

Metástasis: Aspectos biológicos de su desarrollo y avances terapéuticos

A. Alonso-Varona*, T. Palomares**, P. Bilbao**,
Y. Calle*, B. Castro*, E. Barberá-Guillem***

* Dpto. de Biología Celular y Ciencias Morfológicas.

** Dpto. de Cirugía y Medicina Física. Fac. Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco.

***Dpto. de Patología. Fac. de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia.

Introducción

El desarrollo de metástasis determina el factor pronóstico y, en consecuencia, las expectativas de vida de los enfermos cuando se diagnostica una enfermedad tumoral. Desde un punto de vista clínico, podemos considerar la metástasis como el resultado final de la historia natural de la mayor parte de los tumores. Esta evolución es la consecuencia de la diseminación y asentamiento de las células tumorales que constituyen el tumor primario en órganos situados a distancia de aquel en el que se originó la enfermedad inicialmente.

Para la comprensión de este proceso desde un punto de vista biológico, es necesario el análisis de las etapas secuenciales de la denominada “cascada metastática”:

1.-Tumor primario: las neoplasias malignas están constituídas por poblaciones celulares que muestran un rango amplio de heterogeneidad biológica en cuanto a las propiedades de la superficie celular, antigenicidad, inmunogenicidad, índice proliferativo, sensibilidad a los citostáticos y expresión de cualidades fenotípicas que les permiten invadir otros tejidos (1,2).

2.-Invasión local: el comportamiento invasor inicial se justifica por la presión mecánica ejercida por el tejido proliferativo (3); por la acción de enzimas proteolíticas (hidrolasas lisosómicas, colagenasas) que reducen la organización molecular de las barreras hísticas disminuyendo así la resistencia a la invasión (4,5); y, circunstancialmente, por la capacidad de desplazamiento expresada por algunos tipos de células metastáticas especialmente invasivas (6,7).

3.-Diseminación de las células tumorales: en la mayor parte de los casos se realiza a través del sistema sanguíneo y/o linfático. Esta entrada se encuentra facilitada por la estructura de la microcirculación, especialmente en vasos neoformados con endotelio fenestrado o discontinuo, escasez de uniones intercelulares estables entre las células endoteliales y membrana basal discontinua o ausente (8). Una vez que las células tumorales han penetrado en la microcirculación, son transportadas pasivamente hasta órganos distantes. En sistemas experimentales, está demostrado que el proceso metastático es ineficaz en esta etapa: la mayor parte de las células tumorales inyectadas por vía intravenosa en un animal mueren. Esta muerte masiva (ineficacia) es debida probablemente a traumas en el regimen de turbulencia de la corriente sanguínea, a la escasa deformabilidad de las células neoplásicas (9) y/o a la acción de macrófagos, células NK y linfocitos T citotóxicos (10).

4.-Implantación e invasión secundaria de las células tumorales: las observaciones clínicas demuestran que la mayor parte de los tumores primarios tienen una tendencia a metastatizar de modo preferente en determinados órganos (11). Así, los carcinomas de mama tienden a diseminarse por el cerebro y pulmones; los tumores pulmonares desarrollan metástasis en el cerebro y las glándulas suprarrenales; y el carcinoma de próstata lo hace en el hueso. Otros patrones de colonización se han descrito también en los sistemas experimentales (12). Estos datos permiten sostener la idea de que ciertas características específicas de las células tumorales circulantes, de los endotelios de los órganos diana y del microambiente de cada órgano podrían estar implicados en la localización de los focos tumorales secundarios al tumor primario (13,14).

Tras la adhesión de las células tumorales al endotelio microvascular comienza una de las etapas más estudiadas del proceso metastático: la extravasación de las células tumorales en el órgano diana. Este paso se realiza preferentemente en el lecho microvascular utilizando los pasos transendoteliales abiertos previamente por los linfocitos y macrófagos localizados en la zona de retención de las células tumorales, provocando una lisis enzimática o citotóxica de las células endoteliales o por presión mecánica tras la proliferación intraluminal de las células tumorales (15,16). Una vez superada la barrera endotelial, la capacidad de las células tumorales para producir enzimas que degradan los componentes de la membrana basal y del tejido conectivo subyacente, facilita el desplazamiento de estas células hacia el parénquima del órgano diana.

La organización de los nuevos focos tumorales está modulada por factores tales como: el status endocrino del órgano huésped, la existencia de inflamación local, la respuesta inmune propia del órgano y la liberación de factores de crecimiento (17,18,19).

Patrón de distribución metastático no aleatorio

Históricamente existen dos argumentos para explicar el fenómeno de la selectividad de las metástasis:

a) según la teoría mecanicista de J. Ewing (20), el factor determinante para predecir el patrón de metastatización de los tumores es la posición hemodinámica relativa de cada órgano respecto a aquel que alberga el tumor primario. Estudios posteriores demuestran que las metástasis extrapulmonares son escasas cuando se inyectan células tumorales por la vena de la cola en animales de experimentación (21). Así, si la tasa de células tumorales que llegan a un órgano está determinada en buena medida por su irrigación sanguínea, los factores hemodinámicos deben influir notoriamente en la frecuencia metastática. Por otro lado, si los complejos fenómenos de interacción entre las células tumorales y el órgano receptor durante la colonización fueran similares en todos los tejidos metastatizados, cabría esperar una relación estrecha entre algunos parámetros del abastecimiento sanguíneo a cada órgano y la incidencia de metástasis en éstos. Weiss y colaboradores (22) estudiaron un grupo de enfermos en cuya autopsia se detectaron metástasis hepáticas y pulmonares. Los casos seleccionados fueron separados en dos grupos dependiendo del drenaje venoso preferente, hacia la circulación portal o hacia la cava, del tumor primario. Se intentó correlacionar la incidencia de metástasis en 10 órganos seleccionados con las siguientes características de cada órgano: peso total, volumen sanguíneo, volumen sanguíneo/gramo de órgano, tiempo de tránsito sanguíneo, flujo sanguíneo y flujo sanguíneo/gramo de órgano. Los resultados obtenidos demostraron que no había correlación entre la frecuencia de metástasis y los parámetros estudiados.

b) según la teoría del “seed and soil” de Paget (23), la capacidad de colonización metastática está determinada por las propiedades intrínsecas de las células tumorales (“seed”) y/o el lugar de asiento (“soil”). Así, se han estudiado factores derivados de extractos de órganos diana que pueden tener un efecto estimulante o inhibidor del crecimiento de las células tumorales (24). Además, la implantación subcutánea de fragmentos de órganos y la posterior inyección de células tumorales, con reconocida afinidad por un órgano determinado, demostró que la colonización se producía en este órgano y también en el fragmento de órgano homólogo transplantado (25,26). Por otro lado, se postula la existencia de una adhesión específica de las células tumorales a algún elemento hístico del órgano diana: mediante moléculas de reconocimiento específico por interacción frontal de dos perfiles complementarios de moléculas localizadas en la superficie de ambos tipos celulares, o por interacción del tipo llave-cerradura en la que podrían participar moléculas proteicas.

Otras pruebas a favor de la adhesión específica de las células tumorales, como condición previa para que se produzca la metástasis, son los estudios de inhibición específica de la metástasis mediante el bloqueo de la adhesión de las células tumorales al endotelio, con un anticuerpo monoclonal dirigido a determinantes específicos de la superficie de las células tumorales (27). La modificación enzimática de los componentes de la superficie celular sin alterar la viabilidad de las células da lugar a una modificación del comportamiento metastático (28). La modificación selectiva de biosíntesis de glicoproteínas origina variaciones en la capacidad de adhesión de las células tratadas y se correlaciona con el fracaso en la formación de focos metastáticos (29).

En nuestro modelo experimental, utilizamos inicialmente el hígado como órgano diana para provocar el desarrollo de metástasis. La estructura histológica de este órgano permite definir zonas funcionales en el acino hepático atendiendo a la actividad enzimática mitocondrial de los hepatocitos (succinato-deshidrogenasa). La reacción histoquímica para la SDH sobre secciones histológicas y la utilización de técnicas de microespectrofotometría y microdensitometría, nos permitió determinar un gradiente de actividad en los hepatocitos que discurren paralelos al trayecto sinusoidal hepático entre su extremo venoso portal y las vénulas terminales hepáticas (Fig.1). De esta forma pudimos establecer una correlación y una función matemática general entre los perfiles de intensidad o de densidad óptica relativa y los valores de distancia entre las venas portales y las venas terminales hepáticas (30). La ecuación obtenida se puede utilizar para interpolar los valores de la actividad SDH de los hepatocitos, que rodean cualquier estructura u objeto incluido en el parénquima hepático, con los valores de una escala relativa de 0 a 10 correspondiente a la distancia teórica entre los extremos sinusoidales (Fig.2).

Una vez establecida la referencia anatómica y funcional del hígado, recurrimos a la inoculación de las células tumorales por la vía intraesplécnica con el fin de que accedieran a este órgano. Comprobamos que las células tumorales alcanzan la microcirculación hepática pasando a la red sinusoidal donde son retenidas de

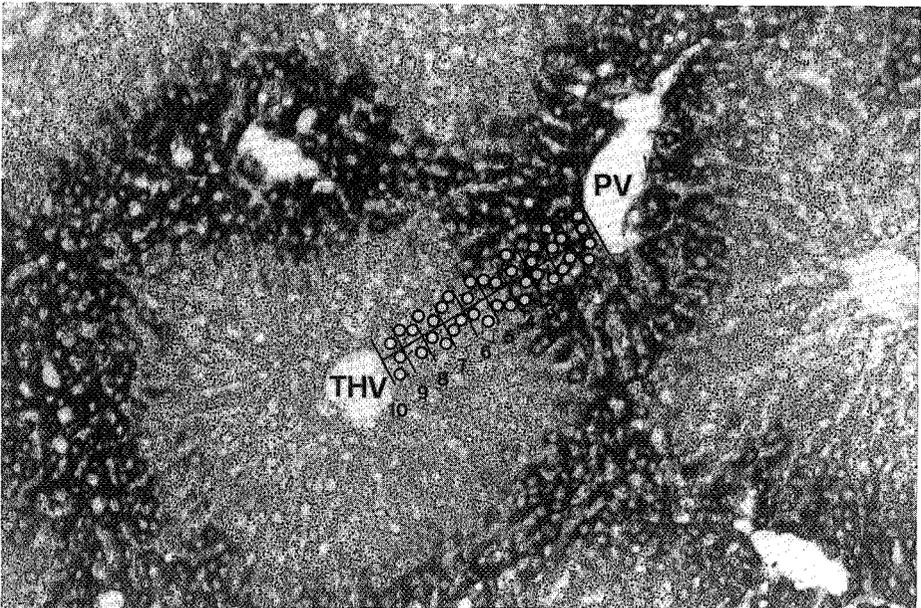


Figura 1.- Sección histológica del hígado de ratones tras la reacción histoquímica para la Succinato-deshidrogenasa. Se muestra el trayecto entre la vena portal (PV) y la vénula hepática terminal (THV). La línea imaginaria que une estos dos vasos está dividida en 10 segmentos, en los cuales se realiza la medida citofotométrica de la cantidad de cromóforo en cada uno de los citoplasmas de los hepatocitos.

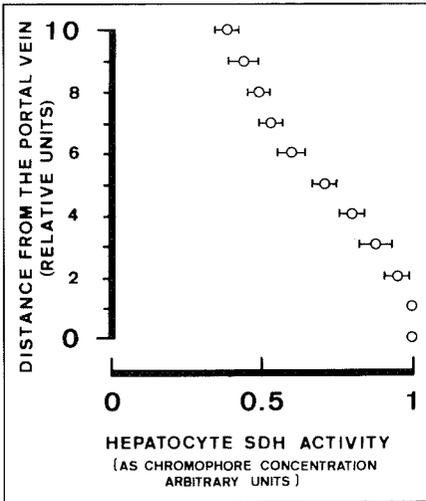


Figura 2.- Curva del gradiente acinar de la actividad SDH de los hepatocitos, calculada mediante la medida citofotométrica en 10 puntos equidistantes de una línea imaginaria que une los vasos portales y los vasos centrales.

manera estable. Demostramos que, ya en los estadios iniciales, la presencia de estas células tumorales provoca una reacción difusa en todo el órgano objetivo por: a) una reducción del patrón de fenestración del endotelio sinusoidal en todo su trayecto desde los vasos portales hasta las venas centrales, que es significativamente más acusado en el segmento sinusoidal de la zona 3 del acino hepático; b) una modificación de la capacidad fagocítica de las células de Kupffer dependiendo del tipo de células tumorales utilizado (31). A pesar de esta respuesta sinusoidal, el proceso metastático progresa hasta la formación de focos micrometastáticos en el plazo de 5 a 7 días.

Cuando estudiamos la distribución de los focos metastáticos sobre

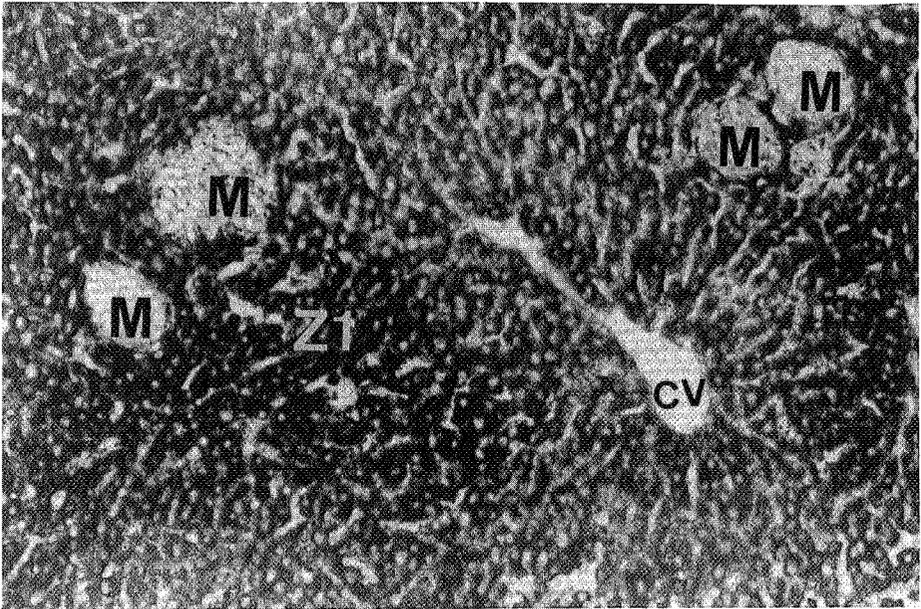


Figura 3.- Sección histológica del hígado de ratones 7 días tras la inoculación de células del Melanoma B16F10. Las micrometástasis (M) se identifican como pequeños focos no teñidos localizados en la zona donde los hepatocitos tienen elevada actividad SDH: zona 1. El parénquima que rodea la vena central (CV) se encuentra libre de metástasis.

secciones histológicas sometidas a la reacción histoquímica de la succinato-deshidrogenasa (donde podemos establecer la zonación funcional del acino hepático) comprobamos que las micrometástasis se localizan en la zona 1 del acino (Fig.3), específicamente en los segmentos periportales de la red sinusoidal independientemente de la capacidad metastática de las líneas celulares empleadas, de la vía de inoculación, de la estirpe de los animales (rata o ratón) e incluso de las modificaciones microambientales inducidas en la arquitectura sinusoidal, la distribución de las células de Kupffer y la composición de la matriz extracelular del espacio de Disse (Fig.4)(32).

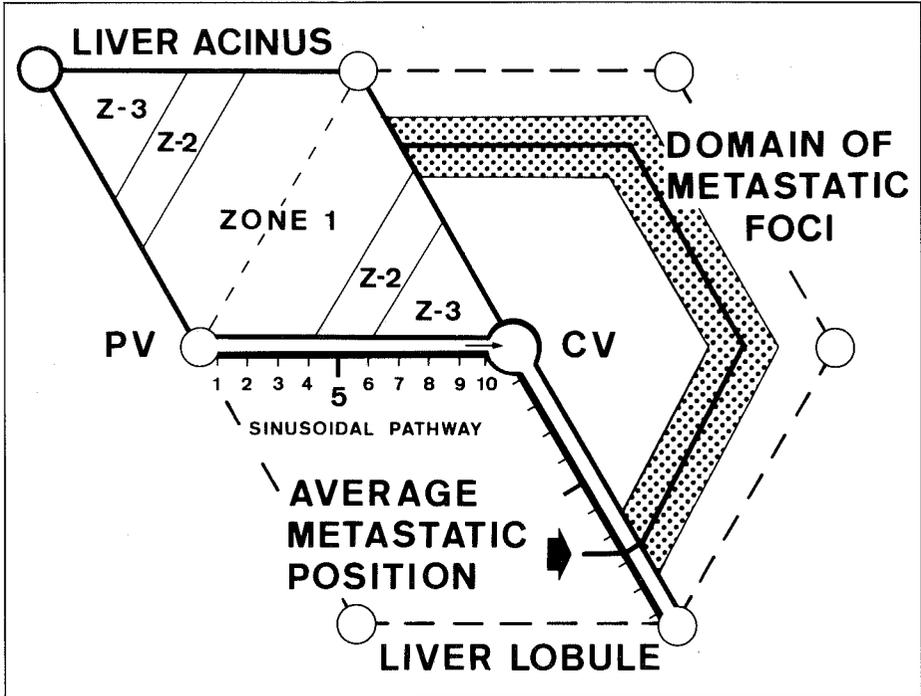


Figura 4.- Diagrama que representa los modelos acinar y lobulillar de la organización tisular del hígado. Los sinusoides hepáticos se distribuyen desde los vasos portales (PV) hasta las venas centrales (CV), definiendo un trayecto al que hemos adjudicado una escala de 0 (en el extremo portal) a 10 (en el extremo venoso central). La trama delimita la zona donde específicamente se desarrollan los focos tumorales.

Estos datos plantean la necesidad de realizar el estudio del destino inicial de las células tumorales que acceden al hígado. Las células tumorales marcadas in vitro con Bromodeoxiuridina (BrdUrd) pueden ser detectadas en las secciones histológicas con un anticuerpo monoclonal frente a las secuencias BrdUrd. Utilizando esta técnica, se demostró que la mayor parte de las células inyectadas fue-

ron retenidas en la red microcirculatoria y que estas células fueron destruidas durante la primera hora (Fig.5). Sólo una pequeña proporción de estas células permanecen viables en el hígado al menos 72 horas. Esta destrucción masiva de células podría ser llevada a cabo por factores mecánicos (estrechamiento de la luz sinusoidal), la acción fagocítica de las células de Kupffer o por la acción de las células Pit (células NK), ya que el tratamiento de los animales con Ciclosporina A (un agente inmunosupresor) se correlaciona con un incremento en el número de células tumorales retenidas en el hígado (33).

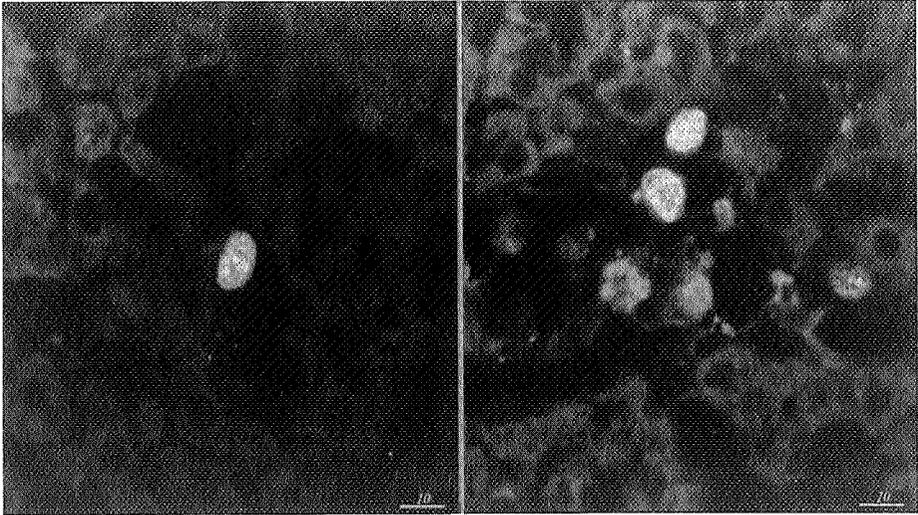


Figura 5.- Imágenes obtenidas con microscopio confocal. a) célula tumoral aislada retenida en la luz sinusoidal microvascular hepática. b) destrucción intrasinusoidal de células del Melanoma B16F10, se ven núcleos de células intactas y fragmentos nucleares.

Un estudio más detallado de la posición de las células tumorales retenidas en el hígado demostró que, a pesar de que se localizan en todo el trayecto sinusoidal, el mayor porcentaje se encuentra en los segmentos periportales. Estos datos sugieren la participación de las células endoteliales en el fenómeno de retención de las células tumorales, teóricamente comparable con el “homing linfocitario” de las vénulas postcapilares del ganglio linfático.

Aun cuando se desconocen los factores que determinan esta especificidad en la colonización metastática del hígado, es importante destacar que no se trata de un mecanismo específico del proceso tumoral. El tratamiento de los animales con Fenilhidracina provoca una anemia hemolítica y la aparición de focos hematopoyéticos intrasinusoidales hepáticos que coinciden espacialmente en su localización con los focos metastáticos. Además, cuando se produce una coincidencia temporal de los dos procesos, la presencia de los focos hematopoyéticos induce

un aumento significativo del volumen metastático, debido probablemente a la existencia de algún tipo de interacciones locales entre las células hematopoyéticas y las tumorales (34).

Otro órgano susceptible de ser metastatizado con gran frecuencia es el pulmón. Para la inducción de focos tumorales en el parénquima pulmonar, las células tumorales se inoculan por la vena de la cola en ratas y ratones. Siguiendo el mismo procedimiento de marcaje de las células tumorales en cultivo con BrdUrd, pudimos establecer el ritmo de eliminación de estas células en el pulmón: la desaparición del 90% de las células se produce en la primera hora tras la inoculación. La población de células que sobrevive en esta primera hora, permanece al menos hasta las 24 horas postinoculación y su número se correlaciona con el de los focos tumorales que se encuentran al cabo de 15 días.

Ya que el pulmón presenta mayores dificultades que el hígado para definir territorios funcionales diversos, planteamos la posibilidad de establecer regiones en función de las características del glicocáliz de las células endoteliales. Para ello se inocularon treinta lectinas, asociadas a un fluorocromo, con afinidad para diferentes terminaciones oligosacáridas. De todas ellas la WGA (Weat germ agglutinin) delimitaba dos tipos de segmentos vasculares: segmentos WGA⁺ y WGA⁻ según la lectina quedará o no adherida a la superficie luminal de las células endoteliales (Fig.6). La combinación del marcaje de las células tumorales, para su identificación en secciones histológicas, y la regionalización de los seg-

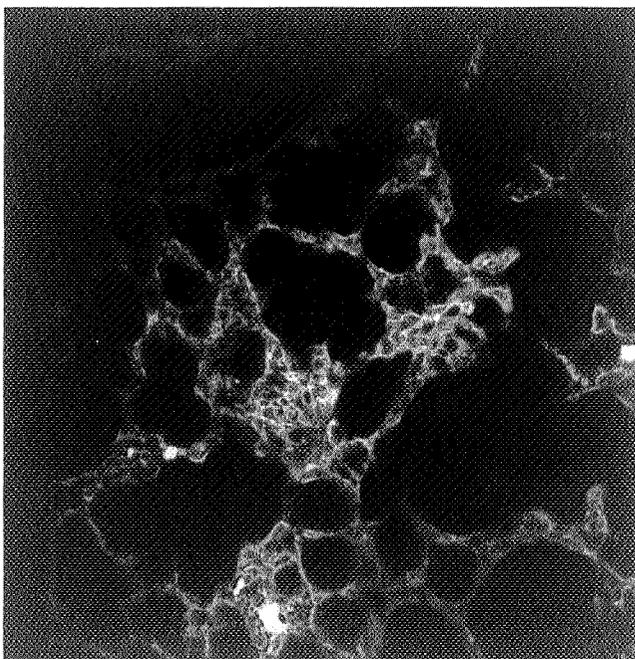


Figura 6.- Sección óptica, obtenida mediante microscopio confocal, de pulmón de ratón perfundido por la vía intraarterial con la lectina WGA. Las zonas brillantes corresponden a segmentos microvasculares WGA+.

mentos vasculares permitió demostrar que las células tumorales quedan retenidas en el 80% de los casos en regiones WGA⁺.

Por otro lado, cuando los focos se desarrollan, lo hacen con más frecuencia (85%) en las regiones pleurales y subpleurales que en la zona parenquimatosa central de los pulmones (15%), a pesar de que esta última región es mayor en términos de volumen. Estos datos demuestran que la distribución de las metástasis tampoco es aleatoria en el pulmón.

Heterogeneidad del endotelio sinusoidal hepático. Posible implicación en la adhesión de las células tumorales

Existen evidencias experimentales recientes de la adhesión selectiva de células tumorales a determinados tipos de endotelio (35,36,37). Así, algunos tipos celulares se adhieren “in vitro” selectivamente al endotelio aislado del órgano donde producen la colonización “in vivo”.

En el caso del hígado, aún cuando se desconocen los factores concretos responsables de la selectividad de la implantación, se han identificado variaciones en las características biológicas de los sinusoides periportal y perivenoso. Jungerman y Katz (38) han descrito la existencia de gradientes metabólicos, hormonas, eicosanoides y mediadores de la inflamación, en el trayecto sinusoidal; también hay variaciones zonales de la distribución, capacidad proliferativa y actividad fagocítica de las células de Kupffer (39). Considerando que las células tumorales establecen relación inicialmente con las células endoteliales, es importante revisar algunos datos relativos a la heterogeneidad de las células endoteliales que tapizan la primera o la segunda mitad del sinusoides. En la zona 1 el endotelio es menos poroso que en la zona 3, dato que sugiere una comunicación menor entre la luz sinusoidal y el espacio de Disse en la zona 1. La pared del endotelio sinusoidal de la zona 3 facilita la intravasación de células hematopoyéticas creando poros de gran tamaño, incluso hasta después del nacimiento. Las células endoteliales de las zonas 1 y 3 se distinguen por las características de los carbohidratos de su superficie glicoproteica. La zona 1 tiene concentraciones mayores de Ac. N-acetil-neuramínico, galactosa y N-acetil-glucosamina, mientras que manosa y glucosa se encuentran distribuidas de forma más homogénea en todo el trayecto sinusoidal. Un estudio cuantitativo más detallado de la unión de la lectina WGA (Wheat germ agglutinin) demuestra que las células endoteliales de la zona 1 tienen un número seis veces mayor de sitios de unión para esta lectina que las células endoteliales de la zona 3 (40).

Los sinusoides que derivan directamente de las venas portales (estrellas portales) (Fig.7), así como los sinusoides septales, están formados por células endoteliales de elevada afinidad por la WGA, mientras que las células endoteliales que tapizan la segunda mitad del sinusoides carecen de afinidad por esta lectina. Esta distribución de los tipos de células endoteliales coincide con las zonas funcionales definidas en el acino hepático: endotelio WGA⁺ en zona 1 del acino hepático (alta actividad SDH) y endotelio WGA⁻ en zona 3 del acino hepático (baja actividad SDH) (Fig.8).

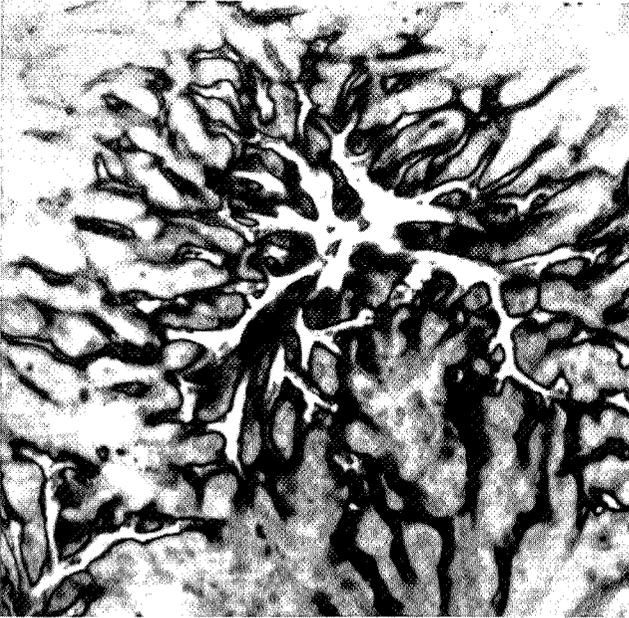


Figura 7.- Reconstrucción tridimensional de la sección transversal de un vaso portal y los sinusoides originados en él. Para la obtención de las secciones ópticas se realizaron secciones histológicas gruesas (50 μm) de hígado de ratón perfundido por la vía venosa portal con lectina WGA. El marcaje corresponde a la pared sinusoidal con afinidad por la lectina.

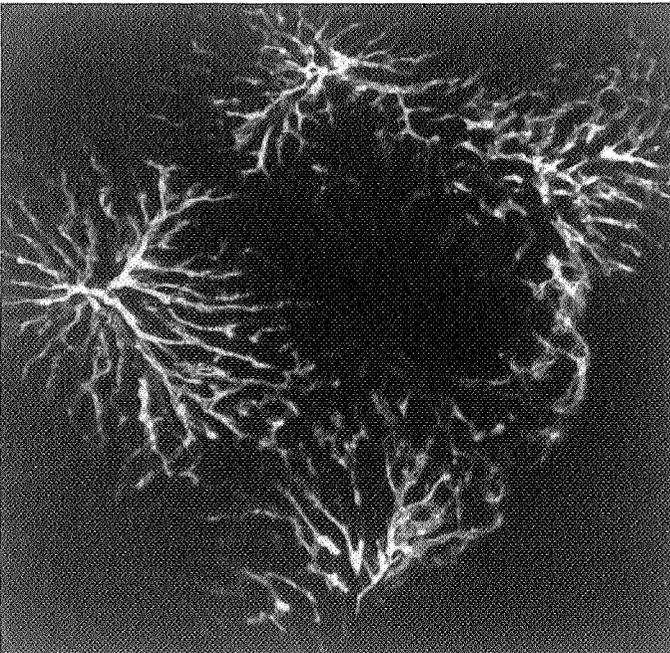


Figura 8.- Reconstrucción tridimensional de los vasos (venas portales y sinusoides) WGA⁺. En la imagen se reproduce el esquema de organización del parénquima hepático según el modelo de Rappaport.

Interacción tumor-microambiente del huesped

El asentamiento y proliferación de las células tumorales potencialmente metastáticas en un órgano específico, lleva implícito la continua evasión de las defensas del huesped, el desarrollo de aporte vascular y, según estudios recientes, depende también de la existencia de interacciones bidireccionales entre las células tumorales y el microambiente celular del órgano compatible.

Las células tumorales son capaces de secretar diversas citocinas que afectan a las diferentes células del huesped (células endoteliales, fibroblastos, células cebadas, macrófagos y las propias células del parénquima) y a la matriz extracelular, las cuales, a su vez, secretan diversos factores que recíprocamente afectan a las células metastáticas. El resultado de este diálogo celular determinará, en gran medida, la inhibición o el estímulo de la proliferación de las células tumorales y el desarrollo de la metástasis en un órgano específico (41).

Sin embargo, esta regulación del crecimiento metastático a través de la secreción recíproca de citocinas es un proceso dinámico, de tal manera que, a medida que existe una progresión de la metástasis, se producen alteraciones en la respuesta de las células tumorales a las moléculas inhibitoras y estimuladoras del crecimiento derivadas de las células del huesped. En este sentido Garth Nicolson (42) establece tres estadios de progresión metastática: paracrino, autocrino y acrino.

La tendencia de las células tumorales a metastatizar y crecer preferentemente en localizaciones específicas, sugiere que los estadios precoces de la progresión metastática están dominados por mecanismos de crecimiento paracrino, en términos de respuesta a los factores de crecimiento locales del órgano diana. Como ejemplo de modelo de regulación paracrina, es el crecimiento y producción de metástasis hepáticas específicas de células tumorales del carcinoma de colon humano y la respuesta de éstas, a través de receptores apropiados, a la acción paracrina de factores de crecimiento como el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), sintetizado y secretado por las células de Ito, Kupffer y endoteliales hepáticas, y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa) secretado por los hepatocitos (43). Otro ejemplo, es la utilización de la transferrina como factor de crecimiento por parte de diferentes líneas tumorales como las células del carcinoma de próstata que metastatizan en hueso (44).

A medida que se va produciendo la diseminación tisular y orgánica tumoral, son los mecanismos de crecimiento autocrino los que parecen gobernar la respuesta de crecimiento de las células metastáticas. Se va produciendo así, una pérdida progresiva de la sensibilidad a los inhibidores del crecimiento y una disminución de los requerimientos a los factores estimuladores exógenos. El melanoma maligno es un buen ejemplo de esta independencia en los sucesivos estadios de progresión tumoral. Estudios "in vitro" demuestran que las células del melanoma primario requieren diversos factores de crecimiento exógenos como el factor de crecimiento fibroblástico beta (FGF-beta) y el factor de crecimiento insulina-like (IGF-1) (45). En contraste, las células del melanoma metastático requieren, en menor medida, la presencia de estos factores exógenos, como lo demuestra el

hecho de la rápida adaptación de estas células al crecimiento “in vitro” medio de cultivo y en ausencia de suero (46). Estas células tumorales son capaces de secretar de forma autocrina sus propios factores de crecimiento como FGF, PDGF, TGF-alfa, TNFs, IL-1, IL-6, etc. (47-49), lo que propicia la autonomía de estas células en su progresión tumoral.

Finalmente, esta progresiva autonomía, como resultado de la acumulación de múltiples alteraciones, produciría en las células tumorales un estado en el que existiría una falta absoluta de regulación en las señales nucleares activas (estado acrino), con una independencia total a los multi-factores de crecimiento estimuladores o inhibidores endógenos y exógenos, pudiendo producirse, virtualmente, la colonización metastática de cualquier tejido (42).

Interacción tumor-sistema inmune

1.-Sistema inmune y citocinas. El descubrimiento de la existencia de una respuesta inmune antitumoral, fue sugerida a principios de siglo por Ehrlich (50) y Bashford (51) (quienes, respectivamente, denominaron a los antígenos tumorales “gérmenes aberrantes” y “factor responsable de regresión”), y mantenido por Burnet en 1957 (52), con su teoría de la vigilancia inmunológica (el desarrollo de tumor representaría una alteración o fracaso de la función protectora del sistema inmune). Esto datos junto con la observación de regresiones espontáneas de algunos tumores, el desarrollo tardío de metástasis en ciertas neoplasias o la mayor frecuencia del cáncer en pacientes inmunodeprimidos, como el sarcoma de Kaposi en el SIDA, ha ido configurando el marco inmunológico en el control del cáncer y la posibilidad de la manipulación del sistema inmune para tal fin.

En la defensa antitumoral, el sistema inmune presenta dos tipos de mecanismos: uno de resistencia natural celular y humoral, que supone la primera barrera de defensa del organismo sin requerir una inmunización previa, teniendo especial trascendencia en el control frente a la aparición de metástasis; y un segundo mecanismo inducido que se corresponde con la respuesta inmunológica generada frente al antígeno tumoral, participando también células y anticuerpos. Este último mecanismo de acción se basa en un complejo sistema celular regulado por un entramado de factores de crecimiento denominado “red de citocinas”, que establecen una serie de interconexiones de señales necesarias para el reconocimiento de la célula tumoral y la expansión clonal de las células efectoras citotóxicas (Fig.9).

Inicialmente, las células presentadoras de antígenos captan, procesan y presentan el antígeno tumoral a la célula T. Esta, a su vez, precisa dos señales estimuladoras: una procedente de la unión del receptor antigénico específico, y la segunda señal o “coestimulación” debida a moléculas como la proteína B7/BB1 que se engarza con la proteína CD28 presente en la superficie del linfocito T. Ambas señales, probablemente sólo puedan ser transmitidas por células muy especializadas como los macrófagos, células B y células dendríticas, interviniendo en este estímulo inicial las señales accesorias de las citocinas IL-1, IL-4 e IL-6 (53). La célula T activada sintetiza y secreta otros factores de crecimiento solu-

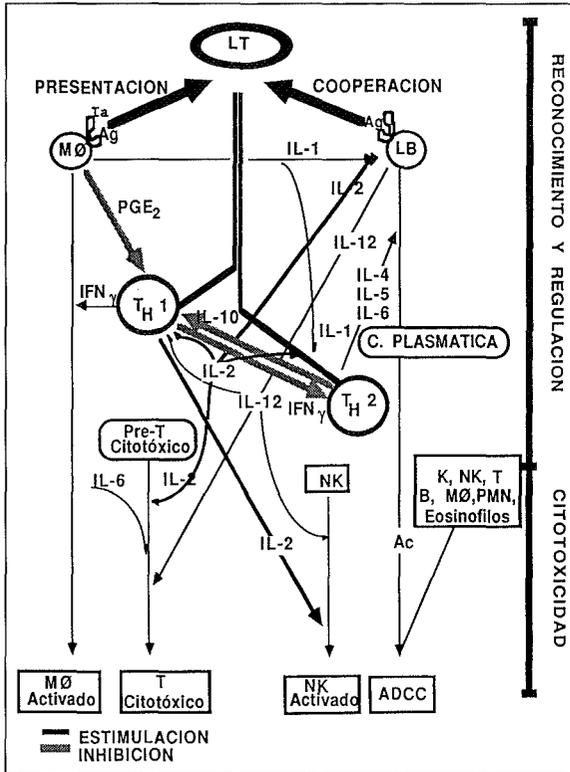


Figura 9.- Sistema inmunitario: reconocimiento antigénico, regulación de la respuesta inmune por la red de citocinas y activación de la función efectora citotóxica.

bles, como la IL-2 y el IFN-gamma, por parte de la subpoblación de linfocitos T_{H1}, y las interleucinas IL-4, IL-5 e IL-6 por las células T_{H2}, actuando dichas interleucinas como estimuladoras del crecimiento, expandiendo o activando otras poblaciones efectoras citotóxicas (macrófagos, linfocitos T citotóxicos, células NK y la citotoxicidad celular inespecífica dependiente del anticuerpo-ADCC) encargadas de la destrucción de la célula neoplásica (54,55).

Este esquema de funcionamiento del sistema inmune presenta un mecanismo de contrarregulación, debido principalmente a una regulación cruzada existente entre las células T_{H1} y T_{H2}, de tal forma que la secreción de IFN-gamma por parte de las células

T_{H1} inhibe la proliferación de las T_{H2}, y la secreción de IL-10 por parte de estas últimas, inhibe la síntesis de las citocinas secretadas por las T_{H1} (56).

2.-Aplicación de las citocinas a la terapia oncológica. Las citocinas son proteínas o glicoproteínas multifuncionales de bajo peso molecular, secretadas por linfocitos (linfocinas) y monocitos (monocinas), que a través de los receptores celulares de superficie, transmiten las señales de actividad, crecimiento y diferenciación, que modulan el comportamiento del sistema inmune. Entre ellas se incluyen todas las interleucinas (IL-1...IL-12), interferones (alfa, beta y gamma), factores de necrosis tumoral (alfa y beta) y los factores de crecimiento hematopoyético (factores estimuladores de colonias de granulocitos G-CSF, de macrófago M-CSF, y de granulocito-macrófago GM-CSF).

La demostración de la capacidad de las citocinas para modular, no sólo la función inmune, sino también el propio crecimiento tumoral, ha motivado su utili-

zación en estudios “in vitro”, en experimentación animal, así como en ensayos clínicos humanos, persiguiendo este tipo de inmunoterapia activa inespecífica tres objetivos fundamentales. En primer lugar, la estimulación de la proliferación y diferenciación de las células de la estirpe mieloide, mediante la administración de los factores estimuladores de colonias hematopoyéticas con la intención de modular la hematopoyesis durante los períodos de aplicación antitumoral de quimio y/o radioterapia, para prevenir, disminuir o recuperar la hipoplasia de la médula ósea. Por ejemplo, está bien documentada la capacidad del GM-CSF para recuperar la neutropenia y disminuir las complicaciones infecciosas de la quimioterapia estandar en pacientes con linfomas no-Hodgkin de alto riesgo en los que además aumenta el índice de remisiones completas (57), y, en este sentido, ha sido aprobado para su uso en clínica por la Food and Drug Administration (FDA).

El segundo objetivo en el tratamiento antitumoral con inmunomoduladores, es la inhibición directa de la proliferación celular neoplásica mediante la utilización de agentes como el TNF (58), que sin embargo, no ha producido los resultados clínicos esperados, debido a un índice bajo de respuestas objetivas y a una elevada toxicidad sistémica.

El tercer objetivo de la terapia con citocinas, es la potenciación activa de la respuesta inmune del huésped cuya actividad está disminuida. De este modo, sobre todo han demostrado actividad antitumoral los interferones y la IL-2. La utilización del IFNalfa-2b ha producido excelentes resultados en enfermedades como la tricoleucemia (59), leucemia mieloide crónica (60) y trombocitemia esencial (61) obteniendo tasas de respuestas objetivas del 70-90%, siendo menos efectivo en los tumores sólidos, en los que obtiene una tasa de respuestas del 20-40% en el sarcoma de Kaposi (62) y del 15-25% en el melanoma maligno (63) y en el carcinoma de células renales (64).

El descubrimiento de la IL-2 por Morgan y cols. en 1976 (65), revolucionó inicialmente el campo de la inmunoterapia del cáncer. Esta molécula glicoproteica está directamente involucrada en la inducción de casi todas las respuestas inmunes en las que participa el linfocito T, célula-eje sobre la que gira todo el proceso regulador inmunitario. La IL-2 ejerce su actividad antitumoral a través de complejos efectos indirectos en el sistema inmune, estimulando la proliferación de las células T, induciendo la secreción de otras citocinas y activando o estimulando la citotoxicidad a través de los linfocitos T citotóxicos, células LAK, NK y ADCC (66).

Los efectos antineoplásicos de la IL-2 fueron inicialmente documentados por Steven A. Rosenberg, que demostró la inhibición del crecimiento de metástasis hepáticas, pulmonares y dérmicas en una serie de modelos tumorales murinos como sarcomas, melanomas y adenocarcinomas (67). Posteriormente, ensayos clínicos en pacientes con tumores en estadio avanzado, demostraron su actividad antitumoral, sobre todo en el melanoma y carcinoma de células renales con una tasa de respuestas objetivas del 20%, aunque generalmente parciales (68) y asociada a una toxicidad importante (69).

Diversos autores señalaron que la administración de IL-2, en sí misma, era incapaz de activar células líticas suficientes para obtener un mayor número de respuestas clínicas, sobre todo de remisiones completas (70). La observación de la existencia de infiltrados tumorales de células T citotóxicas, NK y macrófagos con capacidad antitumoral mediante citotoxicidad directa y ADCC, dió lugar al planteamiento de otra estrategia inmunoterápica, la inmunoterapia adoptiva. Uno de los primeros procedimientos de transferencia adoptiva fue la administración de células líticas activadas por linfocinas, células LAK, que se generan mediante la estimulación "in vitro" con IL-2 de los linfocitos circulantes aislados del paciente (71). Sin embargo, este tipo de bioterapia sólo produce una tasa de respuestas ligeramente superior a la obtenida con dosis altas de IL-2 sola, aunque con un número mayor de respuestas completas (5-10%) (72).

Con el afán de incrementar la potencia lítica antitumoral y disminuir la toxicidad, se desarrolló posteriormente un nuevo tipo de terapia celular adoptiva, consistente en la administración de dosis inferiores de IL-2 y linfocitos infiltrantes del tumor (TILs), obtenidos de la resección previa de tejido neoplásico y expandidos "in vitro" con dicha citocina. Los TILs son una población celular compuesta, predominantemente, por células T con la característica de ser especialmente citotóxicas para las células tumorales autólogas de la neoplasia que infiltran, demostrando una eficacia 50-100 veces superior que las células LAK (73). En el protocolo de tratamiento con TILs, Rosenberg incluyó la administración previa de ciclofosfamida (CY), citostático que administrado a dosis bajas es capaz de eliminar selectivamente las células T supresoras, facilitando de este modo el "homing linfocitario", aumentando así los efectos antitumorales de los TILs.

Los primeros resultados de la aplicación clínica de esa terapia en pacientes con melanoma maligno, mostraron un índice de respuestas del 55% (74). Sin embargo, estudios posteriores señalan que el tratamiento con TILs produce una tasa de respuestas objetivas similar al tratamiento con IL-2 sola o combinada con células LAK (75).

3.-Controversias del tratamiento con citocinas. Clásicamente se ha considerado al sistema inmune el factor antitumoral fundamental, sin embargo, en múltiples situaciones parece desviarse el papel del mismo en la supresión del cáncer. La observación de que los propios mecanismos inmunológicos humorales pudieran proteger a las células tumorales de las células citotóxicas, debido a la interposición de complejos antígeno-anticuerpo (76), la administración del bacilo de Calmette-Guérin, BCG, pudiese aumentar el crecimiento de tumores murinos (77), o que los propios linfocitos espléncicos murinos estimularan el desarrollo neoplásico, permitió a autores como Prehn (78) y Ershler (79) desarrollar el concepto del "estímulo inmunológico del crecimiento tumoral", señalando la paradójica función dual que la reacción inmune normal puede ejercer en relación al cáncer, inhibiendo el crecimiento del tumor o estimulando su desarrollo.

En este sentido, estudios recientes están cuestionando la potencialidad terapéutica de las citocinas, debido a la contribución de estos factores de crecimiento

en la patofisiología del cáncer, favoreciendo el desarrollo de la metástasis bien como promotores de la angiogénesis, estimulando la reabsorción ósea, aumentando la adhesión de las células tumorales, induciendo la liberación de enzimas proteolíticos, etc. (80). Así, se ha observado la estimulación que ejercen la IL-3, GM-CSF y el G-CSF en la proliferación de líneas tumorales hematológicas (leucemia mieloide aguda) (81) y en tumores sólidos (adenocarcinomas colo-rectales, carcinomas de vejiga, sarcoma osteogénico y cáncer de mama) (82); la IL-1 es capaz de promover la adhesión de las células del melanoma a las células endoteliales, aumentando su potencial metastático (83); la IL-6 ejerce una función estimuladora autocrina en mielomas (84), linfomas (85), leucemia mielomonocítica (86) y en algunos tumores sólidos (carcinoma renal, ovario y vejiga) (87), etc.

En relación al papel de la IL-2 como mediador autocrino del crecimiento, estudios "in vitro" han confirmado la presencia e implicación del sistema IL-2/IL-2R en la proliferación celular de tumores hematológicos (leucemia linfoblástica aguda de células T) (88) y tumores sólidos como el melanoma murino B16F10 demostrado en nuestro laboratorio (89).

Utilizando este modelo tumoral de melanoma murino nos planteamos cual sería la respuesta "in vivo" a la administración exógena de IL-2. Para ello empleamos la misma combinación utilizada por Rosenberg, el tratamiento de CY+IL-2, y lo comparamos con el efecto producido por el agente citostático administrado aisladamente. Procedimos a la inducción de metástasis hepáticas en los ratones mediante la inoculación intraesplénica de las células tumorales, valorando inicialmente la supervivencia de dichos animales.

Pudimos observar que la adición de IL-2 al tratamiento con CY disminuía significativamente la supervivencia de los animales respecto al tratamiento con CY sola. Posteriormente comprobamos, mediante la evaluación de la afectación tumoral hepática por métodos morfométricos, que el área hepática infiltrada por tumor a los 10 días de evolución era tres veces superior en los animales tratados con CY+IL-2 en relación a los tratados solo con CY. Estos datos demuestran el estímulo proliferativo "in vivo" ejercido por la IL-2 sobre estas células tumorales (90,91).

Experiencias terapéuticas

En los últimos años se ha producido un gran avance en la comprensión de la biología tumoral y, específicamente, en el conocimiento de los mecanismos de proliferación de las células metastáticas en respuesta a las señales mitogénicas del microambiente del órgano específico, así como de las interacciones de las células tumorales con el sistema inmune.

Todo ello ha propiciado el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos más racionales, entre los que cabe destacar, en primer lugar, la utilización de terapias antiproliferativas en los estadios precoces de la metástasis (mientras las células tumorales son todavía dependientes de las señales paracrinas del órgano coloniza-

do), mediante la administración de análogos de inhibidores del crecimiento, anticuerpos monoclonales contra receptores de factores de crecimiento (92), empleo de retinoides como inhibidores de crecimiento e inductores de la diferenciación celular (93), etc.

En segundo lugar, la aplicación de la terapia génica al cáncer permite, por un lado, la manipulación de la respuesta inmune antitumoral del huesped mediante la inserción de citocinas en los TILs, aumentando su actividad antitumoral. Por otro lado, modificando genéticamente las propias células tumorales, insertando en ellas genes de citocinas, que incrementen su reconocimiento inmune (vacuna tumoral) y faciliten su destrucción por las defensas del propio huesped (94).

Las amplias posibilidades de la manipulación genética de las células humanas, ha dado lugar a plantear el desarrollo de futuras estrategias preventivas del cáncer, mediante la clonación de los genes que codifican los antígenos asociados al tumor; éstos, una vez incorporados al paciente a través de diferentes vectores, permitirán su inmunización.

Este trabajo ha sido financiado en parte por el Proyecto de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea 075.327-E199/90.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Hart, I.R. & Fidler, I.J. (1981). The implications of tumor heterogeneity for studies on the biology and therapy of cancer metastasis. *Biochem. Biophys. Acta* 651:37-50.
- 2.-Nicolson, G.L. & Poste, G. (1982). Tumor cell diversity and host responses in cancer metastasis. *Curr. Probl. Cancer* 7:4-83.
- 3.-Eaves, G. (1973). The invasive growth of malignant tissues as a purely mechanical process. *J. Pathol.* 109:233-237.
- 4.-Wooley, D.E. (1984). Collagenolytic mechanisms in tumor cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 3:361-372.
- 5.-Liotta, L.A., Thorgeirsson, V.P. & Garbisa, S. (1982). Role of collagenases in tumor cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 1:277-282.
- 6.-Strauli, P. & Haemmerli, O. (1984). The role of cancer cell motility in invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 3:127-143.
- 7.-Mareel, M.M.(1983). Invasion in vitro: methods of analysis. *Metastasis Rev.* 2:201-218.
- 8.-Carr, J., Dreher, B. & Carr, I. (1983). Lymphatic metastasis; lymphangio chemotherapy of mammary cancer: ascitic form of mammary adenocarcinoma 13762. *Clin. Exp. Metastasis* 1:29-38.
- 9.-Weiss, L. & Schmid-Schoenbein, G.W. (1989). Biomechanical interactions of cancer cells with the microvasculature during metastasis. *Cell Biophys.* 14:187.
- 10.-Bouwens, L., Jacobs, B., Remels, L. & Wisse, E. (1988). Natural cytotoxicity of rat hepatic natural killer cells and macrophages against a syngeneic colon adenocarcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 27:137-141.
- 11.-Onuigbo, W.I.B. (1974). Organ selectivity in human cancer metastasis. *Oncology* 30:294-303.
- 12.-Weiss, L., Ward, P.M., Harlos, J.P. & Holmes, J.C. (1984). Target organ patterns of tumours in mice following the arterial dissemination of B16 Melanoma cells. *Int. J. Cancer* 33:825-830.
- 13.-Brodt, P. (1986). Characterization of two highly metastatic variants of Lewis lung carcinoma with different organ-specificities. *Cancer Res.* 46:2442-2448.
- 14.-Willmott, N. & Newton, J. (1987). Demonstration of site-specific tumor growth by a 50% end point assay. *Invasion & Metastasis* 70:30-40.
- 15.-Nakamura, K., Kawagushi, T., Asahina, S., Sakurai, T., EEBina, Y., Yokoya, S. & Morita, M. (1977). Electromicroscopic studies on extravasation of tumor cells and early foci of hematogenous metastasis. *Gann. Monograph. Cancer Res.* 20:57-71.
- 16.-Machado, E.A., Gerad, D.A., Mitchell, J.R., Lozzio, B.B. & Lozzio, C.B. (1982). Arrest and extravasation of neoplastic cells. *Virchow. Arch. (Pathol. Anat.)* 396:73-89.

- 17.-Nicolson, G.L. & Poste, G. (1982). Tumor cell diversity and host responses in cancer metastasis. *Curr. Problem Cancer* 7:4-83.
- 18.-Vaage, J. & Gandhbir, L. (1978) Local cellular responses associated with dormancy and regression of a syngeneic C3H mammary carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 4:262-268.
- 19.-Fidler, I.J., Gersten, D.M. & Budmen, M.B. (1976). Characterization in vivo and in vitro of tumor cells selected for resistance to syngeneic lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* 36:3160-3165.
- 20.-Ewing, J. (1928). Metastasis, in: *Neoplastic disease a treatise on tumors*; 3rd Ed. Saunders, Philadelphia.
- 21.-Coman , D.R. (1953). Mechanisms responsible for the origin and distribution of blood-borne tumor metastasis: a review. *Cancer Res.* 13:397-404.
- 22.-Weiss, L., Haydock, K., Pikren, J.W. & Lane, W.W. (1980). Organ vascularity and metastatic frequency. *Am. JJ. Pathol* 101:101-113.
- 23.-Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet*, 571-573.
- 24.-Hart, I.R. (1982). "Seed and soil" revised: mechanisms of site specific metastasis. *Cancer Met. Rev.*1:5-16.
- 25.-Sugarbaker, E.V., Cohen, A.M. & Ketcham, A.S. (1971). Do metastases metastasize? *Ann. Surg.* 174:161-166.
- 26.-Hart, I.R. & Fidler, I.J. (1980). Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 Melanoma. *Cancer Res.* 40:2281-2287.
- 27.-Belloni, P. & Nicolson, G.L. (1992). Role of the vascular endothelium in cancer metastasis. In: Simionescu N, Simionescu M, eds. *Endothelial cell disfunctions*. New York: Plenum Press, 395-425.
- 28.-Sargent, N.S.E., Price, J.J.E. & Tarin, D. (1983). Effect of enzymic removal of cell surface constituents on metastatic colonization potential of mouse mammary tumor cells. *Br. J. Cancer* 48:569-577.
- 29.-Irimura, T. & Nicolson, G.L. (1981). The role of glycoconjugates in metastatic melanoma blood borne arrest and cell surface properties. *J. Supramol. Struct. Cell Biochem.* 17:325-336.
- 30.-Barberá-Guillem, E., Alonso-Varona, A., Boyano, M.D. & Vidal-Vanaclocha, F. (1990). Estimating anatomical-functional position coordinates in liver tissue. *Anat. Rec.* 228: 267-276.
- 31.-Vidal-Vanaclocha, F., Alonso-Varona, A., Ayala, R. & Barberá-Guillem, E. (1990). Functional variations in liver tissue during the implantation process of metastatic tumor cells. *Virchows. Archiv. (Pathol. Anat.)* 416:189-195.
- 32.-Barberá-Guillem, E., Alonso-Varona, A. & Vidal-Vanaclocha, F. (1989). Selective implantation and growth in rats and mice of experimental liver metastasis in acinar zone one. *Cancer Res.* 49:4003-4010.

- 33.-Barberá-Guillem, E. & Vidal-Vanaclocha, F. (1991). Selective involvement of a specific sinusoidal domain in hepatic metastasis. In: Orr FW, Buchanan MR, Weiss L, eds. *Microcirculation in cancer metastasis*. Boca Raton: CRC Press, 183-203.
- 34.-Vidal-Vanaclocha, F., Alonso-Varona, A., Ayala, R. & Barberá-Guillem, E. (1990). Coincident implantation, growth and interaction sites within the liver of cancer and hematopoietic foci. *Int. J. Cancer* 466:267-271.
- 35.-Auerbach, R., Lu, W.C., Pardon, E., Gumkovsky, F., Kaminska, G. & Kaminski, M. (1987). Specificity of adhesion between murine tumor cells and capillary endothelium: an in vitro correlate of preferential metastasis in vivo. *Cancer Res.* 47:1492-1496.
- 36.-Rice, G.E. & Bevilacqua, M.P. (1989). An inductible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* 246:1303-1306.
- 37.-Pauli, B.U. & Lee, C.L. (1988). Organ preference of metastasis. The role of organ-specifically modulated endothelial cells. *Lab. Invest.* 58:379.
- 38.-Jungermann, K. & Katz, N. (1989). Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol. Rev.* 69:708-764.
- 39.-Barberá-Guillem, E., Alonso-Varona, A. & Vidal-Vanaclocha, F. (1989). Acinar redistribution of Kupffer cells concomitant to the implantation and focal growth in rat liver of metastatic rhabdomyosarcoma cells. In: E.Wisse, D.L. Knook, and K Decker eds. *Cells of Hepatic Sinusoid, vol.II*, Rijswijk: Kupffer cell Foundation, 421-422.
- 40.-Barberá-Guillem, E., Rocha, M., Alvarez, A. & Vidal-Vanaclocha, F. (1991). Differences in the lectin-binding patterns of the periportal and perivenous endothelial domains in the liver sinusoids. *Hepatology* 14:131-139.
- 41.-Nicolson, G.L. (1993). Cancer progression and growth: relationship of paracrine and autocrine growth mechanisms to organ preference of metastasis. *Exp. Cell Res.* 204:171-180.
- 42.-Nicolson, G.L. (1993). Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis. *Cancer Met. Rev.* 12:325-343.
- 43.-Radinsky, R. (1993). Paracrine growth regulation of human colon carcinoma organ-specific metastasis. *Cancer Met. Rev.* 12:345-361.
- 44.-Rossi, M.C. & Zetter, B.R. (1992). Selective stimulation of prostatic carcinoma cell proliferation by transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:6197-6201.
- 45.-Mancianti, M.N., Herlyn, M., Weil, D. et al. (1988). Growth and phenotypic characteristics of human nervous cells in culture. *J. Invest. Dermatol.* 90:134-141.
- 46.-Rodeck, U. & Herlyn, M. (1991). Growth factors in melanoma. *Cancer Met. Rev.* 10:89-101.

- 47.-Rodeck, U. (1993). Growth factor independence and growth regulatory pathways in human melanoma development. *Cancer Met. Rev.* 12:219-226.
- 48.-Bennicelli, J.L., Elias, J., Kern, J. & Guerry, D. (1989). Production of interleukin 1 activity by cultured human melanoma cells. *Cancer Res.* 49:930-935.
- 49.-Colombo, P., Maccalli, C., Mattei, S. et al. (1992). Expression of cytokine genes, including IL-6 in human malignant melanoma lines. *Melanoma Res.* 2:181-189.
- 50.-Ehrlich, P. (1957). *Collected papers of Paul Ehrlich* (Himmelweit, ed.) Londres: Pergamon Press, 2:560-572.
- 51.-Bashford, E.F. (1913). The bearing of immunity reactions on the nature of cancer. *Trans XVII Intl. Congr. Med., London, subsection III (a)* 29.
- 52.-Burnett, F.M. (1957). Cancer: a biological approach. *Brit. Med. J.* 1:779-786.
- 53.-Schwartz, R.H. (1992). Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71:1065-1068.
- 54.-O'Garra, A. (1989). Factores reguladores peptídicos. Interleucinas y sistema inmunitario. *Lancet (ed. español)* 15: 35-45.
- 55.-Coffman, R.L. (1990) Heterogeneidad de las células T facilitadoras y patrones de respuesta inmunitaria. *Hosp. Pract. (ed español)* 5:57-71.
- 56.-Mosmann, T.R. & Moore, K.W. (1991). The role of IL-10 in the cross regulation of Th1 and Th2 responses. *Immunoparasitol. Today* A49-A53.
- 57.-Khawaja, A., Linch, D.C., Goldstone, A.H. and col. (1992). Recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor after autologous bone marrow transplantation for malignant lymphoma: a British National Lymphoma investigate double-blind, placebo- controlled trial. *Br. J. Haematol.* 82:317-323.
- 58.-Rosenblum, M.G. & Donato, N.J. (1989). Tumor necrosis factor alfa: a multi-faced peptide hormone. *Cri. Rev. Immunol.* 9:21-44.
- 59.-Balkwill, F.R. (1989). Interferones. *Lancet (ed español)* 15:178-182.
- 60.-Talpoz, M., Kantarjian, H.M., McCredie, K.B. and col. (1987). Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 65:1280-1288.
- 61.-Giles, F.J., Siger, C.R.J., Gray, A.G. and col. (1988). Alpha-Interferon therapy for essential thrombocythaemia. *Lancet* 2:70-72.
- 62.-Gill, P.S. (1991). Phase I/II trials of alpha interferon alone or in combination with zidovudine as maintenance therapy following induction chemotherapy in the treatment of acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi's sarcoma. *Semin. Oncol.* 18:53-57.
- 63.-Kirkwood, J.M. (1991). Studies of Interferons in the therapy of melanoma. *Semin. Oncol.* 18:83-90.

- 64.-Figlin, R.A., Abi-Aad, A.S., Beldegrun, A. & Kermion, J.B. (1991). The role of Interferon and Interleukin 2 immunotherapeutic approach to renal cell carcinoma. *Semin. Oncol.* 18: 102-107.
- 65.-Morgan, D.A., Ruscetti, F.W., Gallo, R.G. (1976). Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal bone marrow. *Science* 193: 1007-1008.
- 66.-Parkinson, D.R. (1988). Interleukin 2 in cancer therapy. *Semin. Oncol.* 15: 10-26.
- 67.-Rosenberg, S.A., Mule, J.J., Spiess, P.J., Reichert, C.M. & Schwarz, S. (1985). Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high dose recombinant IL-2. *J. Exp. Med.* 161:1169-1188.
- 68.-Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Yang, J.C. and col. (1989). Experience with the use of high dose interleukin 2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann. Surg.* 210: 474-485.
- 69.-Siegel, J. & Puri, R.K. (1991). Interleukin 2 toxicity. *J. Clin. Oncol.* 9: 694-704.
- 70.-Lotze, M.T., Malory, Y.L., Ettinghausen, S. and col. (1985). In vivo administration of purified human interleukin 2. II. Half life, immunologic effects and expansion of peripheral lymphoid cells in vivo with recombinant IL-2. *J. Immunol.* 135: 1865-1875.
- 71.-Rosenberg, S.A. (1990). Inmunoterapia del cáncer. *Invest. Ciencia* 166: 26-34.
- 72.-Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M. and col. (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine activated killer cells and interleukin 2 or high dose interleukin alone. *N. Engl. J. Med.* 316: 889-897.
- 73.-Rosenberg, S.A., Spiess, P. & Lafrenier, R. (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233: 1318-1321.
- 74.-Rosenberg, S.A., Packard, B.S., Aebersold, P.M. and col. (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and the interleukin 2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 319: 1676-1680.
- 75.-Dillman, R.O., Oldham, R.K., Barth, N.M. and col. (1991). Continuous interleukin 2 and tumor-infiltrating lymphocytes as treatment of advanced melanoma. *Cancer* 68:1-8.
- 76.-Foley, E.J. (1953). Properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain origin. *Cancer Res.* 13: 835-842.
- 77.-Levy, N.L., Mahaley, M.S. & Day, E.D. (1972). Serum mediated blocking of cell-mediated antitumor immunity in a melanoma patient: association with BCG immunotherapy and clinical deterioration. *Int. J. Cancer* 10: 244-248.

- 78.-Prehn, R.T. (1972). The immune reaction as a stimulator of tumor growth. *Science* 176: 170-171.
- 79.-Ershler, W.B., Tuck, O., Moore, A.L. and col. (1988). Immunologic enhancement of B16 melanoma growth. *Cancer* 61: 1792-1797.
- 80.-Malik, S. (1992). Cytokines and cancer. Clinical trials and experimental studies are unravelling paradoxes. *B.M.J.* 305: 265-267.
- 81.-Miyachi, J., Kelleher, C.A., Yang, Y.C. and col. (1987). Effects of three recombinant growth factors, IL-3, GM-CSF and G-CIF, on the blast cells of acute myeloblastic leukemia maintained in short-term suspension cultures. *Blood* 70:657-663.
- 82.-Berdel, W.E., Danhauser, S., Steinhäuser, G & Winton, E.F. (1989). Various human hematopoietic growth factors (interleukin-3, GM-CSF, G-CSF) stimulate clonal growth of non-hematopoietic tumor cells. *Blood* 73:80-83.
- 83.-Burrows, F.J., Haskard, D.O., Hart, I.R. and col. (1991). Influence of tumor-derived interleukin 1 on melanoma-endothelial cell interactions "in vitro". *Cancer Res.* 51:4768-4775.
- 84.-Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T. and col. (1988). Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 332:83-85.
- 85.-Yee, C., Bidoudi, A., Iscove, N.N. and col. (1989). A possible autocrine role for interleukin 6 in two lymphoma cell lines. *Blood* 74:798-804.
- 86.-Everson, M.P., Brown, C.B. & Lilly, M.B. (1989). Interleukin 6 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor are candidate growth factors for chronic myelomonocytic leukemia cells. *Blood* 74:1472-1476.
- 87.-Serve, H., Steinhäuser, G., Oberberg, D. and col. (1991) Studies on the interaction between interleukin 6 and human malignant nonhematopoietic cell lines. *Cancer Res.* 51:3862-3866.
- 88.-Shraoni, M., Allonche, E., Spanakis, C. and col. (1991). Involvement of the IL-2R system on the proliferation of acute lymphoblastic leukemia T-cells. *Proc. Asoc. Cancer Res.* 10:78.
- 89.-Barberá-Guillem, E. (1992). Interleukin-2 enhances the growth of mouse B16 melanoma cells. *Cli. Exp. Metastasis* 10(Suppl 1): abstract 78.
- 90.-Palomares, T., Bilbao, P., Alonso-Varona, A. & Barberá-Guillem, E. (1994). La adición de interleucina 2 al tratamiento con Ciclofosfamida disminuye la supervivencia de los animales con metástasis del melanoma. Estudio "in vivo" con el melanoma B16. *Oncología* (en prensa).
- 91.-Barberá-Guillem, E., Cohen, S.A., Alonso-Varona, A., Boyano, M.D., Palomares, T., Bilbao, P., O'Connor, E. & Pellín, A. (1994). Correlation between IL-2R expression on solid tumor cells and metastatic potential. *J. Exp. Med.* (en prensa).
- 92.-Nicolson, G.L. (1993). Cancer progression and growth: relationship of paracrine and autocrine growth mechanisms to organ preference of metastasis. *Exp. Cell. Res.* 204:171-180.

- 93.-Smith, M.A., Parkinson, D.R., Cheson, B.D. & Friedman, M.A. (1992). Retinoids in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* 10:839-864.
- 94.-Rosenberg, S.A. (1992). Gene therapy for cancer. *J.A.M.A.* 268:2416-2419.