
ARTÍCULO DE REVISIÓN

Participación de los patrones moleculares asociados al daño en el tratamiento convencional del cáncer

Verónica Rojo-León,* Dolores Aguilar-Cázares,* Heriberto Prado-García,*
Ángeles Carlos-Reyes,* José Sullivan López-González*

* Laboratorio de Cáncer Pulmonar, Unidad de Investigación, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ismael Cosío Villegas

Participation of damage-associated molecular patterns in conventional treatment of cancer

ABSTRACT

Cells of the innate immune system are involved in discriminating between the innocuous cell death (apoptosis) which occurs in tissues during homeostasis, and the cell death associated to tissue damage (necrosis). Recently, a new variant of apoptosis termed immunogenic apoptosis has been described. In cancer, this type of cell death has acquired great relevance. In vitro and in vivo experimental models support that radiotherapy and some chemotherapeutic drugs induce the immunogenic apoptosis of malignant cells. Dying cells express at cytoplasmic membrane or release several nuclear or intracytoplasmic molecules termed "danger signals" or damage associated molecular patterns (DAMPs). DAMPs alert the organism and play a role inducing an efficient anti-tumor immune response. In this review, the importance of cell death by immunogenic apoptosis, the cytotoxic drugs that induce this type of cell death, the biologic role of some DAMPs and their participation in the activation of the antitumor immune response, in particular in the phagocytic cell, are indicated. The goal of this information should impact in improving the participation of the immune system in the recognition and efficient elimination of the residual tumor cells and to overcome the evasion mechanisms of tumor cells. This knowledge should lead to a better control of the growth of tumors with a concomitant reduction in the tumor recurrence. Also, an increase in the survival of the cancer patients or probably their definitive cure could be reached in the future.

RESUMEN

El sistema inmunológico innato discrimina entre la muerte celular inocua (apoptosis), que se lleva a cabo durante la homeostasis, de la muerte celular potencialmente dañina (necrosis). Recientemente se ha propuesto un nuevo tipo de muerte celular por apoptosis definida como apoptosis inmunogénica; este tipo de muerte ha adquirido relevancia en el tratamiento convencional del cáncer en etapas avanzadas. Estudios *in vitro* e *in vivo* en modelos animales han demostrado que la radioterapia o algunos fármacos quimioterapéuticos empleados en el tratamiento del cáncer inducen la apoptosis inmunogénica que, a diferencia de la apoptosis, expone de manera extracelular ciertas moléculas intracitoplasmáticas y nucleares. En conjunto estas moléculas se han denominado patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) o señales de peligro. Los DAMPs alertan al organismo y participan colaborando en el reconocimiento del antígeno tumoral y en la inducción de una eficiente respuesta inmunológica antitumoral. Esta revisión tiene como objetivo destacar en el tratamiento del cáncer: 1) La importancia de la apoptosis inmunogénica, 2) Que ciertos fármacos antineoplásicos inducen este tipo de muerte, 3) El papel biológico de los DAMPs y 4) La participación que tienen algunos de ellos en la activación de la respuesta inmunológica antitumoral, en particular en las células fagocíticas. El conocimiento de los DAMPs puede ser clave en un futuro para proponer adecuaciones en los esquemas de tratamiento convencional actuales a fin de estimular la actividad antineoplásica del sistema inmunológico y soslayar los mecanismos de evasión de las células tumorales. Lo anterior llevará al control del crecimiento tumoral y a la disminución de su recurrencia, lo que deberá incrementar la sobrevida en los pacientes, o bien, permitirá la curación definitiva del cáncer.

Key words. Cancer. Chemotherapy. Radiotherapy. Damage associated molecular patterns (DAMPs). Immunogenic apoptosis. Antitumor immune response.

Palabras clave. Cáncer. Quimioterapia. Radioterapia. Patrones moleculares asociados al daño (DAMPs). Apoptosis inmunogénica. Respuesta inmunológica antitumoral.

INTRODUCCIÓN

Para mantener la homeostasis de los tejidos la tasa de recambio entre las células que mueren y las que se duplican debe mantener un equilibrio.¹ Se ha estimado que durante la vida de un individuo cada segundo mueren millones de células y, a pesar de la frecuencia con que sucede este evento, no induce una respuesta inflamatoria; esto debido a que en condiciones normales la célula muere mediante un proceso de apoptosis fisiológica.^{2,3} Sin embargo, cuando un trauma extenso en el tejido produce que un conjunto de células mueran por apoptosis o necrosis el organismo genera una reacción inflamatoria, proceso altamente regulado, cuya finalidad es la reparación tisular.^{1,2}

Por otro lado, los patógenos contienen en su estructura diversos componentes que como sustancias extrañas al organismo actúan como antígenos e inducen una respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Esta respuesta inmunológica controla la infección y evita su diseminación.^{4,5} Actualmente se conoce que para inducir una respuesta inmunológica en contra de los patógenos se requiere, además de los antígenos, otra serie de moléculas contenidas en los agentes patógenos. A estas moléculas se les ha designado genéricamente como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).⁴ Los PAMPs interactúan con una serie de receptores presentes principalmente en las células fagocíticas, estos receptores se han denominado receptores de reconocimiento a patrones moleculares asociados al patógeno (PRR) y entre ellos se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo NOD (NLRs), receptores tipo RIG-1 (RLRs) y los receptores tipo lectina C (CLRs).^{5,6} En particular, en el caso de las infecciones intracelulares, además de los antígenos y los PAMPs, es necesaria la participación de otra serie de moléculas liberadas por la célula infectada, las cuales participan en la activación de la respuesta inmunológica.^{5,6}

A continuación se revisará en forma breve la apoptosis inmunogénica, se indicarán algunos de los DAMPs liberados y sus efectos biológicos, principalmente en las células fagocíticas y se enlistarán los fármacos antineoplásicos que hasta el momento se ha descrito que inducen la apoptosis inmunogénica *in vitro* o empleando modelos experimentales. Además, se enfatizará en la necesidad de realizar estudios clínicos que permitan precisar la participación de los DAMPs en el sistema inmunológico para el control del crecimiento o eliminación del tumor.

APOPTOSIS INMUNOGÉNICA

Recientemente, algunos estudios han demostrado que las células pueden morir por una variante de la apoptosis denominada apoptosis inmunogénica.⁷⁻¹⁰ Lo anterior se debe a que estas células exponen en su membrana, o liberan, moléculas nucleares y citoplasmáticas. Estas moléculas ahora extracelulares adquieren una actividad biológica distinta que estimula la participación de la respuesta inmunológica.^{8,10,11} Las moléculas intracelulares liberadas de las células en apoptosis inmunogénica también se liberan durante el proceso de necrosis y se han designado colectivamente como señales de peligro o patrones moleculares asociados al daño (DAMPS).^{5,8,10,11}

PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS AL DAÑO O DAMPS

Las señales de peligro se establecieron por primera vez en 1994 como parte del modelo de peligro propuesto por Polly Matzinger.^{12,13} Este modelo sugiere que el sistema inmunológico responde al daño causado por toxinas o daño mecánico donde no hay agentes patógenos presentes (inflamación estéril).^{12,13} Posteriormente, en 2004 se propuso que los PAMPs y las señales de peligro derivadas de la célula o del tejido dañado se denominaran colectivamente DAMPs.^{8,14} Los DAMPs pueden ser de origen endógeno, liberados por las células del huésped, o exógenos, provenientes de patógenos o de fragmentos derivados de la degradación de la matriz extracelular, como los generados por la destrucción del tejido o por la inflamación.^{8,11}

Además, dentro de las moléculas de origen endógeno existe un subconjunto de moléculas denominadas alarminas, su designación se debe a que estas moléculas poseen algunas de las siguientes características:

- Son liberadas rápidamente después de la muerte por apoptosis inmunogénica/necrosis, pero no por apoptosis fisiológica.
- Reclutan células presentadoras de antígeno profesionales (APCs) e inducen en ellas su maduración al estimular la expresión de moléculas de coestimulación.
- Son secretadas por células del sistema inmunológico como macrófagos y células dendríticas, sin que esto implique su muerte,
- Participan en el establecimiento de la homeostasis promoviendo la reparación del tejido destruido por los efectos de la inflamación.^{8,14}

Los DAMPs son reconocidos por un conjunto de receptores (TLRs, NLRs, RIRs y CLRs).^{5,6} Estos receptores se encuentran expresados en las células del sistema inmunológico, principalmente en las APCs: monocitos, macrófagos y células dendríticas (DCs).^{4,6} Los receptores para los DAMPs señalan para la activación de varias vías, entre ellas la del NF-κB, las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la del interferón tipo I.⁶ Lo anterior incrementa la expresión de citocinas proinflamatorias así como diversas actividades, entre ellas:

- La fagocitosis de más células en apoptosis inmuno-génica/necrosis.^{1,15,16}
- El incremento en la expresión de las moléculas de histocompatibilidad y las moléculas de coestimulación.^{5,10,11}

Estos eventos convergen en la presentación del antígeno a los linfocitos T de ayuda (Th) y T citotóxicos (Tc) para inducir una eficiente respuesta inmunológica en contra del antígeno.^{1,8,17}

CÁNCER Y RESPUESTA INMUNOLÓGICA

En la oncogénesis las células transformadas adquieren gradualmente diversas mutaciones en protooncogenes, genes supresores y genes de estabilidad.^{18,19} Algunas de estas alteraciones generan cambios estructurales en las proteínas propias, lo cual conduce a que las células tumorales expresen antígenos propios modificados o antígenos tumorales.^{19,20}

Durante el desarrollo tumoral parte de la población de las células neoplásicas sufren apoptosis/necrosis debido a su reconocimiento por las células citotóxicas naturales (NK y NKT), lo cual puede favorecer la localización extracelular de los DAMPs.^{10,17,20} Los DAMPs promueven la quimiotaxis de las APCs y la fagocitosis de los restos celulares que contienen los antígenos tumorales.^{15,16} Lo anterior estimula en las APCs de los tejidos (que se encuentran en estadio inmaduro) la degradación del antígeno tumoral a péptidos, la expresión de genes que se asocian con la producción de moléculas codificadas por el MHC, la asociación de los péptidos a dichas moléculas, la expresión de diversas moléculas de coestimulación, la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF, etc.), así como la migración de las APCs a los ganglios linfáticos cercanos.²⁰⁻²² En este sitio las APCs maduran y asocian los péptidos tumorales con las moléculas clase II y clase I del MHC, así como expresan las moléculas de coestimulación.^{20,21,23}

La interacción de dichas moléculas con los correspondientes receptores presentes en los linfocitos Th y linfocitos Tc (sinapsis inmunológica) inducen, tanto en las APCs como en los linfocitos, la producción y secreción de distintas quimiocinas y citocinas que estimulan la proliferación y diferenciación (activación) de los linfocitos.^{24,25} Posteriormente, los linfocitos Th y Tc migran al sitio del tumor para llevar a cabo su efecto biológico. En particular, los linfocitos Tc efectores (tras reconocer por medio de sus receptores a los péptidos tumorales asociados con las moléculas clase I del MHC presentes en las células tumorales) liberan una serie de proteínas citotóxicas, induciendo la destrucción parcial de la masa tumoral.^{25,26} Las moléculas citotóxicas liberadas por los linfocitos Tc inducen en la célula tumoral la muerte celular por apoptosis inmuno-génica, lo que mantiene en el microambiente la presencia del antígeno tumoral, así como de los DAMPs.^{3,25,27} Este microambiente es propicio para que se inicie un nuevo ciclo de estimulación antígenica en contra del tumor, conduciendo a la eliminación total del mismo, en el caso de que el tumor no desarrolle mecanismos de evasión.^{21,27,28}

Sin embargo, cuando las células tumorales incrementan su inestabilidad génica, las clonas celulares adquieren gradualmente diversas alteraciones que impiden su reconocimiento y eliminación por parte de las células de la respuesta inmunológica del huésped.^{19,21} Entre los mecanismos de escape que presenta el tumor se encuentran:

- Disminución o no expresión de moléculas clase I del MHC, de moléculas de coestimulación, de receptores de muerte (Fas, TRAIL, TNF-R, etc.).^{28,29}
- Incremento en la expresión de moléculas antia apoptóticas (Bcl-2, FLIP, Serpina PI-9, etc.).^{28,30}
- Inducción de células T reguladoras (Treg),^{28,29} entre otros mecanismos (para revisión ver referencias 28-30).

Estos y otros mecanismos llevan a una pobre respuesta inmunológica antitumoral mediada por la respuesta innata y adaptativa, por lo que el tumor crece hasta ser clínicamente detectado.^{21,28,29}

ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA POR ALGUNOS ESQUEMAS DE TRATAMIENTO CONVENCIONAL DEL CÁNCER

En pacientes con cáncer avanzado, cuyo tumor no puede ser resecado quirúrgicamente, la opción de tratamiento convencional es el empleo de quimiote-

Cuadro 1. Actividades inmunoestimulantes de la radioterapia y diversos fármacos empleados en la quimioterapia.^{33,34}

Agente terapéutico	Mecanismo de acción:
Radiación y DAC	• Contrarrestar los mecanismos de evasión tumoral Incremento en la expresión de moléculas clase I del MHC en los tumores.
Cisplatino, radiación, 5-fluorouracilo y dacarbazina	Incremento en la expresión del receptor de muerte CD95 en las células tumorales lo que permite su eliminación por las células T citotóxicas y NK.
Mesilato de imatinib e IL-2	Incremento en la expresión del receptor de muerte TRAIL.
Bleomicina	Disminución de la producción de la citocina inhibitoria TGF-β por el tumor.
Taxanos	Inhibición de macrófagos tipo M2.
Ciclofosfamida	Inhibición de las células T reguladoras (Treg).
Antraciclinas, oxaliplatino, radiación	• Inducción de DAMPs Liberación de HMGB1 y expresión de calreticulina (CRT) en la superficie celular.
Bortezomib	Expresión membranal de la proteína de choque térmico HSP90.
5-fluorouracilo	Incremento en la producción de HSPs.
Paclitaxel, radiación	• Efecto directo en las APCs Activación mediada por receptores tipo Toll
Gemcitabina	Incremento en la presentación de antígenos tumorales

HMGB1: proteína del grupo de alta movilidad caja 1. DAC: 5-aza-2'-deoxitidina. APC: célula presentadora de antígeno. MHC: complejo principal de histocompatibilidad. CRT: calreticulina. TRAIL: ligando de inducción de apoptosis relacionado a TNF. TGF-β: factor de crecimiento transformante β.

terapia y radioterapia; estas terapias se aplican con el objetivo de reducir el crecimiento del tumor.^{31,32} Las altas dosis aplicadas de estos tratamientos tienen efectos citostáticos o citotóxicos en las células tumorales, asegurando su destrucción parcial o total.^{31,32} Sin embargo, estos tratamientos tienen efectos adversos en las células del sistema inmunológico, impidiendo su participación.³³

Sin embargo, varios estudios demuestran que algunos agentes quimioterapéuticos inducen en las células tumorales la reexpresión de moléculas clase I del MHC, de moléculas de coestimulación, así como de moléculas involucradas en la apoptosis (Fas, TRAIL, etc.), haciendo susceptibles a las células tumorales de ser reconocidas y eliminadas por el sistema inmunológico (Cuadro 1).^{33,34} En este mismo sentido se ha demostrado que algunos agentes citotóxicos empleados en la quimioterapia, a dosis reducidas respecto al tratamiento convencional, inducen la muerte de las células tumorales mediante la apoptosis inmunogénica y en consecuencia la expresión de los DAMPs (Cuadro 1). Además, estas dosis reducidas no alteran considerablemente la funcionalidad de las células del sistema inmunológico.³³⁻³⁵ Lo anterior indica que los mecanismos de evasión de las células tumorales pueden ser soslayados por algunos tipos de tratamientos, estimulando la participación

de la respuesta inmunitaria antitumoral del huésped.^{33,34} Estas observaciones han iniciado un nuevo campo de conocimiento en relación con los DAMPs involucrados en la activación de la respuesta inmunitaria antitumoral.³

DAMPs Y TRATAMIENTO ANTITUMORAL

Las primeras evidencias de la inducción de la apoptosis inmunogénica en células tumorales se observaron en modelos experimentales con distintos tipos de cáncer (linfoma, colon, mama y cervical) empleando antraciclinas (agentes intercalantes que inhiben la síntesis de DNA y RNA).³⁶⁻³⁹ Asimismo, se demostró que estos fármacos inducen el reconocimiento del tumor por las células del sistema inmunológico y que la participación de receptor tipo Toll 4 (TLR-4) es importante en la activación de las APCs.^{40,41} Por lo anterior, las antraciclinas incrementan la actividad de las células de la inmunidad innata y adaptativa en contra del tumor, lo que se asocia con disminución en el crecimiento del mismo.⁴¹ Estudios posteriores mostraron que, además de las antraciclinas, la radiación ionizante y el oxaliplatino, pero no otros fármacos como la mitomicina C y el etopósido, inducen la muerte celular inmuno-

génica. Este fenómeno es independiente del empleo de adyuvantes u otras sustancias inmunoestimulantes.^{33-35,42}

Se ha demostrado que parte de la actividad antitumoral de la radiación y algunos fármacos citotóxicos se debe a que las células tumorales reexpresan:

- Moléculas de histocompatibilidad que asocian péptidos tumorales, haciéndolas inmunogénicas.^{43,44}
- Moléculas proapoptóticas,³³
- Liberan extracelularmente DAMPs.^{17,34,45}

De manera particular los DAMPs se pueden clasificar con base en su localización o por su procedencia:

- DAMPs expuestos en la membrana plasmática de la célula en apoptosis (calreticulina, HSP70 y 90).
- DAMPs liberados por las células (HMGB1, ácido úrico, citocinas proinflamatorias),
- DAMPs derivados de la degradación de la matriz extracelular o del estroma (ATP, DNA, RNA y moléculas derivadas de la matriz extracelular).^{8,9}

Con base en ello, se describirán sólo algunos de los DAMPs que se ha demostrado poseen actividad a favor de la respuesta inmunológica antitumoral.

Calreticulina

La calreticulina (CRT) es una proteína de unión a calcio localizada principalmente en el retículo endoplasmático (RE) donde, como chaperona, ayuda al plegamiento de otras proteínas.¹⁷ En las células estresadas o en apoptosis inmunogénica inducida por antraciclinas, oxaliplatino y radiación, la CRT es uno de los primeros DAMPs que se relocaliza en la superficie celular, lo que incrementa la inmunogenicidad de las células, ya que estimula la fagocitosis de las mismas por las APCs.⁴⁶⁻⁴⁸

Los estudios que han demostrado la importancia de la CRT en la apoptosis inmunogénica incluyen estudios *in vitro* empleando células tumorales de distintos orígenes, así como modelos experimentales *in vivo* deficientes o no en la CRT.^{47,48} El mecanismo para la translocación de la CRT del interior de la célula (endo-CRT) a la superficie (ecto-CRT) no ha sido completamente caracterizado. Sin embargo, en este proceso está implicada la respuesta al estrés en el RE, la participación de la caspasa-8 y otras proteínas presentes en el RE, como ERp57.^{9,46,48}

Se ha demostrado que la doxorrubicina y la mitoxantrona inducen, en diversas líneas tumorales, la exposición de la CRT en la membrana citoplasmática de las células en apoptosis inmunogénica, lo cual se ha asociado con incremento de su fagocitosis por las APCs.^{45,47,48}

Se ha reportado que ratones previamente inoculados con células apoptóticas de cáncer de colon tratadas *in vitro* con antraciclinas u oxaliplatino, que inducen la externalización de CRT, rechazan un segundo inóculo con células tumorales viables.^{46,47} En cambio, en ratones previamente inoculados con las mismas células tumorales tratadas con fármacos que no inducen la externalización de CRT, se observa crecimiento del tumor.^{46,47} Estas observaciones sugieren que la CRT es un marcador de la apoptosis inmunogénica en modelos experimentales. Sin embargo, es necesario determinar si esta molécula también se expresa en las células tumorales de pacientes en tratamiento con los mismos u otros agentes citotóxicos y si se asocia o no con la sobrevida.

Proteínas de choque térmico (HSPs)

Las HSPs son una familia de proteínas chaperonas que participan en el plegamiento de las proteínas.¹⁷ En particular, las HSP70 y HSP90 en condiciones de estrés regulan la apoptosis actuando en múltiples niveles de la cascada de la señalización.^{7,17}

Las células tumorales que mueren por apoptosis inmunogénica translocan las HSP70 y HSP90 a la membrana citoplasmática.^{49,50} Su externalización es reconocida por el receptor scavenger CD91 presente en las APCs, lo que se ha asociado con la maduración de las mismas y con el incremento de los péptidos antigenicos provenientes de los antígenos tumorales a las moléculas del MHC. Lo anterior conlleva a la activación de los linfocitos Tc antígeno-específicos.^{49,50}

HMGB1

La proteína del grupo de alta movilidad caja 1 (HMGB1, por sus siglas en inglés) es miembro de la familia de las proteínas no-histonas conocidas como HMG localizadas en el núcleo de las células.⁵¹ La HMGB1 se une al DNA y a los nucleosomas y desempeña un papel estructural importante, ya que modifica la arquitectura de la cromatina, contribuye a la regulación de la transcripción (alterando la estruc-

tura de la cromatina) y asocia factores de transcripción para promover su unión con el DNA.⁵¹⁻⁵³ Además de su función nuclear esta proteína es de las moléculas de mayor interés, ya que ha sido implicada en la activación de la respuesta inflamatoria y es el DAMP mejor caracterizado.⁵³⁻⁵⁵

La HMGB1 es liberada pasivamente de las células que mueren por apoptosis inmunogénica/necrosis, pero no de las células que mueren por apoptosis fisiológica.^{8,56} La HMGB1 no sólo es liberada por células que mueren, se ha demostrado que células como macrófagos, DCs y células NK la secretan mediante un mecanismo de secreción no clásico (liberación activa).^{55,57,58} Despues de su liberación por alguna de estas vías, la HMGB1 interactúa con los TLR-2 y TLR-4 y con el receptor para productos finales de glicosilación avanzada (RAGE) induciendo, en las diversas células que expresan estos receptores, un efecto tipo citocina proinflamatoria.⁵³ La HMGB1 induce la maduración de las DCs al incrementar la expresión de moléculas clase II del MHC y moléculas de coestimulación (CD80 y CD86).^{59,60} Mientras que en monocitos y macrófagos la HMGB1 promueve la migración de estas células al sitio de inflamación o lesión, así como el incremento en la producción de citocinas proinflamatorias.^{61,62}

La evidencia de que la HMGB1 participa en diferentes etapas del reconocimiento de las células tumorales dañadas por las células inmunes proviene de experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*.^{54-56,63} Líneas tumorales de origen murino y humano tratadas *in vitro* con diferentes estímulos apoptogénicos liberan HMGB1 extracelular.^{40,42} La HMGB1 liberada se une al TLR-4 presente en las APCs.^{40,64} Se ha demostrado que esta unión inhibe la continua degradación de los péptidos tumorales en el lisosoma, lo que favorece su presentación por las moléculas del MHC.⁴⁰ Lo anterior activa a los linfocitos Th y Tc generando una eficiente respuesta inmunológica antitumoral.⁶⁵

Con base en lo anterior se ha realizado un primer estudio en pacientes con cáncer de mama bajo tratamiento con antraciclinas. Dicho estudio analizó la expresión de la variante alélica del gen para el TLR-4 (Asp299Gly) que genera una alteración en la porción extracelular del TLR-4, lo que reduce su unión a HMGB1 y en consecuencia bloquea la funcionalidad del receptor.⁴⁰ El estudio concluye que las pacientes que muestran este polimorfismo para TLR-4 presentan mayor recurrencia del tumor posterior al tratamiento, comparado con el grupo de pacientes que no portan esta variante alélica.⁴⁰

Ácido úrico

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas y se produce en grandes cantidades cuando las células degradan su DNA, como es el caso de las células en apoptosis inmunogénica/necrosis.^{8,10} Rock, *et al.*,⁶⁶ mostraron que las células sometidas a condiciones de estrés liberan cristales de urato monosódico (MSU) que actúan como DAMP. El MSU se une a receptores como el CD14, TLR-2 y TLR-4, presentes en varios tipos celulares, y en las APCs estimula su maduración; además, promueve la respuesta de los linfocitos Tc antígeno-específicos.⁶⁷ Datos recientes indican que en las APCs, el MSU participa activando al complejo multiproteico denominado inflamasoma NLRP3 (previamente designado NALP3) que actúa en los precursores proinflamatorios (IL-1β, IL-18 e IL-33) transformándolos a sus formas activas.⁶⁷⁻⁶⁹ Se demostró en un modelo experimental murino que la inyección peritoneal de ácido úrico (en altas cantidades) acelera el rechazo del tumor, mientras que su ausencia favorece la progresión del mismo.⁷⁰ Se ha propuesto que para que el MSU actúe como DAMP debe de ser liberado en elevadas concentraciones, lo que indica que el estrés celular al que se somete la célula debe ser lo suficientemente potente a fin de despertar la respuesta inmunológica.⁷⁰ Estos resultados han llevado a proponer un modelo en el que las células tumorales muertas liberan ácido úrico que actúa en las APCs para estimular la respuesta antitumoral.⁷⁰ Por lo anterior, el ácido úrico en altas concentraciones podría ser un mediador importante en la apoptosis inmunogénica.

ATP

La muerte celular inducida por algunos fármacos antitumorales es acompañada por una reducción de la concentración de ATP intracelular y la subsiguiente acumulación extracelular.¹⁰ Se ha observado que la quimioterapia afecta los niveles de ATP antes y durante el proceso de la apoptosis/necrosis,⁷¹ sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual es liberado. Se ha reportado que el agotamiento de ATP (por inhibición *in vitro* de la síntesis del mismo) suprime la inmunogenicidad de las células tumorales.^{45,72,73} Además, el ATP liberado de las células tumorales actúa sobre los receptores purinérgicos P2RX7 y P2RY2 presentes en las APCs, lo que (al igual que el ácido úrico) estimula la activación del inflamasoma NLRP3 y, por ende, la producción de la citocina proinflamatoria IL-1β.⁷¹⁻⁷³ Dado lo anterior,

se ha considerado que la liberación de ATP puede ser un factor a tomar en cuenta para incrementar la inmunogenicidad del tumor en pacientes tratados con quimioterapia.⁴⁵

EXPECTATIVAS DEL TRATAMIENTO CONVENCIONAL Y LOS DAMPS

La apoptosis inmunogénica es un proceso multietapas en el cual se exponen extracelularmente y de manera espacio-temporal los DAMPs. A continuación se indicará en forma breve la secuencia de eventos que, desde nuestro punto de vista, pueden

activar la respuesta inmunológica antitumoral (Figura 1).

Después del daño inducido por ciertos agentes citotóxicos en el tumor, las células que inician la apoptosis inmunogénica rápidamente trasladan algunos DAMPs a su superficie. Dentro de estos primeros eventos se encuentra la expresión de la ecto-CRT.⁴⁵ Esta molécula favorece que las APCs tisulares sean reclutadas y reconozcan las células tumorales que expresan la ecto-CRT.^{47,48} Posteriormente, las HSPs se translocan a la superficie de las células y, junto con la ecto-CRT, incrementan el reconocimiento por las APCs de las células en

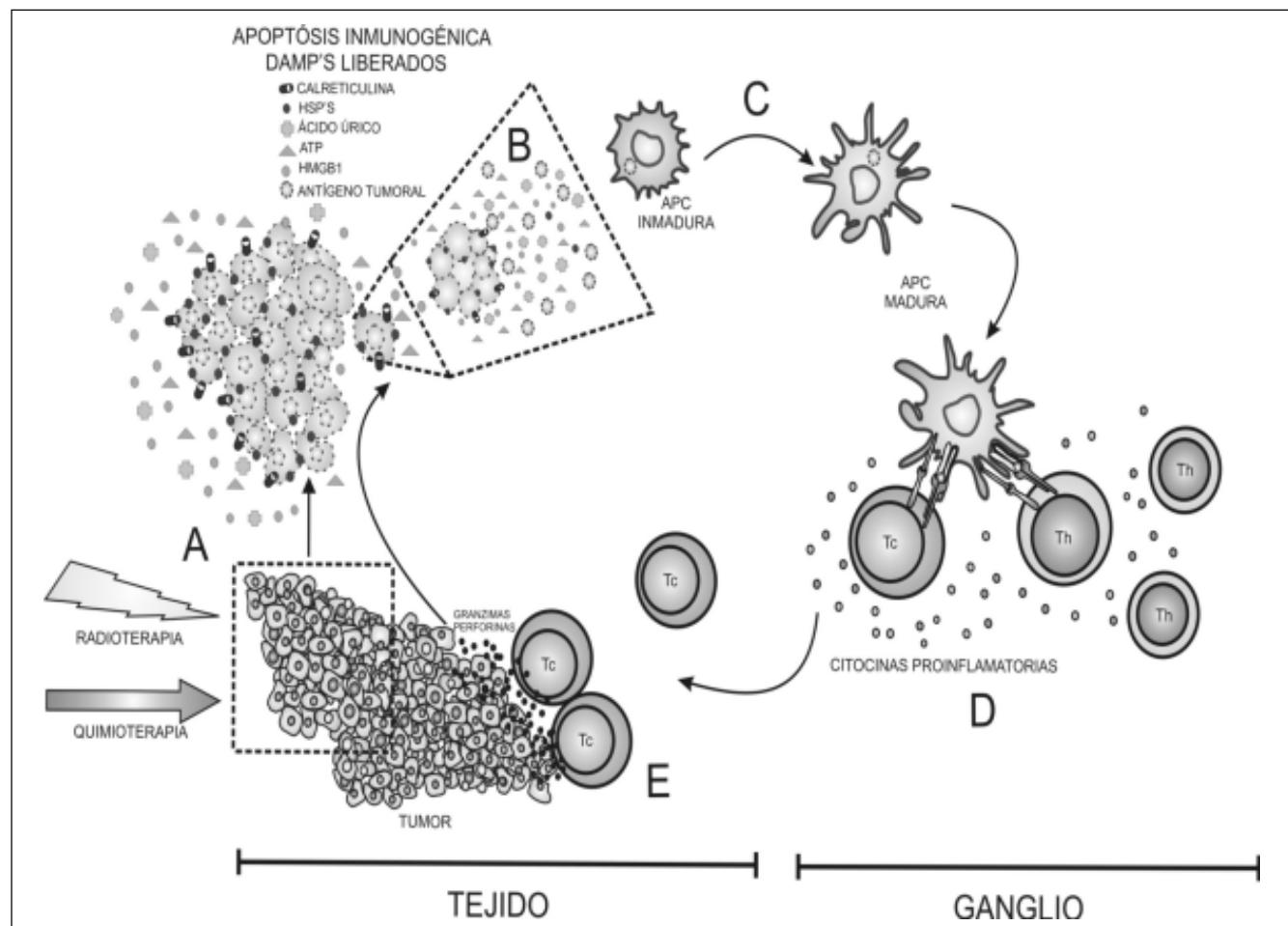


Figura 1. Apoptosis inmunogénica inducida por el tratamiento convencional antitumoral. A. Después de la radioterapia o quimioterapia las células tumorales mueren por apoptosis inmunogénica caracterizada por la localización extracelular de DAMPs. B. En este evento se relocaliza en la membrana de los cuerpos apoptóticos la calreticulina (CRT) y las proteínas de choque térmico (HSPs) y se libera ácido úrico, ATP y HMGB1. C. Estos DAMPs reclutan células presentadoras de antígeno (APCs) al sitio del tumor que fagocitan los cuerpos apoptóticos. La participación de los DAMPs también favorece el procesamiento de antígeno tumoral, la maduración y la migración de las APCs al ganglio. D. Una vez en ganglio, las APCs presentan el antígeno tumoral a los linfocitos Th y Tc. E. Los linfocitos Th producen diversas citocinas proinflamatorias, las cuales participan en la activación de los linfocitos Tc efectores. Los linfocitos Tc migran al sitio del tumor donde reconocen a las células tumorales residuales y las eliminan liberando gránulos citotóxicos (granzimas y perforinas).

apoptosis inmunogénica y de los cuerpos apoptóticos conteniendo antígenos tumorales.^{45,49}

En etapas más avanzadas de la apoptosis inmunogénica participan otros DAMPs liberados por las células tumorales. En este contexto, la HMGB1, el ácido úrico y el ATP en el microambiente tumoral interactúan con una serie de receptores presentes principalmente en las APCs.^{63,70,71} La señalización inducida por algunos de estos complejos ligando-receptor activa la transcripción de genes relacionados con las moléculas clase I y II del MHC, lo que incrementa la expresión de estas moléculas.^{50,60} Por otro lado, los DAMPs liberados, y probablemente otras moléculas expresadas por la APC, participan regulando la degradación de los antígenos tumorales y su asociación con las moléculas del MHC para llevar a cabo la presentación antigénica.^{34,45} Los DAMPs como HSPs y HMGB1 promueven la producción de citocinas proinflamatorias lo que incrementa la expresión de moléculas de coestimulación (CD80/CD86) en la APC.^{34,50,59} Además, la HMGB1 promueve la maduración y migración de las APCs al ganglio linfático, donde interactúan con los linfocitos Th y Tc antígeno específicos para inducir su activación.^{45,65,74} Finalmente, las células inmunológicas efectoras, en particular los linfocitos Tc, migran al sitio del tumor donde actúan reconociendo y destruyendo a las células tumorales residuales mediante la liberación de granzimas y perforinas.^{3,25} Este mecanismo citotóxico induce la apoptosis inmunogénica de más células tumorales, incrementando la liberación de los DAMPs, lo que refuerza la participación de la respuesta inmunológica antitumoral del huésped.^{7,34}

Conclusiones

En cáncer avanzado las opciones de tratamiento son la radioterapia y/o quimioterapia. Con respecto a la quimioterapia se han empleando distintos fármacos que inducen la citostasis o la muerte de las células tumorales y en consecuencia mantienen o reducen la masa tumoral.³¹ Recientemente se ha reportado en modelos experimentales de cáncer que algunos fármacos citotóxicos causan la muerte tumoral induciendo la apoptosis inmunogénica.³³ Este tipo de muerte se caracteriza por la presencia extracelular de DAMPs que participan activando la respuesta inmunológica innata y adaptativa.^{7,34,75} No obstante que el conocimiento en esta área es incipiente, profundizar en el estudio de los DAMPs indudablemente impactará en la comprensión de la biología del cáncer, así como en potenciar la respuesta inmunológica antitumoral.

Para conseguir este objetivo será necesario adecuar los esquemas de tratamientos convencionales actuales, de tal forma que:

- Mantengan su acción biológica sobre las células tumorales.
- Induzcan la apoptosis inmunogénica,
- Disminuyan su efecto nocivo en las células del sistema inmunológico.

Lo anterior establecerá una eficiente respuesta inmunológica tumor-específica que permita la erradicación de la masa tumoral.

El conocimiento de la actividad biológica de los DAMPs descritos hasta ahora, así como de los que eventualmente se descubran, permitirá en un futuro cercano modular la respuesta inmunológica, minimizando o eludiendo los mecanismos de evasión del tumor. En consecuencia, su implementación en la terapia antineoplásica tendrá, sin duda, un impacto significativo en la sobrevida y calidad de vida de los pacientes. Asimismo, los DAMPs pudieran aplicarse en conjunto con las vacunas antitumorales para potenciar y prolongar su efecto biológico protector. La investigación en relación con el papel que juegan los DAMPs permite mantener una perspectiva optimista en relación con futuras formas de tratamiento anti-neoplásico.

AGRADECIMIENTOS

Apoyado por financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de expediente: CONACyT-SEP 2008-01-102106. La autora Verónica Rojo-León, alumna de posgrado en el Programa de Ciencias Biológicas de la UNAM, agradece el apoyo brindado por el CONACyT a través de la beca 239908.

REFERENCIAS

1. Erwig LP, Henson PM. Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *Am J Pathol* 2007; 171: 2-8.
2. Krysko DV, Vandenabeele P. Clearance of dead cells: Mechanisms, immune responses and implication in the development of diseases. *Apoptosis* 2010; 15: 995-7.
3. Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 353-63.
4. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
5. Jeannin P, Jaillon S, Delneste Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 530-7.
6. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 826-37.

7. Apetoh L, Tesniere A, Ghiringhelli F, Kroemer G, Zitvogel L. Molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anti-cancer therapies. *Cancer Res* 2008; 68: 4026-30.
8. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: All we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1-5.
9. Garg AD, Nowis D, Golab J, Vandenebeele P, et al. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: An emerging amalgamation. *Biochim Biophys Act* 2010; 1805: 53-71.
10. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* 2010; 140: 798-804.
11. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 279-89.
12. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 991-1045.
13. Matzinger P. The danger model: A renewed sense of self. *Science* 2002; 296: 301-5.
14. Yang D, Tewary P, De la Rosa G, Wei F, Oppenheim JJ. The alarmin functions of high-mobility group proteins. *Biochim Biophys Act* 2010; 1799: 157-63.
15. Aderer A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 593-623.
16. Poon IK, Hulett MD, Parish CR. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differ* 2010; 17: 381-97.
17. Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, et al. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ* 2008; 15: 3-12.
18. Anisimov VN. Carcinogenesis and aging 20 years after: Escaping horizon. *Mech Ageing Dev* 2009; 130: 105-21.
19. Ponder BA. Cancer genetics. *Nature* 2001; 411: 336-41.
20. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001; 2: 293-9.
21. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21: 137-48.
22. Vieweg J, Jackson A. Modulation of antitumor responses by dendritic cells. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 26: 329-41.
23. Palucka AK, Ueno H, Fay JW, Banchereau J. Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells. *Immunol Rev* 2007; 220: 129-50.
24. Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, Somersalo K, et al. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 375-96.
25. Marincola FM, Wang E, Herlyn M, Seliger B, Ferrone S. Tumors as elusive targets of T-cell-based active immunotherapy. *Trends Immunol* 2003; 24: 335-42.
26. June CH. Principles of adoptive T cell cancer therapy. *J Clin Invest* 2007; 117: 1204-12.
27. Dhodapkar MV, Dhodapkar KM, Palucka AK. Interactions of tumor cells with dendritic cells: Balancing immunity and tolerance. *Cell Death Differ* 2008; 15: 39-50.
28. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: Immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 715-27.
29. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 267-96.
30. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: Mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 2005; 84: 627-39.
31. De Vita VT Jr CE. Principles of medical oncology. In: De Vita VT Jr HS, Rosenberg SA (ed.). *Cancer: Principles and practice of oncology*. 8th. Ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Williams and Wilkins; 2008, p. 337-45.
32. Lawrence TS TR, Giaccia A. Principles of radiation oncology. In: De Vita VT Jr HS, Rosenberg SA (ed.). *Cancer: Principles and practice of oncology*. 8th. Ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Williams and Wilkins; 2008, p. 307-10.
33. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 59-73.
34. Haynes NM, van der Most RG, Lake RA, Smyth MJ. Immunogenic anti-cancer chemotherapy as an emerging concept. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 545-57.
35. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Andre F, et al. The anti-cancer immune response: Indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest* 2008; 118: 1991-2001.
36. Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 2005; 202: 1691-701.
37. Haskell JS. Adriamycin-activated macrophages as tumor growth inhibitors. *Cancer Res* 1981; 41: 3852-6.
38. Ho RL, MacCubbin D, Zaleskis G, Krawczyk C, et al. Development of a safe and effective adriamycin plus Interleukin 2 therapy against both adriamycin-sensitive and -resistant lymphomas. *Oncol Res* 1993; 5: 373-81.
39. Zaleskis G, Ho RL, Diegelman P, MacCubbin D, et al. Intracellular doxorubicin kinetics in lymphoma cells and lymphocytes infiltrating the tumor area in vivo: A flow cytometric study. *Oncol Res* 1994; 6: 183-94.
40. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007; 13: 1050-9.
41. Apetoh L, Mignot G, Panaretakis T, Kroemer G, Zitvogel L. Immunogenicity of anthracyclines: Moving towards more personalized medicine. *Trends Mol Med* 2008; 14: 141-51.
42. Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, Kepp O, et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* 2010; 29: 482-91.
43. Nowak AK, Lake RA, Marzo AL, Scott B, et al. Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. *J Immunol* 2003; 170: 4905-13.
44. Taieb J, Chaput N, Menard C, Apetoh L, et al. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* 2006; 12: 214-9.
45. Kepp O, Galluzzi L, Martins I, Schlemmer F, et al. Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 2011; 30: 61-9.
46. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LPR on the phagocyte. *Cell* 2005; 123: 321-34.
47. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007; 13: 54-61.
48. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* 2009; 28: 578-90.
49. Binder RJ, Srivastava PK. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2005; 6: 593-9.
50. Somersan S, Larsson M, Fonteneau JF, Basu S, et al. Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 2001; 167: 4844-52.
51. Reeves R. Nuclear functions of the HMG proteins. *Biochim Biophys Act* 2010; 1799: 3-14.
52. Andersson U, Erlandsson-Harris H, Yang H, Tracey KJ. HMGB1 as a DNA-binding cytokine. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 1084-91.

53. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): Nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 331-42.
54. Bianchi ME, Manfredi AA. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2007; 220: 35-46.
55. Dumitriu IE, Baruah P, Manfredi AA, Bianchi ME, Rovere-Querini P. HMGB1: Guiding immunity from within. *Trends Immunol* 2005; 26: 381-7.
56. Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentini B, et al. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep* 2004; 5: 825-30.
57. Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, et al. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J* 2003; 22: 5551-60.
58. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 2002; 3: 995-1001.
59. Dumitriu IE, Bianchi ME, Bacci M, Manfredi AA, Rovere-Querini P. The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 84-91.
60. Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey KJ, et al. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 59-66.
61. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 2000; 192: 565-70.
62. Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, Pakkanen J, et al. Regulation of monocyte migration by amphotericin (HMGB1). *Blood* 2004; 104: 1174-82.
63. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, et al. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev* 2007; 220: 47-59.
64. Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Wang H, et al. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 11942-7.
65. Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, et al. High mobility group box protein 1: An endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J Immunol* 2004; 173: 307-13.
66. Shi Y, Galusha SA, Rock KL. Cutting edge: Elimination of an endogenous adjuvant reduces the activation of CD8 T lymphocytes to transplanted cells and in an autoimmune diabetes model. *J Immunol* 2006; 176: 3905-08.
67. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003; 425: 516-21.
68. Chen CJ, Shi Y, Hearn A, Fitzgerald K, et al. Myd88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *J Clin Invest* 2006; 116: 2262-71.
69. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440: 237-41.
70. Hu DE, Moore AM, Thomsen LL, Brindle KM. Uric acid promotes tumor immune rejection. *Cancer Res* 2004; 64: 5059-62.
71. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 2009; 15: 1170-8.
72. Aymeric L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Res* 2010; 70: 855-8.
73. Martins I, Tesniere A, Kepp O, Michaud M, et al. Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle* 2009; 8: 3723-8.
74. Tesniere A, Apetoh L, Ghiringhelli F, Joza N, et al. Immunogenic cancer cell death: A key-lock paradigm. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 504-11.
75. Kepp O, Tesniere A, Schlemmer F, Michaud M, et al. Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. *Apoptosis* 2009; 14: 364-75.

Reimpresos:

Dr. José Sullivan López-González

Unidad de Investigación

Departamento de Enfermedades

Crónico-Degenerativas

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Calzada de Tlalpan, Núm. 4502

Col. Sección XVI,

14080, México, D.F.

Tel.: 5487-1703, commutador: 5487-1700 Ext. 5230

Correo electrónico: slopezgonzalez@yahoo.com

Recibido el 17 de noviembre 2010.

Aceptado el 26 de agosto 2011.