



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

La interacción entre las células *natural killer* y el cáncer:
nuevas perspectivas para la inmunoterapia.

The interplay between natural-killer cells and cancer:
new perspectives for immunotherapy.

Autor: Pablo Herrera Russert

Directora: Sara Oliván García

Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza

Curso 2017/2018

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	3
II. INTRODUCCIÓN	5
III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	7
IV. REVISIÓN	9
1. MECANISMOS DE DETECCIÓN Y CITOTOXICIDAD DE LAS CÉLULAS NK	13
<i>1.1. Receptores de membrana de las células NK</i>	<i>13</i>
<i>1.2. Receptores de activación.....</i>	<i>16</i>
<i>1.3. Receptores de inhibición.....</i>	<i>19</i>
<i>1.4. Mecanismos de citotoxicidad y actividad efectora.....</i>	<i>21</i>
2. MECANISMOS DE INMUNOEVASIÓN DEL CÁNCER ANTE LAS CÉLULAS NK.....	23
3. APLICACIONES DE LAS CÉLULAS NK EN ONCOTERAPIA	27
<i>3.1. Preestimulación y trasplante de células NK alogénicas.....</i>	<i>28</i>
<i>3.2. Bloqueo de receptores de inhibición</i>	<i>29</i>
<i>3.3. Receptores quiméricos de antígenos: CARs</i>	<i>30</i>
<i>3.4. Anticuerpos biespecíficos en células NK</i>	<i>33</i>
V. CONCLUSIÓN.....	35
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	39

I. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

RESUMEN

Las células *natural-killer* (NK) constituyen un subtipo celular linfoide de la inmunidad innata altamente especializado en la función efectora citotóxica, hecho que las involucra en la primera línea de defensa frente a agentes infecciosos y células neoplásicas.

La implicación de las células NK en la modulación inmune del cáncer es un hecho constatado. Dicha regulación se fundamenta en la capacidad que presentan para diferenciar entre células sanas y anormales, proceso que ocurre mediante la valoración de señales procedentes de receptores activadores e inhibidores ubicados en la membrana plasmática de las células NK.

Por otra parte, el microentorno tumoral es capaz de modificarse como consecuencia de sus interacciones con la inmunidad, hecho que puede comprometer la funcionalidad de las células NK hasta el punto de conducir a la destrucción del tumor o a su evasión del control inmune. Estas vías de escape incluyen la secreción de factores inmunosupresores, la represión y/o sobreexpresión de ciertos ligandos y el reclutamiento de otras células inmunes de actividad inhibidora sobre las células NK.

La caracterización funcional y propiedades únicas de las células NK las convierten en excelentes candidatos para distintos tipos de tratamientos, como la transferencia adoptiva de células y el trasplante de células madre hematopoyéticas. Sin embargo, su aplicabilidad en clínica se ve restringida por varios factores, como su limitada supervivencia y/o la baja capacidad de expansión que presentan. El abordaje de estas carencias es posible mediante medidas de preactivación y de ingeniería genética. Estas vertientes, capaces de amplificar el potencial efector de las células NK, incluyen el desarrollo de receptores quiméricos de antígenos (CARs), el bloqueo de receptores con función inhibidora y el diseño de anticuerpos biespecíficos.

PALABRAS CLAVE

Células NK, células natural-killer, KIR, inmunoterapia, cáncer, microentorno tumoral, CAR, anticuerpos biespecíficos, bloqueo de receptores, transferencia adoptiva de células, trasplante de células madre hematopoyéticas.

I. ABSTRACT AND KEYWORDS

ABSTRACT

Natural killer (NK) cells are an innate lymphoid cell subtype endowed with a highly specialized cytotoxic effector function, which includes them in the first line of defense against infectious agents and malignant cells.

The involvement of NK cells in cancer immunoediting is a proven fact. Said regulation process is based on the ability of NK cells to distinguish healthy cells from abnormal cells by measuring the overall input of activating and inhibiting signals perceived from neoplastic cells through NK cell surface receptors.

However, the cancer microenvironment is able to evolve as a result of its interplay with the immune system, thus compromising and tampering NK cell functionality to the point where two outcomes are possible: tumor annihilation or escape from immune recognition. Immune evasion occurs through the secretion of immunosuppressive factors, repression and/or overexpression of certain activating ligands and recruitment of supplementary immune cells, which are capable of undermining NK cell regulation.

The unique advantages and functional characterization of NK cells make them outstanding candidates for the design of several novel cancer treatments, such as adoptive cell transfer and hematopoietic stem cell transplantation. However, the clinical applicability of NK cells is hindered by several contingencies, such as their short life span and/or limited expansion capability. The engagement of these flaws is possible through preactivation procedures and genetic engineering. These approaches, which also serve to enhance the effector potential of NK cells, include the transduction of chimeric antigen receptors (CARs), checkpoint blockade and the design of bispecific antibodies.

KEYWORDS

NK cells, natural killer cells, KIR, immunotherapy, cancer, cancer microenvironment, CAR, bispecific antibodies, checkpoint blockade, adoptive cell transfer, hematopoietic stem cell transplantation.

II. INTRODUCCIÓN

La relación existente entre el sistema inmune y el cáncer constituye un fenómeno constatado. Numerosos estudios han evidenciado que la existencia de inmunodeficiencias, tanto en humanos como en modelos animales, se asocia a incidencias mayores de neoplasias de varios tipos [1]. Tanto la inmunosupresión crónica postrasplante como las infecciones por VIH se asocian a altas incidencias de cáncer; mientras que la regresión de melanomas asociada a la expansión clonal de células T pone de manifiesto que el sistema inmune es, en muchos casos, capaz de instaurar una respuesta defensiva adecuada frente a las células tumorales [2].

Sin embargo, el hecho de que puedan desarrollarse tumores malignos en pacientes inmunocompetentes sugiere que la inmunidad desempeña tan sólo un papel parcial en la contención del cáncer [2]. Como consecuencia, la teoría de inmunovigilancia ha visto reconfigurada hasta originar un concepto más amplio: la inmuoedición tumoral, que constituye un proceso dinámico que abarca tanto la prevención de neoplasias como la modulación de la inmunogenicidad de los tumores en formación [2, 3]. La inmunidad dispone para este fin de dos respuestas fundamentales: la respuesta adaptativa y la respuesta innata, caracterizada esta última por su capacidad para identificar y erradicar agentes infecciosos y células anómalas sin depender para ello de encuentros previos [4].

Las células *natural-killer* (NK) son una estirpe de linfocitos efectores, integrantes de la respuesta inmune innata y dotados de capacidad citotóxica sobre un amplio espectro de neoplasias [5]. Su implicación en el paradigma de la inmuoedición tumoral constituye un hecho evidenciado, ya que, tanto en pacientes humanos como en modelos animales, el defecto o carencia absoluta de células NK se asocia a mayores incidencias de distintos tipos de cáncer [2, 7]. En este sentido, resulta ilustrativa la alteración de su funcionalidad en el marco de ciertos trastornos genéticos (como el síndrome de Chédiak-Higashi y el síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X), asociada a una mayor tendencia carcinogénica [7]; y, del mismo modo, su deficiencia como consecuencia de mutaciones de genes específicos (GATA2 y MCM4), también asociada a mayores incidencias de cáncer y a mayores niveles de malignidad [7].

Como consecuencia de sus encuentros con el sistema inmune, los tumores sufren modificaciones y ediciones sucesivas a medida que evolucionan en el huésped. A pesar de que la inmunidad adaptativa desempeña un papel crítico en la edición de tumores emergentes, existe evidencia de que las células NK son igualmente responsables de la inmuoedición del cáncer [7].

Se conjetura que una de las principales funciones de las células NK en el contexto del cáncer es el control de la enfermedad metastásica y no estrictamente la contención de tumores primarios, [8] dado que, a pesar de ser reconocida su capacidad para infiltrar tumores sólidos, su recuento en ellos es relativamente escaso en comparación con los niveles que manifiestan en sangre periférica [9]. Adicionalmente, la deficiencia de células NK se asocia generalmente a mayores índices de crecimiento, recidiva y diseminación tumoral [7], mientras que un nivel adecuado de infiltración en tumores primarios se asocia a un mejor pronóstico y a una incidencia de metástasis menor [9].

La dimensión inmunovigilante de las células NK suscita mucho interés desde una perspectiva oncoterapéutica dado su carácter relativamente inexplorado y su prometedora viabilidad, sobre todo cuando fracasan otras medidas en el abordaje del paciente con cáncer. Además, las células NK disponen de un repertorio de características que las diferencian de otros linajes celulares empleados habitualmente en la investigación inmunoterapéutica, y que las hacen especialmente ventajosas. Algunas de éstas, en el marco de la transferencia adoptiva, son su capacidad de reconstitución y prevención de remisiones [5], su especificidad tumoral constitutiva y su seguridad, ya que no tienden a desencadenar reacciones de injerto-contrahuésped ni tormentas de citoquinas [10].

Estas propiedades invitan a abrir nuevos frentes de investigación en el abordaje del cáncer y su metástasis, mereciendo especial mención su potencial en el trasplante de células madre hematopoyéticas, su empleo en la terapia celular adoptiva [5] y su aplicación en el desarrollo de receptores quiméricos para antígenos tumorales [10], una estrategia terapéutica que ofrece perspectivas muy atractivas en la investigación actual con células NK.

III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es acometer el estudio de la interacción entre las células *natural-killer* y las células neoplásicas, así como describir y revisar las nuevas terapias de oncoinmunología basadas en su utilización.

Para ello, la disquisición se va a estructurar sobre cuatro aspectos elementales:

1. La descripción molecular y funcional de las células NK y sus características distintivas.
2. Los sistemas moleculares que explican la capacidad de las células NK para diferenciar entre células sanas y tumorales, y los mecanismos de citotoxicidad empleados para su erradicación.
3. Las vías de evasión tumoral utilizadas por el cáncer para eludir el control de las células NK.
4. La exposición y revisión de las distintas terapias basadas en células NK, así como las estrategias planteadas para solventar las limitaciones de su aplicabilidad clínica.

IV. REVISIÓN

Las células *natural-killer* (NK) constituyen un linaje celular del sistema inmune altamente especializado en la inducción de apoptosis, vía citotoxicidad, de tanto células víctimas de infecciones víricas como de procesos neoplásicos, en ausencia de sensibilización previa o de reordenación génica [11]. También se ha descrito su capacidad citolítica sobre hongos y bacterias, y su vinculación con algunos procesos autoinmunes, reacciones alérgicas y la enfermedad de injerto-contra-huésped [9, 7].

Las células NK son integrantes de la familia de células linfoides innatas, estirpe constituida por células derivadas de un progenitor linfoide común y adscritas al linaje linfoide; y constituyen el único subgrupo de la familia ILC dotado de capacidad citotóxica [12]. Se desarrollan de un progenitor celular CD34⁺ común a los linfocitos T citotóxicos (T_C o CD8⁺) en la médula ósea, bazo y ganglios linfáticos, por estímulo de citoquinas varias, fundamentalmente los interferones α y β (IFN- α e IFN- β), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y las interleucinas IL-12 e IL-15, y tras la compleción de su maduración se vierten a la circulación periférica [11].

Las células NK se caracterizan fenotípicamente como linfocitos CD3⁻CD56⁺, y atendiendo a sus niveles de expresión de CD56 se distribuyen en dos subgrupos [13]. El grupo CD16⁺CD56^{dim}, fracción más abundante en la sangre, y el CD16⁻CD56^{bright} que se corresponde con subpoblaciones inmaduras de escasa citotoxicidad halladas predominantemente en los ganglios linfáticos [7]. Existe un subtipo adicional, CD16⁺CD56^{neg}, de reducida funcionalidad y asociado a enfermedades autoinmunes e infecciones crónicas por el virus de inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1) y el virus de la hepatitis C (HCV) [14].

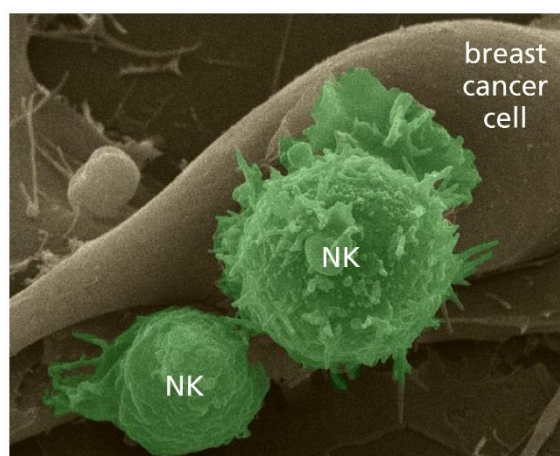


Figura nº1 – Imagen de microscopio electrónico de barrido (MEB) de células NK atacando una célula neoplásica de mama.

The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Las células que manifiestan rasgos fenotípicos inusuales, como consecuencia de estados de estrés, transformación neoplásica o infecciones por virus, son capaces de desencadenar la actividad efectora de las células NK por interacción directa [1] (ver **Figura nº1**). Esto provoca la activación de mecanismos citolíticos, la producción de citoquinas y la secreción de inductores de la proliferación

de otras células inmunes [11]. La activación de las células NK, como se relatará posteriormente en detalle, ocurre por dos vías elementales. La primera es la detección en células diana de la ausencia de moléculas identificativas, generalmente proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad humana (MHC) clase I, que interactúan con receptores de inhibición de las células NK. La segunda es la identificación de ligandos específicos asociados a estados de riesgo, que interactúan con receptores de activación [7].

A diferencia de otras células inmunes, las células NK mantienen un estado persistente de alerta y predisposición para aniquilar células diana en el momento de su activación. Como consecuencia, la respuesta innata mediada por células NK constituye la primera línea de defensa ante muchos crecimientos neoplásicos en sus fases iniciales [7, 11]. Adicionalmente, la respuesta de las células NK es típicamente más rápida que la de otros componentes del sistema inmune [11] (ver **Figura n°2**). Este hecho sugiere que muchos de los primeros encuentros entre el sistema inmune y las células neoplásicas ocurren ante este tipo celular y la mayoría de ellos pasan desapercibidos clínicamente [1].

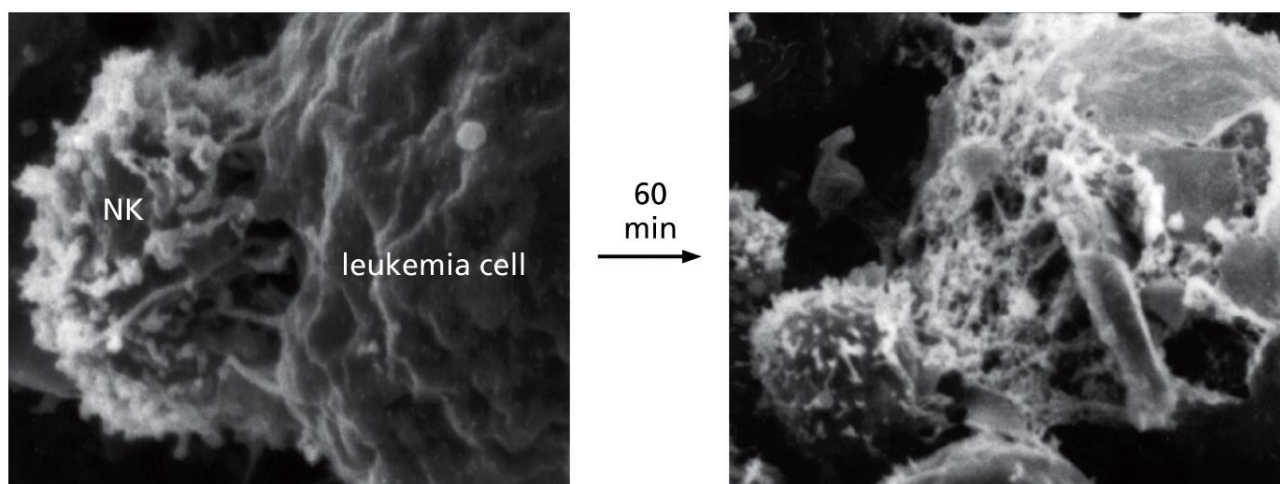


Figura n°2 – Imagen de MEB de una célula NK atacando una célula neoplásica en un contexto de leucemia. En solamente 60 minutos la célula leucémica aparece fragmentada y con la membrana plasmática colapsada sobre sí misma como consecuencia del ataque.

The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

La rápida actuación de las células NK, en el marco de las infecciones por virus, permite la represión de su replicación y proporciona el margen temporal necesario para que acontezca la maduración y diferenciación de los linfocitos, efectores de la respuesta inmune adaptativa específica (generalmente a los 7 días desde el primer encuentro entre la célula NK y el agente viral) [11, 1].

Como se ha referido previamente, las células NK son capaces de frustrar el crecimiento de tumores mediante toxicidad directa, fundamentalmente mediante la liberación de gránulos citolíticos

y la interacción con receptores de muerte en la membrana plasmática de las células neoplásicas. Sin embargo, la liberación de citoquinas en el microentorno tumoral posibilita adicionalmente la regulación y reclutamiento de otras células inmunes, y con ello el ajuste de la respuesta general del organismo frente al foco neoplásico desencadenante [9]. Dos de estas citoquinas, el interferón- γ (IFN- γ) y TNF- α , estimulan la maduración de las células dendríticas, coordinadoras clave tanto de la respuesta inmune adaptativa como de la innata [1]. El IFN- γ es, además, uno de los mediadores de la activación de los macrófagos y un significativo inductor del desarrollo de las células T_{Helper} (T_H), de modo que su liberación permite la instauración de un vínculo directo entre las células NK y otras células inmunes [1]. En virtud de esta asociación, las células NK son capaces de estimular la movilización e infiltración puntual de elevados números de células T_C y orquestar indirectamente su actividad efectora sobre las células neoplásicas [9].

1. Mecanismos de detección y citotoxicidad de las células NK

La identificación de células neoplásicas se produce mediante la estimulación de receptores ubicados en la membrana plasmática de las células NK. Dichos receptores no interactúan con entidades antigénicas, sino con ligandos cuya expresión o ausencia en células diana ocurre como consecuencia de situaciones de riesgo (alteraciones metabólicas, estrés fisiológico y estados proliferativos) [1]. Su expresión e identificación condiciona la activación o inhibición de la actividad efectora de las células NK [4].

Los receptores de membrana de las células NK conforman un grupo muy amplio y variado de moléculas, muchas de las cuales no son exclusivas de la inmunidad innata, ya que algunos se han identificado también en las membranas celulares de otras células inmunes relacionadas con la respuesta inmune adaptativa; particularmente monocitos, granulocitos y células T [4, 7] (ver **Tabla nº1**). La función de dichos receptores estriba fundamentalmente en el reconocimiento e interacción con proteínas del MHC clase I, además de otros ligandos. Su síntesis y expresión a nivel de membrana sucede bajo estímulos específicos y por mediación de las citoquinas previamente citadas [4]. Sus interacciones están dirigidas preferiblemente, aunque no únicamente, a células hematopoyéticas (eminentemente células dendríticas).

Adicionalmente, la comparación de subpoblaciones de células NK autólogas evidencia una manifiesta heterogeneidad en la expresión de marcadores de superficie. Se tiende a atribuir este fenómeno a las características fenotípicas variables asociadas a cada etapa de maduración celular de las células NK y a la coexistencia de estirpes varias, diferenciadas para confrontar células diana de distintas características [4].

1.1. Receptores de membrana de las células NK

Los receptores de las células NK se clasifican en dos grandes grupos atendiendo a criterios de configuración estructural: los receptores de lectina tipo C y los receptores tipo inmunoglobulina [4, 7].

Por un lado, los receptores de lectina tipo C (codificados en 12p13.1) reciben su nombre por la gran similitud que guardan con las lectinas y por la presencia en su estructura de dominios dependientes de calcio para la unión a carbohidratos específicos; aunque en el caso de las células NK

esta unión ocurre generalmente con otras proteínas [4]. Una de las familias de receptores más destacables de este grupo es CD94-NKG2; formado por la unión de la proteína CD94 con el receptor NKG2A (de función inhibitoria) o con el receptor NKG2C (de función activadora) por medio de un enlace disulfuro [7]. Los receptores del grupo CD94-NKG2 son generalmente invariables e interactúan con la proteína HLA-E, un ligando no polimórfico del MHC clase I [4].

Receptor	Nº CD	Inhibidor	Activador	Expresión en otras células	Ligandos
KIR	CD158	✓	✓	Células T efectoras y/o de memoria	MHC clase I
NKG2A	CD159a	✓	✓	Células T efectoras y/o de memoria	HLA-E
NKG2C	CD159c		✓	Células T efectoras y/o de memoria	HLA-E
NKG2D	CD134		✓	Células T y macrófagos activados	MIC-A, MIC-B y ULPB-1
DNAM1	CD226		✓	Células T y monocitos	PVRL2 (CD112) y PVR (CD155)
TIGIT	x	✓		Células T	PVRL2 (CD112) y PVR (CD155)
Tactile	CD96	✓		Células T	PVR (CD155)
FcγRIIIA	CD16a		✓	Monocitos activados y macrófagos	F _c de anticuerpos IgG
NKp46	CD335		✓	Linfocitos T αβ y γδ e ILC3	HS, HN, HA, vimentina, PfEMP1, componentes bacterianos desconocidos y ligandos extracelulares desconocidos
NKp44	CD336		✓	Linfocitos T αβ y γδ, ILC3 y células dendríticas	HS, HN, HA, PCNA, NKp44L, glicoproteínas de envolturas virales y componentes bacterianos desconocidos
NKp30	CD337		✓	Linfocitos T αβ y γδ, ILC3 y células epiteliales	HS, HA, PfEMP1, B7-H6, BAT3 y HCMV pp65
PD1	CD279	✓		Células B y T activadas y células mieloides	PDL1 y PDL2
4-1BB	CD137		✓	Células T, células dendríticas y células endoteliales	4-1BBL

Tabla nº1 – Principales receptores de membrana de las células NK.

HCMV, citomegalovirus humano; **HLA-E**, human leukocyte antigen-E; **HN**, neuroaminidasa hemaglutinina; **HS**, heparán sulfato; **IgG**, inmunoglobulina G; **ILC3**, célula linfoide innata 3; **KIR**, receptor tipo inmunoglobulina de células NK; **MIC**, major histocompatibility complex (MHC) class I polypeptide-related sequence; **PCNA**, antígeno nuclear de célula proliferativa; **PD1**, proteína de muerte celular programada; **PDL**, ligando de PD1; **PfEMP1**, proteína de membrana de eritrocitos *Plasmodium falciparum* 1; **Tactile**, T cell-activated increased late expression; **TIGIT**, T cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains; **ULBP**, proteína de unión a UL16.

Tabla adaptada a partir de Morvan MG and Lanier LL. (© Macmillan Publishers Limited 2016)

Por otro lado, el grupo de receptores tipo inmunoglobulina (codificados en el complejo de receptores de leucocito del cromosoma 19) incluye, por una parte, los denominados *killer-cell immunoglobulin-like receptors* (KIRs), que se unen a las moléculas HLA-B y HLA-C; y, por otra parte, los receptores ILT/LIR, que se unen a la mayor parte de las moléculas del MHC clase I [4, 7]. Los receptores tipo KIR proceden de una familia multigénica de genes polimórficos que codifica tanto receptores de

función activadora como inhibidora. También han sido observados expresados en linfocitos T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, y se ha planteado su asociación con la adaptabilidad (o memoria) inmunológica de los linfocitos T CD8+ [7].

Ambos tipos de receptores, tanto lectina tipo C como tipo inmunoglobulina, presentan actividad inhibitoria y activadora independientemente de su configuración estructural; por otra parte, algunos receptores específicos han demostrado tener actividad dual. Este último fenómeno se explica por la existencia de receptores con ectodominios idénticos pero asociados a regiones citosólicas diferentes, con efectos diametralmente opuestos a nivel de señalización intracelular [4].

La modulación de la respuesta de las células NK por las células neoplásicas se explica por el modelo de señales opuestas (*opposing-signals model*). Dicho modelo se cimenta, como se ha referido antes, en la expresión sobre la membrana celular de receptores activadores e inhibidores, y la distinción entre células sanas y neoplásicas ocurre por desbalances en el equilibrio de las señales entrantes. La base del modelo es que las señales inhibitorias contrarrestan las señales de activación, de modo que toda señal negativa causa el bloqueo de la citotoxicidad de las células NK, aun existiendo estimulación de los receptores de activación [4, 7].

Los receptores inhibidores detectan ligandos del MHC clase I propio en las células diana, impidiendo o dificultando la activación de las células NK; mientras que los receptores activadores detectan ligandos asociados a patógenos o a estados de anormalidad, conduciendo a la activación efectora y la lisis de la célula diana.

Las células sanas que expresan niveles adecuados del MHC clase I propio escapan los procesos de citotoxicidad, mientras que las células neoplásicas que reprimen la expresión de dichas moléculas son, en teoría, efectivamente identificadas y destruidas (ver **Figura n°3**).

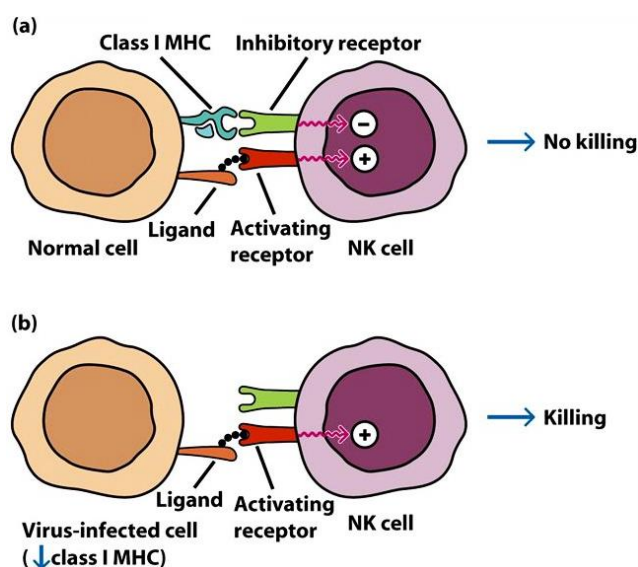


Figura n°3 – Modelo de señales opuestas.

Kuby Immunology (© Freeman and Company 2007)

1.2. Receptores de activación

Las células NK precisan de señales intensas de activación para inducir su actividad efectora, ya que, como se ha referido previamente, prevalecen las señales de inhibición sobre las de activación [4]. La activación de la función citotóxica de las células NK ocurre por la estimulación de los receptores activadores, ya sea a través de uno sólo o varios en conjunto [4]. Los receptores de activación implicados en el control del cáncer y su diseminación están generalmente bien identificados, y lo mismo ocurre con la mayoría de sus ligandos.

Se ha constatado que muchos de los ligandos asociados a receptores de activación, vinculados a distintos tipos de cáncer, modulan sus niveles de expresión en concordancia con el grado de malignidad tumoral y las interacciones con la inmunidad, y lo mismo ocurre con la expresión de proteínas del MHC clase I [7]. Este fenómeno, asociado a pronósticos clínicos más desfavorables, acontece generalmente durante los estadios de remisión parcial de la enfermedad tumoral y también en casos de supervivencia prolongada, y es consecuencia de la acumulación de mutaciones y eventos de inmunoselección (englobados en los fenómenos de inmunoección).

Los marcadores de membrana activadores de las células NK mejor caracterizados en el contexto cáncer son el receptor NKG2D, los *natural cytotoxicity receptors* (NCR), DNAM1 y el receptor CD16.

Receptor NKG2D

El marcador NKG2D (de lectina tipo C, también denominado CD314 o KLRK1) aparece expresado también en linfocitos T_C y linfocitos T $\gamma\delta$. Dispone de la capacidad de unirse a un amplio repertorio de ligandos, muchos de los cuales aumentan su expresión en células neoplásicas como respuesta al estrés fisiológico y como consecuencia de la pérdida de diferenciación [7, 5].

Los ligandos del receptor NKG2D son las proteínas del MHC clase I MIC-A y MIC-B, y los transcritos inducidos por el ácido retinoico (RAET), amplio grupo que incluye la familia de proteínas ULPB (proteína de unión a UL16) [4] (ver Figura nº4). Como se ha sugerido previamente, la expresión de estos ligandos en la membrana plasmática no ocurre en células normales, sino en células víctimas de estrés fisiológico (por calor, trauma, daño en el DNA, etc.), infecciones por virus y especialmente en estados de proliferación acelerada [4]. Bajo esta perspectiva, el extenso abanico de ligandos del receptor NKG2D ha evolucionado a modo de sistema centinela, diseñado para dirigir señales de

alerta al sistema inmune en el contexto de crecimientos neoplásicos, y permitiendo a la inmunidad ejercer sus respuestas efectoras más precoces a través de las células NK [4].

La estimulación de NKG2D por sus ligandos ocasiona adicionalmente su afinación, mediada por señales intracelulares que provocan su control transcripcional, traslacional y postraslacional. La sobreestimulación del receptor conduce a la pérdida de funcionalidad y desregulación, hecho que justifica la descripción de asociaciones entre la actividad de NKG2D y algunos cuadros de carácter autoinmune, consecuencia del entrecruzamiento de los ligandos con otras vías de señalización intracelular [7, 4].

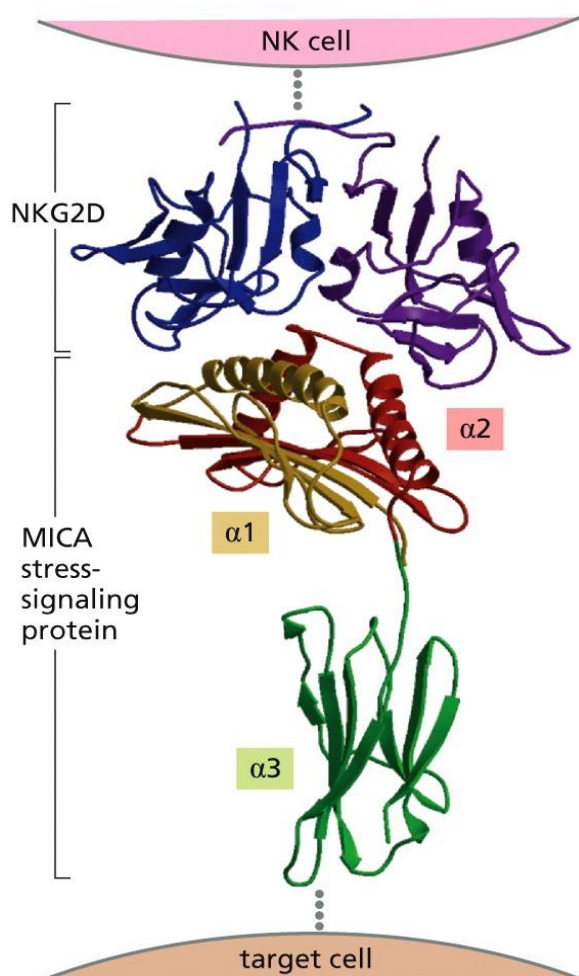


Figura nº4 – Representación de NKG2D.

Estructura molecular del complejo formado por NKG2D y su ligando MIC-A. Las dos subunidades de NKG2D aparecen representadas en la parte superior, adosadas a la membrana de la célula NK por medio de un dominio de anclaje (no representado).

The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Receptores del grupo NCR

El grupo de marcadores NCR está compuesto por tres proteínas de tipo KIR cuya función es eminentemente activadora: NKp30 (NCR3), NKp44 (NCR2) y NKp46 (NCR1) [7]. Se componen de uno o dos dominios extracelulares KIR, responsables de la unión al ligando, y contienen un dominio transmembrana dotado de un aminoácido con carga positiva [15]. NKp46 y NKp30 se han observado

expresados en células NK de forma constitutiva, mientras que el marcador NKp44 requiere previa activación para su expresión [9, 7].

Se han descrito varios ligandos asociados a los receptores NCR (ver **Tabla n°1**), codificados en genes de virus, bacterias y parásitos, muchos de los cuales no están del todo definidos. A pesar de ello, se han asociado muchos ligandos de los receptores NCR tanto a células tumorales como a tejidos sanos [7, 15]. Es un hecho constatado que los receptores NCR se unen a ligandos expresados por todo el organismo humano; sin embargo, algunos de estos ligandos se consideran putativos de ciertas estirpes tumorales [7]. Dos ejemplos son la molécula heparán sulfato y el ligando B7-H6, cuya expresión se asocia con la leucemia, linfomas, melanomas y carcinomas [7].

Un aspecto de interés es la asociación entre la expresión de NKp46 y la incidencia metástasis y diseminación de tumores varios, en especial melanomas, linfomas, carcinomas y fibrosarcomas inducidos [9]. Por otra parte, se ha constatado que en pacientes infectados por HIV-1 la expresión de NKp30, NKp44 y NKp46 se encuentra significativamente reducida, explicando, al menos en parte, la merma de los sistemas de control tumoral de las células NK. La menor expresión de estos receptores se ha asociado a una mayor incidencia de tumores oportunistas, en cohortes de pacientes sin tratar y sin inmunosupresión profunda (menos de 200 células CD4+ por mm³). Adicionalmente, la sobreexpresión del receptor NKp46 en ratones transgénicos se ha asociado a una mayor inmunidad mediada por células NK y a una menor incidencia de metástasis [16].

Receptor DNAM1

El marcador DNAM1 (*DNAX accessory molecule-1* o CD226) es un receptor activador de tipo KIR expresado en subtipos específicos de células T y en células mieloides, además de células NK [4]. Sus ligandos, CD112 (PVRL2) y CD155 (PVR) pertenecen a la familia de las nectinas, moléculas de adhesión celular cuya expresión ocurre de forma generalizada en muchos tejidos humanos y de forma llamativa en algunos tipos de cáncer, particularmente el melanoma [7]. La deficiencia del receptor DNAM1 se ha asociado con una mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores primarios e implantados, en modelos experimentales con ratones [7]. Adicionalmente, se ha constatado que el bloqueo de DNAM1, mediante anticuerpos o disrupción genética, merma la capacidad de detección de las células NK en el melanoma y en tumores derivados [7].

Receptor CD16

El receptor CD16 (o FC γ III), también de tipo KIR, se expresa en células NK de subtipo CD56^{dim} y en neutrófilos activados [7]. Interactúa generalmente con la región constante de moléculas IgG, de modo que constituye el principal mecanismo de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (*antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity* o ADCC) de las células NK [5].

La unión de anticuerpos IgG1 humanos a antígenos específicos exhibidos en células infectadas o alteradas posibilita su reconocimiento por el receptor CD16, conduciendo a la activación de la célula NK y a la destrucción de las células dianas opsonizadas (ver **Figura nº5**) [1]. También se ha descrito su estimulación en ausencia de anticuerpos, sugiriendo la existencia de otros ligandos no filiados [7].

La expresión de CD16 en la membrana de las células NK se ha asociado a beneficios terapéuticos en tratamientos oncológicos basados en anticuerpos. También se ha descrito una asociación entre la pérdida de expresión del marcador y el empeoramiento clínico de pacientes con cáncer [7].

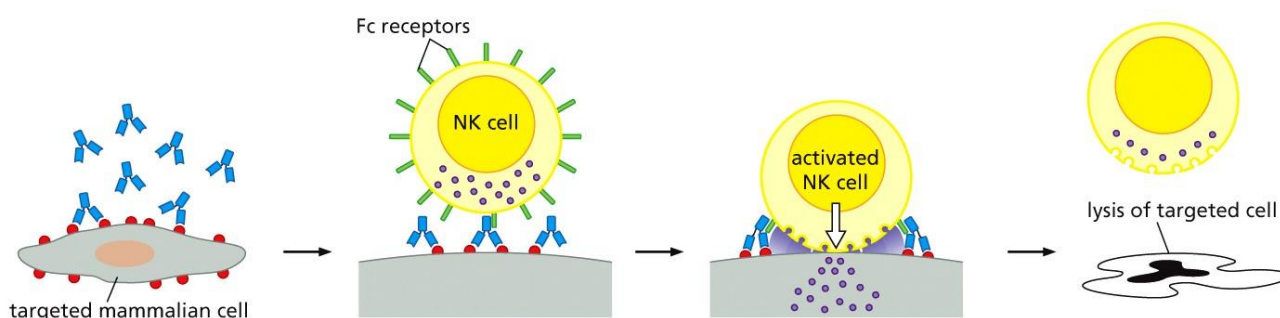


Figura nº5 – Representación esquemática de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos de las células NK.

The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

1.3. Receptores de inhibición

Los receptores de inhibición anulan la activación de las células NK cuando se unen a ciertos ligandos de superficie de las células diana, generalmente moléculas del MHC clase I [4]. Por esta razón, la ausencia de proteínas del MHC propio en células tumorales constituye uno de los principales desencadenantes de la actividad efectora de las células NK.

El funcionamiento de los mecanismos de inhibición se explica por el modelo de ausencia propia (*missing self*) [4]. De acuerdo con este modelo, una de las funciones más elementales de las células NK consiste en eliminar células diana que no expresan niveles adecuados de moléculas del MHC

clase I en sus membranas (ver **Figura nº3**). Dicha hipótesis no excluye que la célula diana pueda escapar de la lisis por medio de otros mecanismos de inhibición alternativos que compensen la ausencia del MHC en su membrana; porque, como se ha puntualizado previamente, las células NK disponen de otros muchos juegos de receptores que modulan su activación [17].

El aumento del MHC clase I expresado en células neoplásicas se tiende a asociar con el nivel de malignidad, ya que la conservación de su expresión posibilita la supervivencia de las células tumorales tras encuentros fortuitos con células NK [5]. Por otra parte, y paradójicamente, la malignidad y tendencia metastásica se asocian también con la pérdida de expresión de proteínas del MHC clase I [7]. Estas observaciones contradictorias reafirman que, en última instancia, la activación de las células NK depende del alelo de MHC expresado y del tipo de interacción predominante entre ambas células (determinado por los demás receptores), variable en función del estadio de progresión del tumor y de las condiciones de experimentación [4, 5].

Receptor CD94/NKG2A

La práctica totalidad de los receptores inhibidores son de tipo inmunoglobulina (o KIR), con la excepción del receptor CD94/NKG2A, de lectina tipo C [4]. Este último identifica el ligando HLA-E, molécula no clásica del MHC clase I cuya expresión solamente ocurre mediante la unión previa a proteínas de señalización derivadas de las moléculas HLA-A, HLA-B o HLA-C. Este hecho implica que su expresión es indirectamente representativa del nivel general de expresión de proteínas del MHC clase I en la célula diana [7].

La sobreexpresión de HLA-E se ha descrito en muchos tipos de cáncer, como la leucemia linfóide crónica, donde sus niveles en células B-CLL exceden los asociados a linfocitos B normales [4].

Receptores de inhibición tipo KIR

Uno de los principales desafíos que deben afrontar las células NK para identificar células neoplásicas con eficacia es el ajuste a la variabilidad de los ligandos del MHC clase I, consecuencia de la presión selectiva impuesta por la adaptación a agentes patógenos y alteraciones en la proliferación de las células [18].

El repertorio de receptores inhibidores tipo KIR está capacitado para diversificarse y anticiparse a las variaciones constantes del MHC, permitiendo a las células NK conservar una relación funcional con la variabilidad de sus ligandos [1]. Este fenómeno es posible porque, a diferencia de los anticuerpos y los *T-cell receptors* (TCRs) expresados en las células B y T_C, respectivamente, los receptores inhibidores tipo KIR de las células NK no se restringen por la exclusión alélica [4].

Las alteraciones en la expresión de receptores inhibidores tipo KIR repercuten en la capacidad de activación de las células NK, al perturbar el equilibrio de señales opuestas establecido por el conjunto de receptores. De forma general, su expresión aumentada conduce a una capacidad de activación inferior y una mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores y diseminación metastásica, mientras que su expresión disminuida causa desinhibición y citotoxicidad sobre células normales, en forma de cuadros autoinmunes [1], [7, 18].

Como se ha sugerido previamente, los receptores inhibidores de tipo KIR manifiestan una extraordinaria variabilidad geográfica y poblacional, equiparable a la diversidad de proteínas del MHC clase I con las que interactúan. Adicionalmente, la herencia de receptores KIR y sus ligandos del MHC ocurre de forma aleatoria e independiente, situación que justifica la existencia de combinaciones HLA-KIR discordantes o disfuncionales [4].

Estas discrepancias se han asociado a variaciones en el pronóstico de algunas neoplasias específicas, ya que trastocan la funcionalidad de las células NK de varias maneras [4, 7]. El cáncer de cérvix inducido por el virus del papiloma humano constituye un ejemplo de neoplasia cuya progresión se acelera en presencia de combinaciones MHC-KIR específicas (KIR 3DS1 con HLA-C1 homocigoto, en ausencia de HLA-Bw4) y disminuye en presencia de otras combinaciones diferentes (ausencia de KIR 3DS1 con HLA-Bw4 y/o HLA-C2) [4].

Por otra parte, se ha constatado que las combinaciones de naturaleza eminentemente inhibitoria aparecen sobreexpresadas en pacientes con melanoma, cáncer de mama, leucemia aguda y crónica, y linfoma de Hodgkin, en un marco de activación deficiente de las células NK [19].

1.4. Mecanismos de citotoxicidad y actividad efectora

Los mecanismos de citotoxicidad que esgrimen las células NK son similares a los empleados por las células T_C. Las células NK maduras se describen como linfocitos granulares de gran tamaño cuyo citoplasma celular está ocupado por gránulos de granzimas (enzimas de actividad proteolítica) y perforinas (proteínas disruptivas de membrana) [11]. A diferencia de las células T_C, las células NK

son citotóxicas de forma constitutiva y siempre disponen de gránulos en su citoplasma celular, independientemente de su estado de activación [5]. La interacción entre la célula NK y la célula diana debuta con el proceso de sinapsis inmunológica, que conlleva la liberación de los gránulos por exocitosis en el punto de unión. Este acontecimiento provoca la lisis específica de la célula diana [11].

Otro mecanismo efector es la expresión de moléculas de la familia TNF [11]. La activación de las células NK mediante citoquinas del microentorno provoca la expresión a nivel de membrana de ligandos inductores de muerte, como FasL y TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*), cuya unión con los receptores de muerte de las células neoplásicas ocasiona la activación de la cascada de caspasas y la apoptosis de la célula diana [1].

Adicionalmente, la activación de las células NK es responsable de la secreción de una gran variedad de quimioquinas y citoquinas [11, 7]. Como se ha mencionado previamente, éstas son capaces de regular y modular la actividad de otras células inmunes, y por extensión, establecer un vínculo regulatorio entre la respuesta inmune innata y adaptativa [1]. Merece especial énfasis el IFN- γ , capaz de inducir la expresión de proteínas del MHC clase II en células presentadoras de antígenos, impulsar la activación de células T_H1 y estimular procesos de angiogénesis y activación de macrófagos [7]. De forma paralela, las células NK activadas secretan interleucinas (como IL-10 e IL-15), TNF, factores de crecimiento como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y abundantes quimioquinas (como CCL3, CCL4 y CCL5) [11, 7]. Estas citoquinas posibilitan la instauración de la respuesta inflamatoria, la infiltración del tumor, el reclutamiento de otras células inmunes y la inducción de su proliferación [20].

2. Mecanismos de inmunoevasión del cáncer ante las células NK

En las circunstancias en las que es posible la destrucción del foco neoplásico, la eliminación del tumor constituye la culminación del proceso de inmunoección. Sin bien, cuando las células neoplásicas sobreviven los encuentros con la inmunidad se establece un estado de equilibrio determinado por la capacidad moduladora del sistema inmune y el estado latencia de las células neoplásicas; que en última instancia pueden desbordar el control inmune y proliferar de forma descontrolada, conduciendo a su manifestación clínica [2].

En el caso de las células NK el proceso de evasión acontece por varios mecanismos. El más habitual es la merma de los sistemas de detección de células tumorales, generalmente por alteración de la funcionalidad y expresión de los receptores de membrana [7]. Por otra parte, la presión inmunoselectiva sobre el tumor provoca el surgimiento de células neoplásicas menos inmunogénicas, capaces de limitar los ligandos que exhiben y, por ende, capaces de sobrevivir encuentros sucesivos con células NK [7]. Adicionalmente, hay evidencias de que muchas células tumorales también son capaces de instaurar microentornos inmunosupresores y de reclutar células inmunes específicas que favorecen su crecimiento y progresión, generalmente células del estroma y linfocitos T reguladores (T_{Reg}) [2].

Evasión por represión o sobreexpresión de ligandos de NKG2D

La estimulación de los receptores de la familia NKG2D, como se ha referido previamente, es por sí misma suficiente para activar las células NK con independencia de las señales de inhibición entrantes [4]. Se ha constatado en experimentos llevados a cabo con ratones que la ausencia del receptor equivalente a NKG2D (denominado *Klrk1*) se asocia a mayores índices de formación de neoplasias [7]. Sin embargo, no ha sido esclarecido si la inmunoección tumoral mediada por NKG2D depende de las células NK o de los linfocitos T que lo expresan también [7].

El grupo de ligandos de superficie para receptores de la familia NKG2D (NKG2DL) constituye una amplia gama de proteínas de señalización cuya expresión se desencadena ante estados de estrés, ya sea por daño genético, infecciones víricas o transformación neoplásica [4]. Algunos de los ligandos más relevantes, ya mencionados, son MIC-A, MIC-B, y las familias RAET y ULPB; y su

manifestación, en un marco experimental, puede ser inducida mediante la administración de tratamientos genotóxicos, análogos a los desencadenantes de muchos tipos de cáncer [7].

La represión de ligandos de NKG2D, que constituye un sistema de inmunoevasión muy habitual en células tumorales, ocurre generalmente por la proteólisis de los ligandos mediante enzimas metaloproteinasas, lo que permite eludir la interacción con los receptores de activación (ver **Figura nº6c**). En este sentido, la liberación de ligandos de NKG2D solubles al torrente sanguíneo constituye un fenómeno observable en algunos tumores malignos (particularmente moléculas de lactato deshidrogenasa) y se ha sugerido su posible utilidad como marcador tumoral [7].

Otro mecanismo similar se asienta en la inducción de la expresión de ligandos de NKG2D en células mieloides normales (células del estroma), por mediación de factores solubles secretados por las propias células tumorales [7] (ver **Figura nº6d**). Se ha reseñado previamente que la estimulación a largo plazo de los receptores NKG2D ocasiona la disminución de su funcionalidad y expresión, de modo que la sobreexpresión de ligandos de NKG2D causa al enmascaramiento de las células neoplásicas y, en última instancia, el colapso de la supervisión inmune mediada por este receptor [7]. Se ha descrito un ligando de alta afinidad, MULT1, capaz de revertir de forma competitiva la desensibilización del receptor y, en consecuencia, conservar la actividad antitumoral NKG2D-dependiente de las células NK [21].

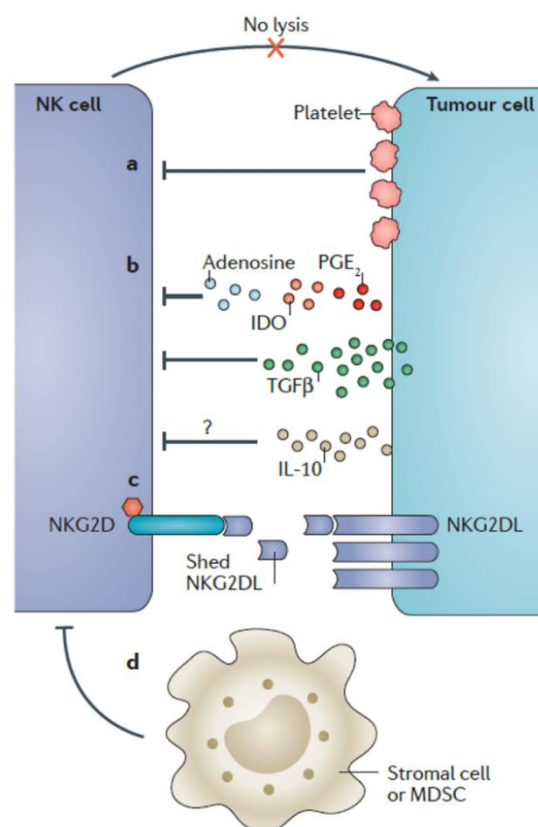


Figura nº6 – Principales mecanismos de inmunoevasión ante células NK.

Morvan MG and Lanier LL. (© Macmillan Publishers Limited 2016)

Activación de plaquetas y secreción de factores

El revestimiento de ciertos tumores por plaquetas, tanto *in vitro* como en células neoplásicas circulantes, constituye un fenómeno que ha sido vinculado a mayores prevalencias de metástasis por supresión de la inmunovigilancia mediada por células NK [7]. Esta asociación se explica por la capacidad de dichas plaquetas para secretar factores inmunosupresores (como *transforming growth factor-β* o TGF-β), la expresión de ligandos para receptores de inhibición y la atenuación de ligandos de activación, sobre todo para el receptor NKG2D (ver **Figura nº6a**).

De forma paralela, muchas células neoplásicas son capaces por sí mismas de producir y liberar factores inmunosupresores (como TGF-β, la prostaglandina E₂ y adenosina) que trastocan la actividad de las células inmunes, y particularmente la funcionalidad de las células NK [1] (ver **Figura nº6b**). Dichos factores no solamente interfieren en la propia actividad efectora, sino también en procesos de diferenciación y maduración celular a través del bloqueo de la expresión de los receptores para IL-10 e IL-15 [7].

3. Aplicaciones de las células NK en oncoterapia

El empleo de células NK en oncoterapia demanda el abordaje de diversos frentes. Uno de los principales objetivos es inducir el bloqueo de los receptores de inhibición y contener la actividad de las células T reguladoras (T_{reg}) capaces de inhibir su potencial efector [1]. Adicionalmente, constituye un objetivo facilitar la infiltración de células NK en tumores primarios, fenómeno que ha demostrado mejorar considerablemente el pronóstico clínico, así como la estimulación pre-trasplante de las células NK con factores de crecimiento y citoquinas, que mejoran su capacidad de proliferación, reconstitución y activación en el huésped [9, 5]. Otros objetivos cruciales son el contrarresto de la actividad de las citoquinas inmunosupresoras secretadas en el microentorno tumoral (como $TGF-\beta$), responsables de la pérdida de funcionalidad de las células NK, y la eliminación de las células del estroma, responsables de la sobreexpresión de ligandos para el receptor NKG2D, que causan su sobreestimulación y desregulación [7].

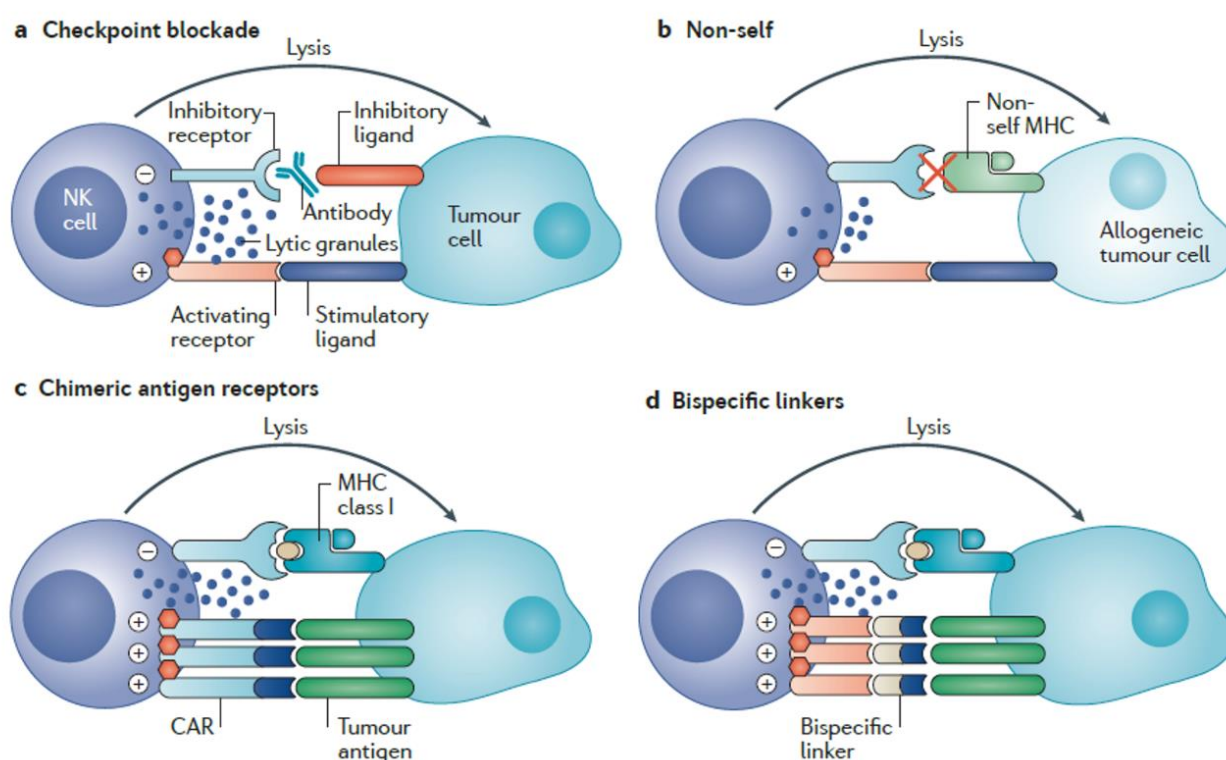


Figura nº7 – Representación esquemática de las estrategias oncoterapéuticas que se benefician del potencial de las células NK.

Morvan MG and Lanier LL. (© Macmillan Publishers Limited 2016)

3.1. Preestimulación y trasplante de células NK alogénicas

Las primeras inmunoterapias basadas en células NK contemplaron la administración de altas dosis de IL-2 para inducir *in vivo* su capacidad de crecimiento y actividad antitumoral, llegando a describirse expansiones de células NK autólogas superiores al 2500% respecto a los recuentos basales y estimulando considerablemente su capacidad citolítica *in vitro* [5]. Sin embargo, la expresión clínica de la estimulación fue desalentadora dada la expansión paralela de células T_{reg}, linfocitos de función inhibidora, y la represión mediada por la interacción entre el HLA propio y los receptores tipo KIR de las células NK [7, 5]. Este hecho justificó el abandono de la estimulación de células NK autólogas como alternativa terapéutica.

La primera aplicación clínica consistente de las células NK en el abordaje del cáncer tuvo lugar en 2002, tal y como describe Ruggeri, L. *et al.*, en un marco de leucemia mieloide aguda (LMA). El trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) de médula ósea alogénicas en pacientes con combinaciones HLA-C/KIR discordantes reveló un índice de recidivas de LMA mucho menor, sugiriendo que las células NK procedentes del donante eran capaces de mediar una respuesta aloantigénica específica sobre las células leucémicas sin desencadenar un cuadro de injerto-contrahuésped en el proceso [7]. El trasplante supuso la desinhibición de la capacidad citolítica de las células NK en el nuevo ambiente de ausencia propia (*missing-self*), caracterizado por la incompatibilidad entre el HLA del huésped y los receptores KIR del donante (ver **Figura nº7b**), resultando una reacción de injerto-contratumor por ausencia de inhibición [22].

Esta demostración ha servido en lo sucesivo para inspirar nuevas estrategias terapéuticas basadas en la transferencia adoptiva de células NK preactivadas *in vitro*, arrojando resultados positivos en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda y de tumores gliales [5]. Por encima de todo, las observaciones referidas han recalcado la importancia de la preestimulación con citoquinas y factores de crecimiento, sugiriendo que el éxito de la transferencia adoptiva estriba en la capacidad de persistencia y expansión de las células trasplantadas [7].

La inducción con IL-12, IL-15 e IL-18 ha demostrado mejorar la capacidad de respuesta a citoquinas y la habilidad de reestimulación de los receptores de activación hasta varios meses después de la preactivación (células NK *memory-like*), al estimular la expresión de CD25 y la capacidad de respuesta a IL-2. Las consecuencias de la inducción son la optimización de la función efectora, la prolongación de la supervivencia y el incremento de la producción de IFN- γ , mediador clave en la represión de células neoplásicas [23, 1].

Del mismo modo, se ha constatado que la administración *in vivo* de citoquinas posibilita la reversión de la anergia de las células NK que ocurre en el contexto de tratamientos inmunosupresores crónicos y en los cuadros avanzados de cáncer [7].

Por otra parte, la preactivación de células NK aisladas de sangre del cordón umbilical ha dado resultados optimistas en el manejo de la leucemia mieloide aguda y el linfoma [7, 24]. Algunas de las características que respaldan el uso de células NK de sangre del cordón umbilical son el menor riesgo de enfermedad de injerto-contra-huésped, su mayor capacidad de reconstitución post-transferencia y la existencia en ella de células precursoras capaces de diferenciarse mediante la estimulación con citoquinas *ex vivo* [10]. Varios ensayos clínicos están evaluando actualmente la factibilidad, seguridad y eficacia en la terapia adoptiva de las células NK procedentes de sangre del cordón umbilical, como alternativa a la sangre periférica. Debe matizarse, no obstante, que la principal limitación del aislamiento de células NK de sangre del cordón umbilical es la cantidad requerida para su aplicación clínica [10].

La transferencia de células NK estimuladas con IL-15 se ha asociado a una respuesta terapéutica favorable en tumores sólidos [10], sin embargo, la toxicidad sistémica de IL-2, IL-12 e IL-15 limita su empleo como medio de preactivación de células NK. Paralelamente, la transferencia adoptiva exige el empleo de células NK alogénicas dotadas de combinaciones HLA/KIR discordantes, ya que de otra manera la interacción entre los ligandos del HLA del huésped y los receptores KIR del donante resulta en su inhibición y, por ende, en una expresión clínica pobre [10, 7].

3.2. Bloqueo de receptores de inhibición

Las interacciones entre los receptores de la familia de receptores KIR y las moléculas polimórficas del MHC de clase I desempeñan un papel clave en los mecanismos de inmunovigilancia y citotoxicidad sobre células neoplásicas [4]. Dado que los receptores inhibidores son capaces de generar una potente represión de la activación de las células NK, los receptores tipo KIR constituyen una diana de bloqueo inmune con interesantes perspectivas en inmunoterapia y control antitumoral (ver Figura nº7a) [4, 7].

El anticuerpo monoclonal IPH2102 genera bloqueo en tres receptores KIR inhibidores que interactúan con moléculas del HLA-C (KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2D3), y ha demostrado incrementar la actividad antitumoral de las células NK *in vitro* [25], manifestando tolerancia hacia células sanas [26]. Adicionalmente, se ha descrito la expresión de receptores inhibidores tipo KIR en

células T CD4+ y CD8+, sugiriendo que los efectos antitumorales derivados del bloqueo podrían incluir otras células integrantes de la respuesta inmune adaptativa, además de las células NK [4, 7].

El bloqueo de receptores KIR ha demostrado no producir efectos secundarios relevantes en pacientes con leucemia mieloide aguda y mieloma múltiple, hecho que avala su aplicabilidad clínica [7]. Su eficacia en monoterapia es reducida, pero se ha constatado que el bloqueo de otras moléculas expresadas en células NK, como PD1 (proteína de muerte programada 1) y CTLA4 (antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos 4), tiene efectos sinérgicos con el bloqueo de receptores inhibidores tipo KIR. Esta sinergia induce paralelamente la producción de citoquinas proinflamatorias a nivel sistémico y optimiza la capacidad efectora de las células NK [25, 7].

3.3. Receptores quiméricos de antígenos: CARs

Los receptores quiméricos de antígenos (CARs) son proteínas basadas en receptores de células T modificados artificialmente. Estructuralmente se componen por un dominio de reconocimiento antigénico extracelular, específico para antígenos tumorales, vinculado a un dominio de señalización intracelular (ver **Figura n°8**) [1, 7]. El dominio extracelular generalmente consiste en un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) capaz de reconocer un antígeno específico sobreexpresado en tumores específicos, sin requerir para ello su presentación mediada por proteínas del MHC [10]. Los dominios intracelulares suelen integrar CD3 ζ , CD28, 4-1BB u OX40, y su propósito consiste en amplificar la activación de linfocitos T y células NK [10].

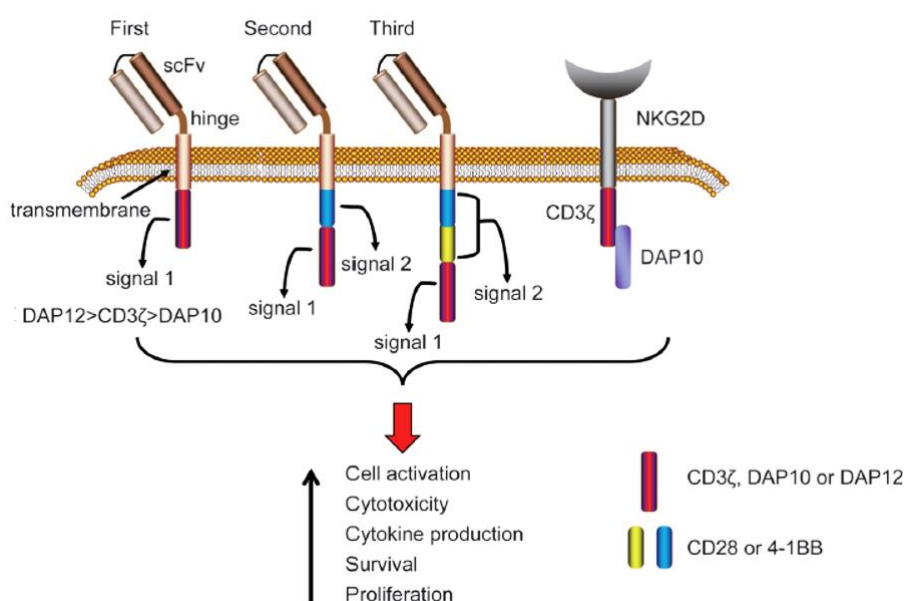


Figura n°8 – Principios básicos de las células CAR-NK.

Los CARs integran un dominio de reconocimiento antigénico (scFv o el receptor NKG2D), un dominio transmembrana y un dominio intracelular que proporciona la señal de activación a la célula NK.

Hu Y *et al.* (© CPS and SIMM 2017)

Ventajas de implementar CARs en células NK

Numerosos estudios han avalado la utilidad de los linfocitos T genéticamente modificados para incorporar CARs (células CAR-T), particularmente en el abordaje de tumores hematológicos como el linfoma, la leucemia linfocítica crónica y la leucemia aguda linfoblástica [7]. Si bien, la aplicación clínica de las células CAR-T en el tratamiento del cáncer se ha visto restringida por varias circunstancias: su difícil producción a gran escala y la descripción de múltiples efectos adversos, como toxicidad neurológica, tormentas de citoquinas e impacto extratumoral [10].

Las células NK transducidas para expresar receptores quiméricos (células CAR-NK) ofrecen comparativamente más ventajas que las células T (ver **Figura n°7c**) [10], principalmente por su nivel de seguridad en el marco clínico, ya que no producen reacción de injerto-contrahuésped ni tormentas de citoquinas. Otras características que respaldan su pertinencia son su mayor especificidad constitutiva para la detección de células neoplásicas (mediada por los receptores de activación y sus ligandos), incluso de tumores que no expresan antígenos para CARs, y su mayor recuento en muestras clínicas, hecho que facilita su aislamiento [10]. Las células NK pueden obtenerse de sangre periférica, sangre del cordón umbilical, células madre embrionarias humanas, células madre pluripotenciales inducidas, y también pueden conseguirse a partir de líneas de células NK-92 [10].

NK-92 constituye una línea celular leucémica infectada por el virus de Epstein-Barr, caracterizada por la ausencia de algunos de los principales receptores activadores de las células NK primarias: los NCRs y el receptor CD16 [7]. Las células NK-92 han sido empleadas repetidamente en el diseño de receptores CARs por varias razones, principalmente su facilidad de expansión bajo estándares adecuados de producción [10]. Sin embargo, dado su origen tumoral, las células NK-92 requieren irradiación previa a su infusión en el huésped, proceso que suprime su capacidad de proliferación *in vivo* [10]. Este hecho, unido a su perfil arriesgado y pobre expresión de receptores activadores, impone limitaciones sobre su posible aplicación clínica [7].

De cualquier modo, la transducción de CARs en células NK primarias (generalmente aisladas de sangre periférica) y células NK-92 tumorales ha manifestado buenos resultados clínicos para una gran variedad de antígenos tumorales, en tratamientos de tanto neoplasias sólidas como hematológicas [10].

Aplicaciones clínicas de las células CAR-NK

El principal desafío que afronta la implantación clínica de las células CAR-NK es la expansión *in vivo* post-trasplante, para la cual se han planteado numerosas estrategias. La utilización de medios de soporte bioactivo, aunque *a priori* una alternativa práctica, se ha asociado a reacciones de injerto-contrahuésped por la persistencia de las células del soporte en el tejido trasplantado. La preestimulación con citoquinas, referida previamente en el contexto de la transferencia adoptiva, constituye la alternativa más adecuada dada su seguridad [7, 5].

Otro desafío reside en la propia transducción de los CARs en las células NK, lograda mediante el empleo de vectores virales y no virales. Los vectores virales, por un lado, han sido asociados a la formación de neoplasias como consecuencia de la inserción de mutaciones y oncogenes en el genoma, de modo que no constituyen una alternativa suficientemente segura [10]. Las estrategias basadas en vectores no virales, por otro lado, contemplan el empleo de DNA desnudo, la elaboración de sistemas de transposones no virales y la inserción de RNA mensajero (mRNA). Dado el carácter transitorio de la expresión de los CARs por transfección de mRNA (de unos tres días), se ha sugerido su utilidad en la preparación de células CAR-NK como terapia adyuvante [10].

Receptores endógenos de células NK en el diseño de CARs

Algunos de los receptores activadores endógenos de las células NK ofrecen interesantes perspectivas como candidatos de CARs para su transducción en linfocitos T [27]. Las células CAR-T que expresan CARs basados en NKG2D manifiestan capacidad citolítica *in vitro* sobre células del estroma y linfocitos, grupos celulares implicados en los mecanismos de inmunoevasión tumoral ante las células NK [7]. Adicionalmente, los receptores CAR-NKG2D no pierden funcionalidad por sobreestimulación porque prescinden de la mediación del adaptador endógeno DAP10, al contrario que el receptor NKG2D endógeno de las células NK [7]. Sin embargo, la anulación del mecanismo de desregulación de NKG2D se ha asociado a reacciones autoinmunes por interacción con ligandos extratumorales [7].

Los receptores endógenos CD16 y los NCR también ofrecen perspectivas favorables en el diseño de células CAR-T. En experimentos con ratones, el receptor CAR-CD16 ha demostrado exhibir una potente actividad antitumoral al optimizar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos [27], y los CAR basados en NKp30 y NKp46 se han asociado a mayor actividad citolítica sobre tumores varios;

manifestando, sin embargo, efectos extratumorales adversos sobre tejidos que también expresan sus ligandos [7].

3.4. Anticuerpos biespecíficos en células NK

Algunos anticuerpos biespecíficos son capaces de reconocer simultáneamente antígenos tumorales por un extremo y unirse a receptores de células NK por otro, funcionando como enlazadores inmunes que inducen la activación e interacción con células neoplásicas (ver **Figura nº7d**) [7].

Anticuerpos biespecíficos para CD16

Dada la potencia de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, muchos anticuerpos biespecíficos se han diseñado con el fin de asegurar una unión más estable y potente con el receptor CD16 que la mediada por la fracción constante (F_C) de las IgG, ligando natural del receptor. Los anticuerpos terapéuticos biespecíficos permiten redirigir el potencial citotóxico de las células NK funcionalmente competentes para la lisis mediada por CD16/ $FC\gamma III$, con efectos más potentes que la citotoxicidad mediada por anticuerpos [28].

Varias estrategias enfocadas a la estimulación de CD16 han demostrado redirigir eficazmente la actividad citolítica de las células NK hacia las células neoplásicas, como el empleo de dominios de cadena sencilla (F_V) de mayor afinidad y la utilización de proteínas tetravalentes dotadas de dos sitios de unión [7]. El acoplamiento de dominios F_V anti-CD16 con dominios F_V específicos para varios antígenos tumorales ha servido para abordar numerosos tipos tumorales. Algunos ejemplos son CD19, proteínas del MHC clase II, CD30 (en linfomas), HER2 (en el cáncer de mama) y CD33 (en la leucemia mieloide aguda) [7].

Un estudio reciente ha demostrado que la activación de CD16 por el anticuerpo tetravalente y biespecífico AFM13 aumenta la funcionalidad de las células NK por encima de sus niveles de activación naturales en el contexto de linfoma de células CD30⁺ [28]. Esta amplificación se traduce en un aumento de sensibilidad de las células NK a las citoquinas IL-15 y a bajas dosis de IL-2, resultando en un recuento celular aumentado respecto al habitual ante el linfoma. Se ha sugerido el desarrollo de estrategias oncoterapéuticas basadas en la administración de combinaciones de AFM13 con IL-2 e IL-15 con el fin de promover la funcionalidad de las células NK ante encuentros repetidos

con células neoplásicas y expandir las poblaciones de células NK reactivas en pacientes con linfoma de células CD30⁺ [28].

Anticuerpos biespecíficos para NKG2D

Se han planteado varias tácticas basadas en la estimulación del receptor NKG2D mediante anticuerpos biespecíficos vinculados a sus ligandos. Una estrategia consiste en redirigir la capacidad citolítica de las células T mediante un anticuerpo biespecífico capaz de reconocer ligandos de NKG2D expresados en células neoplásicas y el CD3 de los linfocitos T [7].

Los anticuerpos biespecíficos han servido también para inducir la citotoxicidad dependiente de NKG2D sobre varios tipos tumorales diferentes, mediante la unión por un brazo a uno de sus ligandos y el acoplamiento de un F_v específico para un antígeno tumoral en el otro. Algunos ejemplos son la proteína de fusión RAET1H-anti-CD138, acoplada a CD138, que aparece sobreexpresado en el mieloma múltiple [29]. Otro ejemplo es la proteína RAET1H-anti-CEA, acoplada al antígeno carcinoembrionario, que demostró tener una elevada eficacia *in vitro* e *in vivo* en el abordaje del cáncer colorrectal.

Una de las principales ventajas del desarrollo de anticuerpos biespecíficos para NKG2D es la coestimulación de tanto células NK como de linfocitos T, que también expresan el receptor en sus membranas (ver **Tabla nº1**). Este hecho, unido a su versatilidad y cimentación en una vía frecuentemente frustrada por la inmunoevasión, refuerza el interés por esta estrategia en potenciales tratamientos para el cáncer, particularmente la leucemia mieloide aguda [7].

V. CONCLUSIÓN

La interacción entre las células NK y las células neoplásicas revela una dimensión de la immunoedición del cáncer en gran medida inexplorada, y su funcionamiento a nivel del microentorno tumoral dista de ser entendido en su totalidad. Sin embargo, el cometido de las células NK en la contención y eliminación de las células tumorales avala su conveniencia en el desarrollo de nuevas estrategias oncoterapéuticas, sobre todo aplicables cuando la regulación del sistema inmune se ve desbordada.

En este contexto, la inmunoterapia proporciona un amplio abanico de tratamientos potentes y específicos, y la investigación con células NK constituye una de sus principales vanguardias. En la actualidad hay una amplia variedad de ensayos clínicos en curso basados en terapias con células NK (796 según datos de <https://clinicaltrials.gov>), hecho que refuerza su carácter hodierno y el interés que suscitan en el diseño de nuevas estrategias para el abordaje del cáncer.

El trasplante de células NK autólogas supuso su primera aplicación en el campo de la inmunoterapia, arrojando resultados desalentadores en un primer momento. Sin embargo, numerosos ensayos clínicos han verificado en lo sucesivo la seguridad y eficacia de las células NK alogénicas en el marco de la terapia adoptiva, particularmente como complemento al trasplante de células madre hematopoyéticas.

No obstante, la aplicabilidad de células NK se ha visto restringida por varios motivos: su efímera supervivencia *in vivo*, su escasa capacidad de búsqueda activa de células neoplásicas, su anergia en microentornos tumorales inmunosupresores y su especificidad pobre para antígenos tumorales. Para compensar estas limitaciones se han planteado numerosas medidas, mereciendo especial énfasis la preestimulación y la implementación de tecnologías de ingeniería genética para modificarlas, que definen las actuales vías de investigación.

La inducción de las células NK con citoquinas y factores de crecimiento constituye una práctica imprescindible a todos los efectos, dado que ha demostrado en repetidas ocasiones extender la supervivencia *in vivo*, incrementar la respuesta a la reestimulación y amplificar de forma duradera la capacidad efectora ante muchos tipos de tumores. Por otra parte, los recientes avances en ingeniería genética han posibilitado la instauración de dos vertientes muy prometedoras: el diseño de CARs y el desarrollo de anticuerpos biespecíficos.

La transducción de CARs en células NK permite dirigir su citotoxicidad sobre células neoplásicas de forma específica, posibilitando así la erradicación de células tumorales que de base son poco susceptibles a ser identificadas y eliminadas. Las numerosas ventajas de las células CAR-NK respecto a las células CAR-T avalan su potencial rendimiento en el tratamiento de neoplasias refractarias, sobre todo de carácter hematológico. De cualquier modo, a pesar de que se han sugerido muchas estrategias para mejorar la eficacia terapéutica de las células CAR-NK, la abrumadora heterogeneidad de los distintos subtipos de células NK obliga a dirigir las futuras investigaciones a la determinación de los candidatos más adecuados para la transducción de CARs. Muchos ensayos clínicos actuales han adoptado esta perspectiva, como manifiesta un ensayo clínico recientemente aprobado para valorar la eficacia terapéutica de las células CAR-NK aisladas de sangre del cordón umbilical sobre neoplasias linfoides de células B (NCT03056339).

Otro aspecto es la transducción de CARs basados en receptores activadores de células NK en linfocitos T. Esta estrategia representa un enfoque particularmente atractivo, ya que las células CAR-T resultantes son capaces de soslayar los mecanismos de inmunoevasión tumoral más habituales. Algunos de estos medios de evasión, frecuentemente responsables de la invalidación de las células NK, son la inhibición mediada por linfocitos T_{Reg} y la desregulación de NKG2D por sobreestimulación.

La otra faceta de la ingeniería genética en boga es la proyección de anticuerpos biespecíficos, moléculas artificiales que complementan el repertorio de anticuerpos convencionales implicados en la ADCC (generalmente moléculas de IgG). La interacción entre los receptores de activación de las células NK y los anticuerpos biespecíficos, concebidos para unirse a antígenos tumorales concretos, conlleva la estimulación de las células NK y el despliegue de su arsenal citotóxico. El desarrollo de terapias basadas en anticuerpos biespecíficos se ve favorecido por su inmediata disponibilidad, la posibilidad de controlar las reacciones adversas con facilidad y la ausencia de efectos citotóxicos a largo plazo. El enfoque actual contempla su aplicación en el abordaje de la metástasis, recalcando su valor como terapia de consolidación frente a su empleo en la citorreducción. Se ha sugerido, por este motivo, su uso en combinación con terapias de bloqueo de receptores.

El bloqueo de receptores inhibidores mediante anticuerpos monoclonales provoca el descenso del umbral de activación de las células NK, e incluso la reversión de la anergia inducida por los microentornos tumorales inmunosupresores. Las investigaciones más recientes coinciden en desechar su empleo en monoterapia, recalcando su valor en combinación con otras inmunoterapias sinérgicas,

conjuntamente capaces de compensar la inhibición de las células NK y amplificar la actividad antitumoral.

A modo de conclusión, ya han sido esbozadas las estrategias fundamentales empleadas para desvelar y explotar los mecanismos antitumorales de las células NK, con el fin de asegurar su conservación o amplificar su potencial efector. En este sentido, resulta imprescindible caracterizar con precisión las células NK, tanto a nivel molecular como a nivel funcional. Un mayor conocimiento de las células NK y del complejo microentorno tumoral posibilitarán el planteamiento de nuevas estrategias capaces de modular su comportamiento, y de esta manera compensar las limitaciones que restringen su actual aplicabilidad en la clínica.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Weinberg R. The biology of cancer. New York: Garland Science; 2014.
2. Muenst S, Läubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *Journal of internal medicine*. 2016 Jun 1;279(6):541-62.
3. O'Sullivan T, Saddawi-Konefka R, Vermi W, Koebel CM, Arthur C, White JM, Uppaluri R, Andrews DM, Ngiew SF, Teng MW, Smyth MJ. Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *Journal of experimental Medicine*. 2012 Sep 24;209(10):1869-82.
4. Kindt T, Goldsby R, Osborne B. *Kuby immunology*. New York: W.H. Freeman and Company; 2007.
5. Mehta RS, Randolph B, Daher M, Rezvani K. NK cell therapy for hematologic malignancies. *International journal of hematology*. 2018 Mar 1;107(3):262-70.
6. Orange JS. Natural killer cell deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013 Sep 1;132(3):515-25.
7. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nature Reviews Cancer*. 2016 Jan;16(1):7.
8. Dyck L, Lynch L. New Job for NK Cells: Architects of the Tumor Microenvironment. *Immunity*. 2018 Jan 16;48(1):9-11.
9. Glasner A, Levi A, Enk J, Isaacson B, Viukov S, Orlanski S, Scope A, Neuman T, Enk CD, Hanna JH, Sexl V. NKp46 receptor-mediated interferon- γ production by natural killer cells increases fibronectin 1 to alter tumor architecture and control metastasis. *Immunity*. 2018 Jan 9.
10. Hu Y, Tian ZG, Zhang C. Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced natural killer cells in tumor immunotherapy. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2018 Feb;39(2):167.
11. Unglaub Silverthorn D, C Ober W, R Johnson B. *Fisiología humana: un enfoque integrado: 6ª Edición*. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2014.
12. Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*. 2015 Jan;517(7534):293.
13. Bezman NA, Kim CC, Sun JC, Min-Oo G, Hendricks DW, Kamimura Y, Best JA, Goldrath AW, Lanier LL, Gautier EL, Jakubzick C. Molecular definition of the identity and activation of natural killer cells. *Nature immunology*. 2012 Oct;13(10):1000.
14. Björkström NK, Ljunggren HG, Sandberg JK. CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease. *Trends in immunology*. 2010 Nov 1;31(11):401-6.
15. Kruse PH, Matta J, Ugolini S, Vivier E. Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunology & Cell Biology*. 2014 Mar 1;92(3):221-9.
16. Glasner A, Isaacson B, Viukov S, Neuman T, Friedman N, Mandelboim M, Sexl V, Hanna JH, Mandelboim O. Increased NK cell immunity in a transgenic mouse model of NKp46 overexpression. *Scientific reports*. 2017 Oct 12;7(1):13090.

17. Malmberg KJ, Sohlberg E, Goodridge JP, Ljunggren HG. Immune selection during tumor checkpoint inhibition therapy paves way for NK-cell “missing self” recognition. *Immunogenetics*. 2017 Aug 1;69(8-9):547-56.
18. Campbell KS, Purdy AK. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology*. 2011 Mar 1;132(3):315-25.
19. Benson DM, Caligiuri MA. Killer immunoglobulin-like receptors and tumor immunity. *Cancer immunology research*. 2014 Feb 1;2(2):99-104.
20. Hoshikawa M, Aoki T, Matsushita H, Karasaki T, Hosoi A, Odaira K, Fujieda N, Kobayashi Y, Kambara K, Ohara O, Arita J. NK cell and IFN signatures are positive prognostic biomarkers for resectable pancreatic cancer. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018 Jan 8;495(2):2058-65.
21. Deng W, Gowen BG, Zhang L, Wang L, Lau S, Iannello A, Xu J, Rovis TL, Xiong N, Raulet DH. A shed NKG2D ligand that promotes natural killer cell activation and tumor rejection. *Science*. 2015 Apr 3;348(6230):136-9.
22. Pradeu T, Jaeger S, Vivier E. The speed of change: towards a discontinuity theory of immunity?. *Nature Reviews Immunology*. 2013 Oct;13(10):764.
23. Ni J, Miller M, Stojanovic A, Cerwenka A. Toward the next generation of NK cell-based adoptive cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2013 Apr 1;2(4):e23811.
24. Mehta RS, Shpall EJ, Rezvani K. Cord blood as a source of natural killer cells. *Frontiers in medicine*. 2016 Jan 5;2:93.
25. Benson DM, Cohen AD, Jagannath S, Munshi NC, Spitzer G, Hofmeister CC, Efebera YA, Andre P, Zerbib R, Caligiuri MA. A phase I trial of the anti-KIR antibody IPH2101 and lenalidomide in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*. 2015 Sep 15;21(18):4055-61.
26. Vahlne G, Lindholm K, Meier A, Wickström S, Lakshmikanth T, Brennan F, Wilken M, Nielsen R, Romagné F, Wagtmann NR, Kärre K. In vivo tumor cell rejection induced by NK cell inhibitory receptor blockade: Maintained tolerance to normal cells even in the presence of IL-2. *European journal of immunology*. 2010 Mar 1;40(3):813-23.
27. Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nature reviews Clinical oncology*. 2016 May;13(5):273.
28. Pahl JH, Koch J, Götz JJ, Arnold A, Reusch U, Gantke T, Rajkovic E, Treder M, Cerwenka A. CD16A activation of NK cells promotes NK cell proliferation and memory-like cytotoxicity against cancer cells. *Cancer immunology research*. 2018 Mar 7.
29. Chan WK, Kang S, Youssef Y, Glankler EN, Barrett ER, Carter AM, Ahmed EH, Prasad A, Chen L, Zhang J, Benson DM. A CS1-NKG2D bispecific antibody collectively activates cytolytic immune cells against multiple myeloma. *Cancer immunology research*. 2018 Jan 1:canimm-0649.