



Claudio Acuña-Castillo
Departamento de Biología
Facultad de Química y Biología
Universidad de Santiago de Chile
claudio.acuna@usach.cl

Vigilancia inmune y cáncer: el arduo camino para llegar a ser terapia

Immune surveillance and cancer: the arduous way to become therapy

Alejandro Escobar¹, Mario Tello², Eduardo Godoy², Carlos Barrera-Avalos²,
Claudia Robles-Planells², Mónica Imarai², Diana Aurenque³, Claudio Acuña-Castillo²

¹Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología,
Universidad de Chile, Santiago, Chile.

²Centro de Biotecnología Acuícola, Universidad de Santiago de Chile

³Departamento de Filosofía, Facultad de Humanidades, Universidad de Santiago de Chile

Resumen

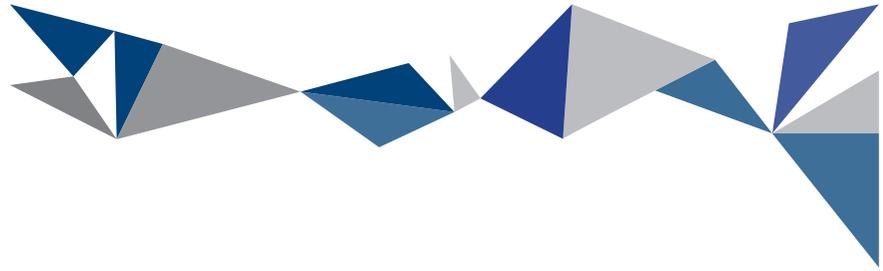
La inmunoterapia contra el cáncer se ha posicionado como un procedimiento que demuestra progresivamente mejores resultados terapéuticos. A lo largo de su historia, observamos una serie de traspies y aciertos que circundan el desarrollo de esta tecnología. El avance tecnológico ha permitido que, en la actualidad, podamos desarrollar terapias específicas capaces de modular el sistema inmune para inducir respuestas antitumorales efectivas. Este tipo de terapia ha implicado, sin duda, una revolución de importante magnitud en medicina. De aquí se comprende, por ejemplo, que en los Premios Nobel de Química y de Medicina 2018 se crucen investigaciones que aportan al desarrollo de anticuerpos humanizados para el tratamiento del cáncer. La presente contribución ofrece una mirada panorámica y simplificada sobre algunos hitos importantes en el desarrollo de las ciencias, que han llevado al avance de lo que hoy conocemos como inmunoterapia contra el cáncer, así como de sus últimos hallazgos, para así, brindar un pequeño reconocimiento a quienes a lo largo de la historia han contribuido a estos avances.

Palabras claves: Inmunoterapia; Cáncer; Terapia; Anticuerpos; Tecnología.

Abstract

Immunotherapy against cancer has been positioned as a procedure that progressively shows better therapeutic results. Throughout its history, we observed a series of missteps and successes that surround the development of this technology. At present, technological advancement has allowed us to develop specific therapies capable of modulating the immune system to induce effective antitumor responses. This type of therapy has involved a revolution of great magnitude in medicine. It is interesting to consider that the Nobel Prize in Chemistry and Medicine in 2018 crosses research that contributes to the development of humanized antibodies for the treatment of cancer. This contribution offers a panoramic and simplified look at some critical milestones in the development of sciences, which have led to the advancement of what we know today as immunotherapy against cancer, as well as its latest findings to offer a small recognition to those who have contributed to these advances.

Keywords: Immunotherapy; Cancer; Therapy; Antibodies; Technology.



Introducción

De acuerdo a su etiología, el cáncer constituye una patología relacionada al crecimiento descontrolado de células en un sitio específico y que, en estados avanzados, es capaz de migrar e invadir otros tejidos comprometiendo al organismo. Este crecimiento celular anormal, ocurre por la generación y acumulación de errores en la información genética y/o por mutaciones. Si estas alteraciones genéticas no son reparadas a tiempo, las células portadoras de las mutaciones pueden transformarse y adquirir características diferentes a una célula normal originando el cáncer (Martín y Civetta, 2011). Si bien nuestro material genético está constantemente afecto a que ocurran este tipo de errores -ya sea debido a agentes externos (mutágenos) o bien a errores inherentes al proceso de replicación-en la mayor parte de los casos las mutaciones son reparadas por la maquinaria de reparación celular y las que no, pueden no ser deletéreas o bien pueden inducir la muerte de la célula (Tafurt y Marin, 2014). Desafortunadamente, en algunos casos las mutaciones pueden ocurrir en genes importantes; por ejemplo, en aquellos asociados a mecanismos de control del ciclo celular lo que pue-

de llevar a la inducción de genes que directamente promueven la replicación celular. También, pueden verse alterados procesos reparativos del material genético incrementando, por tanto, la aparición u ocurrencia de nuevos errores en la replicación del material genético (Orozco *et al.*, 2010). Como consecuencia, se genera un genoma inestable, una condición característica de las células tumorales (Hanahan y Weinberg, 2011). Adicionalmente, esta transformación puede llevar, en algunos casos, a que la célula tumoral además sobre exprese proteínas normales, mutadas y/o proteínas de desarrollo fetal, creando un perfil de expresión de proteínas alterado, lo que convierte a estas células propias en células extrañas para el organismo (Coulie *et al.*, 2014).

Desde sus inicios e incluso hasta nuestros días, los tratamientos convencionales contra el cáncer se han orientado hacia la búsqueda de compuestos que ataquen directamente la capacidad de proliferación de las células cancerígenas (Tannock, 1998). Particularmente, dichos tratamientos utilizan fármacos que inducen efectos citostáticos, es decir, que disminuyen o inhiben temporal-

mente la velocidad de replicación celular, o citotóxicos, que inducen la muerte de las células tumorales. Sin embargo, los agentes quimioterapéuticos no son específicos contra las células tumorales, sino que también tienen actividad nociva sobre las células normales (Chabner y Roberts, 2005; DeVita y Chu, 2008). Así se explican los diversos efectos secundarios de pacientes sometidos a estas terapias; por ejemplo, la pérdida del cabello durante quimioterapia, inducida por la muerte de las células que mantienen el folículo piloso; diarreas y disminución del peso, generadas por daño en el epitelio gastrointestinal; y la alta susceptibilidad a contraer enfermedades e infecciones, producto de la inmunosupresión por la disminuida capacidad de proliferación de los linfocitos un tipo de glóbulos blancos (Montero, 2005). Actualmente, se espera que un agente quimioterapéutico clásico sea capaz de inducir efectos tóxicos preferencialmente en células tumorales, con efectos tóxicos menores o solo a mayores concentraciones en células normales o no transformadas (Nurgali *et al.*, 2018). Los agentes quimioterapéuticos requieren de una serie de validaciones en laboratorio



previo a su utilización en pruebas clínicas. Para ello, se debe confirmar el efecto de los compuestos en células tumorales aisladas y cultivadas en laboratorio, a través de una técnica que se conoce como cultivo celular *in vitro*. Sin embargo, si bien pueden observarse efectos prometedores por este medio, ello no implica necesariamente que ocurrirá lo mismo sobre el crecimiento de una masa tumoral en un organismo. Esto se debe a que, un tumor se comporta como un órgano independiente capaz de autogenerar las condiciones necesarias para su crecimiento y preservación, por ejemplo, promoviendo la generación de nuevos vasos sanguíneos que aseguren el flujo continuo de nutrientes y oxígeno a todo el microambiente tumoral (Hanahan y Weinberg, 2011). Ensayos *in vitro* con células aisladas no permiten, pues, evaluar el efecto de ésta complejidad tumoral sobre la acción de algún compuesto, haciendo necesario el uso de modelos animales (modelo preclínico). Con el modelo animal es posible evaluar el efecto de estas drogas en un contexto más real pudiendo apreciar mejor el efecto del compuesto sobre células tumorales y células normales al mismo tiempo. Este estudio *in vivo* se realiza a través de una técnica conocida como trasplante heterólogo o xenotrasplante de células tumorales en ratones (Greene y Murphy, 1945) (ver anexo Ratones singénicos, transgénicos y Knock-Out). Esta estrategia ha sido fundamental para desarrollar una variedad de fármacos quimioterapéuticos para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. (fuente http://dtp.nci.nih.gov/branches/dscb/mechanistic_explanation.html).

Vigilancia Inmune

El cuerpo cuenta con una estructura conocida como sistema inmune, capaz de buscar, reconocer y eliminar células que tienen alterada la

expresión de genes debido a procesos de transformación ocasionadas por diversos tipos de mutaciones o por infecciones virales. Desafortunadamente, la metodología de evaluación de drogas quimioterapéuticas relegó a segundo plano el papel de la respuesta de este sistema inmune frente al desarrollo de tumores. Tal como se explica en el anexo Ratones singénicos, transgénicos y Knock-Out, la evaluación del uso de drogas en animales de laboratorio, se realiza en animales cuyo sistema inmune ha sido eliminado para así evitar el rechazo de células de otra especie permitiendo, por ejemplo, el crecimiento de células tumorales de humanos previamente trasplantadas (Belizário, 2009). Si bien esto permite evaluar el efecto directo de drogas sobre el crecimiento tumoral, limitó entender un posible papel de la respuesta inmunológica en la protección contra el cáncer. La idea de que la respuesta inmune participa en el control del cáncer es tan antigua como los inicios de la caracterización del sistema inmune, y se acuñó ya a principios del siglo pasado. Inicialmente la activación inespecífica del sistema inmune mediante la inmunización con bacterias muertas realizadas por William Coley a fines del siglo XIX, dan cuenta de que sin saberlo ya en esa época se intentaba activar el sistema inmune para generar respuestas antitumorales, con resultados positivos (Can *et al.*, 2003). Siguiendo esta línea temporal Paul Elrich (1854-1915) planteó a principios del 1900 que “durante el enormemente complicado desarrollo fetal y crecimiento del individuo, la generación de células aberrantes puede llegar a ser bastante común. Sin embargo, afortunadamente en la mayoría de las personas, estas células se mantienen completamente latentes y no se desarrollan en el organismo gracias a la acción de mecanismos positivos de control” (traducción del inglés) (Belizário, 2009). Posteriormente, específica-

mente en 1950, los mecanismos de control planteados por Elrich fueron incluidos en un proceso denominado “vigilancia inmune”, que incluye a los mecanismos celulares y moleculares que se encargan de controlar el crecimiento y presencia de células modificadas, las que al ser reconocidas como ajenas, inducen la acción de la respuesta inmune para su eliminación (DeVita y Chu, 2008). De esta manera, los postulados desarrollados por Lewis Thomas y Frank Burnet a mediados del siglo pasado configuraron la teoría de vigilancia inmune propuesta inicialmente por Elrich. Gracias a una serie de observaciones casuales, así como al desarrollo significativo de la inmunología desde el año 1970 hasta nuestros días, se ha revitalizado con nueva fuerza este planteamiento -olvidado hasta hace solo un par de décadas atrás (Ribatti, 2015). Actualmente sabemos que, en el caso de algunos agentes quimioterapéuticos, se requiere de la activación continua y efectiva de la respuesta inmune para observar efectos terapéuticos. Inicialmente, esta asociación no fue identificada debido a la metodología utilizada en la evaluación y caracterización de los agentes quimioterapéuticos; ambas realizadas, como se mencionó anteriormente, *in vivo* utilizando animales inmunocomprometidos (ver anexo Ratones singénicos, transgénicos y Knock-Out Figura N° 1: Generación de ratones transgénicos).

Sistema inmune y cáncer

Siguiendo con lo ya aludido, las principales terapias asociadas a los tratamientos antitumorales atacan directamente al proceso tumoral mediante el uso de drogas que limitan la proliferación celular. No obstante, la generación de un tumor no solo depende de la capacidad descontrolada de las células de proliferar, sino que también de una serie de factores adicionales. En efecto, existe acuerdo en que el

Generación de animales transgénicos

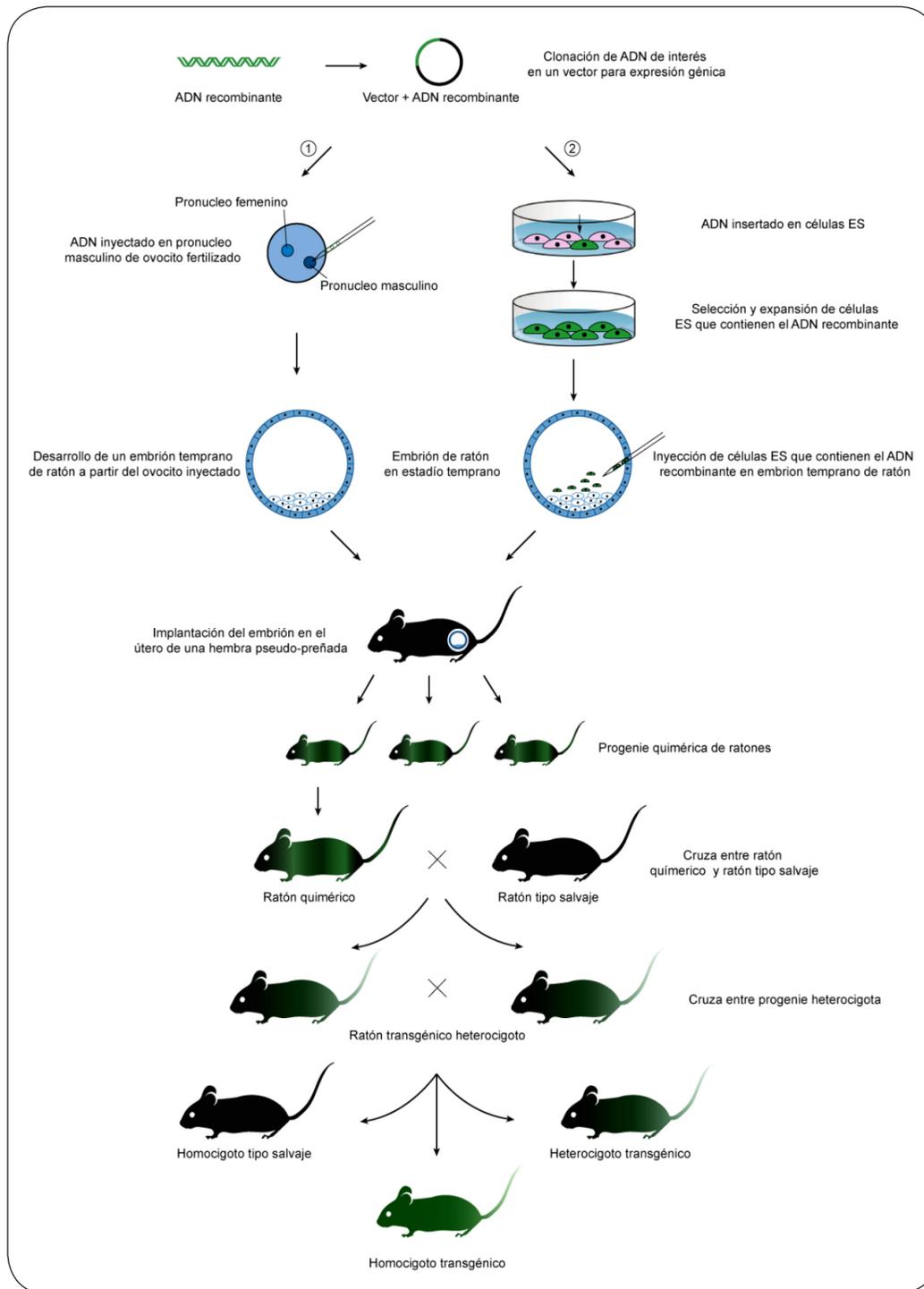


Figura N° 1. Generación de ratones transgénicos. Un animal transgénico es aquel que porta un gen extraño que se ha insertado deliberadamente en su genoma. Existen dos métodos ampliamente utilizados para la generación de animales transgénicos: 1. Inyección del ADN deseado (gen) en el pronúcleo masculino de un ovocito fertilizado, el cual posteriormente desarrollará un embrión temprano. 2. Transformación de células embrionarias (células ES, embryonic stem cells) con el gen deseado, las cuales son insertadas en un embrión temprano. En ambos casos el embrión temprano es implantado en el útero de una hembra pseudo-preñada. Las crías corresponderán a animales quiméricos, compuestos por células provenientes de las células madre del embrión huésped y células madre embrionarias tratadas. Si algunas de las células tratadas llegan a ser parte de la línea germinal del ratón, algunos de sus gametos serán derivados de la célula donante. Si estos ratones quiméricos se cruzan con un ratón tipo salvaje (normal), algunas de sus progenies llevarán una copia del gen insertado, por lo tanto serán heterocigotos para ese gen. Cuando estas progenies heterocigotas se cruzan entre sí, cerca del 25% de las crías llevarán dos copias del gen insertado en cada una de las células de su cuerpo, siendo un animal homocigoto para ese gen.

cáncer corresponde a un proceso multifactorial, modulado por diversas propiedades que va adquiriendo el tumor durante su desarrollo (Hanan y Weinberg, 2011). A la fecha se han caracterizado un sinnúmero de procesos adaptativos intrínsecos del tumor que buscan aumentar su sobrevivencia y disminuir la posibilidad de su destrucción, incluyendo la modulación negativa de la respuesta inmune (Cavallo *et al.*, 2011; Gutschner y Diederich, 2012), por lo cual la estimación del sistema inmune contra el tumor de no ser resolutive podría ser importante para el tratamiento contra esta enfermedad (Del Paggio, 2018). Debido a que la activación de la respuesta inmune es requerida para la eficacia de algunos agentes quimioterapéuticos como el cisplatino, entre otros (Krysko *et al.*, 2012; Vacchelli *et al.*, 2014) (ver anexo Muerte celular inmunogénica), surgen dos preguntas fundamentales: ¿Cómo se explica que un tumor genere un proceso que evita la respuesta inmune?; y, ¿qué ocasiona que la respuesta inmune pase de ser un mecanismo de regulación y de vigilancia constante de las células transformadas a constituir una condición permisiva del crecimiento desmedido de estas células transformadas?

Para responder estas interrogantes es crucial comprender la naturaleza de las células tumorales. Su proliferación descontrolada está asociada a la ausencia de mecanismos de regulación y reparación del genoma, de lo que se desprende que una célula tumoral pueda adquirir nuevas mutaciones producto de los errores inherentes al proceso de síntesis del DNA en cada ciclo replicativo (Vázquez-Ramos, 2016). La adquisición de estos errores permite que por una causa azarosa o ligada a efectos pleiotrópicos se expresen moléculas capaces de regular negativamente la respuesta inmune; por ej. citoquinas antiinflamatorias y moléculas reguladoras de la res-

puesta inmune (ver anexo Procesamiento y Presentación de antígenos tumorales Figura N° 2: Presentación de antígenos, activación e inhibición de linfocitos T).

En la década del 80 del siglo pasado científicos dieron con un impor-

tante hallazgo al observar que existen linfocitos T específicos contra tumores que infiltran al tumor, por lo que son llamados linfocitos T infiltrantes de Tumor (TILT por sus siglas en inglés) (Chiou *et al.*, 2005; Baladamenti *et al.*, 2018). Sin embargo, pese a que reconocen anti-

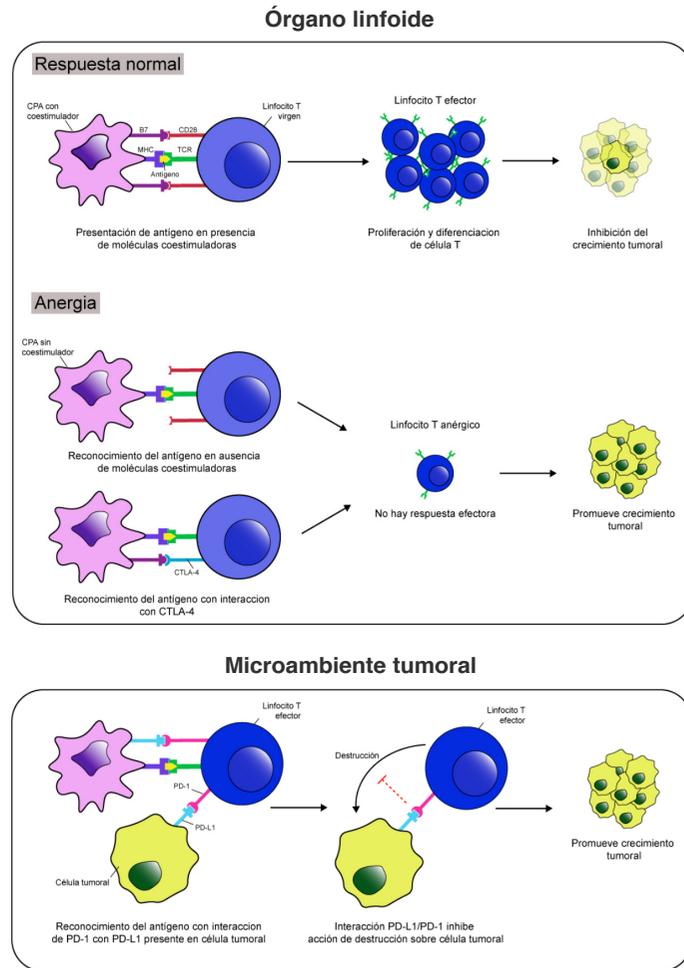


Figura N° 2. Presentación de antígenos, activación e inhibición de linfocitos T. En los órganos linfoides secundarios, como los nódulos linfáticos y el bazo, la presentación de antígenos por las células presentadoras de antígenos (CPA) competentes, que poseen moléculas coestimuladoras como B7, estimula una respuesta normal de células T, produciendo linfocitos efectores capaces de inhibir el crecimiento tumoral (A). Si la célula T reconoce el antígeno presentador por una CPA deficiente en moléculas coestimuladoras, se producirá anergia clonal, es decir linfocitos T no funcionales (B). En condiciones normales en órganos linfoides, existen mecanismos de control de la respuesta inmune. Entre ellos, la estimulación de CD28 por B7 induce también la producción de CTLA-4 en el linfocito T, que compete con CD28 por B7, lo que reduce las señales de activación de las células T y permite "apagar" la respuesta en una etapa temprana de su estimulación (C). En el microambiente tumoral, PD-1 expresado por el linfocito T efector (ya previamente activado por CPAs) reconoce a su ligando PD-L1 expresado por células tumorales o células CPAs infiltrantes, esta interacción inhibe la capacidad del linfocito T de destruir a la célula tumoral, promoviendo el desarrollo del tumor (D). De este modo, la utilización de anticuerpos para inhibir la interacción B7/CTLA-4 en la etapa inicial de la activación del linfocito T, y de PD-1/PD-L1 durante su etapa efectora en el tumor, impide la inhibición de la acción de los linfocitos T, permitiendo su acción sobre el crecimiento tumoral.



genos tumorales específicos, dichos linfocitos no son funcionales y por ello, son incapaces de inducir una respuesta adaptativa protectora que destruya las células transformadas (Cavallo *et al.*, 2011). Ahora bien, surgen más preguntas: ¿Cómo un tumor puede inducir linfocitos específicos que no sean funcionales, es decir que no se puedan activar para inducir una respuesta inmune? Los mecanismos pueden ser variados y se relacionan directamente al incremento de un tipo particular de linfocitos – los linfocitos T reguladores– cuya función radica en la inducción de procesos de tolerancia. Entonces, ¿cómo se generan estos linfocitos? ¿Cuál es el o los mecanismos que llevan a este proceso de tolerancia? La respuesta proviene nuevamente al entender cómo se comporta el tumor y cómo este puede modular de forma negativa la inducción de la respuesta inmune, incluyendo la producción de citoquinas y la presentación de antígenos (ver anexo Procesamiento y Presentación de antígenos tumorales).

Células dendríticas (DCs) como punto de partida en inmunoterapia

En la década de 1970, Ralph Steinman descubre las células dendríticas, generando una línea de investigación que permitió el estudio y caracterización en profundidad de estas células. Gracias a este descubrimiento, así como por su importante contribución al campo de la inmunología (específicamente en la presentación de antígenos por células dendríticas y su alta eficiencia para activar los linfocitos), le fue otorgado el Premio Nobel en 2011. Precisamente, la importancia de las células dendríticas en el control del sistema inmune es responsable de que comenzara a pensarse en la estimulación inmune como un posible uso terapéutico (Steinman, 2007). Un punto de inflexión se produce cuando resulta posible diferenciar

in vitro una gran cantidad de células dendríticas a partir de precursores presentes en tejidos de fácil acceso, como la sangre periférica. Una vez diferenciadas in vitro fue posible “educar” a estas células para montar una respuesta inmune contra el tumor al interior del paciente (Banchereau y Palucka, 2005; Bol *et al.*, 2016). Con todo, pese a que en varios tipos de tumores este tratamiento es notablemente efectivo, en otros no lo es. Evidentemente, esto genera un cuestionamiento central: ¿Cómo es posible que, a pesar de estimular correctamente a linfocitos antitumorales específicos, el sistema inmune no sea capaz de actuar contra las células tumorales? Nuevamente, la explicación parece radicar en la naturaleza misma de las células tumorales. La inestabilidad genómica permite que, gracias a una causa azarosa, el tumor comience a expresar moléculas capaces de regular negativamente la respuesta inmune.

El año 2018, los Dres. James P. Allison y Tasuku Honjo, fueron galardonados con el Premio Nobel por sus contribuciones en el campo de la inmunoterapia pasiva. Dicha terapia consiste en un tratamiento que utiliza anticuerpos monoclonales humanizados (ver anexo Anticuerpos monoclonales y humanizados, Figura N° 3: Secuencia de la recombinación de segmentos de genes de inmunoglobulinas (VDJ). Figura N° 4: Generación de anticuerpos monoclonales por técnica de hibridoma) capaces de bloquear los puntos de chequeo de la respuesta inmune activando procesos de respuesta inmune adaptativa (Iwai *et al.*, 2002; Peggs *et al.*, 2006). En condiciones fisiológicas, las interacciones de las proteínas CD80/86-CTLA-4 y PD-L1/2-PD en la superficie de células inmunes son puntos de chequeo que permiten inhibir la respuesta a autoantígenos (antígenos propios), previniendo la autoinmunidad (ver anexo Procesamiento, Presentación

de antígenos y respuesta inmune). Precisamente estas vías están sobre-expresadas en el cáncer y ello conduce a una evasión de la respuesta inmune y el escape tumoral. Estudios clínicos de inhibidores de estos puntos de chequeo inmunológicos muestran una disminución en la supresión del sistema inmune y un aumento de la respuesta antitumoral (Cavallo *et al.*, 2011). Evidentemente, tanto el diseño como la construcción de este tipo de anticuerpos no es asunto fácil. En la mencionada década de los 80, se comenzó a pensar en alternativas para la construcción de anticuerpos y regiones de anticuerpos que reconozcan antígenos de interés o blancos terapéuticos para también ser utilizados en enfermedades distintas del cáncer. Fue el descubrimiento o, mejor dicho, la innovación generada por George Smith sobre el uso de librerías de fagos (ver anexo Figura N° 5) lo que permitió que el proceso de generación de estructuras que reconozcan antígenos específicos fuese más fácil, optimizando la producción y generación de anticuerpos monoclonales.

Pese a que los avances y procesos descritos no llevan más de 100 años, los tiempos de Elrich parecen tremendamente lejanos. Así, resulta fácil perder de vista la compleja construcción de conocimiento y tecnología que se ha venido erigiendo entre la medicina y la química. En el año 2012 la prestigiosa revista Nature (Review in Immunology) dedicó un volumen completo a la inmunología antitumoral e inmunoterapia (Nature Review in Immunology, 2012), lo cual desde entonces, se perfilaba como una importante opción de tratamiento. Por ello, hemos querido destacar los pasos decisivos en la historia del estudio sobre el cáncer, que fue inspirado en gran medida por una mezcla entre mentes visionarias, errores no inducidos y procesos no concate-

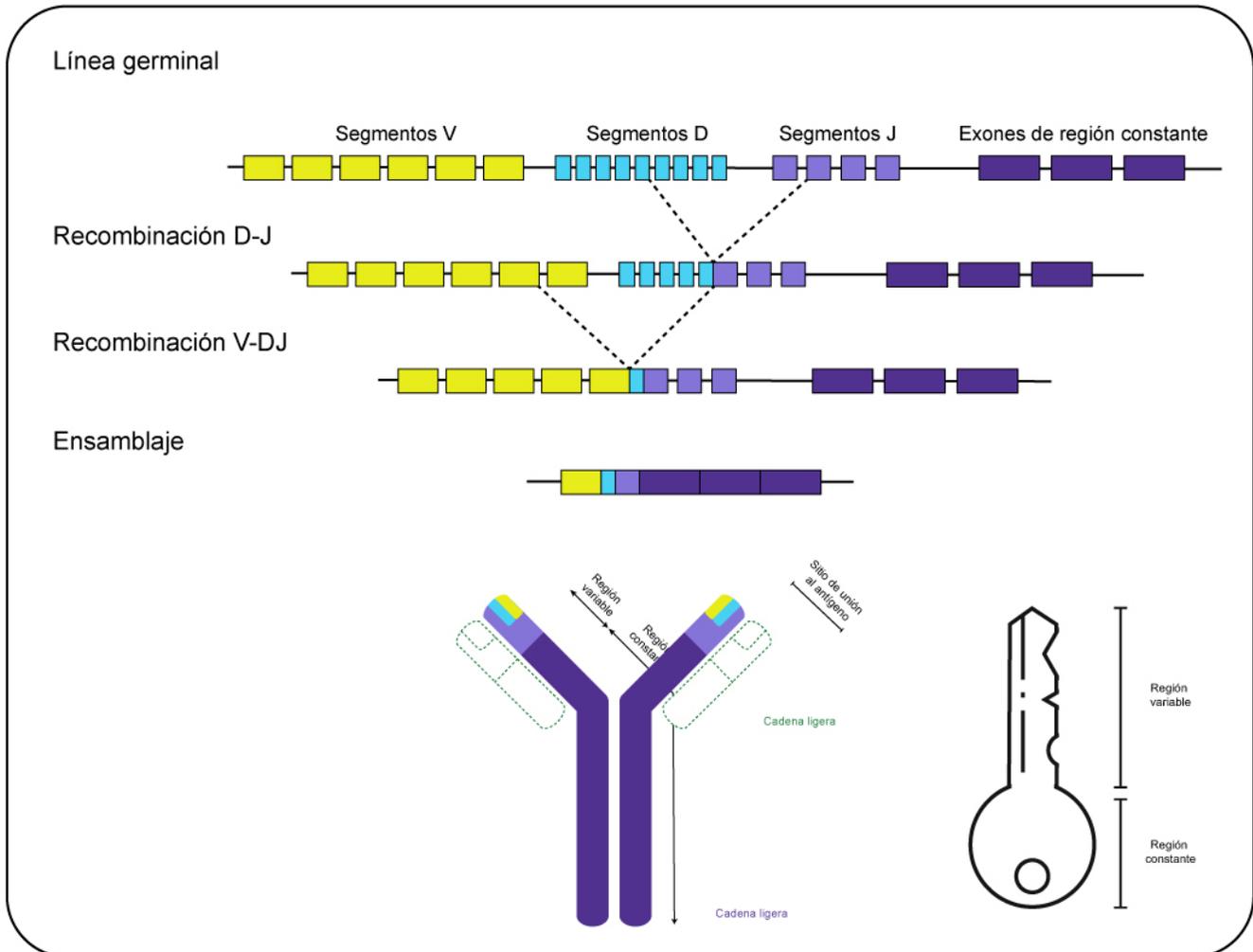


Figura N° 3. Secuencia de la recombinación de segmentos de genes de inmunoglobulinas (VDJ). Las inmunoglobulinas están formadas por una cadena liviana y una pesada, cada una de las cuales contiene una región constante (cabeza de una llave) y una variable (dientes de una llave) que contiene la región de unión al antígeno. Las inmunoglobulinas funcionales se producen durante la maduración de los linfocitos B en un proceso en el que los segmentos de la región variable se reordenan determinando la conformación del sitio de unión al antígeno. En el caso de la cadena pesada, su región variable está codificada por tres tipos de segmentos génicos V, D y J. Durante la recombinación, en primer lugar, una de las versiones del segmento D se yuxtapone a una J. Posteriormente, una versión del segmento V se recluta para acercarse a las dos anteriores. Ahora es posible la síntesis de un ARN con los segmentos necesarios (VDJ y C) que se procesarán por escisión intrónica y se traducirán a proteína. En el caso de la cadena liviana la recombinación es similar, pero más simple, ya que no incluye segmentos D. Así, la variabilidad de recombinaciones que puede surgir entre los distintos segmentos en la región variable, determina el tipo de antígeno que será reconocido por dicha inmunoglobulina, al igual que el patrón de dientes que tenga una llave determina la cerradura que abrirá.

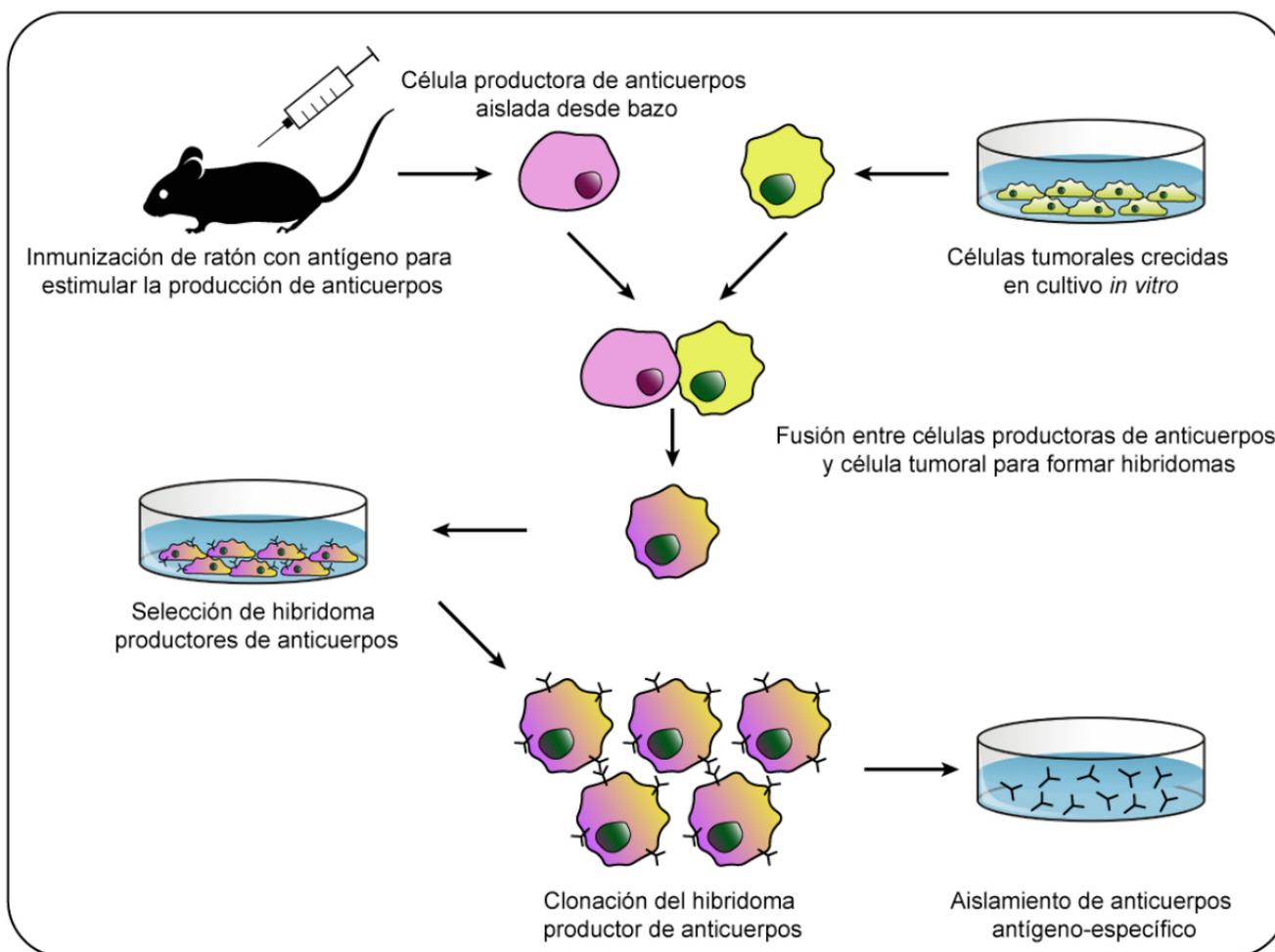


Figura N° 4. Generación de anticuerpos monoclonales por técnica de hibridoma. Los anticuerpos monoclonales van dirigidos contra un mismo epítipo (parte del antígeno que es reconocida por el anticuerpo), de un mismo antígeno lo que los clasifica como ultra específicos. Para obtener una solución que contenga un sólo anticuerpo, es necesario lograr la proliferación de un sólo Linfocito B. La manera de hacerlo consiste en fusionar una célula plasmática específica para el antígeno deseado, con otra célula que posea una capacidad indefinida de división (célula tumoral). Por tanto, la célula fusionada, llamado hibridoma, será capaz de vivir en cultivo, dividirse y producir anticuerpos monoclonales, los cuales posteriormente son purificados.

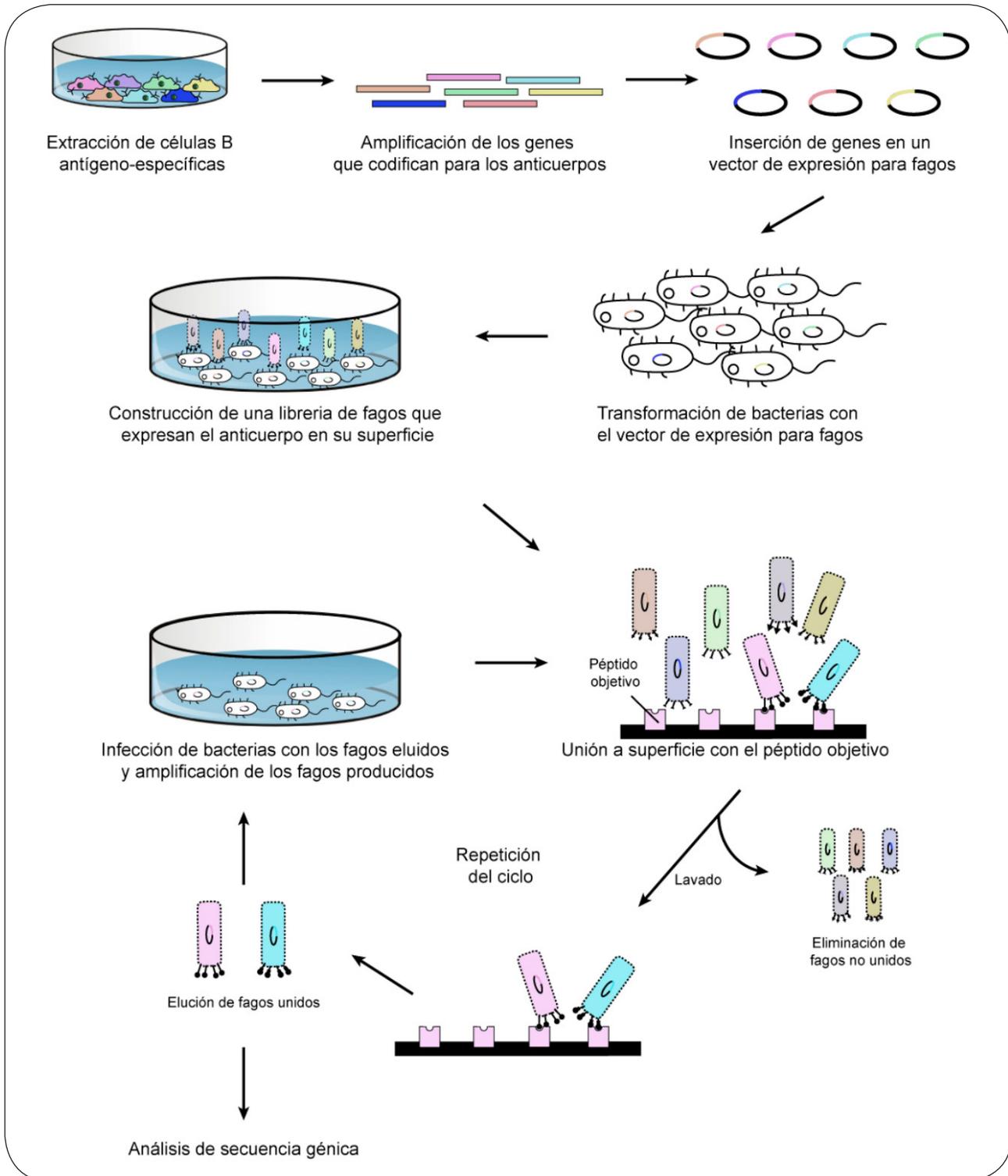


Figura Nº 5. Fago Display. La generación de bibliotecas de fagos es una poderosa herramienta de investigación para el estudio de interacciones entre proteínas, como ocurre entre un antígeno y un anticuerpo. Para ello, el gen que codifica para distintos anticuerpos puede ser aislado y clonado en un vector que contiene las secuencias génicas necesarias para la producción de fagos. La transformación de bacterias con este vector de expresión que contiene el gen de un anticuerpo, dará paso a la formación de fagos que contienen en su interior dicho gen y que expresan en su superficie el anticuerpo. Los fagos se seleccionan mediante un proceso de biopanning. Este proceso de implica cuatro pasos principales: preparación de bibliotecas de péptidos con fagos, captura de fagos específicos que se unen al objetivo, lavado de fagos de baja afinidad o no específicos de la superficie celular y recuperación de los fagos unidos. Después, los fagos eluidos se amplifican y se inicia una nueva ronda, de forma que la librería pierde diversidad pero se enriquece en el número de fagos de interés. Estos son analizados para determinar la secuencia génica que dio origen a ese anticuerpo en particular.



nados. No nos cabe duda de que, en un par de lustros, sus meditaciones, herramientas e hipótesis tendrán cada vez más protagonismo en lo referente a estrategias terapéuticas para el control y tratamiento de una serie de patologías, incluido el cáncer (Farkona *et al.*, 2016).

ANEXOS

Ratones singénicos, transgénicos y Knock-Out

Los ratones de experimentación corresponden a un modelo muy utilizado y cuyo origen se remonta hacia la década de 1920, producto de un trabajo exhaustivo de Clarence Cook Little (Crow y Dove, 2002). La idea de Little fue montar un modelo animal para sus investigaciones en genética clásica, que garantizara resultados experimentales óptimos y reproducibles en estudios de transmisibilidad de genes. Estos animales fueron criados a partir de cruces sucesivas entre familiares de parentesco genético cercano (hermana-hermano), durante 20 generaciones, con el propósito de asegurar familias en las que todos los individuos son homocigotos y poseen la misma dotación genética (singénicos). Gracias a estos animales ha sido posible también manipularlos genéticamente, generando ratones transgénicos (que portan genes de otra especie) e incluso producir animales en los cuales es posible eliminar genes específicos para poder estudiar su función; llamados animales Knock-Out. El primer ratón Knockout fue producido entre 1987 y 1989 por Oliver Smithies, Mario R. Capecchi y Martin Evans (Beckman, 2008), logro por el que recibieron el Premio Nobel de Medicina en el año 2007 (Beckman, 2008). Este tipo de animales son producidos a través de una manipulación genética a nivel de células embrionarias. Dado que las células de un embrión en etapa temprana de desarrollo son totipotenciales, mediante el uso de

herramientas moleculares específicas se les puede transferir diferentes genes. Mediante la inducción de un proceso que se conoce como recombinación homóloga de ADN, también se puede producir la eliminación funcional de un gen. Una vez generadas estas células embrionarias modificadas, éstas pueden ser reintroducidas a un ovocito de 24 células de ratón para ser reimplantado en una madre sustituta. La célula modificada dará lugar a tejido del embrión y generará un animal quimérico, nombre dado a partir de las figuras mitológicas híbridas de más de 1 especie (en este caso quimérico por la co-existencia de genes modificados y naturales). Los cruces repetidos pueden generar un animal homocigoto con las dos copias idénticas del gen de interés modificado (Figura N° 1). Algunas manipulaciones en genes que están implicados en el desarrollo de linfocitos han llegado a generar diferentes tipos de animales que no poseen respuesta inmune adaptativa, haciendo más expedito desarrollar trasplantes, incluyendo tejidos de otras especies: xeno-trasplantes. Esta última característica es responsable del avance del xenotrasplante de células tumorales, las cuales poseen la capacidad de crecer en el hospedero y comportarse de forma similar a como se desarrollaría un tumor ya formado en un ser humano, aumentando las posibilidades de estudiar el efecto citotóxico o citostático de los quimioterapéuticos para el uso humano (Sykes, 2007).

Muerte celular inmunogénica

Las células presentes en un organismo mueren constantemente, ya sea en un ciclo de destrucción de células dañadas y/o por renovación de tejidos en otros casos. La muerte celular se clasifica de acuerdo con sus características en dos grandes tipos: necrosis y apoptosis. La necrosis corresponde a un tipo

de muerte que se asocia principalmente a daños de tejidos como lo que sucede en caso de cortaduras, quemaduras y otros tipos de daños. A nivel celular, la destrucción de la célula lleva al vaciamiento de su contenido al espacio intercelular, promoviendo una respuesta inflamatoria. La apoptosis, por su parte, se define como un tipo de muerte celular programada que, a diferencia de la necrosis, no gatilla inflamación (Elmore, 2007). Este tipo de muerte induce la generación de pequeñas estructuras rodeadas de una membrana, como si la célula se fragmentara en pequeñas porciones, pero manteniendo los componentes de la célula muerta al interior de estas estructuras. La apoptosis fue caracterizada inicialmente en el desarrollo embrionario y es, entre otros procesos, la responsable de la pérdida de la membrana interdigital en los fetos humanos. En el contexto de muerte celular, uno de los efectos indirectos de algunos agentes quimioterapéuticos anticancerígenos, consiste en la capacidad de inducir un tipo de muerte celular específica, denominada recientemente como muerte celular inmunogénica (Kepp *et al.*, 2009; Krysko *et al.*, 2012; Vacchelli *et al.*, 2014). Este tipo de muerte es capaz de inducir la respuesta inmune, ya que las células presentadoras de antígenos (CPA) migran al sitio del tumor y fagocitan los restos generados después de este tipo de muerte celular. Los restos tumorales contienen una gran cantidad de proteínas, entre las cuales existen proteínas que se generan a partir de genes mutados (lo cual se conoce como traducción de proteínas), que pueden ser reconocidas como proteínas no-propias o antígenos contra las cuales se montará una respuesta inmune. Además, este tipo de muerte genera la liberación de factores conocidos como Patrones Moleculares asociados a Daño (DAMPs), los cuales son capaces de inducir la expresión de moléculas



coestimuladoras e inducir una correcta respuesta inmune (Garg *et al.*, 2010; Krysko *et al.*, 2013).

Procesamiento, presentación de antígenos y respuesta inmune

El proceso de procesamiento y presentación antigénica profesional es realizado por células del sistema inmune conocidas como células presentadoras de antígenos (CPA). Este grupo de células, dentro del cual están las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, pueden tomar proteínas propias y no propias (microorganismos y proteínas mutadas) y desarmarlas en pequeños fragmentos. Estos fragmentos serán expuestos en la superficie de las células unidas a receptores especiales llamados proteínas del complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC por sus siglas en Inglés). El complejo formado por el fragmento proteico (antígeno) y el MHC es reconocido por el receptor del linfocito T o TCR (por sus siglas en inglés). Sin embargo, para que se produzca la respuesta inmune de los linfocitos, es necesario que estas CPA expresen además otros receptores que se conocen como moléculas de coestimulación. La CPA presenta en su superficie las moléculas denominadas CD80 y/o CD86 que tienen una función estimuladora de los linfocitos cuando se unen con la molécula CD28 presente en el linfocito; si, por otra parte, la unión de CD80/86 se une a otra molécula presente en el linfocito, la molécula CTLA-4, ocurre una inhibición del linfocito (Abbas, 2003). En términos generales, este proceso de equilibrio entre inducción de respuesta y freno de esta es crucial en el organismo, debido a que una activación exacerbada puede terminar en la inducción de una respuesta autoinmune. Los linfocitos que pueden ser activados por la respuesta inmune corresponden a linfocitos T del tipo CD4 o CD8. Los linfocitos T CD4 producen algunas proteínas solubles

llamadas citoquinas, las cuales tienen como función regular de forma positiva la activación de subtipos de células efectoras como los macrófagos y los linfocitos CD8, mientras que otras también pueden regular de forma negativa la respuesta generando un freno para la sobre-activación. Los linfocitos T CD8+ son las células efectoras finales de la respuesta celular y son capaces de atacar células infectadas, reconociendo los antígenos en el MHC I y llevando a la destrucción de las células reconocidas. Estos linfocitos al igual que toda la respuesta inmune está afecta a un proceso de regulación. Particularmente, los linfocitos TCD8+ o citotóxicos, son regulados por la molécula de Muerte Celular Programada 1 (PD-1) que se expresa en los linfocitos T. En este caso, la unión del receptor PD1 con su ligando PD-L1 y PD-L2 deriva en la inhibición de la actividad citotóxica de los linfocitos (Figura N° 2) (Grothuis y Neefjes, 2005; Neefjes *et al.*, 2011; Blum *et al.*, 2013; Reis e Sousa y Unanue, 2014).

Anticuerpos monoclonales y humanizados

Además de la respuesta inmune celular, el sistema inmune también puede reaccionar generando una respuesta denominada humoral o soluble. Esta se produce por la activación de los linfocitos B que generan y que, posteriormente secretan una proteína denominada inmunoglobulina o anticuerpo. Las inmunoglobulinas reconocen una porción específica de proteínas u otras estructuras moleculares. Cada linfocito B presente en el organismo es capaz de sintetizar solo un tipo de inmunoglobulina, dado que esta se genera mediante un proceso que se conoce como recombinación de segmentos de genes de inmunoglobulinas (recombinación VDJ) (Maki *et al.*, 1980). Lo anterior implica un reordenamiento azaroso entre dis-

tintos segmentos de una región específica del genoma de los linfocitos, responsable de que (al igual que los copos de nieve) no exista un anticuerpo igual a otro. Este proceso permite la generación de un amplio repertorio (especificidades) de anticuerpos y es un caso único de las células somáticas. Este mecanismo fue descrito por Susumo Tonegawa, quien por este tremendo descubrimiento se adjudicó el Premio Nobel en 1987. Este proceso también ocurre en la generación del repertorio del TCR en los linfocitos T. Para entender su complejidad, es útil remitir a un ejemplo: Supongamos que uno tiene una caja fuerte totalmente inviolable y que en el interior posee la colección de vasijas chinas del siglo I de nuestra era, pero ¡perdió la llave! Dado que en el ejemplo no caben la figura del cerrajero y del ladrón ¿Cómo abrir la caja fuerte? Pensemos que dinamitar la puerta o cualquier mecanismo de fuerza no es una opción, dado que rompería la porcelana. Así, una opción más sensata sería optar por conseguir una serie de llaves de diferentes tipos, y al azar, con el fin de lograr encontrar alguna que finalmente logre abrir la caja. Evidentemente, si esta opción se realiza en forma manual podría durar una eternidad, por lo cual exige una automatización. Una máquina, o un robot, estaría a cargo de la tarea de combinar diferentes tipos de llaves; sin embargo, para hacerlo más rápido aún, dividimos la llave en 4 sectores imaginarios y ponemos a 4 robots en la misma actividad, pero cada uno con programaciones diferentes. Ya teniendo las llaves podríamos –sin duda, con paciencia– llegar a abrir la caja. En todo este ejercicio tendremos además llaves que permitan abrir cerraduras que incluso aún no han sido diseñadas (Figura N° 3).

Volviendo a los anticuerpos, a fines del siglo XIX estos fueron caracterizados funcionalmente por Emil



Adolf von Behring y Shibasaburo Kitasato. Ambos describieron la actividad del suero para neutralizar la difteria y la toxina tetánica, y en base a sus observaciones establecieron la existencia de un mediador sanguíneo soluble, dándole el nombre de anticuerpo. En 1975 George Köhler y César Milstein desarrollaron los anticuerpos “monoclonales”, lo que corresponde a una técnica para la obtención de anticuerpos puros contra un determinado antígeno (Figura N° 4). Los descubrimientos de Köhler y Milstein revolucionaron el campo de la biotecnología y representan la base para el reconocimiento específico de antígenos de interés, siendo la base de exámenes tan comunes como el test de embarazo o el examen del VIH (Milstein y Kohler, 1975). Por este desarrollo, ambos obtuvieron el Premio Nobel en 1984. Este proceso resultó ser importantísimo en el desarrollo de la biotecnología, debido a la alta especificidad que tiene un anticuerpo para discriminar entre estructuras que son casi idénticas, y por ello tiene el potencial de ser diseñado para reconocer estructuras diferentes entre células tumorales y normales. Si bien este proceso presenta una serie de posibilidades, considerando la gran cantidad de estructuras que podrían llegar a ser reconocidas por los anticuerpos, la producción de anticuerpos contra proteínas humanas puede ser realizada solo en animales de experimentación y no en el mismo hospedero al cual será utilizado como terapia. Desafortunadamente, debido a que los anticuerpos monoclonales son producidos en otra especie, su uso en seres humanos tiene baja efectividad. El sistema inmune del ser humano reconoce rápidamente los anticuerpos como ajenos y los neutralizaría impidiendo su función. Esta problemática ha comenzado a ser resuelta mediante una tecnología que se conoce como

humanización de anticuerpos monoclonales. Esta humanización consiste en reemplazar la mayor parte de las regiones conservadas de la inmunoglobulina de ratón, por secuencias de proteínas de humanos, haciendo el anticuerpo muy similar a uno humano e impidiendo de esta forma que el anticuerpo pueda ser eliminado por el propio sistema inmune. Este avance significó para Sir Gregory P. Winter la obtención del premio Nobel de Química este año. Desafortunadamente, este proceso para la generación y humanización de anticuerpos no es simple y las humanizaciones pueden generar proteínas que no necesariamente mantengan su actividad de reconocer los antígenos. Así, esto da pie a una siguiente tecnología a tratar denominada Fago Display que resuelve la problemática de cómo generar una amplitud diferente de proteínas específicas. Figura N° 5 obtención monoclonales.

Fago Display

Como tecnología del Fago Display se entiende la producción de proteínas con la capacidad de reconocer anticuerpos que fue desarrollada por George Smith. Primero es necesario saber que los fagos corresponden a virus que infectan bacterias. Los fagos poseen una estructura y material genético muy simple que contiene genes que codifican para proteínas que, a su vez, permiten su propia replicación y que forman su estructura capsular. En el caso de los virus con estructura icosaédrica son aquellos que corresponden a un fago que infecta las bacterias *E. coli*. Al ser este fago tan simple, se pueden generar proteínas de fusión o quiméricas mediante ingeniería genética. Así, en la envoltura del fago se insertan las proteínas quiméricas quedando expuestas hacia el exterior. Las librerías de fagos se caracterizarán

por el tipo de (poli)-péptidos utilizados para construirlas. Se incluyen aquellas que despliegan regiones responsables de la unión del anticuerpo al antígeno, como son los fragmentos Fab o solamente las regiones variables (scFvs), que se construyen mediante combinación previa de los genes que codifican las regiones variables de los anticuerpos en los linfocitos B y su posterior inserción el vector del fago. Para encontrar fagos que reconozcan el blanco de interés, se lleva a cabo un proceso de selección conocido como biopanning, el cual consta de cuatro fases: (1) inmovilización del blanco en un soporte; (2) unión de los fagos al blanco; (3) lavado y eliminación de los fagos que no interactúan; (4) elución de los fagos que han interactuado, para poder amplificarlos mediante infección en bacterias. Voviéndolo a nuestro ejemplo: El sistema del Fago Display se parece a nuestra máquina, robot, de generar llaves, pudiendo generar combinatorias que permiten en algún momento generar una estructura que habrá la cerradura (Figura N° 5). Sin embargo, la tecnología del Fago Display permite además probar estas llaves, ¿cómo lo hace? Supongamos que descubrimos que la llave original estuvo guardada envuelta en un papel y logramos adquirir a partir de este papel, el contorno más o menos certero de la llave. Sin duda, esto facilitaría enormemente poder discriminar la llave que nos sirve, dado que podríamos filtrar solo aquellas llaves que sean de la forma idónea, reduciendo de forma efectiva una serie de errores. En resumen, podríamos dejar que un sistema simple genere miles de millones de copias de llaves y dejamos, al mismo tiempo, que el mismo sistema las pruebe para finalmente determinar cuál era la copia que abre nuestra caja fuerte.



Agradecimientos

Los autores agradecen a ICTIO Biotechnologies, proyectos DICYT, CORFO y FONDECYT. CA agradece de forma especial a Sofía por la ayuda a la generación del orden e ideas.

Referencias

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2003. Cellular and molecular immunology. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA.
- Badalamenti G, Fanale D, Incorvaia L, Barraco N, Listi A, Maragliano R, Vincenzi B, Calò V, Iovanna JL, Bazan V, Russo A. 2018. Role of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with solid tumors: Can a drop dig a stone?. *Cell Immunol* doi: 10.1016/j.cellimm.2018.01.013.
- Banchereau J, Palucka AK. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5: 296–306.
- Beckman M. 2008. Knockout mouse creation wins Nobel Prize. *J Nat Cancer Inst* 100: 6-10.
- Belizário JE. 2009. Immunodeficient mouse models. *Open Immunol J* 2: 79-85.
- Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. 2013. Pathways of antigen processing. *Ann Rev Immunol* 31: 443-473.
- Bol KF, Schreiber G, Gerritsen WR, de Vries IJ, Figdor CG. 2016. Dendritic cell-based immunotherapy: State of the art and beyond. *Clin Cancer Res* 22: 1897-1906.
- Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini PL. 2011. 2011: The immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 60: 319-326.
- Chabner BA, Roberts TG. 2005. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 65-72.
- Chiou SH, Sheu BC, Chang WC, Huang SH, Ho HN. 2005. Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies. *J Reprod Immunol* 67: 35-50.
- Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T. 2014. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: At the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 14: 135-146.
- Crow JF, Dove WC. 2002. Anecdotal, historical and critical commentaries on genetics. *Genetics* 161: 1357- 1361.
- Del Paggio JC. 2018. Immunotherapy: Cancer immunotherapy and the value of cure. *Nat Rev Clin Oncol* 15: 268-270.
- DeVita VT, Chu E. 2008. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* 68: 8643-8653.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495-516.
- Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. 2016. Cancer immunotherapy: The beginning of the end of cancer?. *BMC Med* 14:73. doi: 10.1186/s12916-016-0623-5.
- Garg AD, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P. 2010. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: An emerging amalgamation. *Biochim Biophys Acta* 1805: 53-71.
- Greene HSN, Murphy ED. 1945. The heterologous transplantation of mouse and rat tumors. *Cancer Res* 5: 269-282.
- Groothuis TA, Neefjes J. 2005. The many roads to cross-presentation. *J Exp Med* 202: 1313-1318.
- Gutschner T, Diederichs S. 2012. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biology* 9:703-719.



- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144: 646-674.
- Hoption Cann S, van Netten JP, van Netten C. 2003. Dr William Coley and tumour regression: A place in history or in the future. *Postgrad Med J* 79: 672-680.
- Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. 2002. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *6*: 2-6.
- Kepp O, Tesniere A, Schlemmer F, Michaud M, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. 2009. Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. *Apoptosis* 14: 364-375.
- Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostini P, Vandenabeele P. 2012. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 12: 860-875.
- Krysko O, Løve Aaes T, Bachert C, Vandenabeele P, Krysko DV. 2013. Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell Death Dis* 4: e631.
- Kulmira N, Jagoe RT, Abalo R. 2018. Editorial: Adverse effects of cancer chemotherapy: Anything new to improve tolerance and reduce sequelae?. *Frontiers Pharmacol* 9: 1-3.
- Maki R, Kearney J, Paige C, Tonegawa S. 1980. Immunoglobulin gene rearrangement in immature B Cells. *Science* 209: 1366-1369.
- Martín M, Civetta J. 2011. Carcinogénesis. *Rev Salud Pub México* 53: 405-414.
- Medina MA. 2011. Los signos distintivos del cáncer. *Encuentros en la biología* 4: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros135/cancer.pdf>
- Milstein G, Kohler C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
- Montero A. 2005. Control de síntomas crónicos. Efectos secundarios del tratamiento con radioterapia y quimioterapia. *Oncología* 28: 147-156.
- Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11: 823-836.
- Orozco MC, Farías RR, Loeza PD, Santoyo G. 2010. Cáncer: La importancia de reparar cortes en el ADN y perspectivas desde la farmacogenómica. *Rev Mex Ciencias Farmaceut* 41: 7-14.
- Peggs KS, Quezada SA, Korman AJ, Allison JP. 2006. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 18: 206-213.
- Reis e Sousa C, Unanue ER. 2014. Antigen processing. *Curr Opin Immunol* 26: 138-139.
- Ribatti D. 2015. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget* 8: 7175-7180.
- Steinman RM. 2007. Dendritic cells: Understanding immunogenicity. *Eur J Immunol* 37: S53-560.
- Tannock IF. 1998. Conventional cancer therapy: Promise broken or promise delayed?. *Lancet* 351: 1-16.
- Taufert Y, Marin MA. 2014. Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Revista Biosalud* 13: 95-110.
- Vacchelli E, Aranda F, Eggermont AM, Galon J, Sautès-Fridman C, Cremer I, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. 2014. Trial watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology* 3: e27878.
- Vázquez-Ramos J. 2016. Reparación del ADN: Un asunto de vida...y de Premios Nobel. *Educación Química* 27: 93-96.
- Yang YG, Sykes M. 2007. Xenotransplantation: Current status and a perspective on the Future. *Nat Rev Immunol* 7: 519-531.