

REEVALUACION DE LA INMUNOLOGIA TUMORAL

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

MEDICINA (Buenos Aires) 1996; 56 (Supl 1): 32-44

INMUNORREGULACION DEL CRECIMIENTO DE TUMORES MAMARIOS MURINOS

SLOBODANKA KLEIN

*Departamento Bioterio y Cáncer Experimental, Area Investigación, Instituto de Oncología Angel H Roffo,
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

Resumen Durante el crecimiento de los tumores el papel del sistema inmune es controvertido, y a pesar de las grandes expectativas en poder estimularlo para que fuera eficiente en el rechazo de los mismos, este objetivo aún no se ha cumplido. En esta revisión se resumen y se analizan los estudios inmunológicos realizados con modelos de tumores murinos en nuestro laboratorio. Nosotros hemos trabajado con tumores de mama murinos, y en nuestros primeros estudios hemos determinado que el sistema inmune de los portadores de tumor durante las primeras etapas de su evolución reconoce en forma específica los antígenos tumorales, y que sus linfocitos están activados para respuestas de hipersensibilidad retardada in vivo e in vitro y angiogénesis linfocitaria. Sin embargo, esta funcionalidad no se correlaciona con los mecanismos efectores de rechazo tumoral. El reconocimiento y activación linfocitaria desaparecen a medida que el tumor crece. Las células tumorales y linfocitos del portador de tumor secretan factores solubles que exacerban el crecimiento tumoral y metastásico. Las poblaciones de neutrófilos y mastocitos también se encuentran alteradas durante el crecimiento del tumor. Postulamos que las células tumorales secretan factores que inducen poblaciones celulares a producir inmunosupresores que favorecen el desarrollo del mismo tumor.

La posibilidad que un individuo desarrolle sus propios mecanismos de defensa para prevenir y rechazar células tumorales es la meta de la inmunología tumoral.

Cuando a fines del siglo pasado, William Coley intentó tratar pacientes oncológicos con extractos bacterianos, se basó en un nuevo concepto general que suponía que los tumores de alguna manera podían ser vistos como extraños, y que si el sistema inmune estaba lo suficientemente activado, podría rechazarlos. En ese entonces no se conocía nada acerca de la naturaleza de los antígenos ni de las células que mediaban ya sea el reconocimiento o la activación inmunológica.

En 1908, Paul Ehrlich propuso la primera teoría de reconocimiento inmunológico. Ehrlich suponía la existencia de moléculas polimórficas, los anticuerpos, que actuarían como balas mágicas debido a su especificidad para antígenos extraños. La ventaja de estas balas mágicas es que podían actuar, tanto contra antígenos microbianos como contra antígenos de células tumorales, y por tanto servir como agentes terapéuticos.

La inmunología tumoral surge como disciplina en la década del 50, con la aparición de las cepas de ratones endocriados en los que podían transplantarse tumores que el sistema inmune podía reconocer.

El conocimiento adquirido con el uso de las vacunas antivirales se quiso aplicar en terapias oncológicas. Como la antigenicidad de los tumores espontáneos es más heterogénea que en los inducidos por virus, se intentó entonces con tera-

Dirección postal: Dra. Slobodanka Klein, Area Investigación, Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Av. San Martín 5481, 1417 Buenos Aires, Argentina.

pias tendientes a aumentar la reactividad del sistema inmune. Hasta hace algún tiempo, los resultados de las llamadas inmunoterapias inespecíficas, no fueron demasiado promisorias¹³.

En el Instituto de Oncología Angel H. Roffo, a comienzo de la década del 60, la Dra Rosa R. de Pirotsky creó el Servicio de Química Biológica donde desarrolló técnicas y estudios inmunológicos de suero y proteínas patológicas de pacientes portadores de tumor de mama, mielomas múltiples y macroglobulinemias, y trató de caracterizar antígenos de leucocitos de leucemias⁴.

Antígenos tumorales

La inmunología tumoral se fundamenta en la existencia de neo-antígenos presentes en las células tumorales y ausentes o no en las células normales, llamados antígenos asociados al tumor (AAT), que el sistema inmune del huésped es capaz de reconocer como no propios y efectivizar su rechazo in vivo. El concepto de la inmunidad antitumoral surge de los experimentos realizados con ratones a los que se había inducido tumores con cancerígenos químicos. Cada tumor expresa un antígeno particular que protege al animal del desafío con ese mismo tumor, pero no si son inoculados con un tumor diferente, aún inducido por el mismo carcinógeno^{5, 6}.

Entre los antígenos AAT podemos destacar: a) antígenos oncofetales, que se encuentran normalmente en células fetales pero no en tejidos adultos del mismo origen, entre ellos las α -fetoproteínas y antígeno carcinoembrionario⁷; b) antígenos virales; c) antígenos de diferenciación, que fueron definidos por Old y Boyse para las células leucémicas y que están presentes sólo en algunos estadios de la diferenciación celular; e) productos de oncogenes mutados o reordenados^{8, 9}.

La inmunidad celular a antígenos tumorales en modelos experimentales se detectó tanto in vivo como in vitro¹⁰⁻¹². En nuestro laboratorio, utilizando modelos experimentales murinos de tumores de mama transplantables, tratamos de detectar si el sistema inmune del huésped portador de tumor era capaz de reconocerlo, activarse y producir respuestas durante las distintas etapas de la evolución del tumor transplantado. Los tumores utilizados mostraron respuestas de Hipersensibilidad Retardada (HR), MIF y transferencia de HR

específicas con esplenocitos, durante las primeras etapas de su desarrollo¹³.

Vigilancia inmunológica, escape, tolerancia.

¿Por qué si los tumores son reconocidos por el sistema inmune escapan a su control? La relación huésped-tumor es una relación dinámica en la que participan una serie de factores algunos de ellos con efectos antagónicos.

Varias teorías tratan de explicar la relación huésped tumor.

La teoría de la vigilancia inmunológica o la inmunosurveillance propuesta por Burnet¹⁴ postula que el sistema inmune del huésped, a través de sus linfocitos, puede reconocer y destruir células no propias o propias modificadas, como es el caso de las células tumorales, y propone que la inmunidad sería efectiva frente a un grupo pequeño de células. El crecimiento de un tumor sólo puede explicarse entonces por una falla en la respuesta inmune, o por un escape a su vigilancia¹⁵. Los datos que avalan la teoría de la vigilancia inmunológica se observan durante la oncogénesis de los tumores inducidos por virus y algunos cancerígenos químicos^{8, 16}. Según esta teoría, los tumores en ratones y pacientes inmunosuprimidos deberían ser más frecuentes. Observaciones en ratones nude, atímicos, no avalan esta teoría de la inmunovigilancia. En una extensa revisión de las neoplasias espontáneas y metástasis en estos ratones, se observó que pese a ser inmunodeficientes la incidencia de tumores y metástasis no era mayor que en ratones inmunocompetentes¹⁷. En pacientes inmunosuprimidos sólo se observó mayor incidencia de cánceres tales como linfomas, sarcoma de Kaposí, y algunos tumores de piel¹⁸.

El escape a la vigilancia o acción del sistema inmune se produce cuando el equilibrio entre los factores favorece el crecimiento tumoral.

El mecanismo de *sneaking through* o pasaje furtivo sostiene que las células tumorales son fundamentalmente células normales modificadas que aparecen en número pequeño, y como el sistema inmune es incapaz de detectarlas, el tumor puede entonces crecer. Cuando éste adquiere un tamaño como para que el sistema inmune pueda reconocerlo, la actividad antitumoral no alcanza para destruirlo¹⁹. La tolerancia puede ser provocada por exposición neonatal a un antígeno, como

es el caso de los antígenos de diferenciación oncofetales, presentes en algunos tumores. La presentación de los antígenos en dosis tolerogénicas, dosis altas o muy bajas, puede asimismo inducir tolerancia²⁰.

Los tumores son conjuntos heterogéneos de células entre las que puede haber subpoblaciones que poseen diferente expresión de antígenos. Puede existir una presión ejercida por el sistema inmune que reconoce sólo a alguno de ellos y no a otros, produciéndose así una selección clonal²¹ o presión por el sistema inmune que modularía el fenotipo de las células que van a proliferar.

Estudios realizados por Hammond et al²², sugieren una modulación mediada por el sistema inmune sobre la regulación de la progresión tumoral in vivo, demostrando así que el grado de diferenciación tumoral está relacionado con la inmunocompetencia del huésped. La inmunodepresión favorecería el mantenimiento del estadio de diferenciación, mientras que la reactividad normal o elevada del sistema inmune estaría asociada a una progresiva desdiferenciación.

Los tumores también son capaces de producir factores inmunosupresores y liberarlos al medio y a la circulación. Entre estos se encuentran las prostaglandinas y los factores de crecimiento, que podrían actuar sobre otras células o inducir la liberación de otras citoquinas supresoras, tales como el TGF β ²³. Este factor inhibe una gran cantidad de funciones de macrófagos y linfocitos, puede inducir en los tejidos del huésped la producción de citoquinas inmunosupresoras y de otros factores de crecimiento paracrinos²⁴.

La mayoría de los tumores espontáneos y experimentales son no inmunogénicos²⁵. En nuestro laboratorio desde hace varios años realizamos estudios con un adenocarcinoma de mama murino (M3) aparecido espontáneamente en nuestro Bioterio y con otro tumor proveniente de la Academia de Medicina (S13), ambos con capacidad metastásica en pulmón. Estudios de inmunogenicidad por cirugía, en etapas tempranas del crecimiento del tumor M3 y posterior desafío con el mismo tumor, mostraron que éste era muy poco inmunogénico aún cuando respuestas de HR in vivo e in vitro eran positivas. A pesar de estas respuestas de reconocimiento, el crecimiento del segundo tumor estaba exacerbado y el número e incidencia de metástasis pulmonares aumentados²⁶.

La falta de respuesta inmune en ratones portadores de tumor avanzado fue descrita por diversos autores y en distintos modelos tumorales. A este fenómeno se lo denominó "eclipse"²⁷. Numerosos trabajos^{28,29} describen la supresión específica de los linfocitos a medida que los tumores crecen.

Nosotros observamos en portadores de tumor avanzado, que las respuestas de HR, MIF y la transferencia de HR específicas estaban suprimidas¹³. Esta falta de respuesta puede deberse tanto a exceso de antígeno circulante como a anticuerpos bloqueantes, complejos antígeno anticuerpo o células T supresoras. En el tumor S13, la falta de respuesta pudo revertirse por tratamiento de elución ácida de los linfocitos de portador de tumor avanzado, indicando que los factores supresores estarían unidos a las membranas de los esplenocitos¹³. Si bien los linfocitos de bazo de portadores de tumor avanzado estaban "eclipsados", los linfocitos periféricos circulantes no estaban suprimidos para estas respuestas³⁰.

Resumiendo, los tumores M3 y S13 mostraron ser antigénicos pero no lo suficientemente inmunogénicos como para inducir respuestas de rechazo específicas al crecimiento de un segundo tumor.

Actividad de factores solubles del bazo y de células tumorales

Se estudiaron los factores solubles provenientes de linfocitos de bazo de portadores de tumor pequeño y grande que, al ser inoculados en forma intraperitoneal (ip), exacerbaban el crecimiento de tumores en forma específica. Esta estimulación desaparecía después de las 24 horas de la extirpación quirúrgica del tumor pequeño. La exaltación del crecimiento del tumor por sobrenadantes de esplenocitos era específica y mediada por linfocitos T y B para el tumor pequeño³¹, mientras que en el tumor avanzado estaba mediada sólo por linfocitos T. (Tabla 1)

Se ha postulado que la liberación de antígenos de superficie de la célula tumoral o el desprendimiento de complejos antígeno-anticuerpo interfieren con la respuesta inmune antitumoral. El mecanismo de acción involucraría un bloqueo funcional del receptor para el fragmento Fc de la IgG presente en las células NK o la inducción de células con función supresora²⁹.

Ya que se había observado previamente que la exacerbación temprana podía estar asociada a linfocitos B, se midieron los complejos inmunes circulantes (CIC) en suero a distintas etapas de portación del tumor³². A los 7-9 días de portación del tumor se observó un aumento significativo de los CIC. Cuando éstos fueron aislados e inoculados junto con células tumorales se observó un aumento específico del crecimiento tumoral, y los cortes histológicos del tumor mostraron un aumento del índice mitótico de las células tumorales³³.

Ha sido descrito^{34,35} que las células tumorales producen factores angiogénicos que inducen la formación de neovasos. Estos son utilizados tanto por las células tumorales para nutrirse y diseminarse, como por las células del sistema inmune para llegar al tumor. Se sabe que también linfocitos normales en ratones alo o semiallogeneicos producen una respuesta neovascular, denominada angiogenesis inducida por linfocitos (LIA). Demostramos que linfocitos singeneicos de portadores de tumor eran capaces de inducir una respuesta angiogénica similar a la respuesta producida por linfocitos alogeneicos, a la que se denominó angiogenesis inducida por linfocitos

singeneicos SLIA³⁶. Estudios realizados con sobrenadantes de células esplénicas de portadores de tumor tenían actividad angiogénica en combinaciones singeneicas. Esta actividad de producir neovascularización fue detectada en portadores de tumor precoces y avanzados, así como también con sobrenadantes de linfocitos de ex portadores de tumor avanzado, pero no de tumor precoz³⁷.

Algunos autores mostraron que antígenos tumorales solubles o material proveniente de células tumorales tienen un papel importante en dañar la respuesta inmune tumoral específica³⁸⁻⁴⁰. Estudiamos el efecto de productos provenientes o liberados por células del tumor M3 sobre la aparición de metástasis. Extractos solubles tumorales (ETS) inoculados ip en ratones operados del tumor primario en estadio precoz, provocaron una mayor incidencia de metástasis pulmonares. Este mismo efecto de aumento de metástasis post-quirúrgicas se obtenía con la inoculación de medios condicionados de células tumorales en cultivo o de células tumorales fijadas con formol (Tabla 2). Mediante la esplenectomía simultánea con la extirpación del tumor, se demostró que las células del sistema inmune

TABLA 1.- Actividad biológica de los sobrenadantes de cultivo de células esplénicas

Sobrenadantes de cultivo de 24 h de bazo	Exacerbación tumoral	Fraciones exacerbadoras Seph G100	Subpoblaciones c/actividad exacerbadora	Angiogenesis (SLIA)	Subpoblaciones angiogénicas	C I C
Portador de tumor precoz	+	F1 + no-T +	T +	+	T +	+
Portador de tumor avanzado	+	F1 + F2 + (100-10Kd)	T +	+	T +	-
Ex-portador tumor precoz*	-	- (*)	-	-	-	-
Ex-portador tumor avanzado*	+	F1 +	T +	+	T +	-

* la cirugía se realizó 7-10 días post-trasplante (tumor precoz, diám. < 10 mm).

* la cirugía se realizó 18-20 días post-trasplante (tumor avanzado, diám. > 20 mm) después de 15 días post-cirugía desaparecía la actividad exacerbadora.

mediaban esta exaltación de metástasis, ya que en estos animales esplenectomizados, operados e inoculados con ETS, se inhibía la exaltación de metástasis⁴¹. Cuando los esplenocitos de animales operados e inoculados con ETS fueron transferidos a animales operados, también se observó que estimulaban la aparición de metás-

tasis (Tabla 3). Además, estos esplenocitos estaban inhibidos en su capacidad para transferir respuestas de HR específicas⁴².

De nuestros estudios podemos deducir que, tanto las células tumorales como los linfocitos de portadores de tumor, al igual que factores producidos o inducidos por ambos, son capaces de

TABLA 2.— *Metástasis pulmonares en animales operados de su tumor primario M3 post-tratamiento antigénico*

Tratamiento	Dosis	Animales con metástasis n/total**	%	p*
Control (PBS)		9/26	25	
ETS M3	200 µg	19/26	73	< 0,005
CT M3 formalizadas	5 x 10 ⁵	15/19	78	< 0,005
So CT M3	200 µg	16/23	70	< 0,005
Es órganos normales	200 µg	4/12	33	N.S.
ETS M2***	200 µg	5/14	35	N.S.
Glóbulos rojos de carnero	10 ⁸	3/12	25	N.S.

* Significación con respecto al control calculada por el test de Chi cuadrado.

** Los ratones fueron operados a los 10 días del implante del tumor primario. El tratamiento se realizó a los días 2 y 4 post-cirugía, y la cuantificación de metástasis al día 30.

*** M2: Tumor de mama no relacionado, como control de especificidad tumoral. ETS: Extracto tumoral soluble. CT: Células tumorales. So: Sobrenadante de cultivo de 24 h. ES: Extracto soluble.

TABLA 3.— *Incidencia de metástasis en animales operados de su tumor primario y/o esplenectomizados tratados con extracto tumoral soluble (ETS) (1)*

Tratamiento	Animales con metástasis n/total %	Metástasis por pulmón X̄ ± ES
Sham-esplenectomizados	12/32 38	4,3 ± 1,7
Esplenectomizados (2)	8/35 2,6	2,6 ± 1,6
Sham-esplenectomizados + 200 µg ETS M3 (3)	25/31 80*	2,5 ± 1,8
Esplenectomizados + 200 µg ETS M3	12/35 34	6,0 ± 1,9
Sham-esplenectomizados + 200 µg ETS M2	2/12 17	4,5 ± 2,4
Esplenectomizados + 200 µg ETS M2	3/12 25	3,0 ± 1,9

* p < 0,005 con respecto a los otros grupos experimentales. No hay diferencias significativas entre los otros grupos.

(1) Los ratones fueron operados a los 10 días del implante tumoral y se cuantificaron las metástasis a los 30 días post-cirugía. (2) La esplenectomía fue realizada simultáneamente con la tumorectomía. (3) ETS fue inoculado a los días 2 y 4 post-cirugía.

exacerbar el crecimiento tumoral y/o metastásico. Postulamos que la portación del tumor modula al sistema inmune hacia la inmunosupresión.

Como mencionamos anteriormente, se conoce desde hace tiempo que los tumores promueven la producción de factores inmunosupresores y la activación de macrófagos y linfocitos con función supresora^{43,44}. Más recientemente, se demostró que los tumores son capaces de producir citoquinas supresoras⁴⁵ y proteasas que neutralizan la actividad de las citoquinas secretadas localmente⁴⁶, así como de inducir alteraciones en la estructura del receptor que, de esta manera, transduce señales anormales⁴⁷. La supresión inducida por el tumor generalmente es sistémica, aunque aparece antes dentro del tumor mismo y en los ganglios drenantes. Después de la producción de factores quimioattractantes los tumores pueden ser invadidos por distintos tipos de leucocitos, que allí se sensibilizan.

Para estudiar la respuesta del huésped a factores liberados por la célula tumoral, utilizamos como modelo la implantación de cámaras de difusión (CD) inoculadas con células tumorales. En este modelo la relación huésped tumor se produce sólo a través de los factores solubles, ya que no hay contacto directo célula tumoral-célula del huésped (Fig. 1).

Las células tumorales en CD eran capaces de activar linfocitos del huésped para producir res-

puestas de HR específicas, en tanto que los esplenocitos de los portadores de CD inducían angiogenesis linfocitaria y transferían HR en forma específica⁴⁸ (Tabla 4). Además, para estudiar si la liberación de factores solubles de la célula tumoral M3 creciendo en CD modulaba el crecimiento de un tumor inoculado posteriormente, desafiarnos con células M3 en forma subcutánea (sc), y se observó una exacerbación del crecimiento tumoral⁴⁹. También se observó que el huésped portador de CD con células M3 modificaba significativamente su respuesta hematológica. Los ratones presentaban una inversión de fórmula, neutrofilia sin leucocitosis, linfopenia, y aumento de mielocitos circulantes⁵⁰. También observamos una atracción de neutrófilos que se adherían a las caras externas de las membranas de las CD. En los ratones portadores de CD con células M3 y en animales inoculados por vía sc con células recuperadas de CD, se observó una acumulación de linfocitos en los pulmones⁵¹.

La atracción de neutrófilos alrededor de la CD junto con las observaciones de médula ósea, nos sugirieron estudiar la producción de factores hematopoyéticos por las células tumorales. Resultados preliminares mostraron que los medios condicionados de células M3 contienen GM-CSF, que podría actuar como factor de crecimiento autócrino. Las células tumorales, cuando crecen *in vitro*, tienen menos requerimientos que sus contrapartes normales. Esto se debería entre otras causas, a que son capaces de sintetizar factores de crecimiento que actúan en forma autocrina⁵². Tal vez la producción de GM-CSF y de otros factores podría resultar de una adaptación al crecimiento en cultivo de las células M3. Por otro lado, se ha descrito⁵³ que el GM-CSF podría además actuar activando una población de macrófagos supresores.

Nuestros resultados con los factores solubles de las células tumorales, nos permiten proponer que las células tumorales en crecimiento modularían algunas respuestas inmunes del huésped, activando linfocitos esplénicos para reacciones tales como DTH, SLIA, etc. Al no observar ninguna actividad antitumoral sino, por el contrario, la exacerbación de crecimiento tumoral y metastásico, supusimos que tanto el tumor y también los factores solubles producidos y liberados por el mismo favorecerían la proliferación o activación de una subpoblación de linfocitos y/o de otras

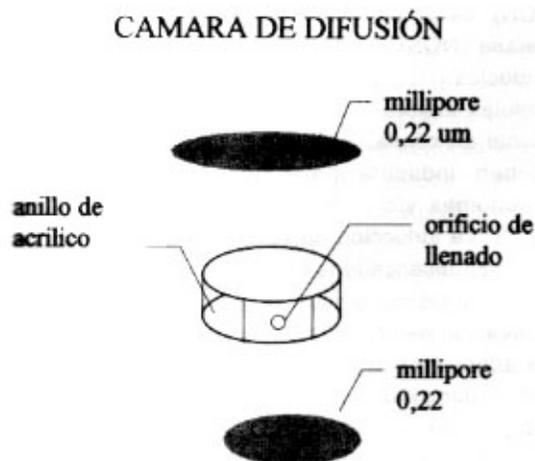


Fig. 1

TABLA 4.— Estimulación de linfocitos por portación de cámara de difusión

Fuente de linfocitos	Engrosamiento almohadilla plantar (mm)		Vasos/mm ² de piel		p
	HR		SLIA		
	$\bar{X} \pm ES$	(n)	$\bar{X} \pm ES$	(n)	
Bazo CD-CT M3 + ETS	0,19 ± 0,003	(8)	2,50 ± 0,52	(13)	< 0,001
Bazo CD- CN + ETS	0,10 ± 0,03	(8)	1,45 ± 0,27	(10)	

células del sistema inmune (ej: los neutrófilos) que tendrían función supresora.

Radicales libres de oxígeno y de nitrógeno y la activación linfocitaria

Los radicales libres de oxígeno o especies reactivas del oxígeno (ROS) son producidos fisiológicamente durante el metabolismo del oxígeno molecular (O_2). Una superproducción de estos metabolitos puede alterar, dañar o matar células, ya que son altamente tóxicos y reactivos. De hecho, células como los macrófagos y los neutrófilos liberan estos metabolitos en zonas inflamatorias para eliminar las células blanco. La interacción con macromoléculas como los ácidos nucleicos, lípidos, proteínas o hidratos de carbono, puede influir sobre el rol celular de éstos y causar alteraciones en las funciones celulares. La producción descontrolada de ROS pone a la célula en situación de estrés oxidativo y causa una falla en los sistemas antioxidantes que los controlan. Dentro de éstos están principalmente las vitaminas E, C y A, el glutatión y las enzimas superóxido dismutasas (SODs), catalasa (CAT) y las glutatión peroxidasas⁵⁴. Frecuentemente las defensas antioxidantes están disminuídas en patologías como el cáncer, detectándose aumento de ROS^{55, 56}. Se demostró que tanto ROS como el peróxido de hidrógeno actúan como reguladores de la activación T y de la producción de IL2 en linfocitos murinos⁵⁷, así como en la proliferación de otros tipos celulares⁵⁸.

Dados los antecedentes de la producción de ROS durante la portación de tumores y su actividad moduladora de la respuesta mediada por linfocitos T, en nuestro laboratorio estudiamos el rol de los ROS en la activación de linfocitos para inducir la respuesta angiogénica (SLIA). La admi-

nistración de antioxidantes a ratones portadores de tumor, inhibió la SLIA así como la incidencia metastásica. Se observó que los bazo de los animales portadores de tumor tenían aumentada la peroxidación lipídica, indicador de estrés oxidativo. Sumado a esto, se determinó la actividad de las enzimas SOD y CAT, encontrándose que existe en este órgano un desbalance a favor de la SOD, lo que impediría que el peróxido de hidrógeno fuera totalmente eliminado. En los bazo de ratones portadores de tumor, estas diferencias SOD/CAT se encuentran acentuadas. En experimentos realizados *in vitro*, se logró activar linfocitos normales en medios productores de ROS. Ensayos posteriores definieron al peróxido de hidrógeno como la molécula clave para esta activación linfocitaria. Finalmente se observó que la administración *in vivo* de peróxido de hidrógeno o drogas capaces de producir ROS, estimularon la respuesta SLIA en forma análoga a la inducida por las células tumorales⁵⁹.

La conversión de L-arginina a óxido nítrico (ON), catalizada por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), es necesaria para la citotoxicidad inducida por macrófagos contra ciertas líneas de células tumorales^{60, 61}. Esta enzima no está presente en células en reposo, sino que las células deben inducirla para que se exprese. Las citoquinas y/o LPS son capaces de activar la NOS. La inducción de esta enzima en diferentes células desencadena reacciones responsables de sus efectos biológicos intracelulares tales como relajación del músculo liso vascular, inhibición de la adhesión y agregación plaquetaria, inhibición de la quimiotaxis de neutrófilos, etc⁶²⁻⁶⁴. El ON es un potente citostático y citotóxico; tiene actividad inmunorregulatoria *in vitro* e *in vivo* y demostró ser un potente inmunosupresor endógeno de la actividad de los macrófagos y linfocitos, que se

anula con el agregado de inhibidores de la NOS⁶⁴. A pesar que los macrófagos representan la fuente principal de ON, los linfocitos también pueden producirlo. Se demostró que la inmunosupresión debida al tumor también podría estar mediada por ON, ya sea por su efecto antiproliferativo sobre los linfocitos o indirectamente, por la inducción de la NOS por el tumor anulando la capacidad de la respuesta de los linfocitos. Se observó que los linfocitos sufren apoptosis inducida por su propio ON contribuyendo a la desregulación de las reacciones inmunes^{65, 66}.

En síntesis, en tumores experimentales estudiamos el papel del ON y de la NOS sobre la progresión tumoral, metástasis y angiogénesis, así como su actividad sobre las distintas respuestas inmunes, en diferentes etapas del crecimiento tumoral.

Mastocitos durante el crecimiento tumoral

La presencia de mastocitos en el tejido conectivo peritumoral fue reconocida ya desde la descripción de este tipo celular por P. Ehrlich en el siglo pasado.

Los mastocitos peritumorales representan uno de los componentes celulares de la reacción inflamatoria local que acompaña a la neoplasia. Este infiltrado es considerado como un indicador local de la respuesta activa del huésped contra el tumor. Sin embargo su significado funcional no es claro. Incluso características del infiltrado tales como ausencia, presencia, grado de extensión y tipos celulares identificados han dado lugar a resultados contradictorios en cuanto a su implicancia en la sobrevida^{67, 68}. En nuestro laboratorio, se estudió el comportamiento de mastocitos durante la evolución de diversos tipos de tumores mamarios murinos. Todos los tumores mostraron capacidad para reclutar mastocitos en el tejido conectivo peri-tumoral e inducir proliferación y degranulación de los mismos⁶⁹.

Con el propósito de estudiar el significado funcional de esta asociación, ratones BALB/c fueron inoculados con células tumorales M3 solas o conjuntamente con mastocitos de cavidad peritoneal de ratones normales o portadores de tumor. La incidencia tumoral fue significativamente menor en el grupo coinoculado con células tumorales y mastocitos normales respecto de los otros grupos. En cultivos primarios del mismo tumor a los que

se agregó mastocitos de ratones normales, se observó inhibición del crecimiento de las células tumorales. Estudios histoquímicos mostraron que el 90% de los mastocitos normales son ricos en heparina mientras que sólo el 30% de los mastocitos de los ratones portadores de tumor contienen este glicosaminoglicano. El tumor estudiado expresa receptores para heparina⁷⁰ y este glicosaminoglicano fue capaz de inhibir su crecimiento in vitro⁷¹. Estos datos llevan a interpretar que la presencia de mastocitos peritumorales en este modelo experimental, refleja efectos de la interacción huésped tumor a nivel celular. La capacidad del tumor de reclutar mastocitos implica contar, en la periferia tumoral, con una célula que constituye fuente de diversos mediadores activos y modulables. Los efectos que estos mediadores puedan tener sobre la evolución tumoral depende por un lado de la combinación de mediadores solubles, producto de la degranulación de mastocitos y, por el otro, del fenotipo tumoral⁶⁹.

Además de su asociación con el tumor primario, los mastocitos fueron identificados en ganglios linfáticos drenantes de tumor. Existe una extensa especulación bibliográfica concerniente a la relevancia de los cambios en la histoarquitectura de los ganglios linfáticos regionales durante la evolución neoplásica^{67, 68, 72, 73}.

Durante estadios tempranos de la evolución tumoral, los cambios observados en el medioambiente de los ganglios regionales no metastásicos, muestran signos característicos de respuesta inflamatoria⁶⁷.

Nuestro grupo estudió el porcentaje de mastocitos presentes en ganglios linfáticos drenantes de dos adenocarcinomas mamarios murinos con nula y alta capacidad metastásica espontánea en ganglios linfáticos regionales (M3 y MM3, respectivamente). Se observó una disminución significativa en el porcentaje de mastocitos a nivel ganglionar. Esta disminución fue mayor en la línea tumoral metastásica (MM3) con respecto a la no metastásica. La respuesta inflamatoria ganglionar fue también más llamativa en la línea metastásica. Estos resultados se obtuvieron previo a la invasión ganglionar, ya que los estudios se realizaron en una etapa muy precoz de la portación del tumor⁷⁴.

A partir de estos hallazgos consideramos que el grado de eventos inflamatorios ganglionares

observados en etapa tan precoz de la evolución tumoral está en parte determinado por el fenotipo del tumor. La degranulación de mastocitos se correlaciona con el mayor grado de invasión tumoral y crecimiento metastásico⁷⁴.

Inmunoterapia

El objetivo de la inmunoterapia antitumoral es aumentar la respuesta inmune específica o inespecífica del huésped para erradicar las células tumorales en crecimiento.

Estimulación no específica

Los primeros intentos de inmunoterapia fueron desarrollados por W. Coley, en los años 1890. Estos intentos consistieron en la estimulación no específica usando terapias con inoculaciones de productos o toxinas bacterianas tales como BCG, *Corynebacterium parvum*, etc. Estos agentes estimulaban el sistema inmune en forma inespecífica, modulando especialmente reacciones mediadas por macrófagos³. Estas terapias se conocen como adyuvantes y si bien solas son incapaces de eliminar al tumor, se utilizan como complementarias.

Con el descubrimiento de las citoquinas y gracias al desarrollo de la ingeniería genética, surgió la posibilidad de emplearlas en concentraciones apreciables y de gran pureza. Los tratamientos de activación del sistema inmune mediante citoquinas no eran específicos, y fueron aplicados generalmente en forma local. Repetidas inoculaciones de citoquinas tales como IL 1, IL 2, IL 3, TNF, IFN γ , podían producir fuertes reacciones de rechazo tumoral en ratones⁷⁵, pero su uso en pacientes resultó de relativa efectividad ya que las dosis necesarias para obtener respuestas resultaron tóxicas y con muchos efectos colaterales.

En nuestro laboratorio, se hicieron algunos intentos de inmunoterapia tratando ratones portadores de tumor pequeño u operados con citoquinas tales como el TNF α e Interferon γ en forma conjunta o separados, inoculados por vía intra o peritumoral, obteniéndose una disminución de metástasis postquirúrgicas. Las citoquinas sólo tenían efecto sobre el crecimiento del tumor primario cuando se administraban conjuntamente con un inhibidor de la síntesis de poliaminas como el DFMO⁷⁶.

Aumento de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)

Los linfocitos T citotóxicos deben reconocer los antígenos tumorales en el contexto del MHC. La mayoría de las células tumorales no expresan MHC en su superficie o, si lo hacen, es en forma muy deficiente o alterada. Muchas terapias se han basado en aumentar la expresión de los antígenos del MHC^{77, 78}.

Para una respuesta tumoral eficiente sería necesaria la colaboración de los linfocitos T helper (Th), que producen una serie de linfoquinas importantes en la respuesta de rechazo tumoral⁷⁹. Para la activación de los Th, la célula presentadora de antígeno debe hacerlo en el contexto del MHC II.

Hemos intentado obtener respuestas antitumorales, tratando de modificar las membranas de las células tumorales con hemisuccinato de colesterol, que aumenta la microviscosidad lipídica de las membranas celulares y permite presentar mejor los antígenos tumorales y los MHC. Si bien observamos una mayor cantidad de epitopes glicoproteicos, que las harían más antigénicas, no hemos logrado con las dosis utilizadas una inmunización efectiva luego de su inoculación⁸⁰.

La interacción huésped tumor es una interacción activa. Si bien el tumor es capaz de inducir la producción de factores estimuladores de su propio crecimiento o de liberar factores que activan poblaciones celulares del sistema inmune, a su vez el huésped es capaz de modular el crecimiento y las características fenotípicas de las células tumorales⁸⁰.

Hemos descrito la modulación del crecimiento tumoral por el sistema inmune. Es fundamental tener en cuenta que el crecimiento tumoral y las respuestas inmunes no son el resultado de la acción del sistema inmune aislado, sino que está influido por otros sistemas homeostáticos del huésped (Tabla 5).

La respuesta inmunológica como mecanismo homeostático

El sistema inmunológico cuenta con numerosos y eficientes mecanismos de autorregulación, que le confieren un alto grado de autonomía funcional. La perturbación de la homeostasis por

TABLA 5.— *Estimulación del crecimiento tumoral y metastásico*

Factores solubles del bazo
 Factores solubles de células tumorales
 Complejo inmunes circulantes
 Células tumorales formolizadas
 Células tumorales en cámara de difusión
 Células tumorales específicas
 Arginina (precursor de ON)

Disminución de metástasis y/o crecimiento tumoral

Esplenectomía
 Mastocitos normales
 Tratamiento con TNF e IFN δ
 Tratamiento con inhibidores de ROS

neoantígenos y/o antígenos propios está bajo control neuroendócrino⁸¹. La presencia de vasos sanguíneos y nervios en el tejido linfático, permite el intercambio de información a través de señales transmitidas por moléculas difusibles y receptores comunes entre sistemas con alto grado de autonomía funcional^{82, 83}. Así las células del sistema inmunológico son target y fuente de productos neuroendócrinos. Por su parte, el sistema nervioso muestra receptores para algunos tipos de citoquinas; así bajo ciertas condiciones de activación, también neuronas y células de la neuroglía son fuente de citoquinas⁸⁴.

Nuestro grupo de trabajo describió la modulación del patrón puberal por un tumor singeneico y por extracto tímico. Cuando se transplantó tumor a ratones hembra durante la transición de prepúberes a púberes, se modificó el sistema neuroendócrino del huésped. El patrón de maduración sexual (evaluado a través de fenómenos estrógeno dependientes: apertura y primera cornificación vaginal) mostró un retraso en portadores de tumor con respecto al control. Esta diferencia no se observó cuando los portadores de tumor recibieron extracto tímico. Así, en este modelo, un estímulo singeneico que indujo modificaciones a nivel endocrino, fue aparentemente revertido por un extracto tímico⁸⁵.

También en nuestro laboratorio se estudió la cantidad de mastocitos presentes en cortes histológicos de cáncer de mama de pacientes en estadios I y II. Estas fueron agrupadas, de acuerdo a su estado hormonogonadal, en postmenopáusicas y con ciclo menstrual conservado. La cantidad de mastocitos fue significativamente mayor en pacientes con ciclo conservado. A su vez, dentro de este estado hormonogonadal, mostraron mayor cantidad de mastocitos aquellas pacientes que fueron operadas de su tumor primario en la fase periovulatoria del ciclo menstrual. Es conocido que el cáncer de mama tiene peor pronóstico en las premenopáusicas. Estos resultados preliminares permiten considerar que la biología del huésped en el momento de la cirugía mamaria puede influir en la evolución postquirúrgica⁸⁶.

Consideraciones finales

Los linfocitos T tienen un rol central en la respuesta inmune a tumores tanto en ratones como en humanos. En la actualidad se intenta modular la respuesta inmune a los tumores de manera de conseguir respuestas efectivas y capaces de ser generalizadas al mayor número posible de tumores.

El conocimiento de los mecanismos mediante los cuales interactúan las células tumorales con el sistema inmune del huésped, permitirá interceptar alguno de los pasos que facilitan el crecimiento tumoral así como activar aquellos necesarios para el desarrollo de una respuesta antitumoral más efectiva.

Creemos que con los desarrollos actuales, los enfoques multidisciplinarios, el mayor conocimiento de la naturaleza de los antígenos tumorales, mejor monitoreo de las repuestas inmunes y la mayor posibilidad de interpretarlas y/o manejarlas podremos revertir el concepto de que "la cancerología ha hecho más por la inmunología tumoral que la inmunología por el cáncer".

Agradecimientos: a las Dras. Elisa Bai de Kier Joffe y Yolanda P. de Bonaparte por la revisión y sugerencias en la redacción del manuscrito. Se destaca asimismo la colaboración de María Adela Jansin y Liliana Vauthay en la redacción de esta revisión.

Summary

Immunomodulation of murine mammary tumor growth

The function of the immune system during tumor growth is very controversial. Although there were great hopes that a proper stimulation of immunity would eradicate tumor cell proliferation this objective has still not been attained. We review and analyze some of the immunologic studies performed in our laboratory using spontaneous murine mammary adenocarcinomas. In early stages of tumor growth our studies showed a specific immune response *in vivo* and *in vitro* by delayed type hypersensitivity tests, and syngeneic lymphocyte induced angiogenesis assay. These activated lymphocyte responses were not involved in mechanisms effective for tumor rejection. The lymphocyte activation vanished with tumor growth. Soluble factors shed from splenocytes of tumor bearing hosts and factors secreted by tumor cells enhanced tumor and metastatic growth. Other cell populations, such as mastocytes and neutrophils were also altered during tumor growth. We conclude that soluble factors released by tumor cells induce the production of suppressor cells or factors that stimulate tumor and metastatic growth.

Bibliografía

- Pollard R. Usages of interferon and interferon inducers in man. *Med Biol* 1981; 59: 69-77.
- Morton D. Cancer Immunotherapy: an overview. *Semin Oncol* 1977; 1: 297-313.
- Yamamura et al. Adjuvant immunotherapy of lung cancer with BCG wall skeleton. *Cancer* 1979; 43: 1314-9.
- Pirosky RR. Immunological study of leukemias in BALB/c mice. *Int J Cancer* 1968; 3: 440-5.
- Prehn, RT, Main JM. Immunity to methylcholanthrene induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 1957; 18: 769-78.
- Schreiber H, Ward PL, Rowley D, Strauss HJ. Unique tumor-specific antigens. *Annu Rev Immunol* 1988; 6: 465-83.
- Pardoll DM. Cancer Vaccines. *Immunol Today* 1993; 14: 310-6.
- Boyse EA, Old LJ. Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics. *Annu Rev Genet* 1969; 3: 269-290.
- Beverly P. Immunology of Cancer. In: Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer, New York: Oxford University Press 1991; p 414.
- Halliday W, Webb M. Delayed hypersensitivity to chemically induced tumors in mice and correlation with an *in vitro* test. *J Natl Cancer Inst* 1969; 43: 141-9.
- George M, Vaughn J. *In vitro* cell migration as a model for delayed hypersensitivity. *Proc Soc Exp Biol* 1962; 11: 514-21.
- David J, Al-Askari S, Lawrence H, Thomas L. Delayed hypersensitivity *in vitro*. I. The specificity of inhibition of cell migration by antigens. *J Immunol* 1964; 93: 264-9.
- Jasnis MA, Klein S, Bonaparte YP, et al. Delayed hypersensitivity in tumor-bearing mice. *In vitro* activation of eclipsed spleen cells. *Int J Cancer* 1977; 20: 394-9.
- Burnet MF. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13: 1-27.
- Baldwin R. Immunological aspects of clinical carcinogenesis. *Adv Cancer Res* 1973; 18: 1-12.
- Globerson A, Feldman M. Antigen specificity of benzopyrene induced sarcoma. *J Natl Cancer Inst* 1964; 32: 1229-35.
- Stutman O. The immunological surveillance hypothesis. In: RB Herberman (ed). Basic and Clinical Tumor Immunology. Boston: Martinus Nijhoff 1983, p 1-160.
- Piessens WF, David J. Tumor Immunology. In: Scientific American Medicine 1992. New York: Scientific American 1992, p 1-8.
- Penn I. Tumors in immunocompromised patients. *Annu Rev* 1988; 39: 63.
- Prehn R. Tumor progression and homeostasis. *Adv Cancer Res* 1976; 23: 203.
- Nowell P. The clonal evolution of tumor cell population. *Science* 1979; 194: 23-8.
- Hammond W, Benfield J, Tesluk H, et al. Tumor progression of lung cancers growing in hosts of different immunocompetence. *Cancer J* 1995; 8: 130-6.
- Inge TH, Hoover SK, Susskind BM, et al. Inhibition of tumor specific cytotoxic lymphocytes activation by transforming growth factor β 1. *Cancer Res* 1992; 52: 1386-92.
- Lopez DM, Lopez-Cepero M, Watson G, et al. Modulation of the immune system by mammary tumor-derived factors. *Cancer Invest* 1991; 9: 643-53.
- Hewitt HB, Walden AS. A critique of the evidence for active host defence based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. *Br J Cancer* 1976; 33: 241-59.
- Klein S, Colombo LL, D'Elia I, Bonaparte YP. Diferente inmunogenicidad de dos tumores de mama murinos con distinta capacidad metastásica en pulmón. *Medicina (Buenos Aires)* 1980; 40: 826.
- Youn J, Le Francois D, Barski G. *In vitro* studies on mechanisms of "eclipsed" cell mediated immunity in mice bearing advanced tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973; 50: 921-6.
- Kirchner H, Glasser M, Holden H, et al. Suppressor cells in tumor bearing mice and rats. *Biomedicine* 1976; 24: 371-4.
- Fujimoto S, Greene MJ, Sehon AH. Regulation of the immune response to tumor antigens. Immunosuppressor cells in tumor bearing host. *J Immunol* 1976; 116: 791-9.
- Bonaparte Y, Oisgold-Dagá S, Klein S, D'Elia I. Tumor delayed hypersensitivity reactions. *In vivo* functional differences between spleen and

- peripheral blood lymphocytes. *Biomedicine* 1980; 33: 16-8.
31. Jasnis MA, Eijan AM, Oigold-Dagá S. Regulation of tumor growth by soluble spleen factors: Effect of tumor resection. *J Surg Oncol* 1987; 35: 139-45.
 32. Hellstrom KE, Hellstrom I. Immunological enhancement as studied by cell culture techniques. *Ann Rev Microbiol.* 1970; 24: 373-9.
 33. Schiavi G, Eijan A, Jasnis MA, Oigold-Dagá S. Monitoring of circulating immune complexes during tumor development. Effect on tumor growth. *J Exp Clin Cancer Res* 1988; 7: 73-9.
 34. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1981; 43: 175-84.
 35. Auerbach R. Angiogenesis inducing factors: A review. In: Pike (ed). *Lymphokines*, New York: Academic Press, 1981, 69-88.
 36. Davel L, Miguez M, Jasnis M, et al. Angiogenic activity by spleen cell supernatants from tumor bearing and tumor resected mice. *J Surg Oncol* 1988; 37: 44-8.
 37. Thomson D, Proctor J, Grosser N, Sutherland M. Impairment of systemic concomitant anti-tumor immunity by excess of soluble tumor antigen. *Cancer Immunol Immunother.* 1980; 8: 127-32.
 38. Venuela JE, Rodríguez R, Gil J, et al. Antigen shedding vs development of suppressor cells as mechanisms of tumor escape in mice bearing Ehrlich tumor. *Int J Cancer* 1991; 47: 86-91.
 39. Thomson D, Eccles S, Alexander P. Antibodies and soluble tumor antigens in blood and lymph of rats with chemically induced sarcomas. *Br J Cancer* 1973; 28: 6-15.
 40. Vaage J. Specific desensitization of resistance against a syngeneic methylcholanthrene-induced sarcoma in C3H mice. *Cancer Res* 1972; 32: 193-200.
 41. Klein S, Bonaparte YP, D'Elia I. Enhancement of the incidence of tumor metastasis in tumor resected mice. *Inv and Mets* 1985; 5: 309-16.
 42. Diament M, Klein S, Bonaparte Y. Suppression of delayed-type hypersensitivity response by soluble tumor extract in tumor resected mice. *J Exp Clin Cancer Res* 1990; 9: 161-6.
 43. Forni G, Varesio L, Giovarelli M, Cavallo F. Dynamic state of spontaneous immune reactivity towards a mammary adenocarcinoma. In: Spreafico F, Arnon R (Eds). *Tumor antigens and their specific immune response*, London: Academic Press, 1979: 167-92.
 44. North R. The murine antitumor response and its therapeutic manipulation. *Adv Immunol* 1984; 35: 89-97.
 45. Colombo MP, Modesti A, Parmiani G, Forni G. Cytokine availability elicits tumor rejection and systemic immunity through granulocyte - T lymphocyte cross-talk. *Cancer Res* 1992; 52: 4853-7.
 46. Bauvois B, Sanceau J, Witzlerbin J. Human U937 cell surface peptidase activities; characterization and degradative effect on tumor necrosis factor α . *Eur J Immunol* 1992; 22: 923-30.
 47. Mizoguchi H, O'Shea, et al. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes. *Science* 1992; 1795-8.
 48. Klein S, Jasnis M, Diament M, et al. Immunomodulation by soluble factors from tumor cultured in vivo in diffusion chambers. *Tumor Biol* 1994; 15: 160-5.
 49. Klein S, Diament M, Bonaparte Y, Jasnis M. Efecto sobre el crecimiento tumoral de factores solubles liberados por células tumorales en un cultivo in vivo. *Medicina (Buenos Aires)* 1993; 53: 12.
 50. Diament M, Klein S, Rodríguez Paradisi E, D'Elia I. Tumor cells cultured in diffusion chambers induce hematological alterations. *In Vivo* 1995; 9: 203-7.
 51. Aguirre Ghiso J, Diament M, D'Elia I, et al. Effects of in vivo culture on tumor and metastatic growth of mammary adenocarcinoma cells. *Tumor Biology* 1996 (in press).
 52. Nicoletti G, De Giovanni C, Lollini P, et al. In vivo and in vitro production of haemopoietic colony-stimulating activity by murine cell clones of different origin: a frequent finding. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989; 25: 1281-6.
 53. Young M, Wright M. Myelopoiesis-associated immune suppressor cells in mice bearing metastatic Lewis lung carcinoma tumor. *Cancer Res* 1992; 52: 633-41.
 54. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet* 1994; 344: 721-3.
 55. Monte M, Sacerdote de Lustig E. Radicales libres de oxígeno y superóxido dismutasa. Aspectos biológicos y médicos. *Medicina (Buenos Aires)* 1994; 54: 61-6.
 56. Roth S, Dröge W. Regulation of T-cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. *Cell Immunol* 1987; 108: 417-23.
 57. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 775-8.
 58. Monte M, Davel, C, Lustig ES. Inhibition of lymphocyte induced angiogenesis by free radical scavengers. *Free Radical Biol Med* 1994; 17: 256-62.
 59. Monte M, Davel L, Lustig E. Hydrogen peroxide is involved in lymphocyte activation mechanisms to induce angiogenesis. *Europ J of Cancer* 1996; (in press).
 60. Cui SH, Reichner JS, Matlo RR, et al. Activated murine macrophages induced apoptosis in tumor cells through nitric oxide dependent or independent mechanisms. *Cancer Res* 1994; 54: 2462-7.
 61. Thomsen L, Lawton FG, Knowles RG, et al. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Res* 54; 1351-2.
 62. Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LI, et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1995; 92: 4392-6.
 63. Mills C, Shearer J, Evans R, et al. Molecular basis of suppressor macrophages: arginine metabolism via the nitric oxide synthase pathway. *J Immunol* 1991; 146: 2719-26.
 64. Albina J, Cuis, Matlo R et al. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 1993; 150: 5080-5.
 65. Taylor-Robinson AW, Liew Fy, Severn A, et al. Regulation of the immune response by NO differentially produced by Th1 and Th2 cells. *Eur J*

- Immunol* 1994; 24: 980-9.
66. Bowers H, Mahapatro R, Kennedy P. Number of mast cells in the axillary lymph nodes of breast cancer patients. *Cancer* 1979; 43: 568-78.
 67. Dabbous M, Walker R, Haney L, et al. Mast cells and matrix degradation at sites of tumor invasion on rat mammary adenocarcinoma. *Br J Cancer* 1986; 54: 459-64.
 68. Lauría L, Eijan A, Bertolesi G, Isturiz M. Influence of mast cells on tumor development. *Tumor Biology* 1996; (in press).
 69. Bertolesi G, Lauría L, Lustig E, Eijan A. heparin receptors in two murine mammary adenocarcinomas with different metastatic ability. Relationship with growth inhibition. *Cancer Letters* 1996; (in press).
 70. Bertolesi G, Lauría L, Eijan A. Growth inhibition in vitro of murine mammary adenocarcinoma cells by heparin and chemically modified heparins. *Tumor Biol* 1994; 15: 196-201.
 71. Cidre L, Lustig E. Mast cell kinetics during tumor growth. *Tumor Biol* 1990; 11: 196-201.
 72. Hartveit F. Mast cell and metachromasia in human breast cancer. Their occurrence, significance and consequences: A preliminary report. *J Pathol* 1981; 134: 7-11.
 73. Vauthay L, Zapata S, Bonaparte Y. Histological studies in tumor draining lymph nodes. Early modifications induced by murine metastatic and non metastatic tumors. *Com Biol (Bs As)* 1992; 10: 1-9.
 74. Forni G, Giovarelli M, Cavallo F, et al. Cytokine-induced tumor immunogenicity: from exogenous cytokines to gene therapy. *J Immunother* 1993; 14: 253-7.
 75. Klein S, Jasnis M, Lustig E, Algranati I. Differential effects of DFMO, rHu α -tumor necrosis factor and rMu γ interferon on primary murine tumor growth and metastasis occurrence. *J Exp Clin Cancer Res* 1990; 9: 85-91.
 76. Elliot B, Carlow D, Rodricks A, Wade A. Perspectives on the role of the MHC antigens in normal and malignant cell development. *Adv Cancer Res* 1989; 53: 181-245.
 77. Tanaka T, Yoshioka T, Bieberich C, Jay G. Role of the MHC class Y antigens in tumor growth and metastasis. *Ann Rev Immunol* 1988; 6: 359-80.
 78. Kern DE, Kiamet JP, Jensen MCV, Greenberg P. Requirement for recognition of class II molecules and processed tumor antigen for optimal generation of syngeneic tumor-specific class I-restricted CTL. *J Immunol* 1986; 136: 4303-10.
 79. Jasnis MA, Klein S, Bogacz J. Crecimiento tumoral con células tratadas con hemisuccinato de colesterol. *Medicina (Buenos Aires)* 1986; 46: 527.
 80. Besedovsky H. Psychoneuroimmunology; an overview. In: Schmol H, et al (eds). New York: Hogrefe & Huber, 1992; p 13-28.
 81. Nahmod V, Finkielman S, Fernández-Castelo S, et al. El sistema nervioso central y el sistema neuroendócrino en la regulación de la respuesta inmune. *Medicina (Buenos Aires)* 1989; 49: 166-70.
 82. Roszman T, Jackson J, Cross R, et al. Neuroanatomic and neurotransmitter influences on immune function. *J Immunol* 1985; 135: 769s.
 83. Blalock J. The immune system. Our sixth sense. *The Immunologist* 1994; 2: 8-16.
 84. Vauthay L, Bonaparte YP. Modulation of the puberal estrogen-dependent pattern by syngeneic tumor and thymic extract. *Cancer J* 1995; 8: 211-3.
 85. Vauthay L, Bonaparte YP. Hormono-gonadal status at the time of surgery influences mast cell number in women with operable breast cancer. 12th European Immunology Meeting, 1994, Barcelona.

Tumor immunologists have attempted to harness and boost the immune system's power in all sorts of ways. Their hopes have often been raised, but never fulfilled. Perversely, their sting of failures seems to have immunised them against despair. They are ready to try again.

Los oncoinmunólogos han intentado controlar y estimular al sistema inmune de todas las maneras posibles. Hubo muchas esperanzas, pero éstas nunca fueron satisfechas. Perversamente, la sucesión de fracasos parecen haberlos inmunizados contra la desesperanza. Están listos para empezar de nuevo.

Cancer Vaccines. Once more unto the breach. *The Economist*, 17 December 1994,