

GENES DESREGULADOS Y CÉLULAS REBELDES: EL ESCAPE DE LOS TUMORES

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DURANTE EL ESCAPE TUMORAL: IMPLICANCIAS EN INMUNOTERAPIA

GABRIEL A. RABINOVICH y ADA G. BLIDNER*

CÉLULAS JUGANDO AL POLICÍA Y AL LADRÓN

La transformación maligna de un grupo de células que lleva a la generación de tumores es sin duda uno de los procesos más complejos y desafiantes de la biología. Los eventos celulares que subyacen a este proceso emergen de alteraciones genéticas que en conjunción con señales provenientes del microambiente de esas células, dictaminan el crecimiento y progresión de un tumor. Un desajuste, un error que no puede ser reparado, conlleva a la amplificación y desinhibición de señales de crecimiento de células que aspiran a dominar tierras

Gabriel Rabinovich es Investigador Superior del CONICET y Profesor Titular de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Actualmente es Vice-Director del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME/CONICET). Su trabajo de investigación está dedicado a los mecanismos de resistencia tumorales y el desarrollo de inmunoterapias. Durante su carrera, Gabriel ha sido galardonado con numerosos premios, incluido el Premio Investigador de la Nación Argentina (2017), Premio Houssay Trayectoria (2017), Premio Konex Platino (2013), John Simon Guggenheim Foundation Award (2006), Cancer Research Institute (USA 2006), TWAS Prize on Medical Sciences (2010), Premio Consagración de la Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (2018) y el American Association of Immunologists Career Award (USA 2017). Además, es miembro de la Academia de Ciencias de los Estados Unidos (NAS), Academia de Ciencias para Países en Desarrollo (TWAS), Academia Nacional de Ciencias de Argentina y Personalidad Destacada de ciudades a lo largo y a lo ancho del país.

Ada Blidner es Investigadora Asistente del CONICET y forma parte del grupo del Dr. Rabinovich. Su trabajo de investigación recibió el apoyo de la Sociedad de Inmunoterapia del Cáncer (SITC Fellowship Award 2016).

vecinas y conquistar lejanas. Cuando estas células rebeldes generan estrategias para camuflarse y evadir la vigilancia de nuestro sistema inmunológico, es cuando hablamos de «escape tumoral».

Nuestra respuesta inmunológica ha co-evolucionado durante años con los microbios que nos rodean: virus, bacterias, parásitos y hongos. Si hoy estamos vivos y sanos es porque logramos defendernos, eliminarlos o convivir con ellos. ¿Pero qué sucede cuando son las células de nuestro organismo las que se transforman y se rebelan? Nuestro sistema inmunológico monitorea constantemente que las proteínas presentes en la superficie de las células (llamadas antígenos) sean normales. En la mayoría de los casos, cuando las células de nuestras defensas (llamadas linfocitos) reconocen células malignas que expresan neoantígenos (es decir, nuevos antígenos), las eliminan. Estos neoantígenos aparecen por la desregulación de la expresión de ciertos genes. Sin embargo, durante procesos de carcinogénesis, es decir, el desarrollo de un cáncer, las células tumorales también evolucionan y se seleccionan las variables resistentes a nuestro sistema inmunológico, resultando invisibles al monitoreo de control. Entonces, son capaces de invadir el torrente sanguíneo y linfático y colonizar nuevos tejidos. Este proceso denominado metástasis involucra la expresión o silenciamiento de una gran variedad de genes asociados a procesos de extravasación (o pasaje de un torrente a otro), migración celular, invasividad, modificación del sistema vascular y escape inmunológico.

La identificación de los mecanismos celulares y moleculares utilizados por células tumorales para eludir el sistema inmunológico llevó al desarrollo de nuevas terapias para el cáncer, las cuales hoy denominamos estrategias de inmunoterapia. Cuando un tumor emite señales que apagan al sistema inmune, hablamos de mecanismos inmunosupresores. Las inmunoterapias tienen como objetivo potenciar las propias defensas del organismo e inhibir los mecanismos inmunosupresores de los tumores, generando un enorme impacto en la expectativa de vida libre de enfermedad en pacientes carentes de otras opciones terapéuticas.

A continuación, haremos un recorrido histórico acerca de cómo fuimos explorando y comprendiendo cómo funcionan los mecanismos asociados al escape tumoral y la respuesta inmunológica

en cáncer. En este contexto, describiremos investigaciones de nuestro laboratorio asociadas a las galectinas, una familia de proteínas altamente conservadas a través de la evolución con importantes implicancias en la progresión tumoral, metástasis, vascularización e inhibición de la respuesta inmunológica. Estos descubrimientos, producto de los esfuerzos en investigación básica, han sido clave para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas en cáncer.

INMUNOVIGILANCIA EN CÁNCER, UN POCO DE HISTORIA

La estimulación del sistema inmunológico para el tratamiento del cáncer tiene sus orígenes hacia finales del siglo XIX. Fue gracias al médico norteamericano William Coley, quien a pesar de no comprender en detalle los fundamentos de la respuesta inmunológica, utilizaba toxinas derivadas de las bacterias *Streptococcus erysipelas* y *Bacillus prodigiosus* para el tratamiento de un tipo de cáncer llamado sarcoma, que era inoperable. La inflamación local producida por estas toxinas era suficiente para reactivar la respuesta inmunológica y reducir el tamaño de tumores en sus pacientes. Estas primeras observaciones sentaron las bases de lo que en la actualidad se considera una revolución en el tratamiento del cáncer. Es por ello que William Coley es considerado por muchos, el padre de la inmunoterapia. En 1909 Paul Ehrlich predijo que el sistema inmunológico podría prevenir la aparición de tumores que de otra manera, serían mucho más frecuentes. Esta idea fue retomada por Frank Macfarlane–Burnet y Lewis Thomas entre los años 50s y 70s, quienes postularon la teoría de inmunovigilancia, por la cual células tumorales podían ser distinguidas de células normales a partir de moléculas extrañas expresadas en su superficie (los neoantígenos) capaces de desencadenar una respuesta inmunológica.

ACELERADORES Y FRENOS DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO: PUNTOS DE CONTROL INMUNOLÓGICO

La activación del sistema inmunológico frente a un tumor involucra una secuencia de diferentes eventos celulares y moleculares. Todo

comienza con el encuentro de una célula de nuestro sistema inmunológico, llamada célula dendrítica (célula presentadora de antígenos profesional) con la célula potencialmente maligna y el reconocimiento de sus antígenos extraños. Una vez que ocurre este reconocimiento, la célula dendrítica viaja a los ganglios linfáticos donde se encuentra con los linfocitos T vírgenes, les presenta los antígenos tumorales y desencadena su activación. Ahora estos linfocitos activos saben qué células deben buscar en el organismo para eliminarlas. Pero la activación del linfocito T es aún más compleja, ya que necesita además de reconocer la molécula extraña, un acelerador. Así como cuando conducimos un automóvil, el embrague es la primera señal para que el vehículo pueda avanzar, pero sólo logramos moverlo cuando presionamos el acelerador. El embrague es entonces la proteína extraña, o antígeno, y el acelerador son otras moléculas presentes en la membrana del linfocito T que facilitan su activación, su migración al sitio de crecimiento tumoral y la eliminación de dichas células anormales. Estos aceleradores se llaman moléculas co-estimuladoras, dado que ayudan a estimular nuestras defensas.

Pero de la misma manera que en un semáforo en rojo debemos frenar el vehículo, los linfocitos T también deben detener su activación una vez que se eliminó el tumor, para lo cual poseen otras moléculas en su superficie, llamadas moléculas co-inhibitorias. Estas moléculas constituyen un freno para la respuesta inmunológica anti-tumoral y una barrera que impide la activación sostenida del linfocito T, que podría resultar dañina para nuestro organismo.

LAS INMUNOTERAPIAS COMO ESTRATEGIA CONTRA EL DESARROLLO DE TUMORES

A partir de sucesivos descubrimientos que la ciencia básica fue alcanzando en las últimas décadas, hemos logrado identificar muchas de las moléculas co-estimuladoras y co-inhibitorias de los linfocitos T. Con el armado parcial de este enorme rompecabezas, hemos comenzado a comprender mejor cómo los tumores modulan la actividad de estas moléculas co-activadoras o co-inhibitorias. De esta manera,

muchos tumores consiguen evadir o apagar el sistema inmunológico, y así lograr progresar e incluso invadir nuevos tejidos. El objetivo de las inmunoterapias consiste justamente en interferir en los planes del tumor, mejorando el balance entre la activación y la represión de las células de nuestras defensas para reconocer y eliminar las células malignas.

En 1987 se identificó por primera vez el gen correspondiente a la molécula co-inhibitoria CTLA-4 (del inglés *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*). Luego, durante 1990 James Allison junto a su equipo de la Universidad de California en Berkeley, estudió su función inmunosupresora en el microambiente tumoral. Es decir, el tumor usa a la molécula CTLA-4 como señal para apagar o frenar a los linfocitos T. Si bien no fue el único grupo que identificó la capacidad inmunosupresora de esta molécula, Allison y colaboradores fueron los primeros en fabricar un anticuerpo neutralizante que bloqueaba la función de esta proteína con el fin de estimular los linfocitos anti-tumorales. En 1994 los investigadores realizaron el primer experimento en ratones portadores de tumores en el cual observaron una reducción completa del tumor cuando estos animales eran tratados con el anticuerpo anti-CTLA-4. El bloqueo de la actividad inhibitoria de esta molécula permitió activar linfocitos T liberando los frenos de la respuesta inmune antitumoral. A pesar del escepticismo inicial acerca del impacto clínico de estos hallazgos, Allison siguió su camino intentando convertir su descubrimiento en una terapia efectiva para pacientes con cáncer. En el año 2010 se reportaron resultados clave en ensayos clínicos en pacientes con melanoma avanzado revelando respuestas antitumorales muy positivas en un grupo de pacientes con este tipo de tumor agresivo de piel. Estos resultados sin precedentes en pacientes con melanoma avanzado, dieron comienzo a una nueva era en la terapia del cáncer: «la era de la inmunoterapia». La utilización de anticuerpos monoclonales neutralizantes de CTLA-4 fue aprobada por las autoridades regulatorias en el año 2011 para el tratamiento de melanoma metastásico. Si bien esta terapia fue exitosa sólo en un 30% de los pacientes, las respuestas obtenidas en aquellos individuos que respondieron al tratamiento fueron sumamente duraderas.

De hecho, aproximadamente el 22% de los pacientes con los que se hicieron los primeros ensayos clínicos, se mantuvieron libres de enfermedad por más de 10 años. Los efectos adversos de esta terapia se hallan relacionados con la activación sostenida de linfocitos T, por lo cual algunos pacientes pueden experimentar eccemas en la piel, irritación intestinal y problemas hormonales. Estos síntomas indeseados son consecuencia de la inflamación exacerbada y daño de tejidos mediado por la respuesta inmunológica descontrolada que comienza a reaccionar contra el propio organismo. Sin embargo, estos efectos adversos, a diferencia de una enfermedad autoinmune clásica, pueden revertirse con el cese de la terapia y controlarse con la administración de corticoides u otros agentes inmunomoduladores. En función de estos descubrimientos, la Academia Sueca otorgó a James Allison el Premio Nobel en Medicina en el año 2018.

En 1992, el investigador japonés Tasuku Honjo descubrió que la proteína PD-1, originalmente relacionada al proceso de muerte programada de linfocitos T (de allí su nombre, *Programmed Cell Death Protein-1*), era una molécula co-inhibitoria presente en la superficie de linfocitos T, que actúa como receptora de señales. A principios del año 2000, en colaboración con Tasuku Honjo, los investigadores Arlene Sharpe, Gordon Freeman y Lieping Chen encontraron que las células tumorales expresaban moléculas capaces de interactuar con PD-1, a los que llamaron PD-L1 y PD-L2 (la L se refiere a «ligando», que es la manera en la que llamamos a las moléculas que son reconocidas por proteínas receptoras como PD-1). Estas moléculas funcionan como el pie que pisa el freno para desactivar a los linfocitos T, evitando que estos eliminen al tumor. Es decir, cuando un linfocito T reconoce a una célula maligna, ésta es capaz de apagarlo mediante la interacción PD-L1 y 2 con PD-1. Muy rápidamente se demostró que el bloqueo de la interacción entre PD-1 y PD-L1 era efectivo en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

Si bien el bloqueo de CTLA-4 fue el puntapié inicial que demostró los beneficios clínicos de la inmunoterapia en pacientes por inhibición de moléculas co-inhibitorias (llamados actualmente puntos de control inmunológico), hoy en día su uso es más limitado que el

bloqueo de PD-1. Por lo tanto, y dado que el bloqueo de PD-1 permitió la inhibición del crecimiento y metástasis en numerosos tipos de cáncer, se convirtió en la estrategia de inmunoterapia por excelencia en un gran número de tumores. El descubrimiento de PD-1 y su función co-inhibitoria le confirió a Tasuku Honjo el honor de recibir el Premio Nobel en Medicina junto a su colega James Allison en 2018.

En los últimos años, una variedad creciente de moléculas co-activadoras y co-inhibidoras han sido descubiertas, caracterizadas e incluso algunas de ellas están siendo contempladas como nuevos blancos de inmunoterapias. Tim-3, LAG-3, TIGIT, CD73, VISTA e IDO son algunas de las moléculas en estudio para diferentes tipos de cáncer. El desarrollo de anticuerpos o agentes capaces de bloquear las señales con las que el tumor apaga al sistema inmune, permitiría que nuestras defensas se activen y reduzcan o eliminen al tumor (Figura 6). Muchos de estos descubrimientos y desarrollos están siendo actualmente analizados en ensayos clínicos, demostrando diferentes grados de eficacia en los tratamientos.

GALECTINAS: NUEVOS BLANCOS TERAPÉUTICOS EN CÁNCER

En las secciones anteriores describimos la función de receptores inhibitorios producto de la expresión regulada de diversos genes en el microambiente tumoral, que al contactar con sus ligandos o interactores proteicos, desencadenan señales negativas sobre la activación y proliferación de linfocitos T. Sin embargo, existen vías alternativas de regulación que se basan en el reconocimiento entre proteínas y glicanos (azúcares). Los glicanos forman parte de muchas proteínas (glicoproteínas) y de grasas o lípidos (glicolípidos), presentes en la membrana celular y en el exterior de las células. La combinación de las distintas estructuras de glicanos asociados a las proteínas de la superficie de los linfocitos T, influyen sobre su destino, ya sea su activación, diferenciación, migración e incluso su muerte. Este proceso de reconocimiento es mediado, al menos en parte, por proteínas que las células tumorales y aquéllas que las rodean liberan a su entorno, denominadas galectinas. El protagonismo de las galectinas en la

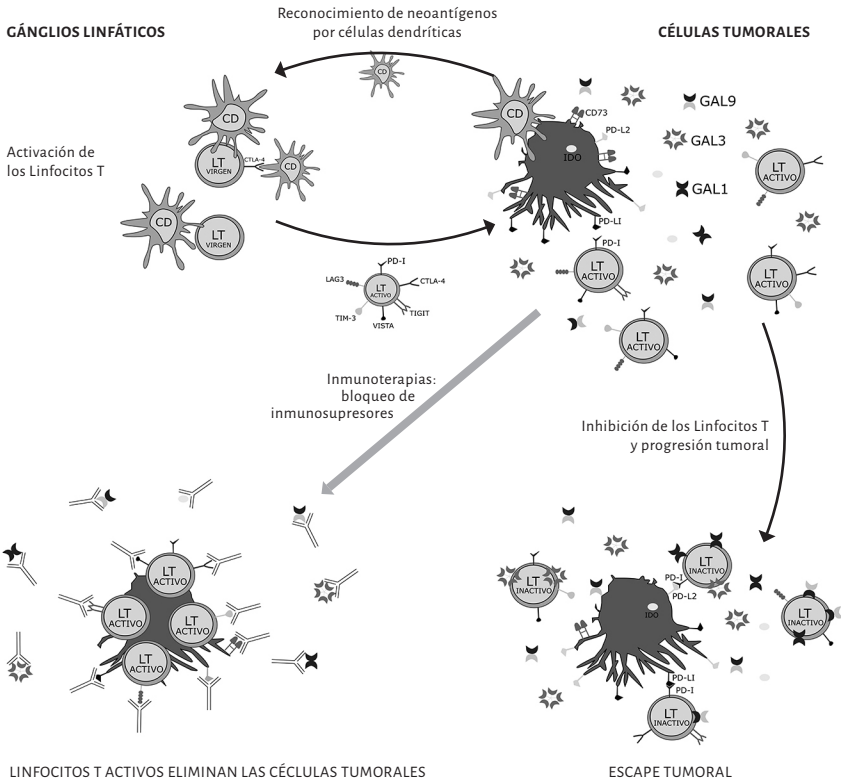


FIGURA 6. Mecanismos de escape tumoral en cáncer. El microambiente de las células tumorales despliega una variedad de estrategias de escape a través de la expresión de moléculas inhibitorias (PD-L1/2, CD73, IDO, VISTA, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT) que inducen la inhibición de los linfocitos T (LT), y modulan la actividad de diversas células de la defensa que no se incluyeron en la figura. En su conjunto, estos eventos inmunosupresores favorecen el crecimiento y progresión de tumores. Las células dendríticas (CD) reconocen los neoantígenos de las células tumorales y viajan a los ganglios linfáticos donde activarán a los linfocitos T. A su vez, la expresión de CTLA-4 en los linfocitos T presentes en los ganglios linfáticos inhibe su activación. Las galectinas se suman como nuevos puntos de control capaces de inhibir la eficacia de la respuesta antitumoral. Las inmunoterapias se basan en el bloqueo de los inmunosupresores haciendo uso de anticuerpos específicos. De esta manera, los linfocitos T permanecen activos y capaces de eliminar las células tumorales.

progresión y el escape tumoral ha sido establecido en numerosas publicaciones y validado en distintos tipos de cáncer como melanoma, linfoma Hodgkin, neuroblastoma, cáncer de mama, pulmón y páncreas. Aunque existen 15 miembros en la familia de las galectinas, 3 de ellos juegan un papel relevante en el escape tumoral: la galectina-1, la -3 y la -9. Del mismo modo que las moléculas co-inhedoras citadas previamente, las galectinas liberadas por el tumor son capaces de suprimir la respuesta inmunológica utilizando distintas estrategias. Galectina-1 se une a ciertas glicoproteínas de los linfocitos T activados, promoviendo su disfunción. Tanto galectina-1 como galectina-9 promueven la muerte selectiva de algunos linfocitos T, involucrados también en patologías autoinmunes, además de favorecer el escape tumoral. Por otro lado, se ha demostrado que galectina-1 es capaz de unirse a otras células de defensa (células dendríticas), haciéndolas más tolerantes ante el reconocimiento de neoantígenos tumorales y facilitando fenómenos anti-inflamatorios y de inmunosupresión. El interés que cobraron las galectinas como nuevos blancos terapéuticos en cáncer, no sólo se debe a su capacidad inmuno-inhedoras, sino también a efectos independientes del sistema inmunológico, tales como angiogénesis tumoral (formación de nuevos vasos sanguíneos que nutren al tumor) y metástasis. En este sentido, observamos que galectina-1 promueve la resistencia a las terapias anti-angiogénicas convencionales contra el cáncer. De esta manera, el bloqueo de galectina-1 logró contrarrestar la resistencia a la terapia anti-angiogénica. Dado el papel protagónico de las galectinas en el crecimiento y progresión de tumores, su bloqueo mediante anticuerpos neutralizantes emerge como una posible estrategia terapéutica para enriquecer el panorama de los tratamientos actuales.

PERSPECTIVAS Y DESAFÍOS

La inmunoterapia ha generado una revolución en el tratamiento del cáncer. Las aplicaciones de estos nuevos tratamientos son muy prometedoras; sin embargo aún no se ha logrado que su eficacia clínica supere el 30-50 % de los pacientes tratados. En gran parte, esta

limitación radica en la complejidad del microambiente del entorno del tumor ya que, como describimos en este capítulo, existen numerosos genes involucrados en el escape inmunológico. De este modo, el bloqueo de mecanismos individuales de inmunosupresión puede llevar a la activación de otros mecanismos alternativos que le confieren al tumor una ventaja adaptativa. Los esfuerzos actuales se hallan destinados a dos objetivos fundamentales:

- a)** Determinar qué mecanismos de escape (genes inhibitorios diferencialmente expresados) se hallan presentes en tumores individuales de cada paciente y
- b)** Combinar el bloqueo terapéutico de dos o más puntos de control inhibitorios. Estos aspectos representan objetivos clave de lo que conocemos como «Medicina de Precisión», es decir, el diseño de un tratamiento específico para las características de cada paciente.

Desde nuestro equipo de trabajo proponemos, a través de la exploración de mecanismos celulares y moleculares involucrados en el efecto inmunorregulatorio de las galectinas, aportar conocimientos fundamentales que permitan el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas en cáncer y enfermedades autoinmunes. Nuestros resultados en modelos preclínicos demuestran que el bloqueo de galectina-1 potencia la respuesta inmunológica, inhibe programas de vascularización y suprime la progresión tumoral en un amplio espectro de tumores. La posibilidad de transferir estos hallazgos para el beneficio de pacientes, sólo será posible a partir del esfuerzo conjunto de investigadores y médicos, además de un Estado y una sociedad que apoyen la investigación básica y su conexión con la transferencia tecnológica y la salud pública.