



Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Médicas
Instituto de Genética Experimental



MECANISMOS MOLECULARES Y CELULARES
INVOLUCRADOS EN LA ACCIÓN
ANTIMETASTÁSICA DE DOSIS BAJAS DE
CICLOFOSFAMIDA EN UN MODELO DE LINFOMA
EXPERIMENTAL

Doctorando: María José Rico

Director: O. Graciela Scharovsky

2009

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a la Dra. Graciela Scharovsky, por haberme dirigido en este trabajo, por haberme acompañado en cada uno de los momentos por los que transité en estos años, tanto en lo profesional como también en lo personal. Agradezco todo lo que me ha enseñado y capacitado y por sobre todas las cosas por haberme brindado su amistad.

Gracias a María Teresa Font por haberme permitido realizar mi Tesis en el Instituto de Genética Experimental en donde sin lugar a dudas encontré una segunda casa.

Gracias a Vivi, por la ayuda con los experimentos, por la amistad, por escucharme, por los consejos de madre, por estar en los momentos que tanto necesité.

Gracias a Mariano, Leandro y Ana, por la amistad, el compañerismo, los buenos consejos, por los inolvidables momentos compartidos.

Gracias a todos los miembros del IGE: los de siempre Patri, Luly, Ricardo, Pablo, Ana, Silvia, María Delia, como así también a los nuevos integrantes: Virginia, Gisela, Juan Manuel, Leonardo, Flavio, por hacer del lugar de trabajo un lugar cálido y acogedor en donde siempre me he sentido como en casa.

Gracias a mis amigas, a mis hermanas por elección, Eli, Juli, Stell, Lau, gracias por haberme acompañado en este como en todos los momentos importantes de mi vida. Ustedes hicieron muchas veces que todo tenga sentido. Gracias simplemente por estar...

Gracias muy especialmente a mamá y a papá por todo, principalmente por la VIDA que me han dado, por enseñarme a vivir en ella, con confiar en mí, por dejarme elegir,

por ser realmente incondicionales en todo, por entender y compartir cada uno de los esfuerzos que permitieron que hoy pueda estar acá. Gracias, todo esto se los debo a ustedes!

Gracias, de todo corazón, a mis hermanos, por estar siempre a mi lado, por acompañarme y escucharme siempre, por darme ánimo y alentarme para que siga adelante aún en momentos difíciles

Gracias a Pablo, por su amor, comprensión, paciencia, por acompañarme en esta carrera, cosa que a veces no es nada fácil. Gracias por apoyarme en mis decisiones y por aconsejarme siempre desde el amor.

Finalmente quiero agradecer a mis dos amores, Fran y Agos, por darle un nuevo sentido a mi vida, por ser dos luces que guían mi vida, gracias porque por ustedes TODO vale la pena y ningún esfuerzo es demasiado grande, las amo!

A todos los que, de una forma u otra, han contribuido a que esté completando esta etapa de mi vida, que sin lugar a dudas va a ser por siempre inolvidable...**MUCHAS GRACIAS**

Índice

1. Introducción	1
1.1. Cáncer	1
1.2. Metástasis	2
1.2.1. Cascada metastásica	3
1.3. Heterogeneidad celular tumoral	5
1.4. Inmunología tumoral	6
1.4.1. Mecanismos inmunes efectores antitumorales	8
1.4.2. Evasión tumoral de la respuesta inmune	8
1.5. Inmunoterapia	9
1.6. Terapia antimetastásica	10
1.6.1. Ciclofosfamida	10
1.7. Interleuquina 10 (IL-10)	12
1.8. Receptor de IL-10	13
1.8.1. Estructura y expresión	13
1.9. Funciones biológicas de IL-10	13
1.10. IL-10 y Cáncer	14
1.11. Galectina-1	14
1.11.1. Estructura y funciones biológicas	15
1.12. Células reguladoras	15
1.12.1. Células reguladoras naturales	17
1.12.2. Células reguladoras inducibles o adaptativas (Tr1)	17
1.12.3. Mecanismos de supresión	17
1.12.4. Roles fisiológicos de los subgrupos de células Tregs	18
1.12.5. Células reguladoras y Galectina-1	18
1.12.6. Células reguladoras y Ciclofosfamida	18
1.12.7. Células NKT	19
1.12.7.1. NKT tipo I	20
1.12.7.2. NKT tipo II	20

1.12.7.3. Desarrollo y diferenciación efectora	20
1.12.7.4. Mecanismos de activación	21
1.12.7.5. Mecanismos de regulación	21
1.12.7.6. Funciones de las células NKT	21
1.12.7.7. Células NKT y Cáncer	22
2. Objetivos	23
3. Materiales y Métodos	24
3.1. Animales	24
3.2. Tumores	24
3.3. Histopatología	26
3.4. Drogas	26
3.5. Anticuerpos	26
3.6. Ensayo de proliferación celular	27
3.7. Cuantificación de IL-10	28
3.8. Cuantificación de IL-10R (receptor de IL-10)	29
3.9. Modulación de la expresión de Galectina-1 por Mafosfamida en células L-TACB primarias y metastásicas	30
3.10. Determinación de la concentración de proteínas	30
3.11. Western Blot para Gal-1	30
3.12. Análisis densitométrico	31
3.13. Determinación de viabilidad celular	31
3.14. Evaluación de la apoptosis temprana. Anexina V	32
3.15. Cinética de expresión de Gal-1 en tumor y bazo de animales portadores del linfoma L-TACB tratados con Cy	33
3.16. Determinación de Galectina-1 por inmunohistoquímica	34
3.17. Cinética de expresión de Gal-1 en tumor y bazo de animales portadores del linfoma L-DGE tratados con Cy	35
3.18. Cinética de expresión de Gal-1 en otros modelos tumorales	35
3.19. Interrelación entre sistema inmune y expresión de Gal-1 durante el crecimiento tumoral en distintos modelos murinos	36
3.20. Modulación de la expresión de Gal-1 con inhibidores de vías de transducción de señales	36

3.21. Estudio de las poblaciones linfocitarias reguladoras de la respuesta antitumoral	37
3.21.1. Células T reguladoras	37
3.21.2. Células NKT tipo I	38
3.22. Análisis estadísticos	39
4. Resultados	40
4.1. Efecto de Mafosfamida sobre la proliferación de células L-TACB de tumor primario y metástasis	40
4.2. Producción de IL-10 por células L-TACB de tumor primario y metástasis	41
4.3. Cuantificación de IL-10R (receptor de IL-10) en células L-TACB de tumor primario y metástasis	42
4.4. Efecto de Mafosfamida sobre la expresión de Galectina-1 (Gal-1) en células tumorales primarias y metastásicas	43
4.5. Efecto de Gal-1 sobre la viabilidad de esplenocitos de ratas portadoras de L-TACB	47
4.6. Efecto de Gal-1 sobre la apoptosis de esplenocitos de ratas tratadas con Cy	48
4.7. Cinética de la expresión de Gal-1 en el linfoma L-TACB	50
4.8. Estudio de la expresión de Gal-1 en tejido tumoral y metastásico de L-TACB	52
4.9. Correlación entre volumen tumoral y expresión de Galectina-1	52
4.10. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de Galectina-1	53
4.11. Determinación de la cinética de expresión de Gal-1 en tumor y bazo de animales portadores del linfoma L-DGE	54
4.12. Correlación entre volumen tumoral y expresión de Galectina-1 en L-DGE	55
4.13. Cinética de expresión de Gal-1 en otros modelos tumorales	56
4.14. Análisis de la influencia del sistema inmune sobre el crecimiento tumoral y la expresión de Gal-1 en distintos modelos tumorales murinos	58
4.15. Vías de transducción de señales implicadas en la modulación de Galectina-1	64
4.16. Estudio de las poblaciones linfocitarias reguladoras de la respuesta antitumoral	66
4.16.1. Células T reguladoras	66
4.16.2. Células NKT I	72
5. Discusión y Conclusiones	76
6. Referencias	104

1. Introducción

1.1. Cáncer

Bajo el nombre de cáncer se agrupan muchas enfermedades diferentes. El cáncer se produce cuando, por diferentes razones, algunas células pierden el control sobre el crecimiento celular y los mecanismos de muerte natural, y comienzan a multiplicarse sin orden ni control. Cada parte del cuerpo está formada por células que se multiplican para llevar a cabo procesos normales como el crecimiento, el funcionamiento normal del organismo y la reparación de tejidos dañados. En el cáncer, las células continúan dividiéndose aún cuando no se necesitan nuevas células. Además, las células cancerosas son menos propensas a morir que las células normales. Para que las células normales se transformen en cancerosas se requieren varias alteraciones en los genes, dado que estos contienen la información necesaria para que dichos procesos se realicen en forma normal. Eventualmente, los genes alterados y un crecimiento celular sin control llegarán a producir un tumor que puede ser de carácter benigno o maligno, este último también conocido como cáncer (Weinberg RA, 2007). Los tumores malignos pueden invadir, dañar y destruir órganos adyacentes y diseminarse a otras partes del cuerpo. Por el contrario, un tumor benigno no posee la capacidad de diseminarse, de ahí su denominación de benigno; no obstante, algunos de ellos pueden dañar el tejido local y necesitan ser extirpados.

En los últimos 150 años el mundo económicamente desarrollado ha ido eliminando las enfermedades infecciosas como causa de mortalidad más significativa. Sin embargo, no ha sucedido lo mismo en los países subdesarrollados, en donde la tasa de muerte por enfermedades transmisibles alcanza el 43%, según el Informe sobre la salud en el mundo del 2007 de la Organización Mundial de la Salud (OMS). En este informe, además, se advierte a las autoridades sanitarias sobre un aumento en la incidencia mundial de enfermedades crónicas no transmisibles, en particular el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (OMS, 2007). En 1996, murieron 6,3 millones de personas por algún tipo de cáncer, constituyendo esta patología la tercera causa de muerte a nivel mundial (12%), después de las enfermedades infecciosas y parasitarias (33%) y las enfermedades cardiovasculares (29%). Las muertes debidas a

enfermedades infecciosas prevalecen en el mundo en desarrollo (43%), mientras que las que ocurren por enfermedades cardiovasculares lo hacen mayoritariamente en países desarrollados (45,6%).

En Argentina, las defunciones debidas al cáncer constituyen el 20% del total de las defunciones relevadas. Del total de las muertes debidas a tumores, un 96% se debió a tumores malignos y un 4% a carcinomas *in situ* y tumores benignos. El cáncer es la segunda causa de muerte en la Argentina, siendo la primera causa las enfermedades relacionadas con el sistema circulatorio que alcanzan un 33% (Estadísticas vitales - Información básica año 2000, Ministerio de Salud Pública de la República Argentina, 2001). Según una publicación más reciente, la tasa de mortalidad por cáncer es de 145,46/100000 habitantes/año, para el período 1997-2000 (Mortalidad por tumores malignos, 1993-1996 y 1997-2000, Ministerio de Salud de la República Argentina, 2002).

Numerosos estudios epidemiológicos muestran que los tipos de cáncer más frecuentes (pulmón, mama, próstata colon y recto) han aumentado su incidencia en aquellos lugares donde aumentaron los factores de riesgo (tabaquismo, dietas inadecuadas, sedentarismo y exposición a agentes químicos ambientales) (Hoel DG, 1992).

Si bien el cáncer comprende muchos tipos diferentes de tumores, y cada neoplasia en cada órgano en particular presenta numerosas variedades, la característica común a todas las neoplasias malignas es la capacidad de originar metástasis, las cuales constituyen la causa de la mayor parte de las muertes por cáncer.

1.2. Metástasis

El fenómeno de desarrollo de metástasis es un proceso de etapas múltiples que una célula tumoral debe llevar a cabo con éxito para alcanzar un sitio distante del tumor primario, proliferar y dar lugar a un crecimiento secundario. Esta serie de etapas, cada una de las cuales encierra en sí misma una particular complejidad, tanto desde el punto de vista bioquímico como genético, recibe el nombre de cascada metastásica (Bonfil RD, 2002; Weinberg RA, 2007).

La serie concatenada de pasos que lleva al desarrollo de un tumor secundario en un sitio diferente al de origen tiene la siguiente secuencia: desprendimiento de las células con fenotipo metastásico, invasión del estroma local hasta llegar a un vaso sanguíneo (proceso que se lleva a cabo mediante adhesión, degradación de la matriz extracelular y locomoción celular y reiteración de esta tríada de pasos), penetración en el torrente circulatorio sanguíneo y/o linfático, proceso conocido como intravasación, supervivencia en la circulación y diseminación, detención y extravasación, proliferación y formación de tumores secundarios (Schirrmacher V, 1984). En esta última etapa, al igual que en los primeros estadios del crecimiento tumoral primario, es crucial el fenómeno de angiogénesis, el cual consiste en la generación de nuevos vasos sanguíneos que penetran el tumor y le brindan los nutrientes necesarios para poder seguir proliferando (Folkman J, 1992).

La mayoría de los tumores primarios pueden ser tratados exitosamente por cirugía solamente o en combinación con quimioterapia, radioterapia o algún tipo de terapia biológica. En este aspecto, la detección precoz de los tumores primarios, la cual ha mejorado por el gran avance alcanzado en la resolución de las técnicas exploratorias, permite que los tratamientos aplicados sean más efectivos y aumente considerablemente la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, en muchos casos, al momento del diagnóstico de un tumor primario, el paciente ya posee múltiples micrometástasis que escapan a la capacidad de detección por los métodos diagnósticos con que se cuenta en la actualidad (Fidler IJ, 1997; Weinberg RA, 2007).

1.2.1. Cascada metastásica. El desarrollo de tumores secundarios involucra una serie de eventos correlativos en los que la célula neoplásica interactúa con el hospedador. Ésta involucra, en primer lugar, la invasión primaria e intravasación, atravesando la membrana basal e infiltrando el estroma intersticial para luego, al encontrar un vaso linfático o sanguíneo, intravasarse y liberarse a la circulación en forma solitaria o formando agregados celulares homo- o heterotípicos. Durante el proceso de diseminación, las células neoplásicas en migración deben soportar la acción

traumática causada por la turbulencia generada por el movimiento de fluidos, las deformaciones debidas al paso por la microcirculación, y el ataque de las células del sistema inmune. En un momento determinado, la célula tumoral se detiene en un órgano debido a que queda atrapada por un filtro capilar o por interacciones específicas con las células endoteliales de ése órgano. Esa célula se adhiere al endotelio vascular a través de moléculas de adhesión e induce la retracción de las células endoteliales, exponiendo de esta manera la membrana basal sub-endotelial. Luego, mediante la acción de enzimas proteolíticas, se produce una brecha en ésta que permite la extravasación de la célula que, finalmente, debido a su motilidad estimulada por factores de la propia célula y/o de la matriz extracelular, pasa al parénquima del órgano blanco. alguna de las células tumorales que lograron llegar al órgano blanco comienza a proliferar utilizando nutrientes y gases que llegan por difusión, generando así las micrometástasis. Estos tumores secundarios microscópicos comienzan luego a vascularizarse, a instancias de factores angiogénicos secretados por las mismas células tumorales o por células estromales, lo que permitirá su proliferación y conversión en metástasis macroscópicas que, a su vez, pueden generar metástasis secundarias (Bonfil RD, 2002; Chambers AF, 1999; Weinberg RA, 2007). Estudios recientes postulan, además, una variante a este modelo: el desarrollo de metástasis seguiría dos rutas diferentes pero con resultados similares. Un modelo implica la migración de las células tumorales desde el tumor primario hasta la sangre o los nódulos linfáticos, lugar en el que se forman metástasis sólidas y de las cuales las células vuelven a migrar para formar otras metástasis en diferentes órganos. En el otro modelo, la diseminación de las células neoplásicas procede sin el pasaje por los nódulos linfáticos hacia sitios distantes (Pantel K, 2004).

Recientemente, se ha planteado una nueva teoría sobre el desarrollo de las metástasis en la que las células madre o *stem cells* jugarían un papel importante. Las tres características que se le atribuyen a las células madre, la auto-renovación, amplia proliferación y la capacidad de diferenciación, podrían explicar tanto el crecimiento sin control como y los patrones de crecimiento diferenciado que son detectables tanto en tumores benignos como malignos. Se ha definido a la célula madre tumoral como aquella célula cancerígena que tiene la capacidad de auto-renovarse, dividiéndose para

dar lugar a otra célula madre tumoral y a una célula que origina una población de células tumorales diferenciadas fenotípicamente diferentes. Se cree que las células madre normales son el blanco de la transformación maligna y de esta manera se podrían explicar las similitudes que existen entre estos dos tipos de células madre. Un modelo alternativo de la iniciación tumoral podría ser la fusión de células madre con células que han sufrido una serie de eventos mutacionales relacionados al desarrollo del cáncer (Bjerkvig R, 2005). Se ha postulado la existencia de dos formas de células madre del cáncer (*cancer stem cells*) durante la progresión del cáncer, las estacionarias y las móviles. Las estacionarias permanecen embebidas en el tejido epitelial y persisten en áreas diferenciadas durante todos los pasos de la progresión tumoral. Por otro lado, las células madre móviles se pueden diseminar y, reteniendo la capacidad de célula madre, pueden formar colonias metastásicas (Brabletz T, 2005). La ruptura de la homeostasis epitelial que conduce a la progresión del cáncer se encuentra correlacionada con la pérdida de las características epiteliales y la adquisición de un fenotipo migratorio. Este fenómeno se conoce como la transición epitelial-mesenquimal (EMT) y es considerado un evento crucial en la malignidad (Thiery JP, 2003). Este nuevo enfoque sobre el proceso metastático, no sería tal vez el único que explique el desarrollo de las metástasis.

Los tumores primarios están conformados por subpoblaciones celulares con características específicas (Heppner GH, 1984). Sólo aquellas capaces de atravesar todas las etapas de la cascada metastásica podrán llegar a destino y generar una colonia a partir del tumor primario en un sitio específico, el cual no es elegido al azar. El sitio de aparición de las metástasis depende en algunos casos de consideraciones anatómicas, como la presencia de filtros capilares en la circulación drenante del tumor (Ewing J, 1928). En otros casos, la aparición de tumores secundarios no depende de la anatomía del órgano sino que habría una preferencia de la célula tumoral por determinados órganos, mecanismo que a fines del siglo XIX, Paget explicó a través de la “Hipótesis de la semilla y suelo” (Paget S, 1889; Bonfil RD, 2002; Fidler IJ, 2003).

1.3. Heterogeneidad celular tumoral

Existe abundante evidencia experimental acerca del origen clonal de los tumores. La mayoría de los cánceres humanos se originan a partir de una única célula transformada, la cual prolifera y da lugar a la formación de un clon (Nicolson GL, 1984; Talmadge JE, 1989). Sin embargo, a lo largo de la evolución y progresión tumoral, una gran diversidad y heterogeneidad celular se origina dentro de un tumor primario. Las células obtenidas de un tumor en crecimiento difieren entre sí con respecto a su morfología, tasa de proliferación, cariotipo, características metabólicas, propiedades antigénicas e inmunogénicas, producción de proteínas tales como enzimas, receptores de superficie, moléculas de adhesión, y presentan diferente sensibilidad a drogas, invasividad y capacidad metastásica (Heppner GH, 1984).

El fenómeno de la heterogeneidad celular tumoral está ampliamente aceptado en la actualidad. Una consecuencia del mismo es el hecho, demostrado experimentalmente, que no todas las células que componen un tumor primario son capaces de desarrollar metástasis. El desarrollo de clones de células con fenotipo metastásico, dentro de una población de células tumorales, es el resultado de la inestabilidad genética y epigenética de las células neoplásicas, inherente al proceso de progresión tumoral y de la selección de células con alguna ventaja selectiva para invasión y metástasis. Cuando se aíslan células con alto potencial metastásico a partir de una población celular tumoral heterogénea, dichas células son genéticamente inestables y pueden generar, por pasajes *in vivo* o *in vitro*, subpoblaciones con mayor o menor capacidad metastásica. Es decir, el fenotipo metastásico es, en sí mismo, inestable (Fidler IJ, 1990). Esta característica trae como resultado la rápida generación de una gran diversidad y heterogeneidad celular dentro de una población tumoral metastásica (Nowel PC, 1976; Nicolson GL, 1991), a pesar del origen monoclonal de los tumores y de que las metástasis podrían desarrollarse a partir de un único clon de células (Fidler IJ, 1986).

1.4. Inmunología tumoral

La inmunología tumoral surgió como disciplina a mitad del siglo pasado, sobre la base de postulaciones de Paul Ehrlich planteadas a comienzos de ese siglo (Ehrlich P, 1909). Ehrlich definió al sistema inmune como aquél encargado de “la defensa del

organismo contra lo no propio”. La inmunología tumoral se fundamenta en la existencia de neoantígenos presentes en las células tumorales y ausentes en las células normales, a los que se denomina antígenos tumorales específicos o TSAs (del inglés, *tumor specific antigens*). Las primeras evidencias experimentales a favor de la generación de una respuesta inmune contra los tumores pertenecen a Gross, luego confirmadas por Foley (Gross L, 1943; Foley EJ, 1953). Estos autores, a mitad del siglo pasado, demostraron que los tumores inducidos por carcinógenos químicos eran rechazados por ratones singeneicos que previamente habían sido inmunizados contra el mismo tumor. Esta inmunidad, en cambio, no era efectiva contra otros tumores, ni siquiera por aquellos inducidos por el mismo carcinógeno. Pasada la primera mitad del siglo XX, Mc Farlane Burnet y Lewis Thomas propusieron la teoría de la vigilancia inmunológica, la cual postula la generación constante de células malignas en el cuerpo de un individuo que son reconocidas como no propias por su sistema inmune, el cual se encarga de eliminarlas. Posteriormente, Burnet modificó esta teoría involucrando a los linfocitos T, los cuales generarían una respuesta inmune específica de tipo celular en el hospedador al reconocer TSAs (Thomas L, 1959; Burnet MF, 1970). La aparición de tumores y/o la falta de rechazo tumoral indicarían una falla de la vigilancia inmunológica; en ello estarían implicados linfocitos supresores o anticuerpos bloqueantes. A lo largo de los años esta teoría fue duramente cuestionada pero, los hallazgos realizados en los últimos tiempos la sustentan. Sin embargo, esta sería sólo una de las etapas o formas en que el tumor puede relacionarse con el sistema inmune. En años posteriores se vio que la inmunovigilancia representa sólo una dimensión de las complejas relaciones existentes entre el sistema inmune y el cáncer (Dunn GP, 2002; Schreiber RD, 2004). Se desarrolló la hipótesis de la inmuoedición del cáncer la cual abarca el potencial protector del huésped y las funciones del sistema inmune esculpidas por el tumor durante el desarrollo tumoral. La inmuoedición del cáncer es un proceso dinámico compuesto por tres fases: eliminación, equilibrio y escape. La eliminación representa el concepto clásico de inmunovigilancia tumoral, el equilibrio es el período de latencia mediado por el sistema inmune luego de la destrucción incompleta del tumor en la fase de eliminación y el escape se refiere al crecimiento final de los tumores que lograron superar las restricciones de la fase de equilibrio (Dunn GP, 2002; Dunn GP, 2004).

Para completar el cuadro de la relación entre el sistema inmune y los tumores también se debe tener en cuenta la participación de mecanismos de inmunidad natural, ejercidos por macrófagos y linfocitos NK (del inglés *Natural Killer*, asesinos naturales), que reconocen la ausencia de moléculas MHC (del inglés, *Major Histocompatibility Complex*, Complejo Mayor de Histocompatibilidad), y de linfocitos $T_{\gamma\delta}$, los cuales poseen un papel protector, siendo los primeros en responder al proceso de transformación de células de la piel y otras células de origen epitelial (Ferrarini M, 2002).

1.4.1. Mecanismos inmunes efectores antitumorales. El sistema inmune dispone de varios mecanismos efectores para eliminar las células neoplásicas. Éstos pueden ser tanto específicos como inespecíficos. Respuesta inmune específica: los anticuerpos, mediadores de la respuesta inmune humoral, pueden destruir células tumorales a través de tres mecanismos diferentes: fijando moléculas del complemento, actuando como opsoninas que facilitan la fagocitosis por macrófagos, y/o generando citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Por el contrario, en la respuesta inmune celular, los linfocitos T citotóxicos, al reconocer antígenos tumorales específicos a través del receptor de célula T o TCR (del inglés, *T cell receptor*) y de las moléculas MHC, producen la lisis y destrucción de las células transformadas. Otros mediadores son las células asesinas activadas por linfoquinas o LAK (del inglés *lymphokine activated killer*). Estas células son linfocitos que carecen de marcadores de células T o B y que tienen la capacidad de destruir una amplia variedad de células transformadas al ser estimuladas *in vitro* por IL-2. Respuesta inmune inespecífica: las células NK pueden matar células tumorales *in vitro*, aunque su papel en la inmunidad antitumoral *in vivo* no está claro aún. Sin embargo, estas células serían las responsables de que ratones deficientes en linfocitos T no presenten una incidencia elevada de tumores espontáneos, cumpliendo la función de vigilancia inmunológica (Delves PJ, 2006). Además, los macrófagos activados por las citoquinas producidas por linfocitos tales como TNF- α (del inglés, *tumor necrosis factor*, factor de necrosis tumoral), IFN- γ (interferón gamma) y GM-CSF (del inglés, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos),

pueden matar células tumorales a través de la liberación de enzimas lisosomales, de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno, y la producción de citoquinas como TNF- α (Matar P, 2002).

1.4.2. Evasión tumoral de la respuesta inmune. A pesar de que, como se ha demostrado, muchos tumores son inmunogénicos (Ladányi A, 2000), éstos pueden evadir la respuesta inmune a través de diferentes mecanismos. Esta imposibilidad por parte del hospedador de eliminar el tumor, o la capacidad de éste de eludir la respuesta inmune, involucran diversos mecanismos tales como la modulación de la expresión de antígenos tumorales y de moléculas MHC, la ausencia de moléculas co-estimuladoras, la inducción de tolerancia, la expresión de moléculas que inducen apoptosis de las células inmunes (como FasL y Gal-1) y de factores inmunosupresores (Gilboa E, 1999; Kiessling R, 1999; Matar P, 2002). También, se han demostrado cambios en las vías de transducción de señales en linfocitos T CD8⁺ de animales portadores de tumor, lo cual redundaría en una ineficiente respuesta inmune (Mizoguchi H, 1992; Croci DO, 2007).

1.5. Inmunoterapia

Los avances recientes en el entendimiento tanto de las alteraciones génicas que contribuyen a la patogénesis del cáncer como de la respuesta inmune hacia los tumores, han llevado al desarrollo de tratamientos con base biológica contra el cáncer. Estas nuevas estrategias se focalizan en los descubrimientos sobre los antígenos tumorales, los requerimientos moleculares y celulares para la activación inmune, el rol de las citoquinas en la amplificación de la respuesta inmune y la evolución de las técnicas de ADN recombinante para la introducción de material genético en las células eucariotas (Berinstein NL, 2005).

La inmunoterapia, modalidad terapéutica incluida dentro de la bioterapia, tiene como objetivo la eliminación de las células tumorales residuales que quedan en el organismo una vez que la masa tumoral principal ha sido eliminada mediante la utilización de cualquiera de los métodos terapéuticos clásicos. Es por eso que esta terapia puede convertirse en un arma útil contra el desarrollo de metástasis. Se basa en la

estimulación del sistema inmune como una forma de inhibir el crecimiento neoplásico. La inmunoterapia *pasiva* consiste en la transferencia al hospedador de anticuerpos o células inmunes específicas contra el tumor. Su efecto es rápido pero de corta duración, lo que genera la necesidad de aplicaciones repetidas y, con ellas, la posibilidad de aparición de efectos secundarios perjudiciales. Por el contrario, la inmunoterapia *activa* tiene como objetivo generar la respuesta inmune en el paciente portador del tumor. La misma involucra diferentes variantes tales como la aplicación de vacunas preparadas en base a células tumorales inactivadas o en base a antígenos tumorales purificados y la inducción de la expresión de moléculas co-estimuladoras en las células tumorales a través de la transfección de el/los gen/es que codifica/n para dichas moléculas o de genes que codifican para citoquinas estimulantes de la respuesta inmune (Pawelec G, 1999; Irvine A, 2000; Matar P, 2002).

1.6. Terapia antimetastásica

Una de las consecuencias clínicas más importante que surge a partir del fenómeno de la diversidad celular tumoral y metastásica es la generación de una marcada heterogeneidad con respecto a su quimiosensibilidad, es decir a su susceptibilidad a la acción tóxica de los agentes quimioterapéuticos. Si bien el método tradicional para el tratamiento del cáncer metastásico es la quimioterapia, esta heterogeneidad celular condiciona enormemente su utilización exitosa, con la consecuencia inevitable de los bajos índices terapéuticos observados. Es por ello que uno de los objetivos principales en Oncología consiste en mejorar estos índices terapéuticos.

Las estrategias actuales en investigación sobre el tratamiento de las metástasis están dirigidas a descifrar e interpretar los mecanismos genéticos implicados en la regulación de cada una de las etapas de la cascada metastásica, así como también a conocer más en detalle las características bioquímicas que comparten las células metastásicas, las cuales le permiten llevar a cabo los procesos que componen dicha serie de eventos. Este conocimiento posibilitará el diseño de nuevos métodos terapéuticos tendientes a inhibir el proceso global de metástasis a través del bloqueo de una o varias de las etapas que lo componen.

Actualmente, numerosas líneas de investigación en cancerología tienen como objetivo principal el planteo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a la erradicación o inhibición de la formación de metástasis. El diseño de estas nuevas modalidades terapéuticas es posible gracias al conocimiento, cada vez más profundo, de la biología de los tumores y las metástasis. En general, este tipo de terapéutica se conoce como terapia biológica o bioterapia, y tiene como objetivo producir un efecto terapéutico a través de la acción de los mecanismos naturales de defensa del huésped (Kreuser ED, 1992). En este contexto están incluidas la inmunoterapia, activa y pasiva, y la inmunomodulación mediante terapia génica o por administración de fármacos (Oldham R, 1986).

1.6.1. Ciclofosfamida. Ciclofosfamida (Cy), es el agente alquilante más utilizado en el tratamiento quimioterapéutico de diversas neoplasias, siendo parte de protocolos para el tratamiento de tumores de mama, linfáticos, ginecológicos y pediátricos en regímenes quimioterapéuticos en altas dosis, así como también para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. El compuesto es inactivo y requiere el metabolismo por parte de las oxidasas hepáticas de función mixta para formar el intermediario alquilante fosforamida. Las enzimas microsomales hepáticas metabolizan la Cy a 4-hidroxi-Cy la cual entra a la célula y se descompone espontáneamente para formar fosforamida y acroleína o ser detoxificada por aldehído deshidrogenasas para formar metabolitos inactivos. Los metabolitos activos producidos a partir de Cy son agentes ciclo-específicos, es decir, actúan predominantemente sobre las células en división (Brock N, 1958; Siu LL, 2005). Se ha demostrado que, además de sus propiedades citotóxicas antineoplásicas, puede modular la actividad del sistema inmune (North RJ, 1982; Mokyr MB, 1985; Berd D, 1987; Racca AL, 1988; Hoover SK, 1990). La interacción entre Cy y el sistema inmune de un huésped portador de un tumor ha sido calificada como bimodal, ya que varía de acuerdo a las dosis utilizadas y al esquema de administración del fármaco (Maguire HC, 1967). La mayoría de los protocolos clínicos la emplean en dosis alta y suministrada repetidamente a lo largo del tratamiento, lo que lleva a diferentes acciones colaterales, entre ellas inmunodepresión (Buckner CD, 1972; Turk JK, 1982). Se ha demostrado que mientras que dosis altas

de Cy producen depresión de la respuesta inmune, la utilización de dosis bajas induce un aumento de la respuesta inmune del huésped, favoreciendo el rechazo inmunológico de los tumores (Turk JL, 1972; Lagrange PH, 1974; Matar P, 1996).

Aunque varios estudios han analizado el efecto inmunopotenciador de dosis bajas de Cy sobre el crecimiento y desarrollo de tumores primarios, su acción sobre las metástasis prácticamente no ha sido explorada.

En el Instituto de Genética Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas, U.N.R., se demostró que una única inyección de Cy en dosis baja (10 mg/kg) inhibe el desarrollo de metástasis espontáneas y experimentales de un linfoma B de rata (L-TACB) cuando es administrada luego que se desarrolló la respuesta inmune al tumor (14 días después del inóculo tumoral). Este tratamiento no produjo en el huésped ninguno de los efectos tóxicos conocidos de Cy, y la dosis fue lo suficientemente baja como para no ejercer citotoxicidad sobre los tumores primarios, los cuales crecieron en forma similar al de los animales que no recibieron tratamiento (Matar P, 1995). En trabajos posteriores se obtuvo evidencia experimental de que el fenómeno inhibitor del desarrollo metastásico por tratamiento con una dosis baja y única de Cy estaba mediado por el sistema inmune del huésped portador del tumor (Matar P, 1998; Matar P, 2000). En ese modelo experimental, los animales portadores de L-TACB desarrollan metástasis espontáneas y están caracterizados por una marcada inmunosupresión, con producción elevada de TGF- β y óxido nítrico y un perfil inmunológico de citoquinas tipo-2. Dentro de este grupo de citoquinas, IL-10 fue el principal factor responsable de la inmunosupresión, a través de su acción inhibidora sobre la proliferación linfocitaria. El tratamiento con Cy restauró la capacidad linfoproliferativa (Matar P, 2000; Matar P, 2001), indujo un cambio en el perfil de citoquinas, de tipo-2 a tipo-1, con producción elevada de IFN- γ e IL-2, e inhibió totalmente el desarrollo metastásico. El cambio observado en el perfil de citoquinas producidas por las células esplénicas, tuvo su correlato en sangre periférica (Matar P, 2001).

Teniendo en cuenta que el tratamiento con Cy en animales portadores del tumor no solamente reduce la producción local de IL-10 a nivel del bazo, sino que este descenso se manifiesta también en sangre periférica, se decidió investigar si esta citoquina, además de su acción inmunomoduladora, tendría efecto directo sobre las células tumorales. En ensayos preliminares se observó que el agregado de IL-10 al medio de cultivo no afectaba la proliferación de células L-TACB provenientes de un tumor primario, pero sí, en cambio, aumentaba la tasa de proliferación de células tumorales provenientes de una metástasis ganglionar del mismo tumor.

1.7. Interleuquina 10 (IL-10)

IL-10 fue primeramente descrita como un factor inhibidor de la síntesis de citoquinas (CSIF). Se demostró que este factor, producido por células T_H2 murinas, inhibía la producción de citoquinas y la activación de las células T_H1 (Fiorentino DF, 1989). La función inhibidora de IL-10 sobre la producción de citoquinas, tanto por células NK como por células T, resultó ser indirecta, a través de la inhibición de la función de células accesorias (monocitos/macrófagos) (de Waal Malefyt R, 1991; Bogdan C, 1991; Ding L, 1992; Howard M, 1992; Donnelly RP, 1999). Posteriormente, los estudios se extendieron y mostraron que IL-10 inhibe un amplio espectro de funciones de monocitos/macrófagos activados, incluyendo la síntesis de citoquinas, la producción de óxido nítrico (NO), y la expresión de moléculas clase II del MHC y moléculas co-estimuladoras tales como B7-1 y B7-2 (Bogdan C, 1991; de Waal Malefyt R, 1991; Howard M, 1992; Cohen MC, 1996).

El estudio inmunológico de diferentes enfermedades inflamatorias humanas y experimentales indicó que la principal función de IL-10 *in vivo* es limitar la respuesta inflamatoria.

1.8. Receptor de IL-10

El receptor de IL-10 media la señal inmunosupresora de IL-10 y de esta manera inhibe la síntesis de citoquinas proinflamatorias. Se ha visto que este receptor promueve la supervivencia de células mieloides progenitoras.

1.8.1. Estructura y expresión. El receptor de IL-10 (IL-10R) es un miembro de la familia del receptor de interferón. El complejo funcional IL-10R es un tetrámero compuesto por dos cadenas IL-10R1 y dos cadenas IL-10R2. IL-10R está expresado en células hematopoyéticas como linfocitos B, T y NK, monocitos y macrófagos (Donnelly R, 1999). IL-10R1: es la subunidad del receptor de unión al ligando. Si bien IL-10R1 está expresado en la mayoría de las células hematopoyéticas, también ha sido detectado en células no hematopoyéticas aunque, en este último caso, su expresión es inducible en lugar de constitutiva. IL-10R2: es la subunidad accesoria que IL-10R utiliza para la señalización intracelular. Esta subunidad contribuye muy poco a la afinidad de unión por el ligando, siendo su función principal la activación de los mecanismos de transducción de señales. IL-10R2 está expresado constitutivamente en la mayoría de las células y tejidos y, por lo tanto, cualquier estímulo que active la expresión de IL-10R1 hará que las células respondan a IL-10 (Lutfalla G, 1993; Gibbs VC, 1997; Spencer SD, 1998).

1.9. Funciones biológicas de IL-10

IL-10 es una citoquina pleiotrópica que regula una variedad de funciones en las células hematopoyéticas. IL-10 modula la expresión de citoquinas, mediadores solubles y moléculas de la superficie celular producidas por células de origen mieloide. Su función principal, ampliamente demostrada, es la limitación y eventual terminación de las respuestas inflamatorias. En virtud de esta propiedad, IL-10 facilita la eliminación de diversos organismos infecciosos con un mínimo daño en los tejidos del huésped (Howard M, 1992; Moore KW, 2001). Además, IL-10 cumple un papel fundamental en el fenómeno de tolerancia inmunológica. En este contexto, se ha sugerido que IL-10 interviene activamente en la protección contra la agresión autoinmune característica de diferentes patologías como diabetes mellitus insulino-dependiente, artritis reumatoidea, lupus eritematoso sistémico y otras (Moore KW, 2001).

1.10. IL-10 y Cáncer

Varios trabajos han descripto una asociación entre niveles elevados de expresión de IL-10 y determinados tipos de cáncer, por ejemplo cáncer de ovario (Pisa P, 1992), varios carcinomas (Chau GY, 2000), melanomas (Kruger-Krasagakes S, 1994; Yue

FY, 1997; Kobayashi M, 1998) y linfomas/mielomas (Khatri VP, 1998). IL-10 puede ser expresada por las propias células tumorales, suprimiendo de esta manera las respuestas antitumorales. En otros casos, IL-10 podría ser producida por células activadas involucradas en una reacción antitumoral del hospedador y, de esta manera, podría ser un indicador de una potente respuesta inflamatoria más que de inmunosupresión (Moore KW, 2001). También se ha visto una expresión preferencial de IL-10 en lesiones metastásicas de algunos tipos de cáncer, sugiriendo un posible papel en la progresión tumoral (Dummer W, 1996; Kobayashi M, 1998).

1.11. Galectina-1

Las galectinas, anteriormente conocidas como lectinas tipo S o lectinas S-Lac, constituyen una familia de lectinas humanas, conservada evolutivamente, definida por su afinidad por glicoconjugados ricos en poli-N-acetil-lactosamina (poli-Gal β 1 $\rightarrow$ 4NAcGlu β 1) y por la similitud de secuencia en sus dominios de reconocimiento de carbohidratos o CRD (del inglés, *Carbohydrate Recognition Domain*) que, en el caso de galectina-1, está codificado por tres exones (Barondes SH, 1994; Rabinovich GA, 1999a). La familia de galectinas está compuesta por 15 miembros (Gal-1, 2, 3... Gal-15). Dentro de ellas, las galectinas 1 y 3 son las más estudiadas. La mayoría de los residuos conservados entre las diferentes galectinas corresponde a la región codificada por el exón central. El CRD típico se pliega para formar una estructura en sándwich compuesta por cinco o seis láminas β . La homología de una galectina dada entre diferentes especies de mamíferos se encuentra en un valor aproximado de 80-90%. El gen que codifica para galectina-1 (Gal-1) en el ser humano se encuentra en la región q12-q13 del cromosoma 22. Gal-1 es ampliamente expresada dentro de los compartimientos inmunes central y periférico en células epiteliales tímicas, células T estimuladas por antígeno, macrófagos y células B activadas. Además, se encuentra en tejidos inmunes como el bazo y los nódulos linfáticos y sitios inmunológicamente privilegiados como placenta, ojo y tumores (Barondes SH, 1994; Rabinovich GA, 1999c; Yang RY, 2008).

1.11.1. Estructura y funciones biológicas. Galectina-1 es un homodímero compuesto por subunidades de 130 aminoácidos unidas no covalentemente. Las

subunidades se pliegan en un dominio globular y poseen un dominio CRD en cada una de ellas (Barondes SH, 1994). Esta característica le permite unirse a diferentes moléculas como receptores glicoproteicos o glicolipídicos, estableciendo puentes cruzados. Tales uniones llevan, en muchos casos, a la activación de diferentes vías de transducción de señales, produciendo múltiples respuestas biológicas. Gal-1 está involucrada en los procesos de transformación tumoral, regulación del ciclo celular, apoptosis de linfocitos T activados y de timocitos, adhesión celular, migración, inflamación y maduración del ARN por corte y empalme (Rabinovich GA, 1999a). Las galectinas carecen de un péptido señal y de un dominio transmembrana y son secretadas a través de un mecanismo no clásico mediante el cual las proteínas sintetizadas son concentradas a nivel de la membrana plasmática luego de un estímulo inflamatorio y son transportadas al exterior de la célula formando vesículas extracelulares ricas en galectina (Cooper DN, 1990).

1.12. Células reguladoras

Las actividades de las células T reguladoras (Tregs) se han reconocido como fundamentales para el desarrollo y mantenimiento de la tolerancia inmune. Distintos tipos de Tregs se han descrito en humanos, incluyendo subgrupos especializados de células $CD4^+$, $CD8^+$, $CD3^+CD4^-CD8^-$ (células doble negativas), $T\gamma\delta$ y células T natural killer (NKT). Parece probable que estas clases de células T trabajen juntas en una red para mantener la homeostasis inmune (Allan SE, 2008). Se ha sugerido que IL-10 sería necesaria para la producción de células T reguladoras capaces de inducir tolerancia a diversos antígenos (Sonoda K-H, 2001). Un grupo de células reguladoras son los linfocitos T $CD4^+CD25^+$ (Cenderbom L, 2000; Dieckmann D, 2001), cuya presencia haría posible la tolerancia de los antígenos propios y su ausencia conduciría a una respuesta de tipo autoinmune. Asimismo, estas células reguladoras permitirían la tolerancia de los tumores en crecimiento, y su eliminación permitiría la inducción de inmunidad antitumoral (Shimizu J, 1999), efecto biológico que puede asimilarse a una respuesta autoinmune. Desde hace mucho tiempo se ha postulado que Cy actuaría sobre una determinada subpoblación linfocitaria, denominada anteriormente como linfocitos supresores (Yasunami R, 1988; Hoover SK, 1990), la cual no había sido debidamente identificada. Posteriormente se demostró que esta población eran linfocitos inmunoreguladores $CD4^+CD25^+$.

Las células T reguladoras (Tregs) pueden ser definidas como células $CD4^+$ que inhiben inmunopatologías o enfermedades autoinmunes *in vivo*. Estas células incluyen aquéllas capaces de suprimir la proliferación de células T *naïve in vitro* y controlar el número de células T $CD4^+$ o $CD8^+$ *in vivo* en huéspedes linfopénicos. Hasta el momento se han descrito dos poblaciones de células Tregs: las naturales y las adaptativas o inducibles (Tr1) (O'Garra A, 2004).

Las células Tregs tienen distinto origen según se trate de células reguladoras naturales $Foxp3^+$ o células adaptativas. Las células adaptativas o Tr1 surgen en la periferia cuando las células T $CD4^+$ son activadas por células presentadoras de antígenos tolerogénicas en presencia de IL-10 (Roncarolo MG, 2006). Las células $Foxp3^+$ pueden desarrollarse en el timo como células T funcionales supresoras o diferenciarse en la periferia a partir de precursores *naïve* (Valzasina B, 2006).

En humanos, se ha detectado un aumento en el número de células T $CD4^+CD25^+$ en la sangre de pacientes con cáncer de distinta naturaleza, incluyendo carcinomas esofágico y gástrico (Ichihara F, 2003), de colon (Sasada T, 2003), de páncreas y mama (Liyanage UK, 2002), melanomas (Javia LR, 2003), hepatocarcinoma (Ormandy LA, 2005), carcinoma cervical y de endometrio (Fattorossi A, 2004), de ovario y de pulmón (Woo EY, 2001) y enfermedad de Hodgkin (Marshall NA, 2004). Las células T $CD4^+CD25^+$ se podrían también acumular en el sitio del tumor o cercano al mismo y en los nódulos linfáticos drenantes (Liyanage UK, 2002). Se ha demostrado que las Tregs, presentes tanto en los ganglios drenantes como en sangre periférica, se encuentran asociadas con un riesgo aumentado de mortalidad y con una disminución de la supervivencia (Curiel TJ, 2004).

1.12.1. Células reguladoras naturales. Las células reguladoras residentes que se producen en el timo son generadas en los estadios tempranos del desarrollo fetal y neonatal de las células T. Con respecto al uso del TCR son policlonales y son potencialmente capaces de reconocer diversos antígenos propios. Una vez generadas, las células T reguladoras tímicas son exportadas a tejidos periféricos, donde funcionan normalmente para evitar la activación de otras células T autoreactivas que tengan el

potencial de convertirse en células efectoras. Las células regulatorias inducidas por el timo son CD4⁺ y expresan típicamente altos niveles de CD25 como así también la molécula co-estimuladora CTLA-4 y GITR (del inglés *glucocorticoid-induced TNFR family-related protein*, proteína relacionada con la familia del TNFR inducida por glucocorticoides). Estas células están siempre presentes en los individuos normales y llevan a cabo su función reguladora durante la vigilancia normal de los autoantígenos. Además, debido a que se desarrollan en el timo, son probablemente específicas para los autoantígenos (Bluestone JA, 2003).

1.12.2. Células reguladoras inducibles o adaptativas (Tr1). Estas células son generadas a partir de poblaciones de células T maduras bajo determinadas condiciones de estimulación antigénica y pueden ser inducidas *ex vivo* cultivando células T CD4⁺ maduras con antígenos o con activadores policlonales en presencia de citoquinas inmunosupresoras. También se originan a partir del timo pero podrían derivar de subgrupos clásicos de células T o a partir de células Tregs naturales. El nivel de expresión de CD25 de las células adaptativas es variable, dependiendo de la enfermedad y del sitio de la actividad reguladora. Estas células funcionan *in vivo* de una manera dependiente de citoquinas. A diferencia de las Treg naturales, las Treg adaptativas no requieren co-estimulación a través de la molécula CD28 para su desarrollo o función.

1.12.3. Mecanismos de supresión. Además de las diferencias en el repertorio de los TCRs y el estado de diferenciación celular, los subgrupos de células Tregs naturales y adaptativas difieren en su mecanismo de acción. Las Tregs naturales funcionan por un mecanismo independiente de citoquinas que presumiblemente involucra interacciones directas con las células T respondedoras o células presentadoras de antígeno. Por otro lado, las Tregs adaptativas median sus actividades inhibitorias produciendo citoquinas inmunosupresoras como TGF- β e IL-10. Sin embargo, estas células también podrían requerir el contacto célula-célula directo para iniciar la cascada supresora (Sojka DK, 2008).

1.12.4. Roles fisiológicos de los subgrupos de células Tregs. Los dos grupos de células Tregs podrían funcionar en diferentes escenarios inmunológicos, dependiendo del contexto de exposición antigénica, la naturaleza de la respuesta inflamatoria y los TCR de las células individuales. Las células Tregs naturales serían más efectivas en suprimir localmente las respuestas de células T autoreactivas, en un escenario no inflamatorio. Contrariamente, durante las reacciones inflamatorias autoreactivas a microbios o a tejidos transplantados, que son más similares al escenario infeccioso, podrían inducirse células Tregs adaptativas para suprimir las respuestas inmunes patológicas. A pesar que esta actividad podría requerir el contacto célula-célula, la supresión resultante es amplificada por la secreción de citoquinas inhibitorias (Miyara M, 2007).

1.12.5. Células reguladoras y Galectina-1. En un análisis a nivel transcriptómico y proteómico se encontró que Gal-1 estaba regulada positivamente en las células Tregs. Se demostró por la técnica de matrices de ADN (*microarrays*) que los linfocitos T inmunoreguladores $CD4^+CD25^+$ sobre-expresan Galectina-1 luego de su activación (McHugh RS, 2002). Estudios de microscopia confocal revelaron que Gal-1 se encuentra presente tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células $CD4^+CD25^+$. Esto último concuerda con la hipótesis que plantea que la galectina unida a la superficie es un mediador clave de la supresión de las células T $CD4^+CD25^+$. Gal-1 inhibe las funciones efectoras de las Tregs, promoviendo el arresto del crecimiento y la apoptosis de las células T activadas. El mecanismo probable sería una activación parcial de las células y un aumento de la susceptibilidad a la muerte celular inducida por activación o a través del bloqueo de la secreción de citoquinas proinflamatorias (Garín MI, 2007; Yang RY, 2008).

1.12.6. Células reguladoras y Ciclofosfamida. En un modelo experimental con tumores establecidos de rata se evaluó un panel de agentes inmunosupresores y se encontró que Cy fue el más efectivo en disminuir la relación de células $CD4^+CD25^+/CD4^+$ en el bazo y en restaurar la respuesta inmune antitumoral en los animales portadores de tumor. En distintos modelos tumorales se encontró que una inyección simple de Cy elimina las células T $CD4^+CD25^+$ y potencia la eficacia de una inmunoterapia activa tumor específica (Ghiringhelli F, 2004; Liu JY, 2007).

También se observó en un modelo en ratón que el tratamiento con Cy inhibió la función supresora de las células Tregs. Una posible explicación es que Cy podría causar apoptosis de la población Tregs. Parece ser que Cy interfiere directa y específicamente con el mantenimiento y la homeostasis de las células Tregs. Sin embargo, se encontró que diez días después del tratamiento el número absoluto de estas células volvió a la normalidad, recobrando su función supresora. Se postula que la función inhibidora de Cy sería multifactorial (Lutsiak MEC, 2005).

En un estudio de fase I en pacientes con carcinoma metastático se encontró que la prevalencia de las células T $CD4^+CD25^+$ de sangre periférica fue significativamente mayor en los pacientes que en los individuos sanos. Se demostró que los tumores no modulan significativamente la actividad supresora de las Tregs de sangre periférica sino que aumentan su número. No se encontró correlación alguna entre la capacidad supresora de las Tregs y el tipo de cáncer (Audia S, 2007). Además, la capacidad inmunosupresora no pudo ser inhibida por una inyección única de Cy. Interesantemente, dosis metronómicas (dosis bajas administradas a intervalos regulares en forma crónica) de Cy combinada con inmunoterapia han mostrado un efecto antitumoral sinérgico, pero el mecanismo todavía no ha sido completamente dilucidado (Hermans IF, 2003).

1.12.7. Células NKT. La denominación de “células NKT” fue publicada por primera vez en 1995 y se utilizó para definir un subgrupo de células T de ratón que participaba en la regulación de la respuesta inmune y compartía algunas características con las células NK, en particular la expresión del marcador NK1.1 (Nkrp1c o CD161c). Estas células producen citoquinas inmunoregulatoras, incluyendo IL-4, INF- γ y TNF y expresan las cadenas α y β del receptor funcional de células T (TCR) y receptores de las células NK, como el NK1.1. Estas células reconocen los antígenos presentados por la molécula no polimórfica MHC de clase I CD1d. En los ratones, la mayoría de las células NKT expresan CD4 y el resto son doble negativas para CD4 y CD8. Este subgrupo de células T reconoce antígenos glicolípidos. Se pueden dividir en dos grupos: NKT tipo I y NKT tipo II.

1.12.7.1. NKT tipo I. Estas células, también llamadas NKT invariantes (iNKT), tienen un repertorio restringido del receptor de células T (TCR) y expresan las cadenas V α 14-J α 18 y V β 8.2, -7 o -2 del TCR en ratones y las homólogas V α 24-J α 18 y V β 11 en humanos. Cuando son estimuladas con α -GalCer (α -galactosilceramida, glicolípido derivado de una esponja marina) producen grandes cantidades de citoquinas T_H1 (INF- γ) y T_H2 (IL-4 e IL-13). A pesar de que estas células tienen actividad citolítica del tipo de las NK, pueden ser consideradas reguladoras de las respuestas inmunes porque rápidamente producen grandes cantidades de citoquinas Th1 y Th2 en enfermedades autoinmunes, infecciosas y cáncer (Terabe M, 2007). La activación de estas células resulta en la activación de otros tipos celulares, incluyendo células dendríticas, células NK, células B y T convencionales. Todas las células iNKT de ratones y humanos reaccionan con α -GalCer. Por lo tanto, la activación de las células iNKT impacta fuertemente en las respuestas inmunes adaptativas y puede afectar un amplio espectro de respuestas inmunes del huésped, como así también influenciar distintas patologías. Estudios preclínicos han demostrado que el ligando de células iNKT, α -GalCer, y glicolípidos relacionados exhiben actividades terapéuticas contra varios tumores y una variedad de enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Van Kaer L, 2007).

1.12.7.2. NKT tipo II. Estas células, también llamadas NKT no invariantes expresan un repertorio de TCR más diverso. A pesar que estas células están restringidas por la molécula CD1d, no reconocen α -GalCer. En ciertas ocasiones pueden ser autoreactivas y reconocer el glicolípido derivado de la mielina endógena, ayudando así a proteger a los ratones del desarrollo de encefalomiелitis experimental. Constituyen una población de células T pro-inflamatorias pro-destructivas. Estas células tienen la capacidad de suprimir la vigilancia inmunológica antitumoral (Seino K, 2005).

1.12.7.3. Desarrollo y diferenciación efectora. Las células NKT, al igual que las células T convencionales, se desarrollan en el timo. Se requiere la expresión de CD1d para la selección positiva de las células iNKT, la cual es mediada por los timocitos doble positivos en lugar de las células epiteliales tímicas. Estudios recientes han

mostrado que la expresión de CD1d por timocitos corticales es suficiente para el desarrollo y la diferenciación de las células iNKT. El desarrollo del linaje iNKT involucra un programa de transcripción único que incluye una variedad de transductores de señales, factores de transcripción y citoquinas, incluyendo Fyn, NF- κ B e IL-15. Estas células tienen la capacidad de producir rápidamente citoquinas y migrar a los sitios de la inflamación (Van Kaer L, 2007).

1.12.7.4. Mecanismos de activación. Recientemente se ha demostrado que las células dendríticas son cruciales para la activación de las células iNKT *in vivo*, luego del tratamiento de ratones con α -GalCer. La presentación de α -GalCer por las células dendríticas resulta en una producción de citoquinas T_H1 y T_H2 y en una transactivación de las células NK, mientras que la presentación de α -GalCer por las células B despierta respuestas inmunes débiles con producción de IL-4 y suprime la activación de las células iNKT mediada por células dendríticas. Las células iNKT se pueden activar durante una variedad de infecciones y durante respuestas inflamatorias y autoinmunes.

1.12.7.5. Mecanismos de regulación. Se ha propuesto que las poblaciones de células NKT I y NKT II se contra-regulan mutuamente y forman un eje inmunoregulatorio (Terabe M, 2007). El mecanismo por el cual las células NKT II suprimen a las de tipo I no está del todo claro. Es posible que esta supresión esté mediada por la producción de un factor inmunosupresor como TGF- β (Tamada K, 1997). Se ha reportado en pacientes con cáncer que las células NKT I son inhibidas en su capacidad para producir INF- γ pero no IL-4 y que niveles bajos de NKT I en circulación son signos de un pronóstico clínico pobre. Por otra parte, además del eje NKT I/NKT II de regulación de la inmunovigilancia tumoral, también podrían ser relevantes interacciones con otras células T inmunoregulatorias como las células Tregs CD4⁺CD25⁺. Estas poblaciones celulares también podrían estar regulándose mutuamente. En un modelo de metástasis pulmonar se ha visto que las células Tregs suprimen el efecto antitumoral y reducen el número de las células NKT I. Esta supresión parece estar mediada por el contacto célula-célula (Terabe M, 2007).

1.12.7.6. Funciones de las células NKT. Las células iNKT han sido implicadas en las respuestas inmunes contra agentes infecciosos, tumores y trasplantes de tejidos y en la regulación de una gran variedad de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. También se ha visto que tienen un rol importante en la regulación de la hematopoyesis durante condiciones de estado estacionario y condiciones de activación (por ejemplo, el tratamiento con α -GalCer). Un aspecto importante de la activación de las células iNKT es su *crosstalk* con otros tipos celulares, incluyendo células dendríticas. Por otro lado, también se ha encontrado que las células iNKT tienen la capacidad de promover tolerancia y de comunicarse con otros tipos de células T reguladoras (Luc Van Kaer, 2007).

1.12.7.7. Células NKT y Cáncer. Se demostró que las células NKT activadas inducen la muerte de las células tumorales a través de la expresión de una amplia variedad de moléculas efectoras inductoras de la muerte celular, incluyendo perforina y FasL, de la misma manera que otras células citotóxicas como NK o células citotóxicas CD8⁺. Además, cuando son estimuladas las células NKT tienen la capacidad de producir citoquinas TH1 (INF- γ) y TH2 (IL-4), lo que puede seguidamente contribuir a activar varios tipos de células inmunes como células dendríticas, NK, o células T. Por lo tanto, se cree que las células NKT median citotoxicidad directa y también efectos adyuvantes en la inmunidad antitumoral activando otros linfocitos citotóxicos principalmente a través de cascadas de citoquinas TH1 (Seino K, 2006). Recientemente se ha reportado que distintas subclases de células NKT tienen distintas capacidades antitumorales (Crowe NY, 2005). No se encontraron grandes diferencias en las citoquinas producidas por los dos subtipos de células NKT, sugiriendo que otros factores estarían involucrados en las respuestas antitumorales *in vivo*. Las células NKT tipo II son responsables de inhibir la vigilancia tumoral en ratones. Esta inhibición involucra IL-13, células mieloides, TGF- β , pero no requieren de las células Tregs naturales Foxp3⁺. Se ha sugerido que las células NKT tipo II regulan negativamente las respuestas antitumorales en ratones, mientras que las tipo I las promueven (Terabe M, 2003). Las células NKT II suprimen la inmunovigilancia antitumoral mediada por células citotóxicas, lo que lleva al desarrollo tumoral, en contraste con lo que ocurre con las de tipo I que aumentan la inmunovigilancia. La

estimulación de las células NKT II favorece el crecimiento tumoral. La estimulación simultánea de las células NKT I y II resulta en un efecto supresor de NKT II sobre las NKT I, junto con una regulación negativa de la activación de las de tipo I. Por lo tanto, estos dos subtipos de células NKT constituyen un eje inmunoregulatorio. Hasta el momento no se conoce el mecanismo por el cual las células NKT II inhiben la activación de las de tipo I (Ambrosino E, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Investigar los mecanismos moleculares y celulares que participan en la acción antimetastásica de una dosis baja de Ciclofosfamida en un modelo experimental de un linfoma de rata. Desarrollar, a partir de los resultados obtenidos, un modelo teórico que explique los mecanismos por los cuales Ciclofosfamida ejerce su efecto.

2.2 Objetivos específicos

- Estudiar la modulación de IL-10 y de su receptor (IL-10R) en células del tumor primario y metastásicas del linfoma L-TACB tratadas con los metabolitos activos de Ciclofosfamida.
- Estudiar el estado de activación de la vía de señalización PI3-k/Akt/mTOR en células tumorales y metastásicas del linfoma L-TACB sin tratar y tratadas con Mafosfamida.
- Identificar y analizar la cinética de aparición de la subpoblación linfocitaria reguladora involucrada en la acción terapéutica de dosis bajas de Ciclofosfamida.
- Investigar los mecanismos por los cuales la expresión de Galectina-1 podría estar relacionada con el efecto antimetastásico de dosis bajas de Ciclofosfamida.

3. Materiales y Métodos

3.1. Animales

Ratas. Se utilizaron ratas adultas, hembras, de las líneas endocriadas IIM e/Fm (de aquí en más, *e*) y Fm *m* (de aquí en más, *m*) del bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina (Calderari S, 1991).

Ratones. Se utilizaron hembras adultas pertenecientes a la línea endocriada BALB/c del bioterio del Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR y ratones inmunodeficientes N:NIH S-(nu) del Bioterio de la Universidad Nacional de La Plata.

En todos los casos, los animales fueron alimentados con alimento balanceado comercial y agua *ad libitum* y fueron mantenidos en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Los experimentos fueron llevados a cabo durante la primera mitad del ciclo de luz. En el caso de los ratones inmunodeficientes, éstos se mantuvieron en gabinetes especiales y se manipularon bajo flujo laminar. En el momento de la eutanasia los animales fueron sacrificados por sobre-exposición a CO₂. Todos los experimentos se desarrollaron siguiendo las normativas éticas establecidas por el Canadian Council on Animal Care (Canadian Council on Animal Care. Guidelines on: Procurement of animals used in sciences. 2007. ISBN: 0-919087-46-9). El número de animales por grupo que se utilizó para los distintos experimentos varió entre 4 y 5, con excepción del experimento descrito en el punto 3.20 en el que se utilizó un pool de muestras de 4 animales.

3.2. Tumores

L-TACB. El tumor L-TACB apareció espontáneamente en una rata endocriada IIMeFM. Es un linfoma de tipo B, pobremente diferenciado, que se mantiene por trasplantes s.c. periódicos con trócar de fragmentos de 1 mm³ (aproximadamente 10⁶ células) en ratas singeneicas. Está constituido por células con núcleos grandes y ovoides, algunos con escotadura, cromatina en grumos y membrana nuclear gruesa; los citoplasmas son escasos y levemente basófilos. Las mitosis son numerosas, las

células se disponen en hojas con algunos macrófagos de citoplasmas claros, que le dan al tumor el aspecto de “cielo estrellado”, similar al presentado por el linfoma de Burkitt humano. Cuando L-TACB es inoculado por vía s.c. crece en el 100% de los animales y origina metástasis espontáneas localizadas exclusivamente en los ganglios linfáticos regionales en un 10 a 30% de los animales. Las metástasis son diagnosticadas por palpación y confirmadas histológicamente (Celoria GC, 1986).

L-DGE. Es un linfoma de tipo inmunoblástico, pobremente diferenciado, que apareció espontáneamente en un ratón de la línea BALB/c en el año 1985 y se mantiene por inóculos subcutáneos periódicos en ratones singeneicos. El porcentaje de letalidad es del 100% (100% de toma y 0% de regresión) y un 25% de los animales desarrollan metástasis espontáneas en ganglios axilares e inguinales (Scharovsky OG, 1993).

S-E100. Es un fibrosarcoma semidiferenciado que apareció espontáneamente en una rata de la colonia IIM en el año 1955. Crece a través de barreras alogeneicas y se mantiene por pasajes subcutáneos periódicos en ratas de la línea *m*. El porcentaje de letalidad del S-E100 inoculado vía s.c. en ratas *m* es del 100% (100% de toma y 0% de regresión) y los animales mueren entre los 28 y 30 días posteriores al inóculo, sin presentar metástasis (Doménico AD, 1963).

M-234p. Es un adenocarcinoma de mama que surgió espontáneamente en 1996 en una hembra BALB/c de 5 meses de edad y se mantiene *in vivo* por trasplantes s.c. en huéspedes singeneicos, cada 20 días. Es un adenocarcinoma de tipo B (Squartini F, 1979) de bajo índice mitótico, epitelial, predominantemente sólido, constituido por células atípicas semidiferenciadas con moderado grado de atipia citológica. En la periferia, el patrón estructural es en su mayor parte acinar y se observan amplios quistes o lagos de contenido hemorrágico. Cuando es inoculado por vía s.c. el porcentaje de toma es del 100% y el de regresión 0%, y produce espontáneamente metástasis pulmonares en el 80% de los animales (Binda MM, 2000).

3.3. Histopatología

Las muestras de tumores y metástasis fueron fijadas en formalina al 10% e incluidas en parafina. Se realizaron cortes con micrótomos de 5-7µm de espesor que fueron teñidos con hematoxilina-eosina para su evaluación histológica.

3.4. Drogas

Ciclofosfamida (Filaxis SA, Argentina): fue disuelta en agua destilada en una concentración de 20mg/ml e inyectada en una concentración de 10 mg/kg de peso corporal para el Linfoma L-TACB y 25 mg/kg de peso corporal para el Linfoma L-DGE.

Mafofosfamida (Asta Medica, Alemania): es un compuesto que en solución da lugar a los mismos metabolitos activos que Cy luego de ser metabolizada en el hígado, y en cantidades equimoleculares (Yasunami R, 1988). La droga fue utilizada para los ensayos *in vitro* en diferentes concentraciones (2,5-5-10 y 20 µM).

Sulfasalazina (CalBiochem): se preparó una dilución 1M en DMSO como solución madre.

Rapamicina (CalBiochem): se preparó una dilución 1mM en DMSO como solución madre.

SB202190 (CalBiochem): se preparó una dilución 2mM en DMSO como solución madre.

3.5. Anticuerpos

Anti-Gal-1: anticuerpo de conejo anti-Gal-1 humana (producido en el laboratorio del Dr. Gabriel Ravinovich).

Anti-IgG: anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Biorad, EE.UU.).

Anti-CD4: anticuerpo de ratón anti-CD4 de rata conjugado con PE-Cy5 (BD Pharmingen, EE.UU.).

Anti-CD25: anticuerpo de ratón anti-CD25 de rata conjugado con FITC (Serotec, Reino Unido).

Anti-CD152 (CTLA-4): anticuerpo de ratón anti-CD152 de rata conjugado con RPE (Serotec, Reino Unido).

Anti-Foxp3: anticuerpo de ratón anti-Foxp3 de rata conjugado con PE (eBioscience, EE.UU.).

Anti-IL-10: anticuerpo de ratón anti-IL-10 de rata conjugado con PE (BD Pharmingen, EE.UU.).

Anti-TCR: anticuerpo de ratón anti- $\alpha\beta$ TCR de rata conjugado con RPE (Serotec, Reino Unido).

Anti-CD161: anticuerpo de ratón anti-CD161 de rata conjugado con FITC (Serotec, Reino Unido).

3.6. Ensayo de proliferación celular

Se trabajó con ratas *e*, singeneicas con L-TACB, que fueron inoculadas en el día 0 con el tumor, con trócar, por vía subcutánea, en el flanco derecho. Luego de transcurridos 21 días, todos los animales presentaron el tumor primario en crecimiento y algunos de ellos habían desarrollado metástasis espontáneas ganglionares, tanto axilares como inguinales, que se detectaron por palpación. En este estadio del desarrollo tumoral, los animales que presentaban metástasis fueron sacrificados por sobreexposición al CO₂. Se extirparon quirúrgicamente los tumores primarios y las correspondientes metástasis y se prepararon suspensiones de ambos tipos celulares por disgregación mecánica de los tejidos en medio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., EE.UU.). Se centrifugaron las células 10 min a 2000 rpm. Se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en el mismo medio. Se realizó un recuento celular con la coloración vital de Azul Trypan, utilizando la cámara de Neubauer.

Se prepararon suspensiones celulares en una concentración de 1×10^5 cél/ml en medio RPMI 1640 + 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Natocor, Córdoba, Argentina). Se trabajó en placas de 96 pocillos y se cultivaron 100 μ l de la suspensión celular con Mafosfamida 0- 2,5- 5- 10 y 20 μ M a 37°C, 5% CO₂ durante 48 hs. Posteriormente se determinó la proliferación celular con el reactivo WST-1 (Roche, Argentina) según las instrucciones del fabricante. El reactivo WST-1 es biorreducido por las células a un compuesto formazán que es soluble en medio de cultivo. La expansión en el número de las células viables resulta en un aumento de la actividad total de las deshidrogenasas mitocondriales de la muestra. Este aumento en la actividad

enzimática conduce a un aumento en la cantidad de formazán que se produce, lo cual se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas en el cultivo. El reactivo WST-1 se agregó en una dilución 1:10 en cada pocillo y se incubó durante 4 h a 37°C y 5% CO₂. Luego se agitó durante 1 min y posteriormente se midió la absorbancia en un lector de microplacas a 450 nm. Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado. Se utilizó medio de cultivo como blanco de la reacción.

3.7. Cuantificación de IL-10

Se cultivaron 10⁵ células tumorales primarias ó metastásicas en frascos de cultivo de 25 cm² (Corning-Costar) en 5ml de RPMI 1640 + 10% SFB durante 48 horas a 37 °C y 5% CO₂. Luego del período de incubación se recolectaron las suspensiones celulares, se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min y se separaron los medios condicionados (MC) sobrenadantes. Los MC fueron alicuotados y se conservaron a – 20°C hasta el momento de su utilización.

La concentración de IL-10 presente en los MC fue determinada por ELISA (Pharmingen OptEIA™ Rat-IL-10 Set, San Diego, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. El ensayo que se realizó fue un ELISA sándwich que utiliza dos anticuerpos diferentes que reconocen distintos epitopes de la citoquina. Se cubrieron los pocillos de una policubeta de 96 pocillos con el anticuerpo de captura monoclonal anti-IL-10 de rata, se agregaron los medios condicionados, posteriormente se adicionó el anticuerpo de detección, que es un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-IL-10 de rata, dirigido contra un epítopo diferente del correspondiente al anticuerpo primario. Se utilizó un conjugado de streptavidina-peroxidasa de rabanita y se incubó durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó un sustrato consistente en tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno y se incubó 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción se detuvo por el agregado de H₂SO₄ 2N. La absorbancia se leyó a 450 nm. Todas las mediciones se realizaron por cuadruplicado.

3.8. Cuantificación de IL-10R (receptor de IL-10)

Se investigó la expresión de IL-10R en la membrana celular por un método de CELISA (ELISA celular). Las células tumorales primarias ó metastásicas fueron fijadas en policubetas de 96 pocillos (8×10^5 células/50 μ l de solución de HANKS + formol 0,5%) durante 18 horas a 37°C. Se realizó un bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena con metanol + 3% de H_2O_2 (30V). Se incubó 20 min a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos 4 veces con Washing Buffer (WB) [HANKS + Tween 20 (0,5%)]. Se bloquearon los pocillos mediante el agregado de solución de HANKS + 10% SFB. Se incubó 1 h a temperatura ambiente. Se lavó 4 veces con WB. Se agregó IL-10 recombinante (IL-10r) en una concentración saturante (5000 pg/ml). Se incubaron las policubetas durante 2 h a temperatura ambiente, se realizaron 4 lavados con WB y un nuevo bloqueo con una solución de BSA (3%) + SFB (20%) + leche descremada (5%) + Tween 20 (0,5%) en solución de HANKS y se incubó por 2 h adicionales a 37°C. En el siguiente paso, se agregó un conjugado de anti-IL-10-biotina/streptavidina-peroxidasa, se incubó la policubeta durante 1 h a temperatura ambiente y se lavó 8 veces con WB. Seguidamente se agregó tetrametilbencidina (TMB) + H_2O_2 , un sustrato de la peroxidasa, y luego de 30 min a temperatura ambiente y en la oscuridad, se detuvo la reacción con H_2SO_4 2N. Se determinó la absorbancia a 450 nm. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado. En la Figura 1 se esquematiza el método empleado.

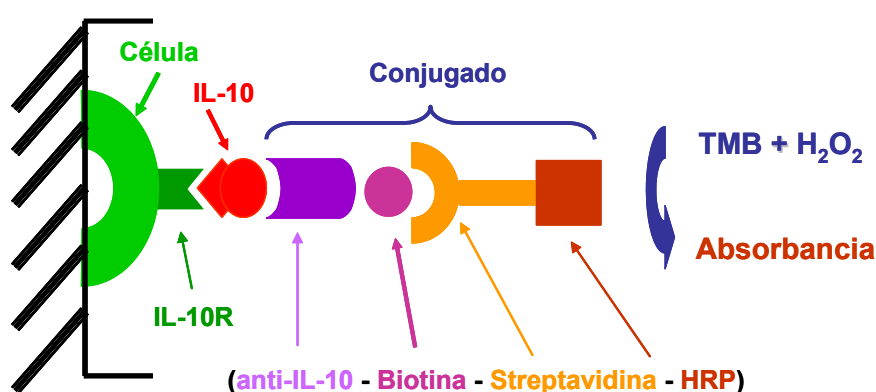


Figura 1. CELISA. Esquema del método.

3.9. Modulación de la expresión de Galectina-1 por Mafosfamida en células L-TACB primarias y metastásicas

A partir de animales que desarrollaron metástasis ganglionares espontáneas se realizaron suspensiones celulares tanto del tumor primario como de la metástasis y éstas se incubaron con RPMI adicionado con 10% de SFB y antibióticos sin y con Maf 2,5 y 5 μ M durante 18 y 24 horas. Luego de la incubación, las células fueron lavadas por centrifugación y resuspensión con medio RPMI 1640. Los pellets secos se congelaron. Luego se realizaron homogenados proteicos en Buffer de Lisis [Tris-HCl 20mM, pH 7,5, EDTA 2mM, EGTA 4mM, β -Mercaptoetanol 10mM, 1 pastilla de Complete Mini, EDTA-free (Roche, Germany)] y se midió la concentración de proteínas totales de cada extracto. Se determinó la concentración de Gal-1 en cada una de las muestras mediante *Western Blot*.

3.10. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración proteica de todas las muestras se determinó mediante el método de Sedmak (Sedmak JJ, 1977). Brevemente, a partir de una solución 1 mg/ml se prepararon distintas diluciones de BSA (albúmina sérica bovina) en un volumen final de 1 ml, que se utilizaron para construir una curva estándar. También se prepararon diluciones de 1 μ l de muestra con 1 ml de H₂O destilada estéril. Se agregó 1 ml de reactivo de Sedmak (0,06% Coomassie G250 en 2,2% HCl) a todos los testigos, a las muestras y a dos tubos que se utilizaron como blanco que contenían 1 ml de H₂O cada uno. Se determinó la absorbancia a 600 nm. Se graficaron las absorbancias en función de las concentraciones conocidas de BSA y se construyó la curva patrón. Luego, por interpolación de la gráfica, se determinó la concentración de las muestras.

3.11. Western Blot para Gal-1

Con el objeto de determinar la cantidad de Gal-1 en células esplénicas de tumor primario y metástasis se realizaron geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli UK, 1970). Brevemente, alícuotas conteniendo 30 μ g de proteínas disueltas en Buffer de Siembra que contiene dodecil-sulfato sódico (SDS), β -mercaptoetanol y azul de bromofenol, se sembraron en geles de SDS-poliacrilamida al 15% y se sometieron a electroforesis. Los geles se

prepararon y corrieron utilizando un equipo comercial (Mini-PROTEAN 3 Cell, Biorad). Luego las proteínas se electrotransfirieron a membranas de polivinil difluoruro (PVDF, PerkinElmer Life Sciences) durante 40 min a 200 mA, utilizando un equipo comercial (Mini Trans-Blot Cell, Biorad). Después de ser bloqueadas durante 1 hora con leche descremada al 5% en TBS-Tween (NaCl 1,5 M, Tris 0,5 M, Tween 0,05% v/v, pH 7,4), las membranas se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo anti-Gal-1 en una dilución 1:1000, diluido en TBS-Tween/leche 5%. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con TBS-Tween y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano, dilución 1:3000. Biorad, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. La proteína inmovilizada fue detectada por quimioluminiscencia. Las membranas se expusieron a films radiográficos (Kodak XAR) y las bandas resultantes se cuantificaron por densitometría.

3.12. Análisis densitométrico

Luego de revelar las membranas en placa radiográfica, se escanearon en un Scanner Hewlett-Packard ScanJet 2400c y se analizaron las bandas correspondientes a Gal-1, tanto en la forma monomérica como dimérica, mediante el software Adobe Photoshop 5.5. Ha sido reportado previamente que, aún en condiciones desnaturalizantes, aparecen bandas de 29 kD, correspondientes al dímero de Gal-1, debido a que las subunidades tienden a asociarse por puentes de hidrógeno (Baum LG, 1995; Rabinovich GA, 1999b). De esta manera, se obtuvieron valores relativos proporcionales a la cantidad de proteína, lo que permitió cuantificar la concentración de Gal-1 en los homogenados proteicos obtenidos a partir de los diferentes tejidos.

3.13. Determinación de viabilidad celular

Se inocularon 8 ratas *e* con el linfoma L-TACB con trocar, vía s.c. En el día 14 del desafío tumoral se distribuyeron en dos grupos experimentales de acuerdo al tamaño tumoral. En ese momento, un grupo fue tratado con una dosis única de Cy de 10 mg/kg de peso corporal (grupo Tratado) y el restante no recibió tratamiento adicional (grupo Testigo). Al día 21 los animales fueron sacrificados, se extirparon los bazo y se realizaron suspensiones celulares. Para ello se realizó la disgregación mecánica de

los bazos en 3 ml de medio RPMI. Para hemolizar los eritrocitos las suspensiones se incubaron con Tris-NH₄Cl durante 10 min a 37°C en una proporción 1/10 (suspensión células/Tris-NH₄Cl). Luego se realizaron dos lavados centrifugando las suspensiones a 2000 rpm durante 8 min y descartando el sobrenadante en cada paso. Finalmente, se resuspendieron las células en 1 ml de RPMI + 10% de SFB. Se determinó la concentración celular de la suspensión contando en una cámara de Neubauer. En una placa de 96 pocillos se sembraron por pocillo 10⁵ células suspendidas en 200 µl de medio de cultivo conteniendo Gal-1 4 µM. Además se sembraron las suspensiones control, sin Gal-1. En todos los casos se trabajó por cuadruplicado. Se incubó en estufa a 37°C y 5% CO₂ durante 96 horas. Se determinó la viabilidad de las células esplénicas pertenecientes a los diferentes grupos mediante la utilización del reactivo WST-1 como se describió en el punto 3.6.

3.14. Evaluación de la apoptosis temprana. Anexina V

Uno de los primeros eventos durante la apoptosis es la pérdida de asimetría en la membrana plasmática. La fosfatidilserina (FS), molécula que se expresa en la cara interna de la membrana celular en células viables, sufre un proceso de translocación y pasa a expresarse en la cara externa de la misma. Este proceso puede ser detectado a través de su interacción con el anticoagulante Anexina V, en presencia de calcio.

Las células esplénicas obtenidas según lo descrito en el punto 3.13. fueron teñidas con un conjugado de Anexina V e isotiocianato de fluoresceína (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Oncogene Research Products, Boston, EE.UU.) de acuerdo con el protocolo provisto por el fabricante. Brevemente, a 500 µl de la suspensión se le agregaron 10 µl de *Media Binding Reagent* y 1,25 µl de Anexina V-FITC. Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 500 µl de *Binding Buffer* en frío. Se agregaron 10 µl de yoduro de propidio. Las muestras fueron analizadas en microscopio de fluorescencia. Se contaron 100 células por muestra y se calcularon los porcentajes de células apoptóticas. Esta técnica permite detectar por fluorescencia las células que atraviesan las fases tempranas de la apoptosis y diferenciarlas de las células necróticas. Utiliza isotiocianato de

fluoresceína conjugado a Anexina V (Anexina-FITC) e ioduro de propidio. Las células viables no presentan fluorescencia, mientras que las necróticas captan ambos marcadores y, por el contrario, las células en apoptosis son positivas sólo para Anexina-FITC.

En la Figura 2 se muestra resumido el esquema experimental que se siguió para los puntos 3.13 y 3.14

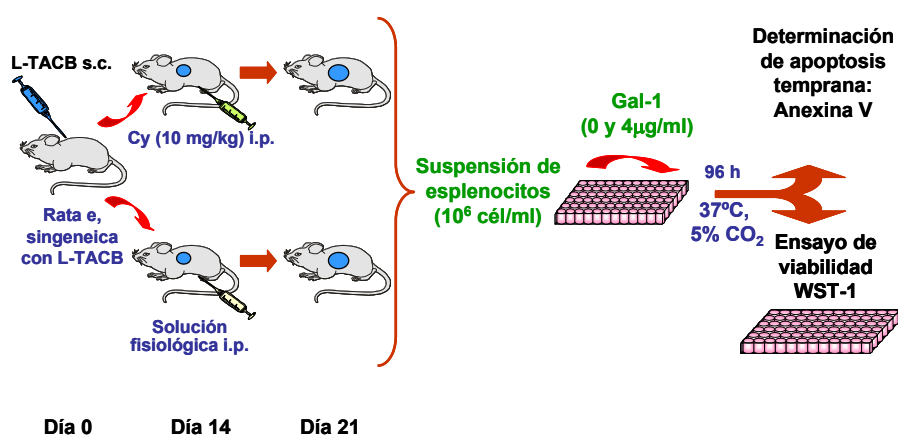


Figura 2. Determinación de viabilidad celular y apoptosis. Modelo experimental.

3.15. Cinética de expresión de Gal-1 en tumor y bazo de animales portadores del linfoma L-TACB tratados con Cy

Se trabajó con 20 ratas *e* desafiadas con L-TACB, con trócar, por vía s.c. Al día cero se sacrificaron cuatro animales y se extirparon los bazos. En los días 7, 10, 14 y 21 posteriores al inóculo tumoral se sacrificaron cuatro animales por fecha extirpándose el tumor primario y el bazo. Además, en el día 14, cuatro animales fueron inoculados con Cy i.p. (10 mg/kg de peso) y los restantes cuatro no recibieron tratamiento ulterior. Finalmente, al día 21 se sacrificaron los ocho animales restantes, cuatro testigos y cuatro tratados. Del grupo de animales testigo de este experimento, y de otros posteriores, se tomaron muestras de los tumores primarios y de las metástasis ganglionares correspondientes, cuando éstas se desarrollaron. De esta forma se obtuvieron cinco juegos de tumor primario y metástasis espontáneas. En todos los casos se congelaron los tejidos y se realizaron los homogenados proteicos en frío, por disgregación mecánica de las células en buffer de lisis. Posteriormente se determinó la

concentración de proteínas totales por el método de Sedmak. Finalmente, se realizó un *Western blot* para la determinación de Gal-1, sembrándose 30 µg de proteínas totales en un gel de poliacrilamida al 15% con SDS. Luego del revelado se analizaron las bandas correspondientes a Gal-1. El modelo experimental se muestra en la Figura 3.

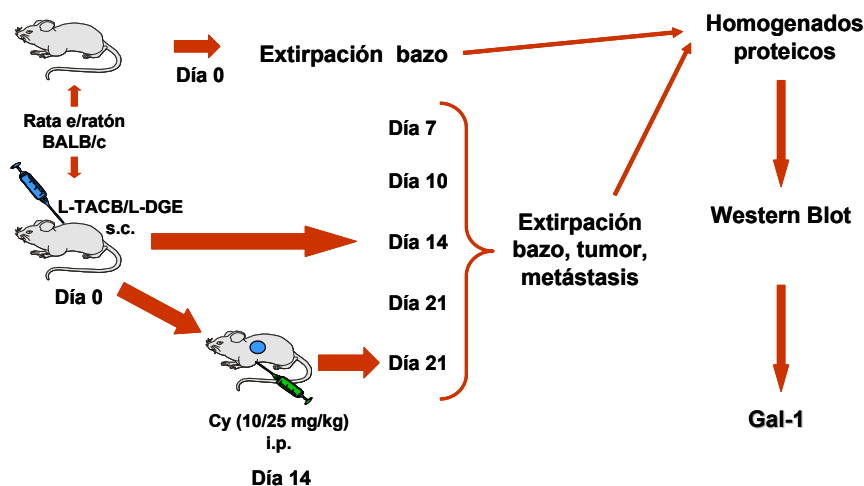


Figura 3. Cinética de la expresión de Gal-1. Modelo experimental.

3.16. Determinación de Galectina-1 por inmunohistoquímica

Los tumores primarios de L-TACB sin tratar y tratados con una dosis baja de ciclofosfamida, y los nódulos linfáticos metastásicos de los mismos animales, fueron fijados con formalina al 10%, deshidratados y luego se incluyeron en parafina. La tinción se realizó en cortes de 5µm de espesor del tejido correspondiente, colocadas en portaobjetos de vidrio cargados positivamente. Luego del desparafinado del preparado, la actividad de la peroxidasa endógena fue eliminada sumergiendo los portaobjetos en peróxido de hidrógeno 0,03% por 5 minutos. Las uniones no específicas fueron bloqueadas usando suero normal de cabra. Posteriormente se lavaron los preparados con una solución buffer con solución salina de Tris + Tween 20 a pH 7,6, durante 5 min, e incubados con un anticuerpo de conejo anti Gal-1 (1:50). Posteriormente se incubó con un anticuerpo secundario de cabra anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa (1:200). Estos anticuerpos fueron los mismos que se utilizaron para los ensayos de *Western Blot*. Las secciones fueron visualizadas con 3,3'-diaminobencidina (Sigma) como cromógeno durante 5 min y luego se utilizó verde de

metilo para la contra tinción. Se realizaron los controles negativos sin el agregado del anticuerpo primario.

3.17. Cinética de expresión de Gal-1 en tumor y bazo de animales portadores del linfoma L-DGE tratados con Cy

Se desafiaron ratones hembras BALB/c con el linfoma L-DGE en forma s.c. En los días 7, 10, 14 y 21 posteriores al inóculo tumoral se sacrificaron cuatro animales por fecha extirpándose el tumor primario y el bazo. Además, en el día 14, cuatro animales fueron inoculados con Cy i.p. (25 mg/kg de peso) y los restantes cuatro no recibieron tratamiento ulterior. Finalmente, al día 21 se sacrificaron los ocho animales restantes, cuatro testigos y cuatro tratados. Del grupo de animales testigos de este experimento, y de otros posteriores, se tomaron muestras de los tumores primarios y de las metástasis ganglionares correspondientes, cuando se desarrollaron. De esta forma se obtuvieron cinco juegos de tumor primario y metástasis espontáneas. En todos los casos se congelaron los tejidos y se realizaron los homogenados proteicos en frío, por disgregación mecánica de las células en buffer de lisis. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Sedmak. Finalmente, se realizó un *Western blot* para la determinación de Galectina-1, sembrándose 30 µg de proteínas totales en un gel de poliacrilamida al 15% con SDS. Luego del revelado se analizaron las bandas correspondientes a Gal-1. Se determinó la relación entre el volumen tumoral y la expresión de Gal-1 usando el test de Correlación de Pearson. El modelo utilizado se grafica en la Figura 3.

3.18. Cinética de expresión de Gal-1 en otros modelos tumorales

S-E100. Se desafiaron 16 ratas hembras *m* con el S-E100 en el día 0. Se obtuvieron muestras de tumor los días 7, 10, 14 y 21 de evolución tumoral y de bazo en los días 0, 7, 10, 14 y 21.

M-234p. Se desafiaron 16 ratones hembras BALB/c con el adenocarcinoma de mama M-234p. Se obtuvieron muestras de tumor los días 10, 20, 30 y 40 de evolución tumoral y de bazo en los días 0, 10, 20, 30 y 40.

El resto del procedimiento experimental fue igual al descrito en el punto 3.15.

3.19. Interrelación entre sistema inmune y expresión de Gal-1 durante el crecimiento tumoral en distintos modelos murinos

Ratas endocriadas *e* y *m* y ratones BALB/c fueron desafiados con L-TACB, S-E100 y M-234p s.c., respectivamente. Simultáneamente se realizó el mismo experimento inoculando los tres tumores en ratones inmunodeficientes N:NIH S-(nu). Los animales fueron sacrificados de manera periódica. Se extirparon los tumores primarios y los bazos y se determinó la expresión de Gal-1 a través de ensayos *Western Blot*. El modelo experimental que se utilizó se muestra en la Figura 4.

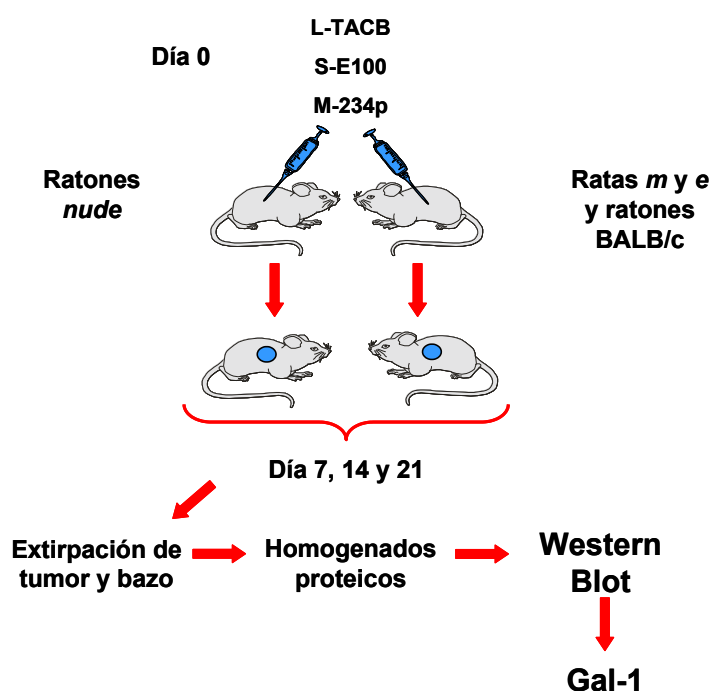


Figura 4. Interrelación entre sistema inmune y expresión de Gal-1. Modelo experimental

3.20. Modulación de la expresión de Gal-1 con inhibidores de vías de transducción de señales

Se realizaron suspensiones celulares tanto de tumor primario como de metástasis a partir de tres animales que desarrollaron metástasis ganglionar espontánea. Se preparó un *pool* de células de cada uno de los tejidos. Para ello, se realizó una disgregación mecánica de los tejidos en medio RPMI. Se prepararon dos suspensiones de $1,2 \times 10^6$ cél/ml en medio RPMI + 10% SFB, una correspondiente al pool de células tumorales

y otra a la de células metastásicas. Las células fueron sembradas ($3,6 \times 10^6$ cél/pocillo) en placas de 12 pocillos y tratadas con: 1) Mafosfamida $5\mu\text{M}$, 2) SB202190 (inhibidor de p38-MAPK) $10\mu\text{M}$, 3) Sulfasalazina (inhibidor de NF κ B) 1mM , 4) Rapamicina (inhibidor de mTOR) $1\mu\text{M}$ y Maf $5\mu\text{M}$ en combinación con cada uno de los otros inhibidores (2, 3, 4). También se sembraron pocillos testigo con células sin tratamiento. Esto se realizó tanto para las células tumorales como para las metastásicas. Las células fueron incubadas durante 96 h en estufa gaseada a 37°C , 5% de CO_2 . Luego de la incubación se obtuvieron los pellets celulares que fueron conservados a -20°C hasta su utilización. Luego se realizaron los extractos proteicos y se midió la concentración de proteínas totales para cada extracto. Se determinó la concentración de Gal-1 en cada una de las muestras mediante *Western Blot*.

3.21. Estudio de las poblaciones linfocitarias reguladoras de la respuesta antitumoral

3.21.1. Células T reguladoras

Se desafiaron ratas *e* singeneicas con el linfoma L-TACB vía s.c (día 0). En el día 14 los animales se distribuyeron en dos grupos: 1) Testigos: se inocularon con solución fisiológica i.p. y 2) Tratados: se inocularon con Cy vía i.p. (10 mg/kg de peso). Se tomaron muestras de sangre periférica con EDTA como anticoagulante en los días 0, 7, 14 y 21, y se procesaron para la determinación por citometría de flujo de los marcadores linfocitarios CD4, CD25, CTLA-4, el factor de transcripción Foxp3 e IL-10. El modelo experimental se muestra en la Figura 5. Para la marcación se realizó el siguiente protocolo: a partir de la sangre anticoagulada con EDTA se separaron las células mononucleares de sangre periférica utilizando un gradiente de Ficoll-Paque. Brevemente, se colocaron $750\text{ }\mu\text{l}$ de sangre + $750\text{ }\mu\text{l}$ de PBS en un tubo de centrifuga. Se agregó a esta solución 1 ml de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, EE.UU.). Se centrifugó durante 40 min a 2000 rpm . Se separó el halo de células mononucleares y $30\text{ }\mu\text{l}$ de esta suspensión se colocaron en tubos para citometría de flujo. Se agregaron $3\text{ }\mu\text{l}$ de anti-CD4-PE-Cy5 y $3\text{ }\mu\text{l}$ de anti-CD25-FITC. Se incubaron los tubos durante 15 min en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se fijaron las células y se incubaron los tubos nuevamente 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se realizó un lavado con PBS y se centrifugaron los tubos durante 10 min a 2000 rpm . Se

resuspendió el pellet en 100 µl de saponina (Sigma, Argentina) y se mezcló en vortex. Se agregaron 3 µl de anti Foxp-3-PE o anti IL-10-RPE según correspondiera. Se mezcló en vortex y se incubó 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Se lavó con PBS, se centrifugó a 2000 rpm por 10 min, se resuspendió en PBS y se leyó en el Citómetro Coulter Epics XL (Coulter Corp. Miami, FL, EE.UU.). Para la marcación de las células CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ se agregaron los tres anticuerpos juntos (anti-CD4- PE-Cy5, anti-CD25-FITC, anti-CTLA-4-RPE) y se incubaron los tubos en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente. Se fijaron las células y se leyeron en citómetro (10000 eventos en cada muestra analizada). Los resultados fueron analizados con el programa WinMD1 2.8 (Scripps Research Institute, La Jolla, Ca, EE.UU.).

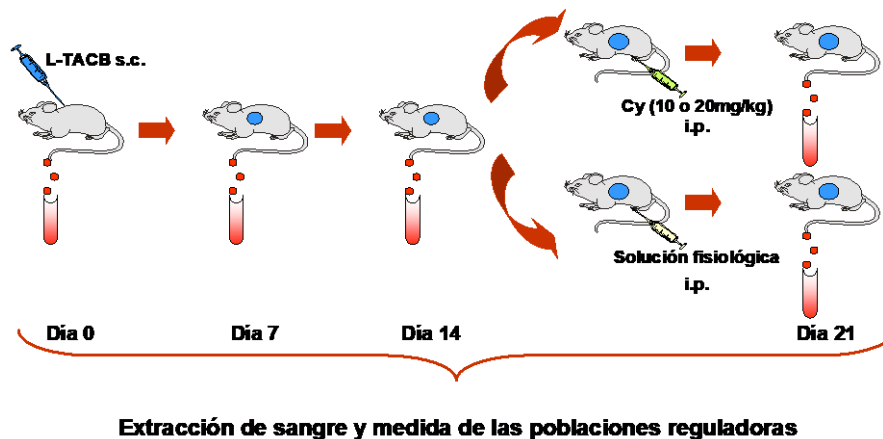


Figura 5. Células T reguladoras. Modelo experimental

3.21.2. Células NKT tipo I

Se utilizó el mismo esquema de trabajo y protocolo que para determinación de las células Tregs (Fig. 5). Para la marcación de las células NKT de tipo I se utilizaron como marcadores los anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR-RPE y anti-CD161-FITC. Luego de ser desafiados con el linfoma L-TACB los animales se distribuyeron en dos grupos experimentales: 1) Testigos y 2) Tratados. Se realizaron dos tratamientos diferentes: i) dosis única de Cy de 10 mg/kg peso en el día 14, ii) dosis única de Cy de 20 mg/kg peso en el día 14.

3.22. Análisis estadísticos

Las diferencias existentes entre los diferentes grupos estudiados fueron analizadas mediante las pruebas de χ^2 , “t” de Student, Análisis de la Variancia (ANOVA) paramétrico y no paramétrico, test de Mann Whitney, test de Friedman, Correlación de Pearson, según correspondiera. Los post-tests que se utilizaron fueron los de Dunn y Tukey según correspondiera. Los resultados fueron significativos cuando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Efecto de Mafosfamida sobre la proliferación de células L-TACB de tumor primario y metástasis

Anteriormente se demostró que una dosis muy baja de Cy inhibe el crecimiento de las células metastásicas, por lo que no es factible estudiar el efecto *in vivo* de la droga sobre dichas células. Por ello debimos recurrir al estudio *in vitro* del efecto de Cy sobre las células metastásicas. Por otra parte, Cy es una droga que debe metabolizarse en hígado para generar los metabolitos activos. Dado que ello no es posible cuando se trabaja *in vitro*, se sustituyó Ciclofosfamida por Mafosfamida (Maf) ya que ésta es una droga que en solución da lugar a los mismos metabolitos activos que Cy luego de ser metabolizada en el hígado, en cantidades equimoleculares.

Para estudiar el efecto de Maf sobre la proliferación de células tumorales primarias y metastásicas se prepararon suspensiones celulares que fueron incubadas con Maf 0 - 2,5 - 5 - 10 y 20 μM durante 48h. En ninguna de las dosis utilizadas Maf afectó la proliferación de las células L-TACB primarias. Por el contrario, se observó un efecto inhibidor de la proliferación celular, dosis-dependiente, de Maf sobre las células L-TACB provenientes de metástasis ganglionares, siendo significativamente menores los valores de células metabólicamente activas correspondientes a las dosis de 5, 10 y 20 μM comparados con el de las células incubadas sin Maf ($p < 0,001$, ANOVA) (Fig. 6). Los resultados muestran un efecto diferencial de Maf sobre células metastásicas, comportamiento que concuerda con los resultados obtenidos *in vivo* con Cy, en el mismo modelo experimental.

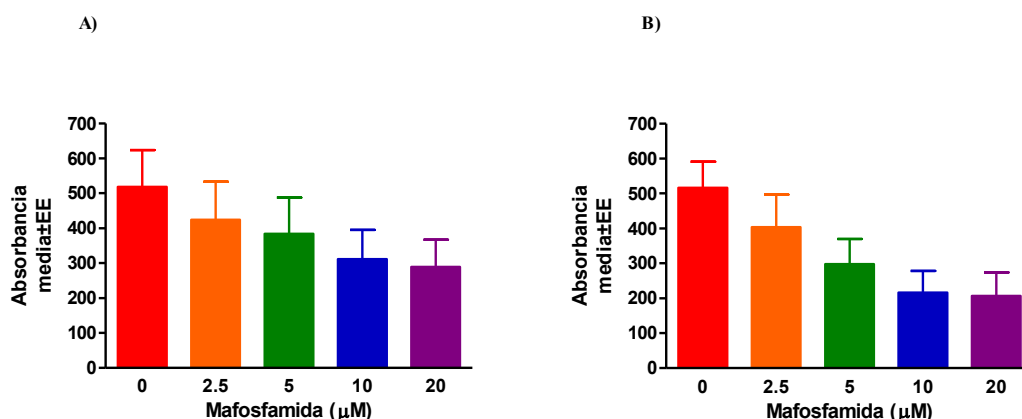


Figura 6. Ensayo de proliferación. Células tumorales primarias y metastásicas incubadas durante 48h con distintas dosis de Mafosfamida. **(A)** Células de tumor primario; **(B)** Células metastásicas, **(A)** ANOVA n.s.; **(B)** ANOVA, $p < 0,05$; Maf 0 versus Maf 10 y 20 ($p < 0,05$, Test de Tukey). Se presenta el valor de Absorbancia (media $\pm$ EE) del cuadruplicado de un juego de tumor y metástasis de cuatro realizados.

4.2. Producción de IL-10 por células L-TACB de tumor primario y metástasis

Previamente, en nuestro laboratorio, se demostró que IL-10 fue el principal factor responsable de la inducción y el desarrollo de inmunosupresión en animales portadores de L-TACB y que el efecto inmunomodulador antimetastásico de Cy estuvo mediado por una reducción en los niveles de IL-10 producidos por linfocitos T (Matar P, 2000; Matar P, 2001). En este modelo experimental también se demostró que las células metastásicas de L-TACB produjeron grandes cantidades de IL-10 y expresaron niveles mayores de IL-10R que las células tumorales primarias (Rico MJ, 2005). Por otro lado, cuando se adicionó IL-10 *in vitro* al medio de cultivo, indujo solamente un incremento de la proliferación de las células metastásicas (Matar P, 2002).

La hipótesis planteada tras esos resultados fue que, además de su actividad inmunosupresora, Cy podría ser capaz de regular la secreción y/o actividad de IL-10 producida por las células tumorales. Para confirmar o rechazar dicha hipótesis se investigó el efecto *in vitro* de los metabolitos activos de Cy sobre la secreción de IL-10, tanto en células tumorales primarias como en células metastásicas.

Con el objeto de determinar la concentración de IL-10 producida por células L-TACB incubadas con distintas dosis de Maf, se obtuvieron los medios condicionados (MC) a partir de suspensiones celulares de tumor primario y de metástasis ganglionares incubadas con la droga. La concentración de IL-10 en los MC de las células tumorales primarias, medida con un ensayo de ELISA, estuvo por debajo de la sensibilidad del método con las cuatro dosis de Maf ensayadas. Por el contrario, en los MC de las células metastásicas, la concentración de IL-10 fue mayor en ausencia de Maf (media $\pm$ EE: 555,8 $\pm$ 126,2 pg/ml) que con Maf 2,5 μ M (199 $\pm$ 69,63 pg/ml; $p<0,05$), 5 μ M (63,75 $\pm$ 43,37 pg/ml; $p<0,001$), 10 μ M (21 $\pm$ 21 pg/ml; $p<0,001$) y 20 μ M (10,5 $\pm$ 10,5 pg/ml; $p<0,001$) (Fig. 7).

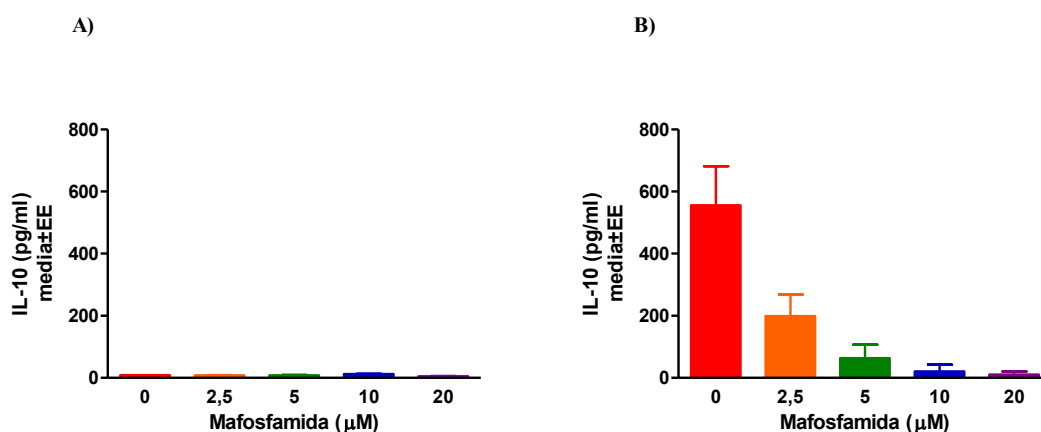


Figura 7. Concentración de IL-10. Se determinó por ELISA la concentración de IL-10 en los MC de células tumorales primarias y metastásicas incubadas durante 48h con distintas dosis de Maf. **(A)** Células de tumor primario; **(B)** Células metastásicas. **(A)** Concentración no detectable. **(B)** ANOVA, $p<0,001$; Maf 0 versus Maf 2,5 μ M ($p<0,05$, Test de Tukey) y versus Maf 5, 10 y 20 μ M ($p<0,01$, Test de Tukey). Se presenta el valor de Absorbancia (media $\pm$ EE) del cuádruplicado de un juego de tumor y metástasis de cuatro realizados.

4.3. Cuantificación de IL-10R (receptor de IL-10) en células L-TACB de tumor primario y metástasis

Con el propósito de determinar la cantidad de receptor para IL-10 (IL-10R) expresado por las células tumorales primarias y metastásicas incubadas con diferentes dosis de Maf se realizó un CELISA (ELISA celular) sobre células tumorales primarias y metastásicas fijadas en policubetas. La cantidad de IL-10R no varió en los cinco grupos de células tumorales primarias. Por el contrario, la densidad óptica en los

pocillos de células metastásicas en ausencia de Maf (media $\pm$ EE: 1156 $\pm$ 332,2) fue mayor que en los de las células incubadas con Maf 5 μ M (292,3 $\pm$ 28,2; $p < 0,05$), 10 μ M (176,7 $\pm$ 52,85; $p < 0,05$) y 20 μ M (169,5 $\pm$ 52,5; $p < 0,05$). Estos resultados muestran que Maf regula negativamente la expresión de IL-10R en las células L-TACB metastásicas. En la Figura 8 se grafican los resultados obtenidos.

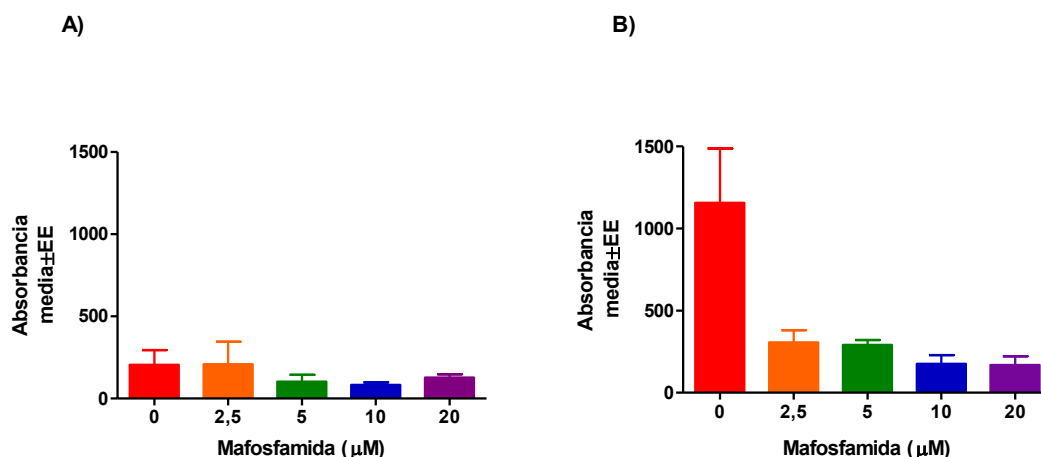


Figura 8. Expresión de IL-10R. Se determinó por CELISA la expresión de IL-10R en células tumorales primarias y metastásicas incubadas durante 48h con distintas dosis de Maf. **(A)** Células de tumor primario; **(B)** Células metastásicas. **(A)** ANOVA n.s. **(B)** ANOVA, $p < 0,001$; Maf 0 versus Maf 2,5 - 5 - 10 y 20 μ M ($p < 0,001$, Test de Tukey). Se presenta el valor de Absorbancia (media $\pm$ EE) del cuadruplicado de un juego de tumor y metástasis de cuatro realizados

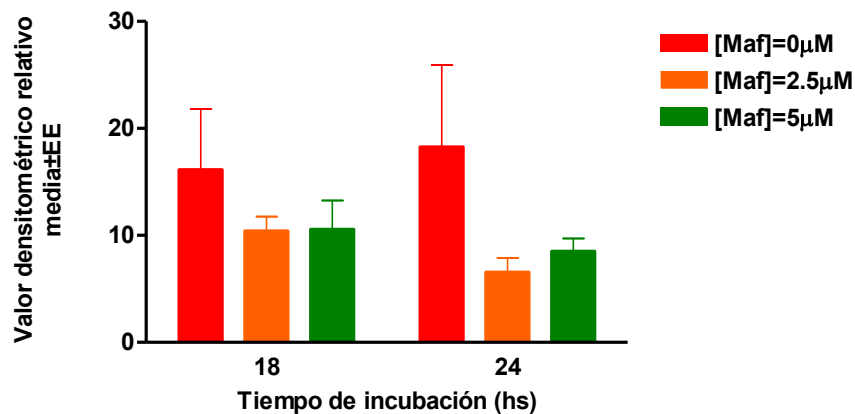
4.4. Efecto de Mafosfamida sobre la expresión de Galectina-1 (Gal-1) en células tumorales primarias y metastásicas

En trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos que el tratamiento con Cy regula negativamente la expresión de Gal-1 *in vivo*. Por ello se decidió estudiar la modulación de la expresión de Gal-1 en células tumorales primarias y metastásicas como resultado de la incubación con Mafosfamida, en diferentes concentraciones, no citotóxicas, y a diferentes tiempos de incubación.

Se prepararon suspensiones de células tumorales primarias y metastásicas y se las incubó durante 18 y 24 horas con distintas concentraciones de Maf (0 - 2,5 y 5 μ M). Luego se prepararon los homogenados proteicos y se realizaron ensayos *Western blot* para estudiar la expresión de Gal-1. En el caso de las células tumorales primarias, la incubación con Maf durante 18 o 24 horas no produjo una modulación significativa en

la expresión de Gal-1, independientemente de la dosis utilizada. Sin embargo, con 24 horas de incubación, Maf mostró una tendencia a regular negativamente la expresión de Gal-1, lo cual no fue dependiente de la dosis. Es de hacer notar la gran variabilidad encontrada en la expresión de Gal-1 de las muestras analizadas (Fig. 9A y 9B).

A)



B)

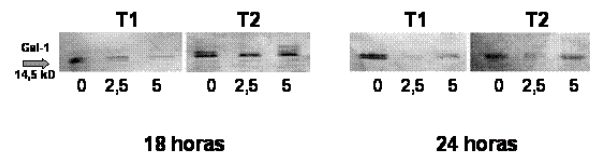
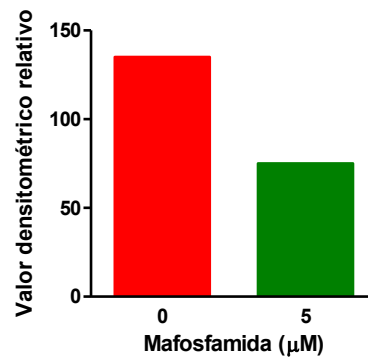


Figura 9. Modulación de la expresión de Gal-1 por Mafosfamida en células tumorales (I). Células tumorales primarias incubadas 18 y 24 horas con diferentes dosis de Maf. (A) análisis densitométrico de los ensayos *Western blot*. Se utilizaron geles al 15% de poliacrilamida y anticuerpo primario anti-Gal-1 (1:1000). Las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo (1:3000) y se revelaron por quimioluminiscencia. Como control positivo se usó Gal-1 recombinante. Las bandas obtenidas fueron semi-cuantificadas por densitometría y expresadas como valores densitométricos relativos. Se presenta la media $\pm$ EE del valor densitométrico relativo de las muestras analizadas (18 hs y 24 hs, ANOVA. n.s.). (B) Placas radiográficas de dos muestras incubadas con Maf 18 y 24 horas.

El efecto de la incubación de células tumorales primarias con Maf sobre la expresión de Gal-1 quedó claramente definido cuando se incubó durante 96 horas. Maf 5μM inhibió la expresión de Gal-1 en un 44,32% en células tumorales primarias (Figs. 10A y 10B).

A)



B)

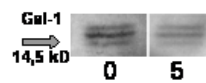
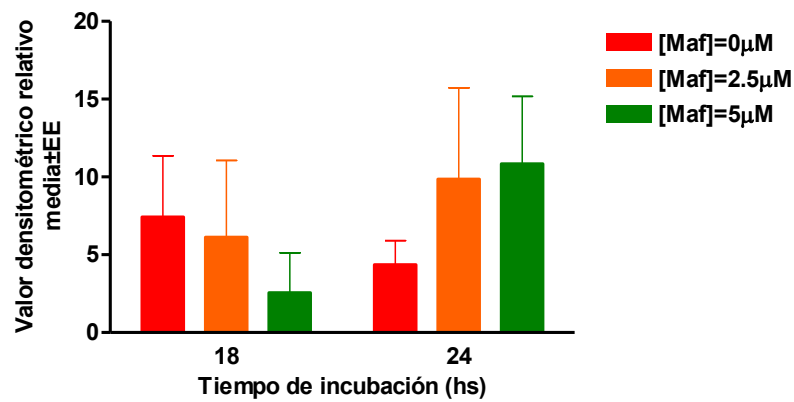


Figura 10. Modulación de la expresión de Gal-1 por Mafosfamida en células tumorales primarias (II). Células tumorales primarias incubadas 96 horas con diferentes dosis de Maf. El procedimiento fue el mismo que el indicado en la Fig. 9, analizándose un pool de muestras tumorales. Las bandas indicadas con la flecha fueron semi-cuantificadas por densitometría y expresadas como valores densitométricos relativos. (A) análisis densitométrico del ensayo *Western blot*. (B) Placa radiográfica del pool de muestras incubado con Maf 5μM

Con respecto a las células obtenidas de metástasis ganglionares espontáneas, la incubación con Maf produjo resultados poco homogéneos en las muestras, por lo que no se encontraron diferencias significativas en la expresión de Gal-1 para ninguna de las dosis de Maf con respecto al grupo incubado sin Maf, tanto a las 18 como a las 24 horas de incubación (Figs. 11A y 11B).

A)



B)

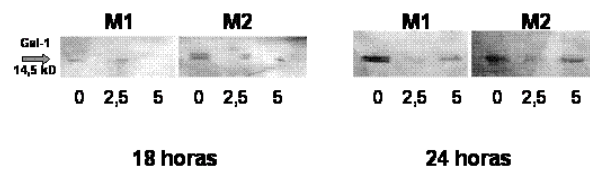
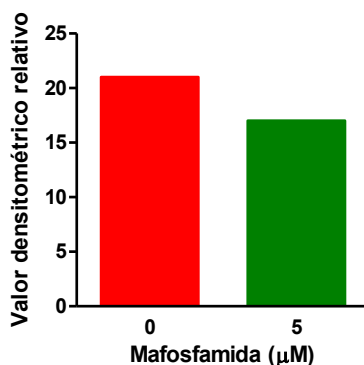


Figura 11. Modulación de la expresión de Gal-1 por Mafosfamida en células metastásicas (I). Células metastásicas incubadas 18 y 24 horas con diferentes dosis de Maf. (A) análisis densitométrico de los ensayos *Western blot*. El procedimiento fue el mismo que el indicado en la Fig. 9. Las bandas indicadas con la flecha fueron semi-cuantificadas por densitometría. Se presenta la media $\pm$ EE del valor densitométrico relativo de dos muestras analizadas (18 hs y 24 hs, ANOVA. n.s.). (B) Placas radiográficas de dos muestras incubadas con Maf 18 y 24 horas.

De manera similar a lo realizado con las células tumorales primarias, se aumentó a 96 horas el tiempo de incubación de las células metastásicas con la dosis mayor de Maf, 5 μ M. Se encontró que dicha concentración de Maf inhibe la expresión de Gal-1 en un 22,23% con respecto a la de las células incubadas sin Maf (Fig. 12A y 12B).

A)



B)

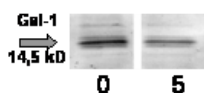


Figura 12. Modulación de la expresión de Gal-1 por Mafosfamida en células metastásicas (II). Células metastásicas incubadas 96 horas con diferentes dosis de Maf. (A) Análisis densitométrico de los ensayos *Western Blot*. El procedimiento fue el mismo que el indicado en la Fig. 9, analizándose un pool de muestras tumorales. Las bandas indicadas con la flecha fueron semi-cuantificadas por densitometría y expresadas como valores densitométricos relativos. (B) Placas radiográficas del pool de muestras incubado con Maf 5 μM.

4.5. Efecto de Gal-1 sobre la viabilidad de esplenocitos de ratas portadoras de L-TACB

Está ampliamente demostrado que Gal-1 induce la apoptosis de linfocitos T activados. Por otro lado, por ensayos anteriores, se conoce que el tratamiento antimetastásico con Cy produce una disminución en la fragmentación del ADN de esplenocitos de ratas portadoras del linfoma y tratadas con una dosis baja de la droga; asimismo aumenta la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Es decir que el nivel de apoptosis de los esplenocitos de animales portadores de tumor podría disminuirse por el tratamiento con Cy. Por lo tanto, se quiso investigar el efecto de Gal-1 sobre las células esplénicas en el modelo del linfoma L-TACB, tanto en la inducción de la apoptosis temprana como sobre la viabilidad de los esplenocitos de animales tratados con Cy. Se trabajó con cuatro grupos experimentales: esplenocitos de ratas portadoras de L-TACB (grupo I), esplenocitos de ratas portadoras de L-TACB incubados con 4 μg/ml de Gal-1 (grupo II), esplenocitos de ratas portadoras de L-TACB tratadas con Cy al día 14 (grupo III) y esplenocitos de ratas portadoras de L-TACB tratadas con Cy al día 14 e incubados con 4 μg/ml de Gal-1 (grupo IV). El agregado de Gal-1 exógena (grupo II)

produjo una disminución del 20,35% de la viabilidad de los esplenocitos comparada con la del grupo I (testigo) ($p<0,05$). Por el contrario, en el grupo IV Gal-1 no tuvo efecto significativo sobre la viabilidad celular comparada con la de los esplenocitos del grupo III (animales portadores de L-TACB tratados con Cy), $p=0,6229$. Como resultado interesante se puede destacar que el tratamiento con Cy de animales portadores de L-TACB indujo un aumento significativo en la viabilidad *in vitro* de los esplenocitos (grupo I vs grupo III; $p<0,05$), la que no fue afectada por el agregado de Gal-1 al medio de cultivo (Fig. 13). Los esplenocitos del grupo IV presentaron un aumento muy significativo de la viabilidad comparada con la del grupo II ($p<0,01$). Finalmente, no se encontró diferencia significativa en la viabilidad de los esplenocitos del grupo III comparada con la del grupo IV.

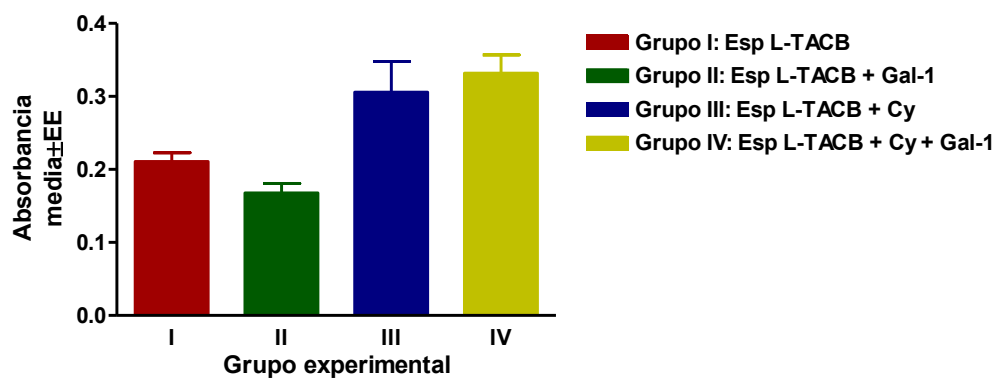


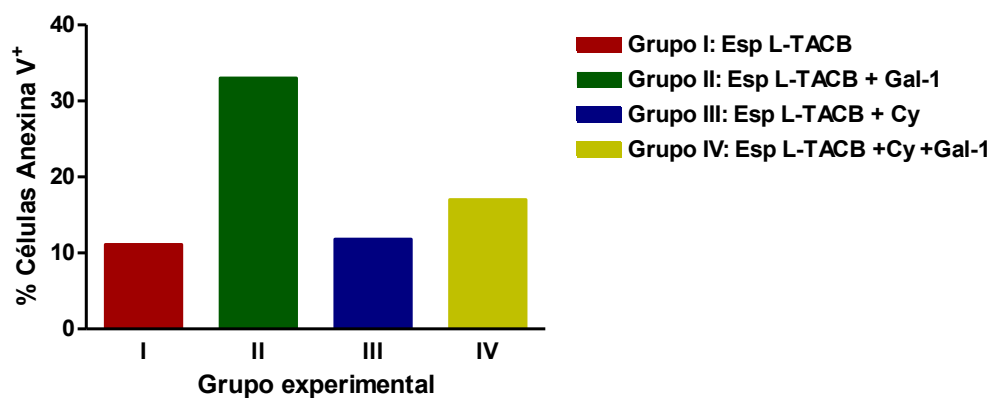
Figura 13. Efecto de Gal-1 sobre la viabilidad de esplenocitos (Esp). Se evaluó la viabilidad de esplenocitos de animales portadores de L-TACB de cuatro grupos experimentales por el ensayo colorimétrico WST-1. Se presenta la media $\pm$ EE de la Absorbancia. ANOVA, $p<0,001$; grupo I vs grupo II y vs grupo III ($p<0,05$, test de Tuckey; grupo II vs grupo IV ($p<0,01$, test de Tuckey).

4.6. Efecto de Gal-1 sobre la apoptosis de esplenocitos de ratas tratadas con Cy

De manera complementaria, se evaluó la inducción de apoptosis de los esplenocitos de animales portadores de L-TACB, tratados y sin tratar con Cy, incubados con Gal-1. La apoptosis temprana de dichas células se determinó a través de la utilización del test de Anexina V. Se observó, como previamente había sido demostrado, que los esplenocitos tratados con Gal-1 (grupo II) presentaban un aumento del porcentaje de células en apoptosis en comparación con el determinado en los esplenocitos del grupo I (33% versus 11%; $p<0,0001$). Sin embargo, el agregado exógeno de Gal-1 no

aumentó los niveles de apoptosis en los esplenocitos del grupo IV con respecto a su correspondiente grupo testigo sin Gal-1 (grupo III) (17% y 12%, respectivamente; χ^2 : n.s.). Por otra parte, se observó una disminución significativa en el número de células en apoptosis temprana en el grupo IV comparado con el grupo II (33% y 17% respectivamente; $p < 0,01$) (Fig. 14A). En la Figura 14B se muestran las fotografías correspondientes a la detección por fluorescencia de las células apoptóticas en esplenocitos de animales portadores de L-TACB incubados con Gal-1, tanto del grupo tratado con Cy (grupo IV) como del grupo sin tratar (grupo II). Estos resultados muestran que el agregado exógeno de Gal-1 no es capaz de revertir el efecto protector que tiene el tratamiento con Cy sobre la apoptosis de los esplenocitos del animal portador del tumor.

A)



B)

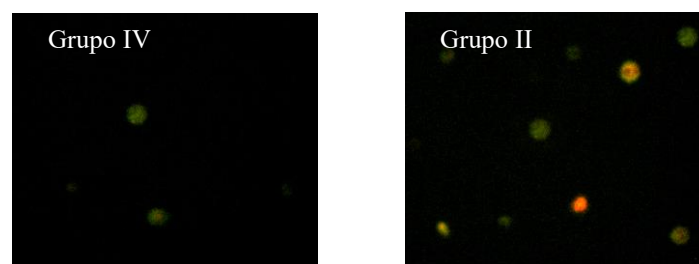


Figura 14. Apoptosis temprana de esplenocitos de ratas tratadas y sin tratar con Cy incubados con Gal-1. (A) % de células Anexina V⁺ en los cuatro grupos experimentales analizados. Grupo I vs grupo II ($p < 0,0001$); grupo II vs grupo IV ($p < 0,01$) (Test χ^2). (B) Microscopía de fluorescencia de esplenocitos apoptóticos teñidos con Anexina V-FITC e Ioduro de Propidio de los grupos IV y II. Aumento 40X.

Los resultados obtenidos al analizar el índice de apoptosis de las células esplénicas apoyan y complementan los logrados en el estudio de la viabilidad celular en los mismos grupos experimentales.

4.7. Cinética de la expresión de Gal-1 en el linfoma L-TACB

En trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró que el tratamiento con Cy en una dosis baja y única tiene efectos antimetastásicos y, al mismo tiempo, regula negativamente la expresión de Gal-1. Teniendo en cuenta estos resultados, pareció interesante estudiar la cinética de expresión de Gal-1 *in vivo* tanto en células tumorales primarias y metastásicas del linfoma L-TACB como en células esplénicas de animales portadores de tumor, así como también realizar el análisis de la forma en que se relacionaba esa expresión de Gal-1 con el proceso de progresión tumoral. Al mismo tiempo, se estudió la cinética de la modulación de la expresión de Gal-1 en células de tumor primario de animales tratados con una dosis baja de Cy.

Se tomaron muestras de tumor primario y de bazo en los días 7, 10 y 14 posteriores al inóculo tumoral. En el día 14 se distribuyeron los animales en dos grupos, uno tratado con Cy (10mg/kg de peso) y el otro, testigo sin tratamiento. En el día 21 se sacrificaron los animales y se tomaron las muestras de tumor y de bazo de los dos grupos experimentales. También se tomaron en el día 0 muestras de bazo de animales normales. En la Figura 15A se muestran los resultados correspondientes al tumor primario. La expresión de Gal-1 no varió entre los días 7 y 10, aumentando a los 14 días del desafío tumoral con respecto a los valores presentados a los 7 días ($p < 0,05$), momento en el que se realizó la primera medición del tumor inoculado. A los 21 días del desafío tumoral, los valores de expresión de Gal-1 se mantuvieron altos y no difirieron de los observados en el día 14. El tratamiento con una dosis baja y única de Cy en el día 14 del desarrollo tumoral produjo, en el día 21, una disminución significativa ($p < 0,01$) en la expresión de Gal-1 en las células de tumor primario cuando se la comparó con la observada en los animales testigos sin tratar, en el mismo día. La expresión de Gal-1 en los tumores tratados regresó a los niveles basales, que no difirieron de los correspondientes al día 7 ($p = 0,49$).

Por otra parte, se estudió la cinética de expresión de Gal-1 en células esplénicas de animales portadores del tumor y se encontró que la expresión basal de Gal-1 en dichas células fue inferior a la determinada en células de tumor primario en el día 7 (Figura 15B). Esta expresión se mantuvo estable hasta el día 10 y luego, a partir del día 14, se produjo una disminución significativa en el nivel de expresión, la cual continuó disminuida en el día 21. Ese valor fue significativamente menor que el correspondiente al día 0 ($p < 0,05$). De manera análoga a lo obtenido con células tumorales, el tratamiento con la dosis antimetastásica de Cy produjo un restablecimiento de los niveles basales de Gal-1 en los esplenocitos los cuales, en el día 21, no difirieron de los observados en el día 0 ($p = 0,4542$).

En las Figuras 15C y 15D se muestran las placas radiográficas de los *Western Blots* de tumor primario y de bazo, respectivamente.

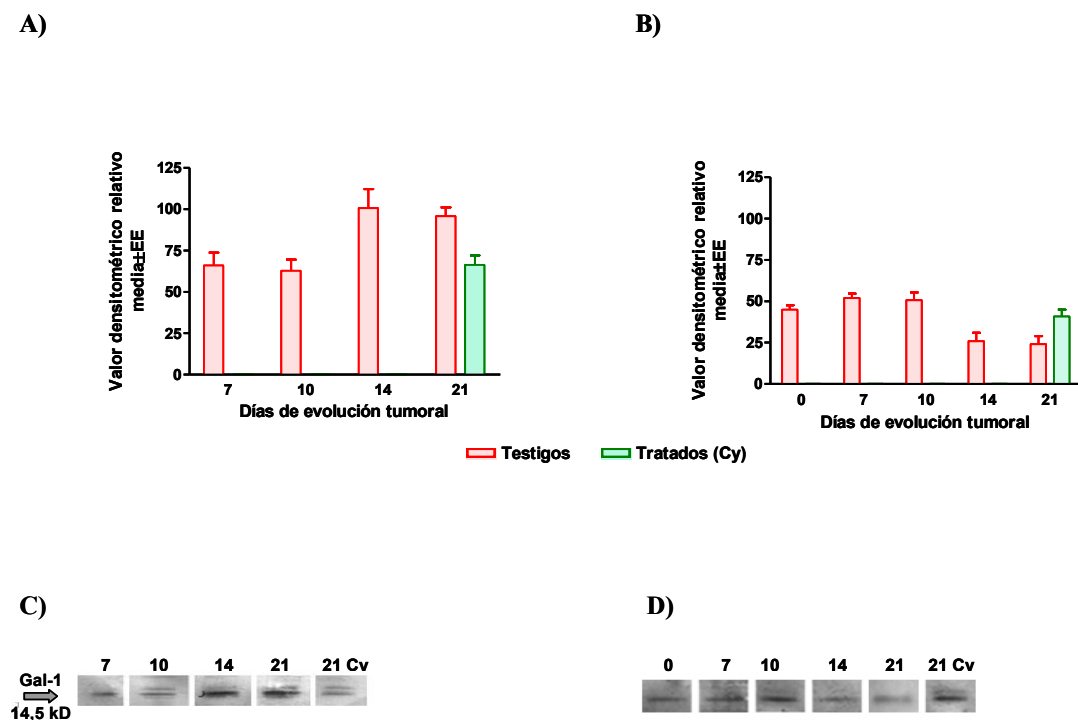
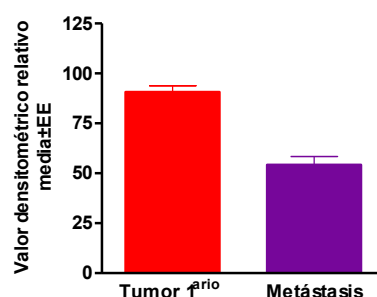


Figura 15. Cinética de la expresión de Gal-1 en L-TACB. Se prepararon extractos proteicos de tumor primario (A) y bazo (B) y se procesaron por *Western Blot*. El procedimiento fue el mismo que el indicado en la Fig. 9. Las bandas indicadas con la flecha fueron semi-cuantificadas por densitometría. Se presenta la media $\pm$ EE del valor densitométrico relativo ($n=4$ /grupo). (C) y (D) Placas radiográficas representativas de tumor y bazo, respectivamente. Se realizó un control de carga por tinción de los geles con Coomassie blue y tinción de las membranas con Ponceau S.

4.8. Estudio de la expresión de Gal-1 en tejido tumoral y metastásico de L-TACB

Posteriormente, se estudió por *Western blot* la expresión de Gal-1 en las metástasis ganglionares de los animales que las desarrollaron y la de sus respectivos tumores primarios. Se observó que la expresión de Gal-1 se encontraba significativamente disminuida en el tejido metastásico comparada con la del tumor primario, en el mismo día ($p < 0,001$, *t* de Student) (Fig. 16A y B).

A)



B)

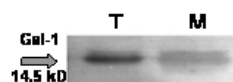


Figura 16. Expresión de Gal-1 en tumor primario y metástasis. A) Se prepararon extractos proteicos de tumor primario y de metástasis y se procesaron por *Western Blot*. El procedimiento fue el mismo que el indicado en la Fig. 9. Las bandas indicadas con la flecha fueron semi-cuantificadas por densitometría. Se presenta la media $\pm$ EE del valor densitométrico relativo. Tumor 1° vs metástasis, ($p < 0,001$, *t* de Student). (B) Placa radiográfica representativa de un juego de tumor (T) y metástasis (M) de los animales analizados. Se realizó un control de carga por tinción de los geles con Coomassie blue y tinción de las membranas con Ponceau S.

4.9. Correlación entre volumen tumoral y expresión de Galectina-1

Teniendo en cuenta la modulación de la expresión de Gal-1 evidenciada en los estudios de cinética de expresión, interesó conocer qué tipo de relación existía entre el volumen tumoral y la expresión de Gal-1. Utilizando un test de correlación de Pearson se obtuvo una correlación positiva y significativa entre ambas variables ($r = 0,5888$; $p = 0,0129$) (Fig. 17).

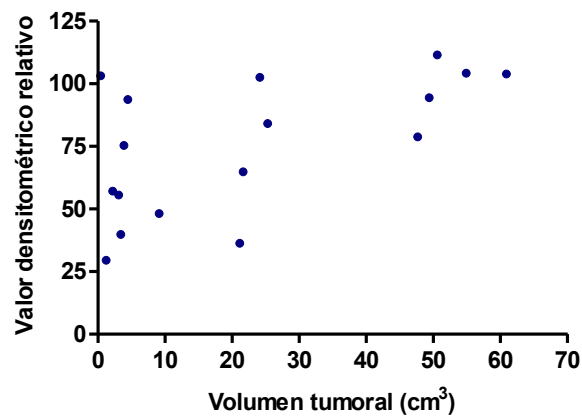


Figura 17. Correlación entre volumen tumoral y expresión de Gal-1 para L-TACB. Test de correlación de Pearson ($r=0,5888$, $p=0,0129$).

4.10. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de Galectina-1

Previamente se estudió la cinética de la expresión de Gal-1 en muestras del linfoma L-TACB primario, metástasis ganglionares y bazo procedentes de animales portadores del tumor, tratados y sin tratar con Cy. Se observó modulación de la expresión de Gal-1 durante el crecimiento tumoral y reversión a los valores basales luego del tratamiento con Cy. Dado que el análisis de la expresión se realizó en un homogenado del tejido estudiado, se consideró conveniente estudiar dicha expresión en cortes del mismo tejido en los que la estructura celular y tisular se mantiene intacta. Para ello, se evaluó la expresión de Gal-1 por inmunohistoquímica en tejido tumoral, tratado y sin tratar con Cy y en tejido metastásico. En concordancia con los resultados obtenidos por *Western Blot*, Gal-1, se expresó con menor intensidad en el tejido tumoral de las ratas tratadas con Cy que la observada en el tumor de las ratas controles. Por otro lado, la expresión de Gal-1 fue menor en tejido metastásico comparado con la del tumor primario. Es de destacar que la localización de Gal-1 fue predominantemente citoplasmática (Fig. 18).

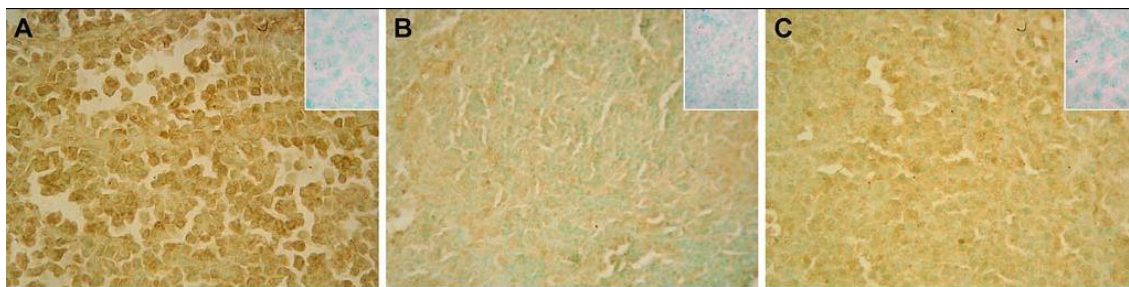


Figura 18. Expresión de Gal-1 en tejido tumoral y metastásico. Inmunohistoquímica para Gal-1 en secciones de tumor primario (A), nódulos linfáticos metastásicos (B) y tumor primario de ratas tratadas con Cy (C). Aumento 40X. La intensidad de la expresión de Gal-1 fue menor en el tumor de los animales tratados y en el tejido metastático comparado con el tumor de las ratas no tratadas. Los insertos corresponden a los respectivos controles negativos de las secciones de los tejidos expuestas al anticuerpo secundario en ausencia de anticuerpo anti- Gal-1.

4.11. Determinación de la cinética de expresión de Gal-1 en tumor y bazo de animales portadores del linfoma L-DGE

Con el propósito de investigar si los resultados obtenidos en el estudio de la cinética de expresión de Gal-1 en el linfoma L-TACB eran exclusivos de ese tumor o si era un comportamiento que se podía generalizar a otros linfomas, se realizó un experimento similar al descrito en la sección 4.6, utilizando el modelo tumoral del linfoma de ratón L-DGE. Ratones BALB/c hembras se desafiaron con L-DGE s.c. (día 0) y se distribuyeron en dos grupos: I) sin tratamiento ulterior y II) tratados en el día 14 con Cy i.p. (25 mg/kg). Es de hacer notar que para el ratón, la dosis baja antimetastásica de Cy es mayor que la correspondiente a la rata. Esta dosis fue establecida en experimentos anteriores (Matar P, 1994; Matar P, 1999). Se sacrificaron animales del grupo I) en los días 0, 7, 14 y 21 y del grupo II) en el día 21, extirpándose tumor y bazo. La expresión de Gal-1 en tumor primario, determinada por *Western Blot*, fue mayor en el día 21 que en el día 7 ($p < 0,05$), observándose un comportamiento inverso en bazo ($p < 0,05$). Se observó una tendencia a la disminución de la expresión de Gal-1 en los animales tratados comparados con los testigos en el tumor primario y un comportamiento inverso (en espejo) en el bazo (Fig. 19). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el modelo de linfoma de rata L-TACB, lo que podría estar indicando un patrón de comportamiento de los linfomas, independientemente de la especie donde se desarrollen.

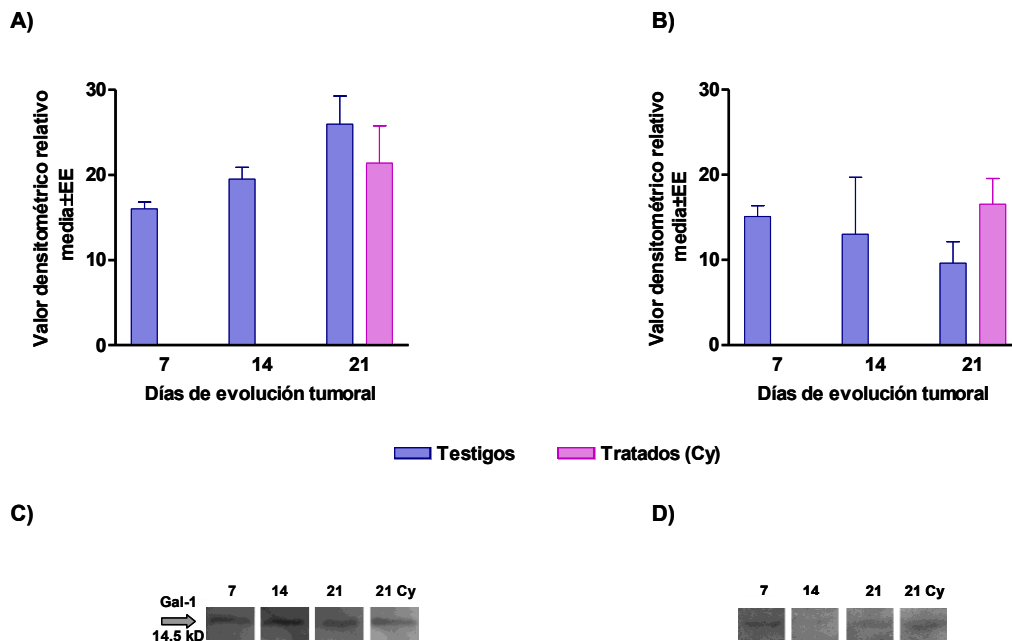


Figura 19. Cinética de la expresión Gal-1 en L-DGE. Se prepararon extractos proteicos de tumor primario (A) y bazo (B) y se procesaron por *Western Blot*. El procedimiento fue el mismo que el indicado en la Fig. 9. Las bandas indicadas con la flecha fueron semi-cuantificadas por densitometría. Se presenta la media $\pm$ EE del valor densitométrico relativo. (C) y (D) Placas radiográficas representativas de tumor y bazo, respectivamente. Se realizó un control de carga por tinción de los geles con Coomassie blue y tinción de las membranas con Ponceau S.

4.12. Correlación entre volumen tumoral y expresión de Galectina-1 en L-DGE

Se estudió la correlación entre el volumen tumoral y la expresión de Gal-1 determinados en el linfoma L-DGE. Utilizando el test de correlación de Pearson se obtuvo una correlación positiva y muy cercana al significado estadístico ($r=0,6617$; $p=0,0522$) (Fig. 20). Por lo tanto, se encontró que la correlación positiva entre la expresión de Gal-1 y el volumen tumoral era una característica común a los linfomas L-DGE de ratón y L-TACB de rata.

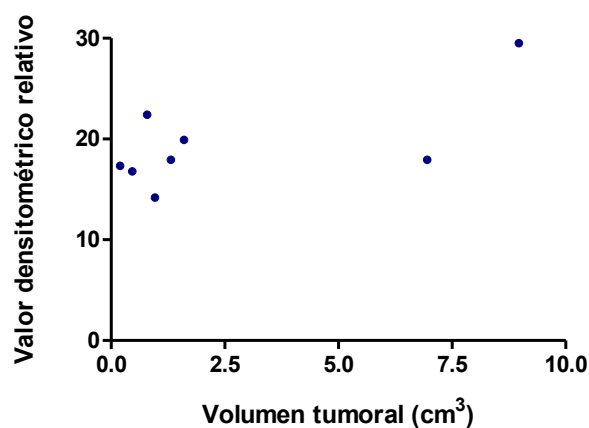


Figura 20. Correlación entre volumen tumoral y expresión de Gal-1 para L-DGE. Test de correlación de Pearson ($r=0,6617$, $p=0,0522$).

4.13. Cinética de expresión de Gal-1 en otros modelos tumorales

Considerando la importancia de la molécula Gal-1 como inmunomoduladora, la concordancia en la regulación de Gal-1 durante el crecimiento tumoral de dos linfomas diferentes planteó el interrogante de si este comportamiento podría ser extrapolado a otros modelos tumorales. Con el objetivo de contestar esa pregunta, se analizó la cinética de expresión de Gal-1 en el fibrosarcoma de rata S-E100 y en el adenocarcinoma de mama de ratón, M-234p.

En el modelo del S-E100 se trabajó con muestras de tumor y bazo tomadas en los días 7, 14, 21. No se observaron cambios significativos en la expresión de Gal-1 durante la progresión tumoral. Sin embargo, en los días 14 y 21 las células de bazo de los animales portadores de S-E100 expresaron significativamente menos Gal-1 que la observada en el día 0 (Fig. 21).

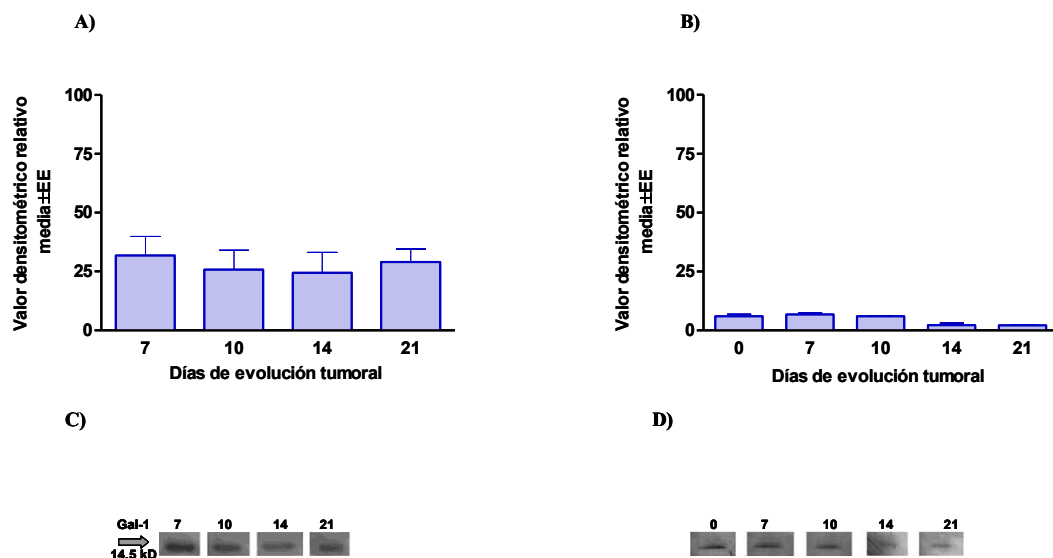


Figura 21. Expresión de Gal-1 en S-E100. Se prepararon extractos proteicos de tumor primario (A) y bazo (B) y se procesaron por *Western Blot*. El procedimiento fue el mismo que el indicado en la Fig. 9. Las bandas indicadas con la flecha fueron semi-cuantificadas por densitometría. Se presenta la media $\pm$ EE del valor densitométrico relativo. (C) y (D) Placas radiográficas representativas de tumor y bazo, respectivamente. Se realizó un control de carga por tinción de los gels con Coomassie blue y tinción de las membranas con Ponceau S.

En el modelo del adenocarcinoma de mama M-234p se tomaron muestras de tumor y bazo en los días 10, 20, 30 y 40. En este modelo tumoral, la cinética de expresión de Gal-1 difirió sustancialmente de la observada en los modelos L-TACB, L-DGE y S-E100. Se observó una disminución en la expresión de Gal-1 durante el crecimiento tumoral. Cuando se comparó el nivel observado en el día 30 con respecto al del día 10, se encontró que esa disminución era estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Asimismo, la comparación de los valores del día 40 con respecto al día 10 arrojó una diferencia marginalmente significativa ($p = 0,07$). Por otra parte, no se observaron cambios en la expresión de Gal-1 en las células esplénicas de los animales portadores de M-234p (Fig. 22). Con estos resultados se pudo demostrar que en tres modelos tumorales diferentes y con distinta inmunogenicidad (L-TACB y M-234-p inmunogénicos y S-E100 débilmente inmunogénico) la cinética de expresión de Gal-1 es distinta: en los modelos de linfoma la expresión aumentó durante el crecimiento tumoral, en el adenocarcinoma de mama disminuyó, mientras que en el sarcoma no se modificó.

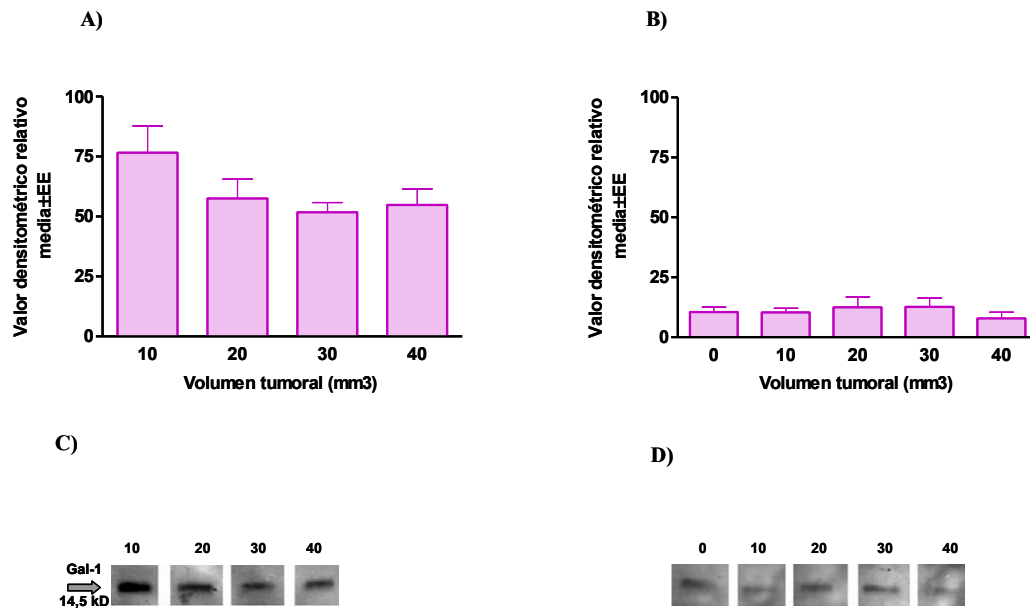


Figura 22. Expresión de Gal-1 en M-234p. Se prepararon extractos proteicos de tumor primario (A) y bazo (B) y se procesaron por *Western Blot*. El procedimiento fue el mismo que el indicado en la Fig. 9. Las bandas indicadas con la flecha fueron semi-cuantificadas por densitometría. Se presenta la media ± EE del valor densitométrico relativo. (C) y (D) Placas radiográficas representativas de tumor y bazo, respectivamente. Se realizó un control de carga por tinción de los geles con Coomassie blue y tinción de las membranas con Ponceau S.

4.14. Análisis de la influencia del sistema inmune sobre el crecimiento tumoral y la expresión de Gal-1 en distintos modelos tumorales murinos

Teniendo en cuenta los resultados descriptos en las secciones 4.7 a 4.13 se desarrolló una hipótesis de trabajo en la que se planteaba que la cinética de la expresión de Gal-1 podría depender de la interrelación entre la inmunogenicidad tumoral y la respuesta inmune del huésped. Para aceptar o rechazar tal hipótesis se plantearon una serie de experimentos que se desarrollaron simultáneamente en animales inmunocompetentes e inmunodeficientes. En el día 0, ratas endocriadas *e* y *m* y ratones BALB/c fueron desafiados con L-TACB, S-E100 y M-234p s.c., respectivamente. Simultáneamente se realizó el mismo experimento desafiando ratones atímicos (*nude*) con los mismos tumores. Los animales fueron sacrificados de manera periódica. Se extirparon los tumores primarios y los bazos y se determinó la expresión de Gal-1 en esos tejidos.

L-TACB. Las figuras 23A y B muestran el crecimiento del tumor L-TACB en ratas *e* y en ratones *nude* respectivamente. Los datos longitudinales volumen tumoral vs tiempo se ajustaron con un modelo exponencial creciente de la forma $V_t = V_i \cdot \exp(k \cdot t)$,

donde V_t es el volumen tumoral (mm^3) en el tiempo t , V_i es el volumen tumoral inicial, k es la tasa de crecimiento exponencial y t el tiempo (días). De esta expresión puede derivarse el tiempo de duplicación del volumen tumoral ($0,69/k$) que representa un indicador de la velocidad de crecimiento. El tiempo de duplicación de los tumores en los ratones *nude* no difirió significativamente del de los huéspedes eutímicos (ratas *e*) (Figura 23C).

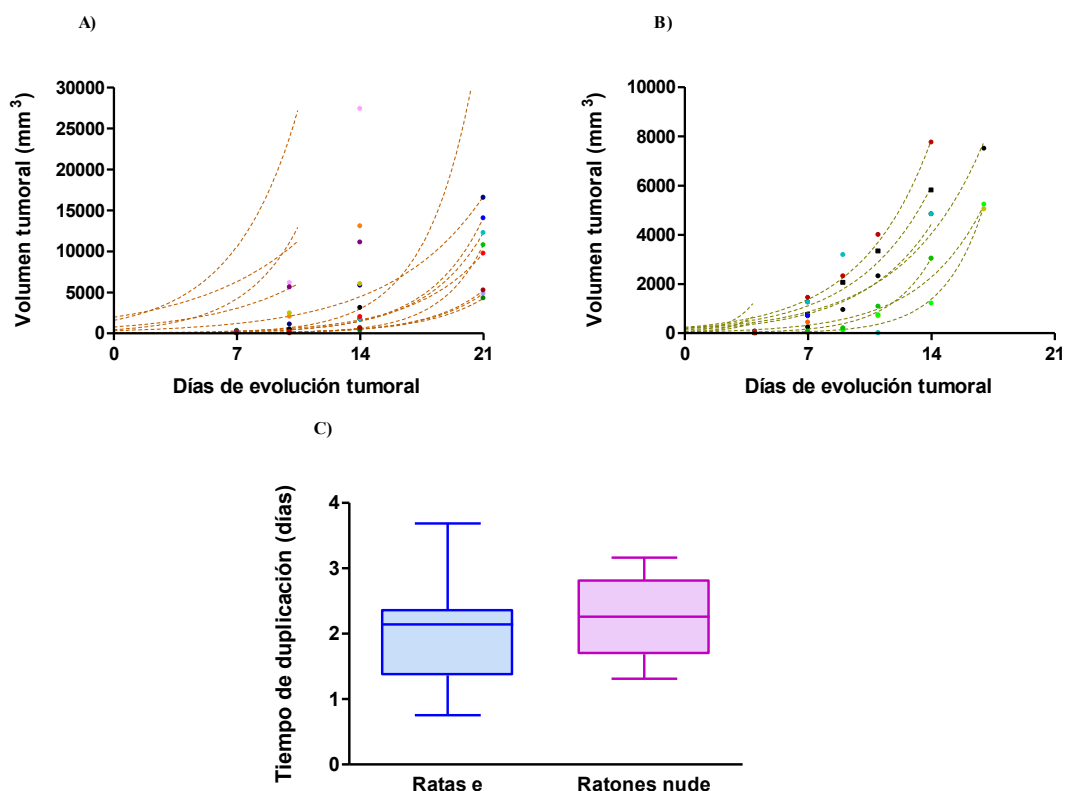


Figura 23. Crecimiento exponencial de L-TACB en animales eutímicos y atímicos. Curvas de crecimiento individuales en ratas *e* (A) y en ratones *nude* (B). C) Tiempo de duplicación de L-TACB en animales eutímicos y atímicos, test de Mann Whitney, n.s.

En lo que respecta a la expresión de Gal-1, ésta fue menor en los tumores de los ratones *nude* que en los de las ratas *e* ($p < 0,05$) a lo largo de la progresión tumoral, mientras que en bazo sólo fue cuantificable en los animales eutímicos. La expresión de Gal-1 en L-TACB creciendo en ratas *e* mostró un resultado similar al obtenido en el experimento mostrado en la Fig. 15A (Fig. 24A). Por otra parte, durante el crecimiento tumoral, la expresión de Gal-1 en ratones *nude*, disminuyó significativamente desde el día 7 al 21 ($p < 0,05$; t de Student) (Fig. 24B).

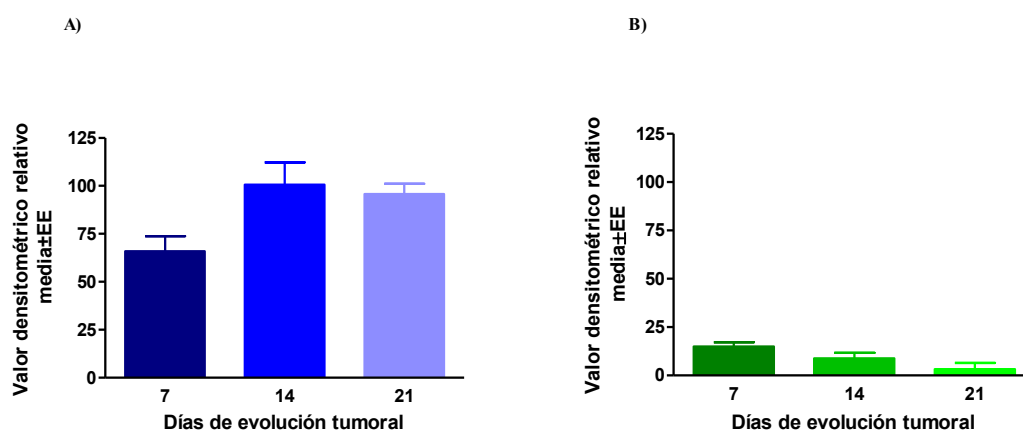


Figura 24. Expresión de Gal-1 en L-TACB de animales eutímicos y atímicos. Se prepararon extractos proteicos de tumor primario en (A) ratas *e* y (B) ratones *nude* y se procesaron por *Western Blot*. El procedimiento fue el mismo que el indicado en la Fig. 9. Se presenta la media±EE del valor densitométrico relativo. (A) $p < 0,05$; ANOVA. B) día 7 vs 21: $p < 0,05$; *t* de Student.

Cuando se analizó la relación existente entre el volumen tumoral y la expresión de Gal-1 en ratas *e* se obtuvo un resultado similar al mostrado en la Fig. 17, es decir una correlación positiva y significativa (Fig. 25A). Por el contrario, cuando L-TACB creció en ratones *nude*, la correlación entre ambas variables fue no significativa, siendo $r = -0,3033$ (Fig. 25B).

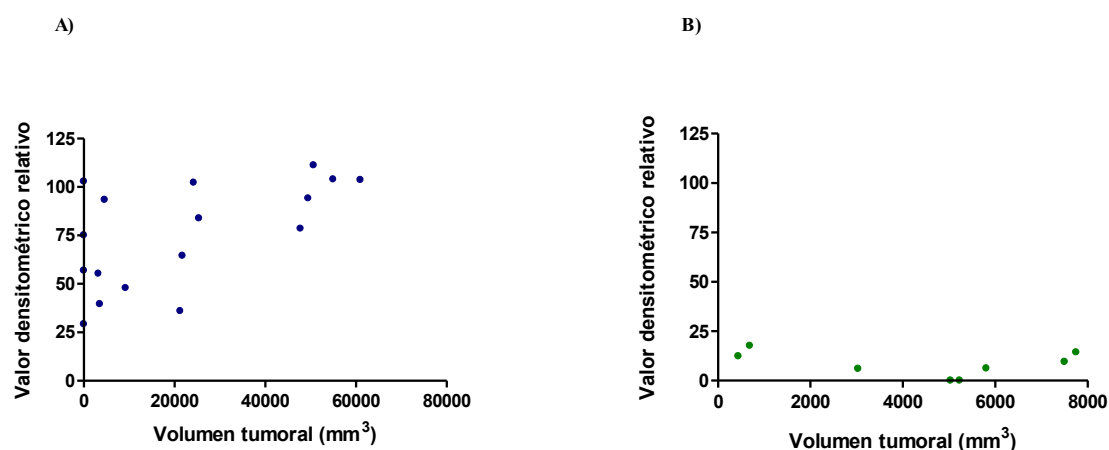


Figura 25. Correlación entre volumen tumoral y expresión de Gal-1 para L-TACB en animales eutímicos y atímicos. A) L-TACB en ratas *e*: $r = 0,5888$; $p = 0,0129$. B) L-TACB en ratones *nude*: $r = -0,3033$; $p = 0,4653$ (Test de correlación de Pearson).

S-E100. Las figuras 26A y B muestran el crecimiento exponencial del tumor S-E100 en ratas *m* y en ratones *nude* respectivamente. La velocidad de crecimiento se estimó de la misma manera que para el crecimiento de L-TACB. El tiempo de duplicación de

los tumores en los ratones *nude*, no difirió significativamente del de los huéspedes eutímicos (ratas *m*) a pesar de mostrar una mediana menor que la de los animales eutímicos (Fig. 26C).

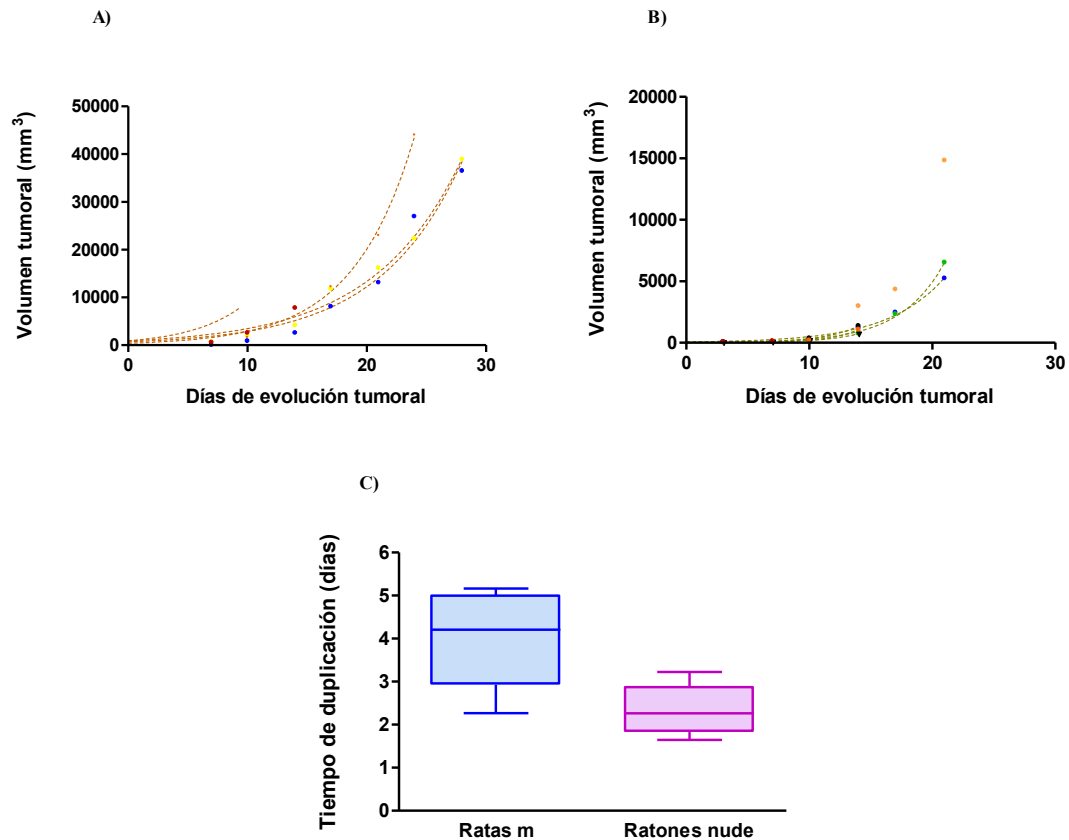


Figura 26. Crecimiento exponencial de S-E100 en animales eutímicos y atímicos. Curvas de crecimiento individuales en ratas *m* (A) y en ratones *nude* (B). C) Tiempo de duplicación de S-E100 en animales eutímicos y atímicos, test de Mann Whitney, n.s.

La expresión de Gal-1 en S-E100 creciendo en ratas *m* no sufrió modificaciones, al igual que lo obtenido en el experimento mostrado en la Fig. 21A (Fig. 27A). Por otra parte, durante el crecimiento tumoral, la expresión de Gal-1 en ratones *nude* fue semejante a la observada en las ratas *m*, sin mostrar variaciones (Fig. 27B), mientras que en bazo sólo fue cuantificable en los animales eutímicos.

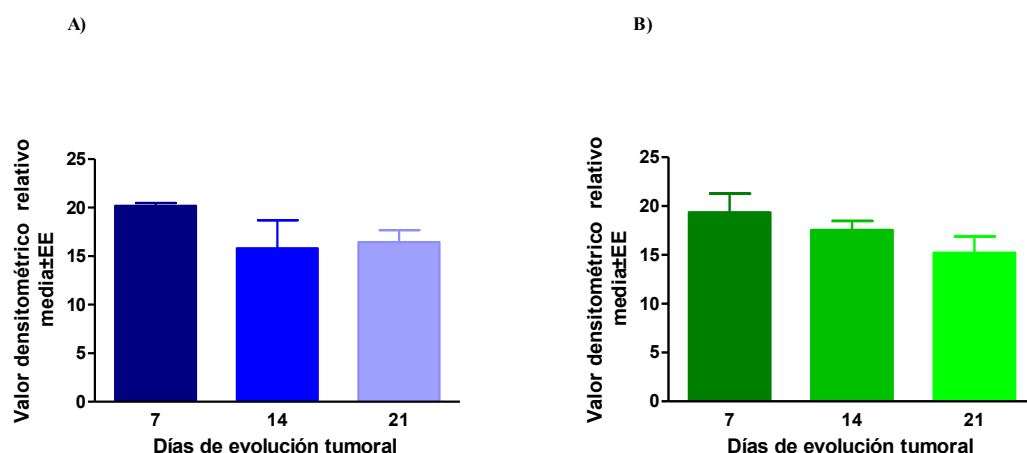


Figura 27. Expresión de Gal-1 en S-E100 de animales eutímicos y atímicos. Se prepararon extractos proteicos de tumor primario en (A) ratas *m* y (B) ratones *nude* y se procesaron por *Western Blot*. El procedimiento fue el mismo que el indicado en la Fig. 9. Se presenta la media±EE del valor densitométrico relativo. (A) ANOVA n.s. (B) ANOVA n.s.

Se analizó la relación existente entre el volumen tumoral y la expresión de Gal-1 en ratas *m*, lo que evidenció una correlación no significativa, $r=-0,4532$; $p=0,1883$ (Fig. 28A). De la misma manera, la correlación entre el volumen del S-E100 creciendo en ratones *nude* y su expresión de Gal-1 fue no significativa, siendo $r=-0,4441$ y $p=0,2311$ (Fig. 28B).

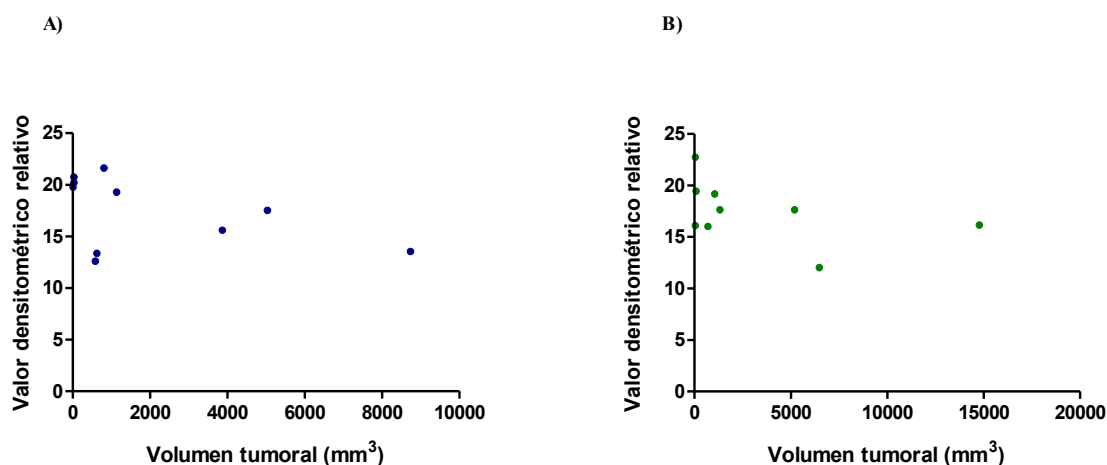


Figura 28. Correlación entre volumen tumoral y expresión de Gal-1 para S-E100 en animales eutímicos y atímicos. A) S-E100 en ratas *m*: $r=-0,4532$; $p=0,188$. B) S-E100 en ratones *nude*: $r=-0,4441$; $p=0,2311$ (Test de correlación de Pearson).

M-234p. Las figuras 29A y B muestran el crecimiento exponencial del tumor M-234p en ratones BALB/c y en ratones *nude*, respectivamente. La velocidad de crecimiento se estimó de la misma manera que para el linfoma L-TACB. El tiempo de duplicación

de los tumores en los ratones *nude* no difirió significativamente del obtenido en los huéspedes eutímicos (ratones BALB/c) (Figura 29C).

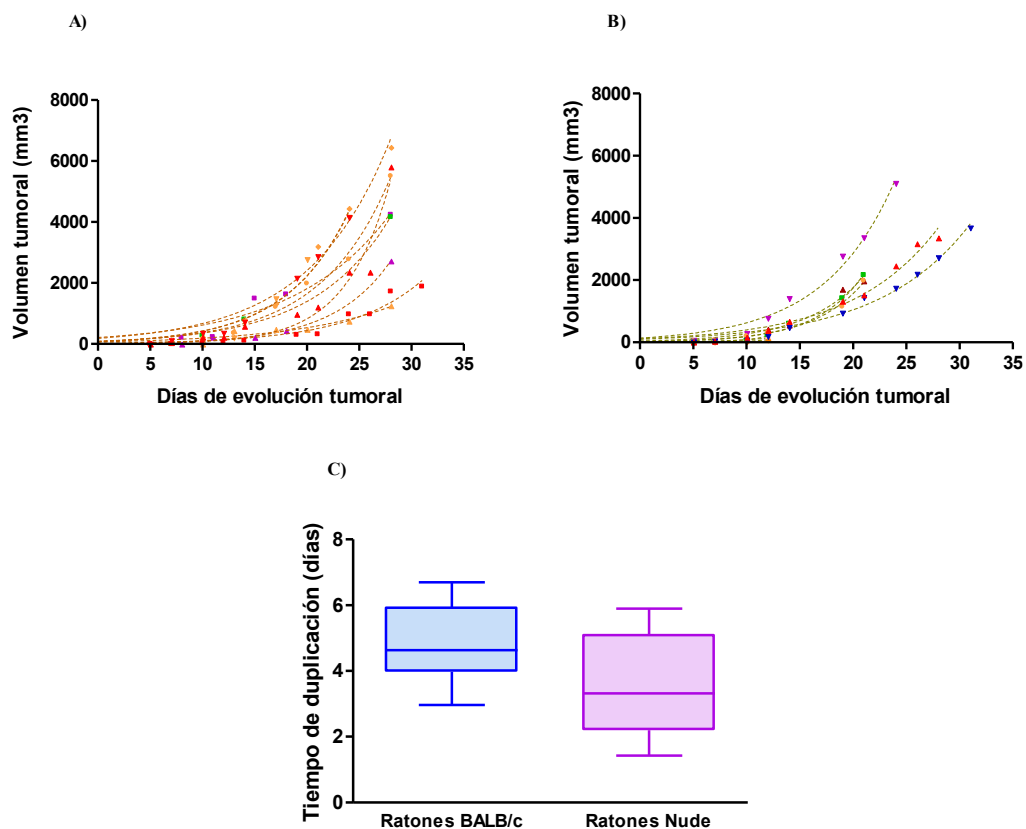


Figura 29. Crecimiento exponencial de M-234p en animales eutímicos y atímicos. Curvas de crecimiento individuales en ratones BALB/c (A) y en ratones nude (B). C) Tiempo de duplicación de M-234p en animales eutímicos y atímicos, test de Mann Whitney, n.s.

La expresión de Gal-1 en M-234p creciendo en ratones BALB/c mostró el mismo resultado similar al obtenido en el experimento mostrado en la Fig. 22A, es decir un descenso significativo a lo largo del crecimiento tumoral ($p < 0,01$) (Fig. 30A). Por el contrario, la expresión de Gal-1 en los ratones *nude* no sufrió modificaciones significativas durante la progresión tumoral. El descenso transitorio observado en el día 20 no fue significativo (Fig. 30B). En bazo sólo fue cuantificable en los animales eutímicos.

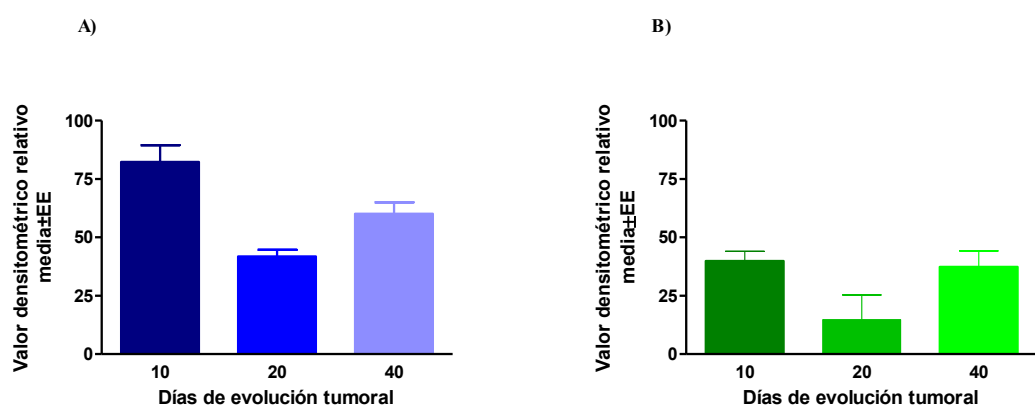


Figura 30. Expresión de Gal-1 en M-234p de animales eutímicos y atímicos. Se prepararon extractos proteicos de tumor primario en (A) ratones BALB/c y (B) ratones *nude* y se procesaron por *Western Blot*. El procedimiento fue el mismo que el indicado en la Fig. 9. Se presenta la media ± EE del valor densitométrico relativo. (A) $p < 0,01$; ANOVA (B) ANOVA n.s.

Se analizó la relación existente entre el volumen tumoral y la expresión de Gal-1 en ratones BALB/c y se encontró una correlación no significativa, $r = -0,4923$; $p = 0,1782$ (Fig. 31A). De igual manera, la correlación entre las mismas variables para M-234p creciendo en ratones *nude* fue no significativa, siendo $r = 0,0141$ y $p = 0,9712$ (Fig. 31B).

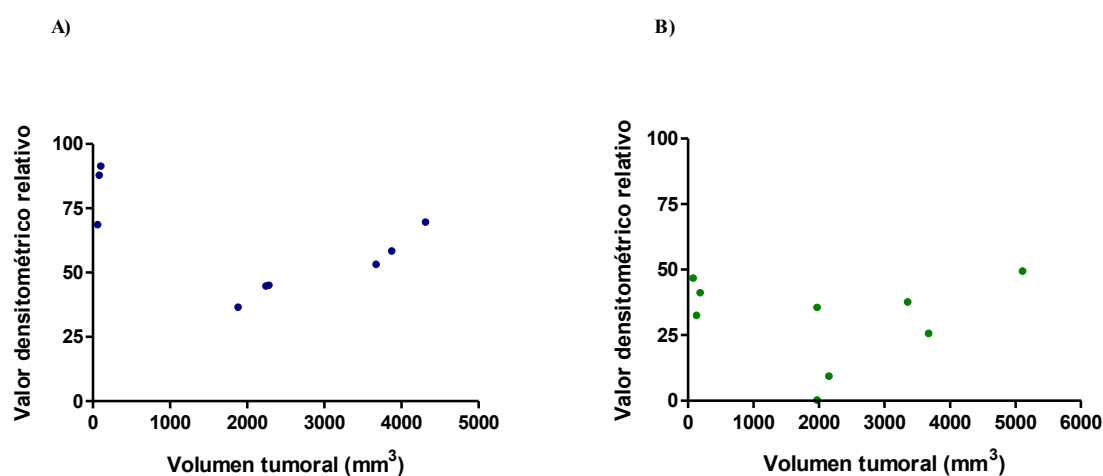


Figura 31. Correlación entre volumen tumoral y expresión de Gal-1 para M-234p en animales eutímicos y atímicos. A) M-234p en ratones BALB/c: $r = -0,4923$; $p = 0,1782$. B) M-234p en ratones *nude*: $r = 0,0141$; $p = 0,9712$.

4.15. Vías de transducción de señales implicadas en la modulación de Galectina-1

Se ha demostrado concluyentemente que la expresión de Gal-1 por parte del tumor es un factor clave en el mecanismo de escape tumoral. La evasión de la respuesta inmune se lograría generando, en el entorno de la masa tumoral, una malla inmunoprotectora rica en Gal-1, la cual elimina, en parte, la respuesta inmune celular

(van den Br le FA, 2001). Dada la importancia de la expresión de Gal-1 por el tumor en la historia de su evolución posterior se decidió estudiar las vías de señalización intracelulares que llevan a la expresión de Gal-1 en las células tumorales, y así dilucidar cuáles moléculas estarían involucradas en este fenómeno y cuáles serían sensibles a la acción de Cy en dosis baja y  nica.

Se estudiaron las vías de señalización que conducen a la expresión de Gal-1 utilizando distintos inhibidores: Sulfasalazina (SZ), droga que inhibe NF- B (factor nuclear de la cadena liviana   de inmunoglobulina de las células B), Rapamicina (Rapa), compuesto utilizado para inhibir mTOR (blanco molecular de rapamicina), y SB20219 (SB), inhibidor de p38-MAPK (proteína quinasa p38 activada por mitógenos). Se prepararon suspensiones de células tumorales primarias y metast ticas de L-TACB y se incubaron con cada uno de los inhibidores en forma individual o con el agregado de Maf durante 96 h a 37 C. Luego se prepararon homogenados proteicos y se determinó por *Western Blot* la expresión de Gal-1. La incubación de células tumorales primarias con SZ, Rapa o SB produjo inhibición de la expresión de Gal-1. Sin embargo, la incubación conjunta con Maf revirtió parcial o totalmente esa inhibición (Fig. 34A). Siguiendo la misma tendencia, aunque con menor intensidad, la incubación de las células metast ticas con SZ, Rapa o SB produjo inhibición de la expresión de Gal-1. Por lo tanto, la expresión de Gal-1 en células metast ticas es menos sensible a la acción de SZ, Rapa y SB que las células tumorales primarias. De manera semejante a lo observado con las células tumorales primarias, el agregado de Maf anuló la inhibición causada por SZ y, por el contrario, aumentó la inhibición de la expresión de Gal-1 producida por Rapa y SB (Fig. 32B).

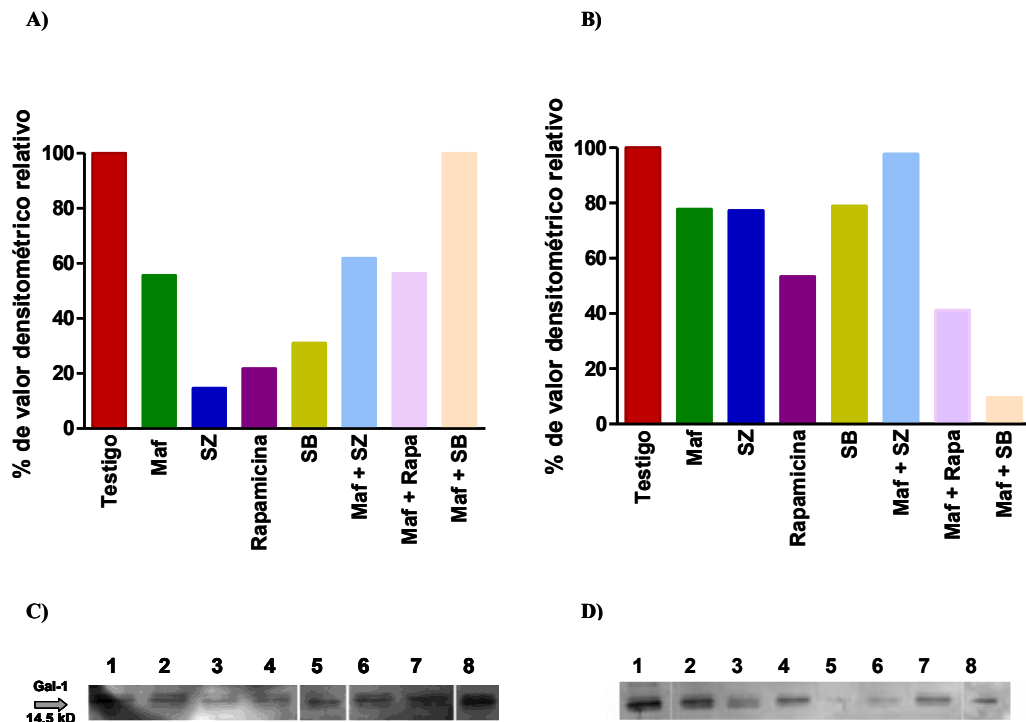


Figura 32. Modulación de la expresión de Gal-1 con inhibidores de vías de transducción de señales. Se prepararon extractos proteicos de las células de tumor primario (A) y metástasis (B), incubadas con los distintos inhibidores y se procesaron por *Western Blot*. El procedimiento fue el mismo que el indicado en la Fig. 9. Las bandas indicadas con la flecha fueron semi-cuantificadas por densitometría. Se presenta la mediana del % del valor densitométrico relativo. (C) y (D) placas radiográficas de tumor primario y metástasis, respectivamente. Calle 1: testigo, 2: Maf 3: SZ, 4: Rapa, 5: SB, 6: Maf + SZ, 7: Maf + Rapa, 8: Maf + SB. Se realizó un control de carga por tinción de los geles con Coomassie blue y tinción de las membranas con Ponceau S.

4.16. Estudio de las poblaciones linfocitarias reguladoras de la respuesta antitumoral

4.16.1. Células T reguladoras

Previamente, se demostró que el tratamiento con dosis bajas de Cy de animales portadores de L-TACB tenía un profundo efecto inmunomodulador, induciendo un cambio en el perfil de citoquinas T_H2 (IL-10; TGF- β) hacia un perfil T_H1 (IL-2; IFN- γ). Por otra parte, actualmente se acepta que las células T reguladoras (Tregs) estarían involucradas en la supresión de la respuesta inmune antitumoral. Por ello, se decidió estudiar el efecto de Cy sobre esta subpoblación linfocitaria. Se desafiaron ratas *e* con el linfoma L-TACB vía s.c (día 0). En el día 14 los animales se distribuyeron en dos grupos: 1) Testigos: se inocularon con solución fisiológica i.p.; 2) Tratados: se inocularon con Cy vía i.p. (10 mg/kg de peso) Se tomaron muestras de sangre

periférica en los días 0, 14 y 21, y se procesaron para la determinación por citometría de flujo de los marcadores linfocitarios CD4, CD25, CTLA-4, Foxp3 e IL-10. En los animales testigo se observó, en el día 21, un aumento en el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ con respecto al día 0 [mediana (rango); día 0: 0,04 (0-0,05) vs. día 21: 0,38 (0,23-1,44); p<0,01] (Fig. 33A), mientras que en los animales tratados no se produjo modificación en dicho porcentaje [día 0: 0,07 (0,04-0,12) vs. día 21: 0,27 (0,06-0,94); n.s.] (Fig. 33B). La subpoblación de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ aumentó su porcentaje a lo largo del experimento, tanto en el grupo testigo (Fig. 33C) como en el tratado (Fig. 33D), siendo significativamente mayor el valor obtenido en el día 21 que el del día 0 (p<0,01 y p<0,05, respectivamente). Sin embargo, estos incrementos fueron diferentes ya que, en el día 21, el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ correspondiente al grupo tratado fue significativamente menor que el del grupo testigo [0,23 (0,03-1,13) vs. 1,13 (0,29-3,27); p<0,01]. Al mismo tiempo, la población CD4⁺CD25⁺IL-10⁺ aumentó su porcentaje en el grupo testigo [día 0: 0,27 (0,1-1,03) vs. día 21: 6,3 (0,97-7,35); (p<0,05)] (Fig. 33E), pero no se modificó en el grupo tratado [día 0: 0,72 (0,5-0,93) vs. día 21: 0,73 (0,23-4,3); n.s.] (Fig. 33F). En el día 21, en el grupo tratado se observó una disminución marginalmente significativa en el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺IL-10⁺ séricas.

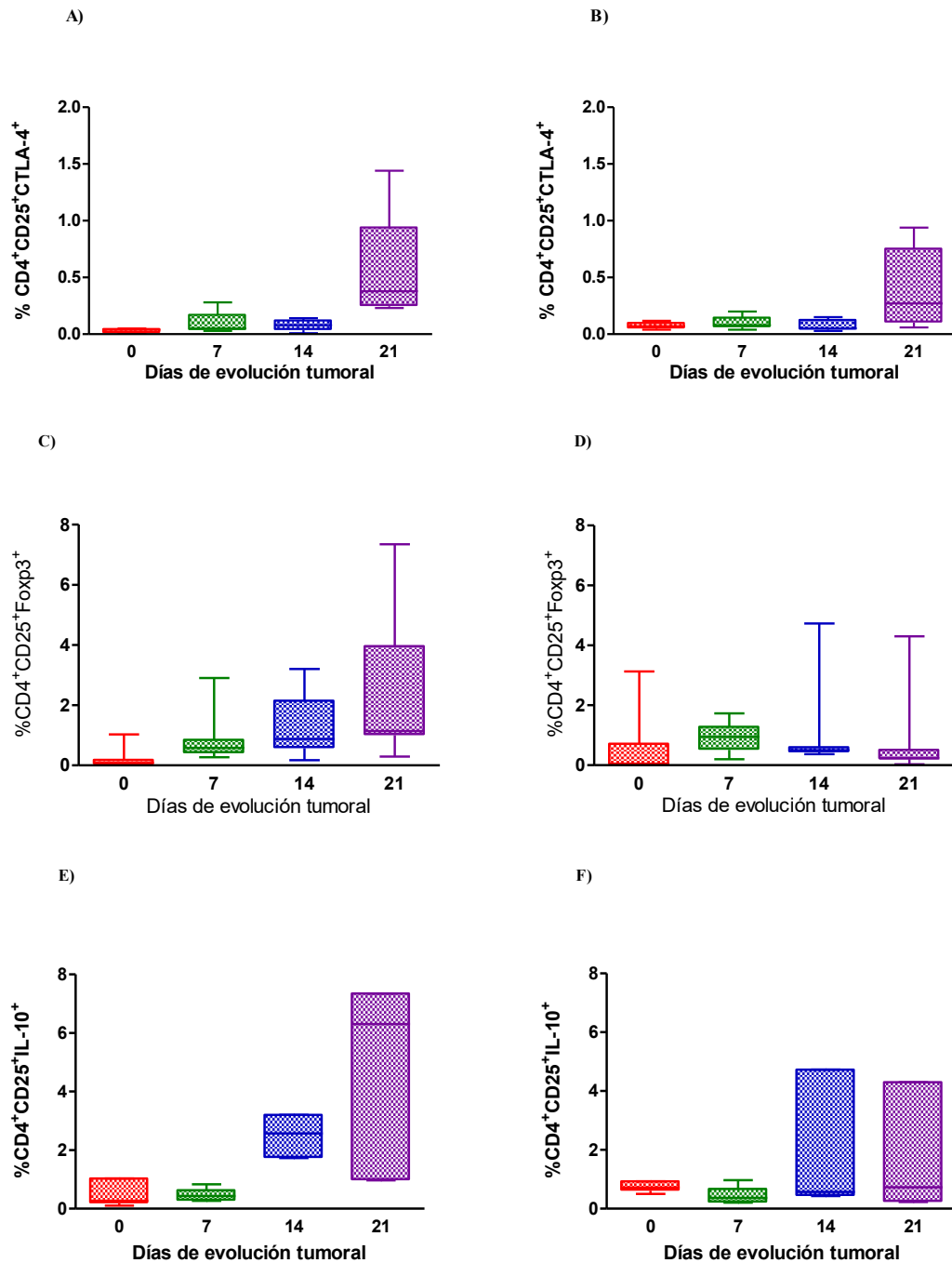


Figura 33. Modulación de células Tregs durante el crecimiento tumoral. Se marcaron las células mononucleares de sangre periférica para determinar distintas poblaciones de células reguladoras y se cuantificaron por citometría de flujo. Se presenta la mediana del % de células positivas. **Células CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺:** **A)** testigos: $p < 0,01$ (Test de Friedman), **B)** tratados: n.s. (Test de Friedman); Día 21: testigos vs tratados, n.s. (Test de Mann-Whitney). **Células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺:** **C)** testigos: $p < 0,01$ (Test de Friedman), **D)** tratados: $p < 0,05$ (Test de Friedman); Día 21: testigos vs tratados, $p < 0,01$ (Test de Mann-Whitney). **Células CD4⁺CD25⁺IL-10⁺:** **E)** testigos: $p < 0,05$ (Test de Friedman), **F)** tratados: n.s. (Test de Friedman); Día 21: testigos vs tratados: marginalmente significativa ($p = 0,0571$) (Test de Mann-Whitney).

En experimentos anteriores, en los que se desarrolló un modelo experimental idéntico al descrito en esta sección, se determinaron los niveles de citoquinas séricas T_H1 y T_H2 . Esos datos se utilizaron para graficar la variación en forma conjunta de la secreción de esas citoquinas y de los porcentajes de las células reguladoras naturales ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) e inducibles ($CD4^+CD25^+IL-10^+$) durante la evolución tumoral y luego del tratamiento con Ciclofosfamida. Se observó que la concentración sérica de IL-10 (citoquina T_H2) aumenta durante la evolución tumoral, al igual que lo hacen las células Tregs naturales y que luego del tratamiento con Cy disminuyen significativamente ambos parámetros (Fig. 34). Por otro lado, mientras la concentración sérica de las citoquinas T_H1 IL-2 e INF- γ disminuye durante la evolución tumoral y aumenta significativamente luego del tratamiento con Cy, regresando a los valores basales, las células Tregs presentan el comportamiento opuesto (Fig. 35).

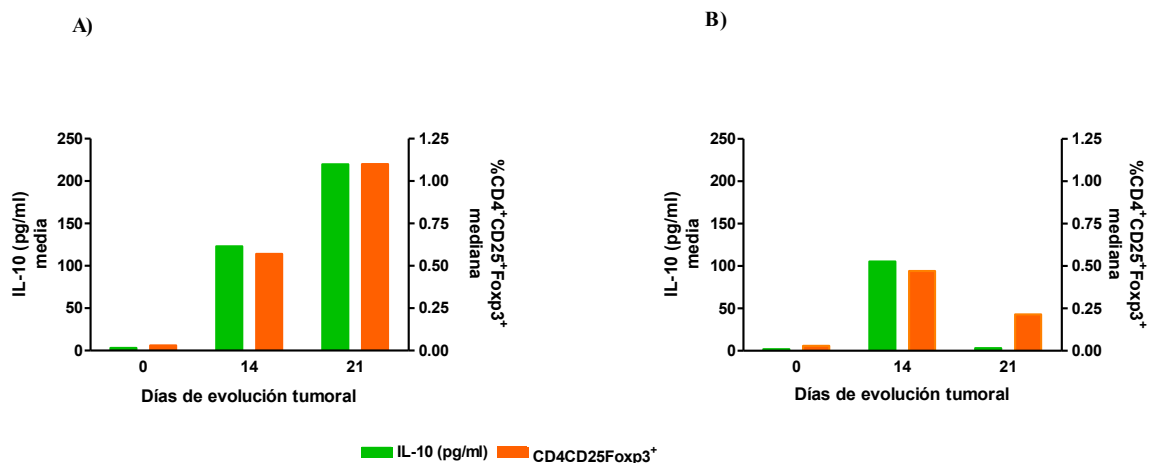


Figura 34. Co-evolución de la concentración sérica de IL-10 y de células Tregs naturales durante el crecimiento tumoral. (A) Animales portadores de L-TACB testigo; (B) animales portadores de L-TACB tratados con Cy (10 mg/kg) en el día 14.

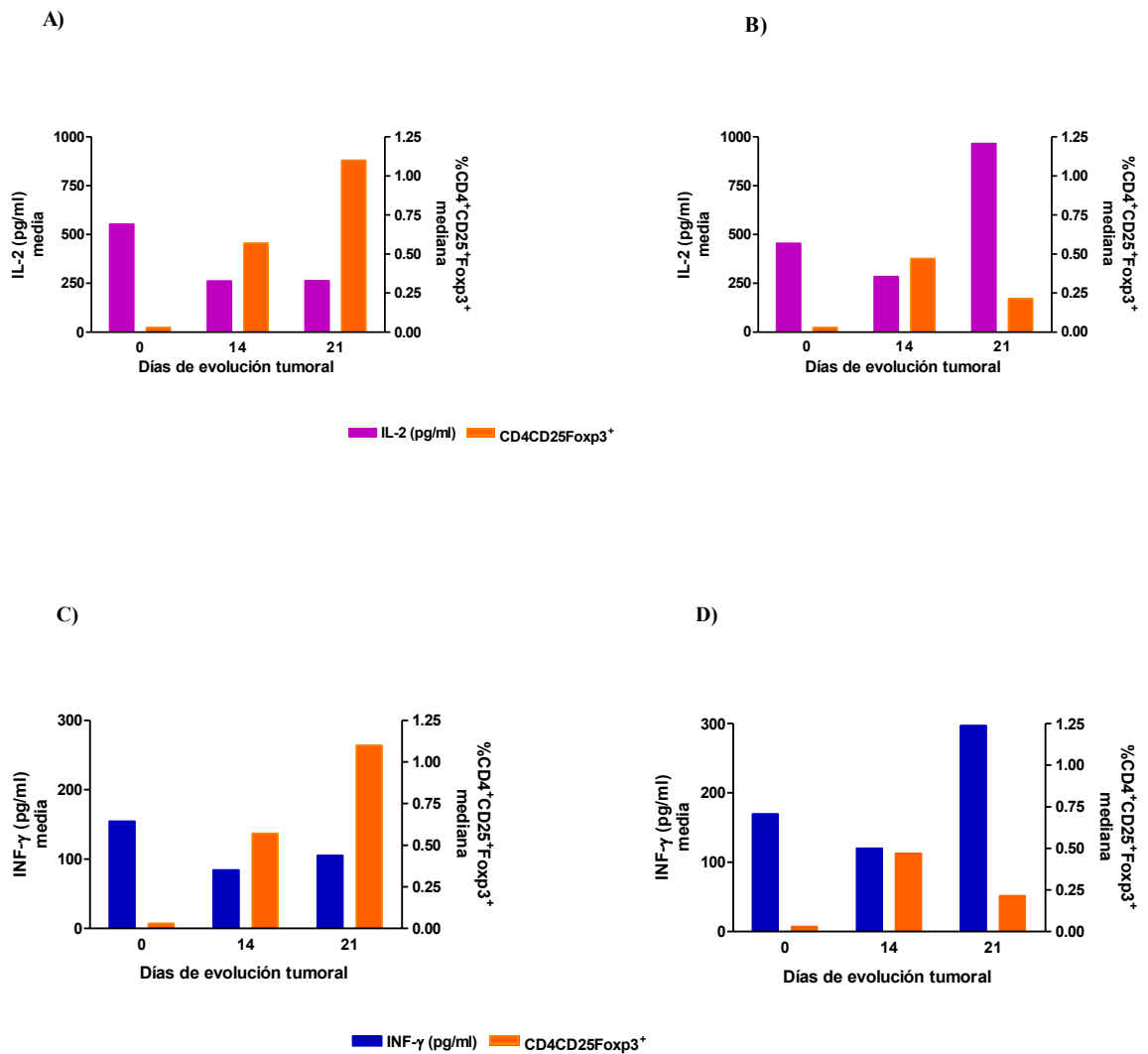


Figura 35. Co-evolución de la concentración sérica de citoquinas TH1 y de células Tregs naturales durante el crecimiento tumoral. (A) y (B) Concentración sérica de IL-2 y células Tregs naturales en animales portadores de L-TACB testigo y tratados con Cy (10 mg/kg) en el día 14, respectivamente. (C) y (D) Concentración sérica de INF-γ y células Treg naturales en animales portadores de L-TACB testigo y tratados con Cy (10 mg/kg) en el día 14, respectivamente.

El mismo tipo de comparación mostrado en la Fig. 34 y 35, realizado esta vez con los niveles de IL-10 sérica y el % de células Tregs inducibles (Fig. 36 y 37), arrojó resultados similares a los descritos para las células Tregs naturales.

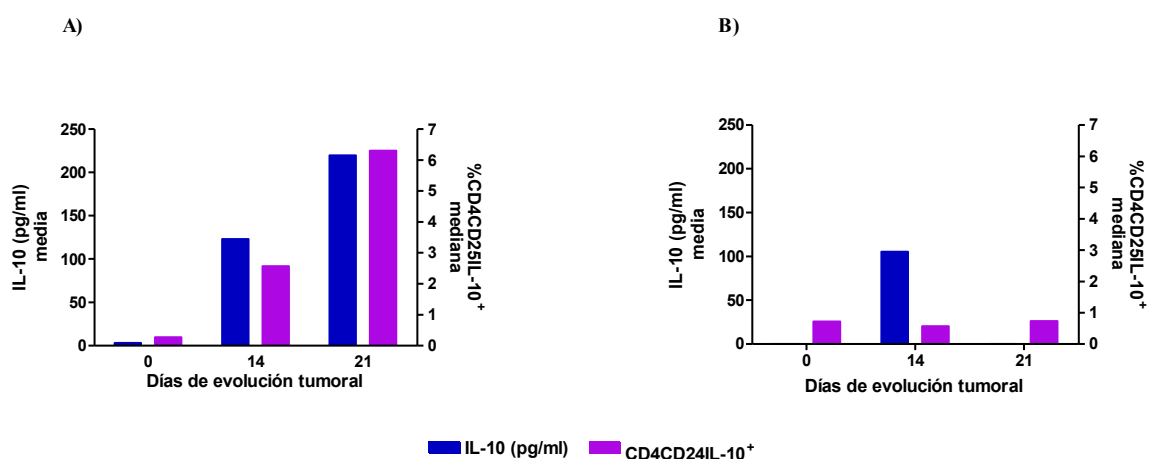


Figura 36. Co-evolución de la concentración sérica de IL-10 y de células Tregs inducibles durante el crecimiento tumoral. (A) Animales portadores de L-TACB testigo; (B) animales tratados con Cy (10 mg/kg) en el día 14.

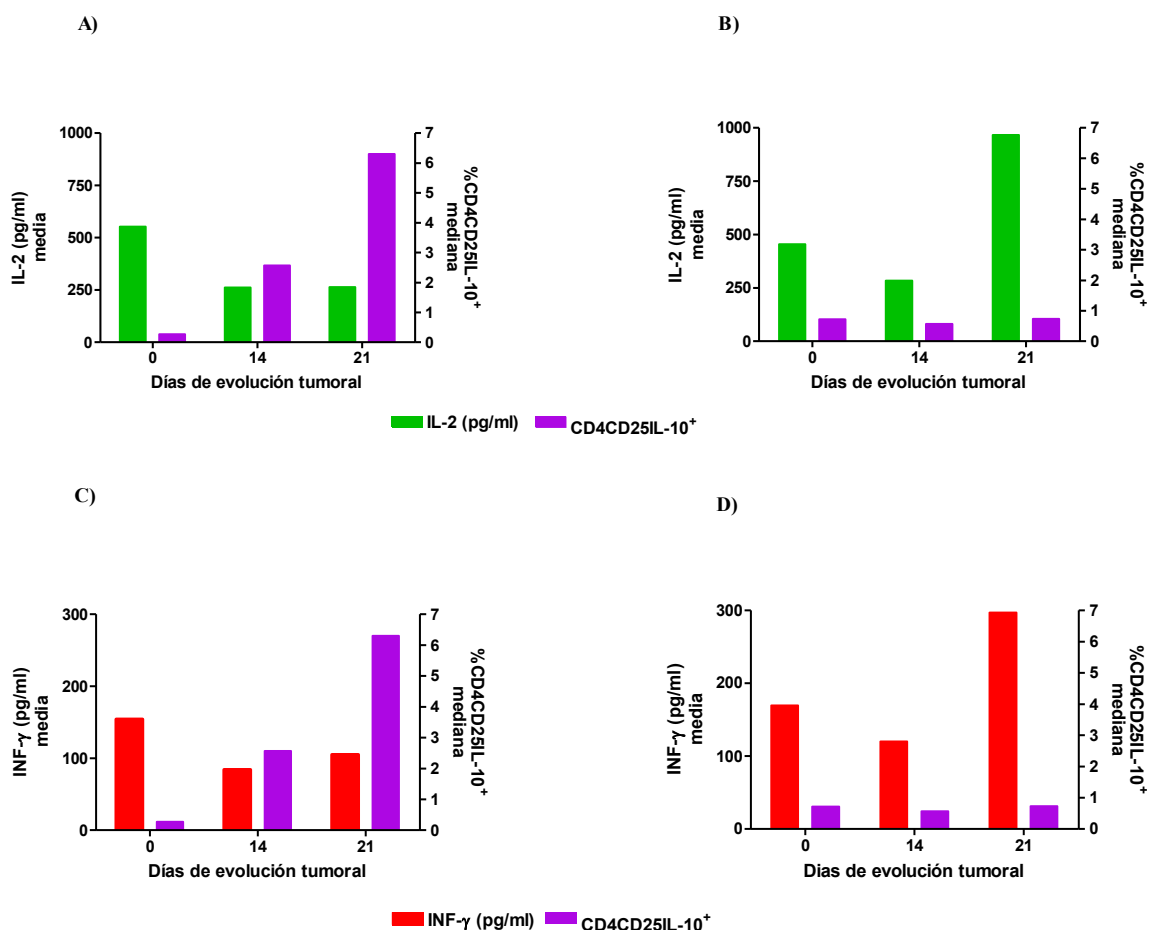


Figura 37. Co-evolución de la concentración sérica de citoquinas TH1 y de células Tregs inducibles durante el crecimiento tumoral. (A) y (B) Concentración sérica de IL-2 y células Tregs inducibles en animales portadores de L-TACB testigos y tratados con Cy (10 mg/kg) en el día 14, respectivamente. (C) y (D) Concentración sérica de INF-γ y células Tregs inducibles en animales portadores de L-TACB testigo y tratados con Cy (10 mg/kg) en el día 14, respectivamente.

4.16.2. Células NKT I

Las células NKT co-expresan marcadores de células T y NK. Se han descrito dos poblaciones: células NKT tipo I, que favorecen la respuesta inmune antitumoral y NKT II que suprimen esta respuesta. Habiendo estudiado la modulación de las células Tregs durante el crecimiento tumoral y el tratamiento con una dosis antimetastásica de Cy, interesó estudiar si la población de células NKT I estaba involucrada en la evasión tumoral de la respuesta inmune y/o en el efecto terapéutico de una dosis baja de Cy.

Tratamiento con una dosis antimetastásica de Cy. Los animales se desafiaron con el linfoma L-TACB y al día 14 del crecimiento tumoral se aplicó una dosis única y baja de Cy de 10 mg/kg de peso. Se tomaron muestras de sangre en distintos días pre y post-tratamiento y se cuantificaron las células NKT I circulantes por citometría de flujo. Se observó un aumento de las células NKT I desde el día 0 al 7 ($p < 0,01$, test de Wilcoxon), mientras que al día 14 ese valor había retornado al nivel basal (Fig. 38A). En el grupo de animales tratados, el porcentaje de las células NKT I siguió un comportamiento similar al del grupo testigo sin observarse, en el día 21 luego del tratamiento con Cy, modulación alguna de dicha población (Fig. 38B). En la Figura 39 se muestra la co-variación de células Tregs naturales y NKT I durante el crecimiento tumoral. Se observa claramente la diferencia en el comportamiento pre- y post-tratamiento para ambas poblaciones celulares. Durante la evolución tumoral, las células Tregs y las NKT I aumentaron hasta el día 7. Luego, se observó un comportamiento diferente en ambos tipos celulares: las células Tregs continuaron aumentando hacia el día 14 mientras que las NKT I disminuyeron. En el día 14 se realizó el tratamiento con Cy el cual produjo en el día 21 disminución de las células Tregs, mientras que no modificó el porcentaje de células NKT I.

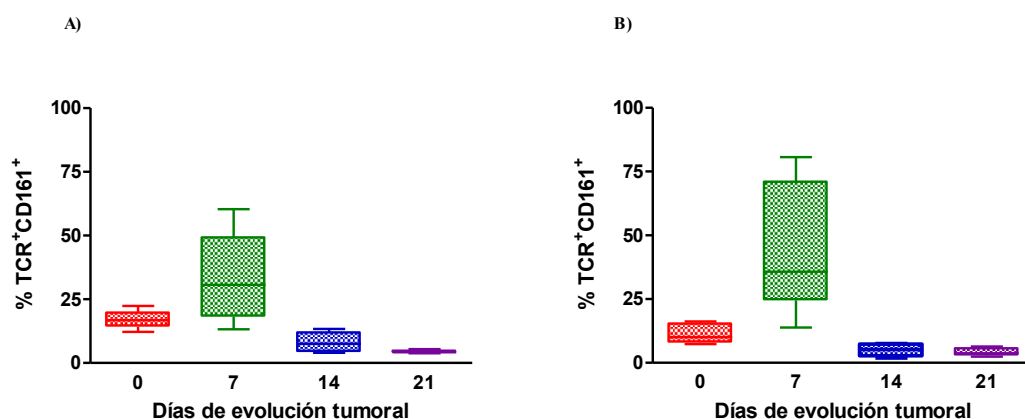


Figura 38. Modulación de células NKT I durante el crecimiento tumoral y el tratamiento con una dosis antimetastásica de Cy. Se marcaron las células mononucleares de sangre periférica con los anticuerpos anti-TCR y anti-CD161 y se cuantificaron por citometría de flujo. Se presenta la mediana del % de células positivas. **A)** Testigos: $p < 0,05$, **B)** tratados: $p < 0,01$ (Test de Friedman). Día 21: testigos vs. Tratados: n.s. (Test de Mann-Whitney).

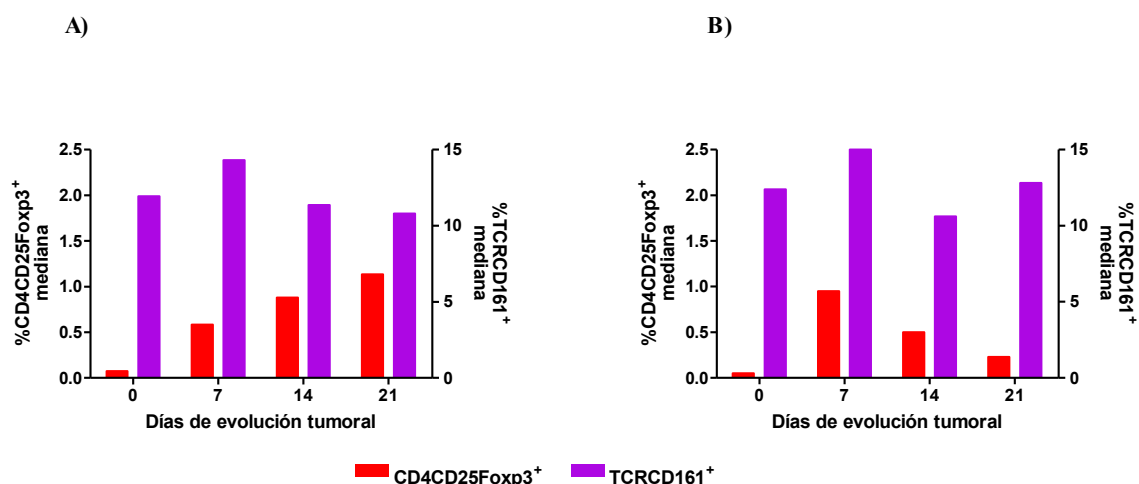


Figura 39. Co-evolución de las poblaciones celulares Treg naturales y NKT I. Se muestra la evolución conjunta de las células Tregs naturales y NKT I en: **A)** animales testigo y **B)** en animales tratados con Cy

Tratamiento con una dosis antitumoral de Cy. Dada la ausencia de modulación de la población de células NKT I por la dosis antimetastásica de Cy se quiso averiguar si esa falta de respuesta se debía a las características del modelo tumoral con el que se trabajaba o si ese comportamiento estaba relacionado con la dosis administrada de la droga. En ensayos anteriores se había determinado que una dosis baja y única de Cy de 20 mg/kg de peso inhibía el desarrollo de tumores primarios en animales

portadores del linfoma L-TACB. Por ello, se desafiaron las ratas con el linfoma L-TACB y al día 14 del crecimiento tumoral se aplicó una dosis única y baja de Cy de 20 mg/kg de peso. Se tomaron muestras de sangre en distintos días pre y post-tratamiento y se cuantificaron las células NKT I por citometría de flujo. En el grupo de los animales testigo, con los que se procedió de igual manera que en el experimento anterior, se observó la misma tendencia en la variación de los % de células NKT I circulantes, pero sin encontrar diferencias significativas entre el día 0 y el 7. Este resultado podría atribuirse a variancia de vueltas de un mismo experimento. En el grupo de animales tratados se observó una tendencia al aumento del % sérico de esta población celular ($p=0,0974$, test de Mann Whitney) (Fig. 40).

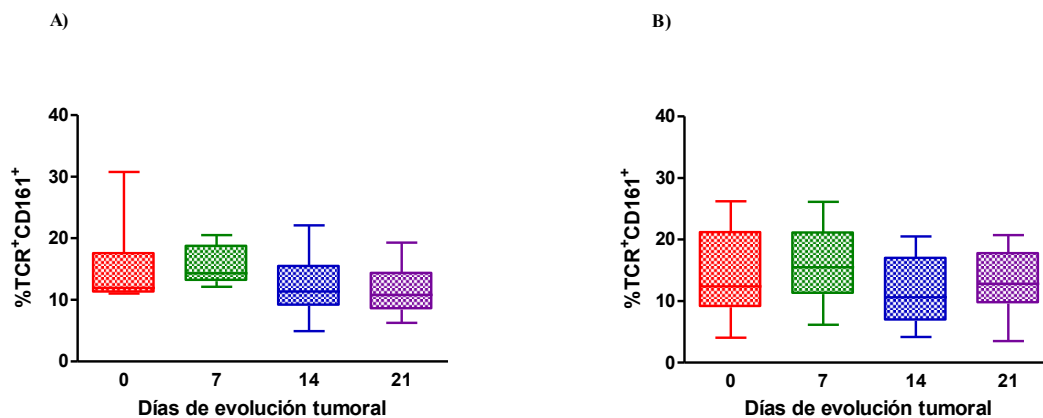


Figura 40. Modulación de células NKT I durante el crecimiento tumoral y el tratamiento con una dosis antitumoral de Cy. Se marcaron las células mononucleares de sangre periférica con los anticuerpos anti-TCR y anti-CD161 y se cuantificaron por citometría de flujo. Se presenta la mediana del % de células positivas. **A)** Testigos: n.s., **B)** tratados: n.s., (ANOVA).

Un resultado interesante se evidenció cuando se compararon los resultados obtenidos en los dos experimentos en los que se trató a los animales con dosis antimetastásica y antitumoral de Cy. El % de células NKT I obtenidas en el día 21, 7 días después de administrar la dosis antitumoral de Cy fue significativamente mayor que el obtenido en el mismo día con la dosis antimetastásica ($p<0,01$, test de Mann Whitney) (Fig. 41).

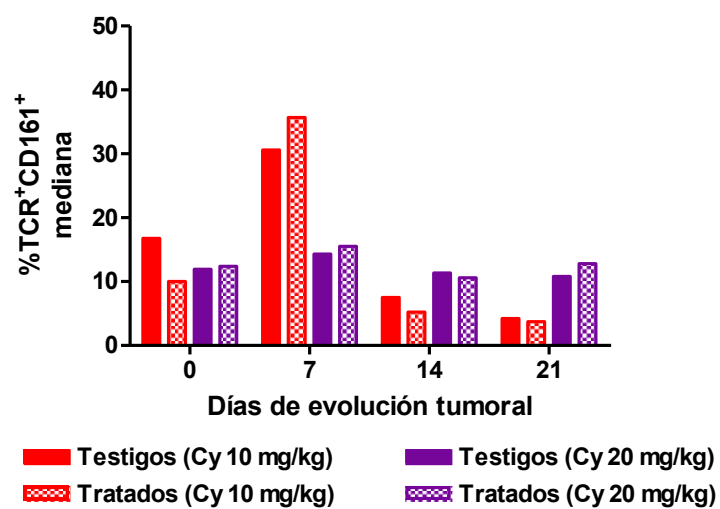


Figura 41. Modulación de la células NKT I con diferentes dosis de Cy durante la evolución del linfoma L-TACB. Día 21: Grupo Cy 10 mg/kg vs grupo Cy 20 mg/kg, $p < 0,01$ (test de Mann Whitney).

5. Discusión y Conclusiones

Clínicamente, el cáncer no es una enfermedad única sino un conjunto de más de cien enfermedades que se originan en distintos tejidos del organismo y que difieren en su tasa de crecimiento, incidencia de acuerdo a la edad y sexo, detectabilidad diagnóstica, respuesta a los tratamientos y pronóstico, entre otras características. Desde el punto de vista de la biología celular y molecular, se trata de un grupo de enfermedades causadas por genes defectivos cuyos productos proteicos alterados, aumentados o ausentes, perturban una serie de señales intracelulares responsables de la conducta celular.

A pesar de que se han propuesto diversas definiciones del cáncer, aún resulta difícil establecer una que sea precisa, debido a las diferencias que existen entre las variantes de esa enfermedad y sus diferentes estadios, que pueden darse en cualquier ser vivo multicelular, y a los diferentes enfoques desde los cuales puede analizarse. Tradicionalmente, se dice que el cáncer es un crecimiento relativamente autónomo de células que proliferan sin respetar los mecanismos de control normales, que invaden tejidos normales adyacentes y que, en algunas ocasiones, se diseminan a órganos distantes del de origen. Robert Weinberg ha definido ciertas características esenciales para que una célula pueda considerarse cancerosa, tales como poseer alteraciones a nivel de su ADN, proliferar indefinidamente, evadir el programa de muerte celular o apoptosis, producir sus propios factores de crecimiento o crecer en presencia de baja concentración de dichos factores, y crear su propia red vascular (angiogénesis) para su oxigenación y provisión de nutrientes (Ellis LM, 1996, Carmeliet P, 2000). A las características anteriores, se suman dos consideradas imprescindibles para que un tumor se convierta en maligno: la capacidad de invadir tejidos vecinos luego de desprenderse del sitio en que se originó primariamente y la de diseminarse y crecer en órganos distantes (fenómeno de metástasis). En el camino de conversión de la célula normal en cancerosa existen etapas intermedias en las cuales el fenotipo celular no corresponde al de normalidad ni al de malignidad, de acuerdo a las características definidas anteriormente. En este caso, se habla de “células transformadas” que, en

modelos animales experimentales, son incapaces de generar un crecimiento tumoral (Ruddon R W, 1995).

El cáncer es una enfermedad genética con alta incidencia en nuestro país y en el mundo entero. Según previsiones de la Organización Mundial de la Salud (OMS, www.who.int), la incidencia mundial del cáncer podría aumentar un 50% en las próximas dos décadas. En el último Informe Mundial del Cáncer de la OMS, del año 2003, se predice que para el año 2020 se diagnosticarán 15 millones de casos nuevos. Esta tendencia se explicaría por un profundo cambio en los estilos de vida, que incorporaron hábitos poco saludables en los que se destacan dietas con altos contenidos calóricos y de grasas, el sedentarismo y el tabaquismo. En el año 2000, los tumores malignos fueron responsables del 12% de las aproximadamente 56 millones de muertes ocurridas en el mundo entero.

A pesar de los grandes esfuerzos volcados hacia la investigación tanto básica como clínica en los últimos tiempos, especialmente en el último cuarto del siglo XX y en lo que va del XXI, los logros obtenidos en cuanto a la prevención, tratamiento y cura de esta enfermedad no han dado los resultados esperados, aunque sí se han logrado mejoras. Por lo tanto, resulta necesario tener un mayor entendimiento de las causas tanto ambientales como genéticas que llevan al desarrollo del cáncer y que afectan a su progresión, lo que facilitaría significativamente la terapia oncológica. Además, la necesidad de lograr terapias que se asemejen al concepto de bala mágica que Paul Ehrlich postuló a principios del siglo pasado, todavía sigue vigente.

La mayor parte de los conocimientos obtenidos acerca de la biología de los tumores y de las metástasis proviene de ensayos en sistemas experimentales, generalmente no humanos. A su vez, esos conocimientos adquiridos han servido y sirven, actualmente, para plantear nuevas estrategias orientadas al tratamiento del cáncer humano. Para ello, se utilizan sistemas tanto *in vitro* como *in vivo*. En el primero de los casos, se emplean líneas celulares inmortalizadas derivadas de tumores animales o humanos que se mantienen en cultivo en el laboratorio. Si bien este sistema tiene la enorme ventaja de permitir el estudio de cada elemento integrante o factor participante por

separado, para luego analizar la importancia de su participación en el conjunto del proceso tumoral, posee la desventaja de no estar integrado por todos los elementos celulares y tisulares de cuya interacción resulta el crecimiento tumoral en el organismo. En los modelos *in vivo*, por su parte, suelen utilizarse tumores animales surgidos en forma espontánea o inducidos por carcinógenos químicos, físicos o virales. Por lo general, dichos tumores suelen mantenerse por trasplantes seriados en animales singeneicos con aquél en el que se originaron. Este tipo de modelo posee la gran desventaja de que carece de las etapas de iniciación y promoción tumorales, y quizás, el inicio de la progresión, y de que genera el crecimiento de un tumor en un huésped normal que, en la mayoría de los casos, no presentaba un ambiente interno preparado para gestar un proceso carcinogénico. Otra variante del modelo *in vivo* consiste en el examen de tumores autóctonos, es decir, aquellos que surgen en forma espontánea o inducida en cada individuo, sin mediar trasplante. Los modelos *in vivo* que involucran animales singeneicos entre sí poseen la ventaja de permitir el estudio del cáncer en poblaciones genéticamente homogéneas, por lo que la variabilidad individual es mínima. Por su parte, los animales exocriados (genéticamente diferentes entre sí) se asemejan a las poblaciones humanas por el hecho de presentar características individuales y tumores que difieren de hospedador a hospedador; sin embargo poseen la desventaja de que debe utilizarse un gran número de animales en cada experimento para obtener resultados concluyentes. Otra alternativa es el estudio de tumores humanos en sistemas xenogeneicos. En estos casos suelen utilizarse animales inmunodeficientes, tales como los ratones *nude* (congénitamente atímicos) o los SCID (con inmunodeficiencia combinada severa), como receptores de implantes de tumores que pueden derivar de cultivos primarios de cánceres humanos, de líneas inmortalizadas derivadas de ellos, o directamente de biopsias de pacientes. Los animales que obran como hospedadores son incapaces de reconocer y rechazar tejidos de otras especies que portan antígenos de histocompatibilidad diferentes a los propios (Bonfil RD, 2002).

Los tumores han elaborado distintas estrategias para evadir una respuesta inmune efectiva. Se asume que la rama de la respuesta inmune adaptativa correspondiente a las células T citotóxicas CD8⁺, restringidas por las moléculas de clase I del Complejo

Mayor de Histocompatibilidad (MHC), está mejor equipada para reconocer el tumor como extraño e iniciar la cascada de eventos que resultan en la destrucción tumoral. En la actualidad, se han identificado diversos mecanismos posibles de escape tumoral al rechazo inmunológico. Entre ellos se pueden citar: a) mecanismos relacionados con la expresión de antígenos tumorales tales como: falta de antigenicidad, desprendimiento de antígenos, modulación antigénica y enmascaramiento de las moléculas de superficie; b) mecanismos relacionados con la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de Clase I y II; c) ausencia de moléculas coestimuladoras; d) inducción de tolerancia; e) expresión de moléculas que inducen apoptosis tales como Galectina-1, o la regulación negativa de Fas; f) factores inmunosupresores tales como anticuerpos o factores supresores y células supresoras. Cualquiera de estos mecanismos favorece la proliferación de las células tumorales, dando como resultado la progresión tumoral (Gilboa E, 1999; Pawelec G, 1999; Bonfil RD, 2002).

La respuesta inmune está regulada por dos tipos de células T *helper* CD4⁺, T_{H1} y T_{H2}, las cuales producen dos grupos de citoquinas con propiedades marcadamente diferentes. Mientras las citoquinas de tipo 1 (IL-2, IFN- γ , etc.) están involucradas en las reacciones inmunes mediadas por células, las cuales son esenciales para una efectiva respuesta antitumoral, las de tipo 2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) se encuentran comúnmente asociadas con fuertes respuestas humores que producen facilitación del desarrollo tumoral. Se sabe que las respuestas T_{H1} y T_{H2} se regulan de una manera recíproca, ya que el IFN- γ inhibe las células T_{H2}, mientras que la IL-10 inhibe las células T_{H1} (Mosmann TR, 1996). Basadas en esta característica, se han propuesto diferentes modalidades terapéuticas que tienen como objetivo inducir un cambio en el perfil de citoquinas de forma tal que permita generar una respuesta antitumoral mediada por células.

Interleuquina 10 (IL-10) es una citoquina anti-inflamatoria que interviene en la regulación de la respuesta inmune, inhibe la síntesis de citoquinas por células T activadas, células NK y monocitos/macrófagos, y bloquea la actividad de macrófagos como célula presentadora de antígenos. Esta citoquina es producida por distintos tipos

celulares, como linfocitos T y B, macrófagos y queratinocitos. Además de inhibir la producción de citoquinas tipo 1, IL-10 inhibe un amplio rango de funciones inmunológicas como la producción de citoquinas proinflamatorias por el macrófago (IL-1, TNF- α , GM-CSF), la presentación antigénica a través de la inhibición de la expresión de moléculas MHC de clase II en monocitos y macrófagos, y la proliferación de linfocitos T inducida por antígenos o mitógenos. Por lo tanto, la producción aumentada de IL-10 estaría asociada al estado de inmunosupresión característico del huésped portador de un tumor (Howard M, 1992; Kawamura K, 2002). Recientemente, se ha demostrado que, además de las células del huésped, las células de algunos tipos de tumores pueden producir IL-10, tales como células de melanoma, carcinoma de pulmón y ciertos tipos de linfomas (Chen Q, 1994; Kim J, 1995; Dummer W, 1996; Yue FY, 1997; Asselin-Paturel C, 1998; Bohlen H, 2000). La sobreproducción tumoral de citoquinas inmunosupresoras como IL-10, está considerada como uno de los mecanismos que emplean ciertos tumores para evadir el rechazo inmunológico (Gilboa E, 1999). Actualmente, los valores de IL-10 sérica se utilizan como factor pronóstico en pacientes portadores de melanomas o linfomas, ya que los niveles elevados están asociados con diseminación metastásica y mal pronóstico (Blay JY, 1993).

Las diversas actividades biológicas de IL-10 están mediadas a través de su unión a un receptor específico ubicado en la superficie celular (IL-10R). Los IL-10R murino, humano y de rata son miembros de la familia de receptores de citoquinas clase II (Ho A S-Y, 1993; Liu Y, 1994; Ward H, 2001). IL-10R está expresado principalmente en linfocitos T y B, células NK, monocitos y macrófagos (Donnelly RP, 1999).

En trabajos previos se encontró que el tratamiento antimetastásico con una dosis baja de Cy tenía como consecuencia una disminución en la producción de IL-10 por las células esplénicas del animal portador del tumor. También se demostró que el tratamiento producía una disminución en los niveles de IL-10 sérica de animales tratados en comparación con los de los no tratados (Matar P, 2001). Considerando la importancia de los efectos del sistema IL-10/IL10R sobre la respuesta inmune y teniendo en cuenta estos resultados, se planteó la hipótesis de que Cy podría también

ser capaz de regular la secreción y/o actividad de la IL-10 producida por las células tumorales. Por lo tanto, se propuso investigar los efectos *in vitro* de los metabolitos activos de Cy sobre la expresión de IL-10 y de su receptor específico tanto en células de tumor primario como en células metastásicas de L-TACB. Al mismo tiempo se estudió la acción de esta droga sobre la proliferación de ambos tipos celulares.

Como se observa en la Fig. 6, Maf disminuyó la proliferación, de las células metastásicas, no ocurriendo lo mismo con las células de tumor primario, en las que no se observó efecto alguno. Este comportamiento estaría de acuerdo con el efecto diferencial que tuvo la administración de Cy *in vivo* sobre el crecimiento de las células metastásicas (Matar P, 1995).

La cuantificación de IL-10 no mostró valores detectables en los medios condicionados provenientes de células tumorales, mientras que en los medios condicionados provenientes de células metastásicas los niveles de IL-10 fueron cuantificables y mayores en el grupo testigo que en los grupos incubados con las distintas dosis de Maf (Fig. 7). En este modelo experimental de linfoma, como en otros modelos de linfomas animales y humanos, IL-10 juega un rol central en la inhibición de la respuesta inmune antitumoral (Urosevic, M, 2003). Previamente, se demostró que el efecto antimetastásico del tratamiento con una dosis baja y única de Cy en ratas portadoras de L-TACB estuvo mediado por una inmunomodulación inducida por Cy, principalmente a través de la reducción de los niveles de IL-10 (Matar P, 2000; Matar P, 2001). Estudios posteriores indicaron que además de su actividad inmunosupresora, IL-10 podría actuar como un factor de crecimiento para las células metastásicas (Matar P, 2002). Se encontraron resultados similares en el modelo de melanoma de ratón B16, varias células de melanoma de ratón y tumores primarios y metástasis obtenidos de pacientes con melanoma (Yue FY, 1997; García-Hernández ML, 2002).

El amplio espectro de actividades biológicas de IL-10 está mediado por la unión a su receptor específico (IL-10R). Por lo tanto, fue importante el estudio de los cambios concomitantes en su expresión durante el tratamiento con Cy. Los resultados obtenidos mostraron que las células de tumor primario expresaron niveles menores de

IL-10R, que no fueron significativamente modificados por ninguna de las dosis utilizadas de Maf. Por el contrario, las células L-TACB metastásicas expresaron cantidades mayores de IL-10R que las células tumorales primarias y la incubación con Maf disminuyó su concentración en las dosis de 5-20 μ M (Fig. 8). Teniendo en cuenta que IL-10 induce la proliferación *in vitro* de células L-TACB metastásicas (Matar P, 2002) y que las células metastásicas expresan simultáneamente IL-10R y producen IL-10, podría establecerse un *loop* autocrino y/o paracrino de estimulación positiva la cual, en forma directa o indirecta, incrementaría la proliferación de las células metastásicas.

La disminución en la expresión de IL-10 y de IL-10R obtenida al incubar con las dosis de Maf 10 y 20 μ M superó en un 50%, aproximadamente, la inhibición de la proliferación celular causada por las mismas dosis de Maf. Por lo tanto, se puede asegurar que, independientemente de su efecto antiproliferativo, Mafosfamida actúa directamente sobre el sistema IL-10/IL-10R, inhibiendo su expresión.

En este trabajo, se demostró un efecto novedoso de los metabolitos activos de Cy sobre la expresión de IL-10 y su receptor específico en células de linfoma. Se observó que Mafosfamida, un derivado de la 4-hidroxíciclofosfamida, indujo una regulación negativa de la producción de IL-10 y de la expresión de IL-10R en células metastásicas y, al mismo tiempo, inhibió la proliferación de dichas células. Los resultados discutidos más arriba sugieren que Maf podría inhibir el *loop* regulatorio mediado por el sistema IL-10/IL-10R y, como consecuencia, la proliferación de las células metastásicas. Por lo tanto, ya que Maf produce *in vitro* los mismos metabolitos activos que Cy *in vivo*, se podría plantear la hipótesis de que Cy, *in vivo*, tendría un efecto similar al ejercido *in vitro* por Maf. En consecuencia, la inmunosupresión e inducción de la proliferación de las células metastásicas causadas por IL-10 en ratas portadoras de L-TACB, podrían ser suprimidos por el tratamiento con dosis bajas de Cy. Estos resultados hacen previsible un impacto importante en el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a los linfomas metastásicos, considerando que la administración de una dosis baja de Cy, un tratamiento carente de toxicidad, podría actuar inhibiendo al menos dos mecanismos que contribuyen al crecimiento maligno y

a la progresión tumoral: escape de la respuesta inmune antitumoral y crecimiento autónomo de las células metastásicas.

Uno de los mecanismos descubiertos en los últimos años por el cual los tumores contraatacan al huésped, teniendo como diana el sistema inmune, es la expresión y secreción de Galectina-1. Esta proteína endógena de unión a β -galactósidos es expresada en diferentes tejidos y por diferentes células del sistema inmune y tiene un rol importante en la homeostasis de los linfocitos T (Ravinovich GA, 2002c). En los procesos de maduración de linfocitos T tímicos, Gal-1 contribuye a los mecanismos de selección mientras que, luego de una respuesta inmune, induce la apoptosis de linfocitos T activados permitiendo así la terminación de la respuesta inmune (Ravinovich GA, 2002a). Estos últimos son mecanismos fisiológicos estrictamente regulados en los que interviene Gal-1. Sin embargo, los tumores, hacen un uso inapropiado de esta proteína y, aprovechándose de su capacidad pro-apoptótica sobre los linfocitos T activados, secretan Gal-1 al medio extracelular. Ésta se une a diferentes componentes de la matriz extracelular, localizándose así en las cercanías del tumor (Zhou Q, 1990). De esta manera, se genera una zona inmunoprivilegiada en la cual los linfocitos T antitumorales mueren cuando Gal-1 se une a los diferentes receptores de membrana, principalmente CD45RO, CD7 y CD43 (He J, 2004). CD43 se expresa en todos los linfocitos T, presentado una isoforma diferente en los linfocitos T activados (Rosenstein Y, 1999). Interesantemente, CD45RO y CD7 tienen un patrón de expresión similar, expresándose en linfocitos T inmaduros y activados (Ralph SJ, 1987; Uittenbogaart CH, 1990; Reinhold U, 1996). Estos últimos receptores son los que participarían en la respuesta inmune antineoplásica. Es así que el tumor primario evade el ataque del sistema inmune y es capaz de crecer descontroladamente aumentando su tamaño y agresividad y, en muchos casos, su capacidad metastásica.

Habiéndose demostrado previamente que Cy tiene la capacidad de disminuir los niveles de expresión de Gal-1 por el tumor primario (Rabinovich GA, 2002b), se estudió el efecto de diferentes concentraciones de Maf sobre la expresión de dicha proteína en células tumorales primarias y metastásicas. Es de hacer notar que, como el

tratamiento impide la formación de metástasis, la única forma de estudiar el efecto de la droga sobre las células con fenotipo metastático fue realizando el estudio *in vitro*. Con este propósito, se realizaron incubaciones a distintos tiempos de células tumorales primarias y metastásicas en presencia de distintas concentraciones de Maf y se evaluó la expresión de Gal-1. La modulación de la expresión de Gal-1 por Maf luego de 18 y 24 horas mostró variaciones según el tipo celular. Por un lado, en células tumorales primarias, la expresión de Gal-1, aunque no fue modulada significativamente, presentó una tendencia hacia la regulación negativa, siendo más marcada a las 24 horas, aunque independiente de la dosis (Fig. 9). Por otra parte, en células metastásicas el comportamiento fue más heterogéneo (Fig. 11). Sin embargo, luego de 96 horas de incubación, la acción de Maf fue más importante. En células tumorales primarias se inhibió la expresión de Gal-1 en un 44% (Fig. 10), mientras que en las metastásicas la inhibición fue del 22% (Fig. 12). De esta manera, se demostró que la expresión de Gal-1 fue modulada negativamente tanto en las células tumorales primarias como en las metastásicas y que esta inhibición fue mayor en las células provenientes del tumor primario. Nuevamente, estudiando una característica biológica de las células tumorales primarias y metastásicas distinta a las analizadas previamente, se hizo evidente el comportamiento diferente de ambas poblaciones celulares, diferencias que se manifiestan tanto en forma cualitativa como cuantitativa.

En la bibliografía actual existe un gran número de estudios que relacionan la expresión de Gal-1 por parte de las células de tumor primario con la progresión tumoral, el grado de agresividad y la adquisición del fenotipo metastático. Se ha encontrado relación entre los niveles de expresión de Gal-1 y el crecimiento tumoral en distintos tipos de tumores. En cáncer de páncreas, se encontró Gal-1 en la mayoría de los fibroblastos que circundan la masa tumoral y dentro de ella. También, en tiroides, se encontraron altos niveles de Gal-1 en carcinomas papilares, pero no foliculares. En adenocarcinoma de endometrio, se observó un aumento significativo en la expresión de Gal-1 en células cancerosas comparadas con el endometrio normal adyacente. Un estudio de carcinomas de próstata humano mostró Gal-1 acumulada en el estroma y en los fibroblastos asociados, pero no en células normales, demostrándose una asociación entre la alta expresión de Gal-1 en el estroma del tejido

maligno y su agresividad (Danguy A, 2002). En el modelo de linfoma de rata L-TACB, se demostró la expresión de Gal-1 por parte de las células tumorales primarias. Además el tratamiento con una única dosis de 10 mg/kg de peso de Cy, la cual posee efecto antimetastásico y no citotóxico, produjo una disminución de la expresión de Gal-1 (Ravinovich GA, 2002b).

Con el objetivo de ampliar el estudio, a nivel molecular, sobre el modelo tumoral L-TACB y, teniendo en cuenta la relación entre la expresión de Gal-1 y la progresión tumoral, se decidió estudiar la cinética de expresión de Gal-1 en tumor primario. Se encontró que la expresión de Gal-1 aumentó a los 14 días del desafío tumoral respecto al día 7 y se mantuvo en esos niveles altos en el día 21. Asimismo, la administración de Cy en una dosis antimetastásica en el día 14 produjo un descenso en la expresión de Gal-1. En el día 21 los animales portadores de tumor tratados con Cy presentaron niveles de expresión de Gal-1 similares a los basales, correspondientes al día 7 (Fig. 15A). Sustentando aún más el modelo, al realizar un estudio de correlación de Pearson entre la expresión de Gal-1 y el volumen tumoral, se encontró que existe una correlación positiva y significativa entre estas dos variables (Fig. 18), lo que permite comprender mejor el fenómeno de progresión tumoral.

Si se tiene en cuenta que la expresión de Gal-1 por parte del tumor primario es uno de los mecanismos de los que se vale el tumor primario para contrarrestar la respuesta inmune y que la expresión de Gal-1 se correlaciona significativamente con el aumento de la masa tumoral surge, de manera directa, la participación de este mecanismo en el proceso de progresión tumoral. Por otra parte, habiéndose demostrado que la dosis de Cy es antimetastásica y confirmando que la misma disminuye los valores de Gal-1 llevándolos a niveles comparables al día 7 del crecimiento tumoral (primer día de medición del tumor inoculado), se evidencia la concordancia entre los resultados obtenidos a nivel molecular, es decir modulación negativa de la expresión de Gal-1 en el tumor, y los obtenidos *in vivo*, esto es inhibición del desarrollo de metástasis. La correlación encontrada entre la expresión de Gal-1 y el volumen tumoral sugiere un nuevo interrogante: ¿podría Gal-1 ser utilizada como un marcador tumoral? Estudios futuros podrán contestar dicho interrogante.

Por otro lado, también se estudió la expresión de Gal-1 en las células metastásicas obtenidas de metástasis espontáneas ganglionares. Analizando muestras de tejido metastásico junto con el tumor primario correspondiente, se comprobó que la expresión de Gal-1 por las metástasis era significativamente menor que la del tumor primario respectivo (Fig. 16). Este cambio en la expresión de Gal-1 podría deberse a que estas células que, según hemos demostrado, poseen características fenotípicas que favorecen su crecimiento, prescindirían en parte de esta molécula y de sus funciones, en beneficio de la expresión de otros productos génicos aún no determinados. Probablemente, otras moléculas involucradas en la adquisición del fenotipo metastático competirían, para su expresión, por las mismas vías de expresión que utiliza el gen que codifica para Gal-1. Podría razonarse que una de las principales funciones de Gal-1 en lo que se refiere al tumor, es decir la inhibición de la respuesta inmune, ya fue en parte cumplida al producirse el escape de células tumorales desde el tumor primario para desarrollar tumores secundarios en los ganglios. Estas metástasis estarían constituidas por células menos sensibles al ataque inmune o menos inmunogénicas. Por lo tanto, la expresión de Gal-1 sería menos necesaria. Por otra parte, se sabe que la masa tumoral es un mosaico de células fenotípica y genotípicamente diferentes (Heppner GH, 1984). Por lo tanto, este cambio en el patrón de expresión podría deberse a que las células capaces de expresar y secretar Gal-1 no serían las mismas que adquieren el fenotipo metastásico. De esta forma, las células que colonizan y desarrollan metástasis expresarían menores cantidades de Gal-1. Estudios realizados por Büchler y colaboradores en cáncer de páncreas, tanto en células tumorales primarias como metastásicas, revelaron un patrón de expresión de Gal-1 en dichas células que se asemeja al obtenido en nuestro laboratorio. Mediante análisis de *Northern* y *Western Blot*, hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, estos investigadores encontraron una fuerte inmunoreactividad de Gal-1 en la mayoría de los fibroblastos en el tejido fibroso dentro y circundando a la masa tumoral, pero llamativamente, no encontraron Gal-1 en las células metastásicas (Berberat OP, 2001). El estudio de la cinética de expresión de Gal-1 también se llevó a cabo en las células esplénicas en animales portadores de L-TACB. Se encontró que los niveles de Gal-1 se mantienen constantes desde el día 0 hasta el día 7 y disminuyen en los días 10, 14 y 21. La administración de una dosis única y baja de Cy restaura, en las células

esplénicas, los niveles de Gal-1, retornándolos a los niveles basales correspondientes al día cero (Fig. 15B). De esta manera, se encontró un comportamiento *en espejo* en la cinética de Gal-1 entre las células tumorales y las esplénicas. En las primeras etapas del crecimiento tumoral, la expresión de Gal-1 por las células esplénicas podría ser interpretada como un mecanismo de defensa del sistema inmune del hospedador ante las células linfoides tumorales, provenientes del linfoma L-TACB. Así Gal-1, expresada por los linfocitos esplénicos, podría inducir la muerte de los linfocitos tumorales. La disminución posterior de la expresión de Gal-1 por los linfocitos esplénicos, sería una consecuencia de la acción del tumor contra el hospedador generando, de esta manera, una menor capacidad de respuesta inmune antitumoral. Por lo tanto, el aumento de la expresión esplénica de Gal-1 logrado luego de la inoculación de Cy al día 14 podría considerarse como parte del restablecimiento de la capacidad inmune, que permitiría a las células esplénicas, junto con otras modificaciones concomitantes, ejercer su acción antitumoral. Una nueva incógnita que queda por resolver es develar cuáles son los mecanismos mediados por el tumor que estarían involucrados en la disminución de la expresión de Gal-1 por parte de los esplenocitos.

Ya ha sido demostrado que Gal-1 es capaz de inhibir las funciones de las células T efectoras promoviendo tanto una disminución en su crecimiento como la apoptosis de las células T activadas (Perillo NL, 1995; Rabinovich GA, 1998; Blaser C, 1998; Rabinovich GA, 1999; Chung CD, 2000; Rabinovich GA, 2002; He J, 2004; Matarrese P, 2005). De manera interesante, estudios previos muestran una modulación bifásica del crecimiento celular y la supervivencia por Gal-1 recombinante humana (Adams L, 1996; Vas V, 2005). A pesar que las bajas concentraciones de esta proteína (en el orden de los 5–10 ng/ml) son mitogénicas y aumentan la formación de colonias de granulocitos-macrófagos durante la hematopoyesis, concentraciones altas de la misma (en el orden de los 5–10 µg/ml) reducen dramáticamente el crecimiento celular y promueven la apoptosis (Adams L, 1996; Vas V, 2005). Para investigar el significado funcional de la expresión regulada de Gal-1 por Cy, se examinaron los efectos de esta proteína de unión a carbohidratos sobre la viabilidad y la apoptosis de las células esplénicas por el agregado de Gal-1 recombinante (en una concentración de

4 $\mu\text{g/ml}$, la cual se había mostrado previamente que promueve la muerte celular (Rabinovich GA, 1997; Rabinovich GA, 1999; Rabinovich GA, 2002; Vas V, 2005). Interesó estudiar si la mayor viabilidad de las células esplénicas de animales portadores de tumor, obtenida luego de la administración de Cy al día 14 en la dosis antimetastásica, se debía sólo a la disminución en la expresión de Gal-1 por parte del tumor, o si involucraba otros procesos directamente relacionados a los esplenocitos. Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio mostraron que el tratamiento con esta dosis de Cy produce un aumento en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en los esplenocitos, acompañado de una reducción en la fragmentación del ADN. Ambos efectos conducen a una disminución de los índices de apoptosis de dichas células, que participan de la respuesta inmune antitumoral (Rabinovich GA, 2002b). Se realizó una suspensión de células esplénicas provenientes de animales portadores de tumor, tratados con Cy y sin tratar (animales testigo), y se la incubó con Gal-1. Luego, se evaluaron tanto los niveles de apoptosis temprana como los de viabilidad de dichas células.

De manera interesante, se demostró que el agregado de Gal-1 no modificó la viabilidad de los esplenocitos de animales portadores de L-TACB tratados con Cy, y que los valores obtenidos, no difirieron significativamente de los logrados con las mismas células en ausencia de Gal-1. Además, la viabilidad de dichas células fue significativamente mayor que la de los esplenocitos de animales portadores de tumor sin tratar (testigos) incubados con Gal-1 (Fig. 13). Los niveles de apoptosis temprana de los esplenocitos de animales portadores de L-TACB incubados con Gal-1 fueron significativamente menores en los animales tratados con Cy respecto a los animales sin tratar. A su vez, dentro del grupo de animales tratados con Cy, los esplenocitos incubados con Gal-1 no presentaron diferencias significativas con los que no fueron incubados con Gal-1 (Fig. 14). Enfocando el análisis en el efecto del tratamiento con Cy se puede decir que, a pesar de no haberse detectado, con el método utilizado, diferencias en el nivel de apoptosis en esplenocitos de animales tratados con Cy y sin tratar, se ve claramente que el tratamiento con Cy en el día 14 del inóculo tumoral protegió a los esplenocitos del efecto pro-apoptótico de Gal-1. Estos resultados podrían estar indicando que, a través del tratamiento con Cy las células esplénicas

cambian su fenotipo, dado que su sensibilidad a la apoptosis inducida por Gal-1 se ve disminuida significativamente.

Por lo tanto, habiendo observado previamente en el modelo tumoral L-TACB que el tratamiento con Cy aumenta la viabilidad de los esplenocitos, con el experimento descrito se avanza en el conocimiento del efecto de dicho tratamiento sobre las células tumorales, demostrando que la incubación con Gal-1 de dichas células no puede revertir el efecto protector de Cy. Es decir que el aumento de la viabilidad de las células esplénicas logrado con el tratamiento con Cy, no se debe únicamente al hecho de que la misma induce una disminución en la expresión tumoral de Gal-1, dado que al agregarla exógenamente la viabilidad celular no desciende a los valores obtenidos sin tratamiento. Se podría decir que Cy tiene la habilidad de generar resistencia en las células T a la muerte celular inducida por Gal-1. A pesar que los mecanismos involucrados en esta resistencia quedan por ser dilucidados, se podría especular que Cy modularía el repertorio de glicanos específicos de las células T creado por la actividad regulada de la 2 β -1,6-N-acetilglucosamiltransferasas (C2GnTs) y la α 2,6 sialiltransferasa (ST6Gal I) (Amano M, 2003; Galvan M, 2000). La glicosilación controlada de la superficie de las células T podría regular la unión de Gal-1 y la muerte celular inducida por Gal-1, como ha sido previamente demostrado (Amano M, 2003; Rappl G, 2002; Roberts AA, 2003). Alternativamente, también se podría especular que la actividad inmunoestimuladora de Cy sería suficientemente fuerte para superar las vías de muerte de Gal-1 *in vivo*.

Los resultados anteriores sugieren que Cy, además de modular negativamente la expresión de Gal-1 por el tumor primario, modularía otra/s molécula/s involucrada/s en la/s vías de apoptosis inducida/s por Gal-1 en esplenocitos. En trabajos futuros sería interesante determinar si otros blancos moleculares de Cy involucran a receptores de membrana para Gal-1, moléculas de las vías intracelulares de transducción de señales o factores de transcripción, entre otros.

Se ha demostrado previamente que Gal-1, una proteína de unión a carbohidratos secretada por células tumorales y estromales, contribuye sustancialmente a las actividades inmunosupresoras de células cancerosas humanas y de ratón regulando la

supervivencia y diferenciación de las células T efectoras (Rubinstein N, 2004). Sin embargo, existe todavía escasa información acerca del estímulo endógeno y exógeno que podría controlar la expresión de esta proteína de unión a carbohidratos *in vivo*.

Con la intención de investigar si los resultados obtenidos en el estudio de la cinética de expresión de Gal-1 en el linfoma L-TACB eran exclusivos de ese tumor o si era un comportamiento que se podía generalizar a otros linfomas, se repitió el experimento utilizando un modelo tumoral de linfoma de ratón (L-DGE). Se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en el modelo de linfoma de rata L-TACB, lo que podría estar indicando un patrón de comportamiento de los linfomas, independientemente de la especie donde se desarrollen (Fig. 20).

De manera interesante, la situación fue completamente diferente en otros dos modelos tumorales. La expresión de Gal-1 en el sarcoma S-E100 no mostró variaciones significativas durante la progresión tumoral en el período estudiado (Fig. 21A). Siguiendo la misma lógica, si se tiene en cuenta que el S-E100 es un tumor pobremente inmunogénico (Bay ML *et al*, comunicación personal), se podría especular que no habría necesidad de un aumento en la expresión de Gal-1 debido a que la amenaza de un ataque por parte del sistema inmune, aparentemente, no existe. Por otra parte, las células esplénicas de los animales portadores del sarcoma, mostraron una disminución significativa en la expresión de Gal-1 en los días 14 y 21 comparado con lo observado en el día 0 (Fig. 21B). Este comportamiento fue similar al observado en el modelo del linfoma L-TACB. Por otro lado, en el adenocarcinoma de mama M-234p los resultados fueron inesperados, debido a que el crecimiento tumoral indujo una clara reducción en la expresión de Gal-1, la cual fue significativa en el día 30 y marginalmente significativa en el día 40 cuando se comparó con los niveles observados en el día 10 (Fig. 22A). Si la modulación de la expresión de Gal-1 es explicada en el contexto de la relación entre el crecimiento tumoral y el sistema inmune, el comportamiento observado en este tercer modelo podría ser explicado por el fenómeno de “inmunoestimulación tumoral”. Prehn *et al* (Prehn RT, 1971) encontraron que niveles intermedios de reactividad inmune antitumoral podría frecuentemente estimular en lugar de inhibir el desarrollo de determinados tipos de

tumores (Prehn RT, 1980; Prehn RT, 1994). También se encontró evidencia en cáncer de mama humano que coincidía con los postulados de Prehn (Stewart THM, 1996; Stewart TH, 1997). Por lo tanto, si este fuera el caso en el modelo tumoral M-234p, una reducción en la expresión de Gal-1 conduciría a una respuesta inmune intermedia la cual, a través de la liberación de citoquinas y/o factores de crecimiento solubles podrían estimular el crecimiento tumoral.

Teniendo en cuenta la hipótesis de que la cinética de expresión de Gal-1 podría depender de la relación entre la inmunogenicidad tumoral y la respuesta inmune del huésped, se desafiaron ratas *e*, *m* y ratones BALB/c con L-TACB, S-E100 y M-234p s.c., respectivamente. Simultáneamente se realizó el mismo experimento con ratones inmunodeficientes *nude*. Los animales fueron sacrificados de manera periódica. Se extirparon los tumores primarios y los bazo y se determinó la expresión de Gal-1. La velocidad de crecimiento de los tumores en los ratones *nude* no difirió significativamente de la de los huéspedes eutímicos, en los tres modelos tumorales. Es necesario aclarar que en el caso del adenocarcinoma de mama M-234p, para poder demostrar que una respuesta inmune intermedia estimula su crecimiento, se debería realizar el experimento con ratones SCID en los que la inmunodeficiencia es completa, a diferencia de los ratones *nude* en los que se ha demostrado la existencia de respuesta inmune inespecífica a cargo de las células NK (Minato N, 1979) y la presencia de algunas células T (Ikehara S, 1984). El resultado interesante que se obtuvo en esta serie de experimentos fue que la expresión de Gal-1 fue menor en los ratones *nude* que en los animales eutímicos a lo largo de la progresión tumoral. Además, la expresión de Gal-1 en bazo sólo fue cuantificable en los animales eutímicos desafiados con los tres tumores estudiados. Durante el crecimiento tumoral la expresión de Gal-1 en ratones *nude* permaneció constante o disminuyó. De estos resultados se puede deducir que la respuesta inmune del huésped inducida por el tumor reguló fuertemente la expresión de Gal-1, ya que en ausencia de respuesta antitumoral específica, su expresión no se modificó durante el crecimiento tumoral.

Tomando en conjunto los resultados obtenidos con los tres modelos tumorales, estos sugieren que, hipotéticamente, Gal-1 podría actuar como un potenciómetro en un

servomecanismo. El tumor sería el motor eléctrico que transmite una señal que es enviada luego a través del potenciómetro (Gal-1), que se ajusta en una forma continua, hasta lograr la exacta cantidad regulada por el tumor y que finalmente alcanza el brazo ejecutor que estaría representado por las células involucradas en la vigilancia inmunológica. Como un servomecanismo común, este sistema opera en un principio de regulación negativa. Cuando el tumor aumenta su expresión de Gal-1, hay una disminución de la respuesta inmune antitumoral; por el contrario, cuando el tumor necesita una respuesta inmune leve para crecer, el tumor disminuye la expresión de Gal-1, permitiendo de esta manera que la respuesta inmune funcione. Además, cuando no hay señales por parte del tumor, no se inducen cambios en la expresión de Gal-1 y la vigilancia inmune no es afectada. La disminución en la expresión de Gal-1 por las células esplénicas en las ratas portadoras de L-TACB y S-E100 (Fig 15B y 21B, respectivamente) y la ausencia de cambios en los ratones portadores de M-234p (Fig. 22B) necesitan mayor investigación para explicar su significado biológico.

La demostración de la existencia de una correlación positiva y significativa entre el volumen tumoral y la expresión de Gal-1, durante el crecimiento del linfoma L-TACB (Fig. 17), observado también en el linfoma L-DGE (Fig. 20), es un hallazgo que sugiere potenciales implicancias clínicas. Esto podría estar indicando un patrón de comportamiento de los linfomas, independientemente de la especie donde se desarrollen y que, por ende, podrían involucrar a la especie humana. Estos datos concuerdan con hallazgos recientes que muestran una asociación entre la alta expresión de Gal-1 y la agresividad de diferentes tipos de tumores (Danguy A, 2002; Lahm H, 2004; Liu FT, 2005). Otros autores encontraron resultados similares en modelos tumorales de carcinoma colorrectal, de laringe, de mama y de pulmón (Huang LJ, 2006; Zhu XL, 2007; Saussez S, 2007; Jung EJ, 2007).

Por otra parte, se analizaron las vías de señalización intracelulares de expresión de Gal-1, tanto en las células tumorales primarias como en las metastásicas. A través de estudios llevados a cabo por Rabinovich y colaboradores en células T humanas, se demostró que la expresión de Gal-1 durante la activación de dichas células involucra las quinasas Lck y Fyn así como también la señalización a través de las moléculas

ERK, p38 MAP quinasa (p38-MAPK) y la quinasa p70^{S6} (Fuertes MB, 2004). Teniendo en cuenta que L-TACB es un linfoma de tipo B y que las vías de señalización intracelular que se conocen en células B son múltiples, como se muestra en la Fig. 42, se decidió estudiar algunas de tales vías de señalización con el objeto de conocer si estaban implicadas en la expresión de Gal-1 en el modelo de L-TACB. Se eligieron tres vías en las que están involucradas las moléculas NF- κ B, mTOR y p38-MAPK, y se usaron inhibidores específicos de las mismas tales como Sulfasalazina (SZ), Rapamicina (Rapa) y SB202190 (SB), para cada una de estas moléculas, respectivamente, (Figura 42). Para esto, se incubaron células tumorales primarias y metastásicas en presencia de los diferentes inhibidores.

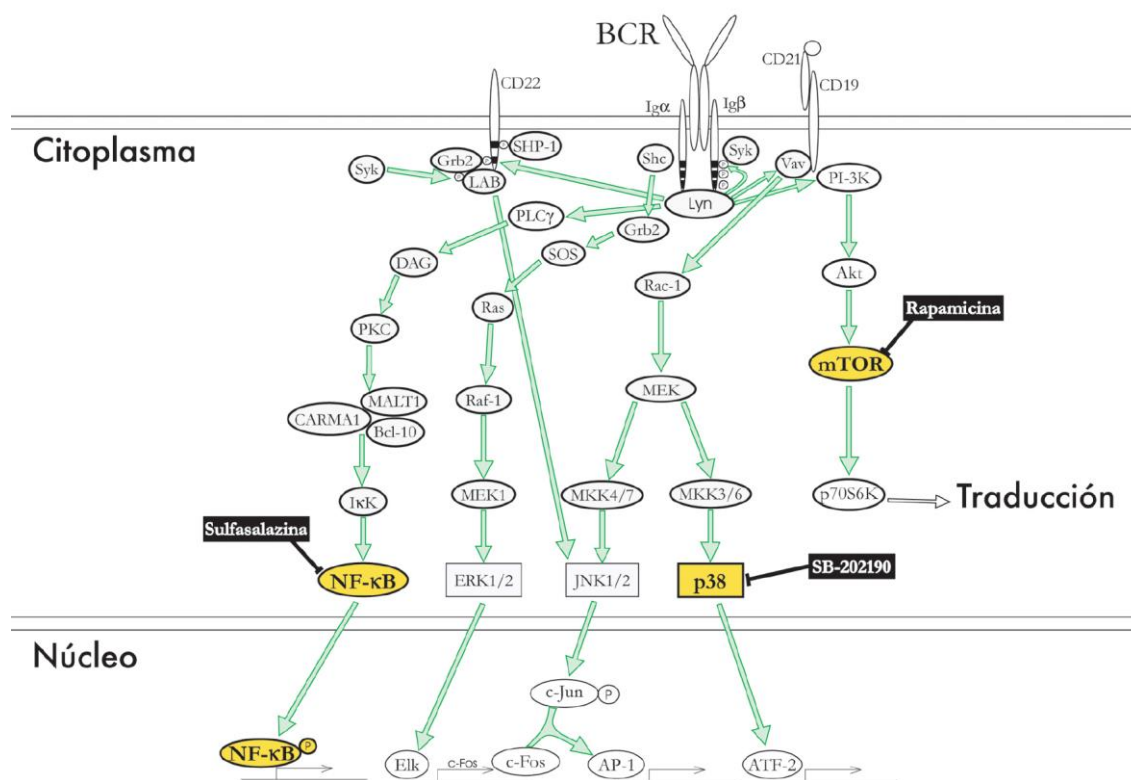


Figura 42. Vías intracelulares de señalización de células B. Se muestran las diferentes vías y los inhibidores utilizados, señalando su blanco molecular específico. Esquema tomado de la Tesis de Grado del Licenciado en Biotecnología Mariano F. Zacarías Fluck, 2005.

En células tumorales primarias, SZ, Rapa y SB, inhibieron la expresión de Gal-1 siendo la acción de SZ algo superior a la de Rapa y estas dos superiores a la de SB, (85%, 78% y 69% de inhibición de la expresión, respectivamente). Llamativamente, en presencia de Maf, disminuyó o se anuló la inhibición lograda con tales compuestos

(38%, 44%, 0% de inhibición, respectivamente) (Fig. 32A). La supresión ejercida por Maf sobre la acción inhibitoria de la expresión de Gal-1, tanto de Rapa como de SZ, podría producirse a través de diferentes mecanismos. En la bibliografía actual no existen antecedentes de una interacción química entre Maf y los inhibidores utilizados, por lo cual podría descartarse como explicación del efecto encontrado. Otro mecanismo posible sería que Maf indujera la activación de factores de transcripción específicos para genes cuyos productos interfirieran en la acción de SZ, Rapa y SB. Este interrogante sugiere nuevas líneas de investigaciones futuras.

Por otra parte, en las células metastásicas, la incubación con SZ, Rapamicina y SB produjo una inhibición de la expresión de Gal-1 (22,65%, 46,46%, 21,06% respectivamente), que fue de aproximadamente el doble en el caso de Rapamicina con respecto a los otros dos inhibidores. Además, el agregado de Maf al medio de cultivo aumentó la inhibición de la expresión de Gal-1 producida por Rapa y SB (58,76% y 90,35% respectivamente) mientras que anuló completamente la acción de SZ (2,33% de inhibición) (Fig. 32B).

Del análisis de esos resultados resulta claro que la expresión de Gal-1 en las células metastásicas es menos sensible a la acción tanto de SZ, como de Rapamicina y SB que en las células tumorales primarias. Por otro lado, Mafosfamida revierte parcialmente la inhibición de dichas drogas en células tumorales pero en las metastásicas la aumenta, levemente en el caso de Rapa y fuertemente en el de SB, mientras que revierte completamente la de SZ. Por lo tanto, en la expresión de Gal-1 de las células metastásicas estarían involucradas otras vías de transducción de señales, además de las estudiadas, resaltando así las diferencias existentes entre las células tumorales primarias respecto de las metastásicas. Además, las vías de señalización intracelulares que llevan a la expresión de Gal-1 fueron afectadas por Maf de diferente manera en ambas poblaciones celulares. Este resultado podría deberse a diferencias cuantitativas en la susceptibilidad a la inhibición o a la existencia de diferencias cualitativas, es decir que las células utilizarían vías de señalización que son, en parte, diferentes. Las diferencias en el genotipo de ambos tipos celulares podrían justificar ambas posibilidades.

A partir de los resultados obtenidos de los experimentos con los inhibidores de las vías intracelulares de transducción de señales se puede concluir que, en el modelo tumoral L-TACB, la expresión de Gal-1 en las células tumorales primarias involucra, al menos, a la familia de factores de transcripción NFκB y a mTOR. Los miembros de la familia NFκB se encuentran en el citoplasma unidos a su inhibidor IκB (del inglés, *inhibitor of kappa B*) y, luego de liberarse de él y de ser fosforilados, migran al núcleo activando la transcripción de una gran variedad de genes (Karin M, 2000). Existen tres vías que llevan al desacoplamiento entre NFκB e IκB y responden a diferentes estímulos extracelulares. La vía clásica de activación es disparada por TNF (Hsu H, 1995; Devin A, 2000). La vía alternativa de activación es disparada por citoquinas como linfotóxina β (LTβ), el factor activador de células B y el ligando de CD40 (Dejardin E, 2002; Claudio E, 2002, Coope HJ, 2002). La tercer vía, llamada la vía atípica, prescinde de las quinasas de IκB, siendo la caseínquinasa 2 la que fosforila al inhibidor y media su degradación, permitiendo así, la migración del factor de transcripción al núcleo (Kato T, 2003). En el cáncer, la activación aberrante de NFκB es un sello y puede estar causada por fosforilaciones desreguladas y, a veces, constitutivas, tanto de NFκB como de IκB. En diferentes modelos animales se ha demostrado la implicancia de la activación de NFκB en el desarrollo tumoral (Romieu-Mourez R, 2001; Gasparian AV, 2002; Viatour P, 2005).

Por otra parte, mTOR es una quinasa que se encuentra corriente abajo de Akt, también conocida como proteinquinasa B (Schmelze T, 2000). Activa a la quinasa p70S6, la cual fosforila a la proteína S6 (componente de la subunidad 40S del ribosoma). Además, mTOR inhibe a 4E-BP1, inhibidor de eIF4E, factor de transcripción que se une a la estructura de la caperuza, presente en el extremo 5' de los ARNm, permitiendo así la traducción dependiente de caperuza (Jefferies HB, 1997; Hara K, 1998). mTOR, no sólo activa a p70S6 y eIF4E, sino que además controla la traducción de c-Myc, un factor de transcripción cuyos genes diana gobiernan una gran variedad de procesos relacionados al crecimiento, como por ejemplo la transcripción y procesamiento de ARNr, la transcripción de proteínas ribosomales y la traducción (West MJ, 1998). mTOR suele estar desregulado en los tumores. Está relacionado al cáncer a través de la enzima PI-3K (fosfatidilinositol-3 quinasa, del inglés

phosphatidilinositol-3 kinase), de Akt y de eIF4E, moléculas que han sido identificadas en versiones oncogénicas o de las cuales se ha demostrado su potencial transformante (Thomas G, 1997).

En cuanto a las vías de expresión de Gal-1 en las células metastásicas, se demostró que, al igual que en las células tumorales primarias, tanto NFκB como mTOR están involucradas en su expresión, Por otra parte, también la quinasa p38-MAPK está implicada en la expresión de Gal-1, ya que la misma es inhibida parcialmente por el agregado de SB, inhibidor específico de dicha quinasa.

La superfamilia de las proteinquinas activadas por mitógenos o MAPK, consta de tres cascadas de quinasas serina/treonina: ERK (quinasas relacionadas a señales extracelulares), p38 MAPK y JNK (quinasa aminoterminal de c-Jun). La cascada de la p38 MAPK regula una variedad de respuestas celulares a stress, inflamación y otras señales (Han J, 1994; Lee JC, 1994; Rouse J, 1994). La p38 MAPK es relativamente inactiva en su forma no fosforilada y se convierte a la forma activa luego de su fosforilación (Wilson KP, 1996). La inactivación es llevada a cabo por diferentes proteinfosfatasas. En cáncer se ha encontrado que p38 MAPK activa al regulador del ciclo celular p53 a través de la fosforilación de dicha molécula (Bulavin DV, 1999). Las actividades corriente abajo que siguen a la activación de p53 involucran la detención del ciclo celular, apoptosis, producción de citoquinas, regulación del corte y empalme del ARN y diferenciación celular (Kumar S, 2003). Por otra parte, p38 MAPK es regulada negativamente por Akt (Gianni M, 2002).

Por los resultados descritos más arriba, podemos concluir que, en nuestro modelo tumoral, algunas de las vías de señalización involucradas en la expresión de Gal-1 son las que dependen de la activación de NFκB y/o de mTOR para el caso del tumor primario, a las que se sumaría p38 MAPK en el tejido metastásico. Por lo tanto, la activación de esas moléculas induciría la expresión de Gal-1 la cual, por su parte, favorecería el crecimiento tumoral.

La investigación a lo largo de la última década ha brindado evidencia importante acerca del rol de Gal-1 en el crecimiento tumoral y en las metástasis *in vivo* (Rabinovich GA, 2005; van den Br le F, 2004) sugiriendo que la inhibición selectiva de Gal-1 u otros miembros de la familia de las galectinas podrían tener implicancias profundas para la terapia del cáncer. Así, se ha predicho que los inhibidores de estas proteínas de unión a carbohidratos (Glinsky GV, 1996; André S, 2001; Nangia-Makker P, 2002; Sorme P, 2002; Rabinovich GA, 2006) tendrían su lugar en los ensayos clínicos oncológicos, lo que conduciría a retrasos en la progresión tumoral y a mejoras en la supervivencia general. En este aspecto, la modulación de la expresión de Gal-1 *in vivo* tendrá implicancias terapéuticas claras. Sin embargo, existe todavía poca información acerca de los agentes endógenos y exógenos que regulan la expresión de Gal-1 en las células tumorales (Chiariotti L, 2004). Se ha demostrado que agentes que inducen diferenciación celular, incluyendo el butirato de sodio (Gillenwater A, 1998) y el ácido retinoico (Lu Y, 2000), pueden modular el contenido de Gal-1 en las células tumorales.

En el presente estudio se provee evidencia que muestra que el tratamiento con una dosis baja de Cy, un agente inmunomodulador y antimetast tico, puede regular diferencialmente la expresión de Gal-1 en el tumor primario (L-TACB), en células metast ticas de L-TACB y en células esplénicas. El mayor conocimiento acerca del rol de Gal-1 en el cáncer y en la inflamación y los mecanismos de acción de esta proteína de unión a carbohidratos en diferentes etapas de la progresión tumoral brindan pistas acerca de cómo la regulación de su expresión y actividad podrían ser utilizadas con propósitos terapéuticos.

En estudios previos, se demostró que el tratamiento con dosis bajas de Cy de animales portadores de L-TACB tenía un profundo efecto inmunomodulador, provocando un cambio en el perfil de citoquinas T_H2 (IL-10; TGF- β) hacia un perfil T_H1 (IL-2; IFN- γ). Por otra parte, las células T reguladoras (Tregs) participan en la supresión de la respuesta inmune antitumoral. Teniendo en cuenta esto, se decidió estudiar el efecto de Cy sobre esta subpoblación linfocitaria. Durante la progresión tumoral se observó un aumento de las tres poblaciones estudiadas: CD4CD25CTLA-4⁺, CD4CD25Foxp3⁺

y CD4CD25IL-10⁺. Como resultado interesante se observó que Cy sólo produjo una disminución significativa en el porcentaje de las células Foxp3⁺ y marginalmente significativa en las células IL-10⁺ (Fig. 35). Por lo tanto, el tratamiento con Cy disminuyó el porcentaje de Tregs naturales e inducibles en ratas portadoras de L-TACB. Esta disminución fue concomitante con una disminución en los niveles séricos de IL-10 y un aumento de IL-2 e IFN- γ observados en estudios previos (Fig. 36, 37, 38, 39). Este resultado, junto con el cambio en el perfil de citoquinas de T_H2 a T_H1 previamente demostrado, indica que el tratamiento está actuando sobre importantes mecanismos de escape tumoral, anulándolos o disminuyendo su acción, contribuyendo de esta manera a la inhibición inmunológica de las metástasis.

Las células NKT co-expresan marcadores de células T y NK. Se pueden dividir en dos poblaciones: células NKT tipo I, que favorecen la respuesta inmune antitumoral y NKT II que suprimen esta respuesta. Habiendo estudiado la modulación de las células Tregs durante el crecimiento tumoral y el tratamiento con una dosis antimetastásica de Cy, interesó investigar si la población de células NKT I estaba involucrada en la evasión tumoral de la respuesta inmune y/o en el efecto terapéutico de una dosis baja de Cy. En el día 7 del crecimiento tumoral, se observó un aumento de las células NKT I, el cual coincidió con el aumento producido en el % de las células Tregs. Esto podría indicar un estado de equilibrio entre las dos poblaciones celulares: las NKT I, involucradas en la respuesta inmune innata antitumoral y las Tregs que participan en los mecanismos de escape tumoral. Sin embargo, hacia el día 14, las células NKT I retornan a los valores basales mientras que las Tregs continúan aumentando, lo cual inclinaría el balance de la respuesta inmune hacia un estado de inmunosupresión. El tratamiento antimetastásico con Cy no tuvo la capacidad de modificar el porcentaje de las células NKT I (Fig. 38). Por lo tanto, esta población celular no estaría involucrada en el efecto terapéutico de Cy administrada en dosis antimetastásica. Dada la ausencia de modulación de células NKT I se quiso averiguar si esa falta de respuesta se debía a las características del modelo tumoral con el que se trabajaba o si ese comportamiento estaba relacionado con la dosis administrada de la droga. En estudios previos del laboratorio se había determinado que una dosis baja y única de Cy de 20 mg/kg de peso inhibía el desarrollo de tumores primarios en animales portadores del linfoma L–

TACB. Por ello, se desafiaron animales con el linfoma L-TACB y al día 14 del crecimiento tumoral se aplicó una dosis única y baja de Cy de 20 mg/kg de peso. Se observó una tendencia al aumento del porcentaje sérico de esta población celular en los animales tratados (Fig. 40). Al comparar las dos dosis de Cy utilizadas, se encontró que el porcentaje de células NKT I que se dosaron con la dosis antitumoral era significativamente mayor al obtenido con la dosis antimetastásica (Fig. 41). Este resultado sugiere el diseño de nuevas propuestas terapéuticas en las que se pudiera modular positivamente la concentración de esta población linfocitaria, agregando a los elementos celulares operantes, uno adicional que colaboraría con el montaje de la respuesta inmune antitumoral.

Los resultados alcanzados en trabajos anteriores junto con los obtenidos en el presente trabajo para el linfoma metastásico L-TACB y sumados a los de otros laboratorios, van agregando nuevas piezas al complejo rompecabezas de la progresión tumoral. En base a los mismos desarrollamos un modelo teórico en el que se proponen algunas de las vías por las que, a partir del tumor primario, se avanza hacia la malignidad (Fig. 43), como así también el probable mecanismo por el cual Cy ejercería su acción antimetastásica (Fig. 44).

Los animales portadores de L-TACB presentan un perfil de citoquinas T_H2 (Fig. 43a). Durante el crecimiento tumoral se observa un incremento de los niveles de IL-10 y TGF- β y bajos niveles de IL-2 e IFN- γ (Matar P, 2001; Matar P, 2002). Por otro lado, también se ve un aumento en la población de las células Tregs naturales e inducidas (Fig. 43b) y un incremento transitorio de la población de células NKT I, la cual retorna a su valor basal, coincidiendo con un aumento de la población reguladora (Fig. 43c) (Rico MJ, 2007; Rico MJ, 2008). Al mismo tiempo la proliferación linfocitaria está significativamente inhibida (Fig. 43d) (Matar P, 2001). Por otro lado, aumenta la expresión tumoral (Fig. 43e) y disminuye la expresión esplénica de Bcl-2 (Fig. 43f), con la consiguiente disminución de la apoptosis de las células tumorales y aumento de la apoptosis de los esplenocitos (Fig. 43g). Además el incremento en la expresión de Gal-1 tumoral (Fig. 43h) induce la muerte de los linfocitos T activados (Rabinovich GA, 2002b), con un mayor detrimento de la respuesta inmune. La mayor producción

de Gal-1 estaría inducida por las necesidades del tumor, cuya inmunogenicidad despertaría una respuesta inmune que debe ser disminuida o evitada para que el tumor pueda seguir creciendo (Zacarías Fluck MF, 2007). La producción de Gal-1 por parte del tumor sería una estrategia más de escape tumoral, ya que la misma podría tener un rol activo en la protección de las células tumorales del ataque inmune. La respuesta inmune así deprimida permite el crecimiento del tumor y de las células con fenotipo metastático. Estas últimas, producen y liberan al medio IL-10 y también aumentan la expresión del receptor para IL-10 (Fig. 43i) (Rico MJ, 2005). De esta manera, las células metastásicas, que no pueden ser eliminadas por el sistema inmune por la inhibición linfocitaria existente, establecen un mecanismo de estimulación autocrina por el sistema IL-10/IL-10R produciendo un aumento de la tasa de proliferación de este tipo de células (Fig. 43j). Es de recordar, que este efecto es exclusivo de las células metastásicas de L-TACB, ya que no se observa con las células tumorales primarias. La IL-10 producida por linfocitos del sistema inmune también actúa sobre las células metastásicas a través de una estimulación paracrina (Fig. 43k). Es así que el crecimiento metastásico se ve favorecido tanto por estimulación autocrina como paracrina (Fig. 43l).

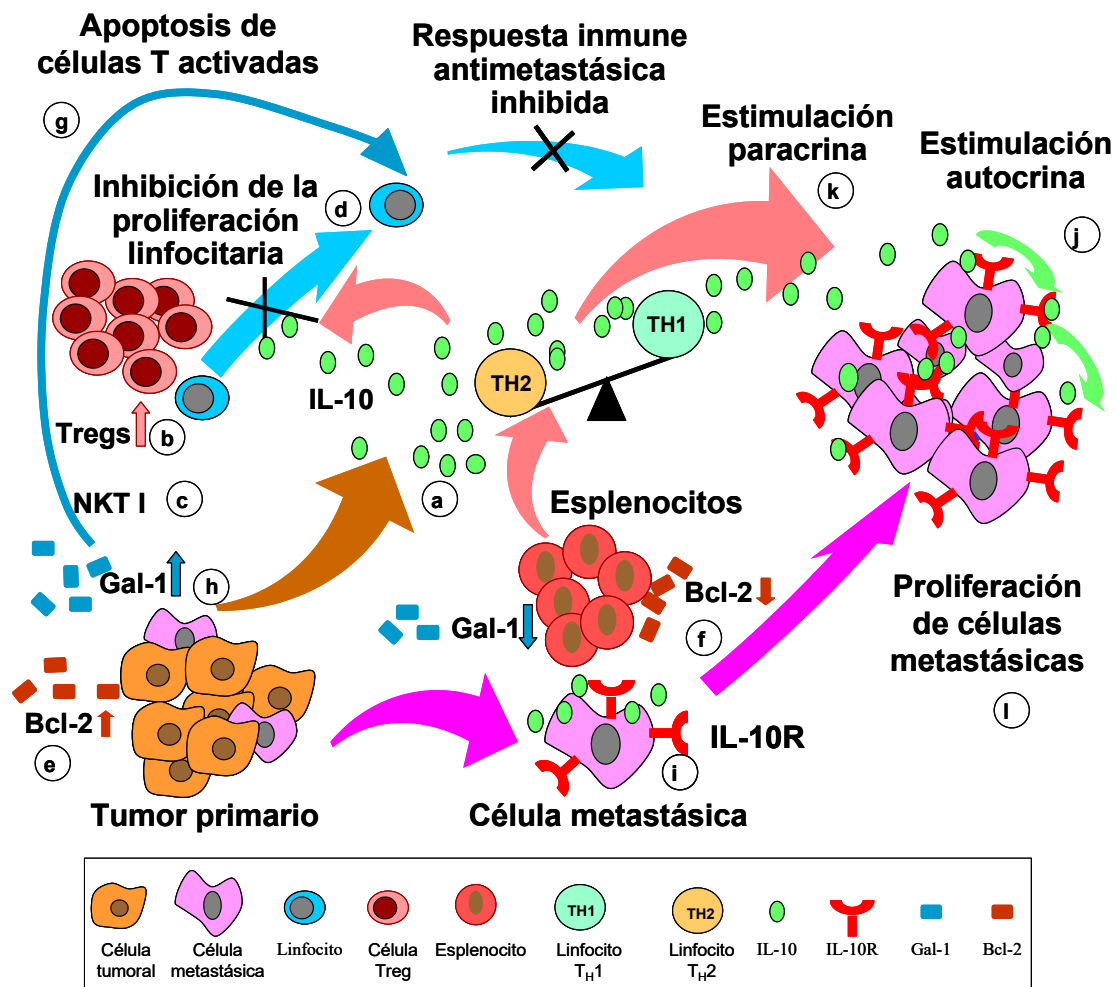


Figura 43. Modificaciones moleculares durante la progresión tumoral y la transición del fenotipo tumoral al metastático.

El tratamiento con una dosis baja y única de Cy, cambia el perfil de citoquinas de T_H2 a T_H1 (IL-2 e IFN- γ) (Fig. 44a) (Matar P, 2002). Al mismo tiempo produce una disminución de las poblaciones Tregs (Fig. 44b) sin modificar el porcentaje de las células NKT I séricas (Fig. 44c). De esta manera, se restaura la linfoproliferación necesaria para una respuesta inmune antitumoral efectiva (Fig. 44d). Se regula negativamente la expresión tumoral de Gal-1 (Fig. 44e) y aumenta la expresión de Bcl-2 en los esplenocitos (Fig. 44f), disminuyendo así la apoptosis de las células inmunes que recuperan su capacidad de actuar contra las células tumorales. A su vez, las células tumorales disminuyen su resistencia a la apoptosis al descender su expresión de Bcl-2 (Fig. 44g). Por otro lado, la disminución de IL-10 e IL-10R inhibe

la estimulación auto- (Fig. 44h) y paracrina (Fig. 44i) de las células metastásicas. La restauración de la respuesta inmune antimetastásica (Fig. 44j) y el efecto citotóxico directo de IFN- γ (Fig. 44k) (Matar P, 2002) inhiben el crecimiento metastático (Fig. 44l).

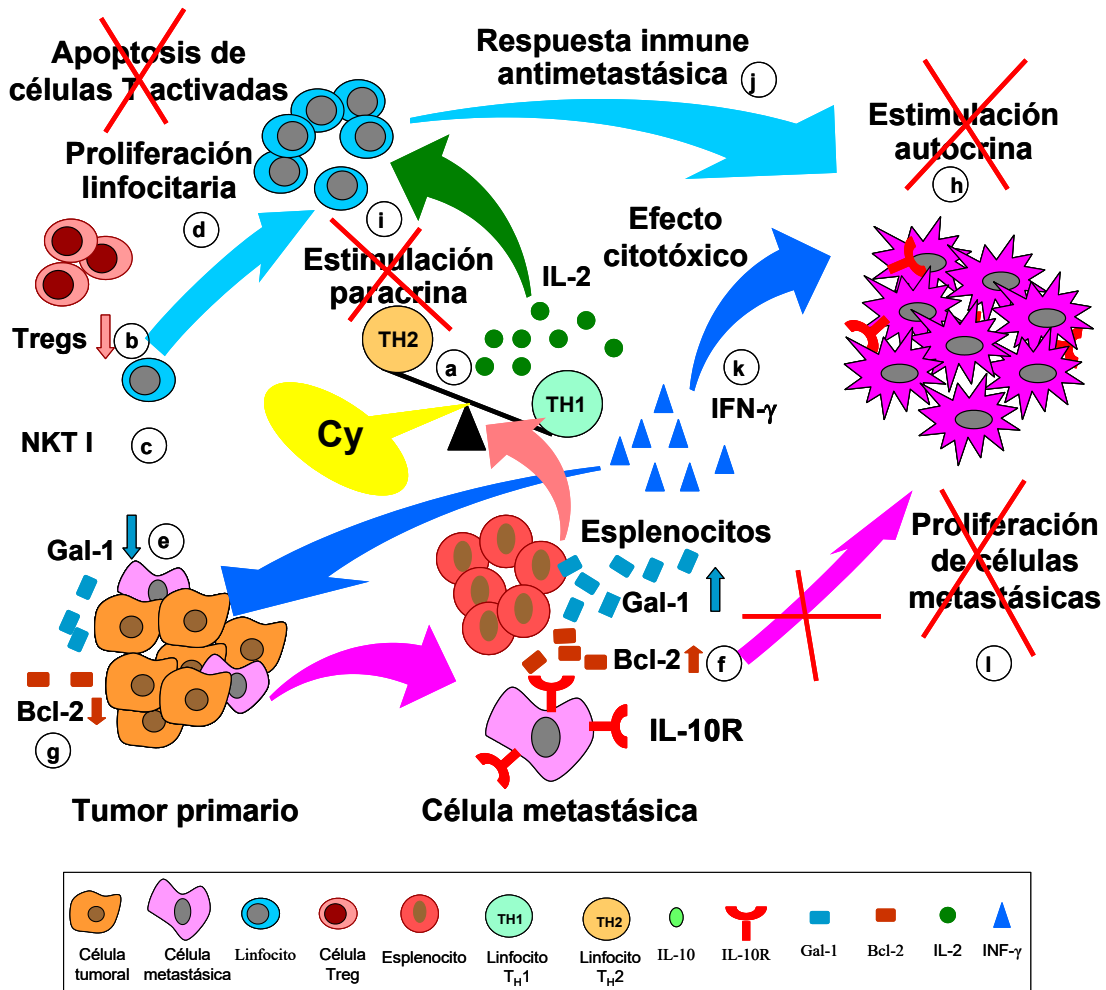


Figura 44. Reversión del fenotipo metastásico por una dosis baja y única de Ciclofosfamida

Este modelo teórico permite comprender algunos de los mecanismos por los cuales tumor y metástasis crecen, aún en presencia de una respuesta inmune. También describe parte de los mecanismos biológicos que explican el efecto antimetastásico de Cy. El modelo planteado es obviamente incompleto ya que, muy probablemente, otros factores celulares y moleculares sean responsables de la regulación de la progresión hacia la malignidad. Sin embargo, brinda una base importante que se podrá ir completando, a medida que se vayan identificando, en estudios futuros, los distintos

elementos que intervienen en el desarrollo y regulación del complejo proceso de la progresión tumoral.

6. Referencias Bibliográficas

- Adams L, Scott GK, Weinberg CS (1996). Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1. *Biochim Biophys Acta*, 1312:137–144
- Allan SE, Broady R, Gregori S, Himmel ME, Locke N, Roncarolo MG, Bacchetta R, Levings MK (2008). CD4⁺ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol Rev*, 223:391-421
- Allione A, Bernabei P, Bosticardo M, Ariotti S, Forni G, Novelli F (1999). Nitric oxide suppresses human T lymphocyte proliferation through IFN-gamma-dependent and IFN-gamma-independent induction of apoptosis. *J Immunol*, 163:4182-4191
- Amano M, Galvan M, He J, Baum LG (2003). The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1-induced CD45 clustering, phosphatase modulation, and T cell death. *J Biol Chem*, 278:7468–7475
- Ambrosino E, Terabe M, Halder RC, Peng J, Takaku S, Miyake S, Yamamura T, Kumar V, Berzofsky JA (2007). Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *J Immunol*, 179:5126-5136
- André S, Pieters RJ, Vrasidas I, Kaltner H, Kuwabara I, Liu FT, Liskamp RM, Gabius HJ (2001). Wedgelike glycodendrimers as inhibitors of binding of mammalian galectins to glycoproteins, lactose maxiclusters, and cell surface glycoconjugates. *Chembiochem*, 2:822–830
- Asselin-Paturel C, Echchadir H, Carayol G, Gay F, Opolon P, Grunenwald D, Chouaib S, Mami-Chouaib F (1998). Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF- β 1 cytokine expression in tumor, TIL and PBL of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer*, 77:7-12
- Audia S, Nicolas A, Cathelin D, Larmonier N, Ferrand C, Foucher P, Fanton A, Bergoin E, Maynadie M, Arnould L, Bateman A, Lorcerie B, Solary E, Chauffert B, Bonnotte B (2007). Increase of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic carcinoma: a Phase I clinical trial using

cyclophosphamide and immunotherapy to eliminate CD4⁺ CD25⁺ T lymphocytes. *Clin Exp Immunol*, 150:523-530

- Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. (1994). Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*, 269:20807-20810
- Baum LG, Pang M, Perillo NL, Wu T, Delegeane A, Uittenbogaart CH, Fukuda M, Seilhamer JJ (1995). Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J Exp Med*, 181:877-887
- Berberat PO, Friess H, Wang L, Zhu Z, Bley T, Frigeri L, Zimmermann A, Büchler MW (2001). Comparative analysis of galectins in primary tumors and tumor metastasis in human pancreatic cancer. *J Histochem Cytochem*, 49:539-549
- Berd D, Mastrangelo MJ (1987). Effect of low dose cyclophosphamide on the immune system of cancer patients: Reduction of T-suppressor function without depletion of the CD8⁺ subset. *Cancer Res*, 47:3317-3321
- Bernstein NL, Buckstein R, Imrie K, Spaner D, Mangel J, Tompkins K, Pennell N, Reis M, Pavlin P, Lima A, Couvadia A, Robinson J, Richardson P. (2002). Bcl-2 clearance: optimising outcomes in follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant*; 29 Suppl 1:S14-7
- Binda MM, Matar P, Rozados VR, Gervasoni SI, Scharovsky OG, Bonfil RD (2000). Correlation between angiostatin generation and concomitant tumor resistance. *Proc Am Assoc Cancer Res*, 41:487
- Blaser C, Kaufmann M, Müller C, Zimmermann C, Wells V, Mallucci L, Pircher H (1998). β -Galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol*, 28:2311–2319
- Blay JY, Burdin N, Rousset F, Lenoir G, Biron P, Philip T, Banchereau J, Favrot MC (1993). Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor. *Blood*, 82:2169-2174
- Bluestone JA, Abbas AK (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, 3:253-257
- Bodgan C, Vodovotz Y, Nathan C (1991). Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med*, 174:1549-1555

- Bohlen H, Kessler M, Sextro M, Diehl V, Tesch H (2000). Poor clinical outcome of patients with Hodgkin's disease and elevated interleukin-10 serum levels. *Ann Hematol*, 79:110-113.
- Bonfil RD & Scharovsky OG (2002). *Oncología molecular y celular. Biología de la célula tumoral* (Hinrichsen L., Scharovsky O. G.), pp. 39-55. Editorial Dunken, Buenos Aires
- Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T (2005). Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 5:744-749
- Brock N, Wilmanns H (1958). The action of a cyclic phosphamide ester of nitrogen mustard on experimental tumors in rats: therapeutic effects and pharmacological properties of B518 ASTA. *Dtsch Med Wochenschr*, 83:453-458
- Buckner CD, Rudolph RH, Fefer A (1972). High-dose cyclophosphamide therapy for malignant disease: Toxicity, tumor response, and the effects of stored autologous marrow. *Cancer*, 29:357-365
- Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, Fornace AJ Jr (1999). Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J*, 18: 6845-6854
- Burnet FM (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*, 13:1-27
- Calderari S, Font MT, Garroq O, Martínez S, Morini JC, Puche R, Tarrés MC (1991). The inbred IIM/Fm stock. *Rat News Lett*, 25:28-29
- Canadian Council on Animal Care. Guidelines on: Procurement of animals used in sciences. 2007. ISBN: 0-919087-46-9
- Cancer. Principles & Practice of oncology (DeVita, Vincent T., Hellman, S., Rosenberg S. A.), pp. 121-134. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia
- Carmeliet P, Jain RK (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801):249-255
- Celoria GC, Hinrichsen LI, Font MT (1986). Tumor behavior of lymphoma TACB in rats resistant or susceptible to sarcoma E-100. *Com Biol (Bs Aires)*, 5:73-83

- Cenderbom L, Hall H, Ivars F (2000). CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol*, 30: 1538-1543
- Chambers AF (1999). The metastatic process: basic research and clinical implications. *Oncol Res*, 11:161-168
- Chau GY, Wu CW, Lui WY, Chang TJ, Kao HL, Wu LH, King KL, Loong CC, Hsia CY, Chi CW (2000). Serum interleukin-10 but not interleukin-6 is related to clinical outcome in patients with resectable hepatocellular carcinoma. *Ann Surg*, 231:552-558
- Chen Q, Daniel V, Maher D, Hersey P (1994). Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int J Cancer*, 56:755-760.
- Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB (2004). Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J*, 19:441–449
- Chung CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA, Miceli MC (2000). Galectin-1 induces partial TCR ζ -chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J Immunol*, 165:3722–3729
- Cindolo L, Benvenuto G, Salvatore P, Pero R, Salvatore G, Mirone V, Prezioso D, Altieri V, Bruni CB, Chiariotti L (1999). Galectin-1 and galectin-3 expression in human bladder transitional-cell carcinomas. *Int J Cancer*, 84:39-43
- Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U (2002). BAFF-induced NEMO-independent processing of NF- κ B2 in maturing B cells. *Nat Immunol*, 3:958-965
- Cohen MC, Cohen S (1996). Cytokine function. A study in biologic diversity. *Am J Clin Pathol*, 105:589-598
- Coope HJ, Atkinson PG, Huhse B, Belich M, Janzen J, Holman MJ, Klaus GG, Johnston LH, Ley SC (2002). CD40 regulates the processing of NF- κ B2 p100 to p52. *EMBO J*, 21:5375-5385
- Cooper DN, Barondes SH (1990). Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol*, 110:1681-1691

- Crowe NY, Coquet JM, Berzins SP, Kyparissoudis K, Keating R, Pellicci DG, Hayakawa Y, Godfrey DI, Smyth MJ (2005). Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J Exp Med*, 202:1279-1288
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 10:942-949
- Danguy A, Camby I, Kiss R (2002). Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1572:285–293
- DeJardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, Li ZW, Karin M, Ware CF, Green DR (2002). The lymphotoxin- β receptor induces different patterns of gene expression via two NF- κ B pathways. *Immunity*, 17:525-535
- Delioukina ML, Blacknall DP, Emmanoulides CD, Nanigian DB, Choi R, Luo J, Territo MC, Baum LG, Baldwin GC (1999). Galectin-1 ameliorates the development and severity of GvHD in a murine model. *Blood*. 94: 392-399
- Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM (2006). *Inmunología Tumoral. Inmunología. Fundamentos*. pp. 426-455. Editorial Panamericana, Buenos Aires
- Devin A, Cook A, Lin Y, Rodriguez Y, Kelliher M, Liu Z (2000). The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*, 12:419-429
- De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo M, Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries J (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II Major Histocompatibility Complex expression. *J Exp Med*: 174: 915-924
- Dieckmann D, Plottner H, Berchtold s, Berger T, Schuler G (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*, 193:1303-1310
- Ding L, Shevach E (1992). IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol*, 148:3133-3139

- Doménico AD, Rabasa SI, Font MT, Suárez JM (1963). Sarcoma E-100. *Ciencia Invest*, 19:462-465
- Donnelly R, Dickensheets H, Finbloom D (1999). The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 19:563-573
- Donnelly R, Dickensheets H, Finbloom D (1999). The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 19: 563-573
- Dummer W, Bastian BC, Ernst N, Schänzle C, Schwaaf A, Bröcker EB (1996). Interleukin-10 production in malignant melanoma: preferential detection of IL-10-secreting tumor cells in metastatic lesions. *Int J Cancer*, 66:607-610
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3:991-998
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21:137–148
- Ellis LM, Fidler IJ (1996). Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer*, 32A(14):2451-2460
- Ewing J (1928). *Metastasis. Neoplastic diseases*. 6th edn. Philadelphia, PA: WB Saunders
- Fattorossi A, Battaglia A, Ferrandina G, Buzzonetti A, Legge F, Salutari V, Scambia G (2004). Lymphocyte composition of tumor draining lymph nodes from cervical and endometrial cancer patients. *Gynecol Oncol*, 92:106-115
- Ferrarini M, Ferrero E, Dagna L, Poggi A, Zocchi MR (2002). Human gammadelta T cells: a nonredundant system in the immune-surveillance against cancer. *Trends Immunol*, 23:14-18
- Fidler IJ (1997). *Molecular biology of cancer. Invasion and metastasis. Cancer. Principles & Practice of oncology* (DeVita, Vincent T., Hellman, S., Rosenberg S. A.), pp. 121-134. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia
- Fidler IJ (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3:453-458
- Fidler IJ, Radinsky R (1990). Genetic control of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 82:166-173

- Fidler IJ, Talmadge JE (1986). Evidence that intravenously derived murine pulmonary melanoma metastases can originate from the expansion of a single tumor cell. *Cancer Res*, 46:5167-5172
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR (1989). Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 170:2081-2095
- Foley EJ (1953). Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin *Cancer Res*, 13:835–837
- Folkman J, Shing Y (1992). Angiogenesis. *J Biol Hem*, 267:10931-10934
- Fuertes MB, Molinero LL, Toscano MA, Ilarregui JM, Rubinstein N, Fainboim L, Zwirner NW, Rabinovich GA (2004). Regulated expression of galectin-1 during T-cell activation involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase and p70S6 kinase. *Mol Cell Biochem*, 267:177–185
- Galvan M, Tsuboi S, Fukuda M, Baum LG (2000). Expression of a specific glycosyltransferase enzyme regulates cell death mediated by galectin-1. *J Biol Chem*, 275:16730–16737
- Garín MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollón E, Wait R, Lechler RI (2007). Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*, 109:2058-2065
- García-Hernández ML, Hernández-Pando R, Gariglio P, Berumen J (2002). Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. *Immunology*, 105:231-243
- Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, Lyakh LA, Karseladze A, Slaga TJ, Budunova IV (2002). The role of IKK in constitutive activation of NF- κ B transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci*, 115:141-151
- Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, Chauffert B, Solary E, Bonnotte B, Martin F (2004). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol*, 34:336-344
- Gianni M, Kopf E, Bastien J, Oulad-Abdelghani M, Garattini E, Chambon P, Rochette-Egly C (2002). Down-regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt

pathway is involved in retinoic acid-induced phosphorylation, degradation, and transcriptional activity of retinoic acid receptor gamma 2. *J Biol Chem*, 277: 24859-24862

- Gibbs VC, Pennica D (1997). CRF2-4: isolation of cDNA clones encoding the human and mouse proteins. *Gene*, 186: 97-101
- Gilboa, E (1999). How tumors escape immune destruction and what we can do about it. *Cancer Immunol. Immunother*, 48:382-385
- Gillenwater A, Xu XC, el-Naggar AK, Clayman GL, Lotan R (1996). Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 18:422-432
- Gillenwater A, Xu XC, Estrov Y, Sacks PG, Lotan D, Lotan R (1998). Modulation of galectin-1 content in human head and neck squamous carcinoma cells by sodium butyrate. *Int J Cancer*, 75:217–224
- Glinisky GV, Price JE, Glinisky VV, Mossine VV, Kiriakova G, Metcalf JB (1996). Inhibition of human breast cancer metastasis in nude mice by synthetic glycoamines. *Cancer Res*, 56:5319–5324
- Han, J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 265:808–811
- Gross L, 1943 (1943). Intradermal immunization of C3H Mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. *Cancer Res*, 3:326-333
- Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J (1998). Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem*, 273:14484-14494
- He J, Baum LG (2004). Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *J Biol Chem*, 279:4705–4712
- Heppener GH (1984). Tumor heterogeneity. *Cancer Res*, 44:2259-2265
- Hermans IF, Chong TW, Palmowski MJ, Harris AL, Cerundolo V (2003). Synergistic effect of metronomic dosing of cyclophosphamide combined with specific antitumor immunotherapy in a murine melanoma model. *Cancer Res*, 63:8408-8413
- Ho AS.-Y, Liu Y, Khan TA, Hsu D, Bazan JF (1993). A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:11267-11271

- Hoel DG, Davis DL, Miller AB, Sondik EJ, Swerdlow AJ (1992). Trends in cancer mortality in 15 industrialized countries, 1969-1986. *J Natl Cancer Inst*, 84:313-326
- Hoover SK, Barret SK, Turk TM, Lee TC, Bear HD (1990). Cyclophosphamide and abrogation of tumor-induced suppressor T cell activity. *Cancer Immunol Immunother*, 31:121-127
- Howard M, O'Garra A (1992). Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today*, 13:198-200
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B. *Cell*. 81:495-504
- Huang LJ, Chen SX, Luo WJ, Jiang HH, Zhang PF, Yi H (2006). Proteomic analysis of secreted proteins of non-small cell lung cancer. *Ai Zheng*, 25:1361-1367
- Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H (2003). Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res*, 9:4404-4408
- Ikehara S, Pahwa RN, Fernandes G, Hansen CT, Good RA (1984). Functional T cells in athymic nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:886-888
- Irvine A. (2000). The immune system versus cancer: can the immune system win? IBC's 4th International Conference on Immunotherapy for Cancer, Coronado, CA, USA, 16-17 August 1999. *Mol Med Today*, 6:7-9
- Javia LR, Rosenberg SA (2003). CD4⁺CD25⁺ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J Immunother*, 26:85-93
- Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G (1997). Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70S6K. *EMBO J*, 16:3693-3704
- Jung EJ, Moon HG, Cho BI, Jeong CY, Joo YT, Lee YJ, Hong SC, Choi SK, Ha WS, Kim JW, Lee CW, Lee JS, Park ST (2006). Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. *Int J Cancer*, 120:2331-8

- Karin M, Ben-neriah Y (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of the NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol*, 18:621-663
- Kato T Jr, Delhase M, Hoffmann A, Karin M (2003). CK2 is a C-terminal I κ B kinase responsible for NF κ B activation during the UV response. *Mol Cell*, 12:829-839
- Kawamura K, Bahar R, Natsume W, Sakiyama S, Tagawa M (2002). Secretion of interleukin-10 from murine colon carcinoma cells suppresses systemic antitumor immunity and impairs protective immunity induced against the tumors. *Cancer Gene Ther*, 9:109-115
- Khatri VP, Caligiuri MA (1998). A review of the association between interleukin-10 and human B-cell malignancies. *Cancer Immunol Immunother*, 46:239-244
- Kiessling R, Wasserman K, Horiguchi S, Kono K, Sjöberg J, Pisa P, Petersson M. (1999). Tumor-induced immune dysfunction. *Cancer Immunol Immunother*; 48:353-362
- Kim J, Modlin RL, Moy RL, Dubinett SM, McHugh T, Nickoloff BJ, Uyemura K (1995). IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *The Journal of Immunology*, 155: 2240-2247.
- Kobayashi M, Kobayashi H, Pollard RB, Suzuki F (1998). A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma. *J Immunol*, 160:5869-5873
- Kreuser E-D, Wadler S, Thiel E (1992). Interactions between cytokines and cytotoxic drugs: putative molecular mechanisms in experimental hematology and oncology. *Seminars in oncology*, 19:1-7
- Krüger-Krasagakes S, Krasagakis K, Garbe C, Schmitt E, Hüls C, Blankenstein T, Diamantstein T (1994). Expression of interleukin 10 in human melanoma. *Br J Cancer*, 70:1182-1185
- Kumar S, Boehm J, Lee JC (2003). p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 2:717-726
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685

- Lagrange PH, Mackaness GB, Miller TE (1974). Potenciation of T-cell mediated immunity by selective suppression of antibody formation with cyclophosphamide. *J Exp Med*, 139:1529-153
- Lahm H, André S, HoeXich A, Kaltner H, Siebert HC, Sordat B, von des Lieth CW, Wolf E, Gabius HJ (2004). Tumor galectinology: insights into the complex network of a family of endogenous lectins. *Glycoconj J*, 20:227–238
- Ladányi A, Nishimura MI, Rosenberg SA, Yang JC (2000). Tumorigenicity and immunogenicity of murine tumor cells expressing an MHC class II molecule with a covalently bound antigenic peptide. *J Immunother*, 23:36-47
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, Strickler JE, McLaughlin MM, Siemens IR, Fisher SM, Livi GP, White JR, Adams JL, Young PL (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 372:739 -746
- Levy G, Tarrab-Hazdai R, Teichberg VI (1983). Prevention and therapy with electrolectin of experimental autoimmune myasthenia gravis in rabbits. *Eur J Immunol*, 13:500-507
- Liu Y, Wei SH.-Y, Ho AS.-Y, de Waal Malefyt R, Moore KW (1994). Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *Journal of Immunology*, 152: 1821-1829
- Liu FT, Rabinovich GA (2005). Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 5:29–41 .
- Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC (2002). Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*, 169:2756-2761
- Lu Y, Lotan D, Lotan R (2000). DiVerential regulation of constitutive and retinoic acid-induced galectin-1 gene transcription in murine embryonal carcinoma and myoblastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1491:13–19
- Lutfalla G, Gardiner K, Uze G (1993). A new member of the cytokine receptor gene family maps on chromosome 21 at less than 35 kb from IFNAR. *Genomics*, 16:366-373

- Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H (2005). Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood*, 105:2862-2868
- Maguire HC, Ettore VL (1967). Enhancement of dinitrochlorobenzene (DNCB) contact sensitization by cyclophosphamide in the guinea pig. *J Invest Dermatol*, 48: 39-43
- Marshall NA, Christie LE, Munro LR, Culligan DJ, Johnston PW, Barker RN, Vickers MA (2004). Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 103:1755-1762
- Matar P, Celoria GC, Font MT, Scharovsky OG (1994). Estimulación de la respuesta antimetastásica a un linfoma de ratón por tratamiento con ciclofosfamida (Cy). *Medicina (Bs. As.)*, 54:544-545
- Matar P, Celoria GC, Font MT, Scharovsky OG (1995). Antimetastatic effect of a single-low dose of cyclophosphamide on a rat lymphoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 14:59-63
- Matar P, Scharovsky OG (1996). Efecto bimodal de la ciclofosfamida en la terapia antineoplásica. *Rev Bras Cancerol*, 42:33-42
- Matar P, Rozados VR, Roggero EA, Bonfil RD, Scharovsky OG (1998). Modulation of the antimetastatic effect of a single low dose of cyclophosphamide on rat lymphoma. *Tumor Biology*, 19:69-76
- Matar P (1998). Ciclofosfamida: su posible rol como modulador de la respuesta antimetastásica. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario
- Matar P, Rozados VR, González AD, Dlugovitzky DG, Bonfil RD, Scharovsky OG (2000). Mechanism of antimetastatic immunopotentiality by low-dose cyclophosphamide. *European Journal of Cancer*, 36:1060-1066
- Matar P, Rozados VR, Gervasoni SI, Scharovsky OG (2001). Down regulation of T-cell-derived IL-10 production by low-dose cyclophosphamide treatment in tumor-bearing rats restores in vitro normal proliferative response. *International Immunopharmacology*, 1:307-319

- Matar P, Rozados VR, Gervasoni SI, Scharovsky OG (2002). Th2/Th1 switch induced by a single low dose of cyclophosphamide in a rat metastatic lymphoma model. *Cancer Immunol Immunother*, 50:588-96
- Matarrese P, Tinari A, Mormone E, Bianco GA, Toscano MA, Ascione B, Rabinovich GA, Malorni W (2005). Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding and Wssion. *J Biol Chem*, 280:6969–6985
- McHugh RS, Whitters MJ, Picirillo CA, Young DA, Shevach EA, Collins M, Byrne MC (2002). CD4+CD25+ Immunoregulatory T cells: Gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*, 16:311-323
- Minato N, Bloom BR, Jones C, Holland J, Reid LM (1979). Mechanism of rejection of virus persistently infected tumor cells by athymic nude mice. *J Exp Med*, 149:1117-1133
- Miyara M, Sakaguchi S (2007). Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*, 13:108-116
- Mizoguchi H, O'Shea JJ, Longo DL, Loeffler CM, McVicar DW, Ochoa AC. (1992). Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science*, 258(5089):1795-1798
- Mokyr MB, Colvin M, Dray S (1985). Cyclophosphamide-mediated enhancement of anti-tumor immune potential of immunosuppressed spleen cells from mice bearing a large MOPC-315 tumor. *Int J Immunopharmacol*, 7:111-122
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19:683-765
- Mortalidad por tumores malignos, 1993-1996 y 1997-2000. Boletín Nro 96. Programa Nacional de Estadísticas de Salud. Dirección de Estadísticas en Informaciones de Salud, Ministerio de Salud, República Argentina, Buenos Aires, 2002
- Mosmann TR, Sad S (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*, 17:138-146

- Nangia-Makker P, Hogan V, Honjo Y, Baccarini S, Trait L, Bresalier R, Raz A (2002). Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. *J Natl Cancer Inst*, 94:1854–1862
- Nicolson GL (1984). Tumor progression, oncogenes and the evolution of metastatic phenotypic diversity. *Clin Exptl Metastasis*, 2:85-105
- Nicolson GL (1991). Gene expression, cellular diversification and tumor progression to the metastatic phenotype. *Bioessays*, 13:337-342
- North RJ (1982). Cyclophosphamide-facilitated immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T-cells. *J Exp Med*, 155:1063-1074
- Nowel PC (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194:23-28
- Offner H, Celnik B, Bringman TS, Casentini-Borocz D, Nedwin GE, Vandenbark AA (1990). Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 28:177-184
- O'Garra A, Vieira P (2004). Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med*, 10:801-5
- Oldham R (1986). Biotherapy: the 4th modality of cancer treatment. *J Cell Physiol (Suppl)*, 4:91-99
- Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F (2005). Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 65:2457-2464
- Pace KE, Hahn HP, Pang M, Nguyen JT, Baum LG (2000). CD7 delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1-induced T cell death. *J Immunol*, 165:2331-2334
- Pace KE, Lee C, Stewart PL, Baum LG (1999). Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J Immunol*, 163:3801-3811
- Pantel K, Brakenhoff RH (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*, 4:448-456

- Pardoll D, Allison J (2004). Cancer immunotherapy: breaking the barriers to harvest the crop. *Nat Med*, 10:887–892
- Pawelec G (1999). Tumour escape from the immune response: the last hurdle for successful immunotherapy of cancer? *Cancer Immunol Immunother*, 48:343–345
- Penninger JM, Irie-Sasaki J, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos AJ (2001). CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat Immunol*, 2:389–396
- Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG (1995). Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, 378:736–739
- Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG (1995). Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, 378(6558):736–739
- Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT, Baum LG (1997). Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes *J Exp Med*, 185(10):1851–1858
- Pisa P, Halapi E, Pisa EK, Gerdin E, Hising C, Bucht A, Gerdin B, Kiessling R (1992). Selective expression of interleukin 10, interferon gamma, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer biopsies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89:7708–7712
- Prehn RT (1994). Stimulatory effects of immune reactions upon the growths of untransplanted tumors. *Cancer Res* 54:908–914
- Prehn RT, Lappé MA (1971). An immunostimulation theory of tumor development. *Transplant Rev*, 7:26–54
- Prehn RT, Outzen HC (1980). Immunostimulation of tumor growth. *Prog Immunol*, 4:651–658
- Rabinovich GA, Modesti NM, Castagna LF, Landa CA, Riera CM, Sotomayor CE (1997). SpeciWc inhibition of lymphocyte proliferation and induction of apoptosis by CLLI, a β -galactoside-binding lectin. *J Biochem*, 122:365–373
- Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, Castagna LF, Wolfenstein-Todel C, Riera CM, Sotomayor CE (1998). Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol*, 160:4831–4840

- Rabinovich GA (1999a). Galectins: an evolutionary conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene. *Cell Death Differ*, 6: 711-721
- Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J, Chernajovsky Y (1999b). Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med*, 190:385–397
- Rabinovich GA, Riera CM, Landa CA, Sotomayor CE (1999c). Galectins: a key intersection between glycobiology and immunology. *Braz J Med Biol Res*, 32:383-393
- Rabinovich GA, Sotomayor CE, Riera CM, Bianco I, Correa SG (2000a). Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur. J. Immunol*, 30:1331-1339
- Rabinovich GA, Ramhorst RE, Rubinstein N, Corigliano A, Daroqui C, Bal de Kier JoVe E, Fainboim L (2002b). Induction of allogeneic T-cell hyporesponsiveness by a galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms. *Cell Death Differ*, 9:661–670
- Rabinovich GA, Rubinstein N, Matar P, Rozados V, Gervasoni S, Scharovsky OG (2002b). The antimetastatic effect of a single low dose of cyclophosphamide involves modulation of galectin-1 and bcl-2 expression. *Cancer Immunol Immunother*, 50:597-603
- Rabinovich GA (2005). Galectin-1 as a potential cancer target. Rabinovich GA. *Br J Cancer*, 92:1188-1192
- Rabinovich GA, Cumashi A, Bianco GA, Ciavardelli D, Iurisci I, D'Egidio M, Piccolo E, Tinari N, Nifantiev N, Iacobelli S (2006). Synthetic lactulose amines: novel class of anticancer agents that induce tumor-cell apoptosis and inhibit galectin-mediated homotypic cell aggregation and endothelial cell morphogenesis. *Glycobiology*, 16:210–220
- Racca AL, Celoria GC, Hinrichsen LI, Graciela Scharovsky O, Font MT (1988). Effect of cyclophosphamide on the growth of a transplantable sarcoma in the rat (S-E 100). *Medicina (B Aires)*, 48:33-38
- Ralph SJ, Thomas ML, Morton CC, Trowbridge IS (1987). Structural variants of human T200 glycoprotein (leukocyte-common antigen). *EMBO J*, 6:1251-1257

- Rappl G, Abken H, Muche JM, Sterry W, Tilgen W, André S, Kaltner H, Ugurel S, Gabius HJ, Reinhold U (2002). CD4 + CD7- leukemic T cells from patients with Sezary syndrome are protected from galectin-1-triggered T cell death. *Leukemia*, 16:40–45
- Reinhold U, Liu L, Sesterhenn J, Abken H (1996). CD7-negative T cells represent a separate differentiation pathway in a subset of post-thymic helper T cells. *Immunology*, 89:391-396
- Rico MJ, Matar P, Bonfil RD, Calcaterra N, Scharovsky OG (2005). The transition to the metastatic phenotype of a rat lymphoma cells involves up-regulation of IL-10 receptor expression and IL-10 secretion. *Clin Exp Metastasis*, 22:127-135
- Rico MJ, Matar P, Zacarías Fluck MF, Giordano R, Scharovsky OG (2007). Low dose cyclophosphamide (Cy) treatment induces a decrease in the percentage of regulatory T cells in lymphoma-bearing rats. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res*, 48:233
- Rico MJ, Matar P, Giordano R, Scharovsky OG (2008). Modulación de las poblaciones NKT I y T reguladoras (Treg) de la respuesta inmune innata durante la evolución del linfoma de rata L-TACB y su tratamiento con Ciclofosfamida (Cy). *Medicina (Buenos Aires)*, 68:179
- Roberts AA, Amano M, Felten C, Galvan M, Sulur G, Pinter-Brown L, Dobbeling U, Burg G, Said J, Baum LG (2003). Galectin-1-mediated apoptosis in mycosis fungoides: the roles of CD7 and cell surface glycosylation. *Mod Pathol*, 16:543–551
- Romieu-Mourez R, Landesman-Bollag E, Seldin DC, Traish AM, Mercurio F, Sonenshein GE (2001). Roles of IKK kinases and protein kinase CK2 in activation of nuclear factor- κ B in breast cancer. *Cancer Res*, 61:3810-3818
- Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev*, 212:28-50
- Rorive S, Belot N, Decaestecker C, Lefranc F, Gordower L, Micik S, Maurage CA, Kaltner H, Ruchoux MM, Danguy A, Gabius HJ, Salmon I, Kiss R, Camby I (2001). Galectin-1 is highly expressed in human gliomas with relevance for modulation of invasion of tumor astrocytes into the brain parenchyma. *Glia*, 33:241-255

- Rosenstein Y, Santana A, Pedraza-Alva G (1999). CD43, a molecule with multiple functions. *Immunol Res*, 20:89-99
- Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, 78:1027–1037
- Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner N, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer O, Rabinovich GA (2004). Targeted inhibition of galectin-1 gene expression results in heightened T-cell-mediated tumor rejection: a novel mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell*, 5:241–251
- Ruddon RW (1995). Characteristics of human cancer. En: *Cancer Biology* 3rd Edition. pp. 3-18. Oxford University Press, Nueva York.
- Sanjuán X, Fernández PL, Castells A, Castronovo V, van den Brule F, Liu FT, Cardesa A, Campo E (1997). Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression. *Gastroenterology*, 113:1906-1915
- Santucci L, Fiorucci S, Cammilleri F, Servillo G, Federici B, Morelli A (2000). Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology*, 31:399-406
- Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer*, 98:1089-1099
- Saussez S, Decaestecker C, Lorfèvre F, Cucu DR, Mortuaire G, Chevalier D, Wacreniez A, Kaltner H, André S, Toubreau G, Camby I, Gabius HJ, Kiss R (2007). High level of galectin-1 expression is a negative prognostic predictor of recurrence in laryngeal squamous cell carcinomas. *Int J Oncol*, 30:1109-1117
- Scharovsky OG, Celoria GC, Font MT (1993). Influence of genetic and environmental factors on susceptibility to metastases. *J Exp Clin Cancer Res*, 12:207-210
- Schirrmacher V (1984). Cancer metastasis. Experimental approaches, theoretical concepts and impacts for treatment strategies. *Adv Cancer Res*, 43:1-73

- Schmelze T, Hall MN (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 103: 253-262
- Schreiber RD, Old LJ, Hayday AC, Smyth MJ (2004). Response to 'A cancer immunosurveillance controversy'. *Nat. Immunol*, 5:4-5
- Sedmak JJ, Grossberg SE (1977). A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem*, 79:544-552
- Seino K, Taniguchi M (2005). Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes. *J Exp Med*, 202:1623-1626
- Seino K, Motohashi S, Fujisawa T, Nakayama T, Taniguchi M (2006). Natural killer T cell-mediated antitumor immune responses and their clinical applications. *Cancer Sci*, 97:807-812
- Sempowski GD, Lee DM, Kaufman RE, Haynes BF (1999). Structure and function of the CD7 molecule. *Crit Rev Immunol*, 19:331-348
- Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25⁺ CD4⁺ T cells: A common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*, 163:5211-5218
- Siu LL, Moore MJ (2005). Pharmacology of anticancer drugs. En: *The basic science of oncology* 4th ed. (Tannock IF, Hill RP, Bristow RG, Harrington L, eds) pp. 322-348. Mc Graw Hill, Nueva York, EEUU
- Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ (2008). Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*, 124:13-22
- Sonoda K-H, Faunce DE, Taniguchi M, Exley M, Balk S, Stein-Streilein J (2001). NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J Immunol*, 166:42-50
- Sorme P, Qian Y, Nyholm PG, LeZer H, Nilsson UJ (2002). Low micromolar inhibitors of galectin-3 based on 3'-derivatization of N-acetylglucosamine. *Chembiochem*, 3:183-189
- Spencer S, Di Marco F, Hooley J, Pitts-Meek S, Bauer M, Ryan A, Sordat B, Gibbs V, Aguet M (1998). The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *J Exp Med*, 187:571-578

- Squartini F, Tumours of the mammary gland (1979). En: Pathology of tumours in laboratory animals. Vol II Tumours of the Mouse. Turusov VS, ed. IARC Scientific Publications N° 23. Lyon. France
- Stewart TH, Heppner GH (1997). Immunological enhancement of breast cancer. *Parasitology Suppl* 115:S141–S153
- Stewart THM (1996). Evidence for immune facilitation of breast cancer growth and for the immune promotion of oncogenesis in breast cancer. *Medicina (Buenos Aires)* 56 (Suppl):13–24
- Talmadge J. E., Fidler I. J. (1989). The pathobiology of neoplasia. Sirica AE (Ed) New York: Plenum Press, 547-572
- Tamada K, Harada M, Abe K, Li T, Tada H, Onoe Y, Nomoto K (1997). Immunosuppressive activity of cloned natural killer (NK1.1+) T cells established from murine tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol*, 158:4846-4854
- Taniyama T, Takai S, Miyazaki E, Fukumura R, Sato J, Kobayashi Y, Hirakawa T, Moore K, Yamada K (1995). The human interleukin-10 receptor gene maps to chromosome 11q23.3. *Hum Genet*, 95: 99-101
- Terabe M, Matsui S, Park JM, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Chen W, Wahl SM, Ledbetter S, Pratt B, Letterio JJ, Paul WE, Berzofsky JA (2003). Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med*, 198:1741-1752
- Terabe M, Berzofsky JA (2007). NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *Trends Immunol*, 28:491-496
- Thiery JP (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol*, 15:740-746
- Thomas L (1959). Reaction of the spleen & thymus of rats to acid & basic nutrition. *Z Mikrosk Anat Forsch*, 65:45-58
- Thomas G, Hall MN (1997). TOR signaling and control of cell growth. *Curr Opin Biol*, 9:782-787
- Turk JL, Parker D, Poulter LW (1972). Functional aspects of the selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide. *Immunology*, 23:493-501

- Turk JK, Parker D (1982). Effecto of chclophosphamide on immunological control mechanisms. *Immunological Rev*, 65:99-113
- Uittenbogaart CH, Higashitani S, Schmid I, Vollger LW, Boone T, Clement LT (1990). Interleukin-4 induces expression of the CD45RA antigen on human thymocyte subpopulation. *Int Immunol*, 2:1179-1189
- Urosevic M, Dummer R (2003). HLA-G and IL-10 expression in human cancer--different stories with the same message. *Semin Cancer Biol*, 13:337-342
- Valzasina B, Piconese S, Guiducci C, Colombo MP (2006). Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent. *Cancer Res*, 66:4488-4495
- van den Br le FA, Buicu C, Berchuck A, Bast RC, Deprez M, Liu FT, Cooper DN, Pieters C, Sobel ME, Castronovo V (1996). Expression of the 67-kD laminin receptor, galectin-1, and galectin-3 in advanced human uterine adenocarcinoma. *Hum Pathol*, 27:1185-1191
- van den Br le FA, Waltregny D, Castronovo V (2001). Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. *J Pathol*, 93:80-87
- van den Br le FA (2004). Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J*, 19:537-542
- Van Kaer L (2007). NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol*, 19:354-364
- Vas V, Fajka-Boja R, Ion G, Dudics V, Monostori E, Uher F (2005). Biphasic eVect of recombinant galectin-1 on the growth and death of early hematopoietic cells. *Stem Cells*, 23:279-287
- Viatour P, Merville, MP, Bours V, Chariot A (2005). Phosphorilation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biol Sci*, 30:44-51
- Vyakarnam A, Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. (1997). Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol*, 17:4730-4737
- Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med*, 10:e17

- Ward H, Vigues S, Poole S, Bristow AF (2001). The rat interleukin 10 receptor: cloning and sequencing of cDNA coding for the alpha-chain protein sequence, and demonstration by western blotting of expression in the rat brain. *Cytokine*, 15:237-240
 - Weinberg RA (2007). *The Nature of Cancer. The biology of Cancer*, pp, 25-56. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York, USA
 - Weinberg RA (2007). *Moving out: Invasion and Metastasis. The biology of Cancer*, pp, 587-654. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York, USA
 - West MJ, Stoneley M, Willis AE (1998). Translational induction of the c-myc oncogene via activation of the FRAP/TOR signaling pathway. *Oncogene*, 17:769-780
 - Wilson KP, Fitzgibbon MJ, Caron PR, Griffith JP, Chen W, McCaffrey PG, Chambers SP, Su MS (1996). Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 271:27696-27700
 - Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH (2001). Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer *Cancer Res*, 61:4766-4772
 - Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R (1995). Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol*, 147:815-822
 - Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 10:e17
 - Yasunami R, Bach J-F (1988). Anti-suppressor effect of cyclophosphamide on the development of spontaneous diabetes in NOD mice. *Eur J Immunol*, 18:481-484
 - Yue FY, Dummer R, Geertsens R, Hofbauer G, Laine E, Manolio S, Burg G (1997). Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer*, 71:630-637
 - Zacarías Fluck MF, Rico MJ, Rozados VR, Rabinovich GA, Scharovsky OG (2007).
- Galectin-1: a potentiometer in a servomechanism generated at the interface of the tumor and the immune system? *Proc. Am. Assoc. Cancer Res*, 48:1208

- Zhu XL, Liang L, Ding YQ (2007). Galectin-1 expression in human colorectal carcinoma and its clinical significance. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 27:1331-1334
- Zhou Q, Cummings RD (1990). The S-type lectin from calf heart tissue binds selectively to the carbohydrate chains of laminin. *Arch Biochem Biophys*, 281:27-35

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de tesis fueron publicados en los siguientes artículos originales:

- **María José Rico**, Pablo Matar, R. Daniel Bonfil, Nora Calcaterra, O. Graciela Scharovsky
The transition to the metastatic phenotype of a rat lymphoma cells involves up-regulation of IL-10 receptor expression and IL-10 secretion
Clin Exp Metastasis, 2005; 22 (2):127-135
- Mariano F. Zacarías Fluck, **María J. Rico**, Silvia I. Gervasoni, Juan M. Ilarregui, Marta A. Toscano, Gabriel A. Rabinovich, O. Graciela Scharovsky
Low dose cyclophosphamide modulates galectin-1 expression and function in an experimental rat lymphoma model
Cancer Immunol Immunother, 2007; 56 (2): 237-248
- O. Graciela Scharovsky, Pablo Matar, Mariano Zacarías Fluck, **María José Rico** and Gabriel A. Rabinovich
From tumor-immune surveillance to tumor-immune escape: story of an enemy with multiple strategies of resistance and counterattack
Inmunología, 2006; 25(2):101-114
- Croci DO, Zacarías Fluck MF, **Rico MJ**, Matar P, Rabinovich GA, Scharovsky OG
Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment.
Cancer Immunol Immunother, 2007; 56 (11):1687-1700
- **María J. Rico**, Pablo Matar, O. Graciela Scharovsky.
Modulation of IL-10/IL-10R expression by mafosfamide -a derivative of 4-hydroxycyclophosphamide in a rat B-cell lymphoma. *Enviado*
- **María J. Rico**, Pablo Matar, Ricardo J. Giordano, O. Graciela Scharovsky
Tregs and NKT I modulation by low dose cyclophosphamide in an experimental rat lymphoma model. *En preparación*.

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de tesis fueron presentados en las siguientes reuniones científicas:

- **Rico MJ**, Zacarías MF, Matar P, Rubinstein N, Toscano MA, Rabinovich GA, Scharovsky OG.
IL-10, IL-10R and Galectin.1 (Gal-1) are molecular targets of low dose cyclophosphamide (Cy) in a rat B-cell lymphoma tumor model.
95th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Orlando, Florida. Marzo de 2004.
Proc Am Assoc Cancer Res, 2004; 45:151
- **Rico MJ**, Zacarías MF, Matar P, Rubinstein N, Toscano MA, Rabinovich GA, Scharovsky OG.
IL-10, receptor de IL-10 (IL-10R) y Galectina-1 (Gal-1): blancos moleculares de ciclofosfamida (Cy) en dosis baja en un modelo de linfoma de rata (L-TACB).
Reunión Anual de Trabajos de la Asociación Argentina de Oncología Clínica. Rosario. Julio de 2004.
Oncología Clínica, 2004; 9:1055
- **Rico MJ**, Zacarías MF, Rubinstein N, Ilarregui JM, Toscano MA, Rabinovich GA, Scharovsky OG
Cinética de expresión de Galectina-1 (Gal-1) y su efecto sobre la viabilidad de esplenocitos en un modelo de ratas portadoras de un linfoma B tratadas con Ciclofosfamida (Cy).
Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas. Mar del Plata. Noviembre de 2004.
Medicina (Buenos Aires), 2004; 64:200
- Zacarías MF, **Rico MJ**, Rubinstein N, Ilarregui JM., Toscano MA., Rabinovich GA, Scharovsky OG
Kinetics of Galectin-1 (Gal-1) expresión and its effect on spleen cells viability of B-cell lymphoma bearing rats treated with a single-low dose Cyclophosphamide (Cy).
96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Anaheim, California. Abril de 2005.
Proc Am Assoc Cancer Res, 2005; 46:1423
- Zacarías MF, **Rico MJ**, Ilarregui JM, Rabinovich GA, Scharovsky OG
Galectin-1 (Gal-1) is a molecular target of an antimetastatic dose of Cyclophosphamide (Cy) in a rat B-cell lymphoma tumor model.
Congreso Latinoamericano de Inmunología, Córdoba. Octubre de 2005.
Libro de Resúmenes Congreso Latinoamericano de Inmunología, 2005; 19
- **Rico MJ**, Zacarías MF, Rabinovich GA, Scharovsky OG
Cinética de la expresión de Galectina-1 (Gal-1) y su relación con la respuesta inmune en modelos tumorales murinos.

XXIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Rosario. Diciembre de 2005.

Biocell, 2006; 30 (2):386

- **Rico MJ**, Matar P, Zacarías Fluck MF, Giordano RJ, Scharovsky OG
La terapia inmunomoduladora con Ciclofosfamida (Cy) disminuye el porcentaje de linfocitos T reguladores en ratas portadoras de un linfoma.
LI Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica – LIV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata. Noviembre de 2006.
Medicina (Buenos Aires), 2006; 66:168
- Zacarías Fluck MF, **Rico MJ**, Gervasoni SI, Rossa A, Roggero E, Rabinovich GA, Scharovsky OG
Cinética de expresión de galectinas 1 y 3 (Gal-1, Gal-3) en el linfoma murino L-DGE y su modulación por ciclofosfamida (Cy).
VIII Congreso, XXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Rosario. Diciembre de 2006.
Biocell, 2007; 31(1):120
- Rozados VR, Mainetti LE, **Rico MJ**, Zacarías Fluck MF, Matar P, Scharovsky OG
Efecto antiangiogénico e inmunomodulador de la terapia metronómica con ciclofosfamida (Cy).
VIII Congreso, XXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Rosario. Diciembre de 2006.
Biocell, 2007; 31(1):119
- **Rico MJ**, Matar P, Zacarías Fluck MF, Giordano RJ, Scharovsky OG.
Low dose cyclophosphamide (Cy) treatment induces a decrease in the percentage of regulatory T cells in lymphoma-bearing rats
98th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Los Angeles, California. Abril de 2007.
Proc Am Assoc Cancer Res, 2007; 48:233
- Zacarías Fluck M.F, **Rico MJ**, Rozados VR, Rabinovich GA, Scharovsky OG
Galectin-1: a potenciometer in a servomechanism generated at the interface of the tumor and the immune system?
98th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Los Angeles, California. Abril de 2007.
Proc Am Assoc Cancer Res, 2007; 48:1208
- **Rico MJ**, Zacarías Fluck MF, Matar P, Rabinovich GA, Scharovsky OG
Modelo teórico de la interacción del linfoma L-TACB en progresión con el sistema inmune y el efecto de una dosis baja de ciclofosfamida

LII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica – LV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología- Reunión de la Sociedad Argentina de Fisiología. Mar del Plata. Noviembre de 2007.
Medicina (Buenos Aires), 2007; 67:204

- Zacarías Fluck MF, **Rico MJ**, Rozados VR, Rabinovich GA, Scharovsky OG
Modulación de la expresión de Galectina-1 por el Sistema Inmune en tres modelos tumorales murinos
IX Congreso XXVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario. Noviembre de 2007.
Biocell, 2008; 32 (3):A4
- **Rico MJ**, Matar P, Giordano RJ, Scharovsky OG
Modulación de las poblaciones NKT I y T reguladoras (Treg) de la respuesta inmune innata durante la evolución del linfoma de rata L-TACB y su tratamiento con Ciclofosfamida (Cy)
LIII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica – Reunión de la Sociedad Argentina de Fisiología. Mar del Plata. Noviembre de 2008.
Medicina (Buenos Aires), 2008; 68:179
- **Rico MJ**, Matar P, Scharovsky OG
Estudio del sistema de regulación IL-10/IL-10R y su modulación por Mafosfamida en el linfoma de rata Nb2
X Congreso XXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Rosario. Diciembre de 2008.
Biocell, en prensa

