

REEVALUACION DE LA INMUNOLOGIA TUMORAL

Símpoſio Internacional
Academia Nacional de Medicina
Buenos Aires, 27 agosto 1996

MEDICINA (Buenos Aires) 1996; 56: 85-88

DEBATE: Reevaluación de la inmunoterapia del cáncer

MELANOMA: MODELO Y OPORTUNIDADES PARA LA INTERVENCION INMUNOLOGICA

JOSE MORDOH

Instituto de Investigaciones Bioquímicas; Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires

Esta conferencia bien podría llamarse «No preguntemos qué puede hacer el sistema inmune por nosotros. Más bien preguntemos qué podemos hacer nosotros por el sistema inmune». Dentro de su inmensa complejidad, existen dos factores fundamentales para que el sistema inmunológico pueda cumplir adecuadamente su función: tiempo y cantidad. Cuando cualquiera de estos dos factores son insuficientes el sistema inmune colapsa. Y este colapso podría llevarnos a extraer conclusiones inadecuadas sobre la utilidad del mismo. En realidad, adelantos médicos fundamentales se han basado en «Hacer algo por el sistema inmune». Pensemos en la primera vacunación documentada, realizada por E. Jenner contra la viruela en 1798, y que culminó con la erradicación de esta enfermedad en 1980. Acaso, y a la luz de nuestros conocimientos actuales, ¿dicha vacunación y las múltiples que le siguieron contra otros agentes infecciosos no han tratado de «ganar tiempo» para que cuando el sistema inmune se enfrente con el real patógeno pueda responder en «tiempo y cantidad» adecuados? O acaso ¿el descubrimiento de la penicilina por Fleming, Florey y Chain en 1940, que revolucionó la terapia médica, y los antibióticos que le siguieron, no abrieron el camino a agentes que permiten «ayudar» al sistema inmune contra diversos agentes infecciosos, reduciendo su número hasta que sean manejables por el mismo?

Y para los que, en base a estos antecedentes, pudieran suponer que el sistema inmune no posee un rol de inmunovigilancia adecuado contra los agentes infecciosos, están las lecciones devastadoras del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) o las infecciones en pacientes neutropénicos para mostrarnos las consecuencias de un sistema inmune funcionalmente defectuoso.

¿Pueden extrapolarse estas reflexiones al rol del sistema inmune contra las enfermedades neoplásicas? Para tratar de responder algunas de las preguntas tomaré como modelo de estudio al melanoma, y mis conclusiones e interrogantes estarán basados en el análisis de aproximadamente 200 pacientes atendidos en el servicio. El melanoma cutáneo, tumor maligno de la piel que ocurre predominantemente en adultos, ofrece gran importancia médica debido a que se trata del cáncer cuya incidencia aumenta más rápidamente en la actualidad, calculándose que hacia el año 2000, 1 de cada 80 personas padecerá esta enfermedad en el transcurso de su vida. A este factor se unen su gran agresividad y la escasez de recursos terapéuticos eficaces una vez diseminado. La detección precoz y extirpación quirúrgica son herramientas fundamentales en el tratamiento del melanoma y constituyen un factor determinante de que el aumento de la curva de mortalidad sea menor que el de la curva de incidencia.

Melanoma e inmunidad

El melanoma primario es capaz de despertar una respuesta inmune, como se infiere por la re-

Dirección postal: Dr. José Mordoh, Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, Patricias Argentinas 435, 1405 Buenos Aires, Argentina

acción linfóide que suele acompañar dichas lesiones. Al respecto, está descrita una situación paradójica que consiste en la asociación de regresiones espontáneas parciales en la lesión primaria con un peor pronóstico global de la evolución de la enfermedad. La presencia de regresiones totales del tumor primario puede ser mayor a lo supuesto, ya que en nuestra serie de 200 pacientes tenemos aproximadamente 15% en los que el melanoma primario no pudo ser identificado. En contraposición, la capacidad de despertar reacciones inmunes «espontáneas» por parte del huésped se pierde en gran medida cuando el melanoma metastatiza. Si bien la regresión espontánea de lesiones metastásicas está descrita, nosotros sólo hemos tenido la oportunidad de analizar un caso con estas características que nos fuera remitido por el Servicio de Dermatología del Hospital Ramos Mejía. Es por lo tanto, un desarrollo extremadamente infrecuente. Aunque parcialmente comprendida, esta falta de respuesta inmune parece deberse a tres factores fundamentales: 1) escasa antigenicidad de los antígenos tumorales. Así por ejemplo, gangliósidos aberrantes como GM2 ó GD3, expresados fundamentalmente por el melanoma, no son antígenicos a menos que se los conjugue con carriers adecuados; esto es, se comportan como haptenos¹; 2) liberación por parte del tumor de sustancias inmunosupresoras, una de las cuales ha sido identificada en nuestro laboratorio y que impide la proliferación de células linfoides²; 3) pérdida de expresión, especialmente en el melanoma metastásico, del complejo MHC I (*Major Histocompatibility Complex I*), necesario para el reconocimiento de los antígenos por parte de los linfocitos citotóxicos CD8³.

¿El sistema linfóide puede reconocer y atacar las metástasis de melanoma? Este es un punto importante dado que numerosos ensayos terapéuticos se han basado en el aislamiento y amplificación de los linfocitos que infiltran las metástasis de melanoma, y que se denominan en sentido genérico TIL (*tumor infiltrating lymphocytes*). Los TIL pueden estar compuestos por linfocitos T citotóxicos (CTL) y células NK (*natural killer*). Los CTL desempeñan un papel importante en el rechazo de tumores inmunogénicos⁴. Para la activación óptima de CTL se requieren dos señales⁵. La primera señal está provista por la formación de un complejo trimolecular TCR (*T cell receptor*)

péptido-MHC entre las células T y los APC (*antigen presenting cells*) ó células dendríticas. La segunda señal es liberada a través de la interacción de moléculas co-estimuladoras. La familia B7 representa un grupo de moléculas co-estimuladoras expresadas constitutivamente en las APC y que interactúan con los ligandos naturales CD28 y CTL-4 en las células T⁶. Esta interacción determina una mayor estabilidad del mRNA para diferentes citoquinas, entre ellas IL-2 (interleuquina-2). Las células tumorales generalmente no expresan B7 y por lo tanto no son capaces de activar directamente CTL tumor específicos⁷.

A diferencia de los CTL, cuya actividad citolítica está restringida por el MHC, las células NK, cuyo fenotipo es CD3⁻ CD56⁺, no están sometidas a esta restricción. Cuando son incubadas en presencia de IL-2 en altas dosis, las NK proliferan y adquieren una actividad citolítica amplia, incluyendo la capacidad para lisis células NK resistentes y células tumorales recién aisladas. Los efectores que expresan esta actividad oncolítica impulsada por IL-2 han sido denominados células LAK (*lymphokine-activated killer cells*)⁸. Aunque la actividad citolítica activada por linfocinas fue primero descrita como la función expresada por cultivos heterogéneos de PBL activados por IL-2, parece ahora claro que las células LAK pueden ser derivadas de células NK⁹ o de células T CD3⁺ bajo condiciones adecuadas que incluyen incubación con IL-2, IL-12 o IL-15¹⁰.

Debemos ahora formularnos la pregunta de si los linfocitos son capaces de migrar espontáneamente a las metástasis de melanoma. Estudios efectuados por nuestro grupo demuestran que existe muy poca infiltración linfocitaria en el melanoma metastásico. Así por ejemplo, del análisis de 37 metástasis de melanoma con el objeto de caracterizar cuantitativa y cualitativamente la infiltración linfóide se observó que más del 90% de las mismas tienen escasa o nula infiltración linfóide (A.I. Bravo y J. Murdoh. Manuscrito en preparación). Debemos tener en cuenta, sin embargo, que en los raros casos en que la misma es intensa ello no garantiza necesariamente un buen pronóstico de la enfermedad. No obstante, la activación exógena del sistema inmune con modificadores biológicos como el interferon-alfa o la IL-2 puede conducir a respuestas clínicas significativas en melanoma metastásico. Es interesante destacar que estas respuestas van gene-

ralmente asociadas con la aparición de vitiligo, lo que indicaría que se ha desencadenado una respuesta inmune dirigida contra antígenos también expresados por melanocitos normales.

Es fundamental enfatizar que el nivel de la respuesta inmune será tanto más eficaz cuanto mayor sea la relación «células inmunológicas efectoras —células tumorales». El objetivo de lograr una relación adecuada sólo puede lograrse induciendo una respuesta inmune eficaz cuando las células tumorales se hallan aún en forma de metástasis subclínicas ó micrometástasis. Dicho en otros términos, se trata de que la activación del sistema inmune gane una carrera contra el tiempo a la proliferación del melanoma. Este es el objetivo principal de las vacunas anti-melanoma, cuya utilización por el momento está restringida a pacientes con estadio III (enfermedad loco-regional) libres de enfermedad detectable luego de la cirugía. Aún entonces, y dependiendo del número de ganglios afectados, estos pacientes son de alto riesgo ya que la probabilidad de recurrencia oscila entre el 40% y más del 80%.

El objetivo principal de la vacunación es lograr en el período libre de enfermedad una inmunización eficaz del huésped induciendo una respuesta humoral (anticuerpos) y celular (clones citotóxicos de linfocitos T) en cantidad suficiente como para neutralizar el crecimiento de las células de melanoma que puedan estar diseminadas. ¿Cuáles serán las estrategias para aumentar *in vivo* la respuesta inmune específica contra los antígenos tumorales? Existen distintos tipos de vacunas en las que siempre se asocian antígenos tumorales con inmunoestimulantes inespecíficos como la BCG o el QS21, extraído de la planta *Quillaja Saponaria Molina*. Con respecto a los antígenos tumorales utilizados, pueden ser *únicos*, como el gangliosido GM2 unido a una proteína carrier¹¹, o *múltiples*, como cuando se utilizan células heterólogas irradiadas^{12, 13}. En un estudio de Fasell no randomizado en 42 pacientes con melanoma estadio III (AJCC), hemos encontrado que la administración de vacunas compuestas por células heterólogas prolongó la mediana de la sobrevida libre de enfermedad de 7 meses para el grupo control a 23 meses para el grupo tratado ($p < 0,001$)¹³. Otra estrategia que se ha comenzado a utilizar recientemente es la de utilizar como vacuna péptidos tumorales. Estos

péptidos se asociarían a los MHC clase I de las APC y activarían clones específicos de CTL¹⁴.

El mecanismo de acción de este tipo de vacunas consistiría en la atracción de grandes cantidades de APC al lugar de inyección, donde digerirían las células tumorales, procesarían los antígenos tumorales y luego de migrar a los ganglios linfáticos regionales los presentarían en forma adecuada para generar CTL^{15, 16}.

Todas estas vacunas están siendo activamente ensayadas en protocolos clínicos y es aún prematuro determinar la estrategia que resultará más eficaz para impedir la proliferación del melanoma. Lo que parece seguro es que los resultados ya obtenidos sugieren que este será el camino para tratar en forma adyuvante esta enfermedad, y debe recalcarse que esta estrategia ya está siendo empleada en otros tumores tales como carcinomas de mama, colon, próstata y linfomas. En el caso del melanoma, el desarrollo de esta línea terapéutica es particularmente importante dada la escasa respuesta de este tumor a diversos agentes quimioterápicos.

Me referiré ahora a otro de los componentes del sistema inmune que está comenzando a demostrar actividad para el tratamiento de los tumores: los *anticuerpos monoclonales (AMC)*. En nuestro laboratorio hemos desarrollado una variedad de anticuerpos de los que mencionaré solamente dos ejemplos. Los AMC pueden utilizarse aislados o como vehículos de sustancias citotóxicas, tales como isótopos radioactivos. El AMC FC501, que reconoce el antígeno CD63, posee la capacidad de internalizarse rápidamente en las células, lo que lo hace sumamente útil para su uso como inmunoconjugado. Estudios preclínicos han demostrado su eficacia para retrasar muy significativamente el desarrollo del tumor mamario indiferenciado IIB-BR-G¹⁷. El AMC FC-215, en cambio, reconoce el antígeno sialil Lewis X (CD15) y es sumamente eficaz en presencia de complemento humano para lisar *in vitro* y en la circulación células tumorales que expresan este antígeno¹⁸ habiendo demostrado actividad clínica en un ensayo clínico de Fase I¹⁹.

Si anticuerpos con idéntica capacidad lítica sobre células de melanoma pudieran ser inducidos mediante vacunas en poblaciones de alto riesgo para el desarrollo de melanoma, estos anticuerpos podrían atacar las células de me-

lanoma en su «fase vulnerable», esto es, apenas penetren en la circulación linfática o sanguínea.

Como se desprende, mientras es evidente que el sistema inmune *per se* parece incapaz de controlar espontáneamente el desarrollo de los tumores, son muchas las oportunidades que sus distintos elementos nos ofrecen para el control del cáncer.

Bibliografía

- Helling F, Shang A, Calves M, et al. GD3 vaccines for melanoma: superior immunogenicity of Keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines. *Cancer Res* 1994; 54: 197-203.
- Morvillo V, Bover L, Mordoh J. Identification and Characterization of a 14 kDa Immunosuppressive protein derived from IIB-MEL-J, a human melanoma cell line. *Cell Mol Biol* 1996; 42: 779-95.
- Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y, Taubenberger J, Yannelli JR, Rosenberg SA: Loss of functional Beta₂-Microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 100-8.
- Melief CJM. Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. *Adv Cancer Res* 1992; 58: 143-75.
- Liv Y, Linsley PS. Costimulation of T cell growth. *Curr Opin Immunol* 1994; 4: 265-70.
- June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 1994; 15: 321-31.
- Chen L, Linsley PS, Hellstrom KE. Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today* 1993; 14: 483-6.
- Grimm EA, Mazunder A, Zhang H, Rosenberg SA. Lymphokine activated killer cell phenomenon. *J Exp Med* 1982; 155: 1823-41.
- Ortaldo JR, Mason A, Overton R. Lymphokine-activated killer cells: Analysis of progenitors and effectors. *J Exp Med* 1986; 164: 1193-1205.
- Patel SS, Thiele DL, Lipsky PE. Major histocompatibility complex-unrestricted cytolytic activity of human T cells = Analysis of precursor frequency and effector phenotype. *J Immunol* 1987; 139: 3886-95.
- Livingston PO, Wong GYC, Adluri S, et al. Improved Survival in Stage III melanoma patients with GM2 antibodies: A randomized trial of adjuvant vaccination with GM2 ganglioside. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1036-44.
- Morton DL, Foshaf LJ, Hoon DSB, et al. Prolongation of survival in metastatic melanoma after active specific Immunotherapy with a new polyvalent melanoma vaccine. *Ann Surgery* 1992; 216: 463-82.
- Mordoh J, Kairiyama C, Bover L, Bravo AI, Solarolo E. Heterologous cell vaccines prolong disease-free survival in stage III human melanoma patients: A non randomized phase II study (Manuscrito en preparación).
- Marchand M, Weynants P, Rankin E, et al: Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. *Int J Cancer* 1995; 63: 883-5.
- Huang AYC, Golumbeck P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H. Role of bone marrow derived cells in presenting MHC-I restricted tumor antigens. *Science* 1994; 264: 261-965.
- Maass G, Schmidt W, Berger M, et al. Priming of tumor-specific T cells in the draining lymph nodes after immunization with interleukin 2-secreting tumor cells: Three consecutive stages may be required for successful tumor vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5540-4.
- Barrio M, Castiglia S, Mordoh J. (Manuscrito en preparación).
- Ballaré C, Barrio M, Portela P, Mordoh J. Functional properties of FC-2.15, a monoclonal antibody that mediates human complement cytotoxicity against breast cancer cells. *Cancer Immunol Immunoth* 1995; 41: 15-22.
- Mordoh J, Silva C, Albarellos M, Bravo AI, Kairiyama C. Phase I Clinical Trial in Cancer Patients of a New Monoclonal Antibody FC-2.15 Reacting with Tumor Proliferating Cells. *J Immunoth* 1995; 17: 151-60.