

Modelación matemática de las implicaciones de la tolerancia dominante en la biología tumoral y la respuesta a terapias combinadas

✉ Kalet León, Karina García, Agustín Lage

Centro de Inmunología Molecular. Ave. 16, esq. a 216, Siboney, Playa,
Ciudad de La Habana, Cuba, AP 16040, CP 11600
E-mail: kalet@cim.sld.cu

RESUMEN

La presencia de linfocitos T reguladores (Tregs) que pueden controlar a otros linfocitos efectores, en el contexto de enfermedades autoinmunes, infecciones y tumores, está definitivamente aceptado en la literatura actual sobre inmunología. Ello confirma la teoría de la tolerancia dominante, que explica la posibilidad de tolerar o rechazar antígenos en el sistema inmune, a partir del equilibrio dinámico entre las poblaciones de linfocitos T reguladores y efectores. Este artículo resume los resultados de un estudio teórico reciente con técnicas de modelación matemática, sobre la interacción dinámica entre poblaciones de linfocitos T en presencia o ausencia de tumores, y como respuesta a diversos tratamientos terapéuticos. Se presenta un modelo matemático basado en uno de tolerancia dominante, desarrollado en el Centro de Inmunología Molecular y premiado por la Academia de Ciencias de Cuba en el año 2002, que incluye células tumorales y simula el efecto frente a tratamientos terapéuticos o a sus combinaciones. Predice cómo ciertas propiedades dinámicas del tumor determinan que este induzca espontáneamente la expansión de poblaciones de Tregs o no. Predice varias estrategias novedosas para tratar de manera diferencial aquellos tumores que expanden o no las células T reguladoras. Este es el primer modelo que permite estudiar el impacto de los Tregs en el crecimiento de tumores malignos. Los resultados fueron avalados por publicaciones internacionales. El modelo también predice el valor práctico para el diseño de tratamientos combinados, que incluyen vacunas, cirugía parcial del tumor y eliminación de poblaciones linfocitarias.

Palabras clave: linfocitos T reguladores, dinámica de crecimiento tumoral, interacción tumor sistema inmune, terapias combinadas, modelación matemática

Introducción

La presencia de linfocitos T reguladores (Tregs) que pueden controlar a otros linfocitos efectores, en el contexto de enfermedades autoinmunes, infecciones y tumores está definitivamente aceptado en la literatura actual sobre inmunología. Ello confirma la teoría de la tolerancia dominante, que explica la posibilidad de tolerar o rechazar antígenos en el sistema inmune, a partir del equilibrio dinámico entre las poblaciones de linfocitos T reguladores y efectores. Sin embargo, a pesar de las evidencias, no hay un modelo biomatemático eficaz, que permita predecir cómo se establece la dinámica entre ambas poblaciones celulares en el contexto de la respuesta antitumoral.

Este estudio biomatemático refiere la función de los Tregs en la tolerancia inmunológica y más específicamente en la biología tumoral, así como la respuesta de los tumores frente a diferentes terapias. Se incluyen varios modelos teóricos, confrontados con datos experimentales. Estos extienden y complementan los resultados teóricos sobre la tolerancia dominante en la regulación de la respuesta inmune (en ausencia de tumores y su tratamiento), que se han venido desarrollando en el Centro de Inmunología Molecular (CIM) desde 1999, y que recibieron un premio de la Academia de Ciencias de Cuba en el 2002 [1].

Resultados y discusión

Estudio teórico de la regulación de la respuesta inmune mediante la tolerancia dominante

Nuestro estudio extiende y complementa los resultados teóricos sobre la regulación de la respuesta inmune

mediante la tolerancia dominante que se han venido desarrollando en el CIM desde 1999: el desarrollo de una formulación simplificada del modelo original de regulación cruzada, con una formulación matemática mucho más simple que mantiene sus propiedades básicas; y la extensión del alcance del modelo básico de regulación cruzada, que evidencia su vigencia y capacidad de ajustarse al conocimiento experimental actual sobre los mecanismos de interacción entre poblaciones de linfocitos T efectores y reguladores [2].

La reformulación del modelo ofrece ventajas para el trabajo teórico, pues el primero, aunque exacto, es muy complejo y difícil de manejar, tanto en simulaciones numéricas como en caracterizaciones analíticas o semianalíticas de las dependencias entre parámetros. Por ser una versión simplificada del inicial, este nuevo modelo es más asequible a un público cuya formación docente se especializa en biología, con un conocimiento mínimo de matemática, que en muchas ocasiones es el destinatario final de los resultados de nuestros estudios. La interacción entre linfocitos T reguladores y efectores en el modelo primario, dependía de que ambas células interactuaran simultáneamente sobre la misma célula presentadora de antígenos (APC). Hoy resulta controversial el mecanismo molecular de esta interacción: al respecto hay varias hipótesis. Se propone que puede ser dependiente de factores solubles producidos localmente en el microambiente celular; dependiente del contacto específico entre la célula reguladora y la efectora; y que ocurre en varias etapas mediante el condicionamiento de las APC en su interacción con los linfocitos T. Para discernir entre estos mecanismos,

1. León K, Pérez R, Lage A. Modelo matemático de la regulación del sistema inmune mediante la tolerancia dominante. *Biotecnol Apl* 2003;20:253-7.

2. Carneiro J, León K, Caramalho I, Van den Dool C, Gardner R, Oliveira V et al. When three is not a crowd: A cross regulation model of the dynamics and repertoire selection of regulatory CD4 T cells. *Immunol Rev* 2007;216:48-68.

se desarrollaron simulaciones computacionales basadas en agentes para las diferentes variantes propuestas. Con ello se demostró que nuestro modelo original de regulación cruzada permite representar todas esas variantes, siempre y cuando la interacción entre células efectoras y reguladoras ocurra localmente en el entorno de las APC, donde se activan los linfocitos T, independientemente de los detalles moleculares de la interacción.

Esta nueva reformulación permite estudiar las implicaciones de la tolerancia dominante en la estructuración del repertorio periférico de los linfocitos T, en su interacción con un grupo diverso de antígenos propios. Como consecuencia del modelo de regulación cruzada, este predice la estructuración dinámica (espontánea) del repertorio de linfocitos T periféricos en tres subpoblaciones, de acuerdo con sus niveles de reconocimiento. La primera es una subpoblación que reconocería antígenos propios muy poco presentados por las APC, y mantiene el equilibrio entre linfocitos T reguladores y efectores con que se generan en el tiempo y perpetúan mediante la generación continua de nuevos clones. Una segunda subpoblación reconocería bajos niveles de antígenos en las APC, cuya composición estaría enriquecida por linfocitos T efectores, y el mantenimiento sería independiente de la generación de nuevos clones en el tiempo. A pesar de su variedad, esta subpoblación está compuesta por clones cuyo número estaría limitado por la baja presencia de sus antígenos, por lo que no causa autoinmunidad. La tercera y última subpoblación reconocería antígenos presentados a altos niveles en las APC. Esta estaría muy enriquecida en Tregs que controlan de manera continua la expansión de linfocitos T efectores potencialmente patogénicos, que reconocen esos antígenos mayoritarios.

La estructuración predicha es cuantitativamente compatible con las proporciones de linfocitos T reguladores y efectores encontradas en experimentos, y pudiera facilitar la respuesta inmune contra un nuevo antígeno foráneo. Por probabilidades, las dos primeras subpoblaciones del modelo reconocerían un nuevo antígeno. Estas no estarían enriquecidas en células T reguladoras, lo que facilitaría la expansión de linfocitos T efectores que desplazarían a aquellos pocos reguladores que pudieran reconocerlo.

Implicaciones de la tolerancia dominante en el desarrollo de tumores malignos

Se desarrolló un nuevo modelo matemático que, incorporando los mecanismos de regulación cruzada antes estudiados y modelados, se centró en la interacción dinámica entre células tumorales y linfocitos T efectores y reguladores [3]. Hasta donde conocemos, este es el primer modelo matemático para esta interacción reportado en la literatura, con impacto en el diseño de terapias contra el cáncer. Este modelo permitió: 1) predecir dos modos de crecimiento tumoral (en ausencia de terapias), que se diferencian en la dinámica de su interacción con el sistema inmune (Figuras 1a y b); 2) predecir e identificar las propiedades dinámicas de los tumores que determinan su crecimiento dependiente de Tregs (denominado modo GR+) o independiente de estos (modo GR-) (Figura 1c); y 3) proponer un experimento que permite distinguir tumores que crecen en modo GR+ o GR- en

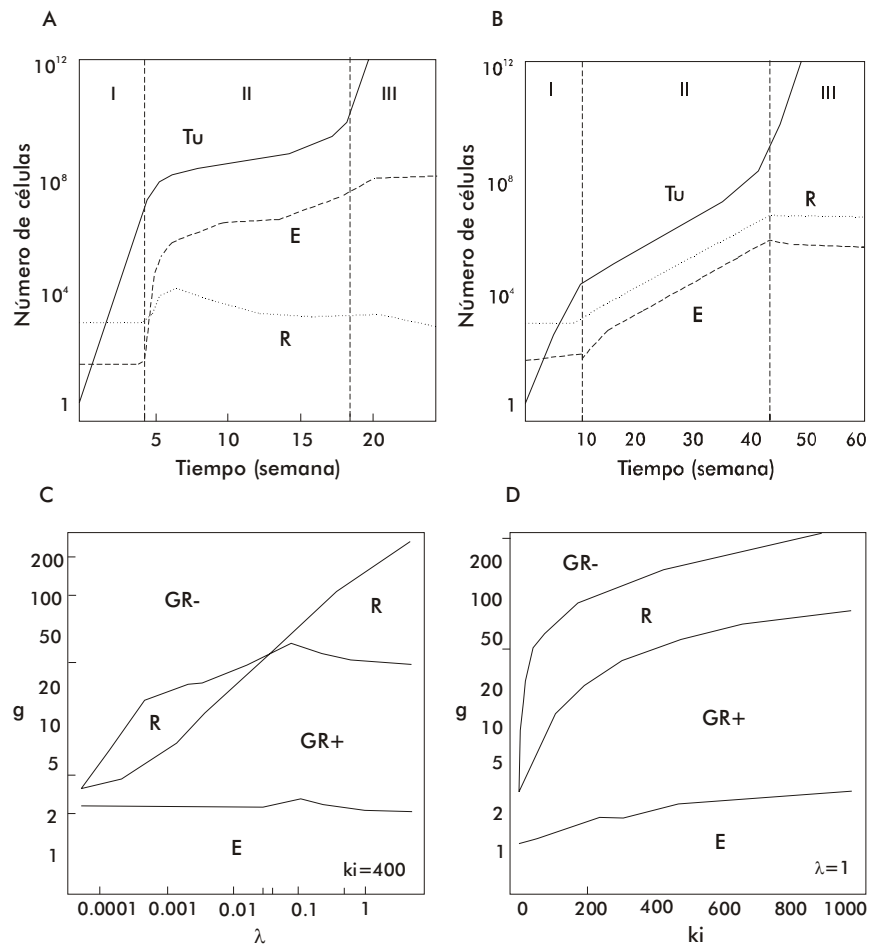


Figura 1. Cinética típica del crecimiento del número de células tumorales (Tu) en su interacción con linfocitos T efectores (E) y reguladores (R), siguiendo el modo GR- (a) o GR+ (b) en nuestro modelo. Las líneas de puntos verticales delimitan tres fases funcionales comunes a estos tipos de tumores en su interacción con el sistema inmune, que resultan relevantes para luego comprender su respuesta frente a diferentes terapias. Los paneles c) y d) muestran las regiones en el espacio de parámetros dinámicos del tumor, donde el modelo predice un crecimiento en modo GR+ o GR-. La región marcada como R corresponde a la regresión espontánea del tumor, y la marcada como E corresponde a un equilibrio estable del tumor con el sistema inmune. Los parámetros indicados g, λ y ki controlan la tasa de crecimiento específico de las células tumorales, la inmunogenicidad del tumor y la sensibilidad a las funciones inmunes efectoras.

modelos de tumores trasplantables en animales de laboratorio.

En el primer caso, el tumor que crece en modo GR+ expande las poblaciones de linfocitos T reguladores y efectores de manera equilibrada, lo cual es dependiente de la actividad supresora. El tumor que crece en modo GR- rompe espontáneamente el equilibrio entre las dos poblaciones linfocitarias, y expande la subpoblación efectora sin que su respuesta inmune detenga el crecimiento tumoral. Estos dos modos de crecimiento explican las evidencias en tumores de modelos animales y en tumores clínicos, cuyo crecimiento y pronóstico dependen de la actividad y expansión o no de los Tregs (T CD4+CD25+).

Respecto a la predicción e identificación de propiedades dinámicas de los tumores, el modelo predice que los tumores con baja tasa de crecimiento específico, relativamente alta inmunogenicidad (definida por la inducción espontánea de la presentación de sus

3. León K, García K, Carneiro J, Lage A. How regulatory CD25+CD4+T cells impinge on tumor immunobiology? On the existence of two alternative dynamical classes of tumors. *J Theor Biol* 2007; 247:122-37.

antígenos en APC) y alta sensibilidad a la función inmune efectora (definida por su sensibilidad a lisis por linfocitos T efectores) crecen en modo GR+. Por el contrario, los tumores con alta tasa de crecimiento específico, baja inmunogenicidad y baja sensibilidad a funciones inmunes efectoras, crecen en el modo GR-. Este resultado es muy importante, pues propone que la diferencia de composición antigénica de los tumores puede que no determine entre uno y otro modo de crecimiento tumoral, y por ende, su capacidad para ser más o menos reconocido por clones de Tregs periféricos. Tal diferencia pudiera derivar de las propiedades dinámicas intrínsecas del tumor, lo que explica observaciones recientes en ratones genéticamente modificados que espontáneamente desarrollan tumores de mama. En estos animales se observó una gran diversidad de tumores, con similar composición antigénica (por su construcción genética), pero que crecen expandiendo o no los Tregs, y utilizan diversos mecanismos de escape.

El modelo predice las propiedades que se deben evaluar en los tumores reales, y ayuda a comprender por qué unos tumores expanden las poblaciones de Tregs y otros no, lo cual es relevante. En particular, que los tumores de crecimiento rápido resulten tumores del modo GR-, tiene como corolario la predicción de que la mayoría de los modelos de tumores trasplantables usados en la experimentación animal, serían tumores GR- negativos. Por lo tanto, estos modelos tumorales son inadecuados para estudiar la función de los Tregs en la biología tumoral y la respuesta de tumores espontáneos frente a inmunoterapias, pues la mayoría tienen un desarrollo mucho más lento *in vivo*.

La proposición de un experimento que permite distinguir tumores que crecen en modo GR+ o GR- en modelos de tumores trasplantables en animales de laboratorio, plantea el estudio del crecimiento de los tumores en función del número de células inicialmente implantadas. Según el modelo biomatemático, los tumores que crecen en modo GR+ mostrarían una dependencia de tipo campana, en que habría crecimiento tumoral con la implantación inicial de muchas y pocas células, mientras que con una cantidad intermedia, se rechazaría el tumor. Tal dependencia se diferencia de la esperada en tumores GR-, en los que con una baja cantidad de células implantadas no habría crecimiento, y sí con muchas células implantadas. Es importante destacar que en los años 70 del siglo pasado se reportaron dependencias como la predicha para tumores GR+ en algunos modelos tumorales, y se escogió el término de *sneaking through* para designar este fenómeno. El resultado con nuestro modelo propone una reinterpretación de estas observaciones en el contexto de la teoría de la tolerancia dominante.

Modelación de la interacción tumor-sistema inmune y del efecto de terapias solas o combinadas

En esta fase del trabajo se puso especial énfasis en comprender las diferencias de la respuesta frente a terapias contra tumores que crecen en los modos GR+ o GR- [4].

Se estudiaron tres tipos de terapias y todas sus combinaciones por pares. La primera fue la vacunación, que en el modelo se simula como un aumento abrupto

y transitorio del número de APC que presentan antígenos tumorales. La segunda fue la eliminación de linfocitos T reguladores y efectores, simulada como un incremento transitorio en su tasa de muerte. La tercera y última terapia fue la cirugía, que se simuló como una remoción abrupta pero parcial de las células tumorales. Hubo similitudes y diferencias en la respuesta de tumores GR+ y GR- frente a las terapias, y las combinaciones terapéuticas fueron superiores a las terapias individuales. Los principales resultados fueron:

1) La predicción sorprendentemente similar de la respuesta de tumores GR+ y GR- frente a la vacunación (Figuras 2a y b). En ambos, altas dosis de la vacuna es eficiente, pero la mínima dosis requerida para inducir el rechazo del tumor se va incrementando con su crecimiento. De ese modo, la vacunación sola es efectiva cuando se aplica en la etapa inicial del crecimiento tumoral. A su vez, vacunar con dosis no óptimas en la etapa inicial del crecimiento tumoral, puede provocar efectos contraproducentes al acelerar el crecimiento del tumor. Este resultado propone que las vacunas convencionales son típicamente más eficientes cuando se aplican a los tumores en estadios menos avanzados o antes de la implantación del tumor, y regularmente fallan en etapas más tardías. Ello también explica los reportes recientes acerca de vacunas terapéuticas que han acelerado el crecimiento tumoral, lo cual sugiere que ocurre en condiciones de vacunación con dosis no óptimas.

2) La respuesta al tratamiento de eliminación de linfocitos T induce rechazo tumoral en ambos tipos de tumores, si la vacuna se aplica en dosis elevadas en una ventana inicial del desarrollo tumoral (Figuras 2c y d). Los tratamientos con dosis no optimizadas o fuera de la ventana inicial de sensibilidad, pueden acelerar el crecimiento del tumor. A pesar de estas similitudes, los tumores GR+ se predicen como más sensibles a esta terapia que los tumores GR-. En los GR+, la ventana de sensibilidad al tratamiento es más amplia y las condiciones de tratamiento que conducen a la aceleración de crecimiento tumoral son más escasas. Este resultado explica observaciones anteriores en modelos animales sobre la inducción de rechazo tumoral solo en la ventana inicial de desarrollo del tumor, como respuesta a la eliminación de linfocitos T con anticuerpos anti-CD25. Nuestro análisis sugiere que este tipo de comportamiento se observa para ambos tipos de tumores (GR+ y GR-), contrario a otras interpretaciones reportadas en la literatura.

3) La predicción de respuesta frente a terapias de cirugía parcial difiere en ambos tipos de tumores. Los tumores GR+ son insensibles a la cirugía parcial, la cual reduce de manera temporal el tamaño del tumor hasta que este vuelve a crecer rápidamente. Por el contrario, los tumores GR- son muy sensibles a esta terapia, pues reduce el volumen tumoral de modo considerable y se aplica una vez que este, en su desarrollo espontáneo, ha provocado la expansión de una respuesta inmune efectora. Este tipo de tratamiento es el único en nuestro estudio que no parece acelerar el crecimiento tumoral como efecto adverso y bajo ninguna circunstancia. Este resultado propone una reinterpretación del efecto de recurrencia tumoral después de la cirugía, que involucra al sistema inmune, a diferencia de la explicación

4. León K, García K, Carneiro J, Lage A. How regulatory CD25+CD4+T cells impinge on tumor immunobiology? On the differential response of tumors to immunotherapies. *J Immunol* 2007;179: 5659-68.

tradicional basada en la permanencia de algunas células tumorales. Esta sugeriría la conveniencia de la cirugía, incluso en condiciones en que es imposible remover todas o la mayoría de las células tumorales.

4) El estudio evidenció una gran complejidad en la respuesta de los tumores frente a las tres terapias. La efectividad de la terapia resultó altamente dependiente de la dosis de aplicación, del tipo de tumor (GR+ o GR-) y de la fase de desarrollo en que se aplica. La terapia que fue efectiva con una dosis determinada en un tumor específico en una fase particular de su desarrollo, fue inefectiva o contraproducente (y provocó su crecimiento acelerado) cuando se aplicó en otra fase de su crecimiento o en la misma fase en un tumor diferente. Este escenario implica mucha dificultad para la evaluación de estos tratamientos desde una perspectiva clínica, pues, a diferencia de los modelos animales, los tumores en pacientes son heterogéneos (no se clasifican hoy como GR+ o GR-) y pudieran estar en diferentes fases de desarrollo con respecto a su interacción con el sistema inmune. Por tanto, la solución demanda que en el estudio clínico haya una mejor clasificación de los tumores y sus estadios, y se diseñen tratamientos eficaces contra diversas poblaciones de tumores. Para la primera estrategia, nuestro modelo propone una definición de tres fases del desarrollo tumoral (Figura 1a y b), en función de su interacción con el sistema inmune, que resulta operativa en el modelo en el momento de evaluar e interpretar la respuesta frente a los tratamientos antes estudiados. Con respecto a la segunda estrategia, el modelo propone combinaciones terapéuticas que posean mayor eficacia que las terapias individuales, y funcionen para ambos tipos de tumores (GR+ o GR-), pero en todas las fases de su desarrollo (estadios tempranos y tardíos).

5) La mejor combinación terapéutica predicha para tumores GR- fue la vacunación con cirugía (Figura 2e). Esta resulta óptima en el modelo si la vacunación se aplica simultáneamente con la cirugía, o ligeramente antes. Esta terapia combinada es potencialmente efectiva en todos los estadios del tumor y superior a las terapias por separado. Este tipo de combinación se ha explorado en la terapia de cáncer: se conoce como vacunación en escenario adyuvante, y ha sido efectiva en algunos modelos tumorales. Lo novedoso en nuestra predicción es que este tipo de combinación no es óptima tal y como se aplica actualmente, con la cirugía antes de la vacunación terapéutica. Esta otra predicción de nuestro modelo es susceptible de evaluación.

6) La mejor terapia combinada predicha para el tratamiento de tumores GR+ fue la eliminación de células T combinada con cirugía, después de la supresión, y toda vez que se recuperan las poblaciones celulares (Figura 2f). Esta fue efectiva en estadios tempranos y tardíos del desarrollo tumoral y, por ende, superior a cualquiera de estas terapias por separado. Hasta donde conocemos, este tipo de combinación nunca se ha evaluado en análisis clínicos o preclínicos, y es un buen candidato para su futura evaluación experimental en el CIM.

Conclusiones

Los resultados de este trabajo contribuyen a la comprensión teórica de la función de los Tregs en la

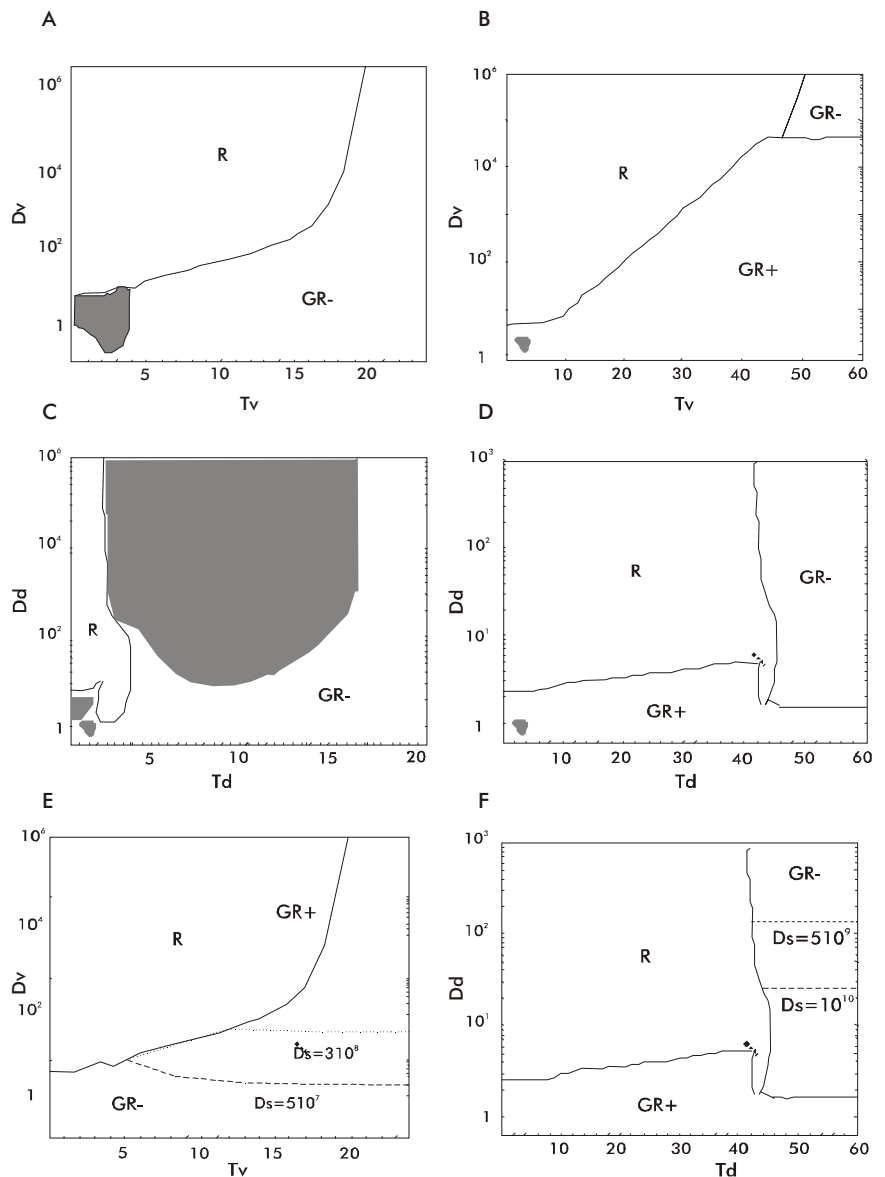


Figura 2. Respuesta frente a tratamientos individuales y combinados. 2a y b) Respuesta frente a tratamientos individuales de vacunación; 2c y d) Eliminación de células T de tumores que crecen en el modo GR- (columna izquierda, cinética en Figura 1a) o GR+ (columna derecha, cinética en Figura 1b) en ausencia de tratamiento, como función de la dosis (Dv para vacuna y Dd para depleciones T) y el tiempo de aplicación del tratamiento con respecto al desarrollo del tumor. Tratamientos con parámetros de aplicación con valores (indicados en los ejes) dentro de las regiones marcadas como R provocan el rechazo del tumor, mientras que aquellos parámetros dentro de las regiones marcadas como GR+ o GR- conducen a una continuidad del crecimiento del tumor en el modo correspondiente. Regiones sombreadas en gris corresponden a parámetros de aplicación del tratamiento que resultan en crecimiento acelerado del tumor. 2e) Respuesta de tumor GR- a la combinación de vacunación con cirugía. La línea continua corresponde a la dosis mínima de vacunación requerida para inducir el rechazo tumoral si se aplica el tratamiento en el tiempo t_v en ausencia de cirugía, mientras las otras dos líneas corresponden a la misma dependencia, pero cuando se aplica una cirugía que reduce el tamaño del tumor al número de células indicado en el gráfico (D_s), justo después de la vacunación. 2f) Respuesta de tumor GR+ frente a tratamientos combinados de eliminación de células T y cirugía. Las líneas continuas delimitan la región de parámetros de aplicación de la eliminación de células T que llevan al rechazo del tumor en ausencia de cirugía. Las líneas discontinuas muestran cómo se ensancha esta región de respuesta cuando se aplica una cirugía, que deja remanentes en el número de células tumorales indicado (D_s), después del tratamiento de eliminación de células T

regulación de la respuesta inmune, y en particular de su influencia en el desarrollo de tumores malignos. Proponen estrategias concretas para la terapia diferencial de tumores, que pudieran ser im-

plementadas y exploradas en experimentación preclínica y clínica. Son un paso de avance en la aplicación de técnicas de modelación y simulación

computacional en el campo de la inmunología y la inmunoterapia, lo que evidencia su validez y potencialidades.