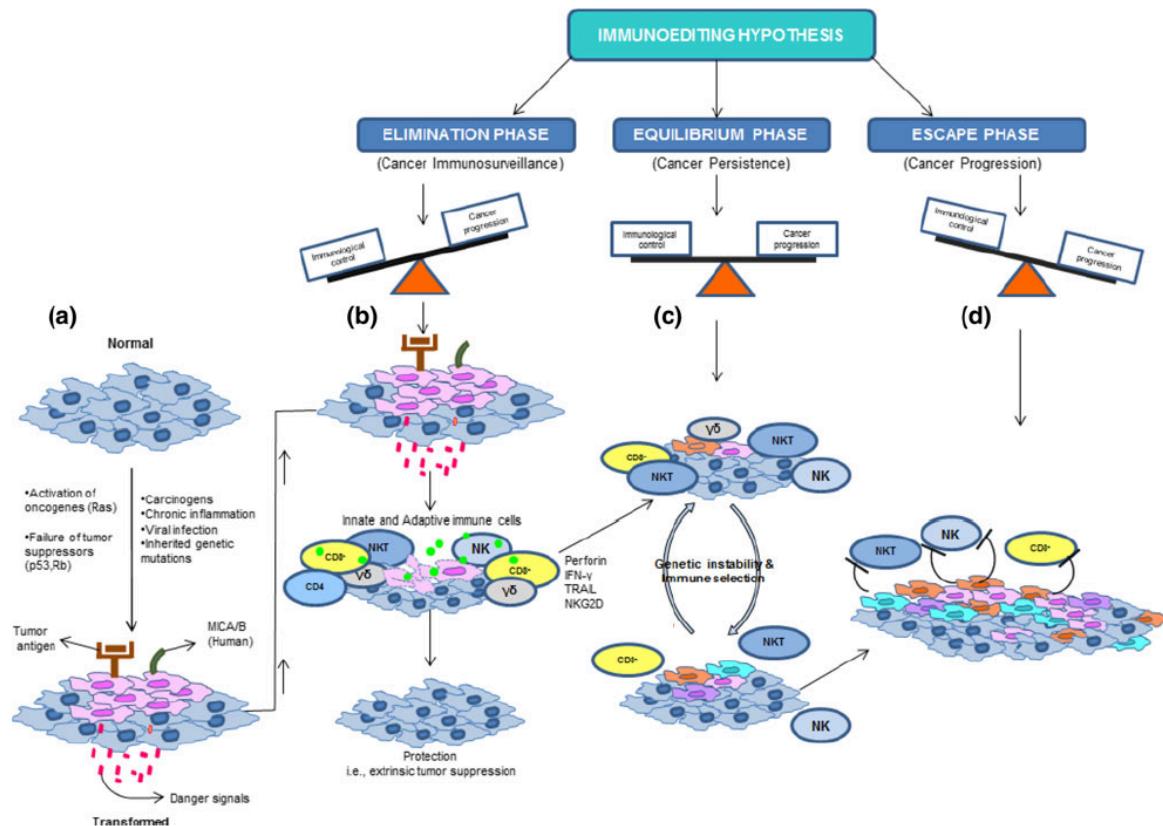


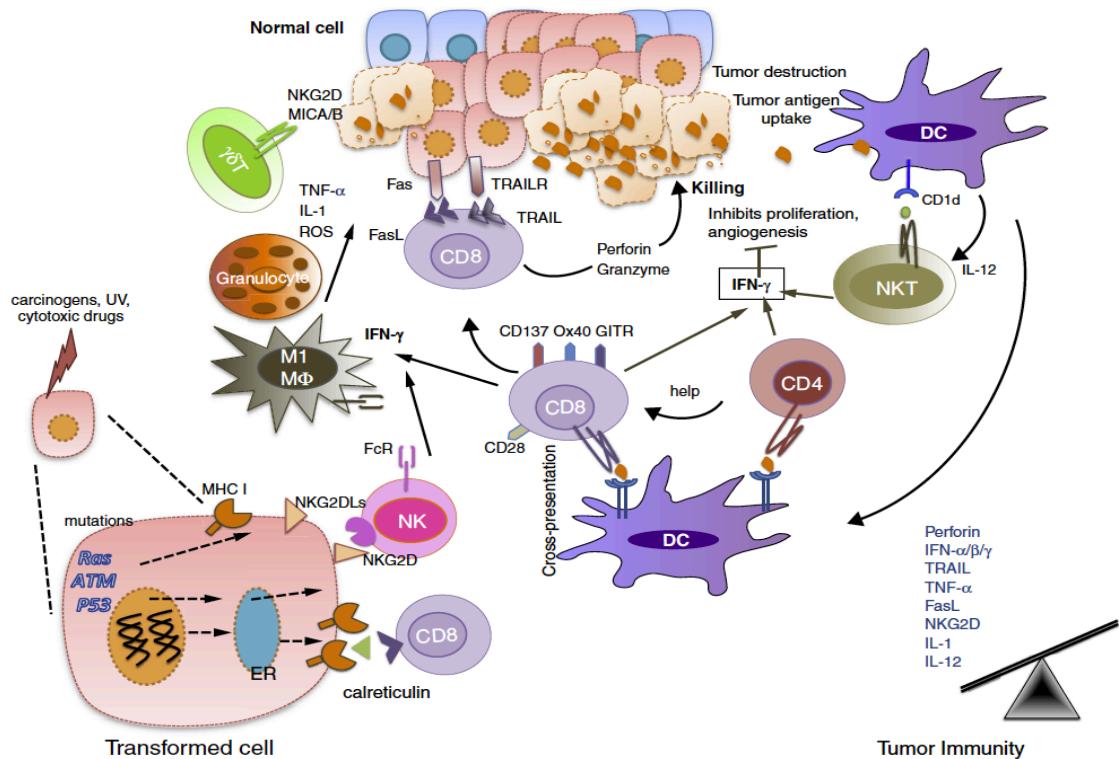
9. Anexos

Figura 1. Descripción de “las tres Es” que conforman la hipótesis de la inmunoedición. Narendra BL *et al.* Immune system: a double-edged sword in cancer. Inflamm Res. 2013;62(9):823-34.



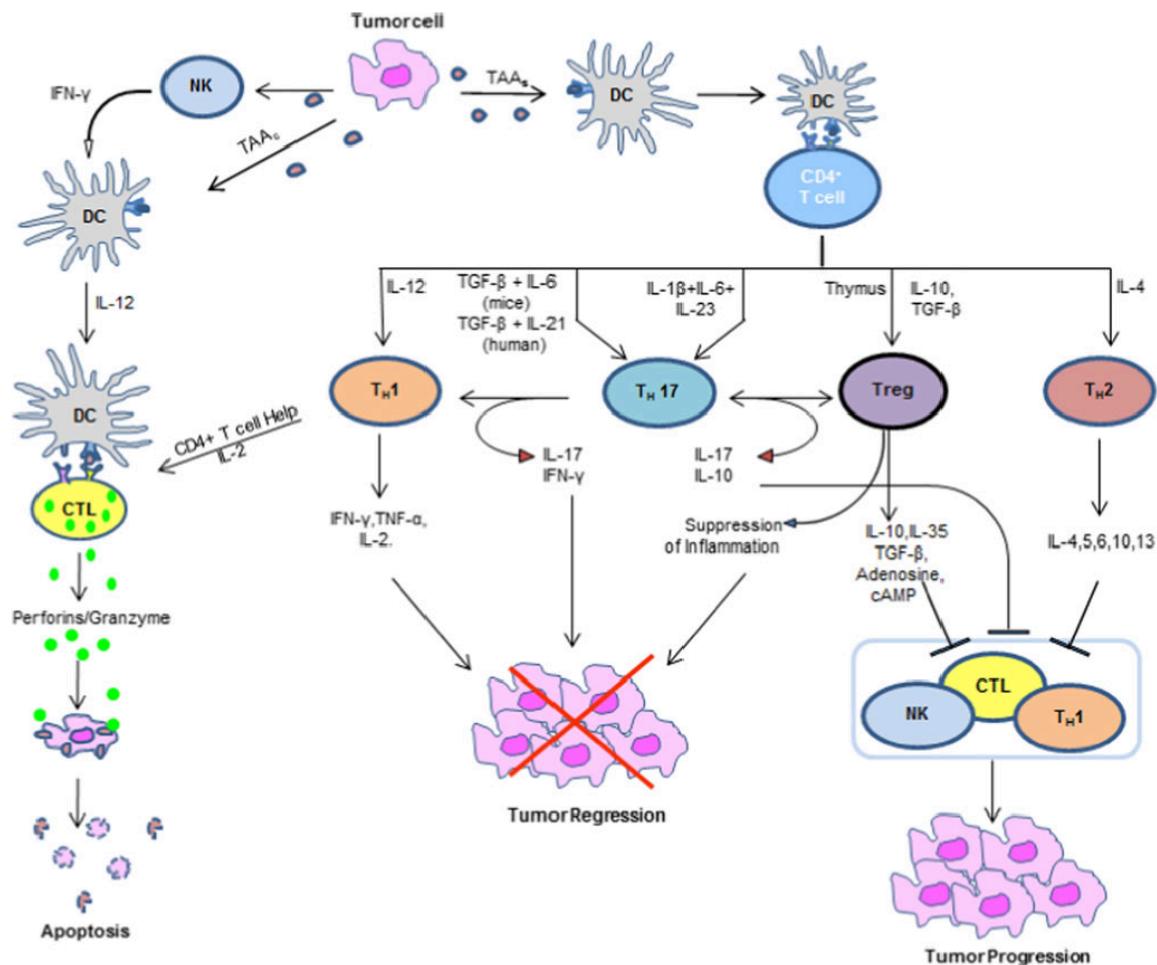
- A.** Factores intrínsecos como oncogenes o factores de supresión tumoral mutados y factores extrínsecos como la inflamación crónica, las infecciones virales y distintas sustancias carcinógenas causan la transformación de las células normales en cancerosas.
- B.** Después de la transformación, las células cancerosas son atacadas por varios tipos de células inmunológicas, que constituyen el sistema de inmunovigilancia tumoral, con el fin de erradicar el tumor en desarrollo. **C.** Si la eliminación no es posible, el sistema inmune y el cáncer pueden llegar a una situación de equilibrio en la que la neoplasia es contenida y su fenotipo inmunológicamente moldeado proliferando, en consecuencia, nuevas poblaciones de células tumorales con inmunogenicidad reducida. **D.** Estas variantes neoplásicas eventualmente escapan al control del sistema inmune por múltiples mecanismos que han ido adquiriendo por presión inmunológica e inestabilidad genética. En esta situación, se expanden de modo incontrolado y se exteriorizan clínicamente.

Figura 2. Descripción esquemática de la fase de Eliminación. Mittal D *et al.* New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. Curr Opin Immunol. 2014;27:16-25



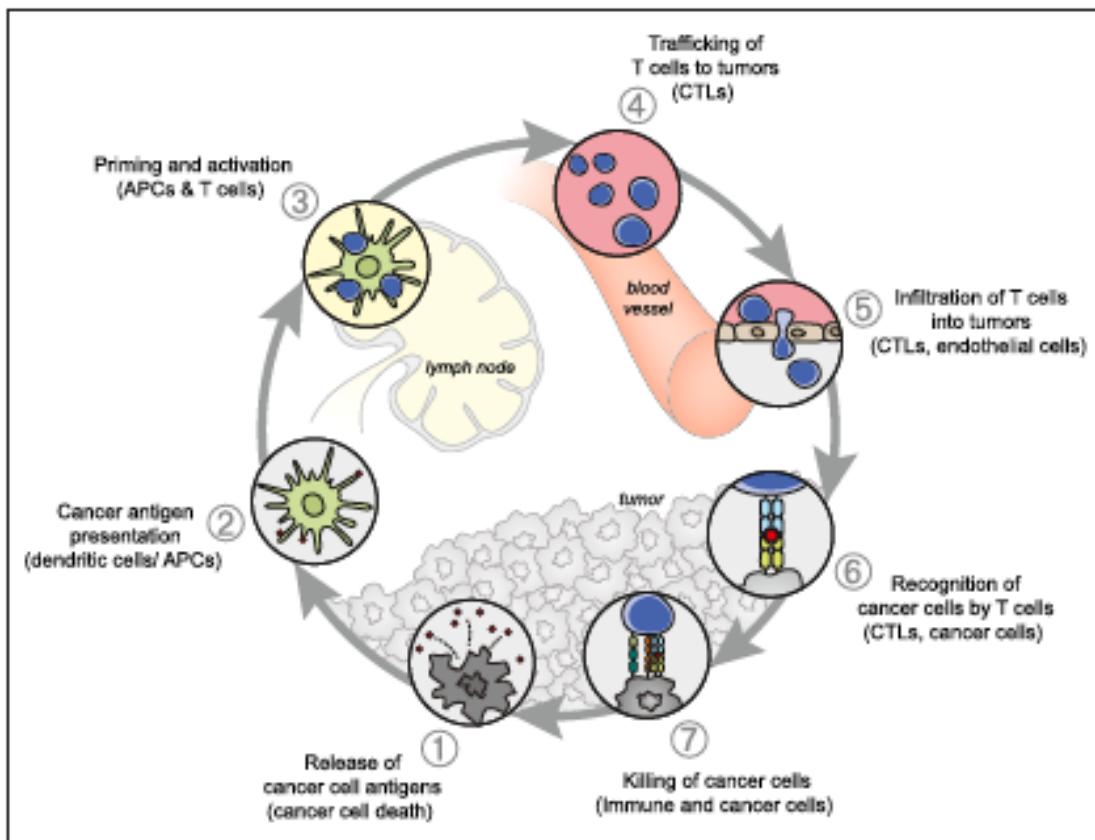
La eliminación es una fase de la inmunoedición tumoral donde el sistema inmune innato y adaptativo colaboran en la detección y destrucción de tumores nacientes antes de que sean clínicamente visibles. Las células normales (azul) son transformadas en células tumorales por carcinógenos junto con el fallo de los sistemas intrínsecos de supresión tumoral (p53, ATM). Estas células tumorales expresan moléculas inducidas por estrés (DAMP), antígenos tumorales en el contexto del complejo MHC clase I, y/o ligandos de NKG2D reconocidos por linfocitos T CD8 $^{+}$ y células NK respectivamente. Las DC incorporan antígenos tumorales y los presentan a los linfocitos T, B y células NKT. Las células efectoras activadas liberan IFN- γ que provoca efectos anti-tumorales mediante la inhibición de la proliferación tumoral y la angiogénesis, y potencia y propaga la respuesta inmune. Los linfocitos T CD8 $^{+}$ pueden inducir la apoptosis por medio de la interacción con los receptores Fas y TRAIL en las células tumorales, o secretando perforinas y granzimas. Los linfocitos T efectores expresan moléculas coestimuladoras (CD28, CD137, GITR, OX-40) que promueven su proliferación y supervivencia. Las células de la respuesta innata también colaboran secretando TNF- α , IL-1, IL-12 y especies reactivas de oxígeno.

Figura 3. Implicación y relación de los distintos tipos de linfocitos T con la inmunidad anti-tumoral. Narendra BL *et al.* Immune system: a double-edged sword in cancer. Inflamm Res. 2013;62(9):823-34.



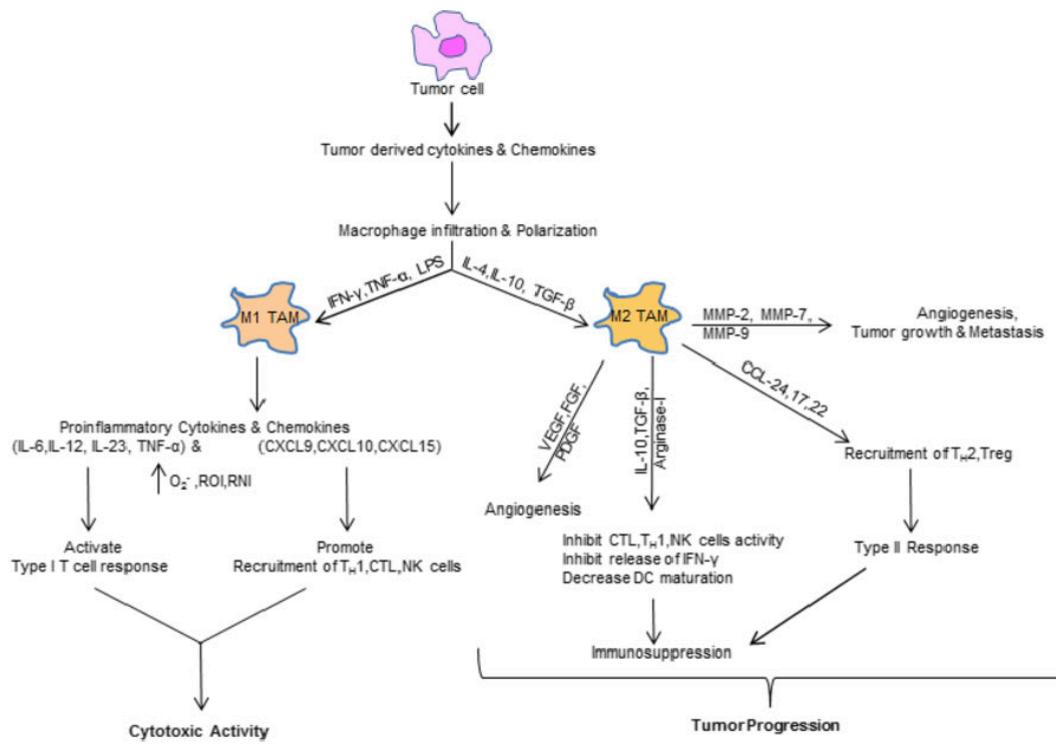
Representación esquemática del rol de los linfocitos T en el cáncer. Las señales derivadas de la presentación antigenica por DC causan la activación de linfocitos T vírgenes CD8⁺ y CD4⁺, y éstos últimos se diferencian en distintas subpoblaciones según el patrón de citoquinas que predomina en el microambiente tumoral ejerciendo distintas funciones.

Figura 4. Descripción del ciclo de la inmunidad frente al cáncer. Chen DS *et al.* Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013; 39(1):1-10.



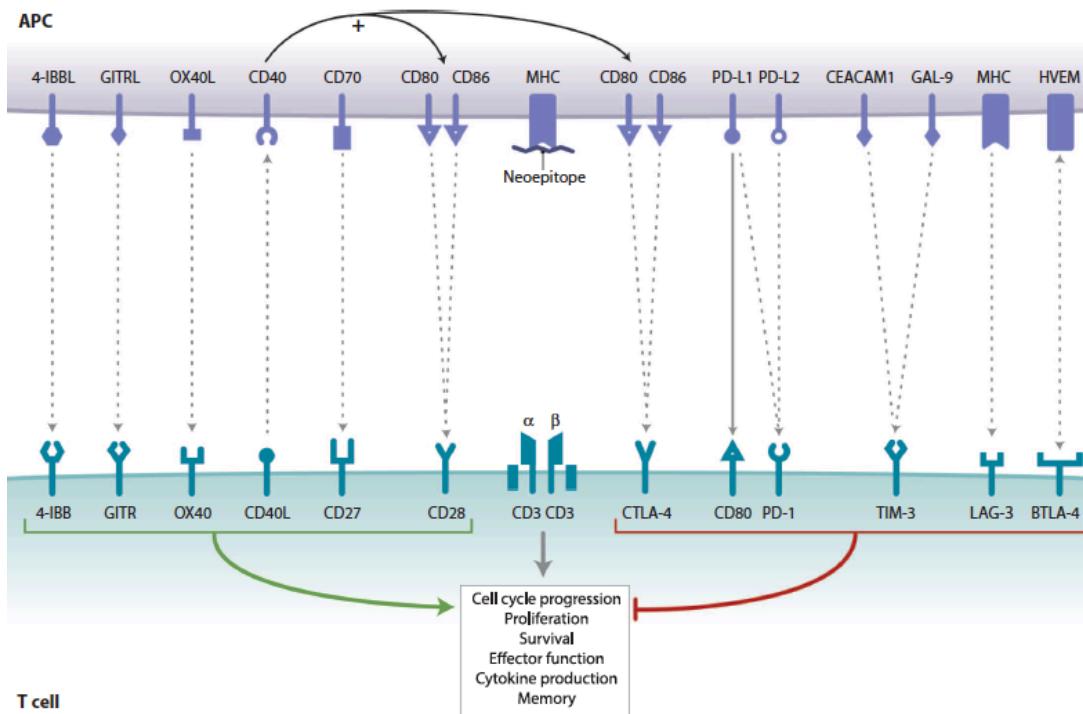
La inmunidad frente al cáncer es un proceso cíclico que puede ser propagado autónomamente, llevando consigo la acumulación de factores estimulantes que conducen a amplificar y refinar la respuesta de los linfocitos T. Este ciclo está también caracterizado por factores inhibidores encargados de regular el alcance de la respuesta inmunitaria por medio de mecanismos de retroalimentación negativa.

Figura 5. Descripción del rol de los macrófagos asociados a tumores. Narendra BL *et al.* Immune system: a double-edged sword in cancer. Inflamm Res. 2013;62(9):823-34.



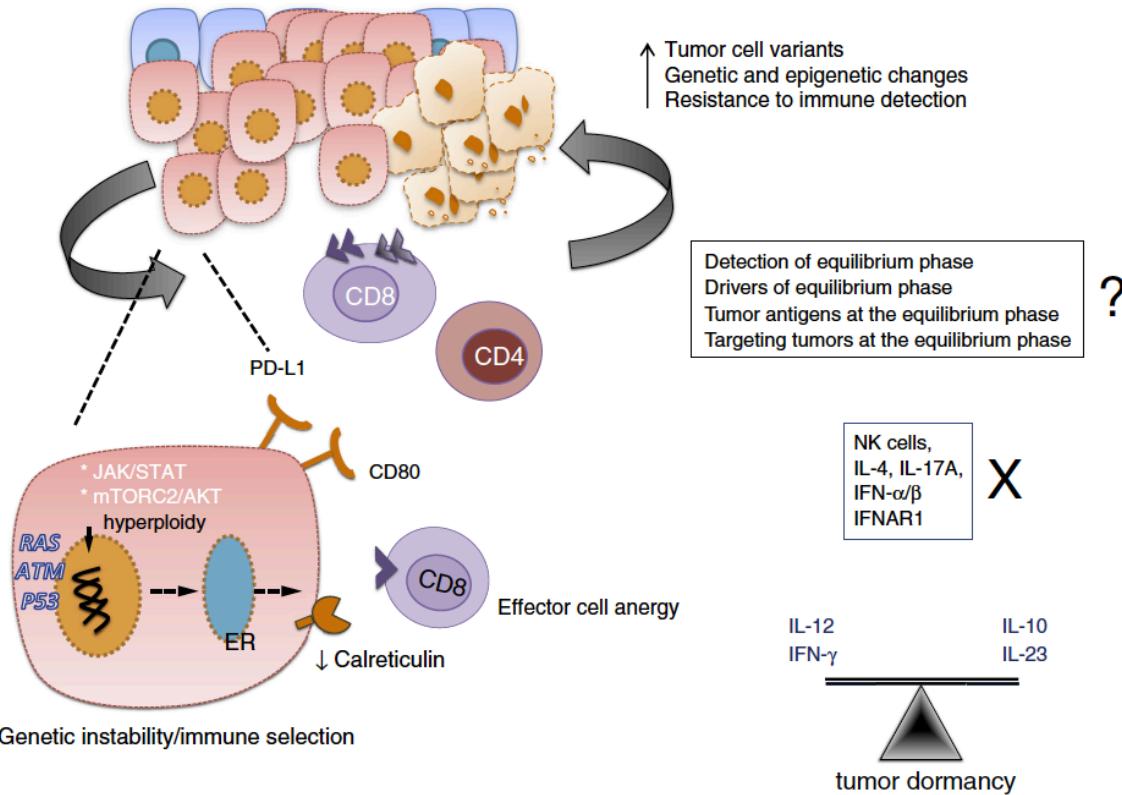
Las células tumorales producen patrones heterogéneos de citoquinas y factores de crecimiento que inducen el reclutamiento de monocitos y su diferenciación hacia macrófagos. Basándose en el patrón de citoquinas que impera en el microambiente tumoral, los macrófagos pueden exhibir un fenotipo M1 (clásico) o M2 (alternativo) con funciones distintas. Los macrófagos M1 expresan un perfil de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias que inhiben la progresión tumoral, mientras que los macrófagos M2 secretan moléculas anti-inflamatorias y proteasas que promueven la angiogénesis, la metástasis y la inmunosupresión.

Figura 6. Moleculas coseñalizadoras que regulan las fases del ciclo celular de los linfocitos T. Lesokhin AM *et al.* On being less tolerant: enhanced cancer immunosurveillance enabled by targeting checkpoints and agonists of T cell activation. Sci Transl Med. 2015;7(280):280sr1.



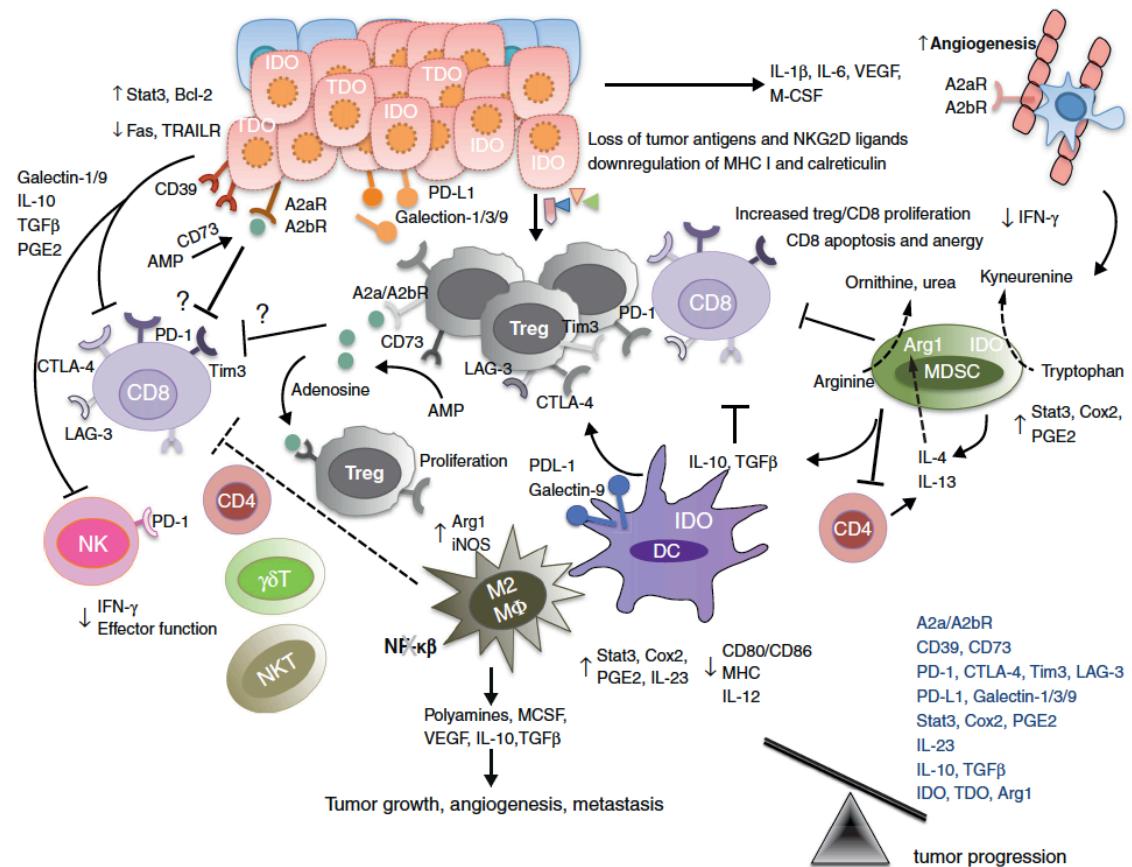
La activación del linfocito T está precisamente regulada por múltiples moléculas coestimuladoras imprescindibles, junto con la interacción específica entre el TCR y péptido tumoral. El balance global entre interacciones estimulantes e inhibitorias determina la intensidad, duración y resultados de la respuesta inmunológica. De este modo, la respuesta es determinada por la duración de la expresión de los receptores y la disponibilidad de la interacción con los ligandos en el entorno tumoral.

Figura 7. Descripción esquemática de la fase de Equilibrio. Mittal D *et al.* New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. Curr Opin Immunol. 2014;27:16-25



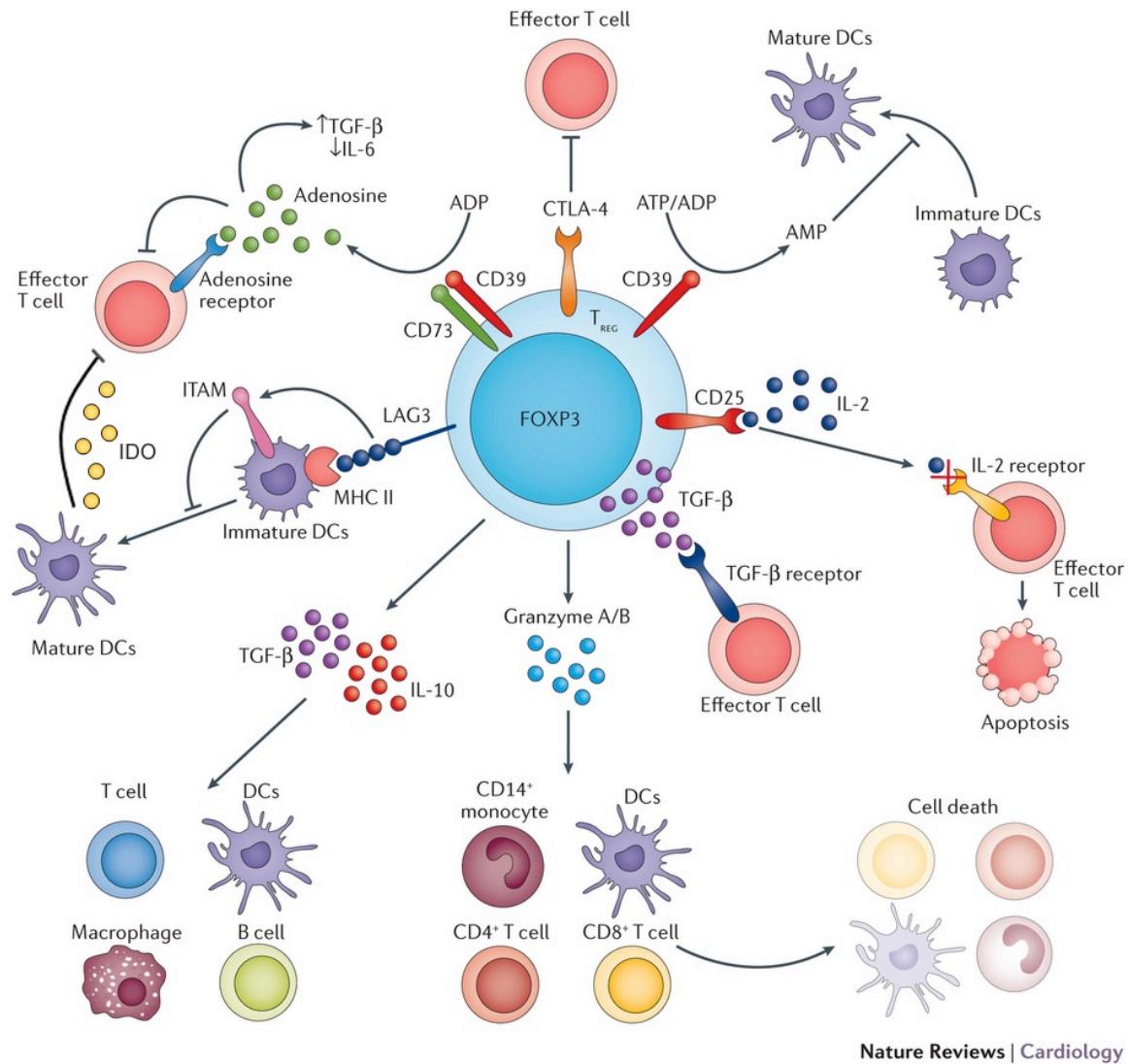
En la fase de equilibrio de la immunoedición tumoral, el sistema inmune contiene al tumor en un estado funcional de latencia. Algunas de las células tumorales sufren cambios genéticos y epigenéticos debido a la constante presión ejercida por la inmunovigilancia. Estas variantes neoplásicas que resultan evolucionan hasta un estado de tolerancia por pérdida de la inmunogenicidad, resistencia a la eliminación o creación de un entorno inmunosupresor. La fase de equilibrio parece caracterizada por un balance entre IL-12 e IFN- γ con IL-10 e IL-23. En esta fase la respuesta inmune innata no parece ser indispensable.

Figura 8. Descripción esquemática de la fase de Escape. Mittal D *et al.* New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. Curr Opin Immunol. 2014;27:16-25.



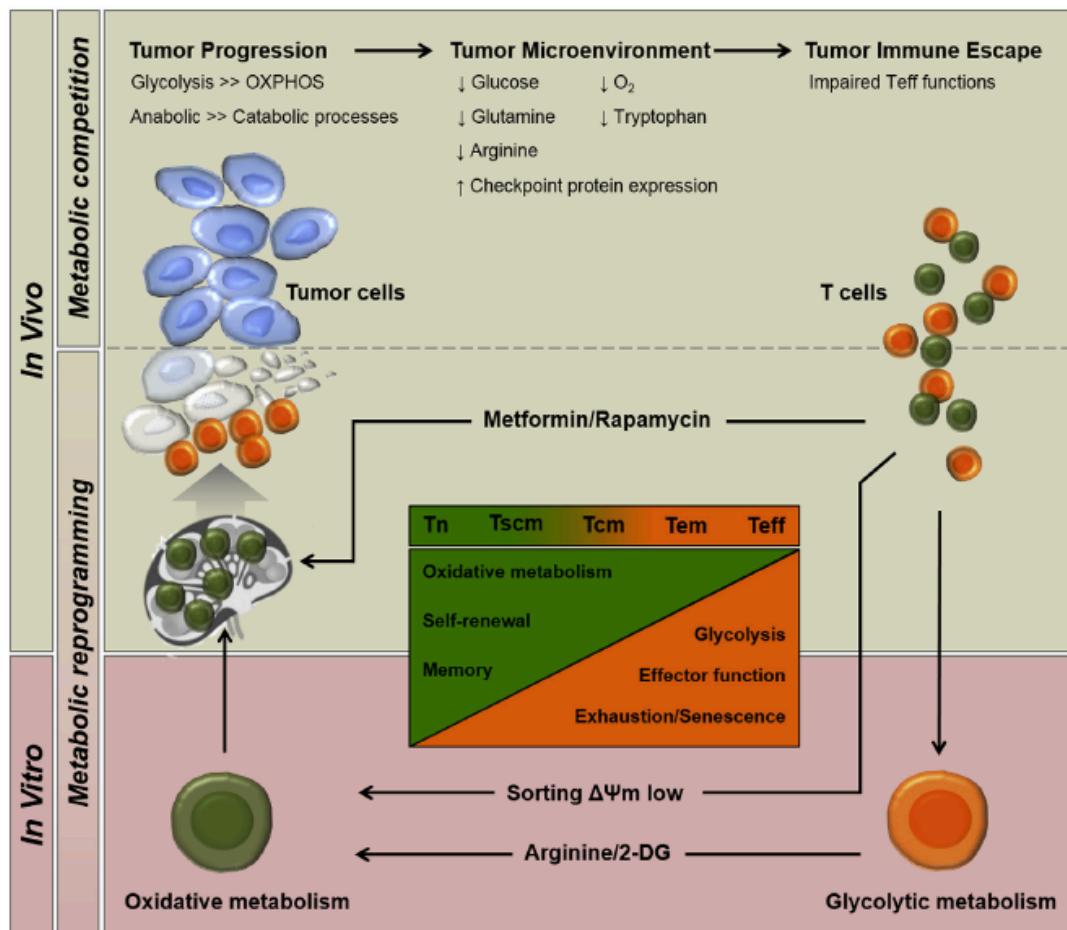
Durante la fase de escape, el sistema inmune fracasa en la contención del progreso tumoral y las enfermedades neoplásicas se hacen clínicamente apreciables. En esta fase, las células tumorales evaden la detección del sistema inmune, expresan moléculas que confieren resistencia a la respuesta inmune (STAT3) y a la apoptosis (Bcl2), generan inmunosupresión (IDO, PD-L1, galectina, CD39, CD73, receptores de adenosina) y secretan citoquinas (VEGF, TGF- β , IL-6, M-CSF) que promueven la angiogénesis. Además, macrófagos M2, DC y MDSC pueden expresar moléculas inmunorreguladoras (IDO, arginasa) y secretar citoquinas anti-inflamatorias (IL-10 y TGF- β) que pueden inhibir la proliferación de linfocitos T CD8 $^{+}$ o inducir su apoptosis, y por contra favorecer la generación de linfocitos Treg inmunosupresores. La expresión de receptores inhibidores (*immune checkpoints*) por los linfocitos T puede ser aprovechada por las células tumorales o los linfocitos Treg para suprimir sus funciones anti-tumorales.

Figura 9. Mecanismos de supresión utilizados por las células Treg. Meng X *et al.*
Regulatory T cells in cardiovascular diseases. Nat Rev Cardiol. 2016



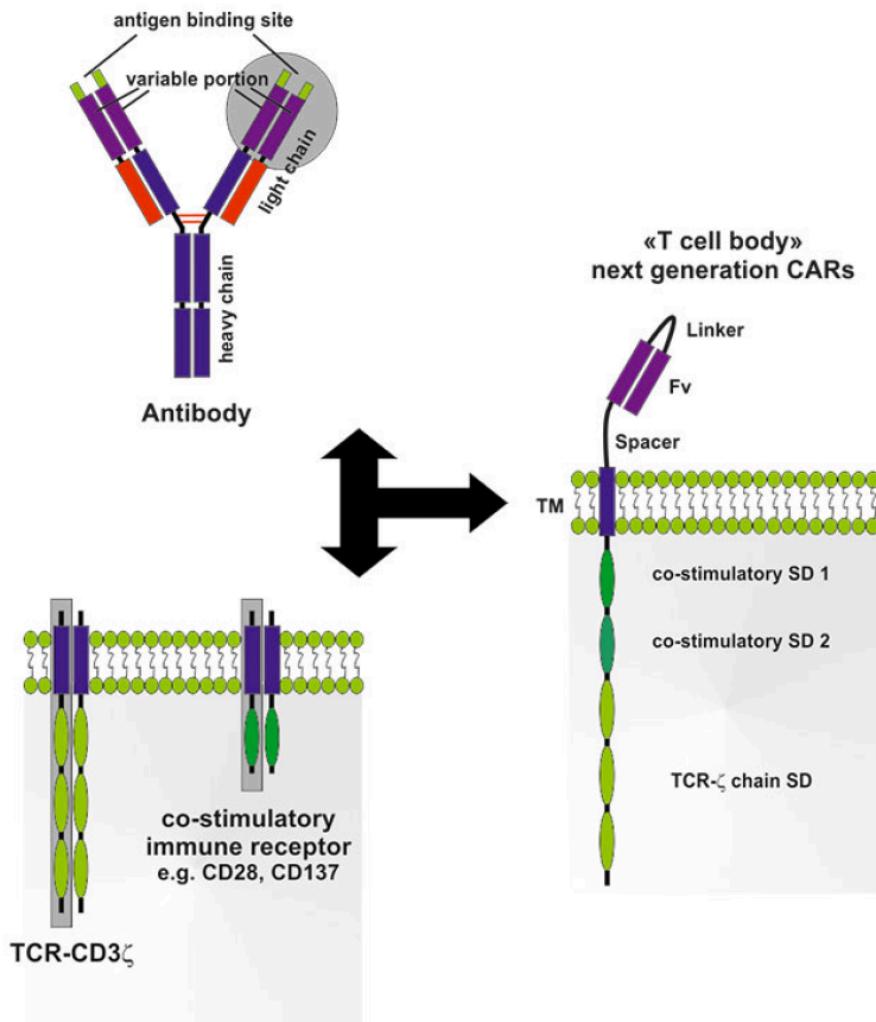
- A.** Citoquinas anti-inflamatorias como IL-10, IL-9 y TGF-β, y la privación de IL-2.
- B.** Citólisis mediada por moléculas de superficie (Fas/FasL, TRAIL, GITR) y secreción de perforina, granzima B o galectina 1 que inducen la apoptosis de los linfocitos T CD8⁺, linfocitos T efectores, y APC. **C.** Modulación del microambiente por generación de adenosina e interferencia con la cisteína. **D.** *Immune checkpoints* que inducen un estado tolerogénico en las APC y suprimen la activación de linfocitos T.

Figura 10. Esquema de las vías de reprogramación metabólica para mejorar la terapia de transferencia de linfocitos adoptivos. Dagnani E *et al.* Integrating T cell metabolism in cancer immunotherapy. Cancer Lett. 2017 Dec 28;411:12-18



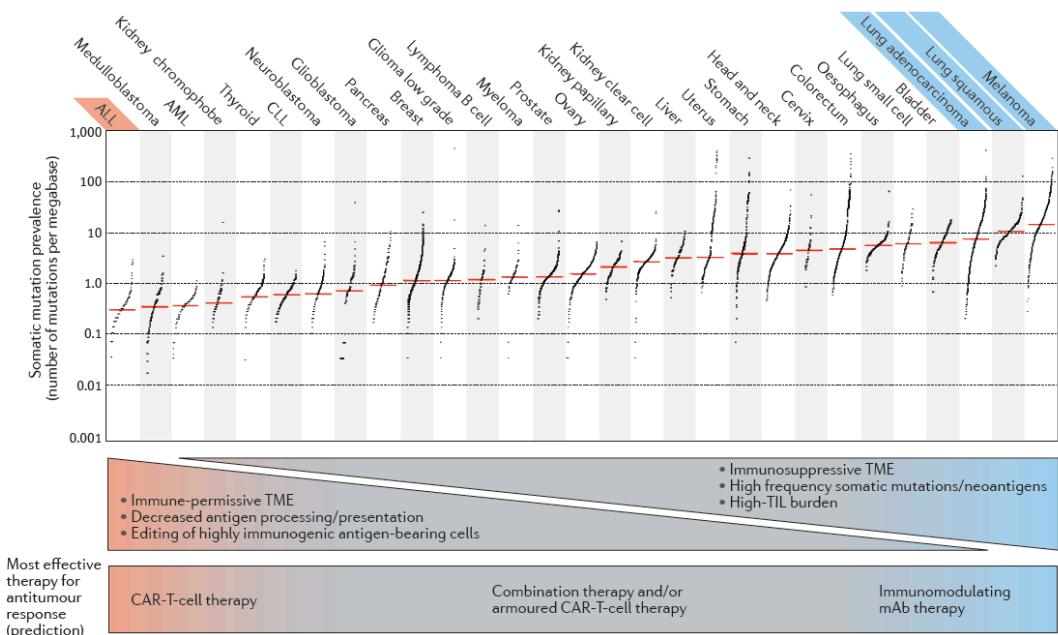
La transferencia adoptiva de linfocitos T tumor-específicos puede ser mejorada mediante la manipulación del metabolismo de los linfocitos. Los linfocitos T efectores, cuyo metabolismo es glucolítico y efectividad anti-tumoral es limitada, pueden ser convertidos en linfocitos T de memoria, cuyas respuestas son más potentes y duraderas, mediante el tratamiento con 2-desoxi-D-glucosa (2-DG) o arginina. La administración de rapamicina o metformina puede contribuir positivamente sobre el metabolismo de los linfocitos. Asimismo, se pueden seleccionar aquellos linfocitos T con un potencial de membrana mitocondrial bajo que también han demostrado mejor actividad anti-tumoral. Los linfocitos T con un metabolismo oxidativo tienen mayor capacidad de proliferación y una vida media más elevada, por tanto una vez infundidos actúan como una fuente estable de células efectoras que migran hacia el tumor. Los linfocitos una vez infiltran el tumor van a volver a enfrentarse a las condiciones hostiles de su microambiente tumoral.

Figura 11. Estructura y organización de los receptores quiméricos de antígenos (CAR) de nueva generación. Riether C *et al.* From magic bullets to specific cancer immunotherapy. Swiss Med Wkly. 2013;143:w13734.



Los CAR están conformados por una porción variable (Fv), procedente de un anticuerpo con una especificidad concreta frente a un antígeno tumoral, que se ha unido mediante una región transmembrana (TM) a dominios de señalización intracelular (SD) derivados del CD3 ζ del complejo del TCR y, o de receptores coestimuladores de segunda señal como CD28, OX40 o CD137. Los linfocitos T CAR pueden ser activados sin la necesidad de la presentación antigénica previa por APC, basta el reconocimiento del antígeno tumoral por el Fv para una activación completa.

Figura 12. Modelo propuesto para la orientación terapéutica en función de la prevalencia de mutaciones en los tumores y sus características inmunofenotípicas. Khalil DN *et al*. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. Nat Rev Clin Oncol. 2016;13(5):273-290.



Los tumores pueden ser tipificados según su tasa de incidencia habitual de mutaciones somáticas y esto permite predecir indirectamente la carga de neoantígenos y por ende su inmunogenicidad. Las células tumorales pueden evitar la eliminación mediante la expresión de una baja carga de antígenos. Esto sucede como resultado de una baja incidencia de mutaciones somáticas, o porque el tumor pierde la capacidad de procesar o presentar antígenos. Las células poco inmunogénicas escapan precozmente a la detección por linfocitos T y por tanto se expanden sin la presión de desarrollar un ambiente inmunosupresor. Esta situación es ideal para la terapia con linfocitos T CAR. Por otra parte, los tumores que expresan una elevada carga de antígenos son vulnerables a la eliminación inmunológica y evolucionan mediante la instauración de un entorno inmunosupresor. Las terapias inmunomoduladoras con anticuerpos están recomendadas en esta situación.

Tabla 1. Susceptibilidad a la formación de tumores, espontáneos e inducidos químicamente, en relación al rasgo de inmunodeficiencia presente en ratones. Basado en: Dunn GP *et al.* Cancer immunoeditin: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Rev Immunol. 2002;3(11):991-8.

Deleción	Inmunodeficiencia	Susceptibilidad tumoral
RAG1	T, B y NKT	Sarcomas inducidos por MCA Neoplasia intestinal espontánea
RAG2 y STAT1 (RkSk)	T, B, y NKT Insensibilidad a IFN- $\alpha/\beta/\gamma$	Sarcomas inducidos por MCA Neoplasias intestinal y mamaria espontáneas
BALB/c SCID	T, B y NKT	Sarcomas inducidos por MCA
Perforina	Perforina	Sarcomas inducidos por MCA Linfomas espontáneos diseminados
TCR J α 281	Subgrupo de NKT	Sarcomas inducidos por MCA
Anticuerpo anti-asialo-GM1	Macrófagos activados y NK	Sarcomas inducidos por MCA
Anticuerpo anti-NK1.1	NK y NKT	Sarcomas inducidos por MCA
Anticuerpo anti-Thy1	T	Sarcomas inducidos por MCA
T $\alpha\beta$	T $\alpha\beta$	Sarcomas inducidos por MCA
T $\gamma\delta$	T $\gamma\delta$	Sarcomas inducidos por MCA Tumores dermatológicos inducidos por DMBA
STAT1	Insensibilidad a IFN- $\alpha/\beta/\gamma$	Sarcomas inducidos por MCA Mayor espectro tumoral sin p53
IFNGR1	Insensibilidad a IFN- γ	Sarcomas inducidos por MCA Mayor espectro tumoral sin p53
IFN- γ	IFN- γ	Sarcomas inducidos por MCA C57BL/6: linfomas espontáneos diseminados BALB/c: adenocarcinoma pulmonar espontáneo
Perforina e IFN- γ	Perforina e IFN- γ	Sarcomas inducidos por MCA Linfomas espontáneos diseminados
IL-12	IL-12	Sarcomas inducidos por MCA
Ratones tratados con MCA y IL-12	IL-12 exógeno	Menor incidencia de sarcomas por MCA

Tabla 2. Estrategias de evasión de las células tumorales. Basado en: Narendra BL *et al.* Immune system: a double-edged sword in cancer. Inflamm Res. 2013;62(9):823-34.

Estrategia evasiva	Mecanismo
Inmunogenicidad reducida	<p>Descenso del reconocimiento de antígenos tumor-específicos por linfocitos T:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Modulación antigénica de los péptidos presentados por MHC. - Alteración de la afinidad de los TCR por el complejo MHC-péptido. - Regulación a la baja de MHC tipo I que reduce la sensibilidad a la citotoxicidad mediada por linfocitos T.
Resistencia a la eliminación inmuno-mediada	<p>Alteraciones en:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Afinidad de la perforina por la membrana celular tumoral. - Interacciones entre Fas y su ligando, subexpresión o mutaciones del mismo. - Mutaciones en receptores TRAIL.
Subversión de la respuesta inmune	<p>Inmunosupresión tumoral:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anergia clonal de linfocitos T mediante expresión de moléculas inmunorreguladoras (Familia B7 de moléculas). - Desarrollo de linfocitos Treg. - Secreción de mediadores inmunosupresores como NO, TGF-β, IL-10, IL-35, PGE-2 o adenosina. - Inhibición de la proliferación de linfocitos T por deprivación de triptófano en el microambiente tumoral mediante la expresión de indolamina-di-oxigenasa (IDO). <p>Alteraciones en la infiltración de células inmunes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Subexpresión de moléculas de adhesión endotelial. <p>Eliminación de células inmunes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Expresión de FasL por las células tumorales. <p>Inhibición de la actividad y maduración de células inmunes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Actividad de células supresoras mieloides (MDSC).

Tabla 3. Espectro de inmunoterapias disponibles actualmente. Mecanismo de acción, ventajas y desventajas. Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? BMC Med. 2016;14:73.

Strategy	Basic mechanism and major advantages	Major disadvantages
Cytokines		
IL-2	-Stimulates the host's immune system	-Low response rates -Significant risk of serious systemic inflammation
IFN- α	-Stimulates the host's immune system -Durable responses (from a small subset of melanoma patients)	-Low response rates -High-dose toxicity
Cell-based therapies		
Vaccines	-Stimulates the host's immune system -Minimal toxicity (e.g., sipuleucel-T) -Administered in the outpatient clinic	-Lack of universal antigens and ideal immunization protocols lead to poor efficacy and response
Adoptive cellular therapy	-Omits the task of breaking tolerance to tumor antigens -Produces a high avidity in effector T cells -Lymphodepleting conditioning regimen prior to TIL infusion enhances efficacy -Genetic T cell engineering broadens TIL to malignancies other than melanoma	-Restricted to melanoma -Safety issues, serious adverse effects, and lack of long lasting responses in many patients -Requires time to develop the desired cell populations -Expensive
Immune checkpoint blockade		
Anti-CTLA-4 monoclonal antibodies	-Unleashes pre-existing anticancer T cell responses and possibly triggers new -Exhibits potent antitumor properties -Prolongation of overall survival	-Only a relatively small fraction of patients obtain clinical benefit -Severe immune-related adverse events have been observed in up to 35 % of patients
Anti-PD1 and anti-PD-L1 antibodies	-Sufficient clinical responses which are often long-lasting -Therapeutic responses in patients within a broad range of human cancers -Reduced toxicity compared to anti-CTLA-4 antibodies	-Only a relatively small fraction of patients obtain clinical benefit
Combination immunotherapy (immune checkpoint blockade as the backbone)	-Improvement of anti-tumor responses/immunity	-May lead to increases in the magnitude, frequency, and onset of side effects

IL-2, Interleukin 2; IFN- α , Interferon-alpha; CTLA-4, Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4; PD1, Programmed cell death protein 1; TIL, Tumor infiltrating lymphocytes

Tabla 4. Comparación entre los criterios irRC y los criterios RECIST modificados (mWHO). Callahan MK, Wolchok JD. At the bedside: CTLA-4- and PD-1-blocking antibodies in cancer immunotherapy. J Leukoc Biol. 2013 Jul;94(1):41-53.

Parameter-evaluated	irRC	WHO
CR	Disappearance of all lesions in two consecutive observations not less than 4 weeks apart	Disappearance of all lesions in two consecutive observations not less than 4 weeks apart
PR	$\geq 50\%$ Decrease in tumor burden compared with baseline in two observations at least 4 weeks apart	$\geq 50\%$ Decrease in SPD of all index lesions compared with baseline in two observations at least 4 weeks apart, in the absence of new lesions or unequivocal progression of nonindex lesions
SD	50% Decrease in tumor burden compared with baseline cannot be established, nor 25% increase compared with nadir	50% Decrease in SPD compared with baseline cannot be established, nor 25% increase compared with nadir, in the absence of new lesions or unequivocal progression of nonindex lesions
Progressive disease	At least 25% increase in tumor burden compared with nadir (at any single time-point) in two consecutive observations at least 4 weeks apart	At least 25% increase in SPD compared with nadir and/or unequivocal progression of nonindex lesions and/or appearance of new lesions (at any single time-point)

SPD, Sum of the products of the two largest perpendicular diameters. Tumor burden = SPD_{index lesions} + SPD_{new, measurable lesions}. Adapted from ref. [29].

Tabla 5. Eventos adversos comúnmente asociados con el bloqueo de checkpoints inmunológicos. Basado en: Khalil DN *et al.* The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. Nat Rev Clin Oncol. 2016;13(5):273-290.

Eventos adversos	Manifestaciones	Manejo
Enterocolitis	Diarrea, dolor abdominal, moco y/o pus en heces.	Antidiarreicos seguidos por corticosteroides si persiste; infliximab si refractariedad.
Neumonitis	Disnea, tos.	Corticosteroides sistémicos.
Hepatitis	Hipertransaminasemia e hiperbilirrubinemia.	Corticosteroides sistémicos; micofenolato mofetilo si refractariedad.
Dermatitis	Erupción pruriginosa/macular/papular, síndrome de Stevens-Johnson (raro), necrólisis epidérmica tóxica (raro).	Betametasona tópica o antihistamínicos orales; corticosteroides sistémicos si refractariedad.
Neuropatía	Neuropatía sensitivomotora, síndrome de Guillain-Barré (raro), miastenia gravis.	Corticosteroides sistémicos.
Endocrinopatía	Hipotiroidismo, hipertiroidismo, hipopituitarismo, insuficiencia adrenal, hipogonadismo, síndrome de Cushing (raro).	Corticosteroides sistémicos, tratamiento hormonal sustitutivo (potencialmente a largo plazo).
Otros	Artritis, nefritis, meningitis, pericarditis, uveítis, iritis, anemia, neutropenia.	