

REVERSION DEL ECLIPSE INMUNOLOGICO Y VACUNACION TERAPEUTICA CONTRA EL CANCER EN UN MODELO EXPERIMENTAL

PAULA CHIARELLA¹, MARISA VULCANO², EVANGELINA LABORDE², MONICA VERMEULEN³, JUAN BRUZZO¹,
BARBARA REARTE², OSCAR D. BUSTUOABAD¹, RAUL A. RUGGIERO¹

¹División Medicina Experimental, ²División Inmunología, ³División Inmunología Oncológica,
Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Resumen Aunque existen vacunas para prevenir la aparición de tumores en animales de experimentación, la mayoría de los intentos por aplicar aquellas vacunas con fines terapéuticos contra tumores establecidos no han sido exitosos. Para comprender la naturaleza de esta refractariedad, estudiamos un tumor de ratón fuertemente inmunogénico inducido por el carcinógeno químico metilcolantreno. En nuestro modelo, el inicio de esta refractariedad coincidió con el comienzo de un estado de inmunosupresión conocido como "eclipse inmunológico" caracterizado por una pérdida o bloqueo de la respuesta inmune antitumoral después que el tumor ha superado cierto tamaño crítico. Este eclipse inmunológico fue acompañado por un proceso de inflamación sistémica en el organismo. El tratamiento de los ratones portadores de tumor con una única dosis del corticoide sintético dexametasona (DX) redujo los parámetros de inflamación sistémica e indujo la reversión del eclipse. Esta reversión no fue por sí misma curativa pero permitió que un tratamiento inmunológico basado en células dendríticas estimuladas con antígenos tumorales, que por sí solo era absolutamente ineficaz, pudiera ejercer un significativo efecto inhibitorio sobre un tumor en crecimiento. El esquema de dos pasos que comprende, primero, un tratamiento antiinflamatorio para revertir el eclipse y segundo, una estrategia de vacunación basada en células dendríticas destinada a estimular la respuesta inmune antitumoral, podría servir, eventualmente, como un modelo de inmunoterapia contra tumores en animales y seres humanos.

Palabras clave: tumor, inmunoterapia, inflamación sistémica

Abstract *Reversion of the immunological eclipse and therapeutic vaccination against cancer in an experimental model.* Although animals can be prophylactically immunized against the growth of tumor implants, most of the attempts to use immunotherapy to cause the regression of animal and human tumors once they become established have been unsuccessful. To understand the nature of this refractoriness we have studied a methylcholanthrene-induced and strongly immunogenic murine fibrosarcoma. In our model, the onset of this refractoriness was associated with the beginning of an immunosuppressive state known as "immunological eclipse" characterized by a loss of the antitumor immune response when tumor grows beyond a critical size. This immunological eclipse was accompanied by the emergence of a systemic inflammatory condition. Treatment of tumor-bearing mice with a single dose of a synthetic corticosteroid, dexamethasone (DX), reduced significantly all parameters of systemic inflammation and simultaneously reversed the immunological eclipse. The reversion of the eclipse upon DX treatment was not curative itself, but allowed an immunological therapy based in dendritic cells pulsed with tumor antigens, which was itself absolutely ineffective, to exert a significant inhibitory effect against an established growing tumor. The two-step schedule using an anti-inflammatory treatment to reverse the immunological eclipse plus a dendritic cell-based vaccination strategy aimed to stimulate the antitumor immune response, could serve eventually as a model of immunotherapy against animal and human tumors.

Key words: tumor, immunotherapy, systemic inflammation

La eficacia de las terapias contra el cáncer no ha mejorado en proporción directa con el esfuerzo invertido en la investigación de esta enfermedad¹.

En la actualidad existen tres tratamientos convencionales contra el cáncer: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Los dos primeros cumplen su objetivo terapéutico cuando las células tumorales se encuentran localizadas; cuando por el contrario éstas se han diseminado desde su punto de origen, estos métodos van perdiendo eficacia por lo que se requiere un procedimiento que destruya las células cancerosas dondequiera que se encuentren, y en tal propiedad radica la importancia de la quimioterapia. No obstante, los procedimientos

Recibido: 20-IX-2006

Aceptado: 8-XI-2006

Dirección postal: Lic. Paula Chiarella. División Medicina Experimental, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Pacheco de Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina.

Fax: (54-11) 4803-9475

e-mail: paulachiarella@argentina.com

quimioterapéuticos son, en mayor o menor medida, tóxicos para las células normales y su continua aplicación genera resistencia en el organismo y estos hechos son los que en definitiva limitan su eficacia¹. Tratamientos moleculares más modernos (herceptin, *imatinib mesylate*, ácido retinoico, etc.), aunque teóricamente promisorios, han mostrado hasta hoy sólo una eficacia relativa en ciertos tipos de cáncer. Una terapia ideal debería combinar la especificidad y la eficacia: especificidad, para eliminar sólo las células tumorales, dejando indemnes a las normales; eficacia, para eliminar todas las células tumorales. La inmunoterapia reuniría, al menos teóricamente, ambos requisitos y de hecho la idea de que el cáncer podría ser tratado por terapias inmunológicas data de 1890 con la propuesta de Paul Ehrlich y William Coley², aunque hasta hoy no ha sido la herramienta eficaz que imaginaron sus primero impulsores.

Hasta comienzos de los años 90, la mayoría de las vacunas contra el cáncer se preparaban mezclando células tumorales irradiadas o extractos de tumores, con adyuvantes bacterianos como la BCG, que incrementaban su inmunogenicidad. Una nueva estrategia de vacunación que ha resultado, en algunos casos, más efectiva que las anteriores para prevenir la aparición de tumores en animales de experimentación, ha sido desarrollada sobre la base de la capacidad de las células dendríticas estimuladas *in vitro* con antígenos tumorales o fusionadas con células tumorales, de activar el sistema T citotóxico antitumoral³. Otras estrategias basadas en el uso de células tumorales transfectadas para producir citoquinas que estimulan la respuesta inmune también han sido desarrolladas recientemente⁴. Sin embargo hasta hoy, todos estos procedimientos de vacunación han dado escasos resultados terapéuticos contra tumores establecidos, tanto en animales de experimentación como en la clínica^{4,5}.

El fracaso de la mayoría de los tratamientos inmunológicos contra el cáncer se ha atribuido a diversas causas. En primer lugar, se ha invocado la falta de inmunogenicidad o la poca inmunogenicidad de los tumores tratados, sobre la base de que tumores espontáneos de ratón, de rata, y presumiblemente humanos, exhiben por lo común una inmunogenicidad mucho menor que la de tumores experimentales inducidos por dosis masivas de carcinógenos químicos y virales^{6,7}. Otra posibilidad es que los tumores, aun cuando pueden ser inmunogénicos al iniciar su crecimiento, pueden sufrir mutaciones a medida que crecen dando como resultado la pérdida o la disminución de la expresión de sus antígenos, evadiendo de este modo el sistema inmunológico⁴.

Implícita en estas causas, invocadas para explicar la refractariedad de los tumores establecidos a los tratamientos inmunológicos, subyace la idea de que la eficacia de estos tratamientos dependería básicamente de la inmunogenicidad del tumor, independientemente del es-

tado del organismo donde éste se desarrolla. Por tal motivo, la gran mayoría de los protocolos de inmunoterapia antitumoral han procurado y procuran mejorar la forma de presentar los antígenos tumorales al sistema inmunológico, de manera tal de estimular más eficazmente la respuesta inmune destinada a rechazar el tumor, antes de que éste modular su expresión antigénica.

Pero, ¿son necesariamente válidas estas consideraciones? Si un tumor es muy inmunogénico, y persiste como tal durante todo su crecimiento, ¿va a ser relativamente sencillo eliminarlo con terapias inmunológicas?, ¿o por alguna razón un organismo portador de tumor se hace refractario a las terapias inmunológicas independientemente de la inmunogenicidad del tumor?

Para responder a estas preguntas, hemos trabajado en nuestro laboratorio con un fibrosarcoma de ratón de la cepa BALB/c, inducido por el carcinógeno químico metilcolantreno al que hemos denominado MC-C. Para determinar su inmunogenicidad se emplearon los siguientes métodos de vacunación: implantación y extirpación de tumor, pretratamiento con dosis subletales de células tumorales, pretratamiento con células tumorales irradiadas con rayos X o inactivadas por calor, transferencia pasiva de esplenocitos inmunes (todos los cuales han sido descritos previamente con detalle^{8,9}) y pretratamiento con células dendríticas estimuladas *in vitro* con lisado tumoral o con células tumorales irradiadas. Las células dendríticas se obtuvieron de células precursoras de médula ósea que se extrajeron del fémur y tibia de ratones BALB/c y se resuspendieron en RPMI 1640 conteniendo 1% de SFB. Luego de lisar los eritrocitos con cloruro de amonio (0.14 M), las células se lavaron y se resuspendieron (1×10^6 /ml) en medio RPMI 1640 conteniendo 10% de SFB, 1% de antibióticos (penicilina y estreptomycin), 5×10^{-5} M β -mercaptoetanol y 30% del sobrenadante de cultivo de la línea J588 productora de GM-CSF. Al cabo de 9 días de cultivo, se obtuvo una población con un 90% de células dendríticas CD11c⁺ (DC). La maduración de las DC se llevó a cabo incubando las células durante 48 h con lisado tumoral de MC-C en relación 1:4 o con células MC-C irradiadas. Luego, ratones normales (sin tumor) fueron inoculados con 3×10^5 DC maduras intra foot pad. A los 7 y 14 días post inoculación de las DC maduras los ratones recibieron un implante con células tumorales MC-C vivas.

Los resultados de estos experimentos revelaron que el tumor MC-C es fuertemente inmunogénico dado que los diferentes métodos de vacunación empleados fueron capaces de impedir el desarrollo de implantes de MC-C, incluso cuando el número de células tumorales implantadas fue muy alto (5×10^7 células).

Sin embargo, estos mismos procedimientos utilizados no ya como vacunas preventivas sino como posibles herramientas o vacunas terapéuticas para tratar el mismo tumor MC-C una vez que se encuentra establecido,

no tuvieron ningún efecto aun cuando el tamaño del tumor a tratar fue muy pequeño. La única excepción fueron las células dendríticas estimuladas *in vitro* con lisado del tumor MC-C. En efecto, cuando 3×10^5 de estas células fueron inoculadas en la almohadilla plantar de ratones que albergaban un tumor MC-C de 10-70 mm³ (para cálculo del volumen tumoral ver cita 8), se observó un retardo del crecimiento tumoral y una mayor supervivencia (76.0 ± 8.4 días; n= 6) que la observada en ratones controles portadores de MC-C de igual tamaño inoculados con células dendríticas inmaduras o solución fisiológica (60.1 ± 3.2 días; n= 11, p< 0.05).

Sin embargo, tumores poco mayores que 70 mm³ no fueron afectados por ninguna de las terapias inmunológicas utilizadas, incluida la terapia con células dendríticas maduras. Ahora bien, la causa de esta refractariedad a los tratamientos inmunológicos no puede atribuirse ni a la falta de inmunogenicidad del tumor (ya que, según vimos, éste es fuertemente inmunogénico), ni tampoco a la pérdida de sus antígenos por mutación una vez que el tumor ha superado cierto tamaño, ya que independientemente del tamaño del tumor del cual nosotros obtenemos células tumorales, hemos demostrado que éstas son eficientemente eliminadas *in vitro* por esplenocitos de ratones inmunes al tumor MC-C e *in vivo* en animales previamente inmunizados contra el tumor MC-C (datos no mostrados).

En nuestro modelo, el inicio de la refractariedad a los tratamientos inmunológicos coincidió con el comienzo de un estado de inmunosupresión conocido como "eclipse inmunológico"¹⁰ caracterizado por una pérdida o bloqueo de la respuesta inmune antitumoral después que el tumor MC-C ha superado cierto volumen crítico⁸. A su vez, el inicio del eclipse se correspondió con el comienzo de un proceso de inflamación sistémica progresiva caracterizado por un aumento en el número de neutrófilos circulantes (alcanzando un valor máximo de $23\,900 \pm 3\,160$ neutrófilos/ μ l, n=4, a los 41 días de crecimiento del tumor MC-C, significativamente mayor (p<0.001) que los valores normales: $2\,900 \pm 260$ neutrófilos/ μ l, n=4) en bazo (muchos de ellos activados y con alta expresión de GR1+MAC1+) y elevada concentración sérica de TNF- α , proteína C reactiva (CRP) y proteína A amiloide (SAA), alcanzando valores máximos (n=4) de 429 ± 21 pg/ml (TNF- α), 180 ± 27 ng/ml (CRP) y $6\,059 \pm 567$ μ g/ml (SAA), a los 41 días de crecimiento de MC-C, significativamente mayores que los valores normales (n=4) para TNF- α (86 ± 11 pg/ml, p<0.001), CRP (76 ± 17 ng/ml, p<0.05) y SAA (73 ± 32 μ g/ml, p<0.001). Este fenómeno de inflamación sistémica ha sido también observado en otros modelos de tumores de ratón¹¹; además, en algunos cánceres humanos, como los tumores colorrectales, hepatocelulares y cervicales, un proceso inflamatorio ha sido reconocido indiscutiblemente como un cofactor que promueve el crecimiento tumoral¹¹.

Sobre la base de que esta inflamación sistémica podría ser una de las causas del eclipse y consecuentemente de la refractariedad a las terapias inmunológicas observada en los ratones portadores de tumor, nosotros realizamos un tratamiento antiinflamatorio usando un corticoide sintético (dexametasona) como paso previo a una terapia inmunológica basada en células dendríticas. Aunque el tratamiento con dexametasona puede ser inmunosupresor si se lo realiza en forma continuada, la aplicación de una sola dosis ha demostrado ser eficaz para revertir la tolerancia a ciertos antígenos¹² y para aumentar la inmunidad antitumoral en algunos modelos de ratón¹³.

En nuestro modelo, la aplicación de una sola dosis de dexametasona (0.50 mg/Kg de peso por vía intraperitoneal) revirtió parcial o totalmente los marcadores de inflamación sistémica (estos marcadores medidos a los 41 días del crecimiento tumoral, tres días después de la aplicación de dexametasona fueron (n=4): neutrófilos circulantes: $10\,280 \pm 327$ / μ l, p<0.01 vs portadores de MC-C de 41 días; TNF- α : 90 ± 9 pg/ml, p<0.001; CRP: 94 ± 21 ng/ml, p<0.05 y SAA: 330 ± 30 μ g/ml, p<0.001) y, como se ha mostrado previamente¹⁴, también revirtió el estado del eclipse inmunológico, lo cual fue demostrado por la recuperación de los siguientes indicadores de respuesta inmune antitumoral: capacidad para transferir pasivamente inmunidad contra MC-C, capacidad para generar inmunidad concomitante contra implantes secundarios de MC-C y presencia de gran número de linfocitos en la periferia y en el interior de estos implantes secundarios, lo cual es revelador de una respuesta inmune antitumoral. En cuanto a la recuperación de la capacidad para transferir pasivamente inmunidad por esplenocitos, los datos fueron (n=4): supervivencia de ratones que recibieron 5×10^5 células MC-C +: a) nada (control) = 58.5 ± 6.2 días; b) esplenocitos de portadores de MC-C de 41 días = 56.2 ± 3.3 días; c) esplenocitos de portadores de MC-C que habían recibido dexametasona 3 días antes = 89.3 ± 6.7 días, p<0.02 vs. a), p<0.01 vs. b). En cuanto a la recuperación de la capacidad para generar inmunidad concomitante, los datos fueron: incidencia de tumor secundario/total en a) controles 34/34; b) portadores de MC-C de 25 días al momento del implante secundario: 23/27; c) portadores de MC-C de 25 días que habían recibido 3 días antes dexametasona: 18/31, p<0.001 vs. a), p<0.05 vs. b).

El efecto terapéutico de un tratamiento combinado con dexametasona y células dendríticas fue evaluado en dos condiciones experimentales que simulaban dos situaciones clínicas.

En el primer experimento, ratones portadores de MC-C de 600 mm³ (en una etapa donde ya se ha hecho claramente manifiesto el eclipse inmunológico) recibieron dexametasona y tres días después células dendríticas estimuladas con lisado de tumor. Como se observa en la

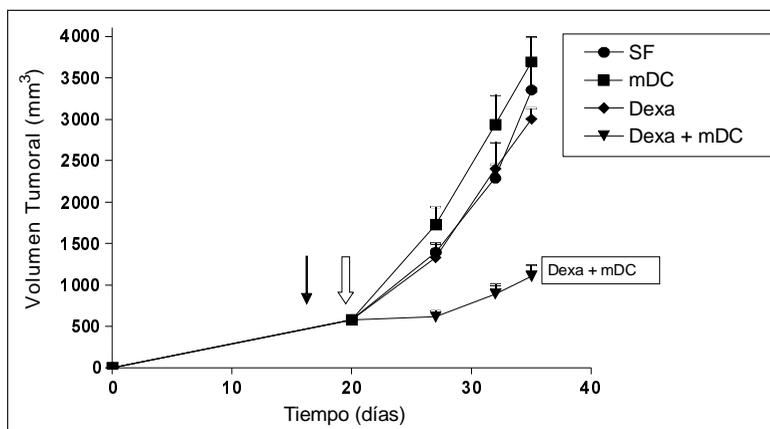


Fig. 1.— Cinética de crecimiento del tumor MC-C en ratones que recibieron un tratamiento combinado de dexametasona (Dexa) y células dendríticas estimuladas con lisado de MC-C (mDC) cuando el tumor MC-C tenía 600 mm^3 (Dexa + mDC, $n=6$). Otros ratones portadores de MC-C fueron tratados con mDC ($n=8$) solamente; con Dexa ($n=6$) solamente, o con solución fisiológica (SF, $n=11$).

↓: Día de inoculación de Dexa. ↓↓: Día de inoculación de mDC.

La diferencia entre los grupos tratados con mDC + Dexa y los otros grupos fue altamente significativa en todos los puntos evaluados ($p < 0.01$ vs. Dexa y $p < 0.001$ vs. mDC o SF).

Diferencia entre grupo que recibió sólo mDC y el conjunto de los que recibieron SF o Dexa ($p < 0.05$, día 27).

Fig. 1. los ratones que recibieron este tratamiento combinado mostraron una profunda inhibición del crecimiento tumoral. De hecho, en los primeros 7-10 días de iniciado el tratamiento, el tumor virtualmente no creció. A partir de los 10-12 días comenzó a hacerlo pero a un ritmo mucho más lento que el de los otros grupos, resultando en una sobrevida de 90.5 ± 3.0 días, lo que excedió significativamente ($p < 0.001$) la sobrevida de los grupos tratados sólo con células dendríticas (54.8 ± 2.8 días), sólo con dexametasona (57.2 ± 5.2 días) o con solución fisiológica (55.3 ± 0.6 días). Adicionalmente, cabe notar que en los ratones que recibieron sólo células dendríticas, el tumor creció más rápido en la semana posterior al tratamiento que en aquéllos que recibieron sólo dexametasona o solución fisiológica ($p < 0.05$, día 27), lo que sugiere que bajo ciertas condiciones, cuando el tumor ha alcanzado cierto tamaño y el eclipse inmunológico no ha sido eliminado, una terapia inmunológica puede exacerbar el crecimiento del tumor de acuerdo a las predicciones de la teoría inmunostimuladora de Prehn¹⁵.

En el segundo experimento, se utilizaron ratones a los que se había extirpado quirúrgicamente un tumor MC-C de gran tamaño ($>2000 \text{ mm}^3$). Cuando se opera un tumor de este tamaño el eclipse inmunológico no desaparece (como hemos comprobado por pruebas inmunológicas hasta cuatro meses después de la operación) y la cirugía es habitualmente no curativa ya que, transcurridos 7-10 días después de la operación, se presentan recidivas locales en la mayoría de los casos. Esta situa-

ción no varió sensiblemente cuando los ratones fueron tratados sólo con dexametasona o sólo con células dendríticas. Sin embargo, la aplicación combinada de dexametasona tres días antes de la extirpación del tumor y células dendríticas dos días después de la misma, disminuyó la incidencia de recidivas de 76-100% a un 25%, y los pocos ratones que exhibieron recidivas murieron más tardíamente que los de los otros grupos (Fig. 2).

Estos dos experimentos demuestran que un tratamiento inmunológico basado en células dendríticas, que por sí mismo era absolutamente ineficaz para controlar el crecimiento de un tumor establecido de considerable tamaño, o de prevenir la aparición de recidivas en animales a los que se había extirpado un tumor de gran tamaño, generó una profunda inhibición del tumor establecido y previno la aparición de recidivas cuando fue precedido por un tratamiento antiinflamatorio que eliminó o redujo la inflamación sistémica y el eclipse inmunológico a ella asociado. Teniendo en cuenta que el tumor utilizado es un fibrosarcoma y que los fibroblastos son células blanco de glucocorticoides, sería interesante estudiar este efecto usando un tumor inmunogénico de otra estirpe histológica para poder generalizar el fenómeno, aunque en nuestras manos, la dosis de dexametasona empleada no inhibió por sí misma el crecimiento del fibrosarcoma MC-C.

En conclusión, todos los resultados presentados en esta comunicación parecen demostrar que el éxito obtenido con un determinado protocolo de vacunación apli-

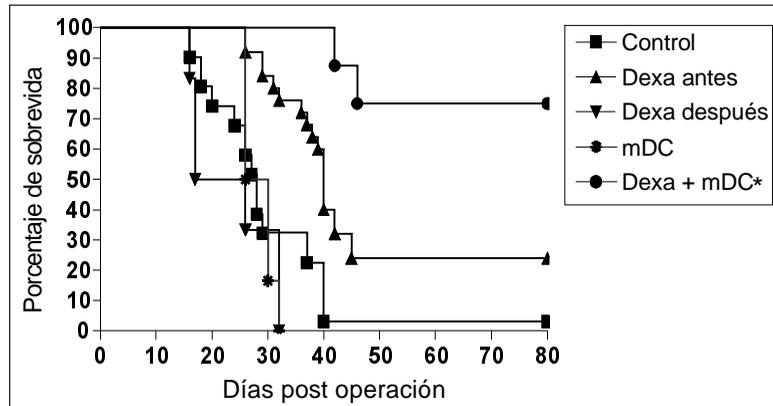


Fig. 2.— Supervivencia de ratones a los que se había extirpado un tumor MC-C >2000 mm³ y que experimentaron recidivas en el sitio de la operación. Estos ratones fueron sujetos a distintos tratamientos. Control: sin tratamiento adicional (ratones con recidiva/total=30/31); Dexa antes: recibieron dexametasona tres días antes de la extirpación del tumor (ratones con recidiva/total=19/25); Dexa después: recibieron dexametasona tres días después de la extirpación del tumor (ratones con recidiva/total=6/6); mDC: recibieron células dendríticas estimuladas con lisado de tumor dos días después de la extirpación del tumor (ratones con recidiva/total=6/6); Dexa + mDC: recibieron dexametasona tres días antes de la extirpación del tumor y células dendríticas estimuladas con lisado de tumor dos días después de la extirpación del tumor (ratones con recidiva/total=2/8). * $p < 0.001$ vs. control, Dexa después y mDC; $p < 0.01$ vs. Dexa antes. Los resultados mostrados corresponden a datos reunidos de dos experimentos similares.

cado como *preventivo* de la aparición de un tumor, no garantiza en absoluto la eficacia de este mismo protocolo utilizado ahora como *terapéutico contra ese mismo tumor en crecimiento*, si previamente no se corrige el estado particular del organismo responsable de la refractariedad a los tratamientos inmunológicos antitumorales. De hecho, el protocolo combinado de terapia en dos pasos que hemos diseñado, donde el primero estaría destinado a eliminar el eclipse inmunológico y la refractariedad a la inmunoterapia, y el segundo a inducir un fuerte estímulo de la respuesta inmune antitumoral una vez que aquella refractariedad hubiera desaparecido, podría servir como punto de partida para elaborar modelos de inmunoterapia racional contra tumores experimentales y humanos.

Bibliografía

- Bailar JC, Gornik HL. Cancer Undefeated. *N Engl J Med* 1997; 336: 1569-74.
- Waldmann TA. Immunotherapy: past, present and future. *Nature Med* 2003; 9: 269-77.
- Nestle FO, Aljagic S, Gilliet M, Sun, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide or tumor lysate-pulsed dendritic cell. *Nature Med* 1998; 4: 328-32.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiología*. 2° ed. Barcelona: Masson, 2003, p13-15.
- Cranmer LD, Trevol KT, Hersh EM. Clinical applications of dendritic cells vaccination in the treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 275-306.
- Hewitt HB, Blake ER, Walder AS. A critique of the evidence for active host defense against cancer based on personal studies of 27 murine tumors of spontaneous origin. *Br J Cancer* 1976; 33: 241-59.
- Middle JG, Embleton MJ. Naturally arising tumors of the inbred WAB/Not rat strain II. Immunogenicity of transplanted tumors. *J Natl Cancer Inst* 1981; 67: 637-43.
- Franco M, Bustuoabad OD, di Gianni PD, Goldman A, Pasqualini CD, Ruggiero RA. A serum-mediated mechanism for concomitant resistance shared by immunogenic and non-immunogenic murine tumours. *Br J Cancer* 1996; 74: 178-86.
- Ruggiero RA, Bustuoabad OD, Bonfil RD, Meiss RP, Pasqualini CD. "Concomitant immunity" in murine tumours of non-detectable immunogenicity. *Br J Cancer* 1985; 51: 37-48.
- North JR. The murine antitumor immune response and its therapeutic manipulation. *Adv Immunol* 1984; 35: 89-155.
- Kamate C, Baloul S, Fradelizi D, et al. Inflammation and cancer, the mastocytoma P815 tumor model revisited: triggering of macrophage activation *in vivo* with protumorigenic consequences. *Int J Cancer* 2002; 100: 571-9.
- Siskind GW. Immunologic Tolerance. In W. E. Paul (Ed) *Fundamental Immunology*, New York: Raven Press, 1984, p 537-58.
- Hiramato Y, Sugimachi K. Effect of glucocorticoid deficiency alters adrenalectomy on antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 1987; 25: 157-60.
- Ruggiero RA, Vanzulli S, Vermeulen M, Vulcano M, Bustuoabad OD. Reversión del eclipse inmunológico de ratones portadores de tumor mediante tratamientos antiinflamatorios. *Medicina* 2004; 64: 278.
- Prehn RT. An adaptive immune reaction may be necessary for cancer development. *Theor Biol Med Model* 2006; 3: 6-14.