoblastoma se debía a la falta de un gen que se denominó "gen supresor de tumor" o anti-oncogen: al quitarle un "freno" que la mantenía normal, la célula se transformaba⁵³. Y así fue creciendo la lista de anti-oncogenes hasta ser casi mas numerosa que la de los oncogenes⁵⁴. En la actualidad se postula

que la transformación celular se debe a una secuencia de "activación de oncogenes y delección de anti-oncogenes", constituyendo una cascada de eventos, como la descrita por Vogelstein^{55,56} para el cáncer de colon, al precisar los sucesivos pasos desde el pólipo hasta las metastasis.

La dicotomía de los linfocitos T: Th1 vs Th2

Una vez establecido el concepto de homeostasis inmunológica, surgió paulatinamente la dicotomía de la respuesta inmune, tanto en contra como a favor del crecimiento tumoral. En 1986, esta dicotomía abarcó a los linfocitos T *helper* CD4+ cuando Mosmann y cols⁵⁷ los subdividieron en Th1 y Th2. En este doble juego de linfocitos T, *los Th1 favorecen el rechazo* con la producción principalmente de IL-2 (interleukina 2), interferón y TNF (factor de necrosis tumoral) mientras que *los Th2 favorecen la tolerancia* con la elaboración de IL-4, IL-5 y IL-10. Estas últimas linfoquinas serían capaces de bloquear el efecto de IL-2 e interferón estableciendo un equilibrio "normal" Th1 vs Th2. Este modelo ha evolucionado incorporando nuevas citoquinas aunque nuevas observaciones lo han complicado en tal forma que se lo empieza a cuestionar⁵⁸. De todas maneras ha permitido profundizar el papel del sistema inmune en la "protección" del organismo frente al desarrollo fetal⁵⁹ y tumoral⁶⁰.

¿Qué han significado estos últimos descubrimientos para la inmunoterapia del cáncer? Después del fracaso de los adyuvantes, los inmunomoduladores biológicos - el interferón y otros - tuvieron un momento de auge, pero no dieron los resultados esperados⁶¹. En cambio, el empleo de IL-2 en el control del tumor tuvo y sigue teniendo sus adictos. Potencialmente IL-2 aumenta el efecto de las células NK (*natural killers*) y aumenta la citotoxicidad por linfocitos CD8 y por macrófagos: es la mejor herramienta del sistema inmune para el rechazo tumoral. Rosenberg y cols⁶² han empleado IL-2 recombinante para estimular in vitro las células LAK (*lymphocyte activated killers*) obtenidas de la sangre periférica del paciente, reinyectándolas a los pocos días (sistema *ex-vivo*) junto con la administración continua de IL-2. Posteriormente perfeccionaron el método reemplazando las células LAK por células TIL (*tumor infiltrating lymphocytes*). Se obtuvieron resultados comparables con la administra-

ción de IL-2 sólo, pero la toxicidad de ambos procedimientos, su costo y especialmente su discutible éxito, reducido a pocos casos de melanoma y cáncer renal, hicieron que este tratamiento no prosperara⁶³. Sin embargo, tal es el interés y "la fe" en IL-2 que se ha propuesto ensayar una terapia génica incorporándola en células somáticas del propio paciente, sean leucocitos o aun células tumorales⁶⁴. De nuevo se habla de una vacuna "génica" contra el cáncer.

Uno se pregunta ¿qué posibilidad de éxito puede tener la inmunoterapia con IL-2 u otra "vacuna"? Tomando en cuenta la homeostasis inmunológica apoyada en el equilibrio Th1 vs Th2, una vez que la balanza se inclina hacia "la aceptación tumoral" bajo Th2, su efectividad se basa en el bloqueo de la rama Th1, lo que vale decir que el sistema *no permitirá* que IL-2 funcione; al administrar IL-2, automáticamente el bloqueo se hará cada vez mas efectivo.

El estado de tumor dormido:

De esta larga enumeración de factores involucrados en la transformación neoplásica, el crecimiento del tumor y su tratamiento ¿qué nos queda? Por cierto una gran acumulación de hechos confirmados dentro de cada contexto experimental, pero ninguna explicación valedera para el problema en su totalidad. Cada concepto, dogma o moda no resiste al tiempo, y da lugar a diversas y sucesivas interpretaciones. En una serie de artículos con el lema *Rethinking cancer*⁶⁵ se propone que en lugar de tratar de destruir todas las células neoplásicas se ensaye "domarlas" para una adecuada convivencia con las células normales. De hecho se encuentran muchos tumores *in situ* en autopsias normales. Este "estado de tumor dormido" se ve apoyado por la teoría de la inmoestimulación de Prehn⁶⁶ y por un libro editado en 1992 por Stewart y Wheelock⁶⁷.

Hoy, en este Simposio, tanto Prehn, a nivel teórico, como Stewart, a nivel clínico, ampliarán sus observaciones. A nivel experimental, Klein nos relatará los experimentos que también apoyan esta teoría llevados a cabo en el Instituto de Oncología Angel H. Roffo, mientras que Hajos, de la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, nos hablará de la caracterización de una línea tumoral, LB. Con este mis-

mo tumor, que se originó en nuestro laboratorio, según comentará Ruggiero, se pudo demostrar que la presencia de un implante tumoral inhibe el desarrollo de un segundo implante del mismo tumor por el fenómeno conocido como resistencia concomitante; el segundo implante no crece, manteniéndose en un estado de tumor dormido favorecido por la presencia de un factor sérico antitumoral. Colaborando en ese tema en nuestro laboratorio, Bustuoabad nos hablará de la interrelación entre mesénquima y tumor y del papel regulador del colágeno sobre la proliferación y muerte de las células tumorales. Y finalmente, para Sporn⁶⁸ el carcinoma no sería la enfermedad de una célula sino que respondería a una compleja falla de la homeostasis que involucra una rotura de la normal comunicación entre epitelio y mesénquima, la cual lleva eventualmente a crecimiento tumoral, invasión y metástasis.

Reflexiones:

Después de esta larga secuencia de paradigmas intercalando esperanza y decepción, pareceríamos estar de vuelta a la observación empírica de Hipócrates, la "de no tratar un tumor oculto", como introducción a la "teoría de la hiperestimulación del tumor" propuesta por Prehn y objeto principal de este Simposio. Es probable que en un futuro próximo surjan otras hipótesis y dogmas, ya que no tenemos "la solución del cáncer". Al respecto, aptas son las palabras del poeta Robert Frost:

*We dance round in a ring and suppose
But the Secret sits in the middle and knows*

Summary

A retrospective vision of tumor immunology

The story of tumor immunology includes periods of hope followed by ones of disenchantment as far as clinical applications are concerned. In antiquity, cancer was considered "contrary to Nature", a concept which was confirmed by Ehrlich at the beginning of our century when he laid down the foundations of immunology. The latter was defined as the defence against all "non-self" intruders, including cancer, as opposed to the protection of "self". This concept was further accentuated by the theory of immunesurveillance

proposed by Burnet in 1969 which implicated a destruction of nascent neoplastic cells by T lymphocytes. To increase host defence was the basis of tumor immunotherapy with BCG, levamisole and other adjuvants. The appearance of the nude mouse, athymic, and yet free of spontaneous tumors, led to a new paradigm, the network theory proposed by Jerne. This was based on immunological homeostasis implicating that both "self" and "non-self" can be rejected and tolerated. Cancer gradually ceased to be considered as "contrary to Nature".

As for the proposed viral etiology of cancer which was the basis of the National Cancer Act signed by Nixon in 1971, this led to various breakthroughs and Nobel Prizes (Table 1), to discoveries such as reverse transcriptase, cellular oncogenes, tumor suppressor genes, which gave a new explanation for neoplastic transformation. The latter can now be considered as the consequence of a cascade of molecular events which include oncogene expression, anti-oncogene deletion, etc., converting, step by step, for instance, a polyp into a colon cancer and its metastases.

The availability of monoclonal antibodies capable of attacking tumor cells did not lead to the expected success because of the complexity of the immune system. Attempts at a better understanding of the latter have led to a subdivision of the T lymphocyte CD4 population into Th1 and Th2. Th1 favor rejection (tumoral, fetal or of transplants) through the elaboration of IL-2, IFN and TNF while Th2 lead to tolerance or acceptance through the production of IL-4, IL-5 and IL-10: both functions neutralize each other establishing a "normal" equilibrium Th1 vs Th2. This could explain the state of "tumor dormancy" or tumors *in situ* which are apparently quite frequent. That any immunological stimulation would cause these dormant tumors to proliferate is the basis of the immunostimulation theory proposed by Prehn and supported by the clinical observations of Stewart. This new concept has led some authors to propose that instead of destroying the tumor cells an attempt be made to maintain them in a state of dormancy in congenial company with normal cells.

Bibliografía

1. Editorial. Jenner, la prudencia y la temeridad. *Medicina (Buenos Aires)* 1969; 29: 306-7.
2. Kuhn TS. The structure of scientific revolutions. Chicago: University of Chicago Press, ed. 2, 1970.
3. Lightman A, Gingerich O. When do anomalies begin? *Science* 1991; 255: 690-5.
4. Shimkin MB. Contrary to Nature. Bethesda: National Institutes of Health, 1977.
5. Scott OCA. Tumor transplantation and tumor immunity: A personal view. *Cancer Res* 1990;50: 757-63.
6. Woglom WH. Immunity to transplantable tumours. *Cancer Res* 1929; 4: 129-214.
7. Bittner JJ. Genetic studies on the transplantation of tumors. III. Interpretations of apparent rhythms. *Am J Cancer* 1932; 16: 1144-52.
8. Bittner JJ. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 1935; 84: 162-8.
9. Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med* 1911;13:397-411.
10. Strong L. Inbred mice in science. In: Origins of inbred strains. Morse HC (ed), New York:Academic Press, 1978, pp 45-67.
11. Gorer PA. The antigenic basis of tumour transplantation. *J Pathol Bacteriol* 1938; 47: 231-52.
12. Ehrlich P. On immunity with special reference to cell life. *Proc R Soc Lond (Biol)* 1900; 661: 424-8.
13. Prehn RT, Main JM. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 1957; 18: 769-78.
14. Klein G, Sjogren HO, Klein E, Hellstrom KE. Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res* 1960;20: 1561-72.
15. Hewitt HB, Blake ER, Walder AS. A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. *Br J Cancer* 1976; 33: 241-59.
16. Medawar PB. Immunological tolerance: phenomenon of tolerance provides testing ground for theories of immune response. *Science* 1961; 133: 303-6.
17. Ridge JP, Fuchs EJ, Matzinger P. Neonatal tolerance revisited: Turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science* 1996; 271: 1723-6.
18. Forsthuber T, Yip HC, Lehrmann PV. Induction of Th1 and Th2 immunity in neonatal mice. *Science* 1996;271: 1728-30.
19. Kaliss N. Immunological enhancement of tumor homografts in mice: a review. *Cancer Res* 1958; 18: 992-1003.
20. Kaliss N. The transplanted tumor as a research tool in cancer immunology. *Cancer Res* 1961; 21: 1203-8.
21. Saal F, Colmerauer MEM, Braylan RC, Pasqualini CD. Tumor growth in allogeneic mice bearing a luciferase cylinder. *J Natl Cancer Inst* 1972; 49: 451-8.
22. Pasqualini CD. Why does a tumor grow? *Allergol Immunopathol* 1976; 4 :449-60.
23. Pasqualini CD. Etiología del cáncer: del ratón al hombre. *Medicina (Buenos Aires)* 1985; 45: 65-76.
24. Filippa DA, Pasqualini CD. Morphological study of allogeneic tumor growth in mice bearing a glass cylinder. *Medicina (Buenos Aires)* 1975; 35: 29-36.
25. Prehn RT, Lappé MA. An immunostimulation theory of tumor development. *Transpl Rev* 1971; 7: 26-54.
26. Prehn RT. Tumor progression and homeostasis. *Adv Cancer Res* 1976; 23: 203-24.
27. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13: 1-27.
28. Burnet FM. Immunological surveillance in neoplasia.

- sia. *Transplant Rev* 1971; 7: 3-25.
29. Foon KA. Biological response modifiers: The new immunotherapy. *Cancer Res* 1989; 49: 1621-8.
 30. Stutman O. Immunodepression and malignancy. *Adv Cancer Res* 1975; 22: 261-422.
 31. Saal F, Pasqualini CD, Rabasa SL: Acción leucemógena de los rayos X en ratones BALB; efecto de la esplenectomía. *Medicina (Buenos Aires)* 1970; 30: 365-71.
 32. Holmberg EAD, Vázquez C, Pasqualini CD, Pavlovsky A, Rabasa SL: Acellular passage of 32P-induced leukemia: an electron microscopic study. *Cancer Res* 1967; 27: 198-204.
 33. Huebner RJ, Todaro GJ. Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc Natl Acad Sc* 1969; 64: 1087-9.
 34. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 1970; 226: 1209-12.
 35. Temin HM. The DNA provirus hypothesis. The establishment and implications of RNA directed DNA synthesis. *Science* 1976; 192: 1073-80.
 36. Bishop JM. Cellular oncogenes and retroviruses. *Ann Rev Biochem* 1983; 52: 301-86.
 37. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991; 64: 235-8.
 38. Slamon DJ, de Kernion JB, Verma IM, Cline MJ. Expression of cellular oncogenes in human malignancies. *Science* 1984; 224: 256-60.
 39. Land H, Parada LF, Weinberg RA. Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* 1983; 222: 771-4.
 40. Pasqualini CD, Holmberg EAD, Rabasa SL, Pavlovsky A. Immunity to Sarcoma 180 and the induction of a leukemia-like condition. *Cancer Res* 1961; 21: 387-9.
 41. Pasqualini CD, Holmberg EAD, Rabasa SL, Pavlovsky A: Leukemia induced by Sarcoma 180 and the development of reciprocal immunity. *Cancer Res* 1963; 23: 974-7.
 42. Basombrio MA, Mayer AMS, Pasqualini CD: Murine sarcoma virus pseudotypes used as immunogens against viral and chemical oncogenesis. *Cancer Res* 1977; 37: 1768-76.
 43. Mayer AMS, Basombrio MA, Pasqualini CD: Enhanced growth of syngeneic Moloney sarcoma with decreased immunity in the regressors. *Br J Cancer* 1977; 36: 173-6.
 44. Basombrio MA. Resistencia a re-infecciones por el *Trypanosoma cruzi* en ratones chagásicos. *Medicina (Buenos Aires)* 1981; 41(Supl 1) :232-6.
 45. Jerne NK. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Institut Pasteur)* 1974; 125c: 373-9.
 46. Jerne NK. The generative grammar of the immune system. *Science* 1985; 229: 1057-9.
 47. Piazzon I, Déroche A, Pasqualini CD: Kinetics of the Graft versus Host reaction during allogeneic tumor enhancement. *Arch Geschwulstforschung* 1980; 50: 322-6.
 48. Piazzon I, Matusevich M, Déroche A, Nepomnaschy I, Pasqualini CD: Early increases in graft-versus-host reactivity during pregnancy in the mouse. *J Reprod Immunol* 1985; 8: 129-37.
 49. Pasqualini CD, Nepomnaschy I, Piazzon I. Inmunología de la relación materno-fetal. *Medicina (Buenos Aires)* 1990; 50: 369-73.
 50. Milstein C. From the structure of antibodies to diversification of the immune system. *EMBO J* 1985; 4: 1083-92.
 51. Pasqualini CD. Anticuerpos monoclonales. Perspectivas terapéuticas. *Bol Acad Nac Med* 1989; 67: 281-6.
 52. Harris H, Miller OJ, Klein G, Worst P, Tachibana T. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 1969; 223: 363-5.
 53. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science* 1991; 254: 1138-41.
 54. Hunter T. Cooperation between oncogenes. *Cell* 1991; 64: 249-51.
 55. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9: 138-41.
 56. Karp JE, Broder S. Molecular foundations of cancer: New targets for intervention. *Nature Med* 1995; 1: 309-20.
 57. Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.
 58. Kelso A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunol Today* 1995; 16: 374-9.
 59. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14: 353-6.
 60. Pasqualini CD. Apoptosis y cáncer. *Medicina (Buenos Aires)* 1994; 54: 697-9.
 61. Schwartz L. Le cancer résiste a la science. *La Recherche* 1996; 284: 54-60.
 62. Rosenberg SA, Spiess P, Lafraniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 1986; 223: 1218-21.
 63. Foa R, Guarini A, Gansbacher B. IL-2 treatment for cancer: from biology to gene therapy. *Br J Cancer* 1992; 66: 992-8.
 64. Bubenik J. IL-2 and gene therapy of cancer. *Int J Oncol* 1993; 2: 1049-52.
 65. Astrow AB. Rethinking cancer. *Lancet* 1994; 343: 494-5.
 66. Prehn RT. Stimulatory effects of immune reactions upon the growth of untransplanted tumors. *Cancer Res* 1994; 54: 908-14.
 67. Stewart THM, Wheelock EF (eds). Cellular immune mechanisms and tumor dormancy. Boca Raton: CRC Press, 1992.
 68. Sporn MB. The war on cancer. *Lancet* 1996; 347: 1377-81.