



UGR

Universidad
de Granada

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular III e Inmunología

Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología

Hospital Universitario Virgen de las Nieves

Heterogeneidad intratumoral en la expresión de moléculas MHC en el tumor murino GR9: mecanismos moleculares implicados y comportamiento biológico *in vivo*.

Irene Romero García³

Junio 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Irene Romero García
D.L.: GR 3128-2012
ISBN: 978-84-9028-251-9

El doctorando Irene Romero García y los directores de la tesis Federico Garrido Torres-Puchol y Ángel García Lora garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Firma del doctorando:

Fdo: Irene Romero García

Directores de la Tesis:

Fdo.: Federico Garrido Torres-Puchol

Fdo: Ángel Miguel García Lora

D. Federico Garrido Torres-Puchol, Catedrático de Inmunología del departamento de Bioquímica, Biología Molecular III e Inmunología, Universidad de Granada, y Jefe del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

CERTIFICA: Que le presente trabajo de investigación titulado: **Heterogeneidad intratumoral en la expresión de moléculas MHC en el tumor murino GR9: mecanismos moleculares implicados y comportamiento biológico *in vivo***, ha sido realizado bajo mi dirección por Irene Romero García, para optar al título de doctor en Químicas.

Y para que conste se firma el presente certificado en Granada a 28 de Mayo de 2012

Federico Garrido Torres-Puchol

D. Ángel Miguel García Lora, Doctor en Químicas e Investigador del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

CERTIFICA: Que le presente trabajo de investigación titulado: **Heterogeneidad intratumoral en la expresión de moléculas MHC en el tumor murino GR9: mecanismos moleculares implicados y comportamiento biológico *in vivo***, ha sido realizado bajo mi dirección por Irene Romero García, para optar al título de doctor en Químicas.

Y para que conste se firma el presente certificado en Granada a 28 de Mayo de 2012

Ángel Miguel García Lora

A mis padres
A mis hermanos

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Federico Garrido, director de esta tesis, por brindarme la oportunidad de participar en esta línea de investigación bajo su dirección.

Al Dr. Ángel García, director de esta tesis, por haber confiado en mí para realizar este trabajo. Gracias por estar ahí para ayudarme hasta el último día. Sin tu optimismo y tu paciencia no estaríamos aquí. Gracias por el paseo en moto.

Al Dr. Ignacio Algarra por su inestimable colaboración en los ensayos.

A Antonia y Encarnita por la gran ayuda que nos prestan desde el animalario del Hospital Universitario Virgen de las Nieves.

A mis chicas del "Mouse Team", Isabel, Ana y Cristina, sin vuestra inestimable ayuda habría sido mucho más difícil llegar hasta aquí. Gracias por vuestros ánimos y apoyarme siempre.

A todos los compañeros del Servicio de Análisis Clínicos tanto a los que se fueron, como a los que continúan compartiendo conmigo tantas mañanas de trabajo. Especialmente a Teresa, Anabel, Quique y Ana R.

A mi familia, especialmente a mis padres por apoyarme siempre en las buenas y en las malas. Sois un ejemplo para mí.

INDICE

RESUMEN.....	15
INTRODUCCIÓN	19
1.- ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN HUMANOS.....	21
1.1.- Genética del sistema HLA	21
1.2.- Genética del sistema H-2 murino.....	23
1.3.- Estructura y función de las moléculas MHC.....	25
1.3.1.- Moléculas MHC de clase I.....	26
1.3.2.- Moléculas MHC de clase II.....	29
1.4.- Procesamiento, transporte, ensamblaje y presentación de péptidos antigénicos.	30
2.- LATENCIA Y PROGRESIÓN TUMORAL: IMPLICACIONES DEL SISTEMA INMUNE.....	41
2.1.- Teoría de la inmuoedición del cáncer	44
2.1.1.- La fase de eliminación.....	45
2.1.2.- La fase de equilibrio	48
2.1.3.- Fase de escape.....	50
2.2.- Control inmunológico del cáncer: modelos murinos de latencia	51
2.3.- El estado de latencia en cáncer reflejado en la práctica clínica.....	54
2.4.- Mecanismos moleculares no inmunes implicados en el periodo de latencia en el cáncer.....	56
2.4.1.- Relación entre la latencia en cáncer y angiogénesis	57
2.4.2.- Otros mecanismos implicados en la latencia de los tumores.....	58
3.- MECANISMOS DE ESCAPE TUMORAL	60
3.1.- Mecanismos que inducen tolerancia y/o anergia.....	60
3.1.1.- Células Inmunosupresoras.....	60
3.1.2.- Ausencia de coestimulación	62
3.1.3.- Citoquinas inmunosupresoras	63
3.1.4.- Degradación enzimática del triptófano.....	65
3.1.5.- Señalización defectiva a través de los receptores de muerte	66
3.1.6.- Apoptosis de linfocitos T activados.....	67
3.2.- Mecanismos de evasión	68
3.2.1.- Pérdida de antígenos tumorales e inmunodominancia	68

3.2.2.- Alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I.....	69
3.3.- Fenotipos alterados en las moléculas MHC de clase I.....	69
4.- MODELOS EXPERIMENTALES MURINOS EN CANCER: MODELO GR9	77
4.1.- Modelos murinos de progresión metastásica	78
4.2.- Modelo tumoral murino GR9.....	83
4.2.1.- Estudios centrados en el clon GR9-B9.....	85
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	93
MATERIALES Y MÉTODOS.....	97
1.- LÍNEAS CELULARES	99
2.- CONGELACIÓN DE LAS CÉLULAS	99
3.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	100
4.- ENSAYOS CELULARES IN VIVO.....	100
4.1.- Ensayos de capacidad oncogénica local	100
4.2.- Ensayos de metástasis espontáneas.....	101
4.3.- Ensayos de metástasis experimentales	101
4.4.- Protocolo de inmunodepleción en ensayos de metástasis espontáneas con el clon GR9-B11	102
4.5.- Protocolo de inmunodepleción en ensayos de metástasis experimentales con el clon GR9-B11	103
5.- ENSAYOS CELULARES IN VITRO	105
5.1.- Ensayos de migración e invasión.....	105
5.2.- Transfección de las líneas celulares murinas con siRNA sintéticos	105
5.3.- Clonación del gen Fhit y transfección de la línea celular GR9-B9.....	106
6.- RECUPERACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE BAZO	107
7.- SEPARACIÓN DEL INFILTRADO DEL PULMÓN.....	107
8.- ANTICUERPOS Y ANALISIS DE EXPRESIÓN EN SUPERFICIE POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	108
8.1.- Expresión de moléculas H-2 de clase I.....	108
8.2.- Expresión de moléculas MHC de clase I no clásicas y MHC de clase II.....	109
8.3.- Análisis de subpoblaciones de células inmunes de bazo y pulmón.....	109
9.- RT-PCR Y RT-PCR A TIEMPO REAL.....	110
10.- ANÁLISIS POR MICROARRAYS	110
11.- WESTERN-BLOT.....	111
12.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	112
RESULTADOS	115

1.- EL GEN SUPRESOR DE TUMORES FHIT REGULA POSITIVAMENTE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS MHC DE CLASE I.....	119
1.1.- Expresión en superficie de las moléculas MHC-I de clase I en el sistema tumoral GR9-B9.....	119
1.2.- Estudio del mecanismo responsable de la ausencia de expresión en superficie de las moléculas MHC-I.....	120
1.3.- Identificación de otros genes diferencialmente expresados entre las líneas celulares H-2 clase I negativas y positivas.....	121
1.4.- Análisis por RT-PCR a tiempo real de los niveles de transcripción de los genes AP-2 α , FHIT, Glis1, y c-Myc en el sistema GR9-B9	123
1.5.- Análisis de la implicación de los genes supresores de tumores Fhit y AP-2 α en la expresión de las moléculas MHC de clase I	125
1.5.1.- Silenciamiento de la expresión de AP-2 α mediante siRNA en la línea tumoral MN4.5.....	126
1.5.2.- Silenciamiento de la expresión de Fhit mediante oligos siRNA en la línea celular MN4.5.....	128
1.5.3.- Implicación de Fhit en la regulación transcripcional de la APM y cadenas pesadas en líneas celulares tumorales de diferente histología	131
1.6.- Transfección del gen Fhit en líneas celulares MHC-I negativas	133
2.- HETEROGENEIDAD INTRATUMORAL EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS MHC-I EN UN TUMOR PRIMARIO DETERMINA SU COMPORTAMIENTO ONCOGÉNICO Y METASTÁSICO.....	136
2.1.- Fenotipo H-2 de clase I de los clones tumorales seleccionados	136
2.2.- Correlación entre los niveles de transcripción de los componentes del APM y de las cadenas pesadas y la expresión en superficie de las moléculas MHC-I ..	138
2.3.- Relación entre el fenotipo MHC-I y la capacidad oncogénica local <i>in vivo</i> ..	140
2.4.- Relación entre el fenotipo MHC-I y la capacidad de producir metástasis espontáneas	142
2.5.- Comparación de la capacidad de migrar e invadir <i>in vitro</i>	144
2.6.- Clasificación de las líneas metastásicas en diferentes fenotipos H-2 de clase I	146
2.7.- Comparación de la capacidad para generar metástasis experimentales del clon GR9-A7 y GR9-B11.....	149
3.- METÁSTASIS ESPONTÁNEAS PUEDEN SER COMPLETAMENTE CONTROLADAS EN UN ESTADO DE LATENCIA POR EL SISTEMA INMUNE ..	151
3.1.- Fenotipo H-2 de clase I del clon GR9-B11 y los tumores locales generados en ratones inmunocompetentes.....	151
3.2.- Ensayos de metástasis espontáneas en ratones BALB/c inmunodeficientes (nu/nu).....	152
3.3.- Estudio de la respuesta inmune	155

3.4.- Estudio de la implicación de los linfocitos T y de las células NK en el control de las células diseminadas	159
3.5.- Comportamiento del clon GR9-B11 en ensayos de metástasis experimentales en ratones BALB/c inmunocompetentes e inmunodeplecionados	162
3.6.- Fenotipos H-2 de las metástasis experimentales obtenidas con el clon GR9-B11	163
3.7.- La pérdida de expresión de la molécula H-2 L ^d ocurre a nivel transcripcional	164
DISCUSIÓN	167
CONCLUSIONES	189
BIBLIOGRAFÍA	193
ANEXOS	221
I. ARTÍCULOS	223

RESUMEN

Uno de los factores que más pueden influir en el fracaso de los tratamientos antitumorales es la amplia heterogeneidad intratumoral. Los tumores se componen de una población muy diversa de células tumorales que exhiben una amplia gama de fenotipos genéticamente heterogéneos. La aparición de estos fenotipos es consecuencia, en parte, de la inmunovigilancia antitumoral ejercida sobre las células tumorales, lo que produce la “escultura inmunológica” de las lesiones tumorales. El sistema inmune ejerce una presión selectiva contra el tumor eliminando aquellas variantes tumorales más inmunogénicas, mientras que las células tumorales que presentan alteraciones que les permiten escapar del control inmunológico y la destrucción, continúan progresando. Cuál de estos efectos predomina depende del equilibrio entre los mecanismos moleculares de la evasión inmune y la respuesta antitumoral de la inmunidad innata y adaptativa. Las células que escapan, propagan el cáncer a órganos distantes del tumor primario, lo que termina afectando a su función y finalmente pueden llevar a la muerte del paciente.

En este trabajo de investigación nos hemos centrado en estudiar la heterogeneidad intratumoral con respecto a la expresión en superficie de moléculas MHC de un tumor murino, GR9. Se ha estudiado cómo se comportan *in vivo* diferentes clones aislados directamente de un tumor primario y que se diferencian en su fenotipo MHC-I. Se han seleccionado diferentes clones: GR9-A7 con expresión alta de moléculas MHC-I, GR9-B7 con una expresión intermedia, GR9-C5 con una expresión baja y con expresión prácticamente negativa GR9-B11. Realizando ensayos *in vivo* e *in vitro*, mostramos que el fenotipo MHC-I de una célula tumoral puede determinar su capacidad oncogénica y metastásica, existiendo relación directa entre los niveles de expresión en superficie de moléculas MHC-I y la capacidad metastásica e indirecta con la oncogenicidad local. Estudiando el diferente comportamiento biológico de estos clones, hemos encontrado unos resultados que nos han permitido profundizar en el

papel desempeñado por el sistema inmune en el control metastásico. El clon GR9-B11 no genera metástasis espontáneas en huéspedes inmunocompetentes, a pesar de que presenta una alta capacidad oncogénica local. Este dato nos hizo pensar que el sistema inmune podría estar implicado en el control de la diseminación metastásica de este clon. Cuando los mismos ensayos fueron realizados en ratones inmunodeficientes, nude, si se generaron metástasis espontáneas, confirmando una posible implicación del sistema inmune. Ensayos de depleción de diferentes poblaciones celulares del sistema inmune, mostraron que las células metastásicas diseminadas estaban siendo mantenidas en un estado de latencia por el sistema inmune. Solamente la depleción de linfocitos TCD8+ o células NK era suficiente para que las células metastásicas “despertaran” continuando su progresión hasta generar metástasis pulmonares. Estos resultados demuestran que el sistema inmune es suficiente para controlar la progresión metastásica de células tumorales en nuestro modelo tumoral.

También hemos profundizado en los mecanismos moleculares que intervienen en la aparición de fenotipos MHC-I alterados en nuestro modelo tumoral. En células tumorales ha sido ampliamente descrita la aparición de fenotipos MHC-I alterados y existen múltiples mecanismos moleculares implicados en estos defectos. Una de las alteraciones encontradas conlleva la pérdida completa de expresión en superficie de moléculas MHC-I, debido a una baja regulación a nivel transcripcional de varios componentes de la maquinaria de procesamiento antigénica y/o de las cadenas pesadas MHC-I. El mecanismo molecular que produce esta alteración era desconocido. En el modelo tumoral murino GR9, nosotros hemos encontrado que la pérdida de expresión del gen supresor de tumores Fhit es la responsable de esta alteración. Su reexpresión mediante transfección génica promovió la recuperación de la expresión en superficie de las tres moléculas H-2 de clase I en células tumorales.

INTRODUCCIÓN

1.- ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN HUMANOS

El descubrimiento en los años 50 de los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en humanos, se debió a la reacción de aglutinación originada al enfrentar sueros de pacientes politransfundidos con leucocitos extraños. En humanos se denominan HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos) y existen dos grandes grupos de moléculas: las HLA de clase I, representado en humanos por las moléculas HLA-A, -B y -C; y las HLA de clase II, que incluye las moléculas HLA-DP, -DQ y -DR. Las moléculas HLA de clase I se expresan en todas las células nucleadas de los vertebrados, mientras que las de clase II tienen una expresión más restringida a células especializadas en la presentación de antígenos. Existen otras moléculas de histocompatibilidad, son las denominadas “no clásicas”, entre este grupo destacan de manera más significativa las moléculas de histocompatibilidad HLA-G, HLA-E y HLA-F, que presentan una gran homología con las moléculas clásicas de clase I (HLA-A, -B y -C), aunque poseen una función, exposición y polimorfismo diferencial.

1.1.- Genética del sistema HLA

Los genes de HLA están localizados en el brazo corto del cromosoma 6 en humanos, en la porción distal de la banda 6p21.3, ocupando un espacio aproximado de 4 Mbp (aproximadamente el 1% del genoma humano) (Campbell and Trowsdale 1993). La región genética formada por el sistema HLA se organiza en diferentes subregiones o locus estrechamente ligados entre sí, heredándose de forma mendeliana codominante, dando origen al sistema más polimórfico existente en humanos. Esta región contiene múltiples genes expresados y no expresados ordenados en tres grupos: la región de clase I, la de clase II y la de clase III (Aguado and Campbell 1999).

En la región de clase I, se encuentran los genes que codifican la cadena pesada de las moléculas de clase I. Dentro de esta región, además de los genes HLA clásicos

(HLA-A, -B y -C), se encuentran los genes no clásicos (HLA-E, -F, -G) y un grupo de genes MIC (MIC A-E). Estos últimos genes presentan una expresión reducida y restringida a ciertos tejidos como el timo, hígado, intestino o placenta. Además presentan bajo grado de polimorfismo. De los cinco genes MIC, sólo MIC A y MIC B (localizados entre el factor de necrosis tumoral (TNF) y el locus HLA B) se expresan. Existen también pseudogenes (HLA-H, -J, -K, -L, -X), genes incompletos o truncados y genes de los que no se conoce su función (Beck et al. 1997).

En la región II (1000-1200 kb), a diferencia de la anterior, si se encuentran los genes que codifican las dos cadenas polipeptídicas (α y β) que constituyen las moléculas HLA de clase II. Estos genes se encuentran localizados en la región HLA-D, que se subdivide en tres regiones funcionales ordenadas por su proximidad al centrómero: HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR (Trowsdale et al. 1985). Otros genes localizados en esta región son los que codifican las proteínas transportadoras de los péptidos de las moléculas de clase I, TAP1 y TAP2 (Spies et al. 1989; Trowsdale et al. 1990), y los genes relacionados con el proteosoma, LMP2 y LMP7 (Brown et al. 1991; Glynn et al. 1991; Kelly et al. 1991).

En la región de clase III (680 kb), que ocupa una posición central, no se localizan genes que codifican moléculas HLA sino otras proteínas relacionadas con el sistema inmunológico como son: las proteínas del complemento, Factor B, C2 y C4; el TNF y los genes HSP70 (Aguado and Campbell 1999). También se localizan los genes BAT2 (G2) y BAT3 (G3) asociados a células B y otros genes no relacionados con el sistema inmunológico. El gen de la β_2 microglobulina se localiza en el cromosoma 15, independiente por tanto del complejo MHC (Goodfellow et al. 1975).

El sistema HLA es altamente polimórfico debido a los múltiples alelos presentes para cada uno de los genes conocidos. Mediante ensayos celulares y serológicos se

ha podido determinar la existencia de aproximadamente 150 alelos distintos, pero actualmente mediante el tipaje genómico están encontrándose muchas especificidades nuevas que multiplican esa cifra inicial.

1.2.- Genética del sistema H-2 murino

Debido al pequeño tamaño del complejo H-2 la recombinación entre sus extremos es rara, y cada par de alelos se transmite de una generación a otra como un set. Los alelos transmitidos juntos como una unidad en cada miembro de un par cromosómico se denominan haplotipo. Los haplotipos de las cepas más comúnmente usadas son estándar y se les asigna unos determinados alelos. Por ejemplo a la cepa BALB/c le corresponde el haplotipo H-2^d, que consiste en K^d, Ab^d, Aa^d, Eb^d, Ea^d, D^d, y L^d. Las recombinaciones ocasionales en el complejo dan lugar a la existencia de haplotipos recombinantes donde los alelos de los locus derivan de diferentes tipos originales. Las moléculas H-2 de clase I son tres; K, D y L, y están localizadas en la región K y D del complejo. Son las equivalentes a las moléculas HLA-A, B y C en el complejo HLA humano (Fig.1).

Las moléculas de clase II se localizan en la región I del complejo H-2. Son de dos tipos, α y β , ambas son codificadas por separado, aunque sus productos están combinados en la superficie celular de forma no covalente (Jones 1997). Hay dos locus α funcionales (Aa y Ea), y dos locus β funcionales (Ab y Eb), aunque algunos ratones portan deleciones que implican a uno o más de estos locus (ej. el haplotipo H2^b pierde Eb). Estos son los equivalentes a los locus DR, DP, DQ del complejo HLA humano. Los productos de los locus Aa y Ab combinan y forman el dímero I-A, mientras los codificados por Ea y Eb forman el dímero I-E. En general, a los dímeros I-A y I-E se les llama moléculas IA e IE.

Fuera de la región telomérica del complejo H-2, junto a la región D, se encuentran los locus de los genes de clase I no clásicos o genes de clase Ib (Fig.1). Estos genes incluyen las regiones Q (o Qa), T (o Tla) y M. Estos locus de clase I no clásicos codifican productos similares en tamaño y estructura a los de los locus K, D y L. Igual que estos, sus productos se asocian a β_2 -microglobulina en la superficie celular, pero son poco polimórficos, y se expresan en un número limitado de células. El número de estos locus varía de un haplotipo H-2 a otro.

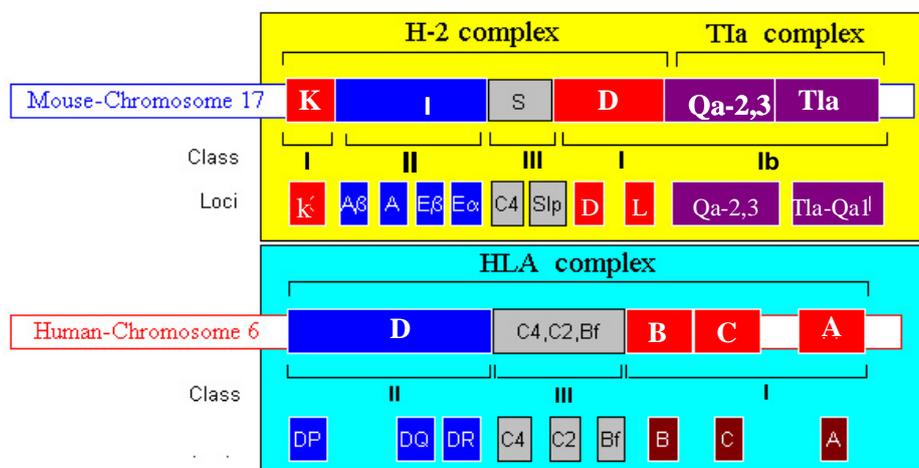


Figura 1. Mapa genético HLA/H-2. La figura muestra la similitud entre el sistema HLA humano y H-2 murino a pesar de encontrarse en diferentes cromosomas. Se observa que la región de clase I humana comprende los locus A, B y C mientras que los genes de clase I murinos se encuentran en la región K y D y comprenden los locus K, D y L.

Los genes de clase III se encuentran en la región S del complejo H-2. Mientras que los genes de clase I y clase II son similares en estructura y función, los de clase III están poco relacionados. Las moléculas de clase III codificadas en esta región son componentes del complemento (C2 y C4), así como el factor B (Bf).

El complejo H-2 también comprende numerosos locus que no son homólogos con los locus de clase I, II o III, pero muchos de ellos codifican proteínas con funciones inmunológicas. Así, la región I (clase II) codifica los locus M α y M β (equivalentes a los

locus DMA y DMB en humanos), cuyos productos están implicados en la unión de péptidos a moléculas de clase II. Igualmente, en esta región se encuentran los locus TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7 que codifican moléculas implicadas en el procesamiento y transporte de péptidos desde el citoplasma al retículo endoplásmico para ser presentados en la superficie celular por las moléculas de clase I.

La región S (clase III) incluye también el gen que codifica el factor de necrosis tumoral β . El complejo H-2 también contiene diversos genes que codifican enzimas, genes de función desconocida y pseudogenes no funcionales homólogos a los de clase I y de clase II.

Como hemos visto, el sistema H-2 murino presenta un elevado grado de homología con el complejo HLA humano, tanto en estructura como en función, y por tanto sirve como modelo experimental para investigar temas relevantes relacionados con el MHC humano.

1.3.- Estructura y función de las moléculas MHC

El interés inicial que despertó este sistema fue debido a su efecto en el rechazo tanto en el trasplante de tumores como en tejidos, pero el verdadero sentido biológico comenzó a surgir a mediados de los años 60. Así, estudios en laboratorios de Harvard y Stanford indicaron que al menos algunos de los genes del complejo H-2 controlaban la respuesta inmune de forma más o menos potente a diferentes antígenos específicos. Se observó, que las moléculas codificadas por el complejo H-2 son críticas para la presentación de antígenos y para el reconocimiento de estos por parte de los linfocitos T, así como para estimular otras moléculas y generar respuestas por parte del sistema inmune, identificando y eliminando células infectadas o alteradas.

Debido a que los linfocitos T son los responsables de la iniciación y regulación de muchas de las respuestas inmunes, la capacidad de presentar a estos linfocitos T péptidos antigénicos es un paso decisivo para el desarrollo de la respuesta inmune. Cada linfocito T consta de un receptor de células T (TCR), cuya función es reconocer un determinado péptido antigénico en asociación con las moléculas de clase I o de clase II. Sin embargo, la capacidad de los linfocitos T de reconocer y unirse a estos péptidos antigénicos está sometida a una “restricción” por parte de las moléculas de clase I o clase II (Zinkernagel and Doherty 1997), siendo necesario que el péptido sea presentado por una molécula específica de clase I o de clase II.

1.3.1.- Moléculas MHC de clase I

Los genes de las moléculas de clase I codifican cadenas simples de proteínas de aproximadamente 45 kDa, con elevado grado de polimorfismo, y con numerosos alelos por cada locus (Bjorkman and Parham 1990; Jones 1997; Pease et al. 1991). Estas moléculas están glicosiladas y se expresan como trímeros, en la superficie de todas las células nucleadas, unidas no covalentemente a una proteína más pequeña, soluble y no polimórfica de 12 kDa (β_2 -microglobulina), junto con el péptido antigénico. La cadena pesada se divide en tres dominios externos (α_1 , α_2 , α_3) unidos por puentes disulfuro, un segmento transmembrana y un segmento citoplasmático (Fig. 2).

La configuración tridimensional de las moléculas de clase I da lugar a una gruta donde se engloba el péptido. Esta gruta está constituida por yuxtaposición e interacción de los dominios α_1 y α_2 , el fondo de la gruta es relativamente plana y está constituido por ocho laminas- β antiparalelas y en los extremos dos hélices- α , una derivada del dominio α_1 y otra del α_2 (Fig. 3).

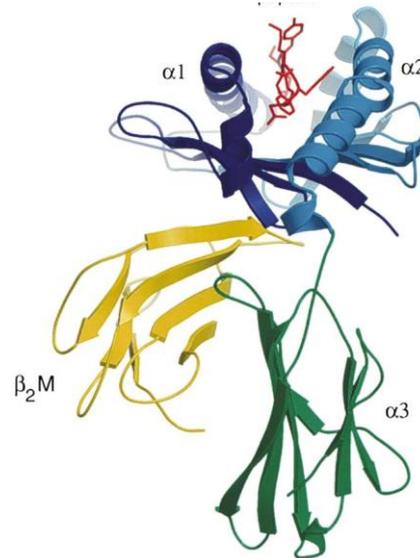
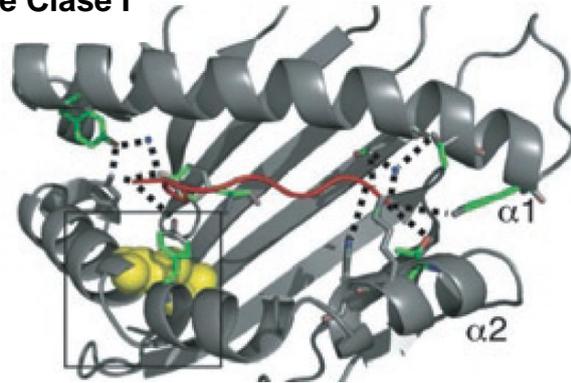


Figura 2. Estructura cristalina de una molécula MHC de clase I. Los dominios se representan en azul ($\alpha 1$), celeste ($\alpha 2$), verde ($\alpha 3$), β_2 -microglobulina en amarillo y péptido en rojo. La gruta de unión al péptido está constituida por una plataforma de laminas β y dos hélices α . Adaptación de Yang. *Y. Microbes Infect.* 2003 Jan; 5(1): 39-47.

Aunque las moléculas de clase I son capaces de unir diferentes péptidos, hay restricciones en cuanto a longitud y secuencia (Stern and Wiley 1994). Como la gruta de unión se encuentra cerrada por los extremos, las moléculas de clase I solo pueden unir péptidos de 8-10 aminoácidos. La presencia del péptido es esencial para la estabilidad de estas moléculas. Dos tipos de interacciones no covalentes hacen posible la unión del péptido a la gruta: en primer lugar interacciones entre aminoácidos del péptido (residuos de anclaje) y la cadena pesada, dependientes de la secuencia peptídica; y en segundo lugar, interacciones por puente de hidrógeno entre aminoácidos del péptido y aminoácidos conservados de la cadena pesada (no polimórficos). Los residuos de anclajes se localizan en los extremos N- y C-terminales del péptido, habitualmente los dos primeros y los dos últimos aminoácidos (Fig.3) (Fremont et al. 1992; York and Rock 1996). Serán estas interacciones las que determinan la especificidad del péptido y los puentes de hidrógenos determinan su conformación.

MHC de Clase I

Figura 3. Dominio de unión al péptido en las moléculas MHC de clase I. Péptido en rojo. Puentes disulfuros en amarillo. Puentes de hidrógeno conservados en líneas discontinuas. Interacciones específicas no covalentes péptido-cadena pesada en verde. Adaptación de Jensen P.E *Nat Immunol.*2007 Oct; 8(10):1041-8.



Las moléculas de clase I presentan péptidos antigénicos a los linfocitos T CD8⁺ (York and Rock 1996). Estos péptidos antigénicos derivan de proteínas degradadas en el proteosoma, y son cargados en el dímero β_2 -microglobulina-cadena pesada (Fig. 2). Este trímero es expresado posteriormente en la superficie celular, donde es reconocido por el TCR de los linfocitos CD8⁺ (Fig. 4), dando lugar esta interacción a una cascada de señales que conducen a la proliferación celular, producción de citoquinas y lisis celular (Johnsen et al. 1999; Seliger et al. 2000b). Las moléculas MHC de clase I también están implicadas en la regulación de la actividad lítica de las células NK, estas son capaces de eliminar aquellas células que han perdido la expresión de las moléculas MHC-I. Aunque las células NK no expresan receptores TCR, reconocen sus dianas mediante dos grandes familias de receptores: los KIR (Killer Immunoglobulin-like receptor) y la superfamilia de la lectina tipo C (Fig. 4). Estos receptores presentan diferentes especificidades y se pueden dividir en dos grupos de receptores según sean activadores o inhibidores (Lopez-Botet et al. 2000; Moretta et al. 1996).

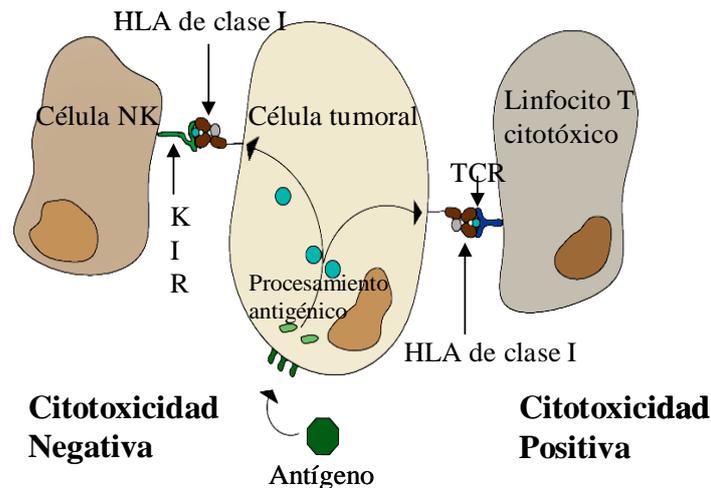


Figura 4. Interacción del complejo MHC-I-péptido con los linfocitos T y con las células Natural Killer (NK). Los linfocitos T reconocen los antígenos tumorales en forma de pequeños péptidos presentados por una molécula MHC-I en particular. Este reconocimiento por un receptor específico de células T activa a los linfocitos T para eliminar de forma específica esta diana tumoral (derecha). Sin embargo, la misma molécula MHC de clase I inhibe la célula NK mediante interacciones con receptores NK inhibidores (izquierda). Solo las variantes MHC de clase I negativas son dianas para las células NK. *Adaptación de García-Lora y cols., Journal of Cellular Physiology 2003 195:346-355)*

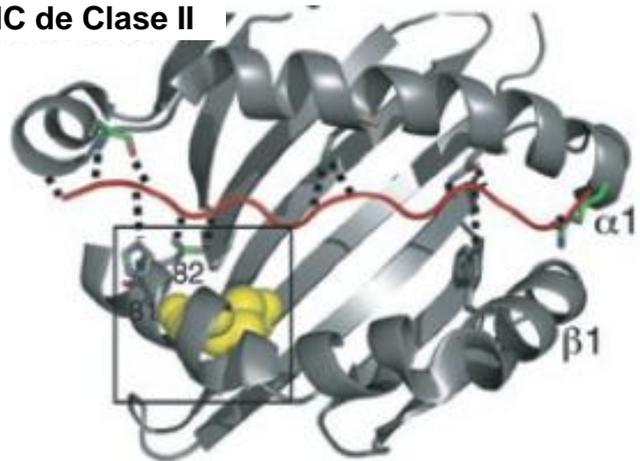
1.3.2.- Moléculas MHC de clase II

Las moléculas de clase II codificadas por Aa y Ea son algo más largas que las codificadas por Ab y Eb. Las primeras son proteínas de 30-32 kDa y las segundas son proteínas de 27-29 kDa, y al igual que las moléculas de clase I están glicosiladas. Ambas cadenas α y β forman dímeros en la superficie celular, unidas al péptido antigénico y adoptan una estructura tridimensional al igual que las moléculas de clase I (Fig. 5). Tanto la distribución de interacciones no covalentes específicas como los puentes de hidrógeno difieren entre las moléculas de clase I y II (Stern and Wiley 1994). En las moléculas de clase I las interacciones por puentes de hidrógeno se sitúan en los extremos de la gruta, limitando la longitud de los péptidos, en contraste, en las moléculas de clase II los extremos de la gruta están abiertos haciendo posible la unión de péptidos de mayor longitud, de 14-18 aminoácidos. A diferencia de las

moléculas de clase I, las moléculas de clase II son expresadas en aquellas células que funcionan habitualmente o pueden funcionar eventualmente como células presentadoras de antígenos: linfocitos B, monocitos/macrófagos, células dendríticas, células epiteliales de Langerhans, células del endotelio vascular (en humanos), células epiteliales tímicas y linfocitos T activados.

MHC de Clase II

Figura 5. Dominio de unión al péptido en las moléculas MHC de clase II. Péptido en rojo. Puentes disulfuros amarillos. Puentes de hidrógeno conservados en líneas discontinuas. Interacciones específicas no covalentes péptido-MHC, en verde. *Adaptación de Jensen P.E Nata Immunol. 2007 Oct;8(10):1041-8*



Las moléculas de clase II tienen la función de presentar péptidos antigénicos, derivados de proteínas extracelulares a los linfocitos T CD4+ (Cresswell 1994). Se expresan en las llamadas células presentadoras de antígenos, que fagocitan las moléculas extrañas, las degradan enzimáticamente en péptidos, y cada péptido es cargado en el dímero cadena pesada α -cadena pesada β , expresándose este trímero en superficie, donde es reconocido por el TCR de los linfocitos T CD4+. Si estos linfocitos reconocen al péptido como extraño, darán lugar a la proliferación y activación de macrófagos y/o a la proliferación clonal de linfocitos B que segregan anticuerpos.

1.4.- Procesamiento, transporte, ensamblaje y presentación de péptidos antigénicos.

Los péptidos presentados por las moléculas MHC-I tienen unas características propias: presentan en el extremo C-terminal residuos hidrofóbicos o básicos, y

diferentes residuos de anclaje. El cambio de residuo de anclaje puede ocasionar que un determinado péptido se una a un alelo particular MHC y no a otro. La mayoría de los péptidos que unen las moléculas MHC-I son derivados de proteínas sintetizadas en el citoplasma celular (Pamer and Cresswell 1998). Siempre se había considerado que estos péptidos procedían de proteínas celulares degradadas en el citoplasma en virtud del proceso de recambio celular de estructuras deterioradas o envejecidas. Sin embargo, diferentes estudios apoyan que la principal fuente de péptidos presentados por las moléculas MHC-I procede de proteínas nuevas recién sintetizadas (Reits et al. 2000; Schubert et al. 2000; Yewdell 2005). La traducción y plegado de proteínas puede ser propensa a errores y entre el 30-80% de las proteínas recién sintetizadas se degradan rápidamente. Estos sustratos han sido denominados productos defectivos ribosomales o DRiPs, y representan polipéptidos sintetizados prematuramente que no tienen la longitud correcta o proteínas mal plegadas. Estos productos generan una fuente rica de péptidos para la presentación antigénica por parte de moléculas MHC-I, y al mismo tiempo este sistema permite una rápida detección de productos virales o bien de células alteradas. Aunque este modelo está siendo aun cuestionado por evidencias que sugieren que estos nuevos péptidos son protegidos de la degradación del proteosoma, durante e inmediatamente después de la traducción, y que las proteínas preexistentes son el principal sustrato del proteosoma (Vabulas and Hartl 2005).

Tanto los polipéptidos como las proteínas mal plegadas y los DRiPs deben unirse a ubiquitina para ser degradados por el proteosoma. El proteosoma es la principal fuente de péptidos presentados por el MHC-I (Hershko and Ciechanover 1992; Rock and Goldberg 1999). Está formado por la subunidad 20S que representa el centro catalítico y por dos complejos reguladores 19S que se unen a los extremos del proteosoma 20S (Fig. 6). El proteosoma 20S es una estructura cilíndrica formada por cuatro anillos,

cada uno de los cuales contiene siete subunidades. Los dos anillos más externos contienen las subunidades α , y los dos anillos más internos las subunidades β (Fig. 6). Los sitios activos del proteosoma, donde ocurre la degradación de los polipéptidos, están localizados en el núcleo catalítico del proteosoma, dentro del “lumen ahuecado” de su estructura cilíndrica. Esta disposición supone una barrera para el acceso de los sustratos a los centros activos (Bochtler et al. 1999; Kloetzel 2001; York et al. 1999). Hay tres subunidades constitutivas, B5(X), B1(Y) y B2(Z), que son reemplazadas por sus correspondientes subunidades inducibles por IFN- γ , B5i(LMP7), B1i(LMP2) y B2i(MECL-1) o LMP10, constituyendo los centros catalíticos del proteosoma (Fig. 6) (Belich et al. 1994; Nandi et al. 1996). La sustitución de las subunidades constitutivas (β 1, β 2, β 5) por las inducibles cambia la especificidad del proteosoma hacia sus sustratos generándose péptidos con extremos C-terminales de residuos hidrofóbicos y básicos, que son los péptidos preferidos para la presentación por moléculas MHC-I y que también son los péptidos preferentemente transportados por los transportadores de péptidos TAPs. De este modo, existen dos tipos de proteosomas, el proteosoma constitutivo (c20S) que se expresa constitutivamente en todas las células y el inmunoproteosoma (i20S) que se origina tras la exposición de las células a IFN- γ . La existencia de unas proteínas activadoras da lugar a la formación de poros en el proteosoma mediante una serie de cambios conformacionales, permitiendo así el acceso de los polipéptidos a los centros activos (Larsen and Finley 1997). Entre estos activadores figura el complejo PA28, inducible por IFN- γ , que está formado por dos subunidades: PA28 α y PA28 β (Rechsteiner et al. 2000; Wilk et al. 2000). La unión del PA28 al proteosoma da lugar a la hidrólisis de péptidos cortos, pero no de proteínas.

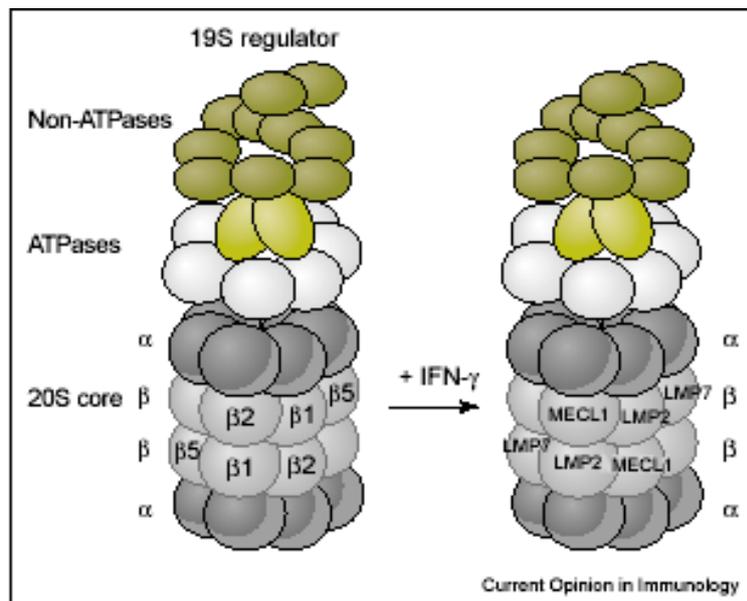


Figura 6. Proteosoma. El proteosoma 20s está formado por 28 subunidades de 21-31kDa, que están dispuestos como cuatro anillos heptaméricos. Los anillos externos contienen las subunidades alfa, y los internos las subunidades beta. Tres de las siete subunidades beta constituyen los sitios activos (beta1, beta2 y beta5), en total hay seis sitios activos en el core 20s. El complejo regulador 19s está compuesto por seis subunidades ATPasa y dos subunidades no ATPasa y el extremo, compuesto por 8-10 subunidades no ATPasa. Tras la inducción con IFN se induce la síntesis de tres subunidades beta, todas con sitios activos. Estas son las subunidades LMP2, MECL1 y LMP7, las cuales se incorporan al core y forman con el resto de subunidades el inmunoproteosoma. Adaptación de P-M Kloetzel y F Ossendorp. *Current Opinion in Immunology* 2004, 16:76-81.

El proteosoma genera péptidos de 15 a 20 aminoácidos, y para obtener péptidos más pequeños (de 8-10 aminoácidos), que son los que cargan las moléculas MHC de clase I actúan las aminopeptidasas, eliminando residuos del extremo N-terminal (Shastri et al. 2002). La peptidasa citoplasmática TPPII está implicada en el recorte proteosomal de productos de más de 15 aminoácidos de longitud, aunque su cuantitativa contribución al pool de péptidos-MHC aún no está claro (York et al. 2006a). La mayoría de los péptidos son degradados en el citosol, siendo empleados los aminoácidos resultantes como fuente metabólica para la biosíntesis de proteínas o bien para el catabolismo celular (Hershko et al. 2000).

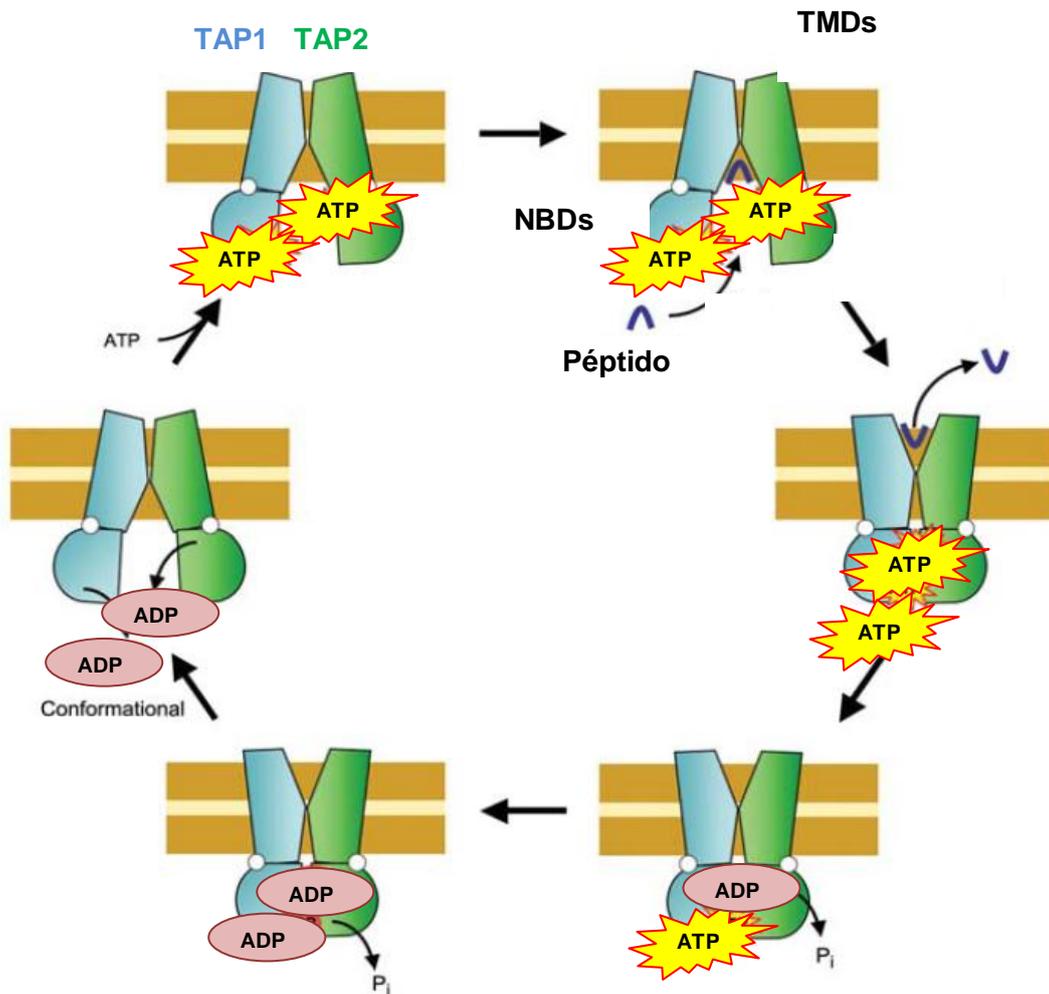


Figura 7. Mecanismo de transporte propuesto. En el estado de reposo (izquierda superior), los NBDs de TAP están separados. La unión del péptido desencadena la dimerización de los NBDs, induciendo un cambio conformacional a una conformación abierta hacia el interior del lumen del RE. Dentro de este paso, el péptido se transloca a través de la membrana desde el citosol al lumen. La hidrólisis de ATP conduce finalmente a la separación del dímero NBD y el retorno de TAP a la conformación de partida. *Adaptación de Schölz C. & Tampé R. Biol Chem. 2009 Aug; 390(8):783-94.*

Solo unos pocos péptidos llegan hasta el borde del RE, siendo transportados al interior de este mediante los ABC transportadores, dependientes de ATP. Los transportadores están compuestos por dos subunidades TAP1 y TAP2 (Lauvau et al. 1999). Estas se encuentran en la región MHC de clase II, próximas a LMP2 y LMP7. La expresión de estos genes es inducible por IFN- γ . El complejo TAP transporta péptidos de 8 a 15 aminoácidos al interior del RE (Elliott 1997). Cabe destacar que la

unión del péptido al complejo TAP es un proceso ATP independiente, sin embargo el proceso de translocación a través de la membrana es un proceso ATP dependiente. Basándose en datos bioquímicos se ha propuesto el siguiente mecanismo de translocación (Fig. 7). En primer lugar, TAP está presente en una conformación abierta, con los dominios de unión a nucleótidos (NBDs) separados el uno del otro en el lado citosólico (estado de reposo). Los dos dominios transmembrana (TMDs) sellan la vía de translocación al lumen del RE desde el citoplasma. En segundo lugar, se produce la unión independiente a TAP del ATP y el péptido (Uebel et al. 1995; van Endert et al. 1994). La unión del péptido provoca un lento cambio conformacional, en el que participa aproximadamente el 25% de todos los residuos de los TAPs (Neumann et al. 2002; Neumann and Tampe 1999). Después de la unión de ATP tiene lugar una ligera rotación de TAP1 hacia TAP2 adquiriendo el complejo una conformación óptima (Chen et al. 2003; Smith et al. 2002; Zaitseva et al. 2006). En este estado de transición, la vía de translocación se ha cerrado en el lado citosólico y ahora el péptido reside en un sitio de baja afinidad, promoviendo su lanzamiento hasta el lumen del RE (Herget et al. 2007; Oancea et al. 2009). El restablecimiento de la conformación original del complejo transportador requiere la hidrólisis de al menos otra molécula más de ATP. Después de la liberación de fosfato y ADP, el transportador está preparado para un nuevo ciclo. En células deficientes en TAP, los heterodímeros de clase I no pueden ensamblarse con los péptidos (de la Salle et al. 1994; Van Kaer et al. 1992). En estas circunstancias las cadenas pesadas de clase I no ensambladas son posteriormente translocadas hacia el citosol y degradadas por el proteosoma. Por lo tanto, células deficientes en TAP no presentarían expresión de moléculas de clase I en superficie asociadas a péptidos TAP-dependientes, exhibiendo una baja respuesta frente a linfocitos T citotóxicos (CTLs). Sin embargo, se han descrito rutas independientes de TAP y del proteosoma para la presentación de péptidos, que generan respuestas de CTLs. Aunque probablemente tengan un pequeño papel en la

expresión de péptidos por parte de las moléculas MHC-I, pueden tener importancia en la generación de una respuesta efectiva de CTLs *in vivo* (Del Val et al. 2011; Lorente et al. 2011; Merzougui et al. 2011).

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la proteólisis de precursores antigénicos en el citoplasma raramente produce el péptido final (Cascio et al. 2001; Toes et al. 2001). Si los péptidos en el RE (retículo endoplasmático) son demasiado largos, sus extremos N-terminales son acortados por la enzima ERAAP - aminopeptidasas del RE asociada al procesamiento antigénico- hasta que adquieren la longitud óptima, convirtiéndose así en la aminopeptidasa clave del recorte final amino-terminal de los péptidos-MHC (Saric et al. 2002; Serwold et al. 2002; York et al. 2002). Esta aminopeptidasa recorta los péptidos-MHC hasta los 8-9 residuos (Chang et al. 2005b). La ERAAP rompe residuos N-terminales de Lys (K), Leu (L), Tyr (Y) y Asn (N) pero es incapaz de romper residuos X-Pro y esto implica una fuerte evidencia que muchos de los péptidos presentados por las moléculas de clase I tengan la secuencia "X-Pro-Xn" (Serwold et al. 2002). La actuación de esta enzima explicaría por qué los péptidos presentados por las moléculas MHC-I poseen la longitud precisa. Los péptidos que no son capaces de unirse a moléculas MHC-I son completamente destruidos por ERAAP (Falk et al. 1990). ERAAP es la única peptidasa del retículo endoplásmico en células de ratón. Diferentes estudios han sugerido que ERAAP tiene un efecto global sobre el repertorio de péptidos presentados por las moléculas MHC-I (Hammer et al. 2006; Yang et al. 2008; York et al. 2006b).

En el lumen del RE, las moléculas MHC-I vacías esperan para cargarse con péptidos, este proceso está altamente regulado e implica a varias proteínas accesorias (Cresswell 2000; Van Kaer 2001). Los péptidos necesitan de una serie de chaperonas para ser cargados en las moléculas de clase I entre las que se encuentran moléculas como calnexina, calreticulina, ERp57/ER60, y tapasina (Fig. 8). Las primeras etapas

en el ensamblaje de las moléculas MHC de clase I están reguladas por interacciones con las lectinas calnexina y calreticulina, que reconocen péptidos N-glicosilados (Helenius and Aebi 2001; Zhang and Salter 1998; Zhang et al. 1995). En primer lugar, la cadena pesada se une a la calnexina que inmediatamente después de su unión a la β_2 -microglobulina es reemplazada por la calreticulina (Farmery et al. 2000). El hecho de que la calnexina sea imprescindible o no en el ensamblaje de las moléculas de clase I no está del todo claro, al haberse observado un correcto ensamblaje y transporte a la superficie celular en líneas celulares humanas deficiente para calnexina, lo que sugiere que esta puede ser reemplazada (Sadasivan et al. 1995; Scott and Dawson 1995). El chaperón capaz de reemplazar a la calnexina es BiP (“immunoglobulin binding protein”) (Stronge et al. 2001). Existen evidencias de que en humanos la proteína BiP se une a la cadena pesada de clase I durante los pasos tempranos del ensamblaje (Nossner and Parham 1995) (Fig. 8).

La calreticulina, por el contrario, juega un papel crítico en el ensamblaje de las moléculas MHC-I (Gao et al. 2002). La unión de la cadena pesada a la calnexina y calreticulina es mediada por la proteína ERp57/ER60 óxido-reductasa tiol dependiente, que establece puentes disulfuro entre estas moléculas (Frickel et al. 2002; Oliver et al. 1999; Tector and Salter 1995) (Fig.8). También se asocian otras proteínas residentes del RE, las dos subunidades de TAP y la tapasina (glicoproteína asociada a TAP) (Grande and Van Kaer 2001). La tapasina sirve como nexo de unión entre el complejo y las moléculas TAP (Fig. 8). El dominio amino-terminal de la tapasina interacciona con los dominios α_2 y α_3 de la cadena pesada y la región carboxilo terminal sirve de unión a TAP (Sadasivan et al. 1996). La tapasina también estabiliza al heterodímero TAP (Lehner et al. 1998). Al complejo multiproteico formado por la cadena pesada, la β_2 -microglobulina, calreticulina, ERp57, las moléculas TAP1/TAP2 y tapasina se le conoce como “complejo de carga peptídico” (Fig. 8). La función de este

complejo es retener las moléculas de clase I en el RE hasta que son cargadas con péptidos de alta afinidad.

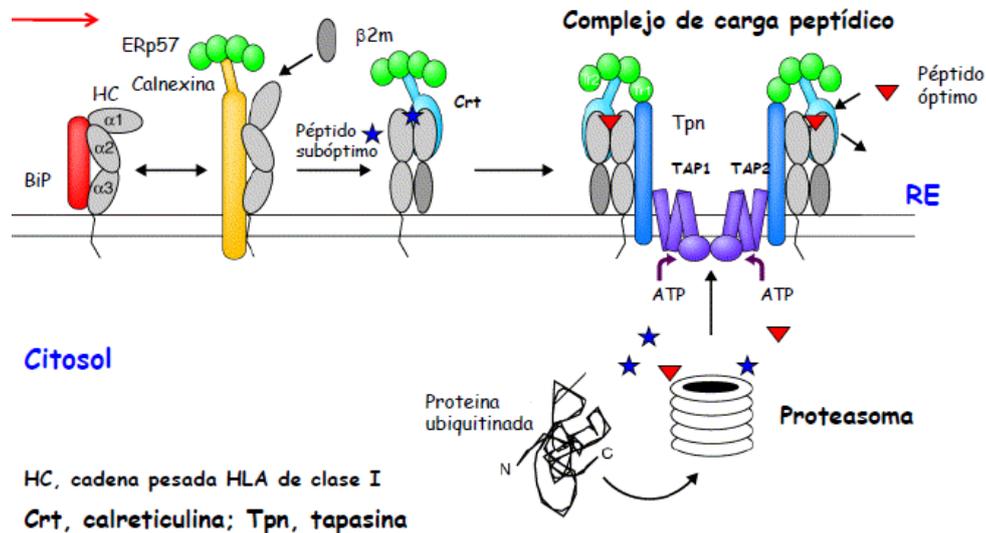


Figura 8. Formación del complejo de carga peptídico (PLC). Las cadenas pesadas recién sintetizadas se asocian con calnexina o con BiP. La asociación con β_2 -microglobulina y con péptidos subóptimos dan lugar a cambios conformacionales en la cadena pesada que desplazan la calnexina y calreticulina, dando lugar a la formación del complejo de carga peptídico (PLC). Los péptidos degradados en el citoplasma vía proteosoma son transportados vía TAP en el lumen del RE en un proceso ATP dependiente. En el PLC los péptidos subóptimos son intercambiados por péptidos óptimos en un proceso mediado por tapasina. *Adaptación de Antoniou y cols. Current Opinion in Immunology, 2003, 15:75-81.*

El proceso de carga del péptido en las moléculas de clase I se realiza en dos pasos: en primer lugar, las moléculas MHC-I cargan “péptidos subóptimos”, de baja afinidad, en segundo lugar; el “complejo de carga peptídico” favorece el intercambio de estos péptidos por otros péptidos de “alta afinidad”, que estabilizan al heterodímero cadena pesada- β_2 -microglobulina (Lewis and Elliott 1998). La unión del péptido y el intercambio es mediado por la tapasina, siendo esta un elemento crítico en el complejo de carga peptídico (Chun et al. 2001; Purcell et al. 2001; Williams et al. 2002). En su

ausencia, la calreticulina y ERp57 tienen una menor asociación con los heterodímeros de clase I (Grande et al. 2000). En ratones deficientes en tapasina (Garbi et al. 2000), la mayoría de las moléculas MHC-I están cargadas con péptidos de baja afinidad, que son inestables a temperaturas fisiológicas. Estas células por tanto expresan pocas moléculas de clase I en superficie y son defectivas en la presentación antigénica restringida a MHC-I. Así, una de las funciones de la tapasina es editar el repertorio de péptidos catalizando el reemplazamiento de péptidos de baja afinidad por péptidos de alta afinidad (Androlewicz 1999; Cabrera et al. 2005). La unión covalente entre la tapasina y ERp57 se ha observado que tiene una gran importancia para la completa oxidación de la cadena pesada (Dick et al. 2002). Así, mutaciones en la tapasina que impiden su unión con ERp57 impiden la completa oxidación de las moléculas de clase I y además previenen la carga de moléculas MHC-I con péptidos de alta afinidad. Este hallazgo sugiere que la tapasina influye en el repertorio de péptidos de las moléculas MHC-I, al facilitar la formación de los puentes disulfuro de la cadena pesada de clase I.

Una vez que las moléculas de clase I han cargado el péptido de alta afinidad, se disocian de TAP mediante un cambio conformacional de estos ATP transportadores. Estas moléculas se dirigen a la vía de salida del RE, formando las vesículas transportadoras COPII (Fig.9). En estas vesículas se asocian a unos receptores BAP31, los cuales son unas proteínas transmembrana de 28 kDa (Spiliotis et al. 2000). Posteriormente, las vesículas se fusionan con el compartimento intermedio RE-Golgi y atraviesan el aparato de Golgi en dirección a la superficie celular. Las moléculas de clase I que no interaccionan correctamente con el complejo de carga peptídico salen del RE de forma prematura antes de cargar el péptido (Lewis and Elliott 1998). Así, estas moléculas van a ser retrotranslocadas y degradadas en el citosol vía proteosoma, proceso que se conoce como “degradación asociada al retículo endoplásmico”.

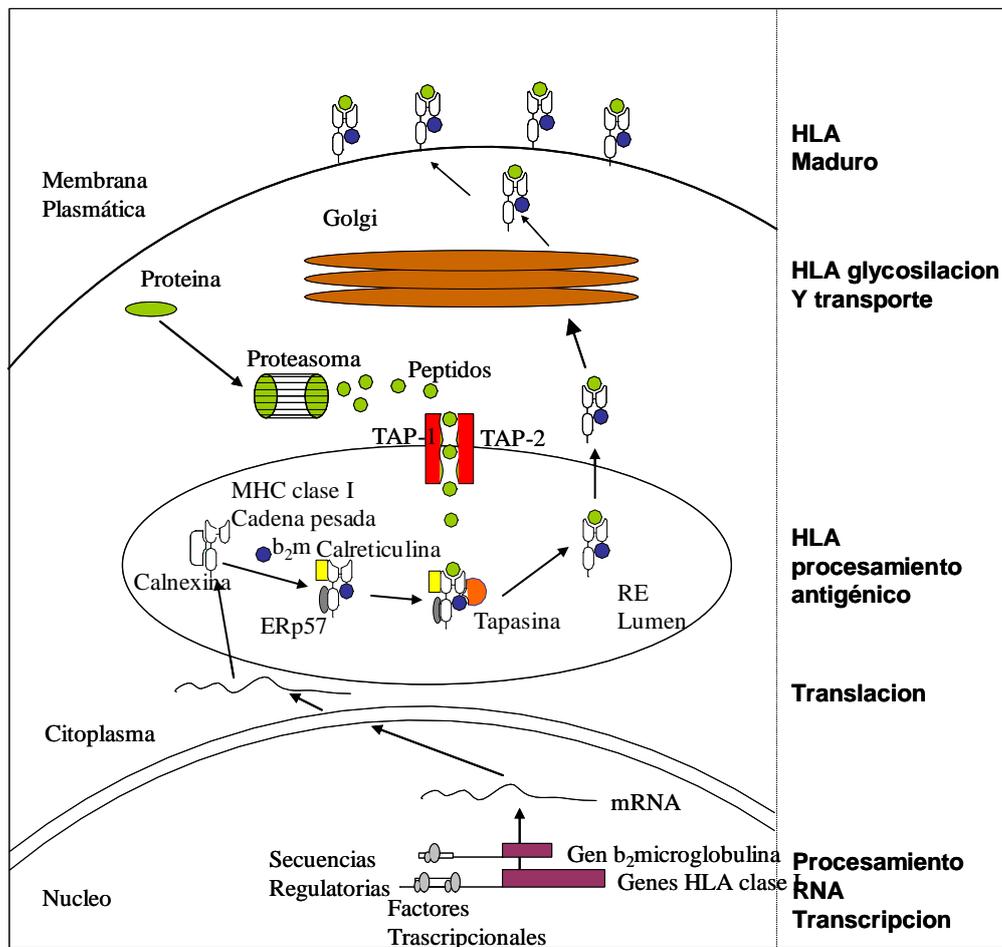


Figura 9. Maquinaria de procesamiento antigénico (APM). Las proteínas endógenas son degradadas por el complejo multicatalítico llamado proteasoma hasta péptidos de 9 aminoácidos. Estos péptidos son transportados hacia el retículo endoplásmico (RE) por el transportador asociado al procesamiento antigénico (Meng et al.) y aquí se une a las moléculas MHC de clase I para ser exportados a la membrana celular y ser presentados a los linfocitos T. *Adaptación de García-Lora y cols. Journal of cellular Physiology 2003 195: 346-355.*

2.- LATENCIA Y PROGRESIÓN TUMORAL: IMPLICACIONES DEL SISTEMA INMUNE

Las investigaciones sobre la respuesta inmune al cáncer se remontan a principios del siglo XX y a menudo han sido controvertidas. La noción de que el sistema inmunológico podría proteger al huésped de una enfermedad neoplásica fue propuesta inicialmente por Ehrlich, sin embargo, la falta de herramientas y conocimientos sobre el sistema inmune hizo imposible demostrarla experimentalmente (Ehrlich 1909). Sería 50 años más tarde cuando se estableció formalmente la “hipótesis de la inmunovigilancia en el cáncer” por Burnet y Thomas (Burnet 1970; Burnet 1957, 1964; Thomas 1959). Ambos autores propusieron que los linfocitos son capaces de reconocer y eliminar las células cancerosas o precancerosas del huésped, antes que puedan llegar a causar daño. Años después, esta predicción no pudo ser confirmada experimentalmente cuando se utilizaron ratones nude, que carecen de células T. Específicamente, la cepa nude CBA/H, no desarrollaba mayor incidencia de tumores espontáneos o inducidos por MCA (metilcolantreno); ni mostraban menores tiempos de latencia tumoral al compararlos con los silvestres control (Rygaard and Povlsen 1974; Stutman 1973, 1974, 1975). De cualquier modo, pasaron algunas cuestiones desapercibidas en ese momento. En primer lugar, la cepa de ratones utilizada en los experimentos de carcinogénesis por MCA de Stutman expresaba una isoforma activa de la enzima arilhidroxilasa que se requiere para metabolizar el MCA en su forma carcinogénica (Heidelberger 1975). De esta forma, es concebible que la transformación celular inducida por MCA en estos ratones ocurriera tan eficientemente que quedase enmascarado cualquier efecto protector de inmunidad. En segundo lugar, los tiempos de monitorización eran demasiado cortos para observar la formación de tumores espontáneos y el desarrollo de sistemas supresores intrínsecos. En tercer lugar, las cepas de ratones utilizadas por Stutman, además de ser más sensibles a la formación de tumores inducidos por metilcolantreno, las dosis utilizadas en dichos

ensayos fueron únicas y elevadas. Por último, que los ratones nude son un modelo imperfecto de inmunodeficiencia ya que producen un bajo número de células T funcionales y además pueden manifestar algún grado de inmunidad adaptativa (Maleckar and Sherman 1987; T. 1983). A todas estas cuestiones hay que añadir, que todavía no se había establecido muy bien la existencia de células natural killer (NK), presentes y funcionales en ratones nude, y se conocía muy poco acerca de su origen, acción y papel en la inmunidad innata. De hecho, no se conocía la profunda influencia de la inmunidad innata sobre la adaptativa (Janeway 1989a).

El interés por la inmunovigilancia del cáncer se reavivó como resultado de una serie de estudios que demostraron: i) el uso de anticuerpos neutralizantes para IFN- γ en ratones portadores de tumores provocaba un crecimiento acelerado del tumor en comparación con el grupo control (Dighe et al. 1994); y ii) los ratones que carecen del receptor de IFN- γ , presentan una incidencia mayor de tumores espontáneos e inducidos en comparación con ratones salvajes de la misma cepa y edad (Kaplan et al. 1998; Shankaran et al. 2001). Desde entonces, una gran cantidad de datos experimentales procedentes de diferentes modelos tumorales murinos, junto con los datos clínicos en pacientes, han proporcionado pruebas inequívocas de la participación de las células del sistema inmune innato y adaptativo en la prevención del cáncer (Dunn et al. 2004a, b; Swann and Smyth 2007).

Nuestro grupo de investigación también ha obtenido evidencias experimentales de la implicación del sistema inmunológico en la progresión tumoral. Nuestros trabajos muestran una mayor producción de metástasis en ratones atímicos al compararlos con animales inmunocompetentes, demostrando que el sistema inmunológico puede actuar durante la evolución metastásica del tumor (García-Lora et al. 2001). Las metástasis generadas en nuestro modelo parecen ser seleccionadas en función del estado inmunológico del huésped. En ratones BALB/c inmunocompetentes, el

fibrosarcoma murino GR9-B9 (H-2 clase I negativo), genera metástasis espontáneas pulmonares también H-2 clase I negativas; por el contrario, esta misma línea celular inyectada en ratones de la misma cepa pero inmunodeficientes (nu/nu) genera metástasis pulmonares H-2 clase I positivas (García-Lora et al. 2001). Estos resultados muestran que el sistema inmune es el responsable de la selección de células tumorales con un fenotipo MHC de clase I específico, y que los cambios originados en las moléculas MHC de clase I durante la colonización metastásica no se originan al azar desde un mismo tumor primario, sino que por el contrario pueden ser reproducidas en diferentes animales singénicos. Las metástasis generadas en ratones inmunodeficientes eran más inmunogénicas que las generadas en ratones normales, provocando rechazo cuando se inyectaban en ratones inmunocompetentes. Estos resultados ponen de manifiesto que, la interacción de las células tumorales con un sistema inmunológico intacto produce una disminución progresiva en la inmunogenicidad de las células tumorales.

Todos estos trabajos muestran evidencias experimentales del concepto de inmunovigilancia propuesto inicialmente por Thomas y Burnet. Sin embargo, los tumores surgen y se desarrollan en presencia de un sistema inmune sano, convirtiendo el término "inmunovigilancia" en insuficiente para describir las complejas interacciones que se producen durante el desarrollo del tumor entre las células tumorales y el sistema inmunológico del huésped. Tal como se concebía originalmente, la inmunovigilancia es la función protectora del huésped y es llevada a cabo por el sistema inmunológico adaptativo sólo en estadios tempranos de la transformación celular. Sin embargo, el sistema inmunológico a través de su interacción continuada con el tumor, puede en parte, esculpir o editar la inmunogenicidad de los tumores, dando lugar a la aparición de variantes menos inmunógenas. El sistema inmune tiene así una naturaleza dual, ayuda a impedir la

progresión del tumor en estadios tempranos pero a su vez promueve la selección de variantes menos inmunógenas, este proceso se conoce como la "inmunoección del cáncer" (Dunn et al. 2002).

2.1.- Teoría de la inmunoección del cáncer

El proceso de la inmunoección en cáncer consiste en tres fases: eliminación, equilibrio y escape (Fig.10), que se han denominado las "tres Es de la inmunoección del cáncer" (Dunn et al. 2002; Dunn et al. 2004b; Swann and Smyth 2007). La fase de eliminación se corresponde con el concepto original de inmunovigilancia en el cáncer, en esta etapa las células cancerosas son reconocidas y eliminadas por el sistema inmune con éxito, regresando los tejidos a su estado normal. Numerosos estudios han demostrado la participación de células del sistema inmune innato y adaptativo en esta fase (Dunn et al. 2006; Dunn et al. 2004a; Swann and Smyth 2007). Las células tumorales que no son eliminadas por el sistema inmune entran en una fase de equilibrio, en esta fase el sistema inmunológico es capaz de controlar el crecimiento celular del tumor, pero sin eliminar completamente las células transformadas. Una vez que un tumor alcanza el estado de equilibrio hay dos posibilidades de evolución, o bien el sistema inmunológico elimina todas las células tumorales o en el segundo escenario, la interacción constante y prolongada del sistema inmune con el tumor provoca la "edición" del tumor, originando una selección de fenotipos menos inmunógenos. Estos fenotipos menos inmunógenos ya no serían susceptibles del ataque del sistema inmune, siendo capaces de progresar a la tercera fase de la inmunoección, denominada de "escape". Se cree que la aparición de síntomas clínicos en general, se correlaciona con esta etapa.

En la última década, la inmunología tumoral ha intentado desentrañar las complejas y dinámicas interacciones que tienen lugar entre el tumor y el sistema inmune.

Numerosos datos experimentales han demostrado que los tumores en la fase de escape logran subvertir el sistema inmunológico, a través de mecanismos directos o indirectos que favorecen su crecimiento. Sin embargo, de las tres fases de la immunoedición del cáncer, la fase de equilibrio es la gran desconocida, aunque se están realizando progresos en esta área tanto en modelos murinos como en humanos.

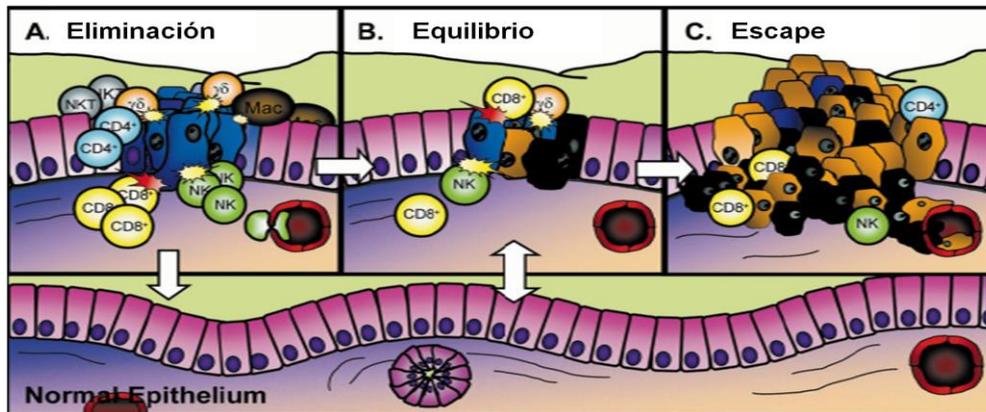


Figura 10. Las Tres E de la immunoedición. a. Fase de eliminación que se corresponde con la inmunovigilancia. b. Fase de equilibrio, representa el proceso en el que el sistema inmune favorece la aparición de variantes tumorales capaces de sobrevivir al ataque inmune. c. Escape, proceso en el que las variantes tumorales "esculpidas" por el sistema inmune se expanden de forma incontrolada en el huésped inmunocompetente. Adaptación de Dunn y cols. *Ann Rev. Immunol.* 2004, 22: 329-60.

2.1.1.- La fase de eliminación

Los componentes que participan en esta fase se han identificado, aunque el papel preciso de cada uno no está del todo claro. El rechazo inmunológico del tumor, al igual que en la defensa de un patógeno, requiere la respuesta integrada del sistema inmunológico innato y adaptativo (Janeway 1989b). Se inicia cuando las células del sistema inmunológico se alertan de la presencia de un tumor (Fig. 11a), que produce la alteración del tejido local como resultado de los procesos de modelado estromal propios de los procesos fisiológicos del desarrollo de un tumor sólido, entre ellos, la angiogénesis (Carmeliet and Jain 2000; Hanahan and Folkman 1996) y el crecimiento invasivo del tumor (Sternlicht and Werb 2001). El modelado estromal que se origina

por el crecimiento invasivo del tumor produce moléculas proinflamatorias que junto a quimioquinas producidas por el propio tumor (Vicari et al. 2002), atraen a las células del sistema inmunológico a esta área de “daño” local (Matzinger 1994; Wrenshall et al. 1999). Una vez reclutadas las células NKT, NK, células $T\gamma\delta$, y/o macrófagos, reconocen moléculas que se expresan en las células tumorales por la incipiente inflamación y/o por el propio proceso de transformación (Benlagha and Bendelac 2000).

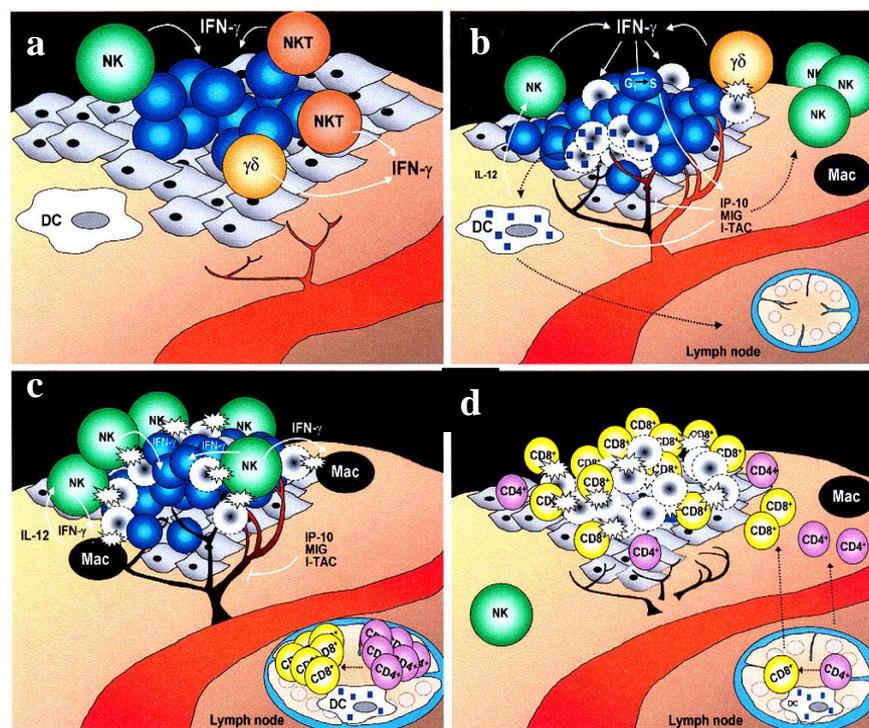


Figura 11. “Immunoediting”. Fase de eliminación. a. Los linfocitos de la respuesta innata (NK, NKT, $T\gamma\delta$) reconocen las células transformadas y son estimulados en la producción de $IFN-\gamma$. b. El $IFN-\gamma$ desencadena una cascada de la respuesta inmune innata que implica: producción de quimioquinas y factores angiostáticos, efecto antiproliferativo del $IFN-\gamma$ sobre las células tumorales, desarrollo de la actividad citotóxica. Los restos de células tumorales son ingeridos por células dendríticas. c. Desarrollo de la respuesta adaptativa en un ganglio linfático. d) Respuesta citotóxica llevada a cabo por los LT $CD4+$ y LT $CD8+$ activados, con destrucción de las células tumorales. *Adaptación de Dun GP y cols, Nature 2002, 3:991-998.*

En un segundo paso (Fig. 11b), se amplifican los efectos del reconocimiento inmune innato. El $IFN-\gamma$ secretado en el lugar del tumor induce la producción local de quimioquinas, que reclutan más células del sistema inmune innato al tumor. Los

productos generados durante el modelado de la matriz extracelular pueden inducir la producción de IL-12 (Hodge-Dufour et al. 1997) por los macrófagos infiltrantes del tumor, que estimulan a las células NK a producir IFN- γ , que a su vez activa a los macrófagos a producir más IL-12 incrementado la producción de IFN- γ por las células NK. Este sistema de retroalimentación positiva (Bancroft et al. 1991) y la unión de los receptores activadores de las células NK a sus ligandos en las células tumorales, estimula aún más la producción de IFN- γ (Diefenbach et al. 2000), que puede ahora activar procesos dependientes del mismo, como efectos antiproliferativos (Bromberg et al. 1996), proapoptóticos (Kumar et al. 1997) y angiogénicos, que darán lugar a la lisis de una elevada proporción de células tumorales (Coughlin et al. 1998; Qin and Blankenstein 2000). Los macrófagos activados además expresan agentes tumoricidas, como son los intermediarios de oxígeno y nitrógeno reactivos, contribuyendo junto a las células NK a la eliminación de células tumorales (MacMicking et al. 1997; Schreiber et al. 1983).

En el tercer paso (Fig. 11c), se liberan antígenos tumorales al medio, por los efectos de la inmunidad innata, dirigiendo el desarrollo de respuestas inmunológicas específicas. Las células dendríticas inmaduras (DCs) reclutadas en el lugar del tumor se activan por la exposición al medio de citoquinas creado por el ataque al tumor o por la interacción con células NK infiltrantes de tumor (Gerosa et al. 2002). Estas DCs activadas pueden adquirir antígenos tumorales directamente por ingestión de desechos celulares del tumor o a través de mecanismos indirectos (Li et al. 2002; Srivastava 2002). Las DCs maduras migran al ganglio linfático (Sallusto et al. 2000) para inducir la activación de células CD4⁺ Th1 vírgenes, específicas de tumor, que facilitan el desarrollo de células T CD8⁺ tumor-específicas (T CD8⁺) a través de la presentación cruzada de péptidos tumorales antigénicos en moléculas de MHC de clase I por las DCs (Albert et al. 1998; Yu et al. 2003).

En el cuarto paso (Fig. 11d), el desarrollo de la inmunidad adaptativa específica del tumor puede capacitar al huésped para la eliminación completa del tumor. Las células T CD4+ y T CD8+ participan en la lisis de las células tumorales que ahora son más inmunógenas al expresar antígenos tumorales después de haber sido expuestas al IFN- γ producido en los pasos 1 y 2 (Shankaran et al. 2001). Las CD4+ producen IL-2 que junto a la producción de IL-15 ayuda a mantener la función y viabilidad de las células TCD8+, que inducirán la muerte celular de forma directa (puesto que son citotóxicas) y de forma indirecta mediante la producción de IFN- γ tras la interacción con sus dianas. Estos dos escenarios no son mutuamente excluyentes y se producen de forma simultánea; sin embargo, la contribución relativa de cada uno varía dependiendo del tipo de tumor. La fase de eliminación es un proceso continuo que se repite frente a células neoplásicas antigénicamente distintas.

2.1.2.- La fase de equilibrio

En la fase de equilibrio (Fig. 10b), el sistema inmunológico del huésped y las variantes tumorales que han sobrevivido a la fase de eliminación entran en una dinámica de equilibrio, donde los linfocitos y el IFN- γ ejercen una potente presión selectiva sobre el tumor, que puede ser suficiente para mantenerlo en un estado de latencia pero sin extinguir completamente un tumor. Aunque muchas de las variantes del tumor original son destruidas, las nuevas variantes tienen alteraciones diferentes que les permiten aumentar la resistencia al ataque inmunológico. El resultado final de esta fase es una población nueva de variantes tumorales con inmunogenicidad reducida, originada de una población parental heterogénea tras ser modelada por el sistema inmunológico, esta fase es probablemente la más larga de las tres. De hecho, se ha estimado que para muchos tumores sólidos el intervalo entre la exposición inicial al carcinógeno y la detección clínica del tumor puede llegar a los 20 años (Loeb et al. 2003). Durante este periodo, la heterogeneidad e inestabilidad genética de las células

tumorales que sobreviven a la fase de eliminación son posiblemente, las principales fuerzas que capacitan al tumor a la progresión (Lengauer et al. 1998; Loeb 1991).

La idea de que las células tumorales pueden ser mantenidas en bajo número en un estado subclínico por un sistema inmune activo propuesta en la “teoría de la inmunoección” ha sido recientemente apoyada por nuevas evidencias experimentales. *Koebel & cols*, en su trabajo han intentado mostrar que la etapa de equilibrio existe y se puede diferenciar de las etapas de eliminación y escape. Empleando un modelo murino de carcinogénesis inducida químicamente con MCA (3-metilconlantreno) a dosis muy bajas, han conseguido identificar pequeñas lesiones tumorales inertes que contienen células tumorales en un estado de equilibrio (Koebel et al. 2007). Los huéspedes murinos aunque aparentemente no muestran ninguna evidencia de tumores en crecimiento, los tumores latentes existen en forma de pequeñas lesiones. El estudio de estas lesiones mostró la existencia de células con grados variables de atipia, núcleos grandes y con cuerpos nucleares prominentes, cambios similares se observan en los estudios histológicos de las lesiones provocadas por el MCA. Además, las lesiones en equilibrio mostraron infiltración de células inmunes, incluyendo células T, células B220⁺ y macrófagos, y en un menor porcentaje células atípicas, con un aumento de células en apoptosis en comparación con los sarcomas en crecimiento. Este “estado de equilibrio” se vio alterado por la realización de inmunosupresión específica, que permitió a los tumores latentes escapar del control inmunológico y crecer, progresando en los huéspedes murinos. El cultivo de las células atípicas que constituían las lesiones latentes cuando se inyectaron en ratones inmunodeficientes generaron tumores, por el contrario en ratones inmunocompetentes (WT) lo hicieron en un número muy bajo de huéspedes. De este estudio se han podido sacar algunas conclusiones importantes: i) los tumores latentes en ratones inmunocompetentes sólo se convirtieron en tumores que progresan después del

tratamiento con anticuerpos monoclonales (mAb) contra células T o bien, capaces de neutralizar la acción de las citoquinas IL-12 o IFN- γ ; ii) la depleción de células NK o la interrupción de las vías de señalización NKG2D y TRAIL no provocaban efecto alguno; y por último iii) las células atípicas escapan de la latencia cuando crecen en huéspedes inmunodeficientes. Estos resultados sugieren que la inmunidad adaptativa, mediada por las células T, es el componente del sistema inmune que mantuvo este estado de equilibrio.

2.1.3.- Fase de escape

En la fase de escape (Fig.10c) las variantes tumorales seleccionadas en la fase de equilibrio ahora pueden crecer en el ambiente inmunológico del huésped. Esta etapa tiene lugar principalmente cuando los cambios epigenéticos y genéticos de la célula tumoral confieren resistencia a la detección inmunológica y/o eliminación, permitiendo a los tumores expandirse y ser clínicamente detectables. Las células tumorales van a emplear múltiples estrategias inmunoevasivas para eludir la respuesta integrada innata y adaptativa desencadenada frente a sus progenitores inmunogénicos.

En las últimas dos décadas son muchos los trabajos científicos centrados en intentar definir las bases moleculares de los mecanismos de escape tumoral, sabemos que los tumores pueden directa o indirectamente impedir el desarrollo de respuestas antitumorales a través de citoquinas inmunosupresoras o por la intervención de células con actividad supresora (Khong and Restifo 2002; Sakaguchi et al. 2001). El escape tumoral también puede ser consecuencia de cambios directos del tumor, como alteraciones que afectan al reconocimiento del tumor por las células efectoras del sistema inmune, como pueden ser la pérdida de expresión de antígeno tumorales, la pérdida de componentes del MHC (Marincola et al. 2000), pérdida de ligandos de NKG2D (Groh et al. 2002), y la pérdida de respuesta al IFN- γ (Kaplan et al. 1998) o

bien mecanismos que proporcionan a los tumores la posibilidad de escapar a la destrucción inmune, como defectos en las vías de señalización del receptor de muerte (Takeda et al. 2002) o la expresión de las señales anti-apoptóticas (Catlett-Falcone et al. 1999).

2.2.- Control inmunológico del cáncer: modelos murinos de latencia

La existencia de un periodo de equilibrio o latencia en la inmunoección del cáncer, era difícil ponerlo de manifiesto en el pasado, debido a la incapacidad para identificar y estudiar pequeñas lesiones preneoplásicas y neoplásicas tempranas, que pudieran estar sujetas al control inmunológico. Las únicas evidencias experimentales sobre la existencia de un equilibrio o “fase de latencia” en el tumor, hasta ahora eran proporcionadas por los datos de modelos de trasplantes de tumores en huéspedes murinos, que muestran como los tumores derivados de huéspedes inmunodeprimidos o inmunodeficientes son más inmunógenos que los obtenidos en ratones inmunocompetentes. Los sarcomas inducidos por MCA en ratones deficientes en IFN- γ , IFN tipo I y células T y linfomas de ratones pfp^{-/-}, son eliminados cuando se trasplantan en huéspedes inmunocompetentes, por el contrario progresan al ser trasplantados en ratones inmunodeficientes (Smyth et al. 2000). En este contexto, nuestro grupo ha obtenido resultados muy interesantes, de la diferente inmunogenicidad encontrada entre las metástasis generadas en ratones inmunocompetentes y nude (García-Lora et al. 2003b). Las metástasis generadas en ratones inmunocompetentes son muy poco inmunógenas, alcanzando un alto poder tumorigénico en ratones inmunocompetentes. Por el contrario, las metástasis generadas en ratones nude, muestran una alta inmunogenicidad en ratones inmunocompetentes, siendo rechazadas. Ahora bien, en ratones nude estas metástasis pierden esa inmunogenicidad, mostrando un alto poder tumorigénico. Además, en ratones inmunodeficientes observamos un mayor crecimiento local de

todas las líneas metastásicas inyectadas, tanto las generadas en ratones inmunocompetentes como en nude. Todos estos resultados apoyan que el sistema inmune esculpe el perfil de inmunogenicidad de los tumores, proceso que se cree ocurre durante la fase de equilibrio y que los linfocitos T tienen un papel destacado en la inmunovigilancia tumoral. Otros estudios sugieren que algunas células tumorales pueden persistir residualmente en huéspedes inmunocompetentes y que la latencia que muestran estas células es el resultado de las acciones del sistema inmune (Weinhold et al. 1979). Así, el concepto que se pone de manifiesto es que el sistema inmune puede prevenir la expansión y la proliferación de células tumorales (Weinhold et al. 1979).

Uno de los primeros trabajos que ponía de manifiesto la existencia del estado de latencia se realizó utilizando el linfoma murino de células B en ratones BALB/c (BCL1), que se caracteriza por provocar una temprana esplenomegalia y tardía leucemia (Slavin and Strober 1978). Sin embargo, cuando los huéspedes murinos eran previamente inmunizados con anticuerpos anti-idiotipo para las células de linfoma BCL1 (es decir, se trataron con una vacuna idiotípica IgM BCL1) y posteriormente inoculados con células BCL1, después de 60 días el 70% de los huéspedes pre-inmunizados permanecían protegidos sin signos de enfermedad, aunque si se detectaban células tumorales circulantes en bajo número por citometría de flujo. Finalmente los huéspedes terminaron recayendo meses después (Vitetta et al. 1997), la pre-inmunización fue insuficiente para erradicar las células BCL1 pero si eficaz para contener la progresión de la enfermedad un tiempo prolongado. La respuesta humoral iniciada por los anticuerpos anti-idiotipo activan la ruta de señalización del BCR, que inhiben la proliferación y es seguido por apoptosis y latencia. Este hecho puede explicarse porque los anticuerpos que interactúan con el receptor de Ig en las células BCL1 ya sea a través de su función efectora o actuando como ligando agonista induce

señales inhibitorias del crecimiento. Este modo de interacción es una característica bien conocida de los receptores de Ig expresados en los linfocitos B inmaduros que experimentan anergia y apoptosis cuando se enfrentan a antígenos propios (Gaur et al. 1993). Este es un mecanismo de defensa fisiológico frente a las células B auto-reactivas durante la maduración de los linfocitos B (Hartley et al. 1993). Esta respuesta se mantiene como un vestigio en las células del linfoma B con un fenotipo inmaduro (por ejemplo, BCL1) y puede ser imitado por anticuerpos anti-Ig. Curiosamente, en este mismo modelo de ratones pre-inmunizados cuando se deplecionaron de células T CD8⁺ o se neutraliza parcialmente la acción del IFN- γ , el periodo de latencia se ve reducido, lo que implica que ambos están implicados en el mantenimiento del estado de latencia (Farrar et al. 1999). Estos resultados son compatibles con el papel de las células T y el IFN- γ en la fase de equilibrio de la inmunomodulación, propuesto en el modelo que *Koebel & cols* (Koebel et al. 2007). Estudios posteriores han demostrado que las células del linfoma de células B (BCL1) se mantienen, aunque en bajo número, en la médula ósea debido a la presencia persistente del antígeno y de células T memoria, que son capaces de coordinar una respuesta mediada por célula T CD4⁺ y T CD8⁺ (Mahnke et al. 2005; Muller et al. 1998). La idea de que la médula ósea es un compartimento que interviene en la memoria inmunológica y la latencia de los tumores, está respaldado por estudios clínicos que muestran una mayor proporción de células T memoria entre las células T CD4⁺ y T CD8⁺ de la médula ósea de los pacientes con cáncer de mama que portan células positivas para citoqueratina, en comparación con donantes sanos (Feurerer et al. 2001).

Existen otros modelos de latencia en tumores como: i) el modelo de carcinogénesis primaria inducida químicamente utilizado por *Koebel & cols*, con el que se demuestra experimentalmente que la etapa de equilibrio existe y es distinguible de las etapas de eliminación y escape (Koebel et al. 2007) y ii) el modelo murino transgénico de

Adenocarcinoma de Próstata (PAC), estudios sobre este modelo han demostrado que la inmunoterapia adoptiva también protege a los ratones a largo plazo. El análisis histológico de los huéspedes protegidos por linfocitos T tumor-específicos mostraron que aunque los tumores no se eliminaban completamente, si se restringían a pequeños focos (Granziero et al. 1999). Además, CTLs específicos del tumor estaban presentes en los ratones protegidos, y estos resultados son coherentes con la existencia de un estado de equilibrio entre el tumor y la respuesta anti-tumoral ejercida por el sistema inmune.

2.3.- El estado de latencia en cáncer reflejado en la práctica clínica

El hecho de que muchos de nosotros tengamos lesiones cancerosas pequeñas y ocultas sin experimentar efectos nocivos (la mayoría nunca va a progresar a la fase de crecimiento exponencial) (Black and Welch 1993), implica que existen mecanismos de defensa contra el desarrollo de tumores (Folkman and Kalluri 2004). En esta dirección, son numerosas las evidencias en la práctica clínica que muestran como los tumores pueden permanecer latentes durante años, observándose recidivas 10 e incluso 20 años después de la remisión (Demicheli et al. 1996; Herrlinger et al. 2005; Matsui et al. 2006; Sagalowsky and Molberg 1999). El 20-45% de los pacientes con cáncer de mama o próstata recaen años o décadas después (Karrison et al. 1999; Pfitzenmaier et al. 2006; Weckermann et al. 2001). Estos periodos de remisión proporcionan un escenario idóneo en la investigación del control inmunológico de los tumores en estado de equilibrio, con el fin de arrojar luz a la falta de visión mecanicista en esta etapa del proceso metastásico. Estudios recientes han demostrado que los pacientes que están libres de enfermedad clínicamente detectable 20 años después del tratamiento aún tienen en la circulación células tumorales (Meng et al. 2004), de hecho, la mayoría de enfermedades neoplásicas después de recibir tratamiento pueden persistir como enfermedad mínima residual. En un estudio de carcinoma de

pulmón de células no pequeñas (CPCNP) se hallaron seis casos de recurrencia después de entre 7 y 14 años de remisión y todos asociados a tratamientos inmunosupresores (Stewart et al. 1991), esto es indicativo del importante papel del sistema inmune en la supresión del crecimiento tumoral. En otros estudios similares, se documentan casos de trasplante no intencionado de células tumorales desde el órgano donante al receptor inmunodeprimido, los tumores de origen provenían de donantes que estaban en remisión clínica (Kauffman et al. 2000) o de donantes sin historia clínica de malignidad (Myron Kauffman et al. 2002). En estos casos, es posible que el tumor se encontrara detenido bajo el estricto control del sistema inmunológico en el donante y el trasplante del órgano en un huésped inmunodeprimido ha favorecido la progresión del tumor. Un caso interesante, son las leucemias de células derivadas del donante tras un trasplante alogénico de medula ósea (Reichard et al. 2006). Desde el punto de vista de la teoría de la inmunoección, en estos casos aunque son raros, puede estudiarse en los donantes vivos la existencia de células pre-neoplásicas o la presencia de una respuesta anti-tumoral del sistema inmune. Aunque la neoplasia surgida en los receptores del injerto en ningún caso se ha llegado a manifestar en los donantes, estos datos sugieren que los tumores malignos que se controlan de alguna manera en el donante surgen en el entorno de acogida después del trasplante. Otro hallazgo en la clínica que evidencia la existencia de la inmunoección en los tumores, es la existencia de una respuesta inmune a las células preneoplásicas en la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), que eventualmente pueden convertirse en mieloma múltiple. Este estado es coherente con la fase de equilibrio inmunológico donde las células de la GMSI pueden eventualmente evolucionar y progresar a malignidad.

2.4.- Mecanismos moleculares no inmunes implicados en el periodo de latencia en el cáncer

En general, el retraso prolongado en el desarrollo tumoral también tiene implicaciones no inmunes. La latencia en el cáncer es poco conocida, sin embargo, existen evidencias clínicas que apoyan la existencia de diversos mecanismos de latencia, que incluyen: la latencia celular por detención de las células tumorales en la fase G0-G1 (latencia intrínseca) (Fig.12a); y la latencia angiogénica (latencia extrínseca), cuando las células tumorales no tiene la habilidad de responder al estado de hipoxia promoviendo la neovascularización (Aguirre-Ghiso 2007) (Fig. 12b). La latencia celular se relaciona o bien con células tumorales que entran en un estado de quietud o senectud, son las células tumorales solitarias; o bien la angiogénesis y la proliferación celular se ve superada por la apoptosis, como consecuencia de la pobre vascularización del tumor, que no se desarrolla más allá de un cierto tamaño como micrometástasis, debido a las limitaciones en el suministro de sangre. En el modelo de latencia de *Koebel & cols*, la comparación de marcadores de proliferación (ki67) y apoptosis (TUNEL) entre los tumores latentes y los que progresan, muestran que los primeros expresan bajos niveles de ki67 y elevados niveles de TUNEL en comparación con los tumores que progresan. Así, los tumores latentes se caracterizan por una combinación de apoptosis incrementada y proliferación reducida (Koebel et al. 2007). Está claro que el camino para la supresión del cáncer no es único, y el rompecabezas es complejo.

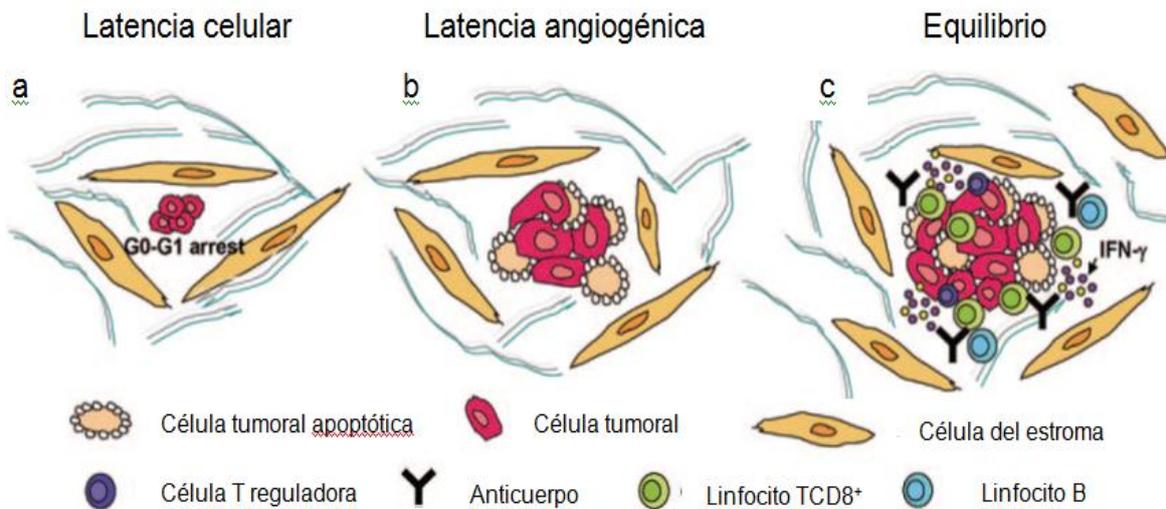


Figura 12. Formas de latencia. **a.** Latencia celular (enfermedad subclínica), las células tumorales están detenidas en la fase G_0/G_1 y puede que estas células además, desarrollen mecanismos para evitar el reconocimiento del sistema inmune y su erradicación. **b.** Latencia angiogénica como resultado de la compensación entre factores pro- y anti-angiogénicos (por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular). **c.** Latencia inmune, la proliferación de las células tumorales se mantienen en cifras bajas (subclínica), por la acción activa del sistema inmune que puede incluir las acciones de las células T $CD8^+$, $IFN-\gamma$ y anticuerpos. No está claro si estas formas de latencia son mutuamente excluyentes. Adaptación de *J Leukoc Biol.* 2008 Oct;84(4):988-93. Epub 2008 May 30

2.4.1.- Relación entre la latencia en cáncer y angiogénesis

La gran mayoría de los tumores tienen su crecimiento supeditado a la generación de vasos sanguíneos funcionales. Si los tumores no pueden inducir la angiogénesis con éxito, desencadenando la formación de los nuevos vasos sanguíneos seguirán siendo avasculares y de tamaño microscópico (Hart 1999; Holmgren et al. 1995; Watnick et al. 2003). Las células en los tumores latentes avasculares normalmente presentan una alta tasa de proliferación que se equilibra con una apoptosis elevada (Almog et al. 2006; Naumov et al. 2006a). Los tumores no-angiogénicos permanecen latentes hasta que adquieran alteraciones suficientes u otra vía de activar la angiogénesis y superar la transición a tumores angiogénicos de rápido crecimiento. Actualmente, existen modelos experimentales de latencia prolongada asociada a una angiogénesis alterada

(Cao et al. 1998; Naumov et al. 2006b). En estos modelos, las células tumorales no pueden formar tumores de crecimiento progresivo, sino que forman pequeñas lesiones que permanecen asintomáticas en el sitio de inyección o como micrometástasis. Por otra parte, la latencia a largo plazo de tumores primarios tanto murinos como humanos crecidos en ratones se puede llegar a inducir por la presencia de un inhibidor potente de la angiogénesis (Cao et al. 1998; Holmgren et al. 1995). De acuerdo con estos resultados, la adición de uno sólo de los factores angiogénicos (factor de crecimiento del endotelio vascular) a las células de melanoma humano, o la co-inyección de células tumorales con las células angiogénicas, es suficiente para escapar de la latencia tumoral (Bayko et al. 1998; Indraccolo et al. 2006). Por lo tanto, escapar de la latencia puede estar asociado con un cambio en la capacidad angiogénica de los tumores.

2.4.2.- Otros mecanismos implicados en la latencia de los tumores

El desarrollo y progresión tumoral está orquestado y sostenido por un equilibrio bioquímico de señales entre la célula tumoral y el microambiente (Kenny and Bissell 2003). Varios estudios indican que en la progresión metastásica, el nuevo microambiente, la interacción con la matriz extracelular y las células normales del estroma del órgano diana, pueden promover la latencia del tumor, al estar mediando en la inducción de un estado de quiescencia en las células tumorales (Barkan et al. 2008; Gilead et al. 2004). De hecho, se ha demostrado que una gran proporción de células cancerosas permanecen en los órganos distantes como células latentes solitarias (Goodison et al. 2003; Naumov et al. 2001). Siguiendo esta línea, una amplia investigación en modelos experimentales han mostrado la participación del receptor de uroquinasa (uPAR), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) y p38 en la regulación de la latencia basada en la quiescencia de los tumores (Allgayer and Aguirre-Ghiso 2008; Yu et al.

1997). Un balance regulado por uPAR puede favorecer la activación de p38 frente a ERK, induciendo *in vivo* un estado de latencia persistente (Ranganathan et al. 2006).

Por otra parte, las señales del microambiente también pueden conducir a cambios en la arquitectura del citoesqueleto que favorecen la entrada en estado de reposo de las células tumorales, adquiriendo estas el fenotipo propio del estado de latencia. Estos cambios están asociados con la producción de fibronectina y las vías de señalización de la integrina b1 (Barkan et al. 2008). Además de los mecanismos descritos, el estado de latencia en el tumor puede estar influenciado por el control hormonal (Uhr et al. 1997), la dieta (Chambers 2009) y la autofagia (Lu et al. 2008). Otros estudios han demostrado que los genes supresores de metástasis puede modular la latencia en la enfermedad metastásica (Hedley et al. 2006).

Así pues, parece que el cáncer puede permanecer oculto y asintomático durante períodos prolongados, mientras que ciertos mecanismos moleculares y celulares consigan detener su progresión o bien sean insuficientes para permitir la progresión del tumor. Comprender el proceso por el cual un tumor supera estas restricciones de crecimiento y emerge del estado de latencia puede conducir a nuevas estrategias para prolongar el estado de latencia, o bloquear incluso la formación de metástasis en fases tempranas. De hecho, todas las terapias contra el tumor van dirigidas a tumores que se han escapado de la latencia celular (intrínseca), angiogénica (extrínseca) o inmunes (equilibrio).

3.- MECANISMOS DE ESCAPE TUMORAL

Se puede establecer que la inmunovigilancia es la encargada de la eliminación de un tumor en un estadio temprano, pero los tumores que se diagnostican mayoritariamente, son los que se encuentran en un estado avanzado de diseminación (clínicamente detectables), es decir, aquellos que han desarrollado mecanismos activos para romper el balance de la inmunidad desde la inmunovigilancia a la tolerancia o al escape. Los mecanismos de escape tumoral al sistema inmunológico se pueden clasificar en dos grupos, aquellos que inhiben directa o indirectamente la activación de las células del sistema inmunológico y los mecanismos desarrollados por las células tumorales para evadir el control del sistema inmunológico, funcionalmente activo.

3.1.- Mecanismos que inducen tolerancia y/o anergia

Los mecanismos que inducen la anergia o tolerancia de las células del sistema inmunológico son varios (Ahmad et al. 2004). Las células tumorales o el estroma influenciado por las células tumorales pueden inducir la anergia directa o indirectamente. Así podemos destacar como mecanismos de anergia los siguientes:

3.1.1.- Células Inmunosupresoras

Hay al menos dos tipos de células que pueden imponer un efecto supresor sobre el sistema inmune del huésped, son las células T $CD4^+CD25^{high}$ (Berendt and North 1980) y las células mieloides $Gr1^+CD11b^+$ (Bronte et al. 2000), ambas proporcionan al tumor la oportunidad de escapar al reconocimiento inmunológico.

En 1971, *Gershon & Kondo* identificaron las llamadas "células supresoras" (Gershon and Kondo 1971). Debido a los conflictivos resultados, el concepto de la inmunosupresión mediada por células T se desvaneció en la década de 1980.

Sakaguchi & cols fueron los primeros en despertar nuevamente el interés por las ahora denominadas células T reguladoras (Treg) al identificar una población de células T CD4⁺ que expresan CD25^{high} en un modelo tumoral murino (Sakaguchi et al. 1995). En los años posteriores numerosos estudios han contribuido a la caracterización de diferentes subpoblaciones de células T con propiedades reguladoras, incluyendo las CD4⁺CD25^{high}, las células Treg inducidas, por ejemplo, las células Tr1 y TH3, así como células Treg CD4⁺CD25^{high} desarrolladas en la periferia por la conversión de células T CD4⁺CD25⁻. Todos estas diferentes poblaciones de células T con función reguladora coexisten y contribuyen a la supresión inmune (Mills and McGuirk 2004; Sakaguchi 2004, 2005; Vigouroux et al. 2004). Estas células además producen citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF-β, las Tr1 secretan elevadas cantidades de IL-10 (Levings et al. 2001), y las TH3 de TGF-β (Weiner 2001). Las células Treg son críticas en el mantenimiento de la tolerancia, se originan en el timo y representan entre el 5-10% de las células T CD4⁺ en la periferia (Sakaguchi 2004). Entre los marcadores que expresan constitutivamente y están asociados a su función y fenotipo están: el antígeno 4 asociado a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y un gen relacionado con la familia del receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR) (McHugh et al. 2002; Read et al. 2000; Shimizu et al. 2002). Diferentes estudios se han enfocado a la búsqueda de marcadores más específicos de células Treg, identificándose el factor de transcripción Foxp3, que únicamente se expresa en las células Treg (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003; Khattry et al. 2003) y se ha propuesto como un marcador de linaje, se trata de un regulador transcripcional necesario para su desarrollo y función (Bennett et al. 2001; Brunkow et al. 2001). Entre las características de las células Treg CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ está su capacidad para inhibir activamente las células T CD4⁺CD25⁻, T CD8⁺, DCs, NK, las células T “asesinas”, y células B (Azuma et al. 2003; Murakami et al. 2002; Romagnani et al. 2005). Estudios recientes sugieren que las células Treg pueden perder la expresión de FoxP3 y ser reprogramada hacia

linfocitos Th efectores (Miyao et al. 2012). Así, las células Treg se convierten en células T FoxP3⁻, “exFoxP3” Th, tras su activación por citoquinas inflamatorias (Komatsu et al. 2009; Xu et al. 2007; Yang et al. 2008) o por transferencia adoptiva de células T en ratones deficientes (Duarte et al. 2009; Komatsu et al. 2009).

Las células mieloides supresoras (MDSC) representan una población heterogénea de células mieloides inmaduras aun no comprometida a macrófago, DC o granulocito, que expresan marcadores de granulocitos, Gr1⁺, y de monocitos, CD11b⁺ (Bronte et al. 2000), y se acumulan en el bazo, ganglios linfáticos y en sangre periférica (Mazzoni et al. 2002). Estas MDSC ejercen funciones supresoras regulando las respuestas de las células T a través de óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno y la secreción de TGF-β, al tiempo que promueve la inducción de las células Treg y favorece las respuestas anti-inflamatorias (Condamine and Gabrilovich 2011; Corzo et al. 2009; Gabrilovich and Nagaraj 2009). La acumulación de células Gr1⁺CD11b⁺ y su capacidad para inhibir la función de las células T ha sido estudiada en pacientes con cáncer (Almand et al. 2001). Son capaces de inhibir la producción de anticuerpos, la generación de CTLs, la función de células T y la proliferación linfocitaria (Kusmartsev et al. 2000; Mazzoni et al. 2002). Las células Gr1⁺ también son capaces de disminuir la expresión de las moléculas CD3ζ (Otsuji et al. 1996) y bloqueando la respuesta a los péptidos presentados por moléculas MHC-I *in vitro* e *in vivo* (Gabrilovich et al. 2001; Kusmartsev et al. 2004).

3.1.2.- Ausencia de coestimulación

Factores como la insuficiente coestimulación para inducir una respuesta de células T contribuyen a la falta de inmunidad eficaz. Hay un gran número de moléculas que normalmente realizan funciones coestimuladoras que intervienen en la interacción ligando/receptor proporcionando una segunda señal crítica para la activación de las

células T y/o APC. Algunas de estas moléculas: CD80 (B7-1)/CD86 (B7-2) que se unen a CD28 y CTLA4, respectivamente; CD40L, expresado en células T CD4 helper activadas que se unen a los receptores CD40 de APCs; CD58 humano y CD48 de ratón (LFA-3) se unen a CD2; y CD54 (ICAM-1) a LFA-1. Los miembros de la superfamilia TNFR (receptor del factor de necrosis tumoral) incluyendo CD27, CD30, 4-1BB y OX40 también se ha mostrado en diferentes estudios que pueden transmitir una señal de coestimulación a los leucocitos (Gruss and Dower 1995; Smith et al. 1994). Las células tumorales son capaces de inducir tolerancia o anergia en base a la presentación de antígenos MHC-I restringidos, sin la expresión de ligandos coestimuladores (Abken et al. 2002). Esta falta de respuesta, sin embargo, puede revertirse cuando las células tumorales se modifican genéticamente para expresar moléculas coestimuladoras (Abken et al. 2002). *Chen & cols.* mostraron como la inserción de genes que codifican moléculas B7.1 y B7.2 en tumores, aumenta su inmunogenicidad (Chen et al. 1994). Además, la coestimulación a través de moléculas como 4-1BB puede ser crítico en la expansión y diferenciación de los linfocitos T citotóxicos (Melero et al. 1997).

3.1.3.- Citoquinas inmunosupresoras

Las células tumorales producen una serie de citoquinas y quimiocinas que pueden tener un efecto supresor sobre las células inmunes. En pacientes de cáncer no microcítico de pulmón (CPNM), la expresión a nivel de mRNA de IL-4, IL-10, TGF- α , y TGF- β 1 fue significativamente mayor que la de IL-2, IL-12, IL-18, e IFN- γ tanto en el derrame pleural como en el tejido del propio tumor (Li et al. 2003). Esta expresión predominante de citoquinas de tipo II (inmunosupresoras) es el reflejo de un estado de inmunosupresión en el microambiente inmunológico. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es secretado por muchos tumores y se considera un factor clave en el escape tumoral (Toi et al. 1996). VEGF no sólo es importante para la

vascularización de los tumores, también es un factor producido por los tumores sólidos para inhibir el reconocimiento inmune (Ohm and Carbone 2001) e impedir la diferenciación y maduración de DCs (Oyama et al. 1998). Elevadas concentraciones de VEGF en sangre se han correlacionado con mal pronóstico en tumores humanos, posiblemente como resultado de sus propiedades angiogénicas y/o su capacidad para suprimir la maduración de DCs (Inoshima et al. 2002; Lissoni et al. 2001). VEGF se relaciona negativamente con la infiltración por DCs en muestras de cáncer de pulmón (Inoshima et al. 2002), también existe una correlación negativa entre el estado de activación de la DCs y la concentración de VEGF en sangre periférica en cáncer de pulmón no microcítico (Fan et al. 2003). En pacientes con cáncer de pulmón, cabeza, y cuello, y mama, se encontró una disminución en la función y en el número de DCs maduras, que se asoció con un incremento de las concentraciones plasmáticas de VEGF (Almand et al. 2000).

Elevadas concentraciones de otra interleucina como la IL-10, se encuentran frecuentemente en suero de pacientes con cáncer. La IL-10 puede ejercer un efecto inhibitorio de la diferenciación de las DCs desde sus precursoras (Girolomoni and Ricciardi-Castagnoli 1997). Esta citoquina también inhibe la presentación antigénica, la producción de IL-12 y la inducción de las respuestas *in vivo* a células T helper (De Smedt et al. 1997; Sharma et al. 1999). La IL-10 también potencia la apoptosis espontánea de las DCs (Ludewig et al. 1995), y la susceptibilidad a la lisis por células NK (Carbone et al. 1999). La IL-10 puede ejercer un efecto protector en las células tumorales frente a los CTLs mediante una falta de expresión de las moléculas HLA de clase I y II e ICAM-1 (molécula intracelular de adhesión tipo 1) (Yue et al. 1997). La pérdida de expresión de las moléculas HLA de clase I también puede ser debida a una regulación negativa coordinada de los transportadores de péptidos TAP1/TAP2 en las

células tumorales mediada por la IL-10 (Salazar-Onfray et al. 1997; Zeidler et al. 1997).

El factor proinflamatorio prostaglandina E (PGE2), es otra citoquina que se expresa en tumores como resultado de un aumento de expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 en diversos tumores humanos (Ristimaki et al. 1997). La PGE2, incrementa la producción de IL-10 por los linfocitos y macrófagos e inhibe la producción de IL-12 por los macrófagos (Huang et al. 1998). También se encuentran elevadas concentraciones de TGF- β en pacientes con cáncer y se ha asociado a la progresión de la enfermedad (Gorsch et al. 1992) y a malas respuestas en inmunoterapia (Doran et al. 1997). TGF- β inhibe la activación, proliferación y actividad de los linfocitos T *in vivo* (Fontana et al. 1989). También se ha descrito la secreción de galectina-1 por parte de las células de melanoma, que inhibe la activación de células T (Rubinstein et al. 2004).

3.1.4.- Degradación enzimática del triptófano

El sistema inmunológico tiene como principal función eliminar cualquier célula que considera como extraña. Sin embargo, durante el embarazo, el feto expresa péptidos antigénicos y moléculas HLA que son extrañas para la madre, pero en este caso no ocurre el ataque por parte de los CTLs. *Munn, Mellor & cols.* aportaron evidencias sobre este hecho que contribuye a la protección de la barrera materno-fetal. Así, la administración de 1-metilriptófano (1MT) a ratones preñados mostró que se producía abortos en los fetos. Esta reacción dependía de las células T y de las disparidades antigénicas entre la madre y el feto (Mellor et al. 2001; Munn et al. 1998). 1-MT es un inhibidor competitivo de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), enzima citosólica que cataliza la degradación del triptófano y que se expresa en las células fetales y en la interfase materno-fetal (Uyttenhove et al. 2003). Estos datos indican que la expresión de IDO protege al feto de las células T maternas. *Van den Eynde & cols* han mostrado

que las células tumorales utilizan el triptófano para evitar la activación del sistema inmunológico (Van den Eynde 2003). LaIDO es una enzima metabólica que degrada el triptófano intracelular. Como el triptófano puede atravesar fácilmente la membrana plasmática mediante transportadores específicos, la bajada de concentración del triptófano intracelular se compensa por la entrada del mismo en la célula. Así, se va generando el agotamiento del triptófano del medio por las células que expresanIDO, que es el caso de muchas células tumorales, y se permite su crecimiento. Los linfocitos T dejan de proliferar en estas condiciones, puesto que tienen un sistema de control (poco conocido todavía) que bloquea el ciclo celular en la fase G1, cuando la concentración de triptófano es inferior a 0,5-1 μM (la concentración sérica normal es de 50 μM) (Munn et al. 1999). Existen estudios que revelan como en pacientes con cáncer colorrectal, con alta expresión deIDO, esta se ha asociado con una menor infiltración del tumor por células T CD3⁺ (Brandacher et al. 2006). En estudios similares en pacientes de cáncer ovárico se encontró una baja infiltración de los tumores por linfocitos T CD8⁺ asociada a una alta expresión deIDO (Inaba et al. 2009). En cáncer de endometrio los estudios muestran una reducción en el infiltrado de células T CD3⁺, T CD8⁺, así como CD57⁺ acompañado de niveles elevados deIDO (Ino et al. 2008). Debido a la importancia de la infiltración inmune para la respuesta antitumoral, esta reducción de algunas poblaciones inmunes sugiere que la expresiónIDO en tumores humanos puede facilitar la evasión inmune.

3.1.5.- Señalización defectiva a través de los receptores de muerte

Los dos ligandos de receptores de muerte que intervienen en el proceso de inmunovigilancia frente al desarrollo tumoral son Fas-ligando (Fas-L) y TRAIL (Straus et al. 2001; Takeda et al. 2001). La señalización defectuosa a través de estos receptores es un mecanismo que puede contribuir a la supervivencia y proliferación de las células tumorales. Presentan secuencias citoplasmáticas denominadas “dominios

de muerte”, imprescindibles para la transmisión de señales apoptóticas a través de la cascada de las caspasas (Salvesen and Dixit 1999). El inhibidor de la caspasa 8 (cFLIP) se expresa en diversos tumores y puede hacer a las células tumorales resistentes a la apoptosis mediada por los receptores de muerte (Irmier et al. 1997). La elevada expresión de cFLIP en las células tumorales puede contribuir a una inmunoresistencia a las células T *in vivo* (Medema et al. 1999). La pérdida o falta de expresión de Fas en los tumores puede contribuir también a una resistencia a la apoptosis. Se han descrito mutaciones en los genes que codifican Fas en mieloma múltiple (Landowski et al. 1997), linfoma de tipo no-Hodgkin (Gronbaek et al. 1998) y melanoma (Shin et al. 1999). Estas mutaciones dan lugar a la pérdida de función del receptor de muerte. En el caso de la apoptosis mediada por TRAIL, puede darse una pérdida de expresión de los mismos por diversos mecanismos originando la resistencia a apoptosis mediada por TRAIL (Hersey and Zhang 2001). La implicación de la metaloproteinasa 7 (MMP7) ha sido ampliamente estudiada en la progresión del cáncer, no sólo por su implicación en la degradación de ECM (matriz extracelular) y la progresión metastásica, sino también por su papel en la regulación del sistema Fas/FasL. MMP7 modula la expresión y activación de Fas, mediante la generación de formas solubles de FasL por la escisión de Fas en la membrana (Mitsiades et al. 2001), y también del receptor Fas (Strand et al. 2004), siendo en ambos casos bloqueada la activación de Fas. Los pacientes con elevada expresión de MMP7 y baja expresión de Fas mostraban una supervivencia más corta (Wang et al. 2006).

3.1.6.- Apoptosis de linfocitos T activados

Uno de los mecanismos más controvertidos de escape tumoral es la expresión de ligandos de receptores de muerte por parte de las células tumorales. Así una amplia variedad de tumores expresan Fas-L, induciendo apoptosis sobre las células diana susceptibles Fas+. Entre ellos, carcinoma de pulmón (Niehans et al. 1997), melanoma

(Hahne et al. 1996), carcinoma de colon (O'Connell et al. 1998), carcinoma hepatocelular (Strand et al. 1996) y carcinoma de esófago (Bennett et al. 1998). Tras la activación de los linfocitos T como resultado del reconocimiento de antígenos tumorales, las células tumorales expresan niveles altos de Fas-L, induciendo la apoptosis de las propias células T ("suicida") y entre las propias células T ("fratricida") (Chappell et al. 1999; Zaks et al. 1999).

3.2.- Mecanismos de evasión

Son los mecanismos desarrollados por las células tumorales para evitar el reconocimiento y lisis por parte de un sistema inmunológico funcionalmente activo.

3.2.1.- Pérdida de antígenos tumorales e inmunodominancia

La expresión de antígenos en tumores es heterogénea, incluso en el mismo tumor. Se puede originar la pérdida de expresión de antígenos tumorales independientemente de que exista una alteración en la expresión de moléculas HLA de clase I. Se ha definido el déficit en la expresión de antígenos de diferenciación de melanocitos (MDAs), tales como gp100, MELAN-MART1 y tirosinasa, y se ha asociado a la progresión tumoral (de Vries et al. 1997). El mecanismo exacto que controla la pérdida de expresión de estos antígenos tumorales no se conoce en la mayoría de los casos. Sin embargo, la propagación de estas variantes tumorales con pérdida antigénica se facilita por el fenómeno de inmunodominancia (Schreiber et al. 2002). La inmunodominancia sería el proceso por el que se detecta preferencialmente un epítipo entre todos los expresados en la célula tumoral diana. Existen muchos estudios que demuestran que la pérdida de TAAs (antígenos asociados al tumor) es un mecanismo para escapar a la respuesta antitumoral inducida (especialmente en melanoma) (van Stipdonk et al. 2009).

3.2.2.- Alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I

De entre todos los mecanismos que explican el escape de las células tumorales de la inmunovigilancia, las alteraciones en la expresión de moléculas MHC de clase I quizás sea el que se detecta con una mayor frecuencia y el que tiene una gran repercusión funcional, puesto que modula la susceptibilidad de las células tumorales a las lisis por CTLs y NKs (Garrido et al. 1993). Según la hipótesis de “pérdida de lo propio”, estas pérdidas hacen más susceptibles a las células tumorales a la lisis por células NK, ya que las NK monitorizan la expresión en superficie de moléculas HLA de clase I a través de sus receptores KIRs (receptores tipo inmunoglobulina, Killer Immunoglobulin-like Receptor) y eliminan aquellas células que presentan una baja expresión de moléculas en superficie (Moretta et al. 1996). Sin embargo, a pesar de la existencia de un sistema inmunológico funcional, las células tumorales continúan creciendo, invadiendo y produciendo metástasis en el huésped inmunocompetente (Boon et al. 1994). Existen datos proporcionados por varios laboratorios que indican que se debe a una selección (todavía no completamente entendida) de variantes de escape tumorales deficientes en estas moléculas de clase I (Garrido et al. 1997; Seliger et al. 2002).

3.3.- Fenotipos alterados en las moléculas MHC de clase I

La pérdida del antígeno MHC asociado a la molécula de clase I, H-2K^k, se describió por primera vez en un linfoma murino en 1976 y un año más tarde se describieron las pérdidas de moléculas HLA en tumores humanos (Garrido et al. 1976; Pellegrino et al. 1977). En los años siguientes se ha detectado una elevada proporción de tumores con estas alteraciones (Garrido et al. 1993; Hicklin et al. 1999). La pérdida total o selectiva de antígenos HLA de clase I se ha descrito en diferentes tipos histológicos de tumor (Garrido et al. 1997). Los resultados del análisis de tumores humanos procedentes de biobancos muestran que entre el 40-90% de los tumores tiene pérdidas totales o

parciales de las moléculas HLA de clase I (Algarra et al. 2000; Marincola et al. 2000). Estas alteraciones se han puesto de manifiesto mediante estudios que implican técnicas inmunohistoquímicas o de inmunofluorescencia de células tumorales, usando anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente determinantes HLA de clase I, locus específicos (HLA-A, HLA-B) o alelo específicos (Garrido et al. 1997; Koopman et al. 2000). Las cifras de pérdidas de moléculas HLA de clase I son cercanas al 100% en algunos tumores: en carcinomas cervicales se presentan en un 96% (Koopman et al. 2000), en un 96% de cáncer de mama (Cabrera et al. 1996), en un 87% de carcinomas colorrectales (Maleno et al. 2004), en un 97% de carcinomas de laringe (Cabrera et al. 2000; Maleno et al. 2002), un 72% de carcinoma de vejiga (Cabrera et al. 2003b). Debido a la heterogeneidad de poblaciones celulares en los tejidos tumorales, es importante definir de forma precisa el déficit de las moléculas HLA de clase I en estas células tumorales.

Nuestro grupo ha unificado estas alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I en siete grupos (García-Lora et al. 2003a) o fenotipos (Fig. 13). De este modo, se encuentran:

Fenotipo I: pérdida completa de moléculas HLA de clase I. Este fenotipo se caracteriza por la ausencia total de expresión en superficie de los antígenos HLA de clase I.

Fenotipo II: pérdida de un haplotipo HLA. Los tumores pueden perder parcial o totalmente uno de los dos haplotipos HLA

Fenotipo III: falta de expresión de un locus, HLA A, B, o C.

Fenotipo IV: pérdidas alélicas. Esta alteración se define como la pérdida de un alelo HLA de clase I. Se necesitan mAbs HLA frente a alelos para su diagnóstico.

Fenotipo V: fenotipo mixto. Es el resultado de la combinación de dos alteraciones diferentes, por ejemplo, una pérdida de haplotipo HLA y una falta de expresión del

locus HLA B o C (combinación de los fenotipos II y III). En este caso, el resultado final es una célula tumoral que expresa un solo alelo HLA.

Fenotipo VI: Ausencia de inducción con IFNs. Algunas células tumorales expresan o no antígenos HLA de clase I en condiciones basales, y no responden a ciertos agentes activadores como citoquinas e IFN- α ó γ .

Fenotipo VII: Falta de expresión de las moléculas clásicas HLA A, B, C y aparición de las moléculas no clásicas HLA E ó HLA G.

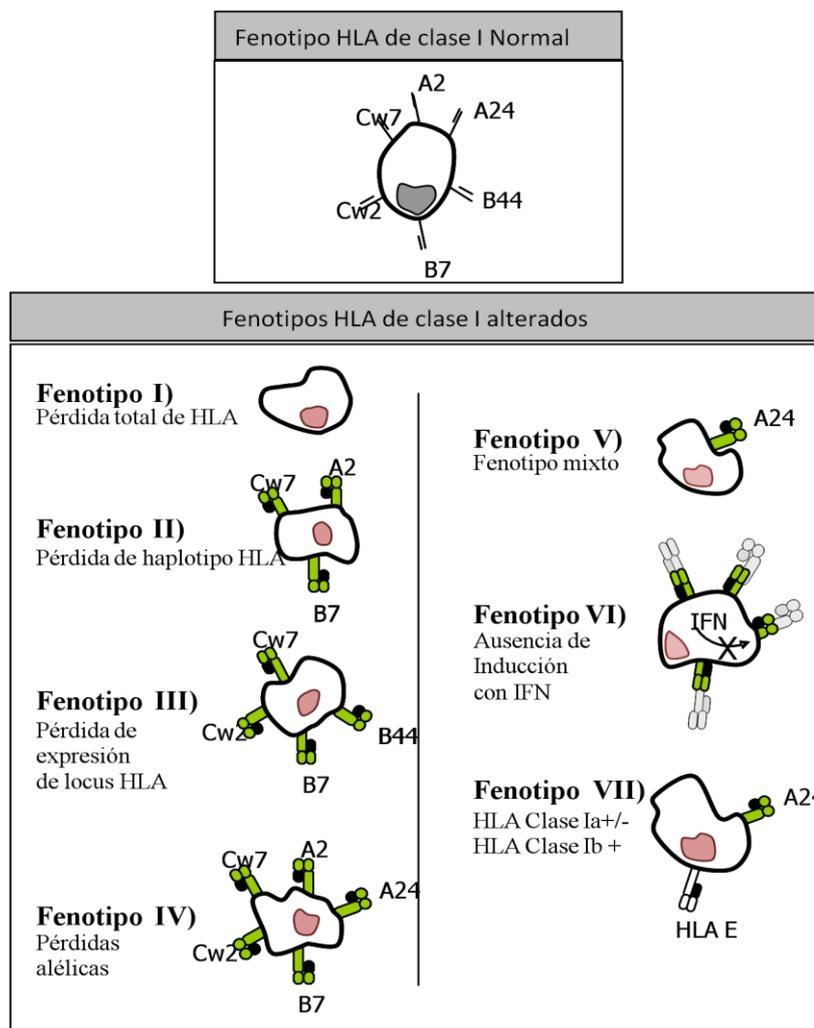


Figura 13. Fenotipos HLA de clase I alterados encontrados en tumores humanos. Las células normales expresan 6 alelos HLA de clase I. Las moléculas HLA pueden estar total o parcialmente ausentes en las células tumorales (Fenotipo I- Fenotipo V). Además, las células tumorales pueden no responder a IFN (Fenotipo VI) o pueden expresar moléculas HLA-E aberrantes en células con baja expresión de HLA A, B o C (Fenotipo VII). *Adaptación de García-Lora y cols. Journal of cellular Physiology 2003 195:346-355)*

Existen diferentes mecanismos moleculares que pueden llevar a la pérdida total o parcial de la expresión de las moléculas HLA de clase I. Estas pérdidas pueden producirse en cualquiera de los pasos que se llevan a cabo en los procesos de síntesis, ensamblaje, transporte o expresión en la superficie celular de las moléculas de clase I (Garrido et al. 1997; Ruiz-Cabello and Garrido 1998). Los mecanismos asociados a cada uno de los siete fenotipos HLA son:

En el **fenotipo I**, se origina la pérdida total de HLA de clase I, que se puede asociar a la pérdida de β_2 -microglobulina. Existen datos que establecen la presencia de deleciones o mutaciones, como ocurre en carcinomas colorrectales (Browning et al. 1996), melanomas (Benítez et al. 1998; Pérez et al. 1999), adenocarcinoma de pulmón (Chen et al. 1996) y linfoma de Burkitt (Rosa et al. 1983). Otra de las alteraciones implicadas en este fenotipo radica en la maquinaria de procesamiento antigénico (APM). Estas alteraciones pueden ocasionar el defecto en el transporte de los péptidos desde el citoplasma al retículo endoplásmico (Cabrera et al. 2003a; Restifo et al. 1993). En otros casos se origina la falta de expresión coordinada de varios componentes del APM (García-Lora et al. 2003b; Ritz et al. 2001; Romero et al. 2005; Seliger et al. 2003).

En el **fenotipo II** se produce la pérdida de un haplotipo, alteración que se encuentra en tumores de diferentes tejidos histológicos (Jiménez et al. 1999; Méndez et al. 2001; Torres et al. 1996). Se ha observado, mediante el uso de marcadores de microsatélites que flanquean la región del MHC. Se han detectado LOH de la región HLA del cromosoma 6 en el 46% de los carcinomas de cérvix, el 36% de carcinoma de cabeza y nuca, en el 17% de carcinomas colorrectales y el 17% de carcinoma de mama (Koopman et al. 2000; Maleno et al. 2004).

En el **fenotipo III**, la falta de expresión de un locus (A, B o C), se asocia con alteraciones en la transcripción de los genes HLA de clase I (Soong and Hui 1992). En melanoma se ha observado una falta de expresión selectiva de HLA-B con un incremento en la transcripción de c-myc, que interfiere con la transcripción de los gen HLA-B a nivel del promotor (Peltenburg and Schrier 1994).

El **fenotipo IV** se manifiesta con pérdida alélica, resultado de mutaciones puntuales, deleciones parciales de los genes HLA de clase I o recombinación genética (Brady et al. 2000; Serrano et al. 2000). Se ha establecido la pérdida selectiva del alelo HLA-B44 en carcinoma colorrectal como consecuencia de un defecto en la tapasina (Cabrera et al. 2005).

En el **fenotipo V** consiste en un conjunto de fenotipos observados en ciertos tumores (Ikeda et al. 1997; Real et al. 1998) y requiere al menos la combinación de dos alteraciones.

El **fenotipo VI** puede englobar a los tumores que no responden a la regulación positiva del IFN sobre los componentes del APM (Rodríguez et al. 2007; Seliger et al. 2008), resultado de la falta de expresión del factor transcripcional que se une al interferón (IRSE) (Abril et al. 1996) y de una expresión alterada de las moléculas TAP1 y LMP2 por una ruta defectiva de IFN- γ (Dovhey et al. 2000).

El último fenotipo descrito es el **fenotipo VII**, consistente en la pérdida de expresión de HLA de clase Ia y la expresión aberrante de clase Ib. Se origina cuando el tumor reduce drásticamente la expresión de moléculas HLA A, B, C y al mismo tiempo expresan HLA-E o HLA-G, que produce la inhibición de las células NK tras interaccionar con el receptor CD94/NKG2a (Marín et al. 2003).

Con frecuencia la expresión en superficie de antígenos HLA de clase I en células tumorales pueden ser recuperadas tras el tratamiento con inmunomoduladores (interferones) o agentes farmacológicos, esto nos demuestra que son alteraciones reversibles las responsables de los defectos en la expresión. Sin embargo, la falta de restauración de la expresión por citoquinas sugiere la existencia de lesiones estructurales irreversibles responsables de la pérdida de antígenos de clase I en la superficie de la célula tumoral.

Tabla 1. Mecanismos implicados en la pérdida de expresión en superficie de las moléculas MHC-I

A. Lesiones irreversibles o “hard”: la expresión no se recupera tras el tratamiento con IFN u otros agentes.

- Pérdidas totales, alélicas o locus específicas de las cadenas pesadas MHC-I
- LOH
- Mutaciones, deleciones o recombinaciones de β_2 -microglobulina
- Alteraciones estructurales en LMP2, TAP1, TAP2 o tapasina

B. Lesiones reversibles o “soft”: lesiones reversibles con el tratamiento con IFN u otros agentes

- Regulación transcripcional negativa de las cadenas pesadas MHC-I
- Regulación transcripcional negativa específica de locus
- Regulación transcripcional negativa de los componentes de la APM
- Alteraciones en la ruta de señalización del IFN

C. Otros defectos moleculares

- Metilación de los genes β_2 -microglobulina, tapasina, CIITA o cadenas pesadas MHC-I
- Regulación postranscripcional de la APM
- Fosforilación de Taps (modificaciones postranscripcionales)

Desde el punto de vista funcional, las alteraciones en la expresión de antígenos de clase I puede ser clasificada en dos grandes grupos: (1) reguladora-reversible, son las denominadas “soft lesion”, con regulación positiva por IFN- γ y (2) estructural-irreversible son las “hard lesion”, cuando la expresión no puede ser recuperada por citoquinas u otros agentes. A pesar de que los diferentes mecanismos moleculares responsables de las alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I se han

descrito hace años (Tabla 1), ha sido recientemente cuando a estos hallazgos se les ha dado relevancia clínica (Aptsiauri et al. 2008; Garrido et al. 2010c).

La pérdida completa de moléculas HLA de clase I debería fracasar como mecanismo de escape debido a un aumento de la susceptibilidad a la lisis por las células NK, consecuencia directa de las pérdidas (Porgador et al. 1997). Se plantea la pregunta de ¿por qué las variantes defectivas para HLA de clase I continúan creciendo y no son destruidas por las células NK? Las células NK expresan receptores activadores como NKG2D que se unen a ligandos que pueden estar expresados en células tumorales, MICA y MICB. La activación de las células NK por esta vía podría contrarrestar el efecto inhibitorio de la unión de HLA-I con los receptores KIRs (Bauer et al. 1999; Groh et al. 1999) en aquellas células tumorales con expresión parcial de moléculas HLA de clase I. Así, a pesar de que los tumores negativos para HLA de clase I pueden ser susceptibles de la lisis por células NK, la ausencia de expresión de MICA o MICB permitiría tener a los tumores una ventaja de crecimiento, representando una estrategia potencial de escape (Garrido and Algarra 2001). Otra posible explicación de por qué las células tumorales HLA-I negativas no son destruidas por las células NK, puede derivarse del modelo activación-inhibición. Las células NK son rápidamente activadas en presencia de factores estimuladores como IL-12, IL-2, IL-15 o IFN tipo I en respuesta a condiciones inflamatorias asociadas con una infección microbiana. En ambientes “estériles” estos efectos estimuladores pueden no originarse (Gerosa et al. 2002). Además, la ausencia de expresión de moléculas coestimuladoras, como B7-1, B7-2, CD40 y CD70 por parte de los tumores, puede impedir una activación adecuada de las células NK a través de la ruta de coestimulación CD28 y CD27 (Galea-Lauri et al. 1999; Takeda et al. 2000). Es posible que en algunas situaciones los tumores puedan producir citoquinas inmunomoduladoras, como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) o el

factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) (Apte et al. 1997), que inhibe directamente la activación de las células NK.

4.- MODELOS EXPERIMENTALES MURINOS EN CANCER: MODELO GR9

La tumorigénesis es un proceso secuencial que implica una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas, tales como la activación de proto-oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores (Visvader 2011). En la pasada década, nuestra comprensión de la genética del cáncer ha experimentado un amplio desarrollo gracias en parte a estudios directos sobre el cáncer humano. El estudio del cáncer familiar ha permitido identificar múltiples genes supresores de tumores que juegan un papel crucial en el desarrollo del cáncer. Las mutaciones o pérdidas de estos genes predisponen al portador al desarrollo del tumor. Para las formas esporádicas del cáncer, la susceptibilidad de cada individuo se ve modificada no solo por estos genes, sino también por otros genes que pueden influir en el desarrollo del proceso. Los modelos murinos ofrecen serias ventajas, convirtiéndose así a lo largo de los años en una alternativa en el estudio del cáncer. Ofrecen ventaja a tres niveles: i) permiten identificar genes nuevos implicados en la patogénesis del cáncer, ii) se puede evaluar mediante ensayos *in vivo* el papel de estos nuevos genes en la tumorigénesis y iii) permiten estudiar la progresión metastásica.

El ratón común *Mus musculus* ha sido ampliamente utilizado como modelo para estudios genéticos y de desarrollo de enfermedades desde principios de los años 20. Uno de los principales motivos es la gran semejanza genética que presenta con humanos. Cuando se comparan los cariotipos humanos y murinos al microscopio, no se encuentran homologías entre ambos. Sin embargo, la secuenciación completa del genoma del ratón reveló que existe una alta homología genética, aproximadamente el 99% de los genes del ratón tiene un homólogo humano. Además, el ciclo de vida del ratón es equivalente al ciclo de vida humano y de otros mamíferos. Únicamente se diferencia en el tiempo: así la esperanza de vida del ratón es de dos años, el período desde la fertilización al nacimiento es sólo de 21 días, alcanzan la pubertad en cinco o

seis semanas y se convierten en ratones adultos en tan solo ocho semanas. Estas características, junto con otras como su fácil alimentación, su gran adaptabilidad a diferentes ambientes y su pequeño tamaño han dado lugar a la amplia utilización de los modelos murinos para la investigación médica, contribuyendo de forma relevante a las investigaciones en cáncer.

Los modelos tumorales murinos son un candidato ideal para estudiar los mecanismos moleculares que subyacen en la patogénesis del cáncer. La generación de ratones knockout y transgénicos ha sido un instrumento determinante en el estudio del papel de los oncogenes y de los genes supresores de tumores. Ahora es posible manipular el genoma del ratón, ratones transgénicos, para que sobre-exprese oncogenes o bien provocar la delección, ratones knockout, de un gen supresor de tumores en la línea germinal de un tejido o linaje celular específico. Algunos de estos ratones transgénicos o knockout se han convertido en modelos tumorales para el estudio de cáncer, permitiendo analizar el papel de los oncogenes y genes supresores de tumores (Ottewell et al. 2006; Talmadge et al. 2007; Van Dyke and Jacks 2002). Esto ha permitido establecer relaciones entre mutaciones individuales en genes y cambios específicos en las células que permiten el desarrollo del tumor.

4.1.- Modelos murinos de progresión metastásica

La progresión metastásica es un reto clínico y la causa de la mayoría de las muertes por cáncer. Como proceso biológico, la diseminación de las células tumorales es bastante complejo, ya que son el reflejo de las barreras que una célula tumoral que abandona el tumor primario debe superar para generar nuevas lesiones secundarias (Gupta and Massague 2006). Solo una minoría de las células que llegan a nuevos órganos y tejidos, logran sobrevivir y finalmente adaptarse a un nuevo microambiente (Nguyen et al. 2009; Quintana et al. 2008). Ciertas propiedades fundamentales de las

células metastásicas, incluyendo la migración y la invasión, han sido el objeto de numerosos estudios utilizando una variedad de ensayos *in vitro*. Los avances tecnológicos logrados con moléculas fluorescentes o bioluminiscentes y en microscopía, han permitido avances en el análisis del proceso metastásico y sus mecanismos moleculares, ya sea como célula solitaria o como migración en clusters de células (Ghajar and Bissell 2008). Sin embargo, estos modelos *in vitro* proporcionan información en el análisis de un conjunto limitado de eventos en la cascada metastásica, que *in vivo* dentro de un tejido específico implica muchos más factores.

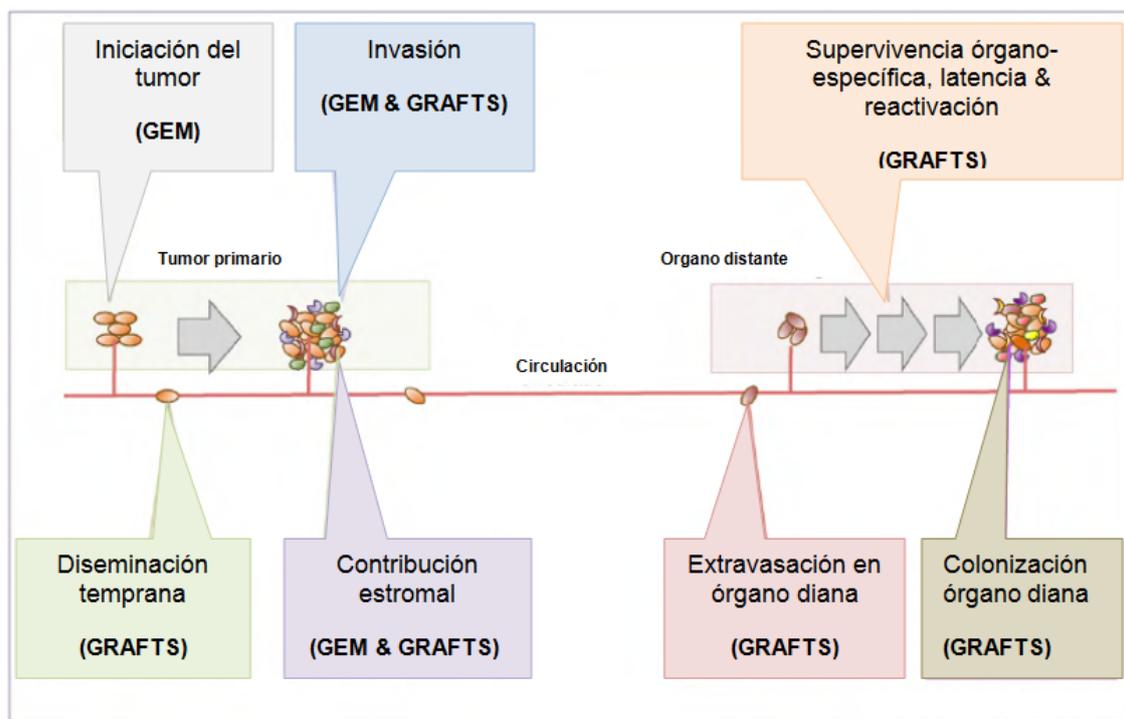


Figura 14. Contribución de los modelos tumorales murinos al estudio de la progresión metastásica. **GEM:** modelos murinos genéticamente modificados, **GRAFT:** modelos murinos de trasplante. Adaptación de *Current Opinion in Pharmacology* 2010, 10:571-577.

Para una mejor comprensión del desarrollo y la progresión tumoral *in vivo*, las estrategias basadas en modelos murinos son las que más información han proporcionado. Modelos basados en ratones modificados genéticamente (GEM), y los modelos tumorales de trasplante (GRAFT), ofrecen enfoques complementarios al

estudio de la progresión tumoral. En el primero, la introducción de mutaciones oncogénicas en un tejido específico permite de manera fiel indagar en aspectos importantes de la iniciación del tumor, la progresión local, y la respuesta a tratamientos (Frese and Tuveson 2007; Jonkers and Berns 2002). En estos modelos, el cáncer se desarrolla con penetrancia alta de una forma gradual, lo que permite el estudio de la iniciación del tumor y los primeros pasos de la diseminación metastásica (Fig. 14). Las células cancerosas en un tumor primario ya han adquirido una serie de funciones que serán muy importantes en el resto de su progresión metastásica. Estas funciones generalmente incluyen la motilidad, invasión, la resistencia a la hipoxia y las especies reactivas de oxígeno, supervivencia, y la evasión de la vigilancia inmune. La adquisición de estas propiedades en las células tumorales se cree que ocurren en el contexto del tumor primario, y modelos de tumores en ratones genéticamente modificados ofrecen un gran alcance para delimitar la adquisición de estas funciones (Fig. 14).

Sin embargo, la diseminación metastásica en los modelos modificados genéticamente se restringe a los pulmones y/o ganglios linfáticos, o no aparece. En los modelos de trasplante (GRAFT), en cepas singénicas o el xenoinjerto, las células tumorales de ratón o humanas se trasplantan en huéspedes inmunocompetentes o inmunocomprometidos, respectivamente. Los trasplantes singénicos permiten incorporar el estudio la interfaz completa del microambiente pero con la limitación que supone estudiar el cáncer solo en huéspedes murinos. A la inversa, a pesar de no existir un sistema inmune singénico, los xenoinjerto proporcionan una alternativa para el estudio de células tumorales humanas *in vivo*. A su vez, podemos distinguir en ambos modelos si el trasplante es ortotópico (en su lugar de origen) o ectópico (subcutánea). Son los llamados ensayos de metástasis experimentales o espontáneas, respectivamente (Fig. 15). Si el trasplante es ortotópico, se realiza en su lugar de

origen, se selecciona una línea tumoral humana o murina de la misma histología. Los xenoinjerto proporcionan un eficaz sistema para investigar la colonización de un órgano diana concreto por células tumorales humanas, y sigue siendo el modelo de elección para estudios pre-clínicos de células derivadas de tumores humanos (Francia et al. 2011). Así, con la inyección de la línea tumoral en una localización concreta de la circulación arterial podemos estudiar la colonización -ensayos de metástasis experimentales- (Fig. 15). Algunas posibilidades son: la inyección en la vena de la cola que obliga a las células tumorales a alojarse en los capilares pulmonares, lo que permite hacer una evaluación de la extravasación y colonización de las células cancerosas en el pulmón (Hart and Fidler 1980); o en la arteria carótida, que del mismo modo, dirige las células al cerebro. Solo la inyección intracardiaca de células cancerosas permite una distribución sistémica de estas células a todos los órganos, para el análisis global del proceso de diseminación, incluyendo extravasación específica en diferentes órganos, la supervivencia en el parénquima recién invadido, la reiniciación de un nuevo tumor y la colonización (Yin et al. 1999). El trasplante ectópico -ensayos de metástasis espontáneas- (Fig.15), tiene la ventaja de poder eliminar el tumor primario, consiguiendo así una supervivencia prolongada del huésped lo que permite una diseminación lenta que recrea los múltiples pasos de la cascada metastásica de forma similar a lo que sucede en humanos (Bos et al. 2009; Nguyen et al. 2009). La progresión metastásica puede ser incluso monitorizado si las células se marcan con marcadores fluorescente como la luciferasa (Gao et al. 2008; McAllister et al. 2008). Tanto los modelos de trasplante ortotópico y ectópico son métodos de elección para estudiar experimentalmente la diseminación metastásica y la colonización de órganos (Fig. 14). Como inconveniente: las líneas celulares implantadas pueden crecer muy rápidamente y no mimetizan el desarrollo lento de los tumores humanos, además la implantación de una línea celular fuera de su lugar de origen (tejido u órgano de diferente histología), puede no responder a terapia de la

misma forma que si la implantación es en su tejido u órgano de origen (misma histología).

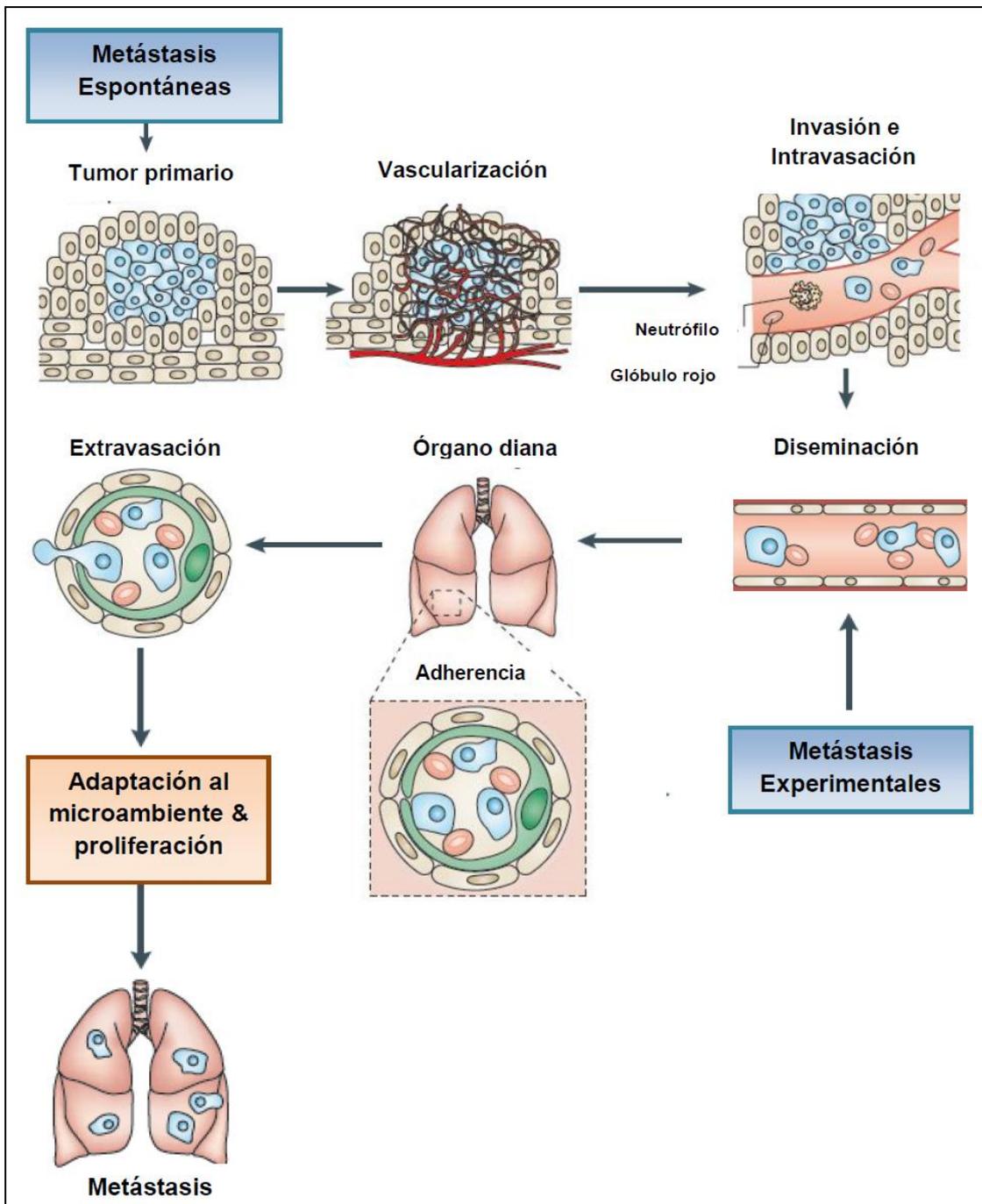


Figura 15. Cascada metastásica. Inicialmente el tumor crece, invade el tejido local y a través de la circulación las células tumorales colonizan nuevos tejidos y/o órganos. Los ensayos de metástasis espontáneas implican el crecimiento del tumor primario y diseminación, mientras los ensayos de metástasis experimentales suponen un bypass al crecimiento y la invasión, como resultado de la inyección directa de las células tumorales en la circulación. *Adaptación de Nat Rev Cancer. 2011Feb; 11(2):135-41.*

Aunque la ingeniería genética ofrece modelos murinos muy útiles para la evaluación preclínica de agentes terapéuticos (De Palma et al. 2008; Paez-Ribes et al. 2009), la respuesta de las células cancerosas humanas a terapia *in vivo* requiere el uso de modelos de xenoinjerto. De particular relevancia es el xenoinjerto de líneas celulares metastásicas, seguido de la resección del tumor primario y la iniciación de la terapia. Esta configuración se aproxima a la situación observada en pacientes con enfermedad avanzada (Ebos et al. 2009). Sin embargo, muchas preguntas clínicamente relevantes siguen sin respuesta, debido en parte a una falta de modelos animales. El problema de la latencia metastásica y el papel del sistema inmunológico en la progresión metastásica son alguna de las preguntas que necesitan respuesta. Clínicamente, las metástasis pueden tardar décadas en progresar (Nguyen et al. 2009) y existe una escasez de modelos murinos para estudiar estos procesos.

En resumen, los principales modelos *in vivo* empleados en el estudio de la progresión metastásica están sujetos a ventajas y desventajas, pero el uso combinado de estos, complementados con sistemas *in vitro*, está dando una comprensión cada vez más sólida de los múltiples pasos de la diseminación del cáncer.

4.2.- Modelo tumoral murino GR9

Dentro de los modelos experimentales de tumores, los de extirpe epitelial como el modelo GR9 son una herramienta imprescindible para el estudio del cáncer, y en concreto de la progresión tumoral, al permitir el estudio de las capacidades tumorigénicas y metastásicas de células tumorales *in vivo*. El sistema tumoral murino GR9 se comenzó a desarrollar a principios de los años 80 por nuestro grupo en el H.U. Virgen de las Nieves y está compuesto por líneas celulares derivadas de un fibrosarcoma murino inducido por metilcolantreno, clones de este tumor primario y metástasis derivadas de algunos de estos clones en ratones inmunocompetentes e

inmunodeficientes. Se obtuvieron tumores sólidos inyectando a nivel subcutáneo 0.2 mg de 3-metilcolantreno en ratones BALB/c inmunocompetentes (Garrido et al. 1986). Dos o tres meses después los tumores fueron extirpados y adaptados a cultivo tisular sin ningún pase *in vivo* para evitar el proceso de inmunoselección o cualquier cambio en su composición original. En el momento en que se detectó la presencia del tumor primario podrían existir varias poblaciones celulares que formaban parte de él. Aunque mantienen un origen genómico común, estas poblaciones podrían diferir en muchos aspectos fenotípicos e incluso genotípicos como consecuencia de la inestabilidad genética intrínseca de las células tumorales y la presión selectiva del ambiente en el que se encuentran en el seno del propio tumor, además de la ejercida por el huésped. La línea celular procedente del tumor primario original, GR9, se denominó parental y mantiene esta heterogeneidad de poblaciones mencionada. A partir de la línea parental GR9, se obtuvieron por el método de dilución límite hasta 43 clones diferentes, de todos ellos se adaptaron a cultivo los clones: A7, B3, B7, B9, B11, C5, C11, D6, D8, G2 y G10 (Garrido et al. 1986). Estos clones obtenidos del tumor GR9 mostraron una gran variabilidad en la expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I clásicas al ser analizados. Se encontramos clones como GR9-G2, D8 y A7, que muestra una expresión alta en superficie de moléculas H-2 de clase I (K^d , D^d , L^d), GR9-B7 y G10, con una expresión intermedia; GR9-C5 con baja expresión de las moléculas H-2 K^d y D^d y ausencia de H-2 L^d ; mientras en el extremo, están los clones GR9-B11, con una expresión muy débil únicamente de molécula H-2 K^d y GR9-B9 que no muestra expresión en superficie de ninguna de las tres molécula H-2 de clase I (Fig. 15) (Garrido et al. 1986). Las líneas celulares establecidas de estos clones, pueden implantarse en animales de experimentación, desarrollándose un tumor primario cuyas características como el periodo de latencia, el ritmo de crecimiento local, rasgos histológicos y capacidad metastásica son reproducibles en animales sanos de la misma especie, sexo y edad. Resumiendo, que el sistema

tumoral GR9, fibrosarcoma inducido químicamente con metilcolantreno, es un tumor heterogéneo constituido por diversos clones que varían de manera gradual en la expresión de las moléculas de clase I en superficie, desde una expresión nula hasta una expresión positiva.

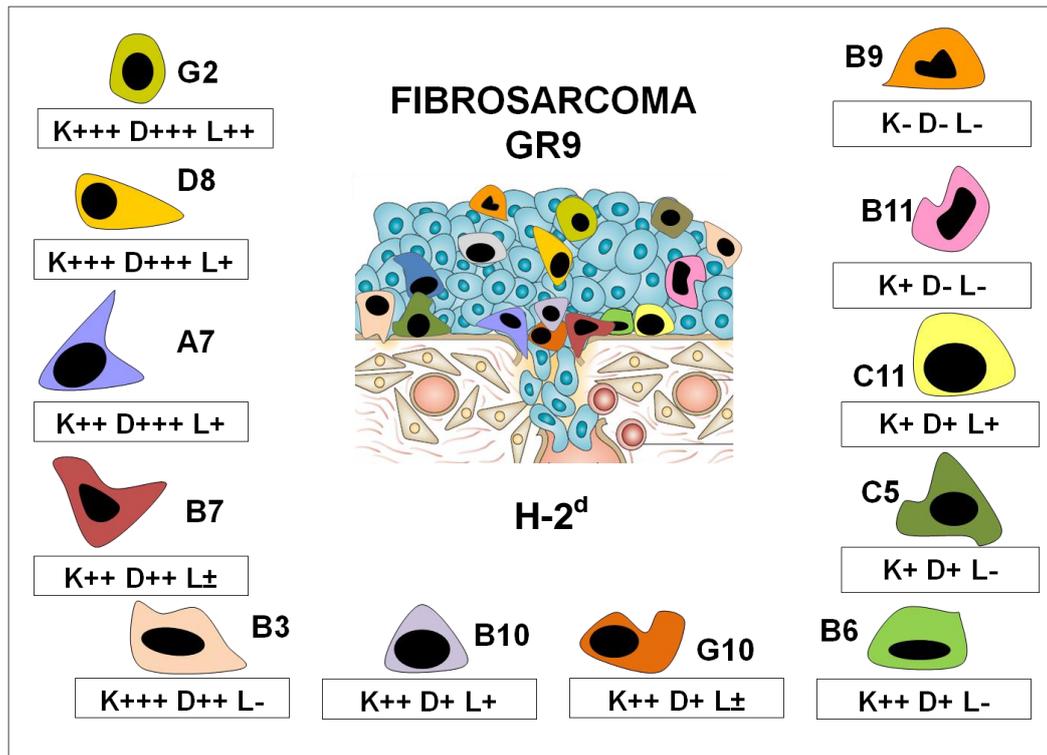


Figura 16. Clones establecidos a partir de la línea tumoral GR9. Los diferentes clones se clasifican en función de su expresión superficial de moléculas H-2 de clase I (K^d, D^d y L^d).

4.2.1.- Estudios centrados en el clon GR9-B9

En los últimos años, han sido varios los estudios centrados en el clon GR9-B9 debido a las características que presenta: H-2 de clase I negativa, sin expresión en superficie de las moléculas K^d, D^d y L^d y recuperación de la expresión de estas moléculas tras el tratamiento con IFN- γ (Fig.17a) (García-Lora et al. 2001). Además, este clon es muy tumorigénico a nivel local, y posee un bajo poder metastásico en

ratones inmunocompetentes. Esta última característica nos ha permitido, estudiar de manera más detallada la implicación del sistema inmune en el proceso metastásico. Se realizaron ensayos de metástasis espontáneas en ratones BALB/c inmunocompetentes, inyectando a nivel subcutáneo en la pata 5×10^5 células del clon GR9-B9 previamente re-clonado, para estar seguros de que las células inyectadas pertenecían al mismo clon (García-Lora et al. 2001). Cuando el tumor alcanzó 8 mm fue extirpado y los ratones fueron sacrificados en el día 50. Las metástasis pulmonares que eran visibles macroscópicamente se adaptaron a cultivo celular, obteniéndose únicamente una metástasis por ratón.

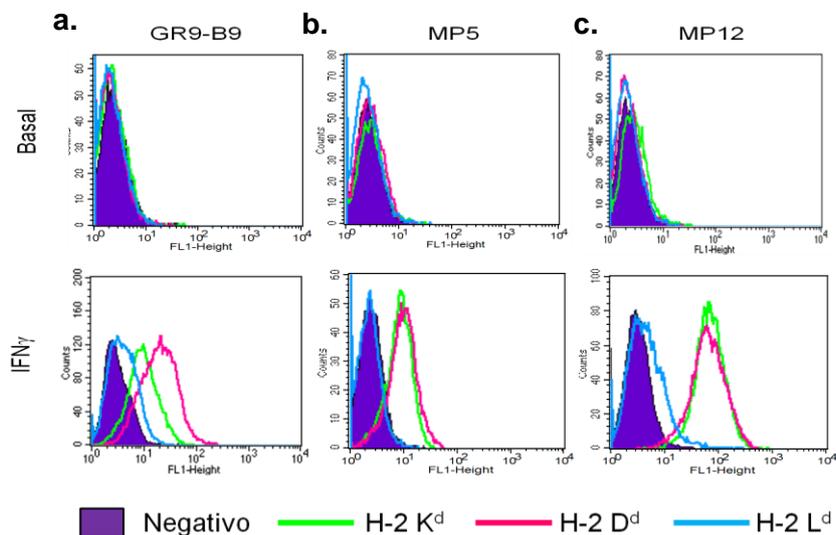
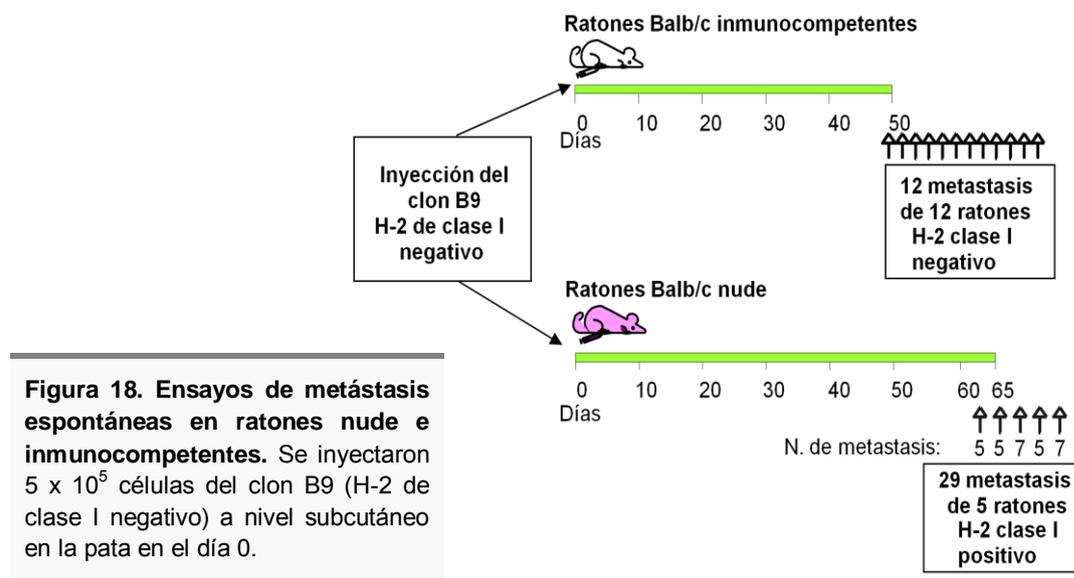


Figura 17. Expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I (K^d, D^d y L^d) en el clon GR9-B9 y en las metástasis generadas en ratones inmunocompetentes (MP12 y MP5). a. GR9-B9 presenta expresión H-2 clase I negativa en basal y se inducen las tres moléculas tras tratamiento con IFN- γ . **b.** MP5 tiene una expresión similar al clon original en condiciones basales pero no se induce la moléculas H-2 L^d con IFN- γ **c.** MP12 presenta expresión similar al clon original del que procede.

Cuando las distintas metástasis obtenidas fueron tipadas por citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales específicos presentaron la misma expresión que el clon GR9-B9 original en condiciones basales: H-2 de clase I K^d, D^d y L^d negativas (Fig.17a). Posteriormente, las diferentes metástasis fueron tratadas con IFN- γ y se observaron dos fenotipos distintos: el 17% de las metástasis presentaban el mismo

fenotipo que el clon GR9-B9, es decir, recuperaban la expresión de las tres moléculas de clase I (K^d , D^d y L^d) (Fig. 17c). Sin embargo, el 83% de las metástasis recuperaba las moléculas K^d y D^d , pero no recuperaba la expresión de la molécula L^d (Fig. 17b). Además, este es un fenómeno repetitivo ya que los resultados son reproducibles en experimentos con otros grupos de ratones y al utilizar otros clones del clon GR9-B9, incluso cuando son tratadas con otros inductores (García-Lora et al. 2001).

Al estudiar y comparar el comportamiento *in vivo* de GR9-B9 en huéspedes inmunocompetentes e inmunodeprimidos, los estudios encontraron diferencias en el número de metástasis (Fig.18). En ratones BALB/c inmunocompetentes se generaron metástasis pulmonares a los 50 días post-inyección, encontrando una sola metástasis/ratón nombradas MP1,...MP12. Las metástasis pulmonares en los ratones nude aparecieron alrededor del día 65 post-inyección, generándose de 5 a 7 metástasis/ratón, en total 29 metástasis de 5 ratones que fueron adaptadas a cultivo celular y nombradas MN1.1....MN1.5, MN2.1...MN2.5,....., MN5.1...MN5.7.



Al analizar la expresión en superficie de moléculas H-2 de clase I de las metástasis generadas en ratones inmunocompetentes y nude a partir del mismo tumor primario

GR9-B9, encontramos diferencias en la expresión. Como hemos avanzado anteriormente, en ratones inmunocompetentes las metástasis mantenían el mismo fenotipo H-2 clase I negativo que el tumor primario (Fig. 17); en cambio, en animales inmunodeficientes, ratones nude, el fenotipo H-2 clase I era diferente, presentando expresión de las tres moléculas H-2 K^d, D^d y L^d en condiciones basales (Fig. 19) (García-Lora et al. 2001). En otras palabras, en presencia de células T fueron inmunoseleccionadas las células tumorales que no expresan moléculas H-2 de clase I dando lugar a las metástasis pulmonares; cuando las células T están ausentes las metástasis que aparecen presentan expresión de moléculas H-2 de clase I, indicando que no ha habido inmunoselección por parte de las células T, y que en cambio ha podido existir una inmunoselección por las células NK. Para poder explicar el origen de estas células H-2 de clase I positivas, que no están presentes en el clon original GR9-B9 del que derivan, debemos de tener en cuenta que el clon original GR9-B9 presenta una alteración MHC-I reversible recuperando la expresión de las moléculas H-2 de clase I después del tratamiento con IFN- γ .

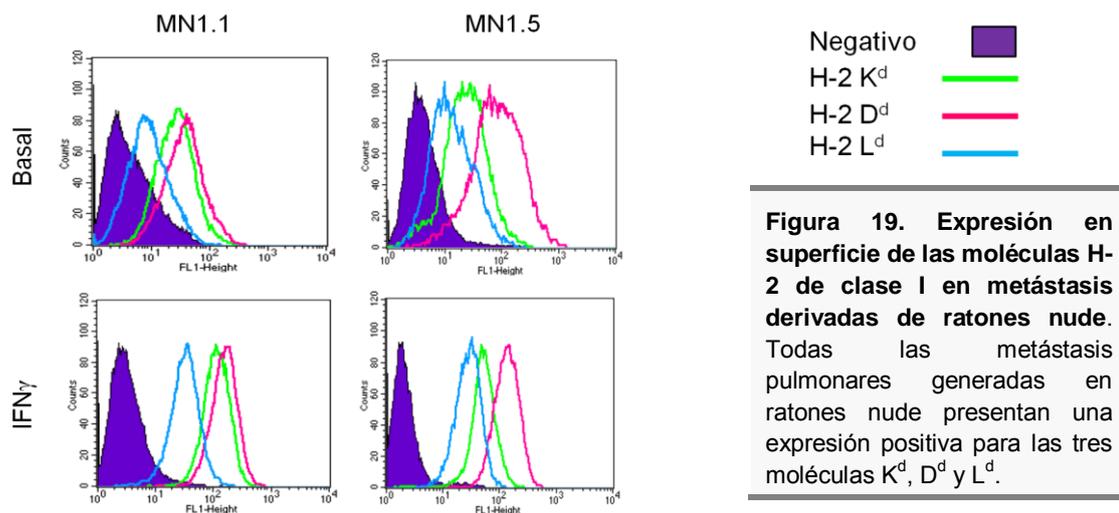


Figura 19. Expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I en metástasis derivadas de ratones nude. Todas las metástasis pulmonares generadas en ratones nude presentan una expresión positiva para las tres moléculas K^d, D^d y L^d.

Se llevaron a cabo ensayos de crecimiento local e inmunogenicidad en ratones BALB/c inmunocompetentes, inyectando a nivel subcutáneo las líneas metastásicas MP5 y MP12 derivadas de ratones inmunocompetentes y líneas derivadas de ratones

nude, MN1.1 y MN1.5 (García-Lora et al. 2003b). Como observamos en la figura 18, las metástasis H-2 clase I negativas generadas en ratones inmunocompetentes son muy poco inmunógenas, alcanzando un alto poder tumorigénico en ratones inmunocompetentes. Por el contrario, las metástasis generadas en ratones nude, H-2 clase I positivas, muestran una alta inmunogenicidad en ratones inmunocompetentes, siendo rechazados (Fig.20).

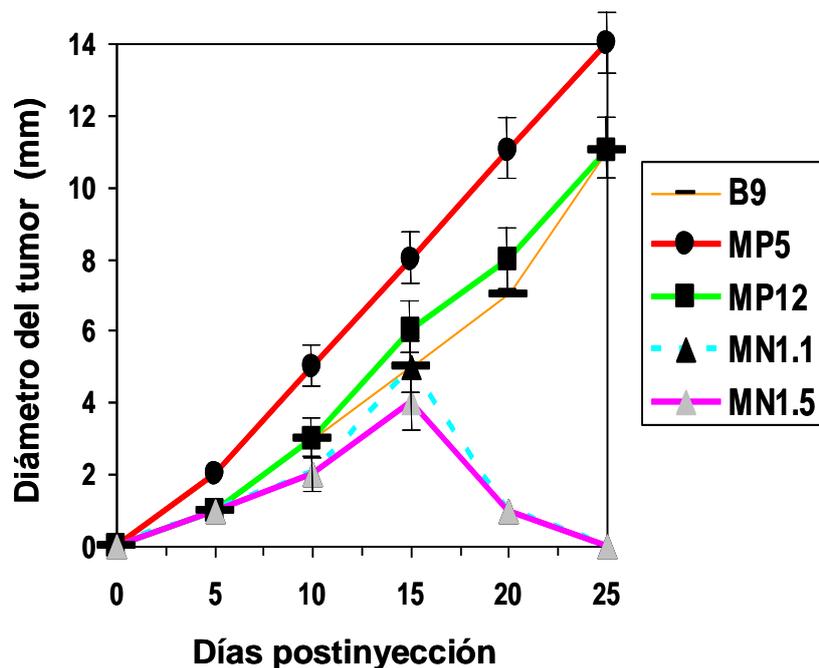


Figura 20. Crecimiento local e inmunogenicidad en ratones inmunocompetentes. Se inyectaron de 0.5×10^6 a 1.5×10^6 células de diferentes líneas metastásicas a nivel subcutáneo en la pata de ratones inmunocompetentes. Se observó el crecimiento tumoral y se midió el diámetro de los tumores. Los tumores originados por las líneas MN1.1 y MN1.5, obtenidas de ratones nude, crecieron más despacio y fueron finalmente rechazados. La figura muestra la media del diámetro del tumor \pm SD de los diferentes grupos de ratones

Estos resultados muestran que las variantes metastásicas MN1.1 y MN1.5 derivadas de ratones nude presentan una mayor inmunogenicidad que las variantes metastásicas MP5 y MP12, derivadas de ratones inmunocompetentes. La línea metastásica MP12 presenta un fenotipo H-2 de clase I negativo en condiciones basales, y tras tratamiento con IFN- γ recupera la expresión en superficie de las tres

moléculas K^d, D^d y L^d, tal y como ocurre con el clon B9. El crecimiento local e inmunogenicidad es idéntico en ambas líneas (Fig. 20). La metástasis MP5 presenta un fenotipo H-2 de clase I negativo en condiciones basales, similar al clon GR9-B9, pero sin embargo no recupera la expresión de la molécula L^d tras ser tratada con IFN- γ . Como podemos observar, su crecimiento local es más rápido que el clon GR9-B9 y la metástasis MP12 (Fig. 20). Por el contrario, las metástasis MN1.1 y MN1.5 son H-2 de clase I positivas para las tres moléculas K^d, D^d y L^d y su crecimiento local es más lento que el del clon GR9-B9 y las metástasis MP5 y MP12 (Fig. 20). Estos resultados muestran una correlación directa entre la expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I e inmunogenicidad y una correlación inversa entre estos con el crecimiento local del tumor.

Ahora bien, si realizamos los ensayos de crecimiento local en ratones nude, las líneas MN1.1 y MN1.5 pierden su alta inmunogenicidad, adquiriendo poder tumorigénico local (Fig. 21). En ratones nude observamos un mayor crecimiento local de todas las líneas metastásicas inyectadas, tanto las líneas H-2 clase I negativas (MP5 y MP12), como las positivas (MN1.1 y MN1.5). Así, las líneas celulares derivadas de las metástasis MP5 y MP12 crecieron hasta 20 mm y 18 mm respectivamente en 25 días (Fig. 21); mientras que las líneas celulares derivadas de las metástasis MN1.1 y MN1.5 crecieron de forma más lenta que las anteriores, alcanzando 10mm y 8mm respectivamente. A diferencia de lo que ocurría en ratones inmunocompetentes, estas últimas no regresaban y por tanto no eran finalmente rechazadas en ratones nude (Fig. 21). Estos resultados muestran un papel destacado de los linfocitos T en la inmunovigilancia tumoral: por un lado las metástasis generadas en ratones nude son más inmunógenas, por otro en ratones nude esta inmunogenicidad es perdida, y además el poder tumorigénico y el crecimiento local de los tumores es mayor en ratones nude que en ratones inmunocompetentes.

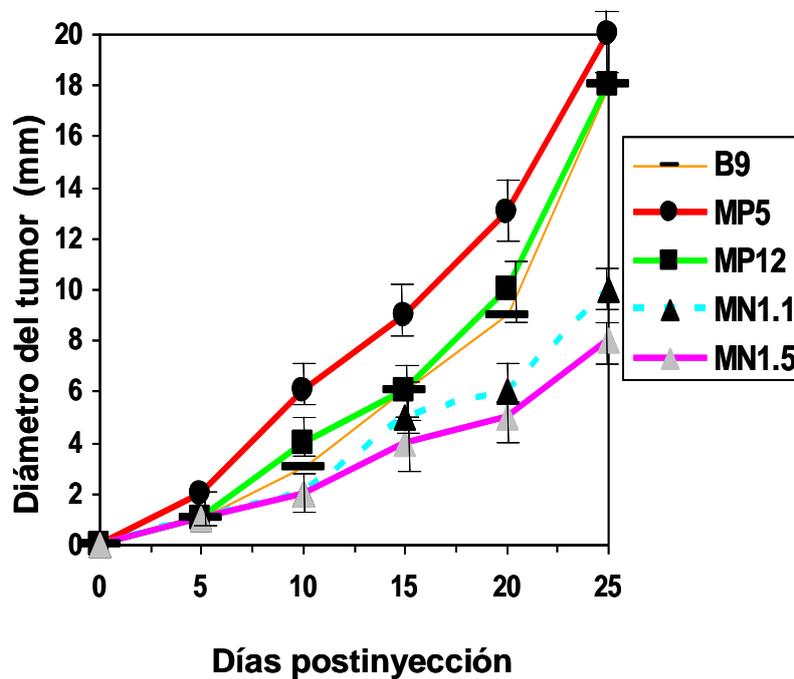


Figura 21. Crecimiento e inmunogenicidad en ratones nude. Se inyectaron de 0.5×10^6 a 1.5×10^6 células de diferentes líneas metastásicas a nivel subcutáneo en la pata de ratones nude. Se observó el crecimiento tumoral y se midió el diámetro de los tumores. Todas las líneas metastásicas crecieron más rápidamente en ratones nude que en ratones inmunocompetentes. Los tumores originados por las líneas derivadas de ratones nude MN1.1 y MN1.5 crecieron de forma más lenta que el resto, pero no son finalmente rechazadas

Nuestro grupo determinó mediante RT-PCR semicuantitativa que, en el sistema tumoral GR9-B9, la pérdida de expresión de moléculas H-2 de clase I es debida a la baja regulación transcripcional coordinada de varios componentes de la maquinaria de procesamiento antigénica: TAPs, LMPs, tapasina y calnexina (García-Lora et al. 2003b). Otros componentes como calreticulina, ERP-59, ER-60 PA-28- α y PA-28- β mantuvieron su expresión. Todos los componentes del APM recuperaron su expresión después del tratamiento con IFN- γ , lo que conllevó la expresión en superficie de moléculas de clase I (García-Lora et al. 2003b).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Son múltiples los mecanismos responsables de la alteración de la expresión de las moléculas MHC-I y entre ellos, se incluyen como uno de los más importantes la pérdida transcripcional coordinada de algunos de los componentes de la APM y/o cadenas pesadas, que provoca la pérdida completa de expresión en superficie de las moléculas MHC-I. El mecanismo molecular implicado en esta alteración ha sido ampliamente estudiado en tumores tanto humanos como murinos de diferentes histologías, sin embargo, aun no se ha conseguido conocer claramente cuál es el mecanismo responsable.

Para trabajar en esa línea de investigación, nuestro grupo había caracterizado ampliamente el sistema tumoral murino GR9-B9, descrito en la introducción. Este sistema recordemos que está compuesto por la línea tumoral murina GR9-B9, H-2 clase I negativa, y metástasis espontáneas generadas en ratones inmunocompetentes e inmunodeficientes (nude). Las metástasis espontáneas generadas en ratones inmunocompetentes mantienen el mismo fenotipo MHC-I negativo que el clon GR9-B9 original. Por el contrario, las metástasis espontáneas que se desarrollaron en ratones inmunodeficientes presentan expresión en superficie positiva para las tres moléculas MHC-I (H-2 K^d, D^d y L^d). Tras realizar estudios de PCR semicuantitativa, se demostró que la pérdida de expresión coordinada de componentes del APM era la responsable del fenotipo MHC-I negativo. Este era un modelo tumoral muy adecuado para poder determinar qué genes podían estar implicados en esta alteración, ya que ambas líneas metastásicas, las MHC-I positivas y las negativas, provenían desde el mismo clon tumoral, y por tanto la diferencia en expresión génica no debería ser muy elevada. Nuestros resultados y los publicados por otros autores apoyaban que esta regulación coordinada debe de ocurrir en trans, ya que una misma alteración en cis en tantos genes, que además están hasta en diferentes cromosomas, parecía muy improbable. Partiendo de esta hipótesis inicial, se compararon las expresiones génicas de las

metástasis MHC-I positivas y negativas, originadas desde el mismo clon tumoral y con expresión o no de los componentes del APM, mediante la realización de bibliotecas de sustracción de cDNA. Se pretendía encontrar entre los genes diferencialmente expresados entre estas líneas al gen o genes candidatos a ser los reguladores transcripcionales de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico de péptidos.

Nos planteamos así como **primer objetivo** de este trabajo, intentar elucidar que gen o genes de los diferencialmente expresados en la librería de sustracción podrían estar implicado en la pérdida de expresión coordinada de los componentes del APM y de la expresión en superficie de las moléculas MHC-I, en el modelo tumoral murino GR9-B9.

Los tumores pueden estar compuestos de una población muy diversa de células tumorales que exhiben una amplia gama de fenotipos genéticamente heterogéneos. No podemos subestimar esta heterogeneidad intratumoral, ya que puede ser responsable de la resistencia a tratamientos y recaídas. Esta heterogeneidad del tumor puede conducir a diferentes grados de plasticidad en la reactivación de los programas de migración e invasión que aumentan la oncogenicidad intrínseca de la célula tumoral.

Como **segundo objetivo** de este trabajo de investigación nos planteamos estudiar detalladamente como la heterogeneidad intratumoral en la expresión de moléculas del MHC-I del tumor murino GR9, podría determinar su comportamiento oncogénico local y su capacidad metastásica *in vivo*. Analizando también el fenotipo MHC encontrado en las metástasis generadas desde cada clon y comparándolo con el del clon original.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- LÍNEAS CELULARES

GR9 es un fibrosarcoma murino inducido químicamente con metilcolantreno en ratones BALB/c, a partir del tumor primario se estableció la línea celular GR9. GR9-A7, B7, C5, B11 y B9 son clones obtenidos por dilución límite a partir de la línea celular GR9 (Garrido et al. 1986). MP5 y MP12 son líneas metastásicas establecidas a cultivo en ensayos de metástasis espontáneas en ratones inmunocompetentes realizados con el clon GR9-B9 (Pérez et al. 1990). MN4.5 es una línea celular metastásica establecida a cultivo tras la realización de ensayos de metástasis espontáneas en ratones nu/nu con el clon GR9-B9 (García-Lora et al. 2001). Además, se utilizaron líneas celulares cedidas por la Dra. Gloria Aseguinolaza (CIMA, Pamplona):

- CT26 línea murina de carcinoma de colón
- 4T1 línea tumoral murina de mama

Todas las líneas celulares se mantuvieron en medio de cultivo Dulbecco o RPMI (Sigma-Aldrich, Madrid, España), complementado con un 10% de suero fetal bovino (Life Technologies, Milán, Italia), 2 mM de glutamina (Sigma-Aldrich) y antibióticos. En algunos experimentos, las líneas celulares fueron tratadas con 100U/ml IFN- γ (Sigma-Aldrich) o con medio de cultivo a una concentración 250 nM de Trichostatin A (TSA, Sigma-Aldrich) durante 48h.

2.- CONGELACIÓN DE LAS CÉLULAS

Para conservar las líneas celulares durante un largo periodo, se congelan las células en nitrógeno líquido. El proceso consiste en centrifugar las células a 200xg en frascos universales durante 5 minutos y resuspenderlas en suero fetal bovino inactivado (Life Technologies, Milán, Italia) + 10% de DMSO (Sigma-Aldrich). Se distribuyen en criotubos y se introducen rápidamente en el congelador de -80°C, pasándose a las 24h a nitrógeno líquido. Para descongelarlas se introducen en un baño a 37°C y

posteriormente se lavan dos veces con PBS estéril, para eliminar los restos de DMSO. Por último, son resuspendidas en medio de cultivo y son depositadas en falcons de cultivos.

3.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En todos los ensayos se emplearon ratones singénicos BALB/c nu/nu o inmunocompetentes de ocho a nueve semanas de edad y sexo masculino, de un peso aproximado de 20gr, procedente de los Laboratorios Charles River, Barcelona, España o del animalario de Hospital Universitario Virgen de las Nieves. El cuidado de los animales se llevó a cabo cumpliendo con la Directiva 86/609/CEE de la Comunidad Europea y la legislación española (Real Decreto 1201/2005) para el uso de animales de laboratorio. Todos los procedimientos experimentales con animales se realizaron de acuerdo a los protocolos aprobados por el HU Virgen de las Nieves y siguiendo las directrices de la Comisión Nacional para la experimentación con animales.

4.- ENSAYOS CELULARES IN VIVO

4.1.- Ensayos de capacidad oncogénica local

Para los estudios de crecimiento y capacidad oncogénica local de las líneas tumorales, se determinó la dosis mínima de células capaz de inducir el crecimiento del tumor. Se seleccionaron grupos de diez ratones BALB/c, a los que se le inyectó en la pata a nivel subcutáneo la dosis seleccionada (6.25×10^5 células/ratón). Los ratones se monitorizaron tres veces por semana, midiendo el diámetro mayor del tumor y cuando alcanzaron el tamaño de 10 mm los animales fueron anestesiados [0,04 ml de diazepam (Valium, Roche-Madrid, España) y 0,1 ml de ketamina (Ketolar, Pfizer-España)] y los tumores extirpados con instrumental estéril. Los tumores se disgregaron para posteriormente establecerlos a cultivo celular *in vitro*.

4.2.- Ensayos de metástasis espontáneas

Se realizaron inyectando diferentes dosis (5×10^6 , 2.5×10^6 , 1.25×10^6 y 6.25×10^5 células/ratón) de las líneas tumorales (GR9-A7, B7, C5 y B11) a nivel subcutáneo en la pata de ratones singénicos BALB/c inmunocompetentes. Los grupos fueron de diez ratones como mínimo. Cuando el tumor local de la pata alcanzó 10 mm fue extirpado con instrumental estéril, y se esperó a que produjese metástasis pulmonares, según el procedimiento descrito por (Pérez et al. 1990). Al final del ensayo los animales fueron anestesiados [0,04 ml de diazepam (Valium, Roche-Madrid, España) y 0,1 ml de ketamina (Ketolar, Pfizer-España)] y sacrificados por dislocación cervical. Las metástasis visibles macroscópicamente fueron extirpadas y disgregadas para su adaptación a cultivo *in vitro*. Los pulmones se fijaron en solución de Bouin (Sigma-Aldrich) para el conteo de las micrometástasis pulmonares. Este ensayo también se realizó en ratones nude con la línea celular GR9-B11 a dos dosis diferentes, 1.25×10^6 y 6.25×10^6 células/ratón, siguiendo el procedimiento descrito.

4.3.- Ensayos de metástasis experimentales

Una suspensión de 2.5×10^5 células tumorales (GR9-A7 o GR9-B11) en 0,2 ml de PBS se inyectó directamente en la vena de la cola de ratones singénicos BALB/c. El día 30 después de la inyección los animales se anestesiaron y sacrificaron por dislocación cervical como se describió en los ensayos de metástasis espontáneas. Se les realizó necropsia completa y todas las metástasis pulmonares macroscópicas se establecieron a cultivo celular *in vitro*. Los pulmones se fijaron en solución de Bouin (Sigma-Aldrich) para el conteo de las micrometástasis pulmonares.

4.4.- Protocolo de inmunodepleción en ensayos de metástasis espontáneas con el clon GR9-B11

1.25×10^6 células del clon GR9-B11 se inyectaron a nivel subcutáneo en la pata de siete grupos de diez ratones BALB/c. Alrededor del día 20-22 los tumores alcanzaron los 10 mm y fueron extirpados (Fig. 22). El día 151 un grupo de ratones fue sacrificado (grupo control 1) y cinco de los seis grupos restantes fueron sometidos a partir del día 152 a dos inyecciones i.p. (intraperitoneal) semanales de inmunoglobulina control (Igs control) o anticuerpos monoclonales (AcMo) para deplecionarlos de diferentes subpoblaciones de células inmunes. El tratamiento se prolongó durante 90 días (Fig. 22). Los grupos y las dosis administradas se distribuyen como se enumera a continuación:

- i) **Igs control:** 125 μ g inmunoglobulina control (IgG policlonal de rata, Sigma-Aldrich)
- ii) **Depleción de linfocitos T:** 125 μ g anti-CD4 (YTS 191) + 125 μ g anti-CD8 (YTS 169)
- iii) **Depleción de linfocitos T CD4+:** 125 μ g anti-CD4 (YTS 191)
- iv) **Depleción de linfocitos T CD8+:** 125 μ g anti-CD8 (YTS 169)
- v) **Depleción de células NK:** 100 μ g anti-asialo GM1 (Wako Chemicals USA Inc., Virginia), una dosis por semana).
- vi) **Grupo control 2** (sin tratar)

El día 242 los animales fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical. A todos los animales se les realizó la necropsia completa. La reducción significativa en

el número de linfocitos circulantes T CD8+, T CD4+ y NK a lo largo de todo el periodo experimental se confirmó mediante citometría de flujo, el efecto fue mínimo sobre otros conjuntos de células inmunes.

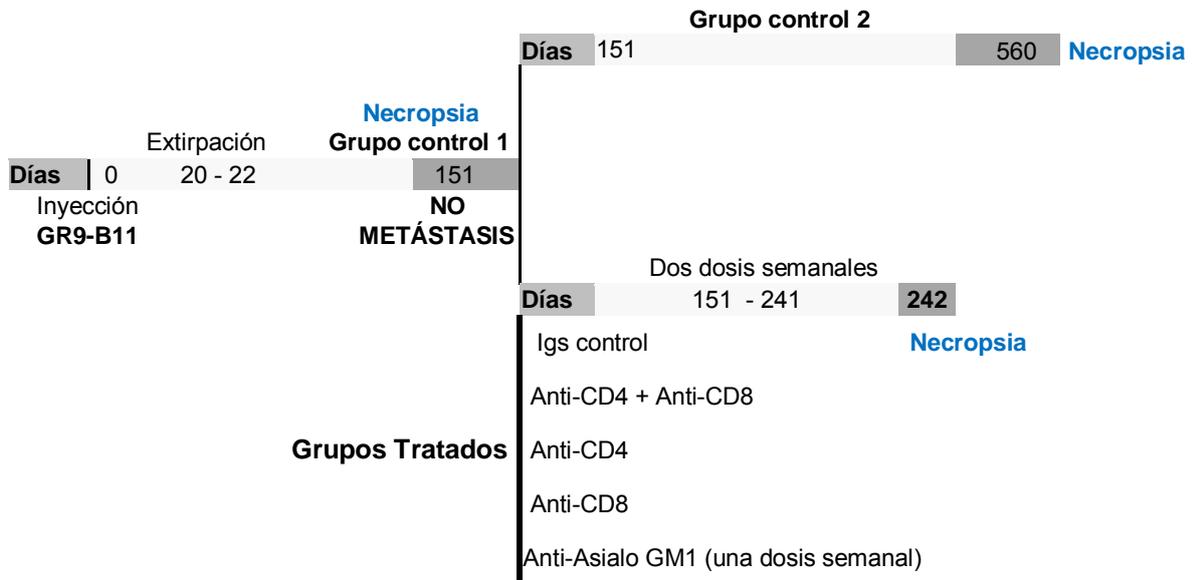


Figura 22. Protocolo de inmunodepleción en ensayos de metástasis espontáneas. Setenta ratones fueron inyectados con la línea GR9-B11, entre los días 20-22 los tumores locales fueron extirpados. El día 151 se sacrificó el primer grupo de diez ratones, a partir del día 152 se administraron los tratamientos en grupos de diez ratones cada uno. Todos los grupos se sacrificaron el día 242 excepto el grupo control 2 que se sacrificó al final del ensayo en el día 560.

4.5.- Protocolo de inmunodepleción en ensayos de metástasis experimentales con el clon GR9-B11

Se emplearon tres grupos de diez ratones BALB/c inmunocompetentes cada uno.

Distribuidos como se especifica a continuación:

- i) Grupo control
- ii) Grupo Ig control
- iii) Grupo anti-CD4 + anti-CD8 (depleción de linfocitos T)

En los días -3 y -1 (antes de la inyección de las células tumorales) los ratones del grupo anti-CD4 + anti-CD8 fueron sometidos a inyecciones i.p. de AcMo (125 µg de anti-CD4 + 125 µg de anti-CD8) para deplecionarlos de células T (Fig. 23). El grupo Ig control también fue sometido a inyecciones i.p pero de inmunoglobulinas control (125 µg IgG policlonal de rata, Sigma-Aldrich) (Fig. 23). Los ratones del grupo control no fueron sometidos a ningún tratamiento previo o posterior a la inyección de las células tumorales. El día 0 a los tres grupos de ratones se les inyectó una suspensión de 2.5×10^5 células en 0.2 ml de PBS (Sigma-Aldrich) directamente en la vena de la cola. Los tratamientos con Igs control o AcMo se mantuvieron a lo largo de cuatro semanas, suministrándolos en las fechas que recoge la línea temporal. El día 30 los ratones fueron sacrificados y todas las metástasis visibles macroscópicamente fueron establecidas a cultivo celular. La reducción significativa del número circulante de linfocitos T CD4+ y T CD8+ se confirmó por citometría de flujo, el tratamiento con AcMo no modificó significativamente otras poblaciones de células inmunes.

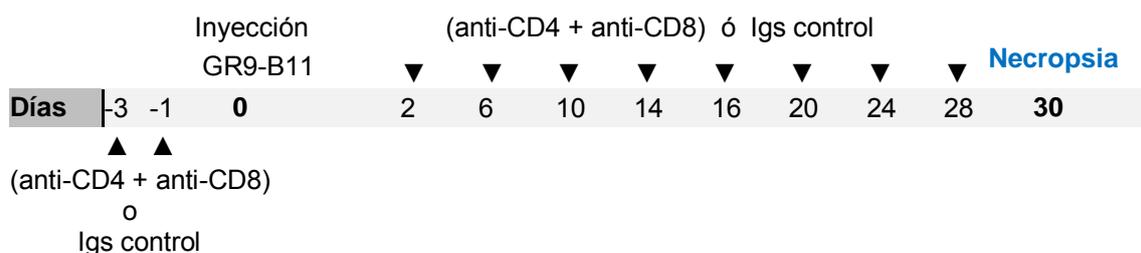


Figura 23. Protocolo de inmunodepleción en ensayos de metástasis experimentales. Dos grupos de diez ratones se sometieron a tratamiento con Igs control o anti-CD4 + anti-CD8 los días que se especifican en la línea temporal. El día 0 se inyectaron las células tumorales GR9-B11 en la vena de la cola.

5.- ENSAYOS CELULARES IN VITRO

5.1.- Ensayos de migración e invasión

Los ensayos de migración se realizaron utilizando cámaras Boyden modificadas, con filtros de policarbonato con un tamaño de poro de 8 micras (Becton-Dickinson). Para los ensayos de invasión se utilizaron cámaras con filtros recubiertos con una capa de colágeno tipo I (Bio-coat Matrigel, Becton Dickinson). Una suspensión de 2.5×10^4 células en medio de cultivo sin suero se colocó en la cámara superior y se les permitió migrar o invadir hasta la cámara inferior durante 20h a 37°C en atmosfera húmeda al 5% de CO₂, utilizando como quimioatrayente medio suplementado con suero fetal bovino (Life Technologies, Milán, Italia) al 10%. Al final del ensayo, las células se retiraron de la superficie superior de la membrana y las células adheridas a la superficie inferior se fijaron y tiñeron (Panóptico-Kit rápido, Panreac), para posteriormente ser contadas. Se analizaron un total de 40 campos (40[200x] campos/cámara). Cada ensayo se repitió al menos tres veces por duplicado y con lotes de células diferentes.

5.2.- Transfección de las líneas celulares murinas con siRNA sintéticos

Se utilizaron siRNA sintéticos específicos prediseñados como control (siNS) y para el silenciamiento de los genes diana Fhit (siFhit) y AP-2 α (siAP-2 α) (siRNA MISIÓN prediseñado, Sigma-Aldrich). En todos los ensayos, se utilizaron por lo menos dos oligos control y dos siRNAs específicos para cada diana. Veinticuatro horas antes de la transfección 2.5×10^5 células de la línea tumoral MN4.5 se sembraron en una placa de 6 pocillos. Las células se transfectaron con 0.15 nmoles de siRNA específicos o control (la concentración final del oligo es de 50 nM en un volumen de 3 ml de medio de cultivo por pocillo). Se utilizó el sistema de transfección N-TER siRNA nanopartículas (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de

48h la eficacia de la transfección se confirmó a través de RT-PCR a tiempo real, utilizando los cebadores descritos en la Tabla 2, y por Western-blot.

5.3.- Clonación del gen Fhit y transfección de la línea celular GR9-B9

El gen Fhit fue clonado a partir del cDNA de las células MN4.5. El RNA total fue extraído siguiendo las instrucciones del Kit RNeasy Mini (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU). El cDNA fue sintetizado utilizando una sonda de oligo(dT) y el kit Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) siguiendo las indicaciones del fabricante. La PCR se realizó utilizando 20 pmol de los cebadores: Fhit-5'Fw-5'-CACCATGTCATTTAGATTTGGCCAA-3', y Fhit-3'-BV-5'-TCAGGCCTGAAAGTAGA CCG-3'. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización de 1 min a 94°C, 65°C (T annealing) durante 1 min, y 2 min de extensión a 72°C durante un total de 30 ciclos. El producto de PCR se purificó y se clonó utilizando el kit de Expresión pcDNA3.3/TA (Invitrogen) y el plásmido obtenido se denominó pcDNA-Fhit. El vector vacío fue utilizado como control (pcDNA-control). Los vectores se usaron para transformar bacterias E. Coli TOP10 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las colonias de bacterias transformadas se seleccionaron en placas con medio de cultivo con 50 µg/ml de ampicilina y posteriormente se pusieron a crecer para la obtención de DNA plasmídico. El DNA del plásmido se extrajo y purificó mediante columnas QIAprep plásmido espín (Qiagen). La secuencia del cDNA de gen Fhit clonado y la orientación correcta se confirmó utilizando el secuenciador automático ABI PRISM 310. El día anterior a la transfección, la línea celular GR9-B9 se sembraron en placas de seis pocillos (1.5×10^5 células/ml) y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Al día siguiente, fueron transfectadas con el plásmido; 1µg de pcDNA-Fhit o pcDNA control utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ensayos de transfección transitoria se realizaron a las 48 h, y las transfectantes estables se

seleccionaron cultivando las células en medio de cultivo suplementado con 1mg/ml de geneticina (G-418, Life Technologies). Las transfectantes viables se clonaron por dilución límite, se expandieron y cultivaron utilizando siempre geneticina (400 µg/ml) para mantener la selección. Las transfectantes estables se designaron B9-FHIT. La transfección estable del gen Fhit fue confirmada por RT-PCR y Western-blot.

6.- RECUPERACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE BAZO

Las poblaciones de linfocitos del bazo fueron aisladas para su posterior estudio por inmunofluorescencia directa. Inicialmente los ratones fueron anestesiados con 0,04 ml de diazepam y 0,1 ml de ketamina, para extirpar los bazos. Los bazos se disgregaron y se pasaron a través de un filtro para células (Cell strainers, BD Falcon, Franklin Lakes, Nueva Jersey), del total de esplenocitos fueron aislados los linfocitos por centrifugación en gradiente de Ficoll Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich) a 500xg durante 20 minutos, y se lavaron 3 veces con PBS (Sigma-Aldrich).

Las poblaciones de macrófagos y células dendríticas del bazo fueron aisladas para su posterior estudio por inmunofluorescencia directa. Inicialmente los ratones fueron anestesiados con 0,04 ml de diazepam y 0,1 ml de ketamina, para extirpar los bazos. Se disgregaron los bazos y los esplenocitos se pasaron a través de un filtro para células (Cell strainers, BD Falcon, Franklin Lakes, Nueva Jersey), posteriormente se lavaron en PBS frío (Sigma-Aldrich) y se resuspendieron en medio de cultivo (Sigma-Aldrich) suplementado al 10% con suero bovino. La suspensión de células se colocó en falcons de cultivo a 37°C en atmosfera húmeda al 5% de CO₂. Se estudiaron las poblaciones de macrófagos y DCs en la fracción adherente y en la no adherente.

7.- SEPARACIÓN DEL INFILTRADO DEL PULMÓN

Los pulmones fueron extirpados y se homogeneizaron en un disociador automático (gentleMACS Disociador-Miltenyi Biotec) en una solución de PBS al 2% de suero fetal

bovino y 150 U/ml de colagenasa (Gibco). La suspensión celular obtenida se trató con colagenasa durante 90 min a 37°C en atmosfera húmeda al 5% CO₂. Posteriormente, los restos de tejido se eliminaron filtrando (Cell strainers, BD Falcon, Franklin Lakes, Nueva Jersey) y las células se lavaron con PBS (Sigma-Aldrich) al 2% de suero fetal bovino (Life Technologies, Milán, Italia). Los linfocitos se aislaron por centrifugación en gradiente de Ficoll Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich) a 500xg durante 20 minutos, y se lavaron 3 veces con PBS (Sigma-Aldrich).

8.- ANTICUERPOS Y ANALISIS DE EXPRESIÓN EN SUPERFICIE POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se estudió la expresión en superficie de las moléculas del MHC de clase I, clase Ib (no clásicas) y clase II mediante inmunofluorescencia, en los clones del sistema tumoral GR9 (A7, B7, C5, B11 y B9), en las líneas celulares derivadas de los tumores locales a nivel de la pata y de las metástasis generadas.

8.1.- Expresión de moléculas H-2 de clase I

La expresión de moléculas MHC de clase I K^d, D^d y L^d fue analizada por inmunofluorescencia indirecta utilizando el FACS (FACScan, Becton Dickinson). Un total de 5 x 10⁵ células fueron lavadas dos veces con PBS frío (Sigma-Aldrich) y se incubaron durante 30 min al 4°C con los anticuerpos primarios anti-H-2 K^d (K9.18), anti-H-2 D^d (34.5.8), y anti-H-2 L^d (28.14.8 y 30.5.7), todos ellos han sido obtenidos de la ATCC (Rockville, MD). Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG conjugada con isotiocianato de fluoresceína (anti-IgG-FITC(ratón)/Fab, Sigma-Aldrich) a una dilución de 1:120 incubando durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Como control se utilizaron células marcadas únicamente con el anticuerpo secundario o con un isotipo control. Se analizaron un mínimo de 1 x 10⁴ células con el software CellQuest-Pro. Los histogramas se obtuvieron por amplificación logarítmica de la fluorescencia emitida por

las células. Todas las líneas celulares fueron estudiadas en condiciones basales y después de tratamiento con IFN- γ (100U/ml durante 48h).

8.2.- Expresión de moléculas MHC de clase I no clásicas y MHC de clase II

Los niveles de expresión de moléculas MHC de clase Ib (Qa1 y Qa2) y clase II (I-A y I-E) en la superficie de las células fueron analizados por inmunofluorescencia directa utilizando el FACS (FACScan, Becton Dickinson). Un total de 5×10^5 células fueron lavadas dos veces con PBS frío y se incubaron durante 30 min al 4°C con los anticuerpos directos anti-H-2 I-A/I-E (M5/114), anti-H-2 Qa1 (6A8.6F10), y anti-H-2 Qa2 (695H1-9-9), todos ellos han sido obtenidos de Santa Cruz Biotechnology. Como control se utilizaron células marcadas con un isotipo control. Se analizaron un mínimo de 1×10^4 células con el software CellQuest-Pro. Los histogramas se obtuvieron por amplificación logarítmica de la fluorescencia emitida por las células. Todas las líneas celulares fueron estudiadas en condiciones basales y después de tratamiento con IFN- γ (100U/ml durante 48h).

8.3.- Análisis de subpoblaciones de células inmunes de bazo y pulmón

El análisis de las subpoblaciones inmunes se realizó por inmunofluorescencia directa, con anticuerpos marcados (Miltenyi Biotec, Madrid, España), se utilizaron: CD3 ϵ -APC, CD4-FITC, CD8-PE, CD25-PE, FoxP3-APC, CD19-FITC, CD49b-FITC, anti-MHC clase II-APC, anti-CD11c-PE y anti-CD11b-FITC. Como control negativo se utilizaron isotipos control IgG conjugados con FITC, PE o APC. Además, para bloquear la unión de anticuerpos no deseado a las células murinas que expresan receptores Fc se utilizó un reactivo de bloqueo (FcR Blocking Reagent, Miltenyi Biotec-Madrid, España). Los anticuerpos se utilizaron de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante (Miltenyi Biotec) y cada muestra consistió de un mínimo de 5×10^4 células.

Las células se analizaron en el citómetro de FACSCanto (Becton-Dickinson) y el software CellQuest-Pro.

9.- RT-PCR Y RT-PCR A TIEMPO REAL

Para aislar el mRNA de las líneas celulares murinas en condiciones basales se utilizó un kit de extracción (MyLteny-Biotech). El DNA complementario (cDNA) se sintetizó utilizando 100 ng de mRNA siguiendo las instrucciones del kit de transcripción reversa High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA), la reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20 μ l. Finalizada la transcripción reversa el cDNA, este se diluyó a un volumen final de 100 μ l (concentración final 1ng/ μ l), se alícuota y se conserva a -20°C.

Se realizaron por RT-PCR cuantitativa en tiempo real a todos los genes especificados en la Tabla 2, se realizaron por medio del Sistema 7500 Fast (Applied Biosystems) usado el Kit Power SYBR Green Maxter Mix (Applied Biosystems). Se utilizaron como control interno los genes GAPDH y β -actina para normalizar las variaciones en la calidad de mRNA y la cantidad de cDNA utilizado. La reacción de PCR se realiza por cuadruplicado, y los valores obtenidos se expresan con la media \pm SD (desviación estándar). Los cebadores, tamaño de amplificación, y la temperatura de annealing para cada gen se especifican en la Tabla 2. Las condiciones de la PCR fueron 40 ciclos de 15s de desnaturalización a 95 ° C y 60s a 60 ° C. Los genes Fhit, AP-2 α , c-Myc y Glis 1 fueron estudiados también utilizando sondas Taq-Man (Roche, Alemania).

10.- ANÁLISIS POR MICROARRAYS

Se realizaron análisis por microarrays de cDNA de las líneas celulares GR9-B9 y las metástasis MP5, MP12 y MN4.5 (Whole Mouse Genome Agilent-G4122A, Agilent

Technologies, Inc., de Santa Clara, CA). Para el análisis se realizó la amplificación de 5 µg de RNA total de cada línea celular siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron cuatro replicas de las hibridaciones con las sondas para cada línea celular. Las imágenes de fluorescencia de la matriz se analizaron tanto para Cy3 y Cy5 utilizando un escáner de fluorescencia y el software Feature Extraction para analizar la intensidad de la imagen y normalizar los datos.

11.- WESTERN-BLOT

El estudio de las proteínas Fhit, Glis 1, AP-2 α , c-Myc, Tap-1, Tap-2, LMP-2, LMP-7 y β -Tubulina se realizó por Western-Blot. Se extrajeron las proteínas totales de las células en cultivo siguiendo el protocolo descrito en el Kit TransFactor Extraction (BD Biosciences). En primer lugar, se despegan las células con PBS-EDTA, se realizan 2 lavados con PBS, se decanta el sobrenadante y se estima el volumen del pellet. Se añade un volumen de buffer de lisis equivalente a 5 veces el volumen del pellet y se incuba 30 minutos en hielo. Tras la centrifugación de la solución a 13.000 xg durante 30 minutos se recoge el sobrenadante que contiene las proteínas totales. Estas proteínas se cuantifican, antes de realizar el ensayo, con el Kit RC DC Protein Assay. Se realizó una electroforesis de 30 µg de proteínas, en Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad) (1:2) a la que le añadimos 2-mercaptoetanol (Sigma), en geles SDS-PAGE del 10-15%. Se somete a un voltaje de 100 V durante 60-90 minutos, en solución 1x Tris Glycine SDS. Como peso molecular se utilizó Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard (Bio-Rad). Tras realizar la electroforesis, se transfiere el gel a una membrana, siguiendo el protocolo del Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Se equilibra el gel y las membranas de PVDF (polyvinylidene difluoride) en Transfer Buffer (25 mM Tris, 192 M Glycine, 0.05% SDS, 10% de metanol). Se prepara el sándwich con la membrana y el gel y la transferencia se realiza a un voltaje de 30V durante toda la noche. Después de esto, la membrana se lava tres veces con agua

bidestilada y seguidamente se realizan 2 lavados de cinco minutos cada uno con PBST (PBS con 0.1% de Tween-20). A continuación, se bloquea la membrana durante 1 hora con una solución 3% Blocker (665 ml de PBST con 20 g de leche semidesnatada en polvo, Blotting Grade Blocker, Bio-Rad). Después de este período, se realizan dos lavados con TBST y se incuba la membrana con los anticuerpos primarios β -Tubulina (1:2000) (Sigma-Aldrich), TAP-1 (1:500), LMP-2 (1:250) (ambos suministrados por el Dr Klaus Fr uth (Howard Johnson, La Jolla, CA)), anti-Fhit (1:500), AP-2 α , Glis1, c-Myc, TAP-2 y LMP-7 (todos a la diluci3n 1:1000) obtenidos de ABCAM (Cambridge, UK), a 4°C durante toda la noche. Seguidamente la membrana se lava 2 veces con PBST y se incuba 60 minutos con el segundo anticuerpo (Goat anti-Mouse IgG-HRP, BD Biosciences Pharmingen). Por último, se realizan dos lavados con PBST, y se añade una soluci3n colorimétrica, Opti-4CN (Bio-Rad) durante 5 a 30 minutos.

12.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos son representados como la media \pm SD. Para los datos que siguen una distribuci3n normal se utiliz3 el test t de Student para evaluar las diferencias entre dos grupos. Para los datos que siguen no siguen una distribuci3n normal se utiliz3 el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativa cuando $*p < 0.05$.

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos y tamaño del amplificado

Oligonucleótido		Secuencia 5' to 3'	Posición	Longitud del producto [bp]
β₂-microglobulina	forward	CTGGTGCTTGTCTCACTGACC	79-99	214
	reverse	GACCAGTCCTTGCTGAAGGAC	273-293	
H2-K^d	forward	CCATCCACTGTCTCCAACACG	895-915	112
	reverse	CCACCTGTGTTCTTCTCATC	987-1007	
H2-D^d	forward	GCCTCCTTCATCCACCAAGAC	906-926	81
	reverse	CACAGCTCCAAGGATGACCAC	967-987	
H2-L^d	forward	CGTCCACTGACTCTTACATGG	914-934	74
	reverse	CCACAGCTCCAATGATGGCC	969-988	
TAP1	forward	GCTGTTCAAGTCTGCTCTC	1537-1556	105
	reverse	CACTGAGTGGAGAGCAAGGAG	1622 - 1642	
TAP2	forward	AGGAGCCTGTGCTGTTCTCG	1802-1821	116
	reverse	CCTGTGCAGACGACTTCATAG	1898-1948	
LMP2	forward	CCTCTGCACCAGCACATCTTC	187 - 207	93
	reverse	CGTGTAGCTCCAGCTGGTAG	261-280	
LMP7	forward	GGACCTCAGTCCTGAAGAGG	855 - 874	116
	reverse	CAACCGTCTTCTTCATGTGG	951 - 971	
Fhit	forward	GCAAGATGGTCTGAAGCTGG	481-501	156
	reverse	GGAGATCTGAGAAGGAGATGG	427-647	
AP-2α	forward	GTCAGTAGTGGAAGGAGAAGC	1230-1250	189
	reverse	GAGTTCACTGACCTGCTGGCT	1399-1419	
GAPDH	forward	TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG	817-837	117
	reverse	CCACTCTTCCACCTTCGATGC	914-934	
β-actina	forward	CAACACAGTGCTGTCTGGTGG	964-994	62
	reverse	GCTGACAGGATGCAGAAGGAG	1007-1026	

RESULTADOS

Los resultados se han dividido en tres capítulos que se corresponde con un artículo ya publicado y dos que están en preparación.

- I) El gen supresor de tumores Fhit regula positivamente la expresión de las moléculas MHC de clase I (artículo publicado)
- II) Heterogeneidad intratumoral en la expresión de moléculas MHC-I en un tumor primario determina su comportamiento oncogénico y metastásico (manuscrito en preparación)
- III) Metástasis espontáneas pueden ser completamente controladas en estado de latencia por el sistema inmune (manuscrito en preparación)

1.- EL GEN SUPRESOR DE TUMORES FHIT REGULA POSITIVAMENTE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS MHC DE CLASE I

1.1.- Expresión en superficie de las moléculas MHC-I de clase I en el sistema tumoral GR9-B9

El sistema tumoral GR9-B9, que ha sido ampliamente descrito en la introducción, está constituido por la línea celular GR9-B9 y metástasis derivadas de ella. Este clon GR9-B9 no presenta expresión en superficie de las tres moléculas MHC de clase I (H-2 K^d, D^d y L^d) en condiciones basales, pero recupera la expresión de las tres moléculas tras el tratamiento con IFN- γ (Fig. 24). Previamente nuestro grupo realizó con este clon ensayos de metástasis espontáneas en ratones BALB/c inmunocompetentes y nude (nu/nu) (García-Lora 2001). Las metástasis obtenidas en ratones inmunocompetentes fueron adaptadas a cultivo celular, estableciendo varias líneas celulares (ej. MP5 y MP12), las cuales no presentaban expresión en superficie de ninguna moléculas H-2 de clase I en condiciones basales, teniendo por tanto la misma expresión que el clon tumoral del que derivan (Fig. 24). Por el contrario, todas las metástasis generadas en ratones inmunodeficientes (ej. MN4.5) tienen una expresión en superficie positiva para las tres moléculas H-2 de clase I en condiciones basales (Fig. 24) (García Lora 2001).

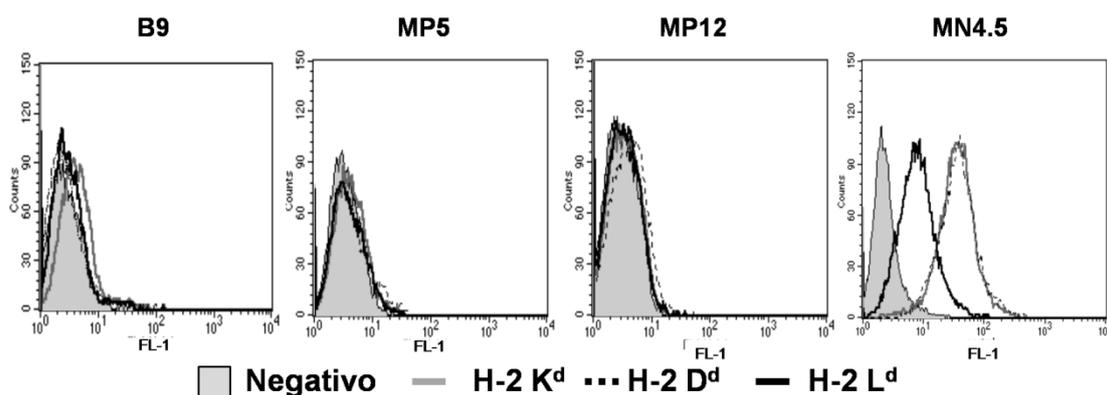


Figura 24. Expresión en superficie de las moléculas H-2 K^d, D^d y L^d en condiciones basales en el modelo tumoral murino GR9-B9. B9, MP5 y MP12, muestran una expresión en superficie H-2 de clase I negativa, por el contrario la línea celular MN4.5 es positiva para las tres moléculas H-2 de clase I. Los histogramas son representativos de un mínimo de tres experimentos independientes.

1.2.- Estudio del mecanismo responsable de la ausencia de expresión en superficie de las moléculas MHC-I

Previamente, mediante estudios de RT-PCR semicuantitativa, conocíamos que en el sistema tumoral GR9-B9 la pérdida de expresión transcripcional coordinada de varios componentes del APM era el mecanismo responsable de la falta de expresión en superficie de moléculas MHC-I en las líneas celulares GR9-B9, MP5 y MP12. Ahora, hemos realizado RT-PCR a tiempo real analizando los niveles transcripcionales relativos de las cadenas pesadas de clase I (H-2 K^d, D^d y L^d), β_2 -microglobulina (β_2m) y varios componentes del APM en el sistema tumoral GR9-B9, para conocer con más exactitud los datos obtenidos previamente. En la Tabla 2 se especifica los cebadores utilizados y el tamaño del amplificado. Los valores obtenidos han sido normalizados utilizando los genes GAPDH y β -actina como controles y la línea tumoral MN4.5 (H-2 clase I positiva) como referencia (valor relativo de 1) (Fig. 25a). Los resultados mostraron que existe una baja regulación coordinada en los niveles transcripcionales de los genes H-2 K^d, H-2 D^d, H-2 L^d, TAP-1, TAP-2, LMP-2, LMP-7, β_2m y calnexina en las líneas celulares GR9-B9, MP5 y MP12, que no presentan expresión en superficie de moléculas H-2 de clase I. Estas líneas presentan ausencia total de expresión de la cadena pesada H-2 L^d y LMP-7, y con respecto a LMP-2 únicamente la línea MP5 transcribe bajos niveles (3.6 veces menos que la línea MN4.5 H-2 positiva). No se observaron diferencias significativas en la expresión de tapasina y calreticulina (Fig. 25a).

Para determinar si la pérdida de expresión en superficie de las moléculas MHC-I era debida a la acetilación de histonas, las células GR9-B9 fueron tratadas con el inhibidor de la histona deacetilasa Trichostatin A (TSA), el cual produjo la recuperación parcial de la expresión en superficie de las moléculas MHC-I en estas células (Fig. 25b).

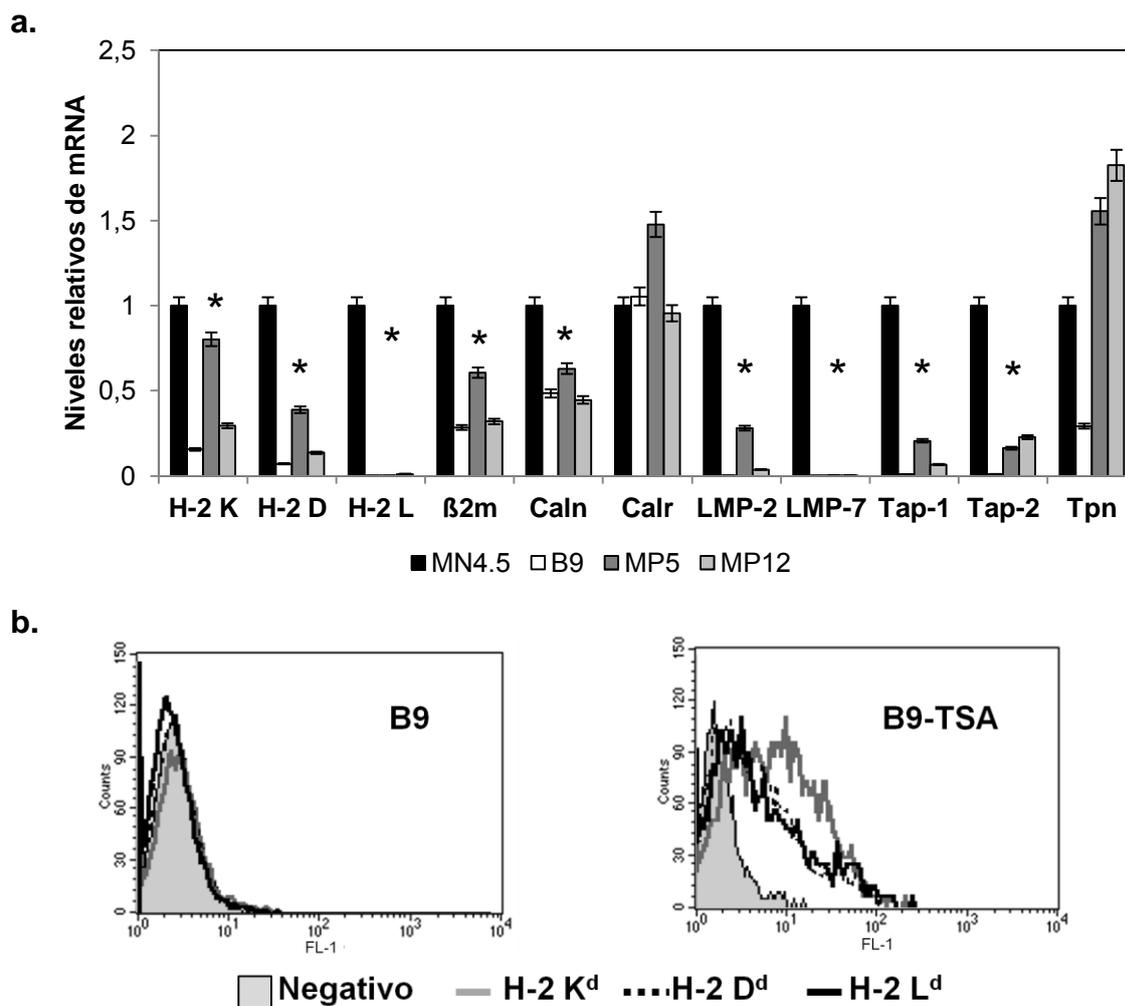


Figura 25. a. Niveles transcripcionales por RT-PCR a tiempo real de las cadenas pesadas de clase I, β 2m y varios componentes de la APM. Los niveles de expresión de los genes de interés se determinaron utilizando β -actina y GAPDH como control. A la línea MN4.5 (H-2 positiva) se le asigno el valor relativo de 1. Los valores se representan como la media \pm SD de un experimento realizado por cuadruplicado y representativo de un mínimo de tres; * $p < 0.01$. **b.** La línea celular B9 recupera la expresión en superficie de las tres moléculas H-2 de clase I tras el tratamiento con TSA (250nM, 48h).

1.3.- Identificación de otros genes diferencialmente expresados entre las líneas celulares H-2 clase I negativas y positivas

Nuestros resultados hasta ahora mostraban que la diferente expresión en superficie de moléculas MHC-I entre las metástasis obtenidas en ratones inmunocompetentes e inmunodeficientes, era debida a una baja regulación coordinada de la APM y de las cadenas pesadas MHC-I. El mecanismo molecular que provoca esta baja regulación

transcripcional coordinada de varios genes era desconocido. Nuestro modelo tumoral presentaba la ventaja de que tanto las metástasis obtenida en ratones nude como las obtenidas en ratones inmunocompetentes derivaban del mismo clon tumoral, por lo que presentaban un origen común. Este hecho nos hacía pensar que el número de genes diferencialmente expresados, además de los mencionados anteriormente de la APM y del MHC-I, no debería ser muy grande. Entre estos genes debería encontrarse el/los genes responsables de la alteración en la expresión de la APM y del MHC-I.

Dos estrategias se emplearon para determinar los posibles “genes candidatos”: en primer lugar, la construcción de una biblioteca de substracción de cDNA comparando las líneas H-2 positivas vs negativas; y en segundo lugar, la realización de análisis de expresión génica mediante microarrays de cDNA. La librería de substracción ya había sido realizada previamente (Martínez MS, 2004) y mostró la existencia de un conjunto de bandas discretas, al sustraer el cDNA de MN4.5 (H-2 positiva) con el cDNA de las H-2 negativas, que no estaban presentes ni en el control, ni en la librería inversa (substracción del c-DNA de las líneas H-2 negativas). Este hecho sugirió la presencia de genes activadores y no represores, que podrían estar controlando la transcripción coordinada de los genes de la APM y las cadenas pesadas.

La Tabla 3 muestra los genes encontrados que son expresados diferencialmente entre estas líneas celulares metastásicas, apareciendo genes conocidos y genes nuevos desconocidos. Partiendo de estos resultados ya conocidos por nuestro grupo, nos propusimos cruzar estos resultados con los que obtendríamos realizando microarrays de cDNA donde compararíamos las líneas celulares MHC-I positivas con las MHC-I negativas. El número de genes diferencialmente expresados que aparecieron en ambos ensayos fue de cuatro: AP-2 α , Fhit, Glis1, y c-Myc. La Tabla 4 muestra el ratio de expresión encontrados para estos genes en los ensayos de microarrays.

Tabla 3. Genes identificados en la librería de sustracción

Gen no.	Nombre	Gene Bank accession no.
1	Fhit: fragile histidine triad gene	MGI:1277947
2	F13a1: coagulation factor XIII, A1 subunit 1	MGI:1921395
3	AFG3: (ATPase family gene 3)-like 2 (yeast)	MGI:1916847
4	mt-Nd5: NADH dehydrogenase 5, mitochondrial	MGI:102496
5	Glis1: GLIS family zinc finger 1	MGI:2386723
6	Ebf1: early B-cell factor 1	MGI:95275
7	Cables1: CDK5 y Abl enzyme substrate 1	MGI:1927065
8	Kpna2: karyopherin (importin) alpha 2	MGI:103561
9	Gen novel: Location: chromosome 11	
10	Mep1b: meprin 1 beta	MGI:96964
11	Oxct2a: 3-oxoacid CoA transferase 2 ^a	MGI:1891061
12	H2-Q8: histocompatibility 2, Q region locus 8	MGI:95937
13	Vav3: vav 3 oncogene	MGI:1888518
14	Clon RP23-30D1: Location: chromosome 3	
15	Clon RP23-265D17: Location: chromosome 1	
16	Tcfap2a: transcription factor AP-2, alpha	MGI:104671
17	AMP deaminasa I: protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit	MGI:1336167
18	Clon RP23-5PI: Location: chromosome X	
19	Fgfr1: fibroblast growth factor receptor 1	MGI:95522
20	Clon RP23-63c10: Location: chromosome 2	
21	Clon RP23-10M12: Location: chromosome 11	
22	c-Myc: myelocytomatosis oncogene	MGI:97250

Tabla 4. Genes seleccionados tras la comparación de la biblioteca de c-DNA y el análisis por microarrays

Gen no.	Nombre	Ratio*
1	FHIT: fragile histidine triad gene	3.15
5	Glis1: GLIS family zinc finger 1	1.64
16	Tcfap2a: transcription factor AP-2 alpha	2.24
22	c-Myc: myelocytomatosis oncogene	1.63

*Datos obtenidos del análisis de los microarrays. Ratio de comparación entre MN4.5 (H-2 positivas) y B9, MP5 y MP12 (H-2 negativas).

1.4.- Análisis por RT-PCR a tiempo real de los niveles de transcripción de los genes AP-2 α , FHIT, Glis1, y c-Myc en el sistema GR9-B9

El siguiente paso era analizar la diferencia de expresión transcripcional de estos cuatro genes mediante RT-PCR a tiempo real, lo que nos permitiría confirmar su diferente expresión y cuantificar las diferencias. Se comparó los niveles de expresión transcripcionales de los genes AP-2 α , Fhit, Glis1 y c-Myc de las líneas H-2 positivas (MN4.5) con las H-2 negativas (GR9-B9, MP5 y MP12). Los cebadores utilizados se

especifican en la Tabla 2 y para el análisis de los datos los valores obtenidos para la línea MN4.5 se tomaron como referencia (valor relativo de 1).

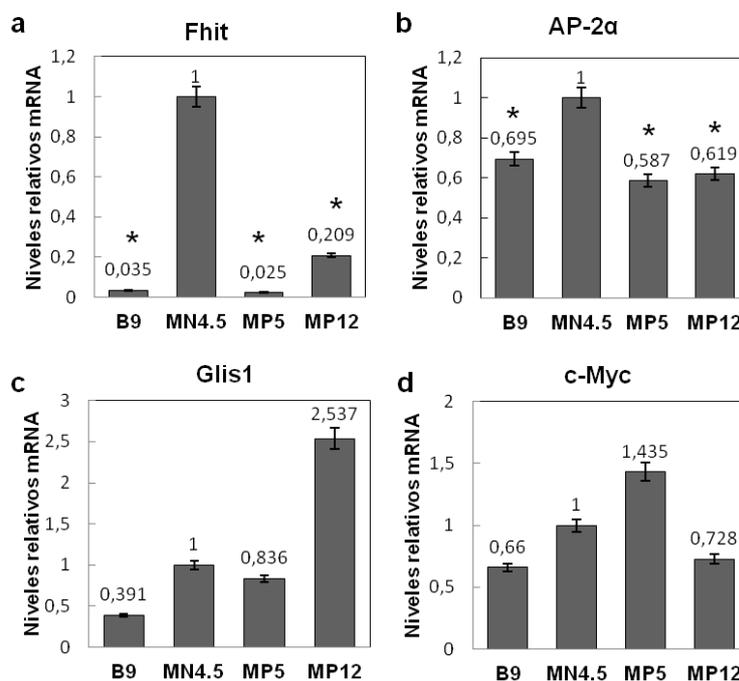


Figura 26. Niveles transcripcionales por RT-PCR de los cuatro genes candidatos del sistema tumoral GR9-B9. a. Niveles de expresión de Fhit, **b.** AP-2α, **c.** c-Myc y **d.** Glis 1. La expresión de los genes se determinó utilizando GADPH y β-actina como control. A MN4.5 le asignamos el valor relativo de 1. Los resultados se representan como la media ± SD de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado; * $p < 0.01$ por comparación de MN4.5 con B9, MP5 y MP12

Los resultados del análisis revelaron que efectivamente los niveles transcripcionales de expresión del gen Fhit son significativamente menores en las líneas MHC-I negativas, GR9-B9, MP5 y MP12, al compararlas con la línea celular MN4.5 (Fig. 26a). Lo mismo ocurría para los niveles transcripcionales de AP-2α, eran significativamente menores en las líneas GR9-B9, MP5 y MP12, aunque las diferencias eran menores que las encontradas para el gen Fhit (Fig. 26b). Los resultados encontrados para los otros dos genes, Glis-1 y c-Myc fueron diferentes, no encontrándose una relación directa entre expresión de estos genes y expresión en superficie de moléculas MHC-I (Fig. 26b y c). Por ejemplo, las líneas celulares MP12 y

MP5 (MHC-I negativas) presentaron una alta expresión de los genes Glis-1 y c-Myc, respectivamente. En consecuencia, la posible implicación de estos dos genes en la regulación de la expresión en superficie de las moléculas MHC-I quedó descartada. La expresión de estos cuatro genes fue también medida a nivel proteico, realizando ensayos de western-blot. Los resultados plenamente confirmaron los obtenidos a nivel transcripcional, encontrando relación directa entre la expresión en superficie de las moléculas MHC-I y los genes Fhit y AP-2 α (Fig. 27).

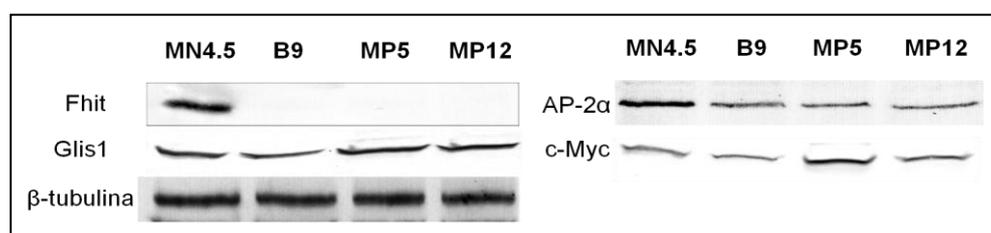


Figura 27. Análisis por western-blot. Comparación de los niveles de las proteínas Fhit, AP-2 α , Glis 1 y c-Myc entre las líneas MN4.5, B9, MP5 y MP12.

1.5.- Análisis de la implicación de los genes supresores de tumores Fhit y AP-2 α en la expresión de las moléculas MHC de clase I

A continuación, decidimos investigar si los genes Fhit o AP-2 α podrían tener una implicación real en la regulación coordinada de la transcripción de los componentes del APM y de las cadenas pesadas H-2 de clase I, y por tanto en la expresión en superficie de las moléculas MHC-I. Una posibilidad sería la transfección de los genes Fhit o AP-2 α en las líneas celulares con expresión negativa de moléculas H-2 de clase I y analizar si recuperan la expresión de estas moléculas. Pero al analizar esta posibilidad, se observó que en la bibliografía se ha descrito que la restauración de estos dos genes supresores de tumores en diferentes líneas tumorales, puede inhibir su proliferación, alterar el ciclo celular y producir apoptosis (Roz et al. 2002). Con el fin de evitar la posible citotoxicidad que provocaría la sobreexpresión de los genes Fhit o AP-2 α tras la transfección, decidimos continuar con una 2^a estrategia alternativa:

silenciamiento de la expresión de estos dos genes, en la línea tumoral H-2 de clase I positiva, a nivel transcripcional utilizando RNAs de interferencia específicos (siRNA) y comprobar si esta inhibición tiene algún efecto en los niveles transcripcionales de los componentes del APM y las cadenas pesadas y en la expresión en superficie de las moléculas MHC-I.

1.5.1.- Silenciamiento de la expresión de AP-2 α mediante siRNA en la línea tumoral MN4.5

Se bloqueó la expresión del gen AP-2 α en las células metastásicas MN4.5, mediante la transfección de dos siRNAs específicos (siAP-2 α), utilizando varios controles para este experimento: transfección con siRNA control (siNS), células transfectadas únicamente con el reactivo de transfección y células no transfectadas. Estas dos últimas células mostraron siempre en todos los ensayos realizados los mismos resultados, por lo que en las figuras aparecen identificadas como MN4.5. A las 48 h de la transfección, se compararon los niveles de expresión transcripcional del gen AP-2 α mediante RT-PCR a tiempo real entre todas las células descritas, encontrando que la transfección de siAP-2 α había producido una disminución específica del 57% en la expresión de este gen (Fig.28a). La transfección de siNS no modificó significativamente la expresión de este gen, encontrando la misma expresión de AP-2 α en los tres controles utilizados (Fig. 28a). En cada uno de los ensayos, se emplearon un mínimo de dos oligos específicos diferentes para la diana AP-2 α , así como dos oligos control, encontrando siempre resultados similares. Al analizar los niveles de expresión transcripcionales de las cadenas pesadas, β_2 -microglobulina y varios componentes del APM después de la transfección, no se apreciaron cambios significativos en comparación con la misma línea sin transfectar y las transfectadas con oligos siNS (Fig. 28b y c). Además, no encontramos ninguna diferencia entre los niveles de expresión en superficie de las tres moléculas H-2 de clase I por citometría

de flujo (Fig. 28d). Estos resultados descartaron la posible implicación del gen AP-2 α en la regulación de la transcripción coordinada de los componentes del APM y las cadenas pesadas de las moléculas MHC-I.

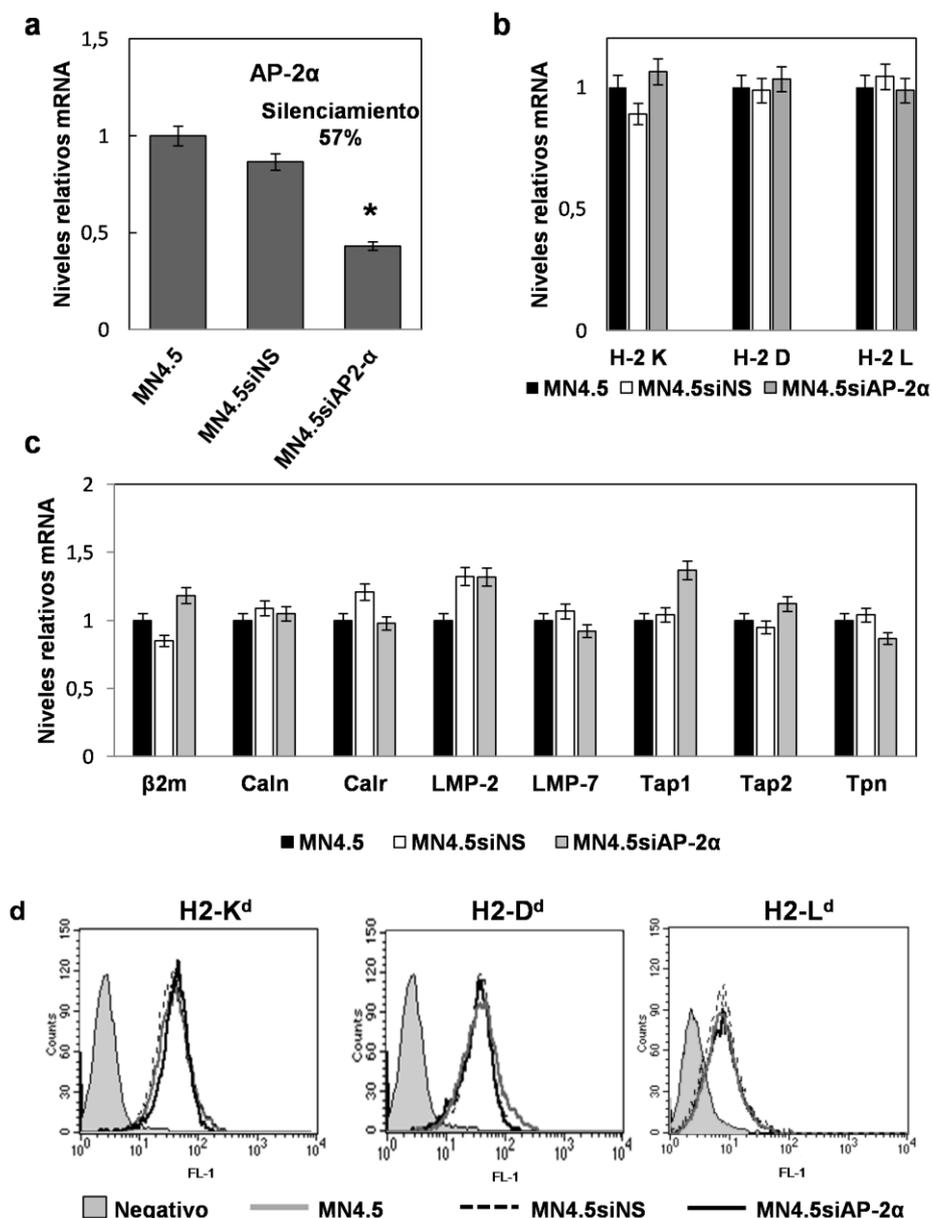


Figura 28. Silenciamiento del gen AP-2 α en la línea MN4.5 utilizando siRNAs específicos. a. Reducción alcanzada en los niveles transcripcionales de AP-2 α , 48h después de la transfección con oligos específicos (siRNAs). **b.** Comparación de los niveles transcripcionales de las cadenas pesadas de clase I K^d, D^d y L^d tras la transfección con siRNAs **c.** Niveles transcripcionales de β 2m y varios componentes del APM tras la transfección con siRNAs. Todos los resultados se representan como la media \pm SD de tres experimentos realizado por cuadruplicado. **d.** Comparación de los niveles superficiales de expresión de las moléculas H-2 K^d, D^d y L^d por citometría de flujo en las tres muestras.

1.5.2.- Silenciamiento de la expresión de Fhit mediante oligos siRNA en la línea celular MN4.5

La transfección de las células tumorales MN4.5 con oligos específicos para el gen supresor de tumores Fhit (siFhit) durante 48 h redujo considerablemente los niveles transcripcionales del gen en un 64%, en comparación con la línea MN4.5 sin transfectar (Fig. 29a). Por el contrario, no observamos ninguna modificación significativa en los niveles transcripcionales del gen Fhit después de la transfección con oligos siNS (Fig. 29a). Para cada ensayo, se utilizaron nuevamente un mínimo de dos oligos control y dos específicos para el gen diana, encontrando siempre resultados similares. En este caso, la inhibición de Fhit si provocó una disminución significativa a nivel transcripcional de las tres cadenas pesadas H-2 de clase I (K^d , D^d y L^d) (Fig. 29b). La reducción de la cadena pesada H-2 L^d alcanzó un 47%, seguida de un 30% en H-2 K^d y un 26% para H-2 D^d (Fig. 29b). El descenso en los niveles transcripcionales de β_2 -microglobulina alcanzó un 32% (Fig. 29c). Al analizar los niveles transcripcionales de varios de los componentes del APM comprobamos que algunos de ellos descendieron significativamente: 80% y 67% para los genes LMP-2 y LMP-7, una disminución de un 48% y 58% para los transportadores de péptidos TAP-1 y TAP-2, y finalmente un 64% en los niveles de tapasina (Fig. 29c). No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los genes estudiados al comparar la línea transfectada con siNS y la línea MN4.5 sin transfectar (Fig. 29b y c). Como se ha mencionado anteriormente, las muestras transfectadas únicamente en presencia del reactivo N-TER nanopartículas (reactivo de transfección) fueron empleadas como controles en todos los ensayos, obteniendo resultados similares a los obtenidos en la línea sin transfectar y la transfectada con siNS. La expresión a nivel de proteína para Fhit y para los TAPs y LMPs fue analizada y confirmó el descenso observado a nivel transcripcional (Fig. 29d)

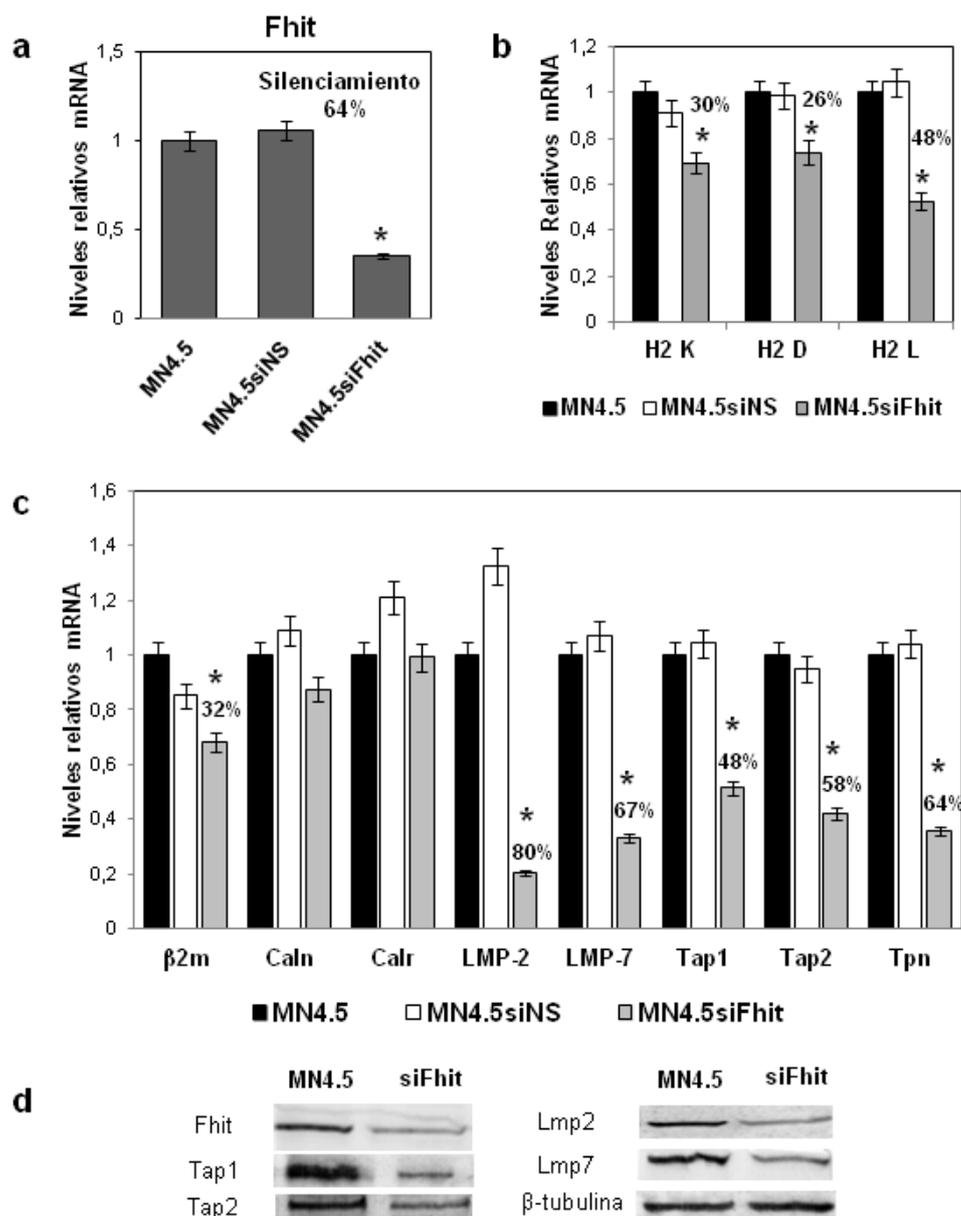


Figura 29. Silenciamiento de la expresión del gen Fhit en la línea MN4.5 por siRNA. a. Comparación de los niveles transcripcionales de Fhit 48h después de la transfección entre la línea sin transfectar (MN4.5), la línea transfectada con oligos control (MN4.5siNS) y la transfectada con oligos específicos del gen diana (MN4.5siFhit). **b.** Niveles transcripcionales de las cadenas pesadas tras la transfección con siRNAs. **c.** Niveles transcripcionales de β2m y varios componentes del APM tras la transfección con siRNAs. Los niveles de expresión de los genes de interés se determinaron utilizando GAPDH y β-actina como control. A los niveles transcripcionales de la línea MN4.5 sin transfectar se les asignó el valor relativo de 1. Los valores se representan como la media ± SD de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado; * $p < 0.01$. **d.** Los análisis por western-blot muestran una disminución en los niveles de proteínas de Fhit y varios componentes del APM tras la transfección con siRNAs de la línea MN4.5 (MN4.5siFhit).

No conocíamos si esta bajada transcripcional de la APM y de las cadenas pesadas MHC-I conllevaría una disminución en la expresión en superficie de las tres moléculas MHC-I, y más aun si esta bajada de expresión en superficie podría ya ser detectada a las 48 h, o necesitaría más tiempo para que se produjera el recambio de las moléculas MHC-I que se encontraban en la superficie celular. Sorprendentemente a las 48 h de la transfección, las células transfectadas con el oligonucleótido siFhit presentaron una disminución significativa en superficie de la expresión de las tres moléculas MHC-I (Fig. 30a). Se observó una reducción significativa en la expresión superficial de las tres moléculas H-2 de clase I al comparar MN4.5siFhit, MN4.5siNS y MN4.5 (Fig. 30a). Las medias de fluorescencias de las moléculas H-2 K^d, D^d y L^d descendieron en un 56.5%, 56.9% y 61.2%, respectivamente (Fig. 30b).

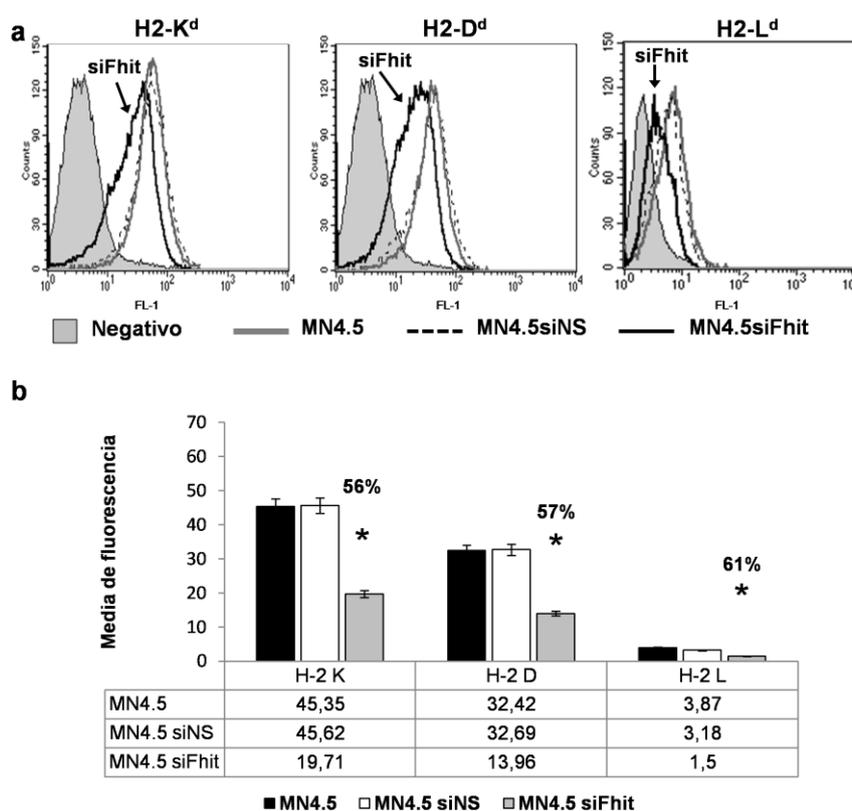


Figura 30. Expresión de moléculas MHC de clase I por citometría de flujo. a. Expresión de las moléculas H-2 de clase I 48h después de silenciar al gen Fhit. **b.** Representación de las intensidades medias de fluorescencia; * $p < 0.01$.

Con el fin de comprobar un posible efecto sinérgico entre los genes Fhit y AP-2 α en la regulación de la expresión de moléculas H-2 de clase I, se realizaron experimentos de co-transfección para ambos genes, no encontrándose ningún efecto adicional en los resultados del ensayo (resultados no mostrados).

1.5.3.- Implicación de Fhit en la regulación transcripcional de la APM y cadenas pesadas en líneas celulares tumorales de diferente histología

Nosotros decidimos investigar si el papel de Fhit en la regulación de la expresión de moléculas MHC-I era exclusivo de este sistema tumoral. Para confirmarlo o descartarlo ampliamos nuestro estudio a dos nuevas líneas tumorales murinas derivadas de tumores sólidos de diferente histología. Utilizamos el carcinoma de colon CT26 y la línea tumoral de mama 4T1. En la línea CT26 la transfección con oligos siFhit (CT26siFhit) inhibió la expresión del gen hasta un 88% (Fig. 31a). Los niveles transcripcionales de las cadenas pesadas H-2 K^d, D^d y L^d disminuyeron significativamente un 26%, 48% y 42% respectivamente (Fig. 31b). Además, detectamos una disminución significativa al comparar los niveles transcripcionales de varios genes de la APM entre CT26siFhit y CT26siNS ó CT26 (Fig. 31b). Los genes que presentaron descensos significativos en sus niveles de transcripción fueron: las chaperonas calnexina y calreticulina (49% y 36%) y los transportares de péptidos TAP-1 y TAP-2 (17% y 30%) (Fig. 31b). No encontramos diferencias en los otros genes analizados. La reducción a nivel transcripcional de los componentes del APM se tradujo en un descenso en los niveles de expresión superficial de las tres moléculas H-2 de clase I (Fig. 31c). La línea celular 4T1 es muy difícil de transfectar y la eficacia que obtuvimos en los ensayos de transfección fue de un 20% con cualquiera de los siRNAs. Se detectó una inhibición de un 20% del gen Fhit en las células transfectadas con siFhit, que se tradujo también en una inhibición aproximada del 20% en la

expresión transcripcional de varios componentes de la APM y de las cadenas pesadas MHC-I (datos no mostrados).

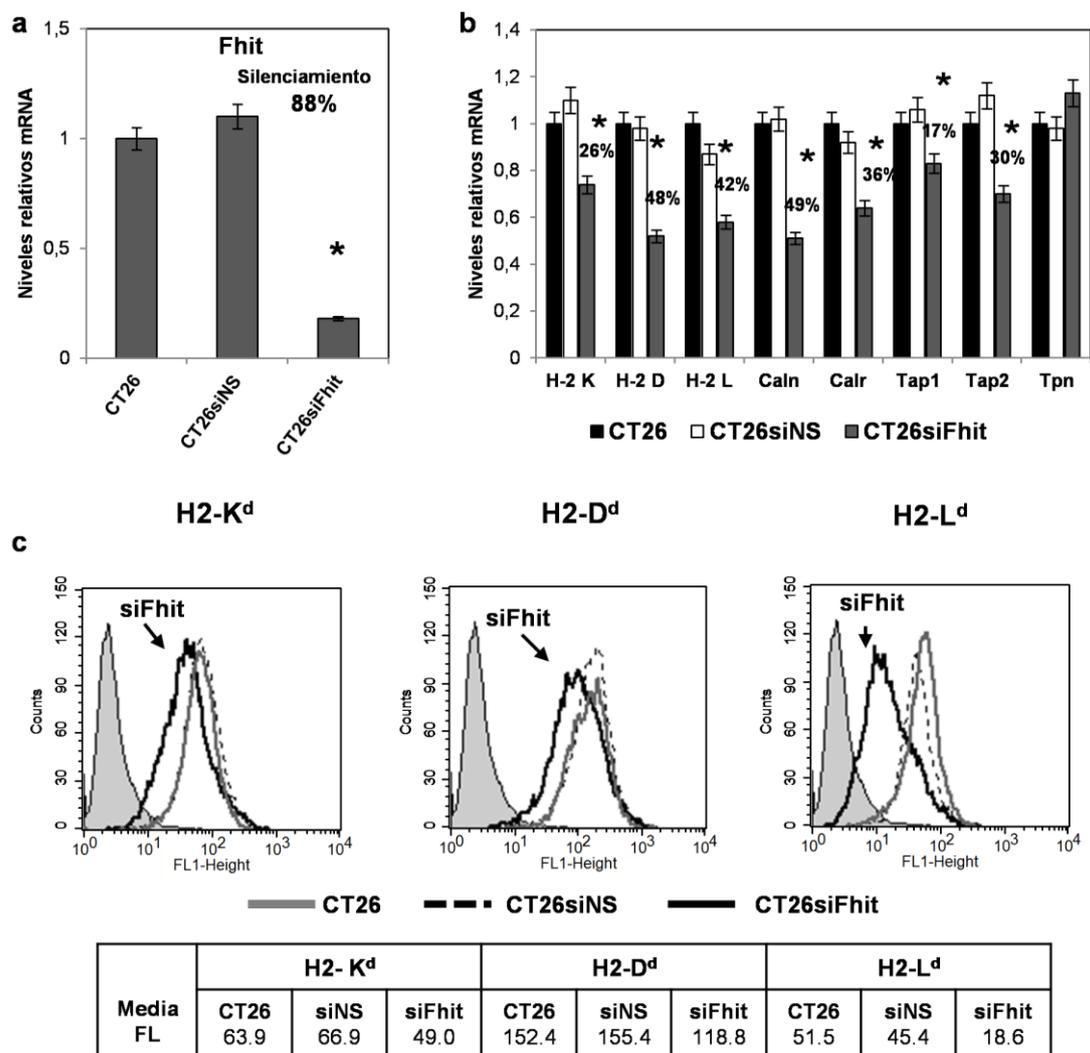


Figura 31. Silenciamiento del gen Fhit en el carcinoma de colon CT26. a. Las líneas fueron transfectadas con oligos siRNAs específicos para el gen Fhit (CT26siFhit), con oligos controles (CT26siNS) o no transfectadas CT26; la eficacia de la transfección se confirmó a las 48h por RT-PCR a tiempo real. b. Comparación de los niveles transcripcionales de las cadenas pesadas, $\beta 2m$ y varios componentes del APM. Todos los resultados se representan como la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado; * $p < 0.01$. c. Niveles de expresión superficial de las tres moléculas H-2 de clase I medidas por citometría de flujo. La tabla muestra la media de fluorescencia para las tres moléculas.

1.6.- Transfección del gen Fhit en líneas celulares MHC-I negativas

Aunque como hemos mencionado anteriormente la transfección del gen supresor de tumores Fhit puede promover la apoptosis y reducir la proliferación celular, nosotros quisimos estudiar si la transfección transitoria o estable del gen Fhit podría recuperar la expresión transcripcional de la APM y de las cadenas pesadas del MHC-I, así como la expresión en superficie de las moléculas MHC-I, en las células tumorales MHC-I negativas GR9-B9 y MP5. Se construyó un plásmido de expresión conteniendo el cDNA para Fhit, pCDNA-Fhit, un plásmido vacío (pCDNA-control), e incluso un plásmido que contenía el gen Fhit pero en orientación opuesta. En todos los ensayos realizados con los dos últimos plásmidos, los resultados fueron los mismos, por lo que solo mostraremos los resultados con el plásmido pCDNA-control.

La transfección transitoria de las células GR9-B9 con el plásmido pCDNA-Fhit (B9-TFhit) provocó que a las 48 h ya se detectará un aumento en la expresión en superficie de las tres moléculas MHC-I comparado con la expresión completamente negativa en superficie que mostraba el clon GR9-B9 (Fig. 32a). La transfección del vector vacío no provocó ninguna variación en la expresión de las moléculas MHC-I en superficie. También pudimos observar que la transfección transitoria de Fhit no afectó la proliferación celular de las células GR9-B9, por lo que decidimos seleccionar transfectantes estables. Varios clones transfectados estables fueron seleccionados (B9-Fhit), en todos comprobamos la expresión de Fhit mediante RT-PCR a tiempo real y mediante western-blot observando una alta expresión (Fig. 32c). En todas las transfectantes estables se detectó un significativo incremento de la expresión en superficie de las moléculas H-2 K^d y D^d, y un sorprendente gran aumento en los niveles de expresión en superficie de la molécula H-2 L^d (Fig. 32a), cuya expresión es la más alta encontrada por nosotros en cualquier línea celular previamente estudiada.

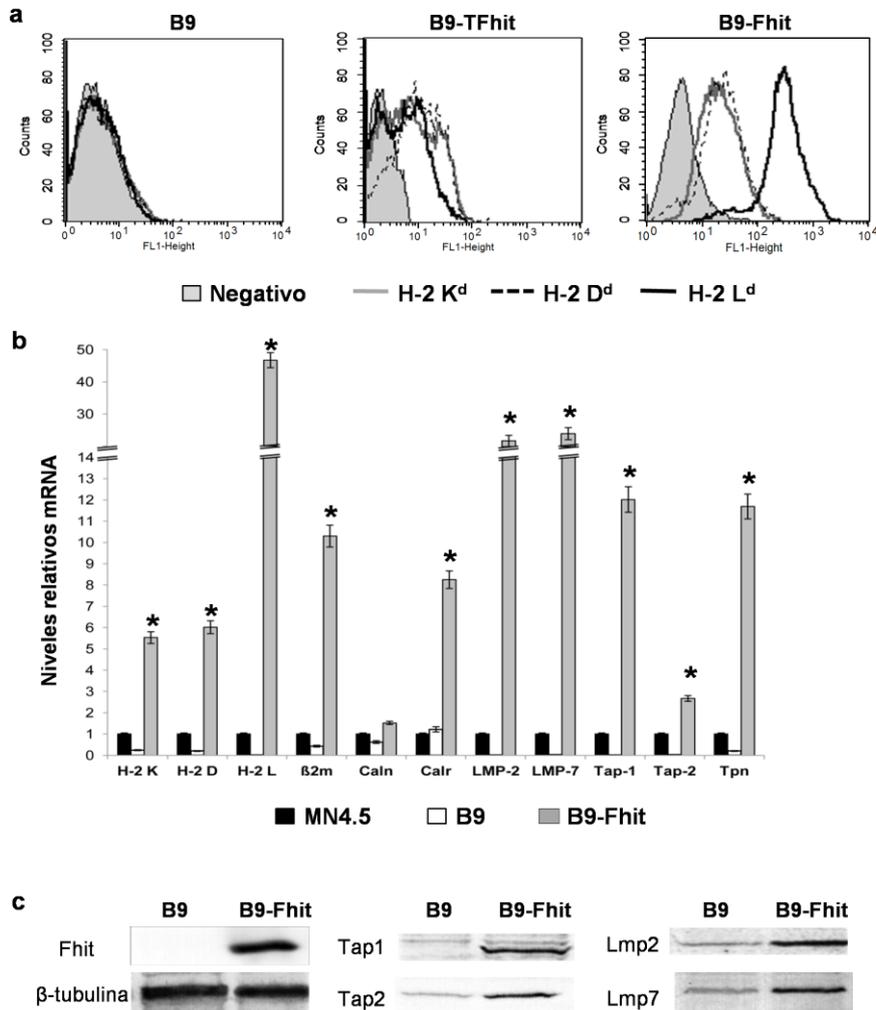


Figura 32. Transfección transitoria (B9-TFhit) o estable B9-Fhit del gen Fhit en la línea celular B9.
a. Expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I en la transfectante transitoria B9-TFhit y en la estable B9-Fhit. **b.** Niveles transcripcionales de expresión de las cadenas pesadas, β 2m y varios componentes del APM tras la transfección estable del gen Fhit en la línea celular B9 (B9-Fhit). Los valores representan la media \pm SD y son representativos de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado; * $p < 0.01$. **c.** Análisis por western-blot que muestran el incremento de los niveles de proteínas Fhit, Tap1, Tap2, Lmp2 y Lmp7 en las transfectantes estables.

Además, comprobamos por RT-PCR a tiempo real que este incremento en superficie de los niveles de expresión de moléculas MHC-I era consecuencia de un incremento muy significativo de los niveles transcripcionales de las cadenas pesadas (H-2 K^d, D^d y L^d), β_2 -microglobulina y de todos los componentes del APM analizados (Fig. 32b). Este incremento conllevó el aumento de los niveles proteicos de todos estos genes. La figura 32c muestra el incremento de expresión que ocurrió en las proteínas Fhit, TAP-1, TAP-2, LMP-2 y LMP-7 al comparar GR9-B9 con la transfectante estable B9-Fhit. Paralelamente en todos estos ensayos se analizaron muestras transfectadas con el vector pc-DNA control que mostraron el mismo resultado que los obtenidos para la línea GR9-B9 sin transfectar. Todos estos ensayos fueron también realizados con las células MP5, y los resultados encontrados fueron prácticamente idénticos, salvo que la expresión transcripcional y en superficie de la moléculas H-2 L^d no fue recuperada, debido a que estas células presenta una lesión estructural en este gen (García-Lora et al. 2001).

La Tabla 5 resume los cambios encontrados a nivel transcripcional con el silenciamiento de Fhit en las células MN4.5 y CT26, y con la transfección del gen Fhit en las células tumorales GR9-B9.

Tabla 5. Cambios encontrados en los niveles transcripcionales de las cadenas pesadas, β_2m y varios componentes de la APM en los ensayos de transfección con oligonucleótidos (siRNAs) y en las transfectantes estables del gen Fhit.

Línea Cel.	H-2 K	H-2 D	H-2 L	β_2m	TAP1	TAP2	LMP2	LMP7	Caln.	Calr.	Tapasina
MN4.5siFhit	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	-	↓
CT26siFhit	↓	↓	↓	-	↓	↓	-	-	↓	↓	-
B9-Fhit	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑

2.- HETEROGENEIDAD INTRATUMORAL EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS MHC-I EN UN TUMOR PRIMARIO DETERMINA SU COMPORTAMIENTO ONCOGÉNICO Y METASTÁSICO

Nuestro segundo objetivo era determinar como la heterogeneidad de expresión en superficie de moléculas MHC-I encontrada en los diferentes clones obtenidos del tumor primario GR9, podría afectar su comportamiento biológico *in vitro* e *in vivo*.

2.1.- Fenotipo H-2 de clase I de los clones tumorales seleccionados

Se han seleccionado un total de cuatro clones del fibrosarcoma murino GR9 inducido químicamente por MCA, ampliamente descrito en la introducción. Los diferentes clones celulares fueron obtenidos por dilución límite. Los clones seleccionados fueron: A7, B7, C5 y B11. Estos clones en su conjunto son representativos del amplio abanico de fenotipos MHC-I que existen en el tumor sólido GR9 (Fig. 16). Cuando estudiamos los niveles de expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I (H-2 K^d, D^d y L^d) en estos clones encontramos las siguientes diferencias (Fig. 33a): GR9-A7 es un clon con expresión basal de las tres moléculas H-2 de clase I, y el tratamiento con IFN- γ induce las tres moléculas; el clon GR9-B7 presenta unos niveles de expresión también positivos, aunque menores, para las tres moléculas H-2 de clase I y nuevamente las tres moléculas se inducen con IFN- γ ; GR9-C5 presenta niveles bajos de expresión de las moléculas H-2 K^d y D^d, y no expresa la molécula H-2 L^d, aunque si induce la expresión de las tres moléculas H-2 de clase I tras el tratamiento con IFN- γ ; y finalmente, GR9-B11 expresa únicamente niveles muy bajos de la molécula H-2 K^d y es negativo para las moléculas H-2 D^d y L^d, este clon induce la expresión de las tres moléculas H-2 K^d, D^d y L^d tras el tratamiento con IFN- γ (Fig. 33a). El tratamiento con IFN- γ , induce la expresión de las tres moléculas en todos los clones, esto descarta la presencia de lesiones estructurales, por tanto presentando "soft lesions". En resumen, la clasificación de estos clones en función de sus expresión de moléculas H-2 de clase I es: el clon GR9-A7 presenta altos niveles de expresión de moléculas H-2 de clase I,

seguido del clon GR9-B7 con niveles intermedios, GR9-C5 niveles bajos, y por último GR9-B11 es prácticamente negativo (Fig. 33).

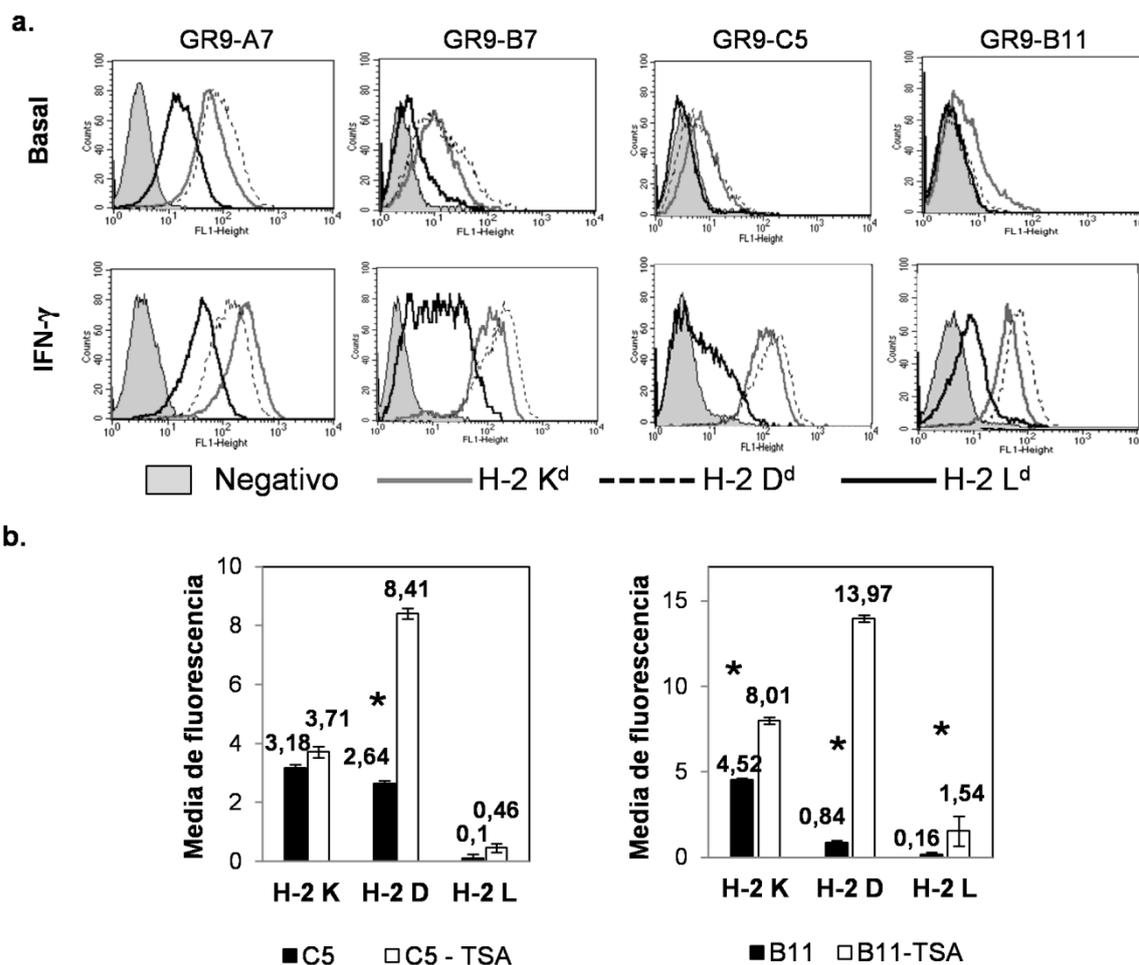


Figura 33. Niveles de expresión de las moléculas H-2 de clase I por citometría de flujo. a. Expresión de los clones GR9: A7, B7, C5 y B11 en condiciones basales y tras tratamiento con IFN- γ (100 U/ml; 48h). **b.** Comparación de los niveles de expresión de moléculas H-2 de clase I en condiciones basales y tras el tratamiento con TSA (250nM, 48h). En la figura se representa la media \pm SD; * $p < 0,01$. Esta figura es un experimento representativo de un mínimo de tres.

Los fenotipos MHC-I alterados de los clones GR9-C5 y B11 pueden ser resultado de la represión epigenética. Diferentes estudios han demostrado que los niveles de expresión de las moléculas H-2 de clase I pueden verse aumentados tras el

tratamiento con inhibidores de la enzima histona deacetilasa (iHDAC), como Trichostatin A (TSA) (Wang et al. 2007). Para demostrar si la deacetilación de histonas está o no implicada en la regulación de la expresión de moléculas H-2 de clase I, las dos líneas celulares GR9-C5 (bajos niveles de MHC-I) y GR9-B11 (MHC-I prácticamente negativa) se trataron con TSA (250 nM de TSA durante 48 horas). Se midieron los niveles de expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I por citometría de flujo comparando las medias de fluorescencia de ambas líneas en condiciones basales y tras el tratamiento con TSA (Fig. 33b). El clon GR9-C5 tras el tratamiento con TSA triplicó los niveles de expresión de la molécula de H-2 D^d, pero sólo ligeramente los niveles de H-2 K^d y L^d (Fig. 33b). El tratamiento con TSA en la línea GR9-B11 provocó un incremento significativo de las tres moléculas H-2 K^d, D^d y L^d de 1.8, 16 y 9.6 veces, respectivamente. Varias observaciones se pueden extraer de estos resultados: en primer lugar, TSA tiene efectos específicos sobre los niveles de expresión de las moléculas H-2 de clase I en ambas líneas celulares, y en segundo lugar, HDAC está contribuyendo a la represión de las moléculas H-2 de clase I.

2.2.- Correlación entre los niveles de transcripción de los componentes del APM y de las cadenas pesadas y la expresión en superficie de las moléculas MHC-I

Para determinar si la expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I se correlacionan con los niveles de transcripción de complejo H-2, analizamos los niveles transcripcionales de las cadenas pesadas H-2 de clase I (K^d, D^d y L^d) por RT-PCR a tiempo real. En la Tabla 2 se detallan los cebadores utilizados y el tamaño de amplificación. Los resultados revelaron que los niveles de transcripción de las cadenas pesadas H-2 K^d y D^d no se corresponden con la expresión superficial de estas moléculas. GR9-B7 es el clon que expresa niveles transcripcionales más altos de estas moléculas, y el clon GR9-B11 también expresa niveles transcripcionales de estas dos moléculas, a pesar de ser prácticamente negativo en superficie (Fig. 34a).

Únicamente el nivel transcripcional de la cadena pesada H-2 L^d se correlacionó con la expresión en la superficie en todas las líneas celulares, se transcribe más en el clon GR9-A7 que en GR9-B7 y los clones con expresión negativa de la molécula H-2 L^d, GR9-C5 y GR9-B11, mostraron un nivel transcripcional muy bajo de la cadena pesada H-2 L^d (Fig. 34a). A continuación, se analizaron los niveles de transcripción de β_2 -microglobulina y algunos de los componentes de la APM (LMP-2, LPM-7, TAP-1, TAP-2, tapasina, calnexina y calreticulina) para analizar si una regulación negativa en ellos podría explicar las diferencias en la expresión superficial de las moléculas H-2 de clase I entre las líneas celulares. En las células GR9-B7, la expresión transcripcional de los genes calreticulina, LMP-2 y LMP-7 es menor que en el clon GR9-A7 (Fig. 34a). En el clon GR9-C5 unos niveles transcripciones disminuidos de la β_2 -microglobulina y de TAP-1, TAP-2 y tapasina, unido a una menor expresión transcripcional de las tres moléculas H-2 de clase I, pueden explicar su menor expresión en superficie. Por último en el clon GR9-B11 los genes regulados negativamente fueron: calreticulina, LMP-2, TAP-1 y tapasina (Fig. 34a). De acuerdo con estos hallazgos, los fenotipos H-2 de clase I alterados que observados en los clones GR9-B7, C5 y B11 se deben principalmente a la regulación coordinada y negativa de algunos de los componentes de la APM.

En el sistema tumoral GR9-B9, nosotros hemos mostrado en este trabajo de investigación la implicación directa del gen supresor de tumores Fhit en la regulación transcripcional coordinada de los componentes de APM y las cadenas pesadas H-2 de clase I (Romero et al. 2012). Los niveles de transcripción de Fhit fueron significativamente menores en las células tumorales con menor expresión en superficie de moléculas MHC-I (Fig. 34b). Los resultado del ensayo mostraron que los niveles transcripcionales de Fhit en GR9-A7 (valor relativo de 1) fueron 1.4 veces

superiores a los encontrados en el clon GR9-B7 y alrededor de 3.6 y 3.2 veces superior al de los clones GR9-C5 y GR9-B11, respectivamente (Fig. 34b).

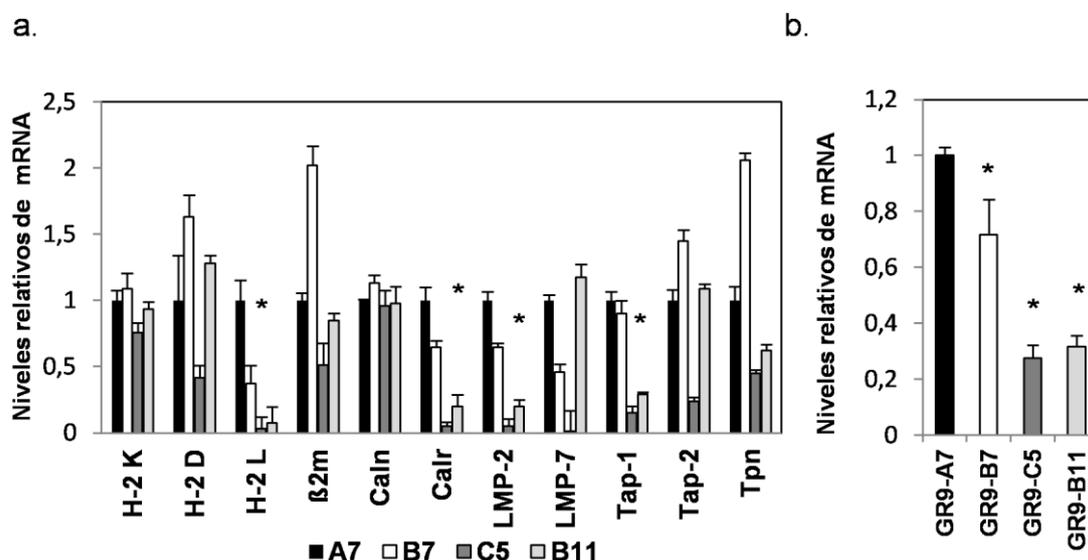


Figura 34. Niveles transcripcionales utilizando RT-PCR a tiempo real. a. Niveles transcripcionales de las cadenas pesadas de clase I, β 2m y varios componentes de la APM. b. Niveles transcripcionales del gen Fhit en las cuatro líneas tumorales de fibrosarcoma. La expresión de los genes de interés se determinaron utilizando β -actina y GADPH como genes control. A los niveles transcripcionales de GR9-A7 se les asignó el valor relativo de 1. Todos los datos se expresaron como la media \pm SD y son representativos de tres experimentos realizados por cuadruplicado; * $p < 0.01$.

2.3.- Relación entre el fenotipo MHC-I y la capacidad oncogénica local *in vivo*

Con el próximo ensayo hemos querido analizar si existe alguna relación entre la expresión en superficie de moléculas MHC de clase I y la capacidad oncogénica local *in vivo*. Para llevarlo a cabo, cada una de las líneas celulares se inyectaron a nivel subcutáneo en ratones singénicos BALB/c. Se utilizó una dosis de células baja (6.25×10^5 células/ratón), con el único propósito de evitar que el rápido crecimiento del tumor local pudiera enmascarar las posibles diferencias existentes entre ellos. El crecimiento de los tumores locales se controló en todos los animales midiendo el diámetro mayor

tres veces por semana. Todas las líneas celulares crecieron *in vivo* localmente y los tumores se extirparon cuando alcanzaron un diámetro de 10 mm, con el fin de evitar el sufrimiento innecesario de los animales. Los tumores locales de los ratones inyectados con las líneas GR9-C5 y B11 comenzaron a crecer en el día 8 y se retiraron el día 23 y 28 respectivamente (Fig. 35). Mientras que los tumores locales de las líneas GR9-A7 y B7, comenzaron a crecer más tarde, en los días 14 y 16 posteriores a la inyección, respectivamente, y se extirparon el día 39 (Fig. 35). El análisis de los resultados mostró que los tumores locales generados a partir de la inyección de clones con niveles de expresión superficial de las tres moléculas MHC-I, los clones GR9-A7 y B7, crecieron notablemente más lentamente que los tumores locales generados por clones con niveles de expresión MHC-I en superficie más bajos, clones GR9-C5 y B11.

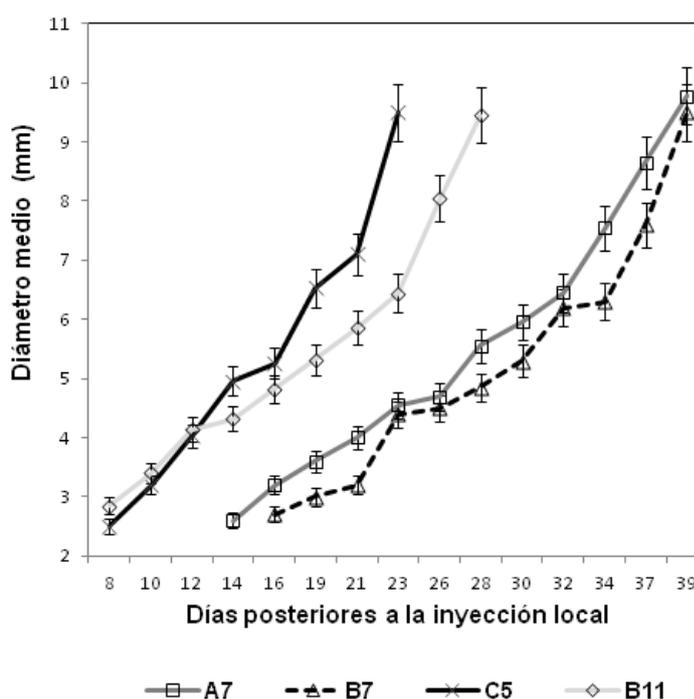


Figura 35. Líneas con diferente fenotipo MHC-I muestran diferencias en su oncogenicidad local. Los clones tumorales GR9-A7, B7, C5 y B11 fueron inyectados a nivel subcutáneo en la pata de ratones BALB/c a una dosis de 6.25×10^5 células. El diámetro del tumor se midió tres veces por semana y se extirparon cuando alcanzaron el tamaño de 10mm. Los tumores con expresión positiva de las moléculas H-2 de clase I, GR9-A7 y B7, crecieron más lentamente que las líneas celulares más negativa, GR9-C5 y B11. Los datos se representan como la media del diámetro del tumor \pm SD de 10 ratones. El ensayo se repitió un mínimo de tres veces.

2.4.- Relación entre el fenotipo MHC-I y la capacidad de producir metástasis espontáneas

Para determinar si existen o no diferencias en la capacidad metastásica *in vivo*, se realizaron ensayos de metástasis espontáneas en ratones singénicos BALB/c inmunocompetentes. Para estos ensayos se utilizaron cuatro dosis diferentes de células de cada uno de los clones (5×10^6 , 2.5×10^6 , 1.25×10^6 y 6.25×10^5 células/ratón). Al utilizar dosis diferentes queremos comprobar si la dosis influye en la capacidad metastásica de estos cuatro clones. En todos los grupos, con independencia de la dosis y el clon inyectado, los tumores crecieron a nivel local y se extirparon cuando el diámetro del tumor llegó a 10 mm. Tras extirpar los tumores locales, los ratones se monitorizaron semanalmente dejando progresar la enfermedad hasta la aparición de metástasis espontáneas. Los ratones fueron sacrificados cuando mostraron signos graves de enfermedad, las metástasis se contaron y se establecieron a cultivo celular. Los grupos de ratones inyectados con 5×10^6 células no llegaron a presentar signo alguno de enfermedad, sacrificándose al final de ensayo. La necropsia reveló que el 100% de estos ratones con independencia de la línea celular inyectada se encontraban libres de metástasis (Tabla 6). Este resultado podría explicarse como consecuencia del rápido crecimiento de los tumores locales (menos de doce días) al emplear una dosis tan alta de células tumorales. Otro resultado interesante es el obtenido con el clon celular GR9-B11 (H-2 clase I prácticamente negativo), esta línea celular no generó metástasis a ninguna de las cuatro dosis de células inyectadas, comportándose como el clon con menor capacidad metastásica (Tabla 6). Esta propiedad encontrada en este clon será estudiada detenidamente en profundidad más adelante. En contraste, las células GR9-A7 (H-2 positivo) mostraron una alta oncogenicidad generando metástasis a las dosis de 2.5×10^6 , 1.25×10^6 y 6.25×10^5 células, generando en los huéspedes linfo-nódulos (LNs; rango, 1-3) y metástasis pulmonares (PMs; rango, 1-52) (Tabla 6) (Fig. 36). GR9-B7 mostró una

oncogenicidad intermedia, la necropsia reveló la existencia únicamente de metástasis pulmonares (PM; rango, 1-6), en los huéspedes inyectados con 2.5×10^6 y 1.25×10^6 células (Tabla 6) (Fig. 36). GR9-C5 tiene una oncogenicidad muy reducida, únicamente cuatro del total de ratones inyectados con esta línea terminaron desarrollando metástasis pulmonares (PM; rango, 1-3) (Tabla 6) (Fig. 36).

Tabla 6. Ensayo de metástasis espontáneas con las cuatro líneas de fibrosarcoma

Línea celular	Dosis células	Nº de ratones	Ratones con metástasis	Nº de metástasis/ratón	
				*PMs	*LMNs
GR9-A7	5×10^6	10	0	0	0
GR9-B7		10	0	0	0
GR9-C5		10	0	0	0
GR9-B11		10	0	0	0
GR9-A7	2.5×10^6	10	8	1-5	0-1
GR9-B7		10	8	1-5	0
GR9-C5		10	2	2-3	0
GR9-B11		10	0	0	0
GR9-A7	1.25×10^6	10	10	1-52	2-3
GR9-B7		10	2	5-6	0
GR9-C5		10	2	3	0
GR9-B11		10	0	0	0
GR9-A7	6.25×10^5	10	7	1-7	0-1
GR9-B7		10	0	0	0
GR9-C5		10	0	0	0
GR9-B11		10	0	0	0

*PMs: metástasis pulmonares; *LNMs: linfo-nodulos metastásicos

En resumen, podemos concluir que la capacidad metastásica *in vivo* fue la siguiente: A7> B7> C5> B11 (Fig. 36). Los resultados de los ensayos *in vivo* señalan claramente que existe una relación directa entre los niveles de expresión en superficie de las moléculas MHC de clase I y la capacidad metastásica espontánea, y una relación inversa con la capacidad oncogénica local.

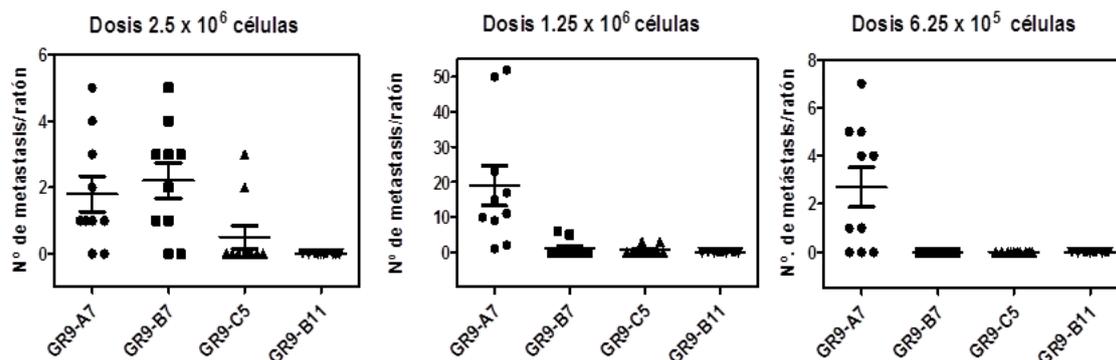


Figure 36. Ensayos de metástasis espontáneas con las líneas celulares de fibrosarcoma GR9-A7, B7, C5 y B11. Resultados para tres de las cuatro dosis inyectadas (2.5×10^6 , 1.25×10^6 y 6.25×10^5) a nivel subcutáneo en la pata de grupos de ratones BALB/c. GR9-B11 no generó metástasis a ninguna de las dosis seleccionadas. GR9-A7 mostró alta capacidad metastásica, GR9-B7 intermedia y GR9-C5 muy baja.

2.5.- Comparación de la capacidad de migrar e invadir *in vitro*

Con este ensayo queríamos comparar la capacidad migratoria e invasiva *in vitro* de estos clones utilizando cámaras de Boyden modificadas. El ensayo consiste en comparar la capacidad de invadir o migrar de las líneas celulares GR9-A7, B7, C5 y B11 desde la parte superior de la cámara hasta la inferior, empleando como quimio atrayente medio de cultivo suplementado con FBS. Una suspensión de 25.000 células en medio de cultivo (sin suero) se coloca en la parte superior de la cámara, 20 horas después las células que llegan a la membrana de la cámara inferior se cuentan. En el análisis de los resultados encontramos diferencias entre la capacidad de migración de los cuatro clones (Fig. 37a y c). Así, GR9-A7 (H-2 positivo) migró 21.3 veces más que GR9-B11 (H-2 prácticamente negativo), 6.2 veces más que GR9-C5 (H-2 bajo) y 1.75 veces más que las células GR9-B7 (H-2 intermedio). En el ensayo de invasión, los resultados fueron muy similares a los de migración, mostrando el clon GR9-A7 mayor capacidad de invasión y GR9-B11 la más baja (Fig. 37b y c). GR9-A7 invadió 12 veces más que GR9-B11, y 3.2 y 1.4 veces más que GR9-C5 y GR9-B7, respectivamente. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado y se repitieron al menos tres veces utilizando lotes de células diferentes de todos los clones. En resumen, la capacidad *in*

in vitro de migrar e invadir siguió el mismo orden que la capacidad metastásica espontánea *in vivo*, A7> B7> C5> B11, en el mismo sentido que decrece la expresión en superficie de moléculas H-2 de clase I.

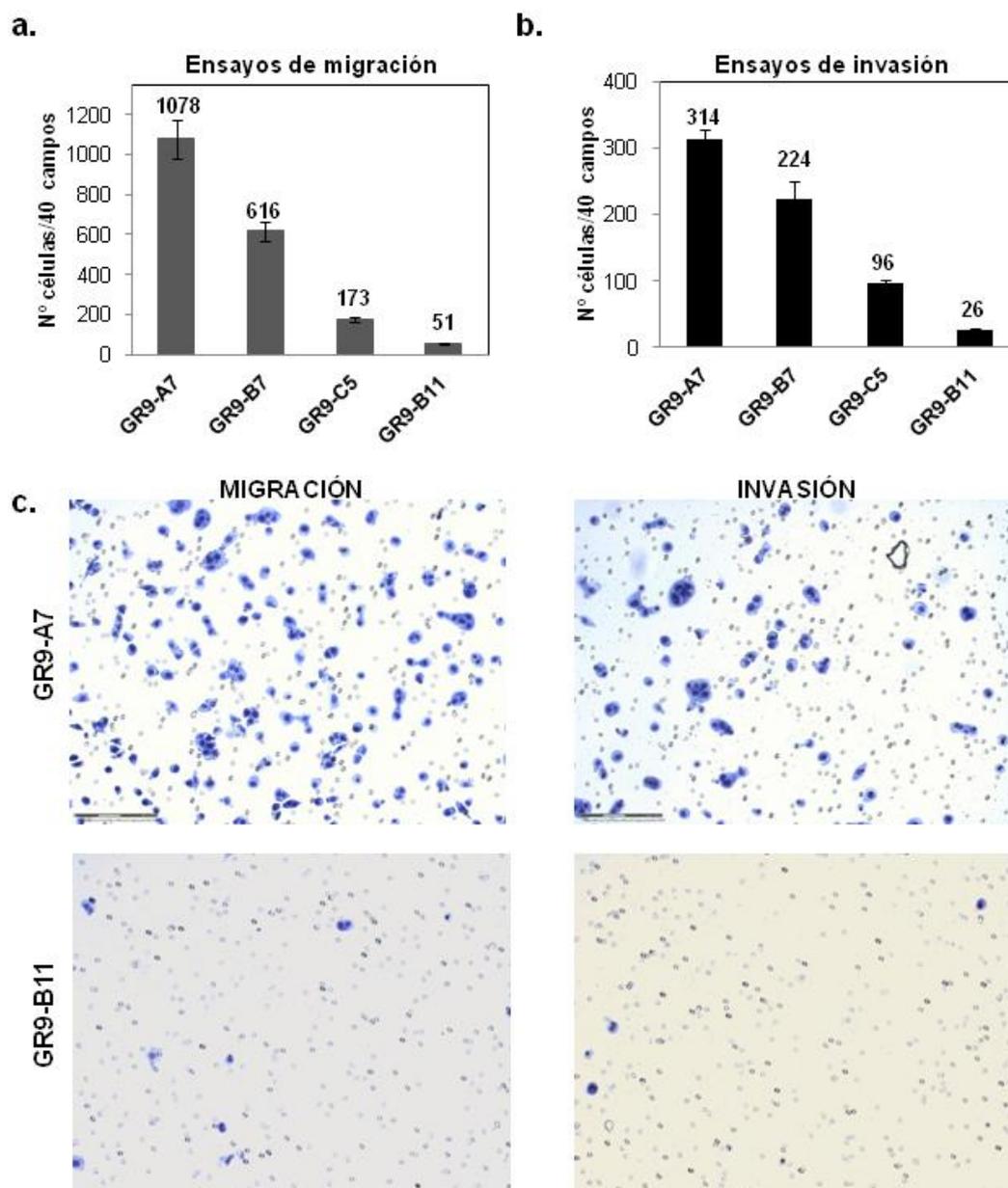


Figura 37. Comparación de la capacidad de migrar e invadir *in vitro* de líneas celulares con diferentes expresión de moléculas MHC-I. a. La habilidad de migrar se evaluó utilizando cámaras de Boyden modificadas tras 20h. **b.** Capacidad de invadir a través del colágeno (matrixgel) en cámara de Boyden tras 20h. **c.** Fotografías de campos representativos. Se representan la media \pm SD, se analizaron lotes de células diferentes y la figura es representativa de un total de tres experimentos realizados por duplicado.

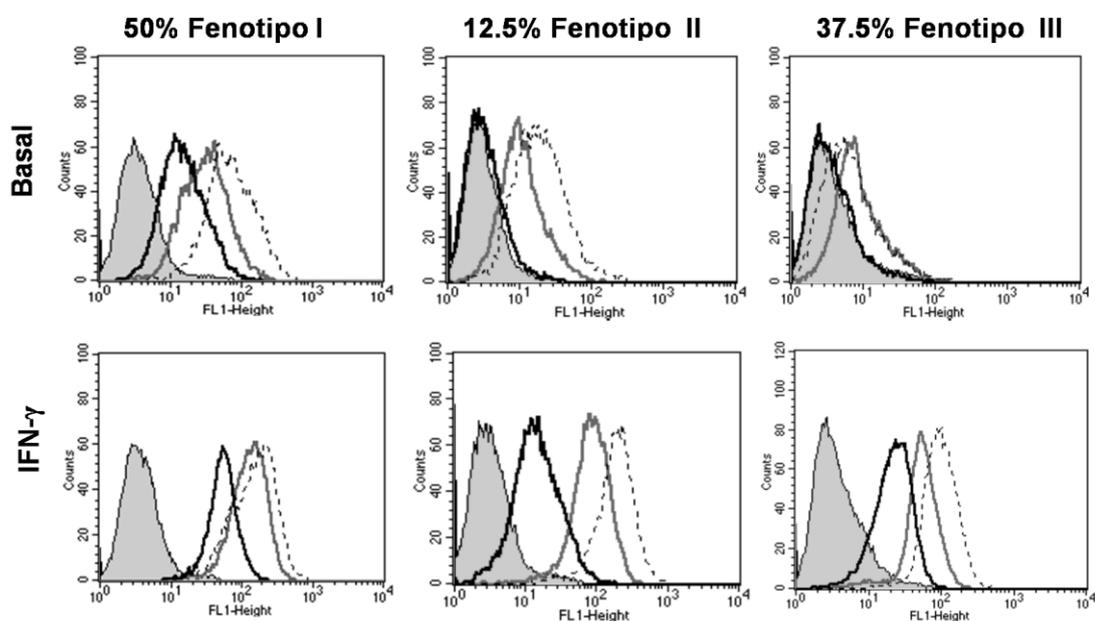
2.6.- Clasificación de las líneas metastásicas en diferentes fenotipos H-2 de clase I

La gran mayoría de las metástasis visibles macroscópicamente se establecieron a cultivo obteniendo nuevas líneas celulares, y se estudiaron los niveles de expresión en superficie de moléculas H-2 de clase I en condiciones basales y después del tratamiento con IFN- γ . Al analizar los resultados observamos que todas las metástasis obtenidas con la inyección GR9-A7 se podían clasificar en tres fenotipos diferentes, (Fig. 38a): **fenotipo I**, le corresponde a aquellas metástasis que presentaron niveles de expresión en superficie de las tres moléculas H-2 de clase I (K^d , D^d y L^d) similares al clon original GR9-A7, este fenotipo se observó en el 50% de las metástasis; **fenotipo II**, metástasis con expresión positiva de las tres moléculas, pero los niveles de expresión son menores que los encontrados en el clon original GR9-A7, este fenotipo representa el 12.5% de las metástasis; y por último el **fenotipo III**, apareció en el 37.5% de las metástasis, estas metástasis se caracterizan por mostrar una ausencia total de expresión de la molécula H-2 L^d , acompañada de una expresión baja de las moléculas H-2 K^d y D^d (Fig. 38a). En los fenotipos I, II y III se induce la expresión de las tres moléculas H-2 de clase I al tratar las líneas con IFN- γ ("soft lesions") (Fig. 38a).

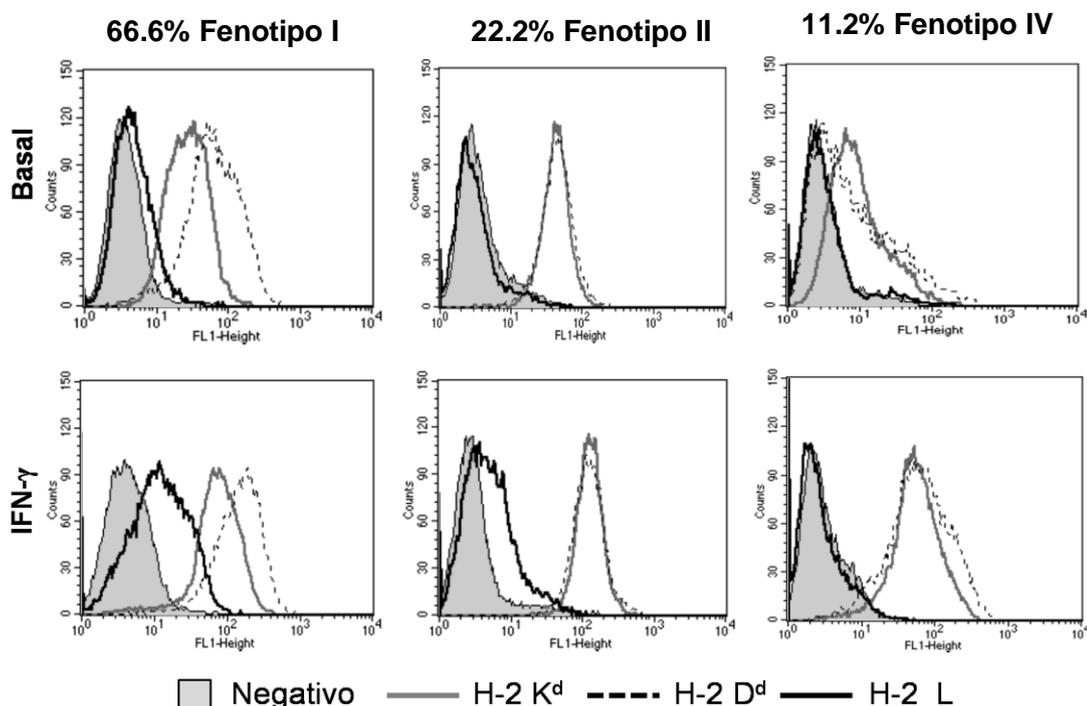
En las metástasis producidas por el clon GR9-B7, aparece un nuevo fenotipo: **fenotipo IV**, caracterizado por una baja expresión de las moléculas H2- K^d y D^d , acompañada de una pérdida total de expresión de la molécula H-2 L^d que no se recupera tras el tratamiento con IFN- γ ("hard lesion"). La distribución por fenotipos fue: 66.6% **fenotipo I**, 22.2% **fenotipo II**, 0% **fenotipo III** y por último, 11. 2% **fenotipo IV** (Fig. 38b).

Todas las metástasis generadas a partir del clon GR9-C5 mostraron expresiones similares al clon original.

a. Fenotipos MHC-I de las metástasis obtenidas de los grupos GR9-A7



b. Fenotipo MHC-I de las metástasis obtenidas de los grupos GR9-B7



█ Negativo — H-2 K^d - - - H-2 D^d — H-2 L

Figura 38. Expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I las metástasis espontáneas generadas por los clones GR9-A7 y GR9-B7. Se analizaron por citometría de flujo en condiciones basales y tras tratamiento con IFN- γ . Encontramos cuatro fenotipos MHC-I diferentes. a. Fenotipos MHC-I de las metástasis del grupo GR9-A7. b. Fenotipos MHC-I de las metástasis espontáneas del grupo GR9-B7. La figura muestra un experimento representativo de cada fenotipo.

Se analizaron para los cuatro clones y sus metástasis la expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase Ib no clásicas (moléculas Qa1 y Qa2) y H-2 de clase II (las moléculas I-A e I-E). Ninguno de los cuatro clones y las líneas metastásicas expresaron moléculas H-2 de clase Ib no clásicas, ni en basal, ni después del tratamiento con IFN- γ . Si encontramos diferencias entre los clones al estudiar la expresión en superficie de moléculas H-2 de clase II: GR9-A7 y el 100% de sus metástasis no expresan moléculas H-2 de clase II; GR9 B7 no expresa en superficie las moléculas H-2 de clase II en condiciones basales, pero si se induce su expresión tras el tratamiento con IFN- γ , resultados similares se repiten en el 33% de sus metástasis pulmonares; GR9-C5 y el 100% de sus metástasis expresan moléculas H-2 de clase II exclusivamente tras el tratamiento con IFN- γ ; y por último, GR9-B11 expresa en superficie moléculas H-2 de clase II muy débilmente tras el tratamiento con IFN- γ (Fig. 39).

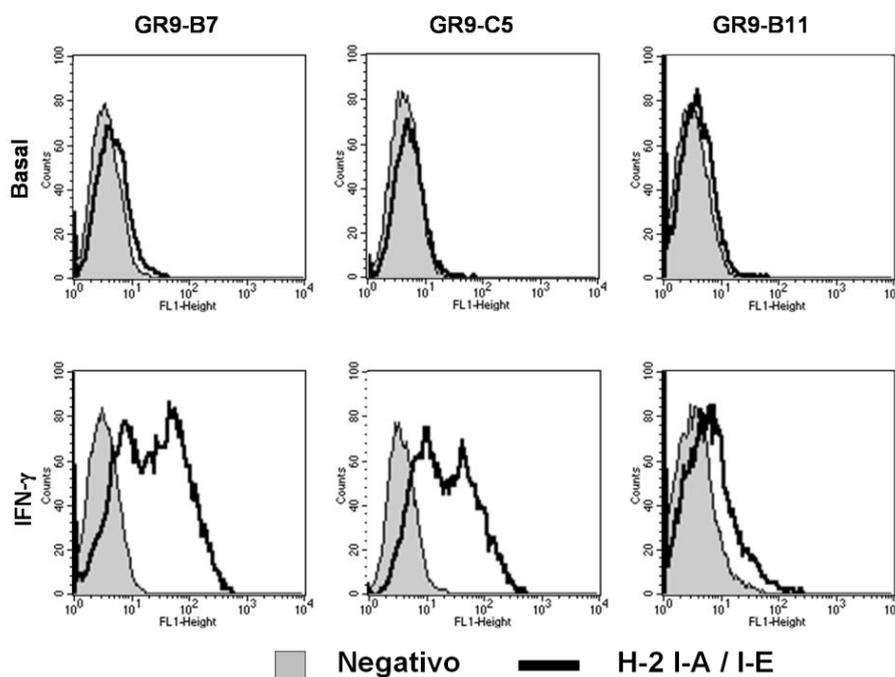


Figura 39. Expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase II (I-A/I-E) de los clones GR9-B7, C5 y B11. Se analizaron por citometría de flujo en condiciones basales y tras tratamiento con IFN- γ .

2.7.- Comparación de la capacidad para generar metástasis experimentales del clon GR9-A7 y GR9-B11

Los resultados obtenidos hasta ahora en ensayos *in vivo* nos permiten afirmar que en ensayos de metástasis espontáneas el nivel de expresión de moléculas MHC de clase I en este sistema tumoral está asociado directamente con la capacidad metastásica de los clones. También conocemos que la capacidad oncogénica local está asociada inversamente con la expresión en superficie de las moléculas MHC-I. Pero no conocemos hasta ahora cómo se comportan estos clones en ensayos de metástasis experimentales y si existe relación o no con la expresión en superficie de moléculas MHC-I. En este ensayo se utilizaron únicamente los clones con mayores diferencias en los niveles de expresión superficial de moléculas H-2 de clase I: el clon GR9-A7 (H-2 positivo, capacidad metastásica espontánea alta y poco oncogénico localmente) y GR9-B11 (H-2 prácticamente negativo, capacidad metastásica espontánea nula, y muy oncogénico localmente). En este tipo de ensayos una suspensión de 2.5×10^5 células/ratón se inyectó directamente en la vena de la cola del ratón, treinta días después se sacrificaron y se realizó la necropsia completa. Sorprendentemente, al realizar la necropsia de los huéspedes encontramos que el 100% de los ratones del grupo GR9-A7 se encontraban libres de metástasis, mientras que en el grupo de GR9-B11 solamente el 20% de los huéspedes permaneció libre de metástasis (Tabla 7). El 80% restante de los animales del grupo GR9-B11 desarrollaron metástasis pulmonares: un 40% desarrollaron ambas, macrometástasis (macro-PMs; rango 1-4) y micrometástasis (micro-PMs; rango, 2-6), y el otro 40% restante únicamente desarrollaron micrometástasis (micro-PMs; rango, 2-4).

Los resultados que encontramos en este ensayo son inversos a los obtenidos en los ensayos de metástasis espontáneas: el clon tumoral con expresión elevada de moléculas H-2 de clase I (GR9-A7) no tienen capacidad para generar metástasis experimentales; por el contrario, las células tumorales con muy baja expresión de

moléculas H-2 de clase I (GR9-B11) muestran una mayor capacidad para generar metástasis experimentales.

Tabla 7. Ensayos de metástasis experimentales con los clones GR9-A7 y GR9-B11

Línea celular	Dosis células	Nº de ratones	Ratones con metástasis	Nº de metástasis/ratón	
				*micro-PMs	*macro-PMs
GR9-A7	2.5×10^5	10	0	0	0
GR9-B11	2.5×10^5	10	8	2-6	1-4

*micro-PMs: micrometástasis pulmonares; *macro-PMs: macrometástasis pulmonares

3.- METÁSTASIS ESPONTÁNEAS PUEDEN SER COMPLETAMENTE CONTROLADAS EN UN ESTADO DE LATENCIA POR EL SISTEMA INMUNE

3.1.- Fenotipo H-2 de clase I del clon GR9-B11 y los tumores locales generados en ratones inmunocompetentes

La línea celular GR9-B11, como ya hemos descrito anteriormente, únicamente expresa en superficie muy débilmente la molécula H-2 K^d, aunque las tres moléculas H-2 K^d, D^d y L^d se inducen tras el tratamiento con IFN- γ (Fig. 40a). Además, en ensayos *in vivo* tiene una oncogenicidad local alta (Fig. 35) y por el contrario una capacidad metastásica nula en ensayos de metástasis espontáneas (Tabla 6). Los tumores locales obtenidos de la inyección de GR9-B11 a diferentes dosis (5×10^6 , 2.5×10^6 , 1.25×10^6 y 6.25×10^5 células/ratón) fueron adaptados a cultivo celular y se analizaron los niveles de expresión en superficie de las moléculas MHC-I en condiciones basales y tras tratamiento con IFN- γ . Al comparar los niveles de expresión MHC-I con los encontrados en la línea GR9-B11 original, se observaron diferencias (Fig. 40a y b). Todos los tumores en condiciones basales expresaron niveles más elevados de las moléculas H-2 K^d y D^d que el propio clon original, y en común con las células GR9-B11 se encontró únicamente que todos ellos continuaron siendo negativos para la molécula H-2 L^d (Fig. 40a y b). Al comparar sus expresiones tras el tratamiento con IFN- γ aparecen nuevas diferencias: todos los tumores locales estaban constituidos por dos poblaciones claramente diferenciadas por citometría de flujo (Fig. 40b). La primera población se caracterizó por una fuerte inducción (mayor que en GR9-B11) de los niveles de expresión de las tres moléculas H-2 K^d, D^d y L^d y la segunda población por una ausencia total de expresión de las moléculas H-2 L^d, lo que indica la aparición de una lesión estructural en el alelo H-2 L^d ("hard lesion") (Fig. 40b).

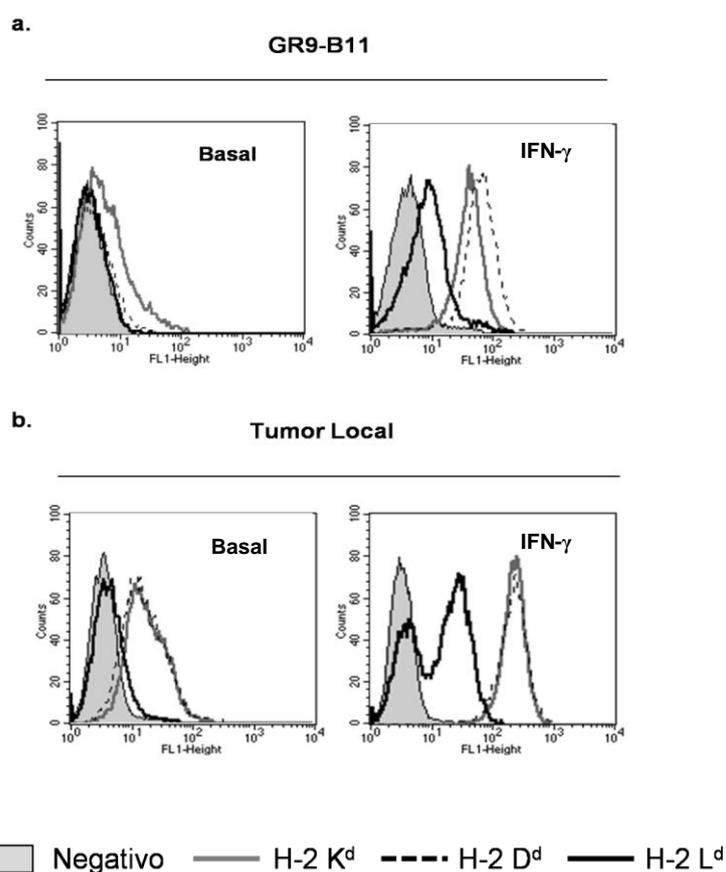


Figura 40. Expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I del clon GR9-B11 y su tumor local. **a.** Expresión de la línea celular GR9-B11 en condiciones basales y tras tratamiento con IFN- γ . **b.** Niveles de expresión del tumor local crecido tras la inyección del clon GR9-B11 a nivel de la pata. Todos los tumores locales exhibieron patrones de expresión similares tanto en condiciones basales como tras tratamiento con IFN- γ . Se muestra un experimento representativo.

3.2.- Ensayos de metástasis espontáneas en ratones BALB/c inmunodeficientes (nu/nu)

La ausencia de metástasis espontáneas en los ensayos realizados con el clon GR9-B11, nos hizo preguntarnos como se comportaría esta línea tumoral si el ensayo de metástasis espontáneas lo realizamos en ratones nude. En ratones nude el ensayo se realizó utilizando una dosis de células baja (6.25×10^5 células/ratón) para evitar un rápido crecimiento del tumor local en los ratones inmunodeficientes, como control la línea fue también inyectada a la misma dosis en ratos BALB/c inmunocompetentes.

Los ensayos se realizaron en grupos de diez ratones y siguiendo los protocolos descritos en material y métodos. El crecimiento local fue monitorizado tres veces por semana, detectando que el crecimiento local fue similar en ratones inmunodeficientes e inmunocompetentes, alcanzando los tumores un diámetro de 10mm en 32 días vs 29 días, respectivamente. Los tumores fueron extirpados cuando alcanzaron un diámetro de 10 mm y adaptados a cultivo celular. Al comparar la expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I en tumores locales de ratones nude con la expresión de los tumores generados en ratones inmunocompetentes observamos que no existían diferencias entre ellos. Los tumores generados en ratones inmunodeficientes presentaron una expresión positiva de las moléculas H-2 K^d y D^d y negativa para la molécula H-2 L^d y el tratamiento con IFN- γ vuelve a poner de manifiesto la existencia de dos poblaciones con fenotipos H-2 de clase I diferentes (Fig. 40b).

Los ratones fueron monitorizados semanalmente y cuando presentaron signos de enfermedad se sacrificaron, la necropsia reveló que el 80% de los ratones nude habían desarrollado metástasis pulmonares espontáneas en un rango de 3-26 metástasis/ratón (Tabla 8). Este mismo ensayo también se realizó a una dosis de células más elevada (1.25×10^6 células/ratón) y la necropsia final reveló nuevamente la existencia de metástasis espontáneas pulmonares, pero al aumentar la dosis el número de ratones que desarrollaron metástasis fue únicamente del 40% y desarrollaron una única metástasis pulmonar por ratón. El descenso en el número de metástasis puede explicarse como consecuencia del rápido crecimiento local de los tumores, que alcanzaron los 10mm en 16 días, un espacio de tiempo relativamente corto para una diseminación metastásica eficaz. En ambos ensayos se emplearon ratones inmunocompetentes como grupo control, la necropsia al final de los ensayos de los grupos control reveló que se encontraban libres de metástasis.

Tabla 8. Ensayo de metástasis espontáneas en ratones inmunocompetentes y nude BALB/c.

Grupos	Dosis células	Nº de ratones	Ratones con metástasis	Nº de metástasis/ratón	
				*micro-PMs	*macro-PMs
BALB/c	12.5 x 10 ⁵	10	0	0	0
nu/nu BALB/c	12.5 x 10 ⁵	10	4	0	1
BALB/c	6.25 x 10 ⁵	10	0	0	0
nu/nu BALB/c	6.25 x 10 ⁵	10	8	3-26	1-8

*micro-PMs: micrometástasis pulmonar; *macro-PMs: macrometástasis pulmonar

Todas las metástasis pulmonares macroscópicas generadas con ambas dosis en ratones nude fueron adaptadas a cultivo celular estableciendo nuevas líneas celulares metastásicas. Al analizar su expresión en superficie de moléculas H-2 de clase I encontramos que el 100% de las metástasis presentan un único fenotipo, que se caracterizó por expresar únicamente en condiciones basales las moléculas H2-K^d y D^d que son inducidas posteriormente tras tratamiento con IFN- γ (Fig. 41). Sin embargo, existe una ausencia total de expresión de moléculas H-2 L^d en condiciones basales y tras tratar las metástasis con IFN- γ .

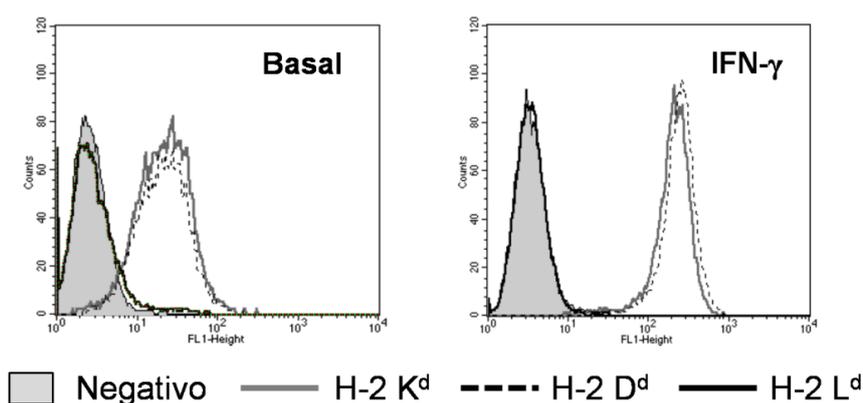
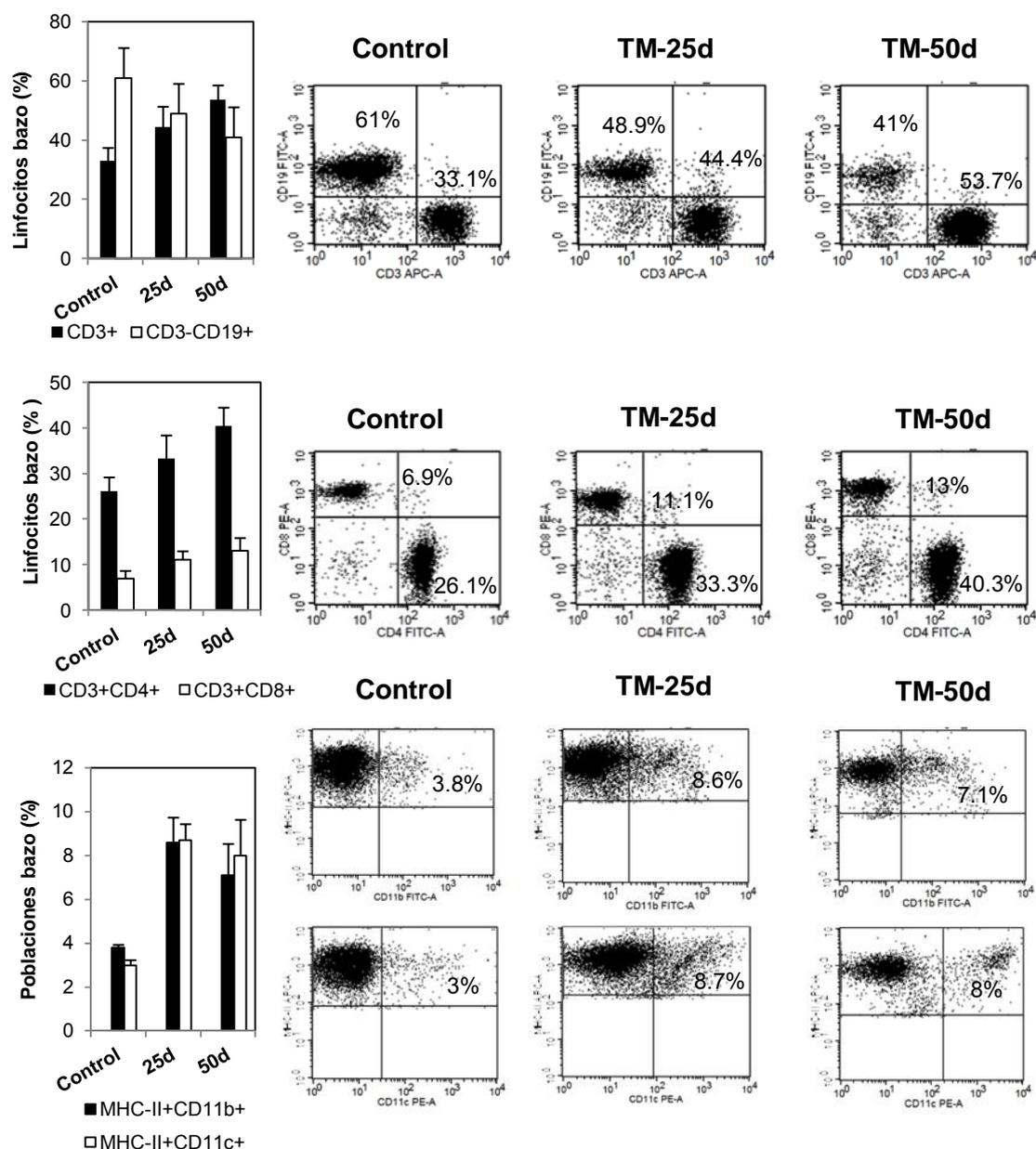


Figura 41. Ensayo de metástasis espontáneas en ratones nude. Expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I en las metástasis establecidas a cultivo. Todas las metástasis presentaron un único fenotipo en condiciones basales y tras tratamiento con IFN- γ . En la figura se muestra un experimento representativo.

Recordemos que en los tumores locales ya estaba presente esta población que finalmente ha terminado por colonizar los pulmones de los huéspedes inmunodeficientes (Fig. 40b). En resumen, la línea tumoral GR9-B11 no genera metástasis espontáneas en huéspedes inmunocompetentes, por el contrario, si es capaz de genera metástasis cuando los huéspedes son inmunodeficientes (nude). Además, el 100% de las metástasis han perdido la expresión del alelo H-2 L^d en superficie ("hard lesion"). Además, valoramos la inmunogenicidad de estas líneas celulares metastásicas generadas en los ratones nude. Para ello se seleccionó una línea metastásica y se inyectó localmente en grupos de cinco ratones inmunocompetentes a dos dosis diferentes (1.25×10^6 y 6.25×10^5 células/ratón). A la dosis más alta el 67% de los tumores fueron rechazados y a la dosis más baja el 40% de ellos.

3.3.- Estudio de la respuesta inmune

Los resultados obtenidos en los ensayos en ratones nude nos hizo plantearnos la siguiente hipótesis: ¿es posible que en huéspedes inmunocompetentes exista una respuesta inmune mediada por células T ejerciendo un control sobre las células derivadas del clon GR9-B11 diseminadas controlando la progresión metastásica? Para intentar dar respuesta a esta pregunta inicialmente nos centramos en estudiar la respuesta inmune a nivel sistémico 25 y 50 días (TM-25d y TM-50d) después de haber extirpado el tumor local (durante la progresión metastásica). Al analizar los cambios en las poblaciones de leucocitos en el bazo comprobamos que existen diferencias estadísticamente significativas en varias de las poblaciones inmunes cuando comparamos los huéspedes murinos inyectados (TM-25d y TM-50d) con los ratones no inyectados (grupo control) (Fig. 41).

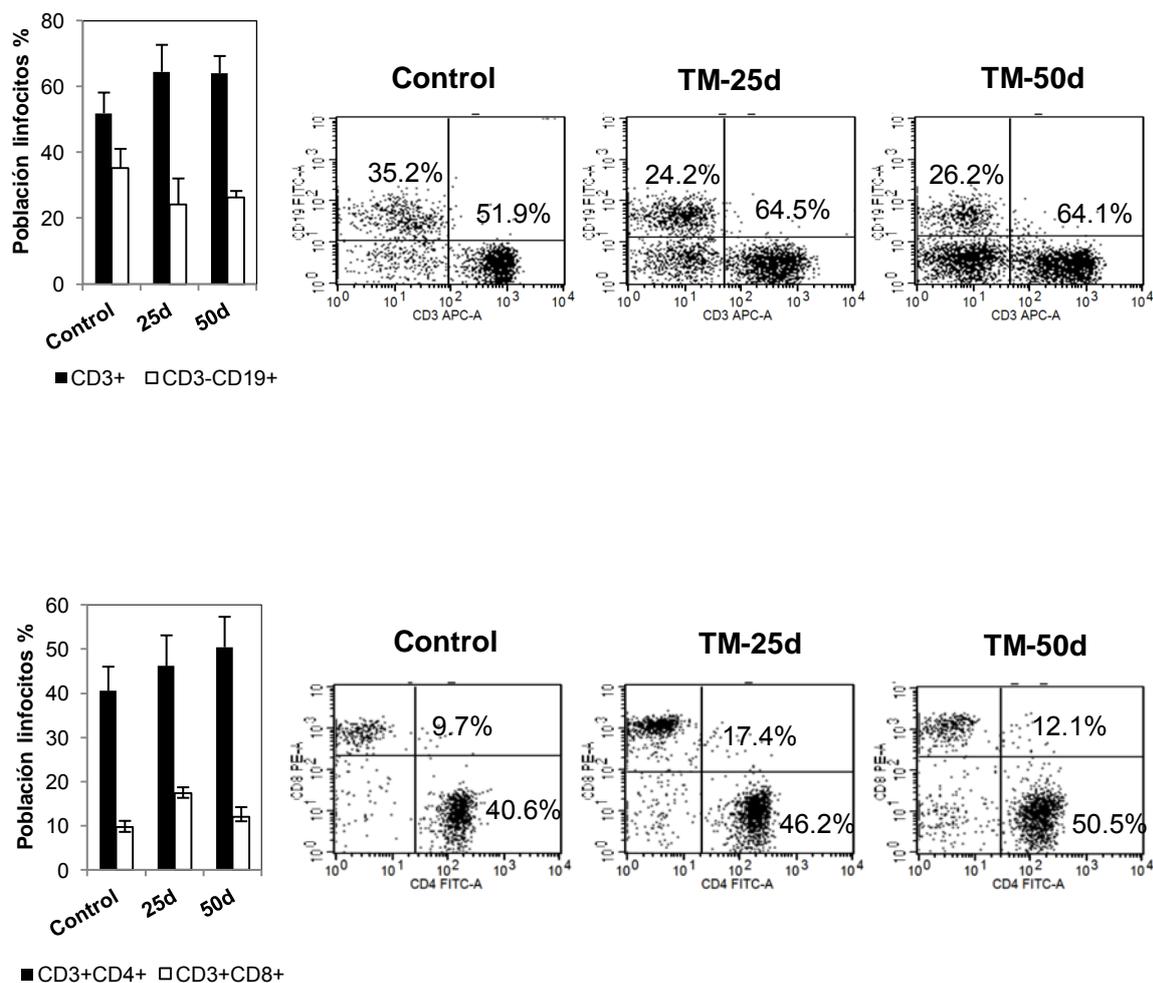


Grupo	*CD3 ⁺	*CD4 ⁺	*CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	*CD3 ⁻ CD19 ⁺	CD3 ⁻ CD49b ⁺	*CD3 ⁺ CD49b ⁺	*MHC-II ⁺ CD11b ⁺	*MHC-II ⁺ CD11c ⁺
Control	33,1 ± 4,3	26,1 ± 3,1	6,9 ± 1,8	4,4 ± 0,8	61,0 ± 4,2	4,6 ± 1,0	0,4 ± 0,3	3,8 ± 0,1	3,0 ± 0,2
TM-25	44,4 ± 6,8	33,3 ± 5,1	11,1 ± 1,9	4,3 ± 1,0	48,9 ± 6,8	5,4 ± 1,7	1,0 ± 0,2	8,6 ± 1,2	8,7 ± 0,7
TM-50	53,7 ± 5,5	40,4 ± 4,1	13,0 ± 2,9	3,6 ± 1,7	41,0 ± 4,7	3,7 ± 1,0	1,4 ± 0,6	7,1 ± 1,4	8,0 ± 1,6

Figura 41. Cambios en las poblaciones de leucocitos (linfocitos, macrófagos y células dendríticas (DC)). Comparamos las poblaciones leucocitarias en el bazo 25 y 50 días después de extirpar el tumor local con las encontradas en el grupo control. La figura representa un experimento representativo que refleja en cambio en la población de linfocitos B (CD3-CD19+) y T (CD3+CD4+ y CD3+CD8+), macrófagos (MHC-II+CD11b+) y DC (MHC-II+CD11c). Los datos se expresan en la tabla como la media ± SD de grupos de diez ratones. Todos los porcentajes son referidos al total de linfocitos excepto, los de la población de Treg (CD3+CD4+CD25+FoxP3+) que se refieren a la población de células T CD4+ y los macrófagos y DC que se refieren a la población de células MHC-II. *p < 0.05

En el análisis de las diferentes poblaciones inmunes detectamos un incremento significativo en la población de linfocitos CD3⁺ (44.4 y 53.7 vs 33.1%), tanto en la subpoblación de linfocitos CD3⁺CD4⁺ (36.3 y 40.4 vs 26.1%), como en la de linfocitos CD3⁺CD8⁺ (11.1 y 13.0 vs 6.9%); detectamos también un ligero incremento en las células NKT (1.0 y 1.4 vs 0.4%); el incremento en las poblaciones de DC y macrófagos también fue muy significativo (8.7 y 8.0 vs 3.0%) y (8.6 y 7.1 vs 3.6%) respectivamente (Fig. 41). Resultados muy similares fueron encontrados en sangre periférica.

Para completar el estudio de la respuesta inmune investigamos si se estaba desarrollando una respuesta inmune a nivel local en el tejido pulmonar, que pueda estar interviniendo en el control/eliminación de las posibles células tumorales diseminadas. Analizamos los cambios en las poblaciones de leucocitos en el infiltrado pulmonar de los huéspedes murinos 25 y 50 días (25d y 50d) después de extirpar el tumor local y comparamos los resultados con ratones no inyectados con las células tumorales. Nosotros nuevamente encontramos un incremento estadísticamente significativo en la población de linfocitos T CD3⁺ que entre los días 25 y 50 alcanzaron aproximadamente un 64%, mientras que en huéspedes no expuestos al tumor la cifra era del 51.9% (Fig. 42). Este incremento en linfocitos T es consecuencia de un incremento tanto en el porcentaje de linfocitos T helper (46.6 y 50.5 vs 40.6%), como de linfocitos T citotóxico (17.4 y 12.1 vs 9.7%) (Fig. 42). Además, hay que señalar que el día 25 el porcentaje de linfocitos T citotóxicos prácticamente se había duplicado. No se detectaron cambios significativos en los porcentajes de otras poblaciones inmunes como las Treg, NK y NKT en los días 25 y 50 posteriores a la extirpación del tumor (Fig. 42).



Grupos	*CD3+	*CD3+CD4+	*CD3+CD8+	CD3+CD4+ CD25+FoxP3+	*CD3- CD19+	CD3- CD49b+	CD3+ CD49b+
Control	51,9 ± 6,3	40,6 ± 5,5	9,7 ± 1,5	2,9 ± 0,7	35,2 ± 5,9	12,2 ± 0,9	1,8 ± 0,8
25 días	64,5 ± 8,2	46,2 ± 7,0	17,4 ± 1,4	3,3 ± 0,8	24,2 ± 7,9	11,1 ± 4,4	1,5 ± 1,0
50 días	64,1 ± 5,2	50,5 ± 6,9	12,1 ± 2,2	3,5 ± 0,6	26,2 ± 2,1	9,6 ± 4,0	1,6 ± 0,3

Figura 41. Cambios en las poblaciones de linfocitos en el infiltrado pulmonar. En los días 25 y 50 después de eliminar el tumor local fueron comparadas las poblaciones con las de ratones control. Un experimento representativo muestra los cambios en las poblaciones de linfocitos B (CD3-CD19+) y T (CD3+CD4+ y CD3+CD8+). Los datos se expresan como la media ± SD de grupos de diez ratones. Todos los porcentajes son referidos al total de linfocitos excepto las Treg (CD3+CD4+CD25+FoxP3+) que están referidas a la población TCD4+; **p* < 0.05 comparando ambos grupos con los ratones sanos.

3.4.- Estudio de la implicación de los linfocitos T y de las células NK en el control de las células diseminadas

Los ensayos realizados hasta este momento con el clon GR9-B11 confirman: que el clon GR9-B11 en ausencia de un sistema inmune completo es capaz de generar metástasis espontáneas; y segundo, el sistema inmune de los huéspedes murinos inyectados con el clon GR9-B11 es capaz de desarrollar en el tiempo una respuesta inmune, tanto a nivel sistémico como local y mediada principalmente por los linfocitos T. Analizando estos resultados pensamos que la respuesta inmune mediada por células T puede controlar las células diseminadas del tumor GR9-B11. Pero desconocíamos si las células diseminadas tumorales eran totalmente erradicadas o mantenidas controladas en estado de latencia. Con el siguiente ensayo pretendíamos confirmar si es posible que la inmunodepleción de estos huéspedes murinos pudiera provocar que estas metástasis despertaran. Para confirmar o descartar esta posibilidad realizamos un nuevo ensayo con la línea celular GR9-B11 que consistió en someter a los huéspedes murinos a inmunodepleción de células T varios meses después de la extirpación del tumor local (Fig. 22). Si realmente existen células diseminadas controladas por el sistema inmune en estado de latencia, con la depleción de los linfocitos que están ejerciendo el control metastásico y poniendo freno a la progresión de la enfermedad, las células metastásicas deben “despertar” y progresar.

Inicialmente, 1.25×10^6 células del clon GR9-B11 se inyectaron a nivel subcutáneo en la pata de siete grupos de ratones inmunocompetentes BALB/c. Entre el día 20-22 todos los tumores locales fueron extirpados en todos los ratones. Posteriormente, el día 151 (aproximadamente cuatro meses después de extirpar el tumor local) desde el inicio del ensayo uno de los dos grupos controles (grupo control 1) fue sacrificado para comprobar que los ratones permanecían libres de metástasis antes de iniciar los tratamientos de inmunodepleción (Tabla 9). El día 152, cuatro de los grupos

comenzaron a ser tratados semanalmente con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD4 + anti-CD8 o inmunoglobulinas control (lgs control), respectivamente (Fig. 22). Además, para evaluar el efecto de la depleción de células NK en la progresión metastásica, se decidió que a un quinto grupo se le administrara semanalmente el anticuerpo anti-asialo GM1. La administración de anticuerpos se mantuvo a lo largo de tres meses y el día 242 los cinco grupos tratados fueron sacrificados, la necropsia del grupo tratado con lgs control reveló una ausencia total de metástasis pulmonares, por el contrario, en todos los grupos inmunodeplecionados los huéspedes desarrollaron metástasis pulmonares, aunque existiendo diferencias entre ellos (Tabla 9). En los grupos de ratones deplecionados conjuntamente de células T CD4+ y T CD8+ o únicamente de linfocitos T CD8+, el 100% de los ratones desarrollaron micrometástasis pulmonares (Tabla 9). La depleción de células NK produjo resultados similares, el 80% de los huéspedes murinos desarrollaron micrometástasis y el 20% de ellos macrometástasis (Tabla 9). También se observaron diferencias entre los grupos al comparar el número de metástasis: el 100% de los ratones tratados con anti-CD4 + anti-CD8 desarrollaron micrometástasis en el rango de 4-62 colonias, frente al 50% de los huéspedes deplecionados únicamente de linfocitos T citotóxicos (anti-CD8) que desarrollaron >100 micrometástasis por ratón y finalmente sólo el 20% de los ratones deplecionados de células NK desarrollaron >100 micrometástasis por ratón. En contraste, el grupo tratado con anti-CD4 es el que presentó menor número de metástasis, sólo el 20% de los huéspedes desarrollaron micrometástasis (rango 1-2) y el 10% de los ratones desarrollaron macrometástasis (2 nódulos/ratón), respectivamente.

Tabla 9. Ensayos de metástasis espontáneas con el clon GR9-B11 inmunodeplecionados

Grupos	Nº de ratones	Ratones con metástasis	Nº de metástasis/ratón	
			*micro-PMs	*macro-PMs
Control	10	0	0	0
Igs Control	10	0	0	0
Anti-CD4+CD8	10	10	4-62	0
Anti-CD4	10	2	2	2
Anti-CD8	10	10	3- >100	0
Anti-Asialo GM1	10	8	2- >100	1

*micro-PMs: micrometástasis pulmonares; *macro-PMs: macrometástasis pulmonares

En resumen, en los grupos deplecionados de linfocitos T citotóxicos y células NK el porcentaje de ratones con metástasis y el número de metástasis pulmonares fue mayor, que en el grupo deplecionado de linfocitos T helper. Además, estos resultados confirman que las células diseminadas del tumor GR9-B11 permanecieron controladas en un estado de latencia, existiendo un estado de equilibrio entre las células tumorales y el sistema inmune. Además, la depleción de células T CD8+ o NK fue suficiente para que la mayoría de las células tumorales escaparan al control del sistema inmune y “despertaran”. Los ratones del grupo control (grupo control 2) permanecieron libres de metástasis al final de los ensayos, aproximadamente 18 meses después de la inyección de las células tumorales.

Después de la necropsia todas las macrometástasis pulmonares de los grupos deplecionados de células NK y linfocitos T CD4 se establecieron a cultivo como nuevas líneas celulares y se analizó sus niveles de expresión superficial de moléculas H-2 de clase I en condiciones basales y tras el tratamiento con IFN- γ . No se observaron diferencias significativas entre las diferentes líneas metastásicas. Todas las metástasis se caracterizan por una expresión positiva de las moléculas H-2 K^d y D^d

y la ausencia total de la molécula H-2 L^d en condiciones basales, después del tratamiento con IFN- γ las tres moléculas (H-2 K^d, D^d y L^d) fueron inducidas.

3.5.- Comportamiento del clon GR9-B11 en ensayos de metástasis experimentales en ratones BALB/c inmunocompetentes e inmunodeplecionados

Con los ensayos mostrados de la línea celular GR9-B11 hemos logrado mostrar que GR9-B11 no genera metástasis espontáneas en ratones inmunocompetentes, sin embargo, si es capaz de generar metástasis experimentales en huéspedes inmunocompetentes (Tabla 7). Nosotros hemos querido comprobar si los linfocitos T también intervienen en el control de las metástasis experimentales, para ello diseñamos un nuevo ensayo que consistió en la realización de ensayos de metástasis experimentales en huéspedes murinos deplecionados de células T (Fig. 23). La depleción de linfocitos T se consiguió por administración i.p de los anticuerpos anti-CD4 + anti-CD8, iniciando el tratamiento en los días -3 y -1 previos a la inyección de las células GR9-B11 en la vena de la cola y manteniéndose durante cuatro semanas mediante la administración de dos dosis de AcMo semanales (Fig. 23). Después de 30 días, el 100% de los huéspedes inmunodeplecionados desarrollaron metástasis experimentales frente al 80% de los huéspedes murinos inmunocompetentes. Además hay diferencias en el número de metástasis experimentales entre los dos grupos: los ratones inmunocompetentes desarrollaron entre 1-4 macrometástasis y 2-6 micrometástasis (Tabla 10); en cambio, en el grupo deplecionado la necropsia reveló el doble de macrometástasis entre 2-9 y entre 7->100 micrometástasis (Tabla 10). En resumen, la depleción de los linfocitos T promueve una mayor capacidad metastásica experimental del clon GR9-B11.

Tabla 10. Ensayos de metástasis experimentales con el clon GR9-B11 en ratones inmunodeplecionados

Grupos	Dosis células	Nº de ratones	Ratones con metástasis	Nº de metástasis/ratón	
				*micro-PMs	*macro-PMs
Control	2.5 x 10 ⁵	10	8	2-6	1-4
Igs control	2.5 x 10 ⁵	10	7	1-7	2-3
Anti-CD4+CD8	2.5 x 10 ⁵	10	10	7- >100	2-9

*micro-PMs: micrometástasis pulmonares; *macro-PMs: macrometástasis pulmonares

3.6.- Fenotipos H-2 de las metástasis experimentales obtenidas con el clon GR9-B11

Todas las metástasis pulmonares experimentales visibles macroscópicamente fueron establecidas a cultivo celular y se analizó la expresión en superficie de las tres moléculas H-2 de clase I en condiciones basales y tras el tratamiento con IFN- γ . No se observaron diferencias entre las metástasis procedentes de ratones inmunocompetentes o inmunodeplecionados. Todas las metástasis fueron clasificados en tres fenotipos diferentes (Fig. 42): **fenotipo I** (20,6%), metástasis con expresión positiva para las tres moléculas H-2 de clase I en condiciones basales y todas se inducen tras el tratamiento con IFN- γ ; **fenotipo II** (29,4%) metástasis que sólo expresa las moléculas H-2 K^d y D^d en condiciones basales y después del tratamiento con IFN- γ se inducen las tres moléculas (H-2 K^d, D^d y L^d) (“soft lesion”); **fenotipo IV** (50%): caracterizado por la ausencia total de expresión de la molécula H-2 L^d en condiciones basales y después del tratamiento con IFN- γ (“hard lesion”) (Fig. 42). Este último fenotipo mayoritario, es el mismo que encontramos en todas las metástasis espontáneas generadas en ratones nude (Fig. 39).

Fenotipo MHC- I de las metástasis experimentales del grupo GR9-B11

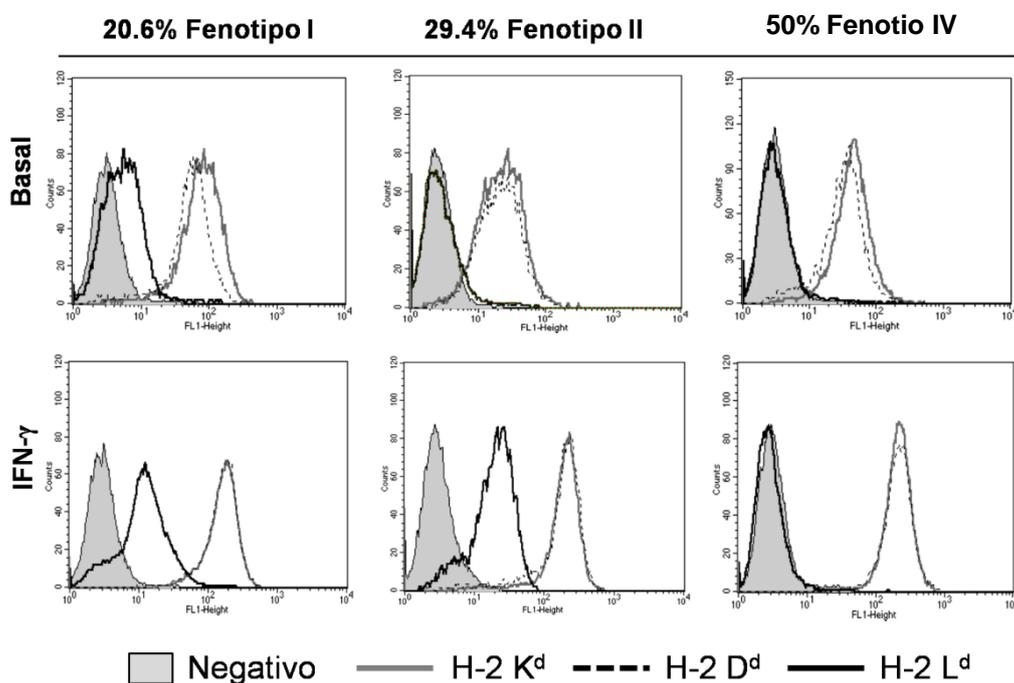


Figura 42. Expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I de las metástasis experimentales en condiciones basales y después de tratamiento con IFN- γ . a. Se clasifican en tres fenotipos diferentes, el fenotipo III fue el mayoritario. La figura muestra un ejemplo representativo.

3.7.- La pérdida de expresión de la molécula H-2 L^d ocurre a nivel transcripcional

Para analizar el mecanismo responsable de la pérdida total de expresión del alelo H-2 L^d en las metástasis experimentales con fenotipo IV, nos propusimos estudiar los niveles transcripcionales de las tres cadenas pesadas H-2 K^d, D^d y L^d de clase I a través de RT-PCR cuantitativa a tiempo real, los cebadores utilizados y el tamaño de la secuencia amplificada están especificados en la Tabla 2. Como control utilizamos una línea tumoral con expresión H-2 de clase I muy positiva (valor relativo de 1) y los resultados se normalizaron utilizando los genes GAPDH y β -actina. Se analizaron un total de tres metástasis una con fenotipo I (PM3) y dos con fenotipo IV (PM1 y PM2),

además del clon original GR9-B11 (Fig. 43). En la figura 42b, los resultados muestran que existe una ausencia total de transcripción de la cadena pesada H-2 L^d en las líneas metastásicas con fenotipo IV (PM1 y PM2).

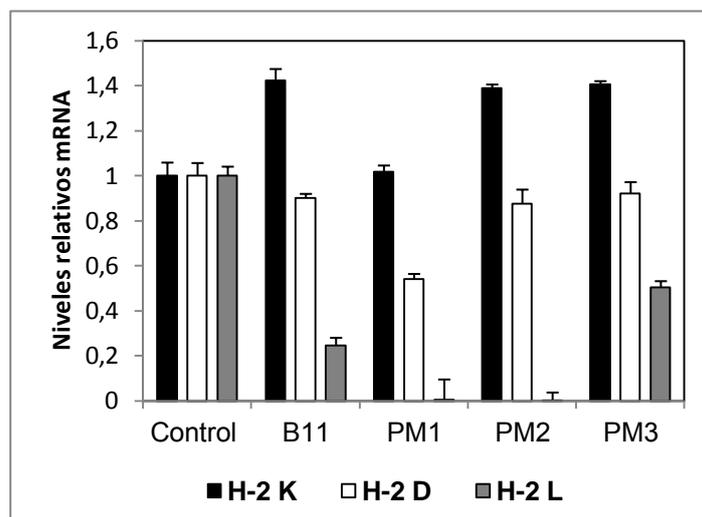


Figura 43. Niveles de transcripción de las cadenas pesadas H-2 K^d, D^d y L^d detectados por RT-PCR a tiempo real. Los análisis se realizaron utilizando los genes GADPH y β -actina como control. A una línea de fibrosarcoma H-2 muy positiva (control) se le asignó el valor relativo de 1. Los valores se representan como la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

DISCUSIÓN

Las alteraciones en la expresión de las moléculas del MHC-I es un mecanismo muy frecuente desarrollado por las células tumorales para escapar de la respuesta inmune antitumoral (Garrido et al. 2010b). La pérdida de estas moléculas puede convertir a la célula en invisible para el sistema inmune, entrando la célula en una fase que nuestro grupo previamente hemos denominado como “Immunobindness” (Immunoceguera) (Garrido et al. 2010a). Esta etapa sucedería a las tres Es de la teoría de la Inmunoedición (Dunn et al. 2004b), donde la célula una vez que ha escapado no es detectada por el sistema inmune y progresa, invade y metastatiza. Las pérdidas de expresión de moléculas del MHC-I que permiten a las células tumorales entrar en esta cuarta etapa, pueden ser de diferente grado, desde una pérdida alélica hasta una pérdida completa de expresión. Siete diferentes fenotipos MHC-I alterados han sido previamente descritos en células cancerosas humanas (García-Lora et al. 2003a). En el caso de pérdida de expresión en superficie completa de todos los alelos, los mecanismos moleculares implicados pueden ser mutaciones o deleciones de la β_2 -microglobulina (Chang et al. 2005a; Hicklin et al. 1998; Paschen et al. 2003), o una baja regulación coordinada de los componentes de la APM, acompañada o no por una baja regulación coordinada de las cadenas pesadas MHC-I. Esta baja regulación coordinada ha sido encontrada en cánceres humanos y murinos de diferente histología (García-Lora et al. 2003b; Murray et al. 1998; Restifo et al. 1993; Romero et al. 2005; Seliger et al. 2003; Seliger et al. 2000a).

El mecanismo molecular que implica esta bajada coordinada de expresión transcripcional no era conocido previamente. Nosotros hemos encontrado, en nuestro modelo tumoral murino GR9-B9, que tanto el clon tumoral original como las metástasis generadas en ratones inmunocompetentes presentan una pérdida completa de la expresión de las moléculas MHC-I, debida a una baja regulación transcripcional coordinada de varios componentes de la APM y de las cadenas pesadas MHC-I. Por el

contrario, las metástasis obtenidas en ratones BALB/c nude a partir del mismo clon tumoral, muestran expresión en superficie de las tres moléculas (H-2 K^d, D^d y L^d), recuperando una alta expresión transcripcional de los componentes de la APM y de las cadenas pesadas MHC-I (Romero et al. 2012). Comparando la expresión de las células metastásicas MHC-I positivas y negativas mediante librerías de substracción de cDNA y microarrays de cDNA, pudimos encontrar a 4 genes que podrían estar implicados. Estos 4 genes presentaban en su expresión transcripcional una relación directa con la expresión transcripcional de la APM y de las cadenas pesadas, y también con la expresión en superficie del MHC-I. La realización de RT-PCR cuantitativa mostró que únicamente dos de estos genes estaban diferencialmente expresados significativamente, el gen Fhit y el gen AP-2 α , ambos genes supresores de tumores. Posteriormente, se realizaron ensayos de bloqueo de la expresión de estos dos genes mediante siRNA en las células MN4.5, que son MHC-I positivas, y los resultados mostraron que el bloqueo del gen AP-2 α no modificaba la expresión transcripcional de la APM ni de las cadenas pesadas MHC-I, ni la expresión en superficie de las moléculas MHC-I (Romero et al. 2012). Cuando estos ensayos fueron realizados para el bloqueo de la expresión de Fhit, los resultados mostraron una bajada de expresión transcripcional de varios genes de la APM y de las cadenas pesadas del MHC-I, que fue acompañada por una reducción de la expresión en superficie de las tres moléculas H-2 K^d, D^d y L^d. Utilizando otras dos líneas celulares tumorales de diferente histología que presentan expresión positiva del MHC-I, CT26 y 4T1, nosotros obtuvimos los mismos resultados. La transfección transitoria y estable de las células MHC-I negativas, GR9-B9 y MP5, con el gen Fhit confirmó estos resultados y estas células recuperaron la expresión de la APM y de las cadenas pesadas y la expresión de las moléculas del MHC-I en superficie (Romero et al. 2012). La molécula H-2 L^d presentó un incremento muy fuerte de su expresión en superficie, pudiendo indicar que esta molécula puede presentar antígenos tumorales que pueden

producir una fuerte respuesta inmune. Su pérdida en las células cancerosas MHC-I negativas podría promover su escape del sistema inmune. En este contexto, nuestro grupo previamente ha mostrado que la pérdida estructural del gen H-2 L^d es un fenómeno muy frecuente durante el desarrollo metastásico del clon GR9-B9 en ratones inmunocompetentes (García-Lora et al. 2001). Todos estos resultados confirman que el gen supresor de tumores Fhit está implicado directamente en la regulación transcripcional de los genes de la APM y de las cadenas pesadas MHC-I y por tanto en la expresión en superficie de las moléculas MHC-I.

El gen Fhit está localizado en un sitio frágil activo, 3p14.2 en humanos y 14-5.61 en ratones, y mantiene una homología entre las dos especies de casi un 90 % (Ohta et al. 1996). Este gen ha sido identificado como un gen supresor de tumores muy importante en cáncer (Pichiorri et al. 2008; Sozzi et al. 1998), encontrándose normalmente alterado en una etapa temprana de la progresión tumoral principalmente en tumores inducidos por agentes carcinogénicos (Baffa et al. 2000; Campiglio et al. 1999). Fhit es uno de los genes que se encuentra más frecuentemente alterados en lesiones precancerosas y cancerosas humanas, ocurriendo pérdida de heterocigosidad, deleciones homocigotas, translocaciones y metilación o hipoacetilación (Fong et al. 1997; Jiang et al. 2009). En nuestro modelo tumoral murino, las líneas celulares tumorales ó metastásicas MHC-I negativas al ser tratadas con el inhibidor de la histona deacetilasa TSA, recuperaron la expresión de Fhit y la expresión en superficie de las moléculas MHC-I, mostrando que en este caso el mecanismo implicado era la hipoacetilación (Romero et al. 2012). La pérdida o la reducción de expresión de Fhit ha sido asociada con un fenotipo invasivo y más agresivo (Jayachandran et al. 2007; Joannes et al. 2010; Mimori et al. 2006); mientras que su sobre-expresión mediante transfección génica puede provocar la inhibición del crecimiento tumoral, induciendo apoptosis dependiente de caspasas e inhibición de la proliferación celular (Ji et al.

1999; Roz et al. 2002). Ratones deficientes para Fhit son más susceptibles al desarrollo de cánceres que ratones salvajes (Dumon et al. 2001; Zanesi et al. 2001), y terapia génica con Fhit en estos ratones puede impedir o revertir tumores inducidos con carcinógenos (Ishii et al. 2001). A pesar de todos estos resultados, la ruta molecular precisa de la función supresora de tumores de Fhit no ha sido elucidada completamente, aunque si se conoce que es independiente de su conocida actividad ATP hidrolasa (Ap_3A) (Campiglio et al. 2006). Nuestros hallazgos descubren una nueva actividad supresora de tumores para Fhit, mostrando que este gen puede mantener la expresión en superficie de las moléculas MHC-I en células tumorales y por tanto facilitar su reconocimiento por el sistema inmune. En consecuencia, la pérdida de expresión de Fhit puede también promover la evasión de las células tumorales de la inmunovigilancia.

También hemos encontrado en nuestro sistema tumoral una correlación entre la expresión del gen supresor de tumores AP-2 α y la expresión en superficie de las moléculas MHC-I. Sin embargo, el silenciamiento de este gen mediante siRNA no modificó la expresión transcripcional de la APM o de las cadenas pesadas MHC-I o la expresión en superficie de las moléculas MHC-I. En estos ensayos de siRNA solamente el silenciamiento de Fhit provocó la alteración en la expresión de la APM o de las moléculas MHC-I. Previamente nuestro grupo de investigación ha desarrollado un modelo de melanoma humano denominado Ando-2, que está compuesto de tres líneas celulares de melanoma derivadas desde la misma línea celular de melanoma, las cuales difieren en su expresión en superficie de moléculas MHC-I (Garrido et al. 2012). En este modelo de melanoma, la expresión transcripcional y en superficie del MHC-I también correlaciona directamente con la expresión de Fhit y AP-2 α , pero la transfección del alelo HLA-A2 en una línea celular de melanoma que había perdido su expresión, provocó el incremento de la expresión transcripcional de AP-2 α . Estos

resultados y los obtenidos por nosotros en el presente trabajo indican que la expresión de las moléculas MHC-I pueden estar implicadas en la regulación de la expresión de AP-2 α pero no al contrario. Por tanto, nosotros proponemos que Fhit puede regular la expresión de AP-2 α a través de la regulación de la expresión de las moléculas MHC-I. Además, Fhit ha sido implicado en la expresión de p21WAF1/CIP1 (Sard et al. 1999), y nosotros hemos encontrado que el silenciamiento de Fhit en las células metastásicas MN4.5 produjo una bajada de un 45% en la expresión transcripcional de p21WAF1/CIP1 (observaciones no publicadas). En este sentido, AP-2 α ha sido también implicado en la regulación de la expresión de p21WAF1/CIP1 (Wajapeyee and Somasundaram 2003; Zeng et al. 1997). Todos estos resultados indican que p21WAF1/CIP1 puede ser otro eslabón de la cadena. Debemos resaltar que MHC-I, AP-2 α y p21WAF1/CIP1 se encuentran los tres localizados en el mismo cromosoma en humanos, cromosoma 6. Resumiendo, una disminución en la expresión de Fhit puede reducir la expresión de las moléculas MHC-I y consecuentemente puede producir un descenso en la expresión de los genes supresores de tumores AP-2 α y p21WAF1/CIP1.

Ha sido propuesto que la sobre-expresión del oncogen HER-2/neu puede producir una bajada de la APM y de la expresión en superficie de las moléculas MHC-I (Herrmann et al. 2004; Lollini et al. 1998; Maruyama et al. 2010; Mimura et al. 2011). *Bianchi & cols* han mostrado, en líneas celulares tumorales de ovario y mama que sobreexpresan el receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) y HER2, que los niveles proteicos de Fhit pueden ser regulados mediante degradación proteosómica mediada por la activación dependiente de EGF de miembros de la familia EGFR (Bianchi et al. 2006; Bianchi et al. 2007). La degradación proteosómica de la proteína Fhit ocurrió después de la fosforilación mediada por Src en tirosina 114 (Pekarsky et al. 2004). Src es una molécula que se encuentran en la ruta de transducción de señales de varios

receptores activados, incluyendo la familia EGFR (EGFR, HER2, HER3 y HER4), la cual promueve su activación durante la proliferación de las células cancerosas. Estos datos demuestran una regulación cruzada entre los miembros de la familia EGFR y la molécula Fhit, sugiriendo que la sobre-expresión de HER2 puede provocar una baja regulación de la expresión en superficie de las moléculas MHC-I a través de la degradación de la proteína Fhit. Nosotros proponemos el siguiente esquema secuencial: HER2 → Fhit → MHC-I → AP-2α → p21WAF1/CIP1.

Caracterización de los mecanismos implicados en la expresión de componentes de la APM y de las moléculas MHC-I es de importancia crucial en células normales y alteradas. Nuestros resultados muestran que Fhit está implicado en la regulación de la expresión en superficie de las moléculas MHC-I en células tumorales. Este estudio revela una nueva y desconocida propiedad de Fhit en relación con su actividad como gen supresor de tumores y de la invasión. La pérdida de la expresión de Fhit puede resultar en una doble ventaja para las células tumorales: ausencia de la actividad supresora de tumores e invisibilidad frente al sistema inmune. Estos resultados abren una nueva línea de investigación para el desarrollo de tratamientos inmunoterapéuticos basadas en la recuperación de la expresión de Fhit para restaurar la expresión de las moléculas MHC-I en células cancerosas deficientes en su expresión y por tanto transformar su antigenicidad e inmunogenicidad. Por otro lado, el bloqueo parcial de la expresión de Fhit puede ser beneficioso en algunas enfermedades autoinmunes y en trasplante de órganos.

Este mismo año ha sido claramente puesto de manifiesto la heterogeneidad intratumoral genética que pueden presentar los tumores. *Gerlinger & cols* han mostrado que el análisis de nueve biopsias de diferentes localizaciones de un tumor de riñón de un paciente, reveló que existían importantes diferencias genéticas en los genes alterados (Gerlinger et al. 2012). Los mismos resultados fueron encontrados en

otros tres pacientes analizados también con cáncer renal, y en todos los pacientes estas diferencias tenían importantes implicaciones en la respuesta a diferentes terapias antitumorales. Este último hecho ha sido brillantemente expuesto por *Turner & Reis-Filho*, remarcando los efectos que la heterogeneidad intratumoral puede tener sobre el efecto de las terapias antitumorales aplicadas (Turner and Reis-Filho 2012). En otro estudio realizado en cuatro pacientes de cáncer de próstata, también fue encontrada una alta heterogeneidad genética intratumoral, presentando evidencias de la presencia de tumores somáticamente independientes en la próstata de un mismo paciente (Lindberg et al. 2012). Nuestros resultados añaden nuevos datos, el modelo tumoral GR9 muestra una heterogeneidad en los clones del tumor primario con respecto a su expresión en superficie de moléculas MHC-I. Se han encontrado desde células altamente positivas hasta células completamente negativas. Además, se ha determinado que en nuestro modelo experimental existe claramente una relación entre la expresión en superficie de las moléculas MHC-I en las células que originan el tumor primario y su capacidad oncogénica local y metastásica. Esta relación es totalmente opuesta entre la capacidad oncogénica local y la capacidad de generar metástasis espontáneas: células con más baja expresión de moléculas MHC-I presentan una mayor capacidad oncogénica local y una menor capacidad metastásica espontánea; y viceversa, células con una mayor expresión de moléculas MHC-I presentan una menor capacidad oncogénica local y por el contrario una mayor capacidad metastásica. En los ensayos de oncogenicidad local, se inyectan un alto número de células tumorales y el tumor local crece rápidamente. Las diferencias en crecimiento local entre los diferentes clones se producen al principio, los clones más negativos para la expresión de moléculas MHC-I empiezan a crecer sus tumores locales a los 8 días, mientras que en los clones MHC-I mas positivos comienzan a crecer a los 14 días. Este hecho nos hace pensar que esta diferencia es debida a características intrínsecas de las células tumorales y no, en principio, a una intervención del sistema inmune. La explicación

que nosotros podemos proponer para el comportamiento oncogénico local, se basa en unos resultados publicados por nuestro grupo recientemente, donde hemos encontrado que las moléculas MHC-I pueden desempeñar una actividad directa como genes supresores de tumores (Garrido et al 2012). En ese trabajo mostramos que en el modelo de melanoma humano Ando-2, mencionado anteriormente, existe una relación inversa entre la expresión de moléculas MHC-I y la capacidad oncogénica local, siendo la línea celular más oncogénica aquella que presenta ausencia completa de expresión en superficie de moléculas MHC-I. De acuerdo con estos resultados, en nuestro modelo tumoral GR9, las líneas más oncogénicas localmente deberían ser las de menor expresión de moléculas MHC-I, y efectivamente es lo que ocurre, los dos clones más negativos para la expresión de MHC-I son los de mayor oncogenicidad local. Además, no podemos descartar completamente que el sistema inmune pueda desempeñar un papel impidiendo el crecimiento local de las células MHC-I positivas. Ensayos previos de nuestro grupo mostraron que la línea celular MN1.1 y MN1.5 (MHC-I positivas) no crecieron en ratones inmunocompetentes y si crecieron en ratones nude. Este último dato añade un nuevo factor a las diferencias encontradas en crecimiento local, indicando que las células MHC-I positivas pueden ser reconocidas por el sistema inmune, lo que provoca el retraso en su crecimiento; mientras que las MHC-I negativas no son reconocidas. Estos dos mismos factores, la oncogenicidad *per se* y el sistema inmune, sirven como argumentación para lo que ocurre en los ensayos de metástasis experimentales, en los cuales los clones tienen el mismo comportamiento que en los ensayos de crecimiento local.

¿Qué ocurre después, cuando el tumor primario es extirpado? las células MHC-I más negativas pueden desencadenar una respuesta inmune tardía en el tiempo, podríamos decir una segunda oleada de inmunovigilancia, que puede reconocer estas células y controlarlas o destruirlas. Efectivamente este fenómeno ocurrió con el clon

GR9-B11 en los ensayos de metástasis espontáneas, generó una respuesta inmune que fue capaz de controlar la progresión metastásica. Con las células tumorales MHC-I positivas ocurre lo contrario, para poder crecer y progresar o bien desarrollan algún mecanismo de escape inmune o deben provocar la inmunosupresión de la respuesta inmune para no ser detectadas. Efectivamente, este último caso es el del clon GR9-A7, un clon MHC-I altamente positivo que origina la inmunosupresión del huésped durante la progresión metastásica. Esta inmunosupresión pudo ser revertida mediante tratamientos de inmunoterapia, los cuales lograron la erradicación total de las metástasis espontáneas generadas por este clon (Garrido et al., 2011). De acuerdo con estos últimos resultados, tumores MHC-I positivos tendrían un buen pronóstico ya que a pesar de ser muy metastásicos, podrían responder a tratamiento inmunoterapéutico. Este hecho ha sido ampliamente reflejado en estudios en tumores humanos, donde pacientes con tumores MHC-I positivos muestran mayor grado de supervivencia y mejor respuesta a tratamientos (Bijen et al. 2010; Kasajima et al. 2010; Kitamura et al. 2007). De acuerdo con nuestros datos, tumores MHC-I negativos también podrían tener buen pronóstico, ya que en este caso el sistema inmune podría controlar la progresión metastásica. Efectivamente, también en humanos se ha encontrado en algunos tipos de tumores, que los pacientes con tumores negativos ó débilmente positivos para la expresión de MHC-I muestran mayor índice de supervivencia y mejor pronóstico (Madjd et al. 2005; Nasman et al. 2012). En dos de estos estudios se muestra que los tumores de peor pronóstico son los que presentan una expresión intermedia de moléculas MHC-I (Nasman et al. 2012; Watson et al. 2006). Resultados muy recientes de de nuestro grupo muestran que la aplicación de los mismos tratamientos inmunoterapéuticos que los aplicados en el caso del clon GR9-A7, no fueron capaces de erradicar completamente las metástasis espontáneas cuando fueron aplicados para el clon GR9-B7, el cual presenta una expresión

intermedia de moléculas MHC-I, convirtiendo a este clon en el de peor pronóstico en nuestro sistema tumoral (manuscrito en preparación).

Una consecuencia significativa que se puede deducir de nuestros resultados es que el comportamiento oncogénico local *in vivo* de unas células tumorales no puede ser extrapolado de manera generalizada a su comportamiento metastásico, ya que como en nuestro modelo tumoral puede ser totalmente opuesto. Esta consideración debe ser tomada en cuenta en la valoración de los tratamientos antitumorales ya que normalmente suelen ser analizados en modelos preclínicos durante la fase del crecimiento del tumor primario y no durante la progresión metastásica. Un tumor muy agresivo localmente, puede no producir metástasis; por el contrario, un tumor muy poco agresivo localmente que puede responder parcialmente a los tratamientos, puede poseer a posteriori una alta capacidad metastásica y por tanto ser muy agresivo. En verdad, otro hecho muy importante es que los modelos preclínicos animales deben reflejar fielmente y emular lo que ocurre durante la progresión del cáncer en humanos. En el desarrollo de esta enfermedad en humanos, el tumor primario puede ser generalmente extirpado y después tiene lugar la aparición de metástasis, que en la mayoría de los casos son las que provocan la muerte del paciente. Nuestro modelo de metástasis murinas espontáneas refleja este proceso: el tumor primario es extirpado y posteriormente los ratones son sacrificados cuando las metástasis progresan. La necesidad de que los modelos preclínicos animales deben ser reflejo de la enfermedad en humanos, ha sido claramente puesta de manifiesto mostrando que en numerosas ocasiones puede ocurrir que los buenos resultados obtenidos en modelos preclínicos, fallan al ser llevados a la clínica humana debido a que los modelos preclínicos tumorales y metastásicos utilizados no reflejan como se origina y progresa el cáncer en humanos (Ellis and Fidler 2010; Talmadge et al. 2007).

También debemos destacar entre nuestros resultados, que en los ensayos de metástasis espontáneas cuando fueron inyectadas 5 millones de células, ninguno de los clones generó metástasis espontáneas al final de los ensayos, permaneciendo todos los animales libres de metástasis. Existe un gran debate sobre si las células metastásicas diseminan rápidamente del tumor primario, o por el contrario necesitan un largo periodo de tiempo para poder migrar, invadir y diseminarse por el huésped (Weng et al. 2012; Yachida et al. 2010). En un modelo transgénico murino de melanoma espontáneo ha sido mostrado que las células metastásicas se diseminaron muy pronto en el tiempo (Eyles et al. 2010). Nuestros resultados de ausencia completa de metástasis espontáneas cuando se inyectó la dosis celular más alta, muestran lo contrario en nuestro modelo tumoral. Cuando el tumor creció muy rápidamente, no hubo el suficiente tiempo para que las células extravasen a vasos sanguíneos e invadieran nuevos órganos, a pesar de que la dosis de células tumorales inyectada era la más alta. Por tanto las células tumorales necesitaron un tiempo mínimo de crecimiento del tumor para poder diseminarse por el organismo y metastatizar.

La expresión en superficie de las moléculas MHC-I fue analizada en las metástasis espontáneas generadas con los diferentes clones. En el caso del clon GR9-A7 MHC-I claramente positivo, las metástasis se dividieron al 50% entre las que presentaban una expresión similar a la del clon original y las que presentaban una expresión menor; entre estas últimas un 37.5% del total presentaban la ausencia total de expresión de la molécula H-2 L^d. En todas las metástasis encontradas la expresión en superficie de las tres moléculas MHC-I era inducida tras el tratamiento con IFN- γ , por tanto presentando lesiones reversibles (“soft lesions”). En los ensayos con el clon GR9-B7, alrededor del 66% de las metástasis presentaron un patrón de expresión de moléculas MHC-I similar al del clon original, y el resto presentaron menor expresión, apareciendo entre estas últimas un nuevo fenotipo MHC-I (11.2% de las metástasis) caracterizado por una

lesión estructural o dura ("hard lesion"), la pérdida total de expresión en superficie de la molécula H-2 L^d en condiciones basales y después del tratamiento con IFN- γ . En el caso del clon GR9-C5, todas las metástasis mostraron un fenotipo MHC-I similar al del clon original del que fueron derivadas. En resumen, podemos observar que el patrón de expresión de moléculas MHC-I en superficie es muy variado comparándolo con el clon del que fueron derivadas, aunque siempre más del 50% de las metástasis presentaron un fenotipo MHC-I similar al del clon original. Si comparamos las metástasis de diferentes clones entre ellas, las que presentan una mayor expresión de moléculas del MHC-I son las derivadas del clon GR9-A7. Ninguno de los clones, ni ninguna de las metástasis presentaron expresión de moléculas MHC-I no clásicas, descartando por tanto cualquier implicación de estas moléculas en el comportamiento biológico de los clones. Con respecto a moléculas MHC de clase II, ninguno de los clones, ni de sus metástasis presentaron expresión basal de estas moléculas. Si podemos observar que en los clones con expresión intermedia o baja de moléculas MHC-I, existe expresión de moléculas MHC de clase II después del tratamiento con IFN- γ . La relevancia de esta expresión no ha sido analizada y sería interesante analizarla en el futuro.

Un resultado sorprendente es el obtenido con el clon GR9-B11, su imposibilidad total de generación de metástasis espontáneas en ratones inmunocompetentes. Este dato nos hizo pensar que merecía la pena profundizar en su estudio. Este clon tumoral a pesar de tener una capacidad oncogénica local muy alta, poseía una capacidad nula para producir metástasis espontáneas en huéspedes inmunocompetentes. El clon GR9-B11 presenta únicamente una expresión en superficie muy débil de la molécula H-2 K^d, aunque la expresión de las moléculas H-2 K^d y D^d es claramente inducida después del tratamiento con IFN- γ , la de la molécula H-2 L^d es débilmente inducida. Este clon es el que presenta mayor oncogenicidad local, medida a través de ensayo

de crecimiento local del tumor primario, de los clones estudiados. Igualmente, presenta una alta capacidad de producir metástasis experimentales. En cambio, y sorprendentemente, se comporta de una manera totalmente contraria con respecto a su capacidad de producir metástasis espontáneas, no generando ninguna metástasis en ratones inmunocompetentes. Que su comportamiento biológico sea igual en ensayos de crecimiento local y en los ensayos de metástasis experimentales, no nos sorprende ya que nosotros creemos que estos dos tipos de ensayos muestran lo mismo, la capacidad de crecimiento local *in vivo* de estas células tumorales. Lo que sí nos ha sorprendido es que teniendo esta alta capacidad oncogénica, después de la extirpación del tumor primario sea completamente incapaz de generar metástasis espontáneas. Nosotros planteamos dos posibles hipótesis para explicar este fenómeno: 1) las células tumorales GR9-B11 son muy oncogénicas localmente, pero son totalmente incapaces de extravasar a vasos sanguíneos y por tanto de invadir y crecer en otras partes del huésped; 2) si eran capaces de invadir y crecer, pero su crecimiento era frenado por el sistema inmune. Decidimos testar esta segunda posibilidad y realizamos los ensayos en ratones BALB/c nude, y en este caso este clon sí fue capaz de generar metástasis espontáneas macroscópicas en un 80 % de los ratones en una rango de 1-8. Estos resultados desechaban la primera hipótesis, las células eran capaces de migrar e invadir, y confirmaban que un sistema inmune completamente activo podría ser capaz de mantener a los ratones libres de metástasis espontáneas. Pero ahora surgían de nuevo dos posibilidades: 1) el sistema inmune era capaz de erradicar completamente las metástasis; 2) el sistema inmune mantenía las metástasis totalmente controladas en un estado de latencia (“dormant metastases”), pero no era capaz de erradicarlas completamente. El siguiente estudio nos resolvería esta duda, se realizaron ensayos de depleción específica de varias subpoblaciones linfocitarias en el huésped. Hay que resaltar que las depleciones inmunes se comenzaron aproximadamente unos cuatro meses después de la

extirpación del tumor primario, encontrándose en ese momento los ratones libres de metástasis. En los ratones deplecionados de linfocitos T (CD4+CD8), o de linfocitos T CD8⁺, o de células NK aparecieron metástasis espontáneas casi en el 100% de los huéspedes. Es decir, las metástasis, que permanecían en estado de latencia, despertaron y lograron progresar invadiendo los pulmones de los animales. En el caso de la depleción de linfocitos T CD4⁺ aparecieron también metástasis pero únicamente en un 20 % de los huéspedes. Estos resultados claramente indican que las metástasis eran controladas en estado de latencia por el sistema inmune sin llegar a ser destruidas totalmente. Por tanto, nos hemos encontrado con un modelo tumoral murino donde las metástasis son mantenidas, casi podíamos decir que completamente o indefinidamente (ratones permanecieron libres de metástasis por más de 18 meses después de la inyección de las células tumorales) en estado de latencia por el sistema inmune. Todos estos datos indican que la inmunovigilancia tumoral desarrolla una importante actividad antimetastásica, siendo incluso capaz de mantener las metástasis inactivas en estado de latencia, permaneciendo el huésped libre de enfermedad durante un largo periodo de tiempo. En este contexto, resultados previos de nuestro grupo han mostrado que otro clon tumoral del modelo GR9, GR9-B9, produjo una única metástasis espontánea pulmonar en ratones inmunocompetentes, mientras que en ratones nude el número de metástasis era de 5 a 7 (García-Lora et al. 2001).

Debemos señalar que nuestro modelo metastásico murino GR9-B11 refleja la clínica que ocurre durante la progresión metastásica en humanos: el tumor primario es extirpado, posteriormente las metástasis pueden progresar o permanecer inactivas en estado de latencia. En la práctica clínica, ha sido ampliamente descrito que después de la extirpación del tumor primario puede pasar un largo periodo de tiempo, que puede abarcar de 5 a 20 años, antes de que la progresión metastásica ocurra (Callaway and Briggs 1989; Matsui et al. 2006; Weckermann et al. 2001). Es muy difícil

encontrar modelos preclínicos de tumores en estado de latencia, pero todavía más difícil es encontrar modelos tumorales de metástasis en estado de latencia. Nosotros hemos encontrado un modelo tumoral de metástasis en estado de latencia que son controladas por el sistema inmune, GR9-B11, que refleja claramente lo que puede ocurrir en algunos casos durante la progresión metastásica en humanos.

Como hemos mencionado anteriormente, el comportamiento opuesto que presenta el clon GR9-B11 con respecto al crecimiento oncogénico local y a la capacidad metastásica espontánea, es debido a con el tiempo puede desencadenar una respuesta inmune que es capaz de controlar a las células metastásicas diseminadas. En ensayos de crecimiento local *in vivo* y en ensayos de metástasis experimentales, las células inyectadas progresan; en cambio, en ensayos de metástasis espontáneas da tiempo a generar una respuesta inmune. El análisis de las poblaciones leucocitarias en bazo, sangre periférica e infiltrado pulmonar en ratones inmunocompetentes 25 o 50 días después de la extirpación del tumor primario originado por las células GR9-B11, mostró principalmente un aumento del porcentaje de células T, tanto de la subpoblación T CD4⁺ como de la T CD8⁺. Además, en bazo pudimos observar un aumento de la subpoblación NKT, así como también de las células dendríticas y de los macrófagos. A estos datos debemos unir que los ensayos de depleción mostraron que las células NK también desempeñaban un papel fundamental evitando la progresión metastásica en nuestro modelo. Nuestros ensayos de depleción muestran que la respuesta inmune fundamental para controlar la progresión metastásica recae principalmente sobre los linfocitos T CD8⁺ y sobre las células NK. El periodo comprendido desde el crecimiento del tumor primario hasta después de su extirpación, permite el tiempo necesario para que esta respuesta inmune conjunta pueda ser activa y sea capaz de mantener en estado de latencia las células metastásicas diseminadas. Recientemente, una serie de ensayos han mostrado como la respuesta inmune puede

detener la progresión del cáncer. Utilizando un modelo tumoral murino de tumores inducidos por MCA, *Koebel & cols* han mostrado que la inmunidad adaptativa mantiene ocultas células cancerosas en estado de equilibrio (Koebel et al. 2007). En ratones que se encontraban libres de tumor después de la inyección de MCA, aparecieron tumores después de la depleción de células T (CD4 + CD8) o del tratamiento con un anticuerpo anti-IFN- γ . En ese estudio las células tumorales en estado de latencia se encontraban en un estado preneoplásico o neoplásico y no eran metástasis como en nuestro estudio. En otro estudio, el IFN- γ liberado por células NK participaba directamente evitando las metástasis pulmonares (Takeda et al. 2011). Pero debemos tener en cuenta que ese estudio fue realizado con metástasis experimentales y que no eran células cancerígenas en estado de latencia. También otro estudio ha desvelado que la depleción de las células T CD8⁺ aceleró la progresión del cáncer en un modelo transgénico de melanogénesis (RET.AAD) (Eyles et al. 2010), los ratones sobreexpresan el oncogen RET en los melanocitos lo que conduce a un aumento de la melanogénesis y permite la transformación oncogénica (Iwamoto et al. 1991). En ese modelo aparecen primero melanomas uveales espontáneos y posteriormente se desarrollaron cánceres en otros órganos. Cuando los huéspedes son deplecionados de células T CD8⁺, estos últimos cánceres aparecen antes. Pero debemos tener en cuenta que no puede ser rotundamente afirmado que los cánceres desarrollados posteriormente en otros órganos sean metástasis, y además los ratones no deplecionados también desarrollaron finalmente cánceres en otros órganos.

Hemos realizado el análisis de la expresión en superficie de las moléculas MHC-I en las metástasis espontáneas obtenidas en ratones nude y en las metástasis experimentales generadas en ratones inmunocompetentes e inmunodeficientes con el clon GR9-B11. Las metástasis espontáneas obtenidas en ratones nude presentaron una mayor expresión en superficie de las moléculas H-2 K^d y H-2 D^d que el clon

original GR9-B11 del que fueron derivadas. Un fenómeno parecido ocurrió con el clon GR9-B9, donde las metástasis generadas en ratones inmunodeficientes presentaban expresión positiva de las tres moléculas H-2, mientras que el clon era totalmente negativo (García-Lora et al. 2001). En estos dos clones las alteraciones de las moléculas MHC-I son reversibles (“soft lesions”) y en ratones nude las células metastásicas no necesitaron escapar de la respuesta inmune mediada por células T y la expresión de MHC-I pudo ser recuperada. En cambio, todas las metástasis espontáneas generadas en ratones nude con el clon GR9-B11 presentaron una alteración irreversible (“hard lesión”) en la molécula H-2 L^d, careciendo de su expresión en condiciones basales y tras el tratamiento con IFN- γ . Nuevamente idéntico tipo de alteración ha sido previamente descrita en un 87% de las metástasis espontáneas generadas por la clon GR9-B9 en animales inmunocompetentes (García-Lora et al. 2001).

Podemos concluir relacionando las posibles implicaciones que los resultados obtenidos en nuestro trabajo pueden tener para investigaciones futuras y para el avance en el estudio de la progresión tumoral y metastásica humana. La alteración en la expresión de moléculas MHC-I es un mecanismo de escape muy importante y el más frecuente encontrado en células humanas para evadir la respuesta inmune. Nuestro trabajo se ha centrado en el estudio de estas alteraciones, sus mecanismos moleculares y sus consecuencias en modelos tumorales preclínicos murinos. Concretamente, nos hemos centrado en la progresión metastásica. Gracias al desarrollo en nuestro laboratorio de un modelo metastásico murino, en el cual a partir de un mismo clon tumoral pudimos generar metástasis MHC-I positivas y metástasis MHC-I negativas, hemos podido descubrir que el gen supresor de tumores Fhit es responsable de la expresión a nivel transcripcional de los componentes de la APM y de las cadenas pesadas del MHC-I, y en consecuencia de la expresión en superficie

de las moléculas MHC-I en estas células tumorales. El gen Fhit se encuentra alterado con mucha frecuencia en tumores, al igual que ocurre con la expresión de las moléculas MHC-I, encontrándose así un posible nexo en común. Sería interesante en el futuro analizar esta posible relación, MHC-I negativo con Fhit negativo, en tumores humanos. Nosotros conocemos por ejemplo que en cáncer de mama, la pérdida completa de expresión en superficie de las moléculas del MHC alcanza casi un 50% (Cabrera et al. 1996), que es el mismo porcentaje descrito para alteraciones de Fhit en ese tipo de tumores (Campiglio et al. 1999; Hayashi et al. 1997). Disponemos de una gran número de muestras de tumores humanos que han sido ya analizadas para la expresión en superficie de las moléculas MHC-I y que en el futuro podrán ser analizadas para la expresión de Fhit.

La recuperación de Fhit en células tumorales puede conllevar la recuperación de la expresión de moléculas del MHC-I y la recuperación de su inmunogenicidad. Y al contrario, el bloqueo de su expresión en otro tipo de células puede decrecer la expresión completa de las moléculas del MHC-I. En ciertas enfermedades autoinmunes y en trasplante de órganos puede interesar bloquear su expresión. En diferentes enfermedades con un componente inmune nos puede interesar escoger su inducción o su bloqueo. Es verdad que el bloqueo de su expresión podría ser peligroso dado su capacidad supresora de tumores, pero debemos tener en cuenta que desconocemos hasta que punto su única depleción puede *per se* generar tumores, y además podemos buscar situaciones intermedias. Incluso un importante punto a investigar sería si en células tumorales con una expresión intermedia de moléculas MHC-I, puede interesar aumentar la expresión de estas moléculas mediante Fhit o bloquearla para modificar su inmunogenicidad. En este sentido es importante señalar que las células metastásicas MN4.5, que recuperan la expresión de Fhit y de las moléculas MHC-I, poseen una inmunogenicidad muy alta en ratones

inmunocompetentes, regresando el tumor primario y siendo finalmente rechazado en todos los huéspedes (García-Lora et al. 2003b). Nuevamente esperamos que los modelos animales preclínicos puedan resolver estas dudas. Además, quedaría por estudiar la posible relación de Fhit con la expresión de moléculas MHC de clase II, su implicación en la ausencia de expresión de las moléculas MHC-I que presentan otros tipos celulares (trofoblastos, células madre, etc), su implicación en la expresión de moléculas MHC-I no clásicas, y finalmente validar un posible tratamiento antitumoral compuesto por la reexpresión de Fhit, solo o combinado con inmunoterapia.

Todos los recientes hallazgos sobre la heterogeneidad genética intratumoral, más los mostrados por nosotros sobre la heterogeneidad intratumoral en la expresión de moléculas MHC-I, unido también a su implicación en la respuesta tumoral a terapias antitumorales, podrán tener importantes implicaciones para la realización de un tratamiento personalizado del cáncer y para el descubrimiento de biomarcadores eficaces para esta enfermedad. Una simple biopsia puede no ser suficiente para determinar el tratamiento adecuado para un cáncer individual de un paciente, poniendo de manifiesto que en el futuro debe tenderse al tratamiento personalizado e individualizado del cáncer (Kirk 2012; McCarthy 2012). Los resultados obtenidos sobre la heterogeneidad intratumoral en la expresión en superficie de moléculas MHC-I en nuestro modelo tumoral, junto con las implicaciones que esto tiene en el comportamiento oncogénico de las células tumorales, abre la perspectiva de la importancia del estudio de una manera pormenorizada de la expresión de las moléculas MHC-I en tumores primarios, pudiendo convertirse en un importante biomarcador tumoral.

El hecho mostrado de que el sistema inmune es capaz de controlar en estado de latencia metástasis espontáneas, manteniendo al huésped libre de la progresión metastásica, revela que el sistema inmune desempeña un papel fundamental en la

lucha antimetastásica. Además de poder destruir las metástasis, también puede ser capaz de mantenerlas totalmente controladas aunque sin llegar a erradicarlas completamente. Este último hecho abre una nueva ventana para poder confiar en el sistema inmune como arma para poder detener la progresión metastásica. Tratamientos que recuperen la inmunogenicidad de las células tumorales, o tratamientos que potencien el sistema inmune pueden lograr si no la erradicación de las metástasis, si su posible control en estado de latencia. Además, nuestro modelo metastásico de latencia podrá permitir en el futuro el estudio detallado de las características que presentan estas metástasis latentes, compararlas con aquellas que progresan para poder analizar su posible efecto.

CONCLUSIONES

1. El gen supresor de tumores Fhit es un regulador positivo de la expresión transcripcional de varios componentes de la maquinaria de procesamiento antigénica y de las cadenas pesadas de las moléculas MHC de clase I, y en consecuencia de la expresión en superficie de las moléculas MHC de clase I en células tumorales.
2. El tumor local GR9 presenta una heterogeneidad intratumoral en cuanto a su expresión en superficie de las moléculas MHC de clase I, que determina el comportamiento biológico *in vivo* de estas células tumorales.
3. En nuestro modelo tumoral murino, la diseminación de las células metastásicas a partir del tumor primario no es un fenómeno rápido, necesita un determinado periodo de tiempo para que ocurra.
4. Las metástasis derivadas desde un mismo clon muestran una segunda heterogeneidad en cuanto a sus fenotipos MHC de clase I, apareciendo nuevas alteraciones que en el caso de la molécula H-2 L^d incluyen daños estructurales.
5. El sistema inmune, concretamente los linfocitos T CD8⁺ y las células NK en nuestro modelo tumoral murino, realiza una eficaz actividad antimetastásica, siendo capaz de mantener controladas por un largo periodo de tiempo (superior a los 18 meses) las metástasis en estado de latencia.

6. Este último hecho abre nuevas posibilidades para nuevos tratamientos antitumorales: terapias que hagan recuperar la inmunogenicidad de las células tumorales o que activen el sistema inmune, pueden promover una respuesta inmune capaz de mantener controladas en estado de latencia metástasis ya diseminadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abken H, Hombach A, Heuser C, Kronfeld K and Seliger B (2002) Tuning tumor-specific T-cell activation: a matter of costimulation? *Trends Immunol* 23:240-245.
- Abril E, Mendez RE, Garcia A, Serrano A, Cabrera T, Garrido F and Ruiz-Cabello F (1996) Characterization of a gastric tumor cell line defective in MHC class I inducibility by both alpha- and gamma-interferon. *Tissue Antigens* 47:391-398.
- Aguado B and Campbell RD (1999) Characterization of a human MHC class III region gene product with S-thioesterase activity. *Biochem J* 341 (Pt 3):679-689.
- Aguirre-Ghiso JA (2007) Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 7:834-846.
- Ahmad M, Rees RC and Ali SA (2004) Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol Immunother* 53:844-854.
- Albert ML, Sauter B and Bhardwaj N (1998) Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392:86-89.
- Algarra I, Cabrera T and Garrido F (2000) The HLA crossroad in tumor immunology. *Hum Immunol* 61:65-73.
- Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, Carbone DP and Gaborilovich DI (2001) Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 166:678-689.
- Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP and Gaborilovich DI (2000) Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 6:1755-1766.
- Almog N, Henke V, Flores L, Hlatky L, Kung AL, Wright RD, Berger R, Hutchinson L, Naumov GN, Bender E, Akslen LA, Achilles EG and Folkman J (2006) Prolonged dormancy of human liposarcoma is associated with impaired tumor angiogenesis. *FASEB J* 20:947-949.
- Allgayer H and Aguirre-Ghiso JA (2008) The urokinase receptor (u-PAR)--a link between tumor cell dormancy and minimal residual disease in bone marrow? *APMIS* 116:602-614.
- Androlewicz MJ (1999) The role of tapasin in MHC class I antigen assembly. *Immunol Res* 20:79-88.
- Apte RS, Mayhew E and Niederkorn JY (1997) Local inhibition of natural killer cell activity promotes the progressive growth of intraocular tumors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:1277-1282.
- Aptsiauri N, Carretero R, Garcia-Lora A, Real LM, Cabrera T and Garrido F (2008) Regressing and progressing metastatic lesions: resistance to immunotherapy is predetermined by irreversible HLA class I antigen alterations. *Cancer Immunol Immunother* 57:1727-1733.
- Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T and Hirai H (2003) Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res* 63:4516-4520.
- Baffa R, Gomella LG, Vecchione A, Bassi P, Mimori K, Sedor J, Calviello CM, Gardiman M, Minimo C, Strup SE, McCue PA, Kovatich AJ, Pagano F, Huebner K and Croce CM (2000) Loss of FHIT expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am J Pathol* 156:419-424.
- Bancroft GJ, Schreiber RD and Unanue ER (1991) Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol Rev* 124:5-24.

- Barkan D, Kleinman H, Simmons JL, Asmussen H, Kamaraju AK, Hoenorhoff MJ, Liu ZY, Costes SV, Cho EH, Lockett S, Khanna C, Chambers AF and Green JE (2008) Inhibition of metastatic outgrowth from single dormant tumor cells by targeting the cytoskeleton. *Cancer Res* 68:6241-6250.
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL and Spies T (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285:727-729.
- Bayko L, Rak J, Man S, Bicknell R, Ferrara N and Kerbel RS (1998) The dormant in vivo phenotype of early stage primary human melanoma: termination by overexpression of vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis* 2:203-217.
- Beck S, Cann HM, Campbell RD, Dunham I, Inoko H, Jazwinska EC, Ragoussis J, Trowsdale J and Ziegler A (1997) Third single chromosome 6 workshop: meeting report. *DNA Seq* 8:113-129.
- Belich MP, Glynne RJ, Senger G, Sheer D and Trowsdale J (1994) Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr Biol* 4:769-776.
- Benitez R, Godelaine D, Lopez-Nevot MA, Basseur F, Jimenez P, Marchand M, Oliva MR, van Baren N, Cabrera T, Andry G, Landry C, Ruiz-Cabello F, Boon T and Garrido F (1998) Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 52:520-529.
- Benlagha K and Bendelac A (2000) CD1d-restricted mouse V alpha 14 and human V alpha 24 T cells: lymphocytes of innate immunity. *Semin Immunol* 12:537-542.
- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF and Ochs HD (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20-21.
- Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC, Brady C, Roche D, Collins JK and Shanahan F (1998) The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J Immunol* 160:5669-5675.
- Berendt MJ and North RJ (1980) T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J Exp Med* 151:69-80.
- Bianchi F, Magnifico A, Olgiati C, Zanasi N, Pekarsky Y, Tagliabue E, Croce CM, Menard S and Campiglio M (2006) FHIT-proteasome degradation caused by mitogenic stimulation of the EGF receptor family in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18981-18986.
- Bianchi F, Tagliabue E, Menard S and Campiglio M (2007) Fhit expression protects against HER2-driven breast tumor development: unraveling the molecular interconnections. *Cell Cycle* 6:643-646.
- Bijen CB, Bantema-Joppe EJ, de Jong RA, Leffers N, Mourits MJ, Eggink HF, van der Zee AG, Hollema H, de Bock GH and Nijman HW (2010) The prognostic role of classical and nonclassical MHC class I expression in endometrial cancer. *Int J Cancer* 126:1417-1427.
- Bjorkman PJ and Parham P (1990) Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 59:253-288.
- Black WC and Welch HG (1993) Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy. *N Engl J Med* 328:1237-1243.

- Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Hartmann C and Huber R (1999) The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28:295-317.
- Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P and Van Pel A (1994) Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12:337-365.
- Bos PD, Zhang XH, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, Minn AJ, van de Vijver MJ, Gerald WL, Foekens JA and Massague J (2009) Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* 459:1005-1009.
- Brady CS, Bartholomew JS, Burt DJ, Duggan-Keen MF, Glenville S, Telford N, Little AM, Davidson JA, Jimenez P, Ruiz-Cabello F, Garrido F and Stern PL (2000) Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer. *Tissue Antigens* 55:401-411.
- Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, Schneeberger S, Obrist P, Winkler C, Werner ER, Werner-Felmayer G, Weiss HG, Gobel G, Margreiter R, Konigsrainer A, Fuchs D and Amberger A (2006) Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res* 12:1144-1151.
- Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD and Darnell JEJ (1996) Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7673-7678.
- Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, Zamboni P, Restifo NP and Zanovello P (2000) Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 96:3838-3846.
- Brown MG, Driscoll J and Monaco JJ (1991) Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* 353:355-357.
- Browning M, Petronzelli F, Bicknell D, Krausa P, Rowan A, Tonks S, Murray N, Bodmer J and Bodmer W (1996) Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tissue Antigens* 47:364-371.
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF and Ramsdell F (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27:68-73.
- Burnet FM (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13:1-27.
- Burnet M (1957) Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1:779-786.
- Burnet M (1964) Immunological Factors in the Process of Carcinogenesis. *Br Med Bull* 20:154-158.
- Cabrera CM, Jimenez P, Cabrera T, Esparza C, Ruiz Cabello F and Garrido F (2003a) Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens* 61 (3):211-219.
- Cabrera CM, Lopez-Nevot MA, Jimenez P and Garrido F (2005) Involvement of the chaperone tapasin in HLA-B44 allelic losses in colorectal tumors. *Int J Cancer* 113:611-618.
- Cabrera T, Angustias Fernandez M, Sierra A, Garrido A, Herruzo A, Escobedo A, Fabra A and Garrido F (1996) High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Hum Immunol* 50:127-134.

- Cabrera T, Pedrajas G, Cozar JM, Garrido A, Vicente J, Tallada M and Garrido F (2003b) HLA class I expression in bladder carcinomas. *Tissue Antigens* 62:324-327.
- Cabrera T, Salinero J, Fernandez MA, Garrido A, Esquivias J and Garrido F (2000) High frequency of altered HLA class I phenotypes in laryngeal carcinomas. *Hum Immunol* 61:499-506.
- Callaway MP and Briggs JC (1989) The incidence of late recurrence (greater than 10 years); an analysis of 536 consecutive cases of cutaneous melanoma. *Br J Plast Surg* 42:46-49.
- Campbell RD and Trowsdale J (1993) Map of the human MHC. *Immunol Today* 14:349-352.
- Campiglio M, Bianchi F, Andriani F, Sozzi G, Tagliabue E, Menard S and Roz L (2006) Diadenosines as FHIT-ness instructors. *J Cell Physiol* 208:274-281.
- Campiglio M, Pekarsky Y, Menard S, Tagliabue E, Pilotti S and Croce CM (1999) FHIT loss of function in human primary breast cancer correlates with advanced stage of the disease. *Cancer Res* 59:3866-3869.
- Cao Y, O'Reilly MS, Marshall B, Flynn E, Ji RW and Folkman J (1998) Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. *J Clin Invest* 101:1055-1063.
- Carbone E, Terrazzano G, Ruggiero G, Zanzi D, Ottaiano A, Manzo C, Karre K and Zappacosta S (1999) Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells. *Eur J Immunol* 29:4022-4029.
- Carmeliet P and Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-257.
- Cascio P, Hilton C, Kisselev AF, Rock KL and Goldberg AL (2001) 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J* 20:2357-2366.
- Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS and Jove R (1999) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10:105-115.
- Condamine T and Gaborilovich DI (2011) Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol* 32:19-25.
- Corzo CA, Cotter MJ, Cheng P, Cheng F, Kusmartsev S, Sotomayor E, Padhya T, McCaffrey TV, McCaffrey JC and Gaborilovich DI (2009) Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 182:5693-5701.
- Coughlin CM, Salhany KE, Gee MS, LaTemple DC, Kotenko S, Ma X, Gri G, Wysocka M, Kim JE, Liu L, Liao F, Farber JM, Pestka S, Trinchieri G and Lee WM (1998) Tumor cell responses to IFN γ affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity* 9:25-34.
- Cresswell P (1994) Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 12:259-293.
- Cresswell P (2000) Intracellular surveillance: controlling the assembly of MHC class I-peptide complexes. *Traffic* 1:301-305.
- Chambers AF (2009) Influence of diet on metastasis and tumor dormancy. *Clin Exp Metastasis* 26:61-66.
- Chang CC, Campoli M, Restifo NP, Wang X and Ferrone S (2005a) Immune selection of hot-spot beta 2-microglobulin gene mutations, HLA-A2 allospecificity loss, and antigen-processing machinery component down-

- regulation in melanoma cells derived from recurrent metastases following immunotherapy. *J Immunol* 174:1462-1471.
- Chang SC, Momburg F, Bhutani N and Goldberg AL (2005b) The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17107-17112.
 - Chappell DB, Zaks TZ, Rosenberg SA and Restifo NP (1999) Human melanoma cells do not express Fas (Apo-1/CD95) ligand. *Cancer Res* 59:59-62.
 - Chen HL, Gabrilovich D, Virmani A, Ratnani I, Girgis KR, Nadaf-Rahrov S, Fernandez-Vina M and Carbone DP (1996) Structural and functional analysis of beta2 microglobulin abnormalities in human lung and breast cancer. *Int J Cancer* 67:756-763.
 - Chen J, Lu G, Lin J, Davidson AL and Quijcho FA (2003) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell* 12:651-661.
 - Chen L, McGowan P, Ashe S, Johnston J, Li Y, Hellstrom I and Hellstrom KE (1994) Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med* 179:523-532.
 - Chun T, Grandea AGr, Lybarger L, Forman J, Van Kaer L and Wang CR (2001) Functional roles of TAP and tapasin in the assembly of M3-N-formylated peptide complexes. *J Immunol* 167:1507-1514.
 - de la Salle H, Hanau D, Fricker D, Urlacher A, Kelly A, Salamero J, Powis SH, Donato L, Bausinger H, Laforet M and et al (1994) Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science* 265:237-241.
 - De Palma M, Mazziere R, Politi LS, Pucci F, Zonari E, Sitia G, Mazzoleni S, Moi D, Venneri MA, Indraccolo S, Falini A, Guidotti LG, Galli R and Naldini L (2008) Tumor-targeted interferon-alpha delivery by Tie2-expressing monocytes inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer Cell* 14:299-311.
 - De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O and Moser M (1997) Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 27:1229-1235.
 - de Vries TJ, Fourkour A, Wobbles T, Verkroost G, Ruiters DJ and van Muijen GN (1997) Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions. *Cancer Res* 57:3223-3229.
 - Del Val M, Iborra S, Ramos M and Lazaro S (2011) Generation of MHC class I ligands in the secretory and vesicular pathways. *Cell Mol Life Sci* 68:1543-1552.
 - Demicheli R, Abbattista A, Miceli R, Valagussa P and Bonadonna G (1996) Time distribution of the recurrence risk for breast cancer patients undergoing mastectomy: further support about the concept of tumor dormancy. *Breast Cancer Res Treat* 41:177-185.
 - Dick TP, Bangia N, Peaper DR and Cresswell P (2002) Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes. *Immunity* 16:87-98.
 - Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N and Raulet DH (2000) Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 1:119-126.
 - Dighe AS, Richards E, Old LJ and Schreiber RD (1994) Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1:447-456.

- Doran T, Stuhlmiller H, Kim JA, Martin EWJ and Triozzi PL (1997) Oncogene and cytokine expression of human colorectal tumors responding to immunotherapy. *J Immunother* 20:372-376.
- Dovhey SE, Ghosh NS and Wright KL (2000) Loss of interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2 in a renal cell carcinoma cell line. *Cancer Res* 60:5789-5796.
- Duarte JH, Zelenay S, Bergman ML, Martins AC and Demengeot J (2009) Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *Eur J Immunol* 39:948-955.
- Dumon KR, Ishii H, Fong LY, Zanesi N, Fidanza V, Mancini R, Vecchione A, Baffa R, Trapasso F, Doring MJ, Huebner K and Croce CM (2001) FHIT gene therapy prevents tumor development in Fhit-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3346-3351.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ and Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991-998.
- Dunn GP, Koebel CM and Schreiber RD (2006) Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 6:836-848.
- Dunn GP, Old LJ and Schreiber RD (2004a) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21:137-148.
- Dunn GP, Old LJ and Schreiber RD (2004b) The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22:329-360.
- Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG and Kerbel RS (2009) Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 15:232-239.
- Ehrlich P (1909) Ueber den jetzigen stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 5:373-290.
- Elliott T (1997) Transporter associated with antigen processing. *Adv Immunol* 65:47-109.
- Ellis LM and Fidler IJ (2010) Finding the tumor copycat. Therapy fails, patients don't. *Nat Med* 16:974-975.
- Eyles J, Puaux AL, Wang X, Toh B, Prakash C, Hong M, Tan TG, Zheng L, Ong LC, Jin Y, Kato M, Prevost-Blondel A, Chow P, Yang H and Abastado JP (2010) Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. *J Clin Invest* 120:2030-2039.
- Falk K, Rotzschke O and Rammensee HG (1990) Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 348:248-251.
- Fan XH, Han BH, Dong QG, Sha HF, Bao GL and Liao ML (2003) [Vascular endothelial growth factor inhibits dendritic cells from patients with non-small cell lung carcinoma]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 26:539-543.
- Farmery MR, Allen S, Allen AJ and Bulleid NJ (2000) The role of ERp57 in disulfide bond formation during the assembly of major histocompatibility complex class I in a synchronized semipermeabilized cell translation system. *J Biol Chem* 275:14933-14938.
- Farrar JD, Katz KH, Windsor J, Thrush G, Scheuermann RH, Uhr JW and Street NE (1999) Cancer dormancy. VII. A regulatory role for CD8+ T cells and IFN-gamma in establishing and maintaining the tumor-dormant state. *J Immunol* 162:2842-2849.
- Feuerer M, Rocha M, Bai L, Umansky V, Solomayer EF, Bastert G, Diel IJ and Schirmacher V (2001) Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients. *Int J Cancer* 92:96-105.

- Folkman J and Kalluri R (2004) Cancer without disease. *Nature* 427:787.
- Fong KM, Biesterveld EJ, Virmani A, Wistuba I, Sekido Y, Bader SA, Ahmadian M, Ong ST, Rassool FV, Zimmerman PV, Giaccone G, Gazdar AF and Minna JD (1997) FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations. *Cancer Res* 57:2256-2267.
- Fontana A, Frei K, Bodmer S, Hofer E, Schreier MH, Palladino MAJ and Zinkernagel RM (1989) Transforming growth factor-beta inhibits the generation of cytotoxic T cells in virus-infected mice. *J Immunol* 143:3230-3234.
- Fontenot JD, Gavin MA and Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.
- Francia G, Cruz-Munoz W, Man S, Xu P and Kerbel RS (2011) Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nat Rev Cancer* 11:135-141.
- Fremont DH, Matsumura M, Stura EA, Peterson PA and Wilson IA (1992) Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb. *Science* 257:919-927.
- Frese KK and Tuveson DA (2007) Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 7:645-658.
- Frickel EM, Riek R, Jelesarov I, Helenius A, Wuthrich K and Ellgaard L (2002) TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1954-1959.
- Gabrilovich DI and Nagaraj S (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9:162-174.
- Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor EM and Kast WM (2001) Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol* 166:5398-5406.
- Galea-Lauri J, Darling D, Gan SU, Krivochtchapov L, Kuiper M, Gaken J, Souberbielle B and Farzaneh F (1999) Expression of a variant of CD28 on a subpopulation of human NK cells: implications for B7-mediated stimulation of NK cells. *J Immunol* 163:62-70.
- Gao B, Adhikari R, Howarth M, Nakamura K, Gold MC, Hill AB, Knee R, Michalak M and Elliott T (2002) Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin. *Immunity* 16:99-109.
- Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K and Mittal V (2008) Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science* 319:195-198.
- Garbi N, Tan P, Diehl AD, Chambers BJ, Ljunggren HG, Momburg F and Hammerling GJ (2000) Impaired immune responses and altered peptide repertoire in tapasin-deficient mice. *Nat Immunol* 1:234-238.
- Garcia-Lora A, Algarra I, Gaforio JJ, Ruiz-Cabello F and Garrido F (2001) Immunoselection by T lymphocytes generates repeated MHC class I-deficient metastatic tumor variants. *Int J Cancer* 91:109-119.
- Garcia-Lora A, Algarra I and Garrido F (2003a) MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* 195:346-355.
- Garcia-Lora A, Martinez M, Algarra I, Gaforio JJ and Garrido F (2003b) MHC class I-deficient metastatic tumor variants immunoselected by T lymphocytes originate from the coordinated downregulation of APM components. *Int J Cancer* 106:521-527.
- Garrido A, Perez M, Delgado C, Garrido ML, Rojano J, Algarra I and Garrido F (1986) Influence of class I H-2 gene expression on local tumor growth.

- Description of a model obtained from clones derived from a solid BALB/c tumor. *Exp Clin Immunogenet* 3:98-110.
- Garrido C, Algarra I, Maleno I, Stefanski J, Collado A, Garrido F and Garcia-Lora AM (2010a) Alterations of HLA class I expression in human melanoma xenografts in immunodeficient mice occur frequently and are associated with higher tumorigenicity. *Cancer Immunol Immunother* 59:13-26.
 - Garrido C, Paco L, Romero I, Berruguilla E, Stefansky J, Collado A, Algarra I, Garrido F and Garcia-Lora AM (2012) MHC class I molecules act as tumor suppressor genes regulating the cell cycle gene expression, invasion and intrinsic tumorigenicity of melanoma cells. *Carcinogenesis*.
 - Garrido C, Romero I, Berruguilla E, Cancela B, Algarra I, Collado A, Garcia-Lora A and Garrido F Immunotherapy eradicates metastases with reversible defects in MHC class I expression. *Cancer Immunol Immunother* 60:1257-1268.
 - Garrido C, Romero I, Berruguilla E, Cancela B, Algarra I, Collado A, Garcia-Lora A and Garrido F (2011) Immunotherapy eradicates metastases with reversible defects in MHC class I expression. *Cancer Immunol Immunother* 60:1257-1268.
 - Garrido F and Algarra I (2001) MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res* 83:117-158.
 - Garrido F, Algarra I and Garcia-Lora AM (2010b) The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible "hard" lesions. *Cancer Immunol Immunother* 59:1601-1606.
 - Garrido F, Cabrera T and Aptsiauri N (2010c) "Hard" and "soft" lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. *Int J Cancer* 127:249-256.
 - Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F and Stern PL (1993) Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today* 14:491-499.
 - Garrido F, Festenstein H and Schirmacher V (1976) Further evidence for depression of H-2 and Ia-like specificities of foreign haplotypes in mouse tumour cell lines. *Nature* 261:705-707.
 - Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M and Stern PL (1997) Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 18:89-95.
 - Gaur A, Yao XR and Scott DW (1993) B cell tolerance induction by cross-linking of membrane IgM, but not IgD, and synergy by cross-linking of both isotypes. *J Immunol* 150:1663-1669.
 - Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA and Swanton C (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366:883-892.
 - Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G and Trinchieri G (2002) Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195:327-333.
 - Gershon RK and Kondo K (1971) Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21:903-914.
 - Ghajar CM and Bissell MJ (2008) Extracellular matrix control of mammary gland morphogenesis and tumorigenesis: insights from imaging. *Histochem Cell Biol* 130:1105-1118.

- Gilead A, Meir G and Neeman M (2004) The role of angiogenesis, vascular maturation, regression and stroma infiltration in dormancy and growth of implanted MLS ovarian carcinoma spheroids. *Int J Cancer* 108:524-531.
- Girolomoni G and Ricciardi-Castagnoli P (1997) Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunol Today* 18:102-104.
- Glynne R, Powis SH, Beck S, Kelly A, Kerr LA and Trowsdale J (1991) A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* 353:357-360.
- Goodfellow PN, Jones EA, Van Heyningen V, Solomon E, Bobrow M, Miggiano V and Bodmer WF (1975) The beta2-microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A region. *Nature* 254:267-269.
- Goodison S, Kawai K, Hihara J, Jiang P, Yang M, Urquidi V, Hoffman RM and Tarin D (2003) Prolonged dormancy and site-specific growth potential of cancer cells spontaneously disseminated from nonmetastatic breast tumors as revealed by labeling with green fluorescent protein. *Clin Cancer Res* 9:3808-3814.
- Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, Gold LI and Arrick BA (1992) Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* 52:6949-6952.
- Grandea AG, 3rd, Golovina TN, Hamilton SE, Sriram V, Spies T, Brutkiewicz RR, Harty JT, Eisenlohr LC and Van Kaer L (2000) Impaired assembly yet normal trafficking of MHC class I molecules in Tapasin mutant mice. *Immunity* 13:213-222.
- Grandea AGr and Van Kaer L (2001) Tapasin: an ER chaperone that controls MHC class I assembly with peptide. *Trends Immunol* 22:194-199.
- Granziero L, Krajewski S, Farness P, Yuan L, Courtney MK, Jackson MR, Peterson PA and Vitiello A (1999) Adoptive immunotherapy prevents prostate cancer in a transgenic animal model. *Eur J Immunol* 29:1127-1138.
- Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH and Spies T (1999) Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6879-6884.
- Groh V, Wu J, Yee C and Spies T (2002) Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419:734-738.
- Gronbaek K, Straten PT, Ralfkiaer E, Ahrenkiel V, Andersen MK, Hansen NE, Zeuthen J, Hou-Jensen K and Guldberg P (1998) Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* 92:3018-3024.
- Gruss HJ and Dower SK (1995) Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 85:3378-3404.
- Gupta GP and Massague J (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127:679-695.
- Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J and Tschopp J (1996) Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274:1363-1366.
- Hammer GE, Gonzalez F, Champsaur M, Cado D and Shastri N (2006) The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat Immunol* 7:103-112.
- Hanahan D and Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353-364.
- Hart IR (1999) Perspective: tumour spread--the problems of latency. *J Pathol* 187:91-94.

- Hart IR and Fidler IJ (1980) Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Res* 40:2281-2287.
- Hartley SB, Cooke MP, Fulcher DA, Harris AW, Cory S, Basten A and Goodnow CC (1993) Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* 72:325-335.
- Hayashi S, Tanimoto K, Hajiro-Nakanishi K, Tsuchiya E, Kurosumi M, Higashi Y, Imai K, Suga K and Nakachi K (1997) Abnormal FHIT transcripts in human breast carcinomas: a clinicopathological and epidemiological analysis of 61 Japanese cases. *Cancer Res* 57:1981-1985.
- Hedley BD, Allan AL and Chambers AF (2006) Tumor dormancy and the role of metastasis suppressor genes in regulating ectopic growth. *Future Oncol* 2:627-641.
- Heidelberger C (1975) Chemical carcinogenesis. *Annu Rev Biochem* 44:79-121.
- Helenius A and Aebi M (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291:2364-2369.
- Herget M, Oancea G, Schrodtt S, Karas M, Tampe R and Abele R (2007) Mechanism of substrate sensing and signal transmission within an ABC transporter: use of a Trojan horse strategy. *J Biol Chem* 282:3871-3880.
- Herrlinger U, Hebart H, Kanz L, Dichgans J and Weller M (2005) Relapse of primary CNS lymphoma after more than 10 years in complete remission. *J Neurol* 252:1409-1410.
- Herrmann F, Lehr HA, Drexler I, Sutter G, Hengstler J, Wollscheid U and Seliger B (2004) HER-2/neu-mediated regulation of components of the MHC class I antigen-processing pathway. *Cancer Res* 64:215-220.
- Hersey P and Zhang XD (2001) How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer* 1:142-150.
- Hershko A and Ciechanover A (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 61:761-807.
- Hershko A, Ciechanover A and Varshavsky A (2000) Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nat Med* 6:1073-1081.
- Hicklin DJ, Marincola FM and Ferrone S (1999) HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today* 5:178-186.
- Hicklin DJ, Wang Z, Arienti F, Rivoltini L, Parmiani G and Ferrone S (1998) beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J Clin Invest* 101:2720-2729.
- Hodge-Dufour J, Noble PW, Horton MR, Bao C, Wysoka M, Burdick MD, Strieter RM, Trinchieri G and Pure E (1997) Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J Immunol* 159:2492-2500.
- Holmgren L, O'Reilly MS and Folkman J (1995) Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1:149-153.
- Hori S, Nomura T and Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
- Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H and Dubinett SM (1998) Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res* 58:1208-1216.
- Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, van Baren N, Baurain JF, de Smet C, Chambost H, Vitale M, Moretta A, Boon T and Coulie PG (1997) Characterization of an

- antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 6:199-208.
- Inaba T, Ino K, Kajiyama H, Yamamoto E, Shibata K, Nawa A, Nagasaka T, Akimoto H, Takikawa O and Kikkawa F (2009) Role of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase in the progression of ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 115:185-192.
 - Indraccolo S, Favaro E and Amadori A (2006) Dormant tumors awoken by a short-term angiogenic burst: the spike hypothesis. *Cell Cycle* 5:1751-1755.
 - Ino K, Yamamoto E, Shibata K, Kajiyama H, Yoshida N, Terauchi M, Nawa A, Nagasaka T, Takikawa O and Kikkawa F (2008) Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. *Clin Cancer Res* 14:2310-2317.
 - Inoshima N, Nakanishi Y, Minami T, Izumi M, Takayama K, Yoshino I and Hara N (2002) The influence of dendritic cell infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 8:3480-3486.
 - Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE and Tschopp J (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190-195.
 - Ishii H, Dumon KR, Vecchione A, Fong LY, Baffa R, Huebner K and Croce CM (2001) Potential cancer therapy with the fragile histidine triad gene: review of the preclinical studies. *JAMA* 286:2441-2449.
 - Iwamoto T, Takahashi M, Ito M, Hamatani K, Ohbayashi M, Wajjwalku W, Isobe K and Nakashima I (1991) Aberrant melanogenesis and melanocytic tumour development in transgenic mice that carry a metallothionein/ret fusion gene. *EMBO J* 10:3167-3175.
 - Janeway CA (1989a) Natural killer cells: a primitive immune system. *Nature* 341:108.
 - Janeway CA, Jr. (1989b) Introduction: T-cell:B-cell interaction. *Semin Immunol* 1:1-3.
 - Jayachandran G, Sasaki J, Nishizaki M, Xu K, Girard L, Minna JD, Roth JA and Ji L (2007) Fragile histidine triad-mediated tumor suppression of lung cancer by targeting multiple components of the Ras/Rho GTPase molecular switch. *Cancer Res* 67:10379-10388.
 - Ji L, Fang B, Yen N, Fong K, Minna JD and Roth JA (1999) Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. *Cancer Res* 59:3333-3339.
 - Jiang Y, Lucas I, Young DJ, Davis EM, Karrison T, Rest JS and Le Beau MM (2009) Common fragile sites are characterized by histone hypoacetylation. *Hum Mol Genet* 18:4501-4512.
 - Jimenez P, Canton J, Collado A, Cabrera T, Serrano A, Real LM, Garcia A, Ruiz-Cabello F and Garrido F (1999) Chromosome loss is the most frequent mechanism contributing to HLA haplotype loss in human tumors. *Int J Cancer* 83:91-97.
 - Joannes A, Bonnomet A, Bindels S, Polette M, Gilles C, Burlet H, Cutrona J, Zahm JM, Birembaut P and Nawrocki-Raby B (2010) Fhit regulates invasion of lung tumor cells. *Oncogene* 29:1203-1213.
 - Johnsen AK, Templeton DJ, Sy M and Harding CV (1999) Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis. *J Immunol* 163:4224-4231.

- Jones EY (1997) MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol* 9:75-79.
- Jonkers J and Berns A (2002) Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nat Rev Cancer* 2:251-265.
- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ and Schreiber RD (1998) Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7556-7561.
- Karrison TG, Ferguson DJ and Meier P (1999) Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Natl Cancer Inst* 91:80-85.
- Kasajima A, Sers C, Sasano H, Johrens K, Stenzinger A, Noske A, Buckendahl AC, Darb-Esfahani S, Muller BM, Budczies J, Lehman A, Dietel M, Denkert C and Weichert W (2010) Down-regulation of the antigen processing machinery is linked to a loss of inflammatory response in colorectal cancer. *Hum Pathol* 41:1758-1769.
- Kauffman HM, McBride MA and Delmonico FL (2000) First report of the United Network for Organ Sharing Transplant Tumor Registry: donors with a history of cancer. *Transplantation* 70:1747-1751.
- Kelly A, Powis SH, Glynne R, Radley E, Beck S and Trowsdale J (1991) Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* 353:667-668.
- Kenny PA and Bissell MJ (2003) Tumor reversion: correction of malignant behavior by microenvironmental cues. *Int J Cancer* 107:688-695.
- Khattri R, Cox T, Yasayko SA and Ramsdell F (2003) An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4:337-342.
- Khong HT and Restifo NP (2002) Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3:999-1005.
- Kirk R (2012) Genetics: Personalized medicine and tumour heterogeneity. *Nat Rev Clin Oncol* 9:250.
- Kitamura H, Honma I, Torigoe T, Asanuma H, Sato N and Tsukamoto T (2007) Down-regulation of HLA class I antigen is an independent prognostic factor for clear cell renal cell carcinoma. *J Urol* 177:1269-1272; discussion 1272.
- Kloetzel PM (2001) Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:179-187.
- Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, Smyth MJ and Schreiber RD (2007) Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450:903-907.
- Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H and Hori S (2009) Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1903-1908.
- Koopman LA, Corver WE, van der Slik AR, Giphart MJ and Fleuren GJ (2000) Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med* 191:961-976.
- Kumar A, Commane M, Flickinger TW, Horvath CM and Stark GR (1997) Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* 278:1630-1632.
- Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D and Gabrilovich DI (2004) Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol* 172:989-999.

- Kusmartsev SA, Li Y and Chen SH (2000) Gr-1+ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. *J Immunol* 165:779-785.
- Landowski TH, Qu N, Buyuksal I, Painter JS and Dalton WS (1997) Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood* 90:4266-4270.
- Larsen CN and Finley D (1997) Protein translocation channels in the proteasome and other proteases. *Cell* 91:431-434.
- Lauvau G, Kakimi K, Niedermann G, Ostankovitch M, Yotnda P, Firat H, Chisari FV and van Ender PM (1999) Human transporters associated with antigen processing (TAPs) select epitope precursor peptides for processing in the endoplasmic reticulum and presentation to T cells. *J Exp Med* 190:1227-1240.
- Lehner PJ, Surman MJ and Cresswell P (1998) Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line .220. *Immunity* 8:221-231.
- Lengauer C, Kinzler KW and Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-649.
- Lewis JW and Elliott T (1998) Evidence for successive peptide binding and quality control stages during MHC class I assembly. *Curr Biol* 8:717-720.
- Li R, Ruttinger D, Si LS and Wang YL (2003) Analysis of the immunological microenvironment at the tumor site in patients with non-small cell lung cancer. *Langenbecks Arch Surg* 388:406-412.
- Li Z, Menoret A and Srivastava P (2002) Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol* 14:45-51.
- Lindberg J, Klevebring D, Liu W, Neiman M, Xu J, Wiklund P, Wiklund F, Mills IG, Egevad L and Gronberg H (2012) Exome Sequencing of Prostate Cancer Supports the Hypothesis of Independent Tumour Origins. *Eur Urol*.
- Lissoni P, Malugani F, Bonfanti A, Bucovec R, Secondino S, Brivio F, Ferrari-Bravo A, Ferrante R, Vigore L, Rovelli F, Mandala M, Viviani S, Fumagalli L and Gardani GS (2001) Abnormally enhanced blood concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastatic cancer patients and their relation to circulating dendritic cells, IL-12 and endothelin-1. *J Biol Regul Homeost Agents* 15:140-144.
- Loeb LA (1991) Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51:3075-3079.
- Lollini PL, Nicoletti G, Landuzzi L, De Giovanni C, Rossi I, Di Carlo E, Musiani P, Muller WJ and Nanni P (1998) Down regulation of major histocompatibility complex class I expression in mammary carcinoma of HER-2/neu transgenic mice. *Int J Cancer* 77:937-941.
- Lopez-Botet M, Llano M, Navarro F and Bellon T (2000) NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. *Semin Immunol* 12:109-119.
- Lorente E, Garcia R and Lopez D (2011) Allele-dependent processing pathways generate the endogenous human leukocyte antigen (HLA) class I peptide repertoire in transporters associated with antigen processing (TAP)-deficient cells. *J Biol Chem* 286:38054-38059.
- Lu Z, Luo RZ, Lu Y, Zhang X, Yu Q, Khare S, Kondo S, Kondo Y, Yu Y, Mills GB, Liao WS and Bast RC, Jr. (2008) The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J Clin Invest* 118:3917-3929.
- Ludewig B, Graf D, Gelderblom HR, Becker Y, Kroczeck RA and Pauli G (1995) Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol* 25:1943-1950.

- MacMicking J, Xie QW and Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15:323-350.
- Madjd Z, Spendlove I, Pinder SE, Ellis IO and Durrant LG (2005) Total loss of MHC class I is an independent indicator of good prognosis in breast cancer. *Int J Cancer* 117:248-255.
- Mahnke YD, Schwendemann J, Beckhove P and Schirmacher V (2005) Maintenance of long-term tumour-specific T-cell memory by residual dormant tumour cells. *Immunology* 115:325-336.
- Maleckar JR and Sherman LA (1987) The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice. *J Immunol* 138:3873-3876.
- Maleno I, Cabrera CM, Cabrera T, Paco L, Lopez-Nevot MA, Collado A, Ferron A and Garrido F (2004) Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Immunogenetics* 56:244-253.
- Maleno I, Lopez-Nevot MA, Cabrera T, Salinero J and Garrido F (2002) Multiple mechanisms generate HLA class I altered phenotypes in laryngeal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Cancer Immunol Immunother* 51:389-396.
- Marin R, Ruiz-Cabello F, Pedrinaci S, Mendez R, Jimenez P, Geraghty DE and Garrido F (2003) Analysis of HLA-E expression in human tumors. *Immunogenetics* 54:767-775.
- Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ and Ferrone S (2000) Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 74:181-273.
- Maruyama T, Mimura K, Sato E, Watanabe M, Mizukami Y, Kawaguchi Y, Ando T, Kinouchi H, Fujii H and Kono K (2010) Inverse correlation of HER2 with MHC class I expression on oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 103:552-559.
- Matsui K, Sawa T, Suzuki H, Nakagawa K, Okamoto N, Tada T, Nagano T and Masuda N (2006) Relapse of stage I small cell lung cancer ten or more years after the start of treatment. *Jpn J Clin Oncol* 36:457-461.
- Matzinger P (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991-1045.
- Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, Serafini P, Zanovello P and Segal DM (2002) Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol* 168:689-695.
- McAllister SS, Gifford AM, Greiner AL, Kelleher SP, Saelzler MP, Ince TA, Reinhardt F, Harris LN, Hylander BL, Repasky EA and Weinberg RA (2008) Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin. *Cell* 133:994-1005.
- McCarthy N (2012) Tumour heterogeneity: Darwin's finches. *Nat Rev Cancer* 12:317.
- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M and 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.
- Medema JP, de Jong J, van Hall T, Melief CJ and Offringa R (1999) Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med* 190:1033-1038.
- Melero I, Shuford WW, Newby SA, Aruffo A, Ledbetter JA, Hellstrom KE, Mittler RS and Chen L (1997) Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* 3:682-685.

- Mellor AL, Sivakumar J, Chandler P, Smith K, Molina H, Mao D and Munn DH (2001) Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. *Nat Immunol* 2:64-68.
- Mendez R, Serrano A, Jager E, Maleno I, Ruiz-Cabello F, Knuth A and Garrido F (2001) Analysis of HLA class I expression in different metastases from two melanoma patients undergoing peptide immunotherapy. *Tissue Antigens* 57:508-519.
- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herlyn D, Terstappen LW, Fehm T, Tucker TF, Lane N, Wang J and Uhr JW (2004) Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 10:8152-8162.
- Merzougui N, Kratzer R, Saveanu L and van Endert P (2011) A proteasome-dependent, TAP-independent pathway for cross-presentation of phagocytosed antigen. *EMBO Rep* 12:1257-1264.
- Mills KH and McGuirk P (2004) Antigen-specific regulatory T cells--their induction and role in infection. *Semin Immunol* 16:107-117.
- Mimori K, Ishii H, Nagahara H, Sudo T, Yamashita K, Inoue H, Barnard GF and Mori M (2006) FHIT is up-regulated by inflammatory stimuli and inhibits prostaglandin E2-mediated cancer progression. *Cancer Res* 66:2683-2690.
- Mimura K, Ando T, Poschke I, Mouggiakakos D, Johansson CC, Ichikawa J, Okita R, Nishimura MI, Handke D, Krug N, Choudhury A, Seliger B and Kiessling R (2011) T cell recognition of HLA-A2 restricted tumor antigens is impaired by the oncogene HER2. *Int J Cancer* 128:390-401.
- Mitsiades N, Yu WH, Poulaki V, Tsokos M and Stamenkovic I (2001) Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res* 61:577-581.
- Miyao T, Floess S, Setoguchi R, Luche H, Fehling HJ, Waldmann H, Huehn J and Hori S (2012) Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity* 36:262-275.
- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC and Moretta L (1996) Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 14:619-648.
- Muller M, Gounari F, Prifti S, Hacker HJ, Schirmacher V and Khazaie K (1998) EblacZ tumor dormancy in bone marrow and lymph nodes: active control of proliferating tumor cells by CD8+ immune T cells. *Cancer Res* 58:5439-5446.
- Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A and Mellor AL (1999) Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 189:1363-1372.
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C and Mellor AL (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281:1191-1193.
- Murakami M, Sakamoto A, Bender J, Kappler J and Marrack P (2002) CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8832-8837.
- Murray PG, Constandinou CM, Crocker J, Young LS and Ambinder RF (1998) Analysis of major histocompatibility complex class I, TAP expression, and LMP2 epitope sequence in Epstein-Barr virus-positive Hodgkin's disease. *Blood* 92:2477-2483.
- Myron Kauffman H, McBride MA, Cherikh WS, Spain PC, Marks WH and Roza AM (2002) Transplant tumor registry: donor related malignancies. *Transplantation* 74:358-362.

- Nandi D, Jiang H and Monaco JJ (1996) Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. *J Immunol* 156:2361-2364.
- Nasman A, Andersson E, Nordfors C, Grun N, Johansson H, Munck-Wikland E, Massucci G, Dalianis T and Ramqvist T (2012) MHC class I expression in HPV positive and negative tonsillar squamous cell carcinoma in correlation to clinical outcome. *Int J Cancer*.
- Naumov GN, Akslen LA and Folkman J (2006a) Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle* 5:1779-1787.
- Naumov GN, Bender E, Zurakowski D, Kang SY, Sampson D, Flynn E, Watnick RS, Straume O, Akslen LA, Folkman J and Almog N (2006b) A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J Natl Cancer Inst* 98:316-325.
- Naumov GN, MacDonald IC, Chambers AF and Groom AC (2001) Solitary cancer cells as a possible source of tumour dormancy? *Semin Cancer Biol* 11:271-276.
- Neumann L, Abele R and Tampe R (2002) Thermodynamics of peptide binding to the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Mol Biol* 324:965-973.
- Neumann L and Tampe R (1999) Kinetic analysis of peptide binding to the TAP transport complex: evidence for structural rearrangements induced by substrate binding. *J Mol Biol* 294:1203-1213.
- Nguyen DX, Bos PD and Massague J (2009) Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 9:274-284.
- Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP, Liston JC, Salerno CT, Knapp DJ, Green DR and Kratzke RA (1997) Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res* 57:1007-1012.
- Nossner E and Parham P (1995) Species-specific differences in chaperone interaction of human and mouse major histocompatibility complex class I molecules. *J Exp Med* 181:327-337.
- O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Roche D, Kelly J, Collins JK and Shanahan F (1998) Fas ligand expression in primary colon adenocarcinomas: evidence that the Fas counterattack is a prevalent mechanism of immune evasion in human colon cancer. *J Pathol* 186:240-246.
- Oancea G, O'Mara ML, Bennett WF, Tieleman DP, Abele R and Tampe R (2009) Structural arrangement of the transmission interface in the antigen ABC transport complex TAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5551-5556.
- Ohm JE and Carbone DP (2001) VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. *Immunol Res* 23:263-272.
- Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Sibrashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM and Huebner K (1996) The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 84:587-597.
- Oliver JD, Roderick HL, Llewellyn DH and High S (1999) ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol Biol Cell* 10:2573-2582.
- Otsuji M, Kimura Y, Aoe T, Okamoto Y and Saito T (1996) Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13119-13124.
- Ottewell PD, Coleman RE and Holen I (2006) From genetic abnormality to metastases: murine models of breast cancer and their use in the development of anticancer therapies. *Breast Cancer Res Treat* 96:101-113.

- Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP and Gabrilovich DI (1998) Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 160:1224-1232.
- Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D and Casanovas O (2009) Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 15:220-231.
- Pamer E and Cresswell P (1998) Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16:323-358.
- Paschen A, Mendez RM, Jimenez P, Sucker A, Ruiz-Cabello F, Song M, Garrido F and Schadendorf D (2003) Complete loss of HLA class I antigen expression on melanoma cells: a result of successive mutational events. *Int J Cancer* 103:759-767.
- Pease LR, Horton RM, Pullen JK and Cai ZL (1991) Structure and diversity of class I antigen presenting molecules in the mouse. *Crit Rev Immunol* 11:1-32.
- Pekarsky Y, Garrison PN, Palamarchuk A, Zanesi N, Aqeilan RI, Huebner K, Barnes LD and Croce CM (2004) Fhit is a physiological target of the protein kinase Src. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3775-3779.
- Peltenburg LT and Schrier PI (1994) Transcriptional suppression of HLA-B expression by c-Myc is mediated through the core promoter elements. *Immunogenetics* 40:54-61.
- Pellegrino MA, Ferrone S, Reisfeld RA, Irie RF and Golub SH (1977) Expression of histocompatibility (HLA) antigens on tumor cells and normal cells from patients with melanoma. *Cancer* 40:36-41.
- Perez B, Benitez R, Fernandez MA, Oliva MR, Soto JL, Serrano S, Lopez Nevot MA and Garrido F (1999) A new beta 2 microglobulin mutation found in a melanoma tumor cell line. *Tissue Antigens* 53:569-572.
- Perez M, Algarra I, Ljunggren HG, Caballero A, Mialdea MJ, Gaforio JJ, Klein G, Karre K and Garrido F (1990) A weakly tumorigenic phenotype with high MHC class-I expression is associated with high metastatic potential after surgical removal of the primary murine fibrosarcoma. *Int J Cancer* 46:258-261.
- Pfitzenmaier J, Ellis WJ, Arfman EW, Hawley S, McLaughlin PO, Lange PH and Vessella RL (2006) Telomerase activity in disseminated prostate cancer cells. *BJU Int* 97:1309-1313.
- Pichiorri F, Palumbo T, Suh SS, Okamura H, Trapasso F, Ishii H, Huebner K and Croce CM (2008) Fhit tumor suppressor: guardian of the preneoplastic genome. *Future Oncol* 4:815-824.
- Porgador A, Mandelboim O, Restifo NP and Strominger JL (1997) Natural killer cell lines kill autologous beta2-microglobulin-deficient melanoma cells: implications for cancer immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13140-13145.
- Purcell AW, Gorman JJ, Garcia-Peydro M, Paradela A, Burrows SR, Talbo GH, Laham N, Peh CA, Reynolds EC, Lopez De Castro JA and McCluskey J (2001) Quantitative and qualitative influences of tapasin on the class I peptide repertoire. *J Immunol* 166:1016-1027.
- Qin Z and Blankenstein T (2000) CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* 12:677-686.
- Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM and Morrison SJ (2008) Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456:593-598.

- Ranganathan AC, Adam AP and Aguirre-Ghiso JA (2006) Opposing roles of mitogenic and stress signaling pathways in the induction of cancer dormancy. *Cell Cycle* 5:1799-1807.
- Read S, Malmstrom V and Powrie F (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192:295-302.
- Real LM, Jimenez P, Canton J, Kirkin A, Garcia A, Abril E, Zeuthen J, Ruiz-Cabello F and Garrido F (1998) In vivo and in vitro generation of a new altered HLA phenotype in melanoma-tumour-cell variants expressing a single HLA-class-I allele. *Int J Cancer* 75:317-323.
- Rechsteiner M, Realini C and Ustrell V (2000) The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem J* 345 Pt 1:1-15.
- Reichard KK, Zhang QY, Sanchez L, Hozier J, Viswanatha D and Foucar K (2006) Acute myeloid leukemia of donor origin after allogeneic bone marrow transplantation for precursor T-cell acute lymphoblastic leukemia: case report and review of the literature. *Am J Hematol* 81:178-185.
- Reits EA, Vos JC, Gromme M and Neefjes J (2000) The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 404:774-778.
- Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA and Bennink JR (1993) Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med* 177:265-272.
- Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P and Harkonen M (1997) Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 57:1276-1280.
- Ritz U, Momburg F, Pilch H, Huber C, Maeurer MJ and Seliger B (2001) Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma. *Int J Oncol* 19:1211-1220.
- Rock KL and Goldberg AL (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 17:739-779.
- Rodriguez T, Mendez R, Del Campo A, Jimenez P, Aptsiauri N, Garrido F and Ruiz-Cabello F (2007) Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. *BMC Cancer* 7:34.
- Romagnani C, Della Chiesa M, Kohler S, Moewes B, Radbruch A, Moretta L, Moretta A and Thiel A (2005) Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells. *Eur J Immunol* 35:2452-2458.
- Romero I, Martinez M, Garrido C, Collado A, Algarra I, Garrido F and Garcia-Lora AM (2012) The tumour suppressor Fhit positively regulates MHC class I expression on cancer cells. *J Pathol*.
- Romero JM, Jimenez P, Cabrera T, Cozar JM, Pedrinaci S, Tallada M, Garrido F and Ruiz-Cabello F (2005) Coordinated downregulation of the antigen presentation machinery and HLA class I/beta2-microglobulin complex is responsible for HLA-ABC loss in bladder cancer. *Int J Cancer* 113:605-610.
- Rosa F, Berissi H, Weissenbach J, Maroteaux L, Fellous M and Revel M (1983) The beta2-microglobulin mRNA in human Daudi cells has a mutated initiation codon but is still inducible by interferon. *EMBO J* 2:239-243.
- Roz L, Gramegna M, Ishii H, Croce CM and Sozzi G (2002) Restoration of fragile histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in lung and cervical cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3615-3620.
- Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer OL and Rabinovich GA (2004) Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T

- cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 5:241-251.
- Ruiz-Cabello F and Garrido F (1998) HLA and cancer: from research to clinical impact. *Immunol Today* 19:539-542.
 - Rygaard J and Povlsen CO (1974) Is immunological surveillance not a cell-mediated immune function? *Transplantation* 17:135-136.
 - Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, Spies T and Cresswell P (1996) Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5:103-114.
 - Sadasivan BK, Cariappa A, Waneck GL and Cresswell P (1995) Assembly, peptide loading, and transport of MHC class I molecules in a calnexin-negative cell line. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60:267-275.
 - Sagalowsky AI and Molberg K (1999) Solitary metastasis of renal cell carcinoma to the contralateral adrenal gland 22 years after nephrectomy. *Urology* 54:162.
 - Sakaguchi S (2004) Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-562.
 - Sakaguchi S (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6:345-352.
 - Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M and Toda M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
 - Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M and Takahashi T (2001) Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182:18-32.
 - Salazar-Onfray F, Charo J, Petersson M, Freland S, Noffz G, Qin Z, Blankenstein T, Ljunggren HG and Kiessling R (1997) Down-regulation of the expression and function of the transporter associated with antigen processing in murine tumor cell lines expressing IL-10. *J Immunol* 159:3195-3202.
 - Salvesen GS and Dixit VM (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10964-10967.
 - Sallusto F, Mackay CR and Lanzavecchia A (2000) The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 18:593-620.
 - Sard L, Accornero P, Tornielli S, Delia D, Bunone G, Campiglio M, Colombo MP, Gramegna M, Croce CM, Pierotti MA and Sozzi G (1999) The tumor-suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8489-8492.
 - Saric T, Chang SC, Hattori A, York IA, Markant S, Rock KL, Tsujimoto M and Goldberg AL (2002) An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* 3:1169-1176.
 - Scott JE and Dawson JR (1995) MHC class I expression and transport in a calnexin-deficient cell line. *J Immunol* 155:143-148.
 - Schreiber H, Wu TH, Nachman J and Kast WM (2002) Immunodominance and tumor escape. *Semin Cancer Biol* 12:25-31.
 - Schreiber RD, Pace JL, Russell SW, Altman A and Katz DH (1983) Macrophage-activating factor produced by a T cell hybridoma: physicochemical and biosynthetic resemblance to gamma-interferon. *J Immunol* 131:826-832.

- Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW and Bennink JR (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404:770-774.
- Seliger B, Atkins D, Bock M, Ritz U, Ferrone S, Huber C and Storkel S (2003) Characterization of human lymphocyte antigen class I antigen-processing machinery defects in renal cell carcinoma lesions with special emphasis on transporter-associated with antigen-processing down-regulation. *Clin Cancer Res* 9:1721-1727.
- Seliger B, Cabrera T, Garrido F and Ferrone S (2002) HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol* 12:3-13.
- Seliger B, Maeurer MJ and Ferrone S (2000a) Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 21:455-464.
- Seliger B, Ruiz-Cabello F and Garrido F (2008) IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv Cancer Res* 101:249-276.
- Seliger B, Wollscheid U, Momburg F, Blankenstein T and Huber C (2000b) Coordinate downregulation of multiple MHC class I antigen processing genes in chemical-induced murine tumor cell lines of distinct origin. *Tissue Antigens* 56:327-336.
- Serrano A, Brady CS, Jimenez P, Duggan-Keen MF, Mendez R, Stern P, Garrido F and Ruiz-Cabello F (2000) A mutation determining the loss of HLA-A2 antigen expression in a cervical carcinoma reveals novel splicing of human MHC class I classical transcripts in both tumoral and normal cells. *Immunogenetics* 51:1047-1052.
- Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R and Shastri N (2002) ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419:480-483.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ and Schreiber RD (2001) IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107-1111.
- Sharma S, Stolina M, Lin Y, Gardner B, Miller PW, Kronenberg M and Dubinett SM (1999) T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J Immunol* 163:5020-5028.
- Shastri N, Schwab S and Serwold T (2002) Producing nature's gene-chips: the generation of peptides for display by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 20:463-493.
- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y and Sakaguchi S (2002) Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3:135-142.
- Shin MS, Park WS, Kim SY, Kim HS, Kang SJ, Song KY, Park JY, Dong SM, Pi JH, Oh RR, Lee JY, Yoo NJ and Lee SH (1999) Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol* 154:1785-1791.
- Slavin S and Strober S (1978) Spontaneous murine B-cell leukaemia. *Nature* 272:624-626.
- Smith CA, Farrah T and Goodwin RG (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76:959-962.
- Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ and Hunt JF (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* 10:139-149.
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI and Trapani JA (2000) Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 192:755-760.

- Soong TW and Hui KM (1992) Locus-specific transcriptional control of HLA genes. *J Immunol* 149:2008-2020.
- Sozzi G, Huebner K and Croce CM (1998) FHIT in human cancer. *Adv Cancer Res* 74:141-166.
- Spies T, Blanck G, Bresnahan M, Sands J and Strominger JL (1989) A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science* 243:214-217.
- Spiliotis ET, Manley H, Osorio M, Zuniga MC and Edidin M (2000) Selective export of MHC class I molecules from the ER after their dissociation from TAP. *Immunity* 13:841-851.
- Srivastava P (2002) Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol* 20:395-425.
- Stern LJ and Wiley DC (1994) Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Behring Inst Mitt*:1-10.
- Sternlicht MD and Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516.
- Stewart TH, Hollinshead AC and Raman S (1991) Tumour dormancy: initiation, maintenance and termination in animals and humans. *Can J Surg* 34:321-325.
- Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH and Galle PR (1996) Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 2:1361-1366.
- Strand S, Vollmer P, van den Abeelen L, Gottfried D, Alla V, Heid H, Kuball J, Theobald M, Galle PR and Strand D (2004) Cleavage of CD95 by matrix metalloproteinase-7 induces apoptosis resistance in tumour cells. *Oncogene* 23:3732-3736.
- Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, Rosen-Wolff A, Peters AM, Sneller MC, Hallahan CW, Wang J, Fischer RE, Jackson CM, Lin AY, Baumler C, Siegert E, Marx A, Vaishnav AK, Grodzicky T, Fleisher TA and Lenardo MJ (2001) The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 98:194-200.
- Stronge VS, Saito Y, Ihara Y and Williams DB (2001) Relationship between calnexin and BiP in suppressing aggregation and promoting refolding of protein and glycoprotein substrates. *J Biol Chem* 276:39779-39787.
- Stutman O (1973) Immunological aspects of resistance to the oncogenic effect of 3-methylcholanthrene in mice. *Isr J Med Sci* 9:217-228.
- Stutman O (1974) Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 183:534-536.
- Stutman O (1975) Immunodepression and malignancy. *Adv Cancer Res* 22:261-422.
- Swann JB and Smyth MJ (2007) Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 117:1137-1146.
- T. H (1983) T-cell function and specificity in athymic mice. *Immunol Today* 4:84-87.
- Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, Iwakura Y, Yagita H and Okumura K (2001) Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med* 7:94-100.
- Takeda K, Nakayama M, Sakaki M, Hayakawa Y, Imawari M, Ogasawara K, Okumura K and Smyth MJ (2011) IFN-gamma production by lung NK cells is

- critical for the natural resistance to pulmonary metastasis of B16 melanoma in mice. *J Leukoc Biol* 90:777-785.
- Takeda K, Oshima H, Hayakawa Y, Akiba H, Atsuta M, Kobata T, Kobayashi K, Ito M, Yagita H and Okumura K (2000) CD27-mediated activation of murine NK cells. *J Immunol* 164:1741-1745.
 - Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H and Okumura K (2002) Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 195:161-169.
 - Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ and Raz A (2007) Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am J Pathol* 170:793-804.
 - Tector M and Salter RD (1995) Calnexin influences folding of human class I histocompatibility proteins but not their assembly with beta 2-microglobulin. *J Biol Chem* 270:19638-19642.
 - Thomas L (1959) In cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. *Ed Lawrence, HS, Hoeber-Harper New York*:529-532.
 - Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, Kraft M, Laplace C, Zwinderman A, Dick TP, Muller J, Schonfisch B, Schmid C, Fehling HJ, Stevanovic S, Rammensee HG and Schild H (2001) Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med* 194:1-12.
 - Toi M, Taniguchi T, Yamamoto Y, Kurisaki T, Suzuki H and Tominaga T (1996) Clinical significance of the determination of angiogenic factors. *Eur J Cancer* 32A:2513-2519.
 - Torres MJ, Ruiz-Cabello F, Skoudy A, Berrozpe G, Jimenez P, Serrano A, Real FX and Garrido F (1996) Loss of an HLA haplotype in pancreas cancer tissue and its corresponding tumor derived cell line. *Tissue Antigens* 47:372-381.
 - Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A and Kelly A (1990) Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* 348:741-744.
 - Trowsdale J, Young JA, Kelly AP, Austin PJ, Carson S, Meunier H, So A, Erlich HA, Spielman RS, Bodmer J and et al. (1985) Structure, sequence and polymorphism in the HLA-D region. *Immunol Rev* 85:5-43.
 - Turner NC and Reis-Filho JS (2012) Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *Lancet Oncol* 13:e178-185.
 - Uebel S, Meyer TH, Kraas W, Kienle S, Jung G, Wiesmuller KH and Tampe R (1995) Requirements for peptide binding to the human transporter associated with antigen processing revealed by peptide scans and complex peptide libraries. *J Biol Chem* 270:18512-18516.
 - Uhr JW, Scheuermann RH, Street NE and Vitetta ES (1997) Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches. *Nat Med* 3:505-509.
 - Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T and Van den Eynde BJ (2003) Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9:1269-1274.
 - Vabulas RM and Hartl FU (2005) Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function. *Science* 310:1960-1963.
 - Van den Eynde B (2003) [A new mechanism of tumor resistance to the immune system, based on tryptophan breakdown by indoleamine 2,3-dioxygenase]. *Bull Mem Acad R Med Belg* 158:356-363; discussion 364-355.
 - Van Dyke T and Jacks T (2002) Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell* 108:135-144.

- van Endert PM, Tampe R, Meyer TH, Tisch R, Bach JF and McDevitt HO (1994) A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity* 1:491-500.
- Van Kaer L (2001) Accessory proteins that control the assembly of MHC molecules with peptides. *Immunol Res* 23:205-214.
- Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Ploegh HL and Tonegawa S (1992) TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell* 71:1205-1214.
- van Stipdonk MJ, Badia-Martinez D, Sluijter M, Offringa R, van Hall T and Achour A (2009) Design of agonistic altered peptides for the robust induction of CTL directed towards H-2Db in complex with the melanoma-associated epitope gp100. *Cancer Res* 69:7784-7792.
- Vicari AP, Caux C and Trinchieri G (2002) Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Semin Cancer Biol* 12:33-42.
- Vigouroux S, Yvon E, Biagi E and Brenner MK (2004) Antigen-induced regulatory T cells. *Blood* 104:26-33.
- Visvader JE (2011) Cells of origin in cancer. *Nature* 469:314-322.
- Vitetta ES, Tucker TF, Racila E, Huang YW, Marches R, Lane N, Scheuermann RH, Street NE, Watanabe T and Uhr JW (1997) Tumor dormancy and cell signaling. V. Regrowth of the BCL1 tumor after dormancy is established. *Blood* 89:4425-4436.
- Wajapeyee N and Somasundaram K (2003) Cell cycle arrest and apoptosis induction by activator protein 2alpha (AP-2alpha) and the role of p53 and p21WAF1/CIP1 in AP-2alpha-mediated growth inhibition. *J Biol Chem* 278:52093-52101.
- Wang GG, Allis CD and Chi P (2007) Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol Med* 13:363-372.
- Wang WS, Chen PM, Wang HS, Liang WY and Su Y (2006) Matrix metalloproteinase-7 increases resistance to Fas-mediated apoptosis and is a poor prognostic factor of patients with colorectal carcinoma. *Carcinogenesis* 27:1113-1120.
- Watnick RS, Cheng YN, Rangarajan A, Ince TA and Weinberg RA (2003) Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 3:219-231.
- Watson NF, Ramage JM, Madjd Z, Spendlove I, Ellis IO, Scholefield JH and Durrant LG (2006) Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int J Cancer* 118:6-10.
- Weckermann D, Muller P, Wawroschek F, Harzmann R, Riethmuller G and Schlimok G (2001) Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: detection and prognostic value. *J Urol* 166:699-703.
- Weiner HL (2001) Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182:207-214.
- Weinhold KJ, Goldstein LT and Wheelock EF (1979) The tumor dormant state. Quantitation of L5178Y cells and host immune responses during the establishment and course of dormancy in syngeneic DBA/2 mice. *J Exp Med* 149:732-744.
- Weng D, Penzner JH, Song B, Koido S, Calderwood SK and Gong J (2012) Metastasis is an early event in mouse mammary carcinomas and is associated with cells bearing stem cell markers. *Breast Cancer Res* 14:R18.

- Wilk S, Chen WE and Magnusson RP (2000) Properties of the beta subunit of the proteasome activator PA28 (11S REG). *Arch Biochem Biophys* 384:174-180.
- Williams AP, Peh CA, Purcell AW, McCluskey J and Elliott T (2002) Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin. *Immunity* 16:509-520.
- Wrenshall LE, Stevens RB, Cerra FB and Platt JL (1999) Modulation of macrophage and B cell function by glycosaminoglycans. *J Leukoc Biol* 66:391-400.
- Xu L, Kitani A, Fuss I and Strober W (2007) Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 178:6725-6729.
- Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B and Iacobuzio-Donahue CA (2010) Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 467:1114-1117.
- Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, Feng XH, Jetten AM and Dong C (2008) Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 29:44-56.
- Yewdell JW (2005) Serendipity strikes twice: the discovery and rediscovery of defective ribosomal products (DRiPS). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51:635-641.
- Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massague J, Mundy GR and Guise TA (1999) TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* 103:197-206.
- York IA, Bhutani N, Zendzian S, Goldberg AL and Rock KL (2006a) Tripeptidyl peptidase II is the major peptidase needed to trim long antigenic precursors, but is not required for most MHC class I antigen presentation. *J Immunol* 177:1434-1443.
- York IA, Brehm MA, Zendzian S, Towne CF and Rock KL (2006b) Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) trims MHC class I-presented peptides in vivo and plays an important role in immunodominance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9202-9207.
- York IA, Chang SC, Saric T, Keys JA, Favreau JM, Goldberg AL and Rock KL (2002) The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol* 3:1177-1184.
- York IA, Goldberg AL, Mo XY and Rock KL (1999) Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol Rev* 172:49-66.
- York IA and Rock KL (1996) Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 14:369-396.
- Yu P, Spiotto MT, Lee Y, Schreiber H and Fu YX (2003) Complementary role of CD4+ T cells and secondary lymphoid tissues for cross-presentation of tumor antigen to CD8+ T cells. *J Exp Med* 197:985-995.
- Yu W, Kim J and Ossowski L (1997) Reduction in surface urokinase receptor forces malignant cells into a protracted state of dormancy. *J Cell Biol* 137:767-777.
- Yue FY, Dummer R, Geertsen R, Hofbauer G, Laine E, Manolio S and 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.

- Zaitseva J, Oswald C, Jumpertz T, Jenewein S, Wiedenmann A, Holland IB and Schmitt L (2006) A structural analysis of asymmetry required for catalytic activity of an ABC-ATPase domain dimer. *EMBO J* 25:3432-3443.
- Zaks TZ, Chappell DB, Rosenberg SA and Restifo NP (1999) Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *J Immunol* 162:3273-3279.
- Zanesi N, Fidanza V, Fong LY, Mancini R, Druck T, Valtieri M, Rudiger T, McCue PA, Croce CM and Huebner K (2001) The tumor spectrum in FHIT-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10250-10255.
- Zeidler R, Eissner G, Meissner P, Uebel S, Tampe R, Lazis S and Hammerschmidt W (1997) Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood* 90:2390-2397.
- Zeng YX, Somasundaram K and el-Deiry WS (1997) AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21WAF1/CIP1 expression. *Nat Genet* 15:78-82.
- Zhang Q and Salter RD (1998) Distinct patterns of folding and interactions with calnexin and calreticulin in human class I MHC proteins with altered N-glycosylation. *J Immunol* 160:831-837.
- Zhang Q, Tector M and Salter RD (1995) Calnexin recognizes carbohydrate and protein determinants of class I major histocompatibility complex molecules. *J Biol Chem* 270:3944-3948.
- Zinkernagel RM and Doherty PC (1997) The discovery of MHC restriction. *Immunol Today* 18:14-17.

ANEXOS

I. ARTÍCULOS

Artículos publicados de esta tesis doctoral:

Romero I, Martínez M, Garrido C, Collado A, Algarra I, Garrido F, García-Lora AM. **The tumour suppressor Fhit positively regulates MHC class I expression on cancer cells.** J Pathol. 2012 Mar 27.

Artículos en preparación de esta tesis:

1.- Romero et al. **Intratumor heterogeneity in MHC-I expression in different clones of a primary tumour determines their oncogenic & metastatic behavior.** Manuscript in preparation

2.- Romero et al. **Spontaneous metastases are totally controlled in dormancy state by T & NK cells.** Manuscript in preparation

Artículos publicados relacionados con esta tesis:

Garrido C, Romero I, Berruguilla E, Cancela B, Algarra I, Collado A, García-Lora A, Garrido F. **Immunotherapy eradicates metastases with reversible defects in MHC class I expression.** Cancer Immunol Immunother. 2011 Sep; 60(9):1257-68. Epub 2011 May 8.

Garrido C, Paco L, Romero I, Berruguilla E, Stefansky J, Collado A, Algarra I, Garrido F, García-Lora AM. **MHC class I molecules act as tumor suppressor genes regulating the cell cycle gene expression, invasion & intrinsic tumorigenicity of melanoma cells.** Carcinogenesis. 2012 Mar;33(3):687-93. Epub 2012 Jan 4.

Otros trabajos publicados durante el desarrollo de la tesis doctoral:

Jimenez-Medina E, Berruguilla E, Romero I, Algarra I, Collado A, Garrido F, Garcia-Lora A. **The immunomodulator PSK induces in vitro cytotoxic activity in tumour cell lines via arrest of cell cycle & induction of apoptosis.** BMC Cancer. 2008 Mar 24;8:78.

Enrique Berruguilla, Eva Jiménez-Medina, Irene Romero, Cristina Garrido, Ignacio Algarra, Antonia Collado, Federico Garrido & Ángel García-Lora. **Complementary antitumor properties of a Calendula extract: cytotoxic & immunomodulatory activity.** In "Herbal Medicine: A cancer chemoprevention

& therapeutic perspective". Ed: Rajesth Arora: Jayppe Brothers Medical Publisher. 2010: 79-97. Capítulo Libro.