

Células Natural Killer: ¿Una nueva vía de inmunoterapia para el melanoma?

MARIANGEL ROCHA ALDANA¹, ORQUÍDEA LEONOR RODRÍGUEZ GARCÍA², ADRIANA FALCO¹,
LUCIBEL CRESPO¹, OSCAR REYES JAIMES¹.

Resumen:

El melanoma es un tumor maligno originado en los melanocitos. Representa el 4% de todos los tumores malignos de la piel y es responsable del 80% de todas las muertes por cáncer de la piel. En las últimas décadas su incidencia ha aumentado considerablemente en el mundo, convirtiéndose en un problema de salud pública. Es por ello que se buscan alternativas de tratamiento novedosas como lo es la inmunoterapia con células Natural Killer (NK). Las células NK son miembros de las células inmunes innatas y están dotadas de una potente actividad citolítica contra los tumores, además actúan como células reguladoras del sistema inmunitario. En el melanoma las estrategias terapéuticas basadas en células NK, consisten en agregar estimulantes inmunes para producir efectos sinérgicos, realizar la transferencia adoptiva de células NK expandidas in vitro o modificadas genéticamente para que sean más fuertes y resistentes, y por último, la transferencia de nano vesículas secretadas por las células NK conocidas como vesículas extracelulares (EVs) que han cobrado atención por los efectos antitumorales mostrados en estudios preclínicos. Estas estrategias terapéuticas basadas en las células NK permiten superar la capacidad de las células tumorales de escapar de la vigilancia inmunológica con alta eficiencia y ausentes efectos adversos, por ahora probada en tumores hematológicos, por lo cual, se convierten en una posible terapia prometedora para el tratamiento del melanoma y otros tipos de tumores sólidos.

Palabras clave: Melanoma, Inmunoterapia celular, células Natural Killer, estimulantes inmunes, vesículas extracelulares.

Natural Killer Cells: A New Route of Immunotherapy for Melanoma?

Summary

Melanoma is a malignant tumor that originates from melanocytes. This entity represents 4% of all malignant skin tumors, and is responsible for 80% of all skin cancer deaths. In recent decades, its incidence has increased considerably in the world, becoming a public health problem. That is why alternatives are sought for novel treatments such as immunotherapy with Natural Killer cells (NK). NK cells are members of the innate immunity, and are endowed with a powerful cytolytic activity against tumors. Also, they act as regulatory cells of the immune system. In melanoma, the therapeutic strategies based on NK cells consist of adding immune stimulants to produce synergistic effects on cells, and then perform an adoptive transfer of NK cells that were expanded in vitro or genetically modified to make them stronger and more resistant. Lastly, the transfer of nanovesicles secreted by

-
1. Médico Dermatólogo. Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit". Universidad Central de Venezuela
 2. Licenciada en Bioanálisis, Docente e Investigador. Laboratorio de Biología Molecular y Celular. Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit". Universidad Central de Venezuela

Autor para correspondencia:
Mariangel Rocha-Aldana.
e-mail: mariangel203@gmail.com

Recibido: 30/07/2021
Aceptado: 05/08/2021

NK cells known as extracellular vesicles (EVs). These vesicles have gained attention for antitumor effects shown in preclinical studies. These therapeutic strategies based on NK cells allow to overcome the capacity of tumor cells to escape immunological surveillance with high efficiency and lack of adverse effects. At present, they have been proven in hematological tumors, thus, becoming a promising potential therapy for the treatment of melanoma and other types of solid tumors.

Keywords: Melanoma, Cellular immunotherapy, Natural Killer cells, immune stimulants, extracellular vesicles.

Introducción

El melanoma es un tumor maligno originado en los melanocitos. Representa sólo 4% de todos los tumores malignos de la piel pero es responsable, aproximadamente, de 80% de todas las muertes por cáncer de la piel¹. Las primeras descripciones de la enfermedad se remontan al siglo V a.C. y se atribuyen a Hipócrates cuando hacía referencia a un «tumor negro fatal». Las aportaciones de los primeros observadores fueron muy valiosas, pero fue en el siglo XIX cuando se puntualizaron los conceptos y principios básicos que perduran hoy día como la relación con ciertas características fenotípicas, potencial hereditario, importancia de la remoción quirúrgica del tumor en fases tempranas y la diseminación a partir de la lesión primaria². Su incidencia ha aumentado a nivel mundial y se ha convertido en un problema de salud pública. Según la Fundación de Cáncer de Piel el 20% de los estadounidenses desarrollarán cáncer de piel³, y la Sociedad Americana contra el Cáncer estimó que para el año 2020 en Estados Unidos se reportarán 100.350 nuevos casos de melanoma y 6.850 morirán a causa de este cáncer, recordando que el riesgo de padecerlo aumenta hasta en un 2,6% de acuerdo al fototipo cutáneo. Sin embargo, la detección precoz marca la diferencia en el 99% de los casos, en Estados Unidos la tasa de supervivencia es de 5 años cuando el melanoma se detecta de forma temprana, baja al 65% si la enfermedad llega a ganglios linfáticos y al 25% si se propaga a órganos distantes⁴. Existen diversos tratamientos para este proceso maligno, dentro de la más novedosas y prometedoras se encuentra la inmunoterapia; tratamiento basado en la activación o inhibición del sistema inmunitario (SI), de forma que éste sea capaz de combatir la enfermedad, a través de sustancias producidas por el cuerpo

humano o fabricadas en el laboratorio. Los avances pioneros en esta terapia han llevado a un progreso significativo en el tratamiento de pacientes con melanoma avanzado, y ha transformado por completo nuestra visión sobre el tratamiento del cáncer, ya que este enfoque terapéutico conduce a respuestas duraderas en pacientes con diferentes tipos de tumores. Las inmunoterapias actuales se basan en un bloqueo de los reguladores negativos del sistema inmunitario adaptativo (puntos de control inmunitario) que liberan respuestas de células T CD8 anticancerígenas. Durante los procesos de inmunoección, las células cancerosas desarrollan numerosas estrategias para evitar ser reconocidas por las células T CD8, sin embargo, estos cánceres pueden ser atacados por células Natural Killer (NK)⁵, es por ello que nos proponemos estudiar la aplicación de las células NK como nuevos enfoques de la inmunoterapia contra el melanoma.

1. Las Células Natural Killer (NK): características, tipos y funciones

Las células NK, identificadas por primera vez en 1975 son abundantes en la piel y se consideran la subpoblación de células inmunes más efectiva para controlar y eliminar las células enfermas in vivo⁶. Como miembros de las células linfoides innatas (ILC) juegan un papel crítico en la defensa temprana del huésped contra los patógenos invasores y las células transformadas. Actúan como las primeras células efectoras dentro del sistema inmunitario innato con respuesta antitumoral, comprendiendo entre el 10 y 15% de los linfocitos circulantes. Se definen fenotípicamente por la expresión de la glicoproteína CD56 y la falta de CD3⁷.

Tipos de células NK

Las células NK se distinguen en dos grupos funcionalmente distintos, de acuerdo a la densidad de expresión del CD56 en su superficie: NK CD56 "bright" y CD56 "dim".

Las NK CD56 dim representan el 90% de las células NK circulantes, son de baja proliferación, producen pocas citocinas pero están equipadas con una fuerte capacidad citotóxica. La muerte de las células objetivo ocurre a través de la liberación de perforina y granzimas: la primera causa la perforación de la membrana de la célula objetivo, lo que permite que la última ingrese a la célula e induzca la apoptosis. Otros mecanismos de destrucción incluyen las interacciones entre los receptores de muerte expresados en las células objetivo y los ligandos correspondientes expresados en células NK, y el de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por el receptor de membrana altamente expresado CD16, que reconoce la porción Fc de los anticuerpos IgG.

Las CD56 bright corresponden al 10% restante de células NK circulantes, tienen una expresión baja o ausente de CD16, son poco citotóxicas pero más proliferativas y ejercen una función inmunomoduladora a través de la secreción de citocinas como interferón (IFN) γ , factor de necrosis tumoral β , factor de estimulación de colonias de macrófagos de granulocitos, IL-10 e IL-13⁷.

Funciones

Las células NK utilizan un conjunto de receptores activadores e inhibidores para ejercer sus funciones. Los inhibidores (KIR / CD158, NKG2A / CD159a, NKG2C / CD159c) para detener la destrucción de células intactas, y los activadores (NKG2D / CD314, NCR, DNAM1 / CD226, CD16) que inician la respuesta inmune contra el cáncer y células infectadas por virus, siendo uno de los principales activadores el receptor NKG2D, involucrado en la lisis mediada por células NK⁵. Este grupo de receptores le permite reconocer la expresión de proteínas alteradas para luego destruir células estresadas como melanocitos premalignos y desarrollar una respuesta antitumoral dentro del microambiente tumoral (TME) antes de que aparezca el melanoma clínico, sin la necesidad de sensibilización previa a antígenos específicos. En la piel, las células NK contribuyen a la reparación de tejidos y la homeostasis, además tienen un papel clave en el

sistema inmunitario de defensa innata y en la vigilancia inmune del cáncer. Estas células también eliminan selectivamente las células madre tumorales, reduciendo el tamaño del tumor y retrasando la progresión metastásica⁷. Reconocen y eliminan células anormales que carecen de restricción de MHC I como las células del melanoma o sin sensibilización previa. Esta característica de las células NK es extremadamente relevante para la terapia del cáncer cuando se considera la alta frecuencia de tumores defectuosos. Al formar sinapsis inmunes con células diana, las NK liberan gránulos citolíticos preformados, que incluyen perforina y granzimas, cuya función es inducir la lisis celular, sin embargo, los cánceres emplean diversas tácticas para retrasar, alterar o incluso detener la inmunidad antitumoral, lo que lleva a fallas en el control del crecimiento tumoral⁶.

2.-Interacción molecular entre el sistema inmunitario (SI) y el cáncer

El sistema inmunitario (SI) tiene la capacidad de reconocer y eliminar antígenos (por ejemplo virus, bacterias), células tumorales antes de que crezcan y eliminar tumores ya formados, lo que se define como vigilancia inmunológica, pero también puede reconocer lo propio, ya que las células de cada individuo expresan antígenos en su superficie como marcas de identidad, y esto se conoce como tolerancia inmunológica⁸.

Durante la progresión del tumor, el SI juega un doble papel debido a una interacción dinámica entre las células inmunes y malignas caracterizadas por tres fases diferentes: eliminación, equilibrio y escape⁹. Las células tumorales expresan antígenos de superficie y antígenos secretados, denominados antígenos asociados a tumor. Estos son reconocidos como extraños por el SI, debido a que cuando las células normales se convierten en células cancerosas, algunos de los antígenos de su superficie cambian o mutan, haciéndolos reconocibles por el SI como antígenos extraños. La identificación de estos antígenos ha sido fundamental para entender como ocurre el reconocimiento de los tumores por el SI, para desarrollar estrategias que permitan modular las respuestas inmunes para atacar el cáncer. Es así como el SI realiza constantemente una vigilancia en todo el cuerpo para detectar la aparición de células tumorales anómalas, destruirlas y eliminarlas antes de que continúe creciendo un tumor¹⁰. Si bien este proceso ocurre constantemente en nuestro organismo, muchas veces no ocurre en forma

eficiente. El SI puede reconocer y eliminar de manera natural las células tumorales, ejerciendo cierta presión selectiva que los tumores deben evadir para poder crecer, sin embargo, la teoría de la inmunoedición propone un proceso de 3 fases: a) Eliminación, mediante la cual el SI puede reconocer y deshacerse de las células tumorales recientemente originadas; b) Equilibrio, donde el SI puede seleccionar y/o promover variantes de células tumorales que sobrevivan al control inmunológico, y c) Escape, en la cual el tumor, a través del desarrollo de mecanismos de resistencia, puede evadir la respuesta inmunitaria¹¹.

La mayoría de los tumores sólo expresan una baja cantidad de antígenos que pueden ser reconocidos como extraños, de modo que la capacidad de inducir una respuesta inmune potente tiende a ser escasa. Por otro lado, el rápido crecimiento y propagación de los tumores muchas veces sobrepasan la capacidad del SI para erradicar todas las células tumorales, y para el control efectivo del tumor se requiere que todas las células neoplásicas sean eliminadas. Los tumores disponen de mecanismos especializados para evitar las respuestas inmunes del organismo (evasión inmune por los tumores), como por ejemplo: 1) Las células tumorales disminuyen o no expresan antígenos en su superficie, impidiendo el reconocimiento por parte de las células del sistema inmunitario, 2) Secreción de sustancias que disminuyen el funcionamiento del SI, incapacitando a los linfocitos para actuar, 3) El tumor puede crecer sin generar inflamación; provocando que no exista ninguna señal de

peligro que indique la presencia de una enfermedad; cuando ocurren estos mecanismos, la respuesta inmune es de tipo tolerogénica con respecto al tumor¹⁰. 4) Reclutamiento de células al sitio del tumor y supresión de la respuesta antitumoral, el tumor genera factores inmunosupresores como TGF- β , VEGF, IL-6 o IL-10 que induce la movilización de células de fenotipo y actividad supresora como los linfocitos T reguladores, células mieloides supresoras, células dendríticas tolerogénicas y los macrófagos asociados al tumor. Estas células pueden inhibir la proliferación de linfocitos T específicos del tumor, inducirlos a un estado de anergia o conducirlos a la apoptosis a través de distintos mecanismos como la secreción de TGF- β o prostaglandina-E2, entre otros¹¹ (Figura 1).

Como ya fue mencionado el SI tiene la capacidad de evitar el ataque a las células normales del cuerpo, y para ello utiliza proteínas presentes en las células inmunitarias que necesitan ser activadas (o desactivadas) para iniciar una respuesta inmunitaria, por lo cual son denominadas "puntos de control". Dentro de estas proteínas tenemos el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4): regulador negativo de la respuesta inmune, que inhibe la preparación y activación de linfocitos T a nivel central y la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) receptor inhibitorio que se expresa en linfocitos T activados, linfocitos B y NK en el momento de una respuesta efectora en curso. En ocasiones, las células del melanoma usan estos puntos de control para evitar ser atacadas por el sistema inmunitario convirtiéndose en otro punto de evasión por parte del tumor¹².

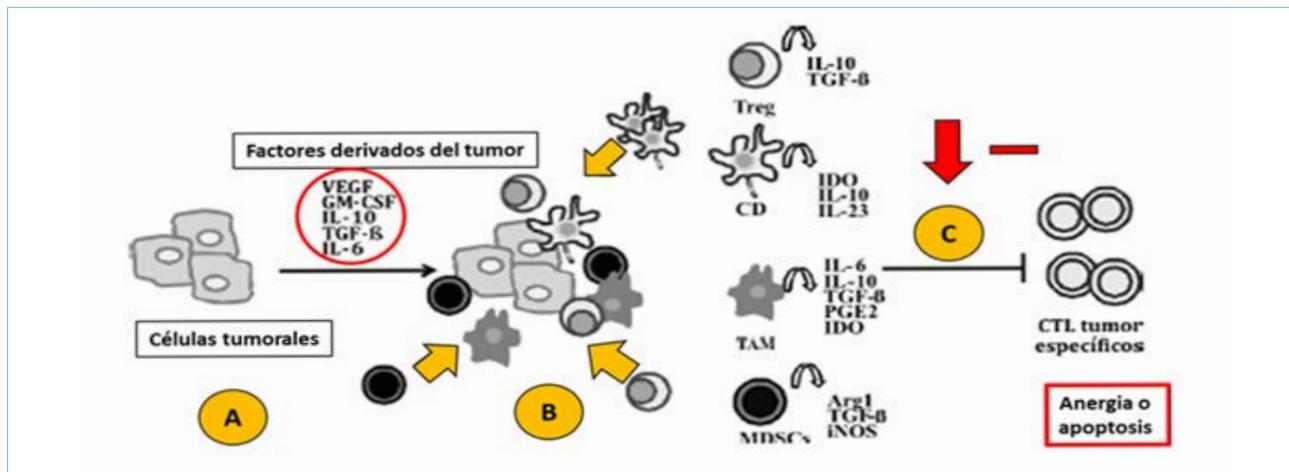


Figura 1. Reclutamiento de células al sitio del tumor y supresión de la respuesta antitumoral. A.- Producción de factores inmunosupresores: TGF- β , VEGF, IL-6 o IL-10 por parte del tumor. B.- Movilización de células de fenotipo y actividad supresora: linfocitos T reguladores, mieloides supresoras, células dendríticas tolerogénicas y macrófagos asociados al tumor. C.- Estas células pueden inhibir la proliferación de linfocitos T específicos del tumor, inducirlos a un estado de anergia o apoptosis a través de distintos mecanismos como la secreción de TGF- β , IL-6, IL-10, IL-13, IL-23, prostaglandina-E2 (PGE2) o la expresión de enzimas como IDO, arginasa 1 o iNOS.

Adaptado de Malvicini M, Puchulo G, Matar P, et al. Medicina; 2010;70:565-570

Influencia del microambiente tumoral (TME) del melanoma sobre la función de las NK.

En la mayoría de los tumores sólidos, las respuestas de las células NK son en gran medida ineficaces, posiblemente debido a dos factores diferentes: el TME supresor influye negativamente en la disponibilidad de células NK totalmente competentes en el sitio del tumor, y la persistencia del tumor que promueve la inmunoeedición.

La frecuencia de células NK es generalmente baja con respecto a los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), y las mismas se agrupan alrededor del estroma, sin interacción con células malignas. Además, las células NK de pacientes con cáncer a menudo muestran un fenotipo alterado que se debe a los mecanismos de supresión inducidos por el tumor y se asocia con la progresión del cáncer⁷.

Las evidencias acumuladas indican que TME produce moduladores solubles que regulan negativamente la maduración, la proliferación y la función efectora de las células NK, uno de ellos es el TGF- β , citocina producida en el TME por las células tumorales y otras células del estroma siendo la principal citocina inhibitoria de las NK, limitando su citotoxicidad y función antimetastásica. Las plaquetas activadas en TME inhiben la citotoxicidad de NK, a través del desprendimiento y la transferencia de sus moléculas de MHC-I a células tumorales, los fibroblastos deterioran la capacidad de activación mediada por el receptor DNAM-1, reduciendo la actividad citolítica de las células NK y por último, la producción de prostaglandina E2 (PGE2) suprime selectivamente la función efectora de las células NK, y representa un regulador clave de la actividad de estas células¹³. Las células NK liberan IFN- γ e inducen la producción de PGE2 por las células de melanoma que inhibe la función de las células NK regulando negativamente la expresión de los receptores activadores, contribuyendo aún más al escape del tumor¹³.

Las células de melanoma humano pueden afectar directamente la expresión de los receptores activadores en las células NK a través de la modulación de sus ligandos afines. Paradójicamente, la sobreexpresión de ligandos activadores se ha demostrado como un mecanismo principal de regulación negativa. Los ligandos activadores también pueden desprenderse de la superficie celular en el TME.

Ambos procesos inducen la hiperactivación del receptor, lo que resulta en su desensibilización e internalización para prevenir el daño tisular. Esto a su vez provoca una fuerte reducción del potencial citotóxico de las células NK. De hecho, el aumento de los niveles del ligando NKG2D, ULBP2, en suero de pacientes con melanoma se ha correlacionado con el tamaño del tumor, la progresión de la enfermedad y el mal pronóstico. Además, en melanoma metastásico se expresan menos ligandos de NKG2D que sus contrapartes primarias, lo que deriva en una menor supervivencia⁷.

Inmunoeedición de melanoma mediada por células NK

En un estudio reciente, se describió un nuevo mecanismo de inmunoeedición por el cual las células de melanoma adquieren resistencia a las células NK activadas por interleucina (IL) -2. Primero se observó que en las lesiones de melanoma primario, había una infiltración de células NK bastante limitada. Con base en este hallazgo, se intentó reproducir esta situación in vitro. Establecieron co-cultivos de células NK de melanoma en proporciones E / T que reflejan infiltrados de células NK (es decir, proporciones bajas de células NK / tumor). Descubriendo que, después de una muerte inicial de células tumorales, las células NK y las células residuales de melanoma persistieron en equilibrio durante varios días. En línea con este descubrimiento, se observó que después de 2 días de co-cultivo, las células de melanoma aumentaron la expresión de moléculas HLA-I (clásicas y no clásicas) en la superficie celular y se volvieron resistentes a la muerte mediada por células NK. El aumento de la expresión de HLA-I fue consecuencia de la liberación de IFN- γ por las células NK tras la interacción con las células de melanoma. Además, el nivel de IFN- γ era proporcional a la fuerza de la estimulación de células NK inducida por melanoma. Dado que la adquisición del fenotipo resistente en las células de melanoma se correlacionó inversamente con la magnitud de la lisis inicial de las células tumorales mediada por NK, el aumento del potencial citolítico de las células NK (p. Ej. exposición a IL-15) podría superar parcialmente la resistencia de las células de melanoma. Curiosamente, la regulación positiva de la expresión de HLA-I en las células tumorales, si bien favorece la resistencia

a la muerte mediada por NK, puede aumentar la sensibilidad de las células de melanoma a las respuestas de las células T. Aunque esto puede ser cierto para las moléculas clásicas de HLA-Clase I, la regulación ascendente paralela de moléculas de HLA-I no clásicas (como ocurrió en el entorno experimental) puede afectar negativamente las respuestas de las células T. Además, como sugiere el estudio histológico y análisis de muestras de melanoma primario, la regulación al alza de HLA-I en realidad puede estar confinada al melanoma¹⁴⁻¹⁷ (Figura 2).

3.-La inmunoterapia como estrategia terapéutica contra el melanoma

La base de la inmunoterapia es la manipulación del sistema inmunitario para que se active contra los tumores, ésta aumenta la capacidad del cuerpo para combatir el melanoma y otros tipos de cáncer mediante el uso de versiones sintéticas de proteínas naturales del sistema inmunitario, o al permitir la liberación de células que atacan los tumores. La inmunoterapia actual del melanoma se basa en el uso de terapia de bloqueo de los llamados puntos de

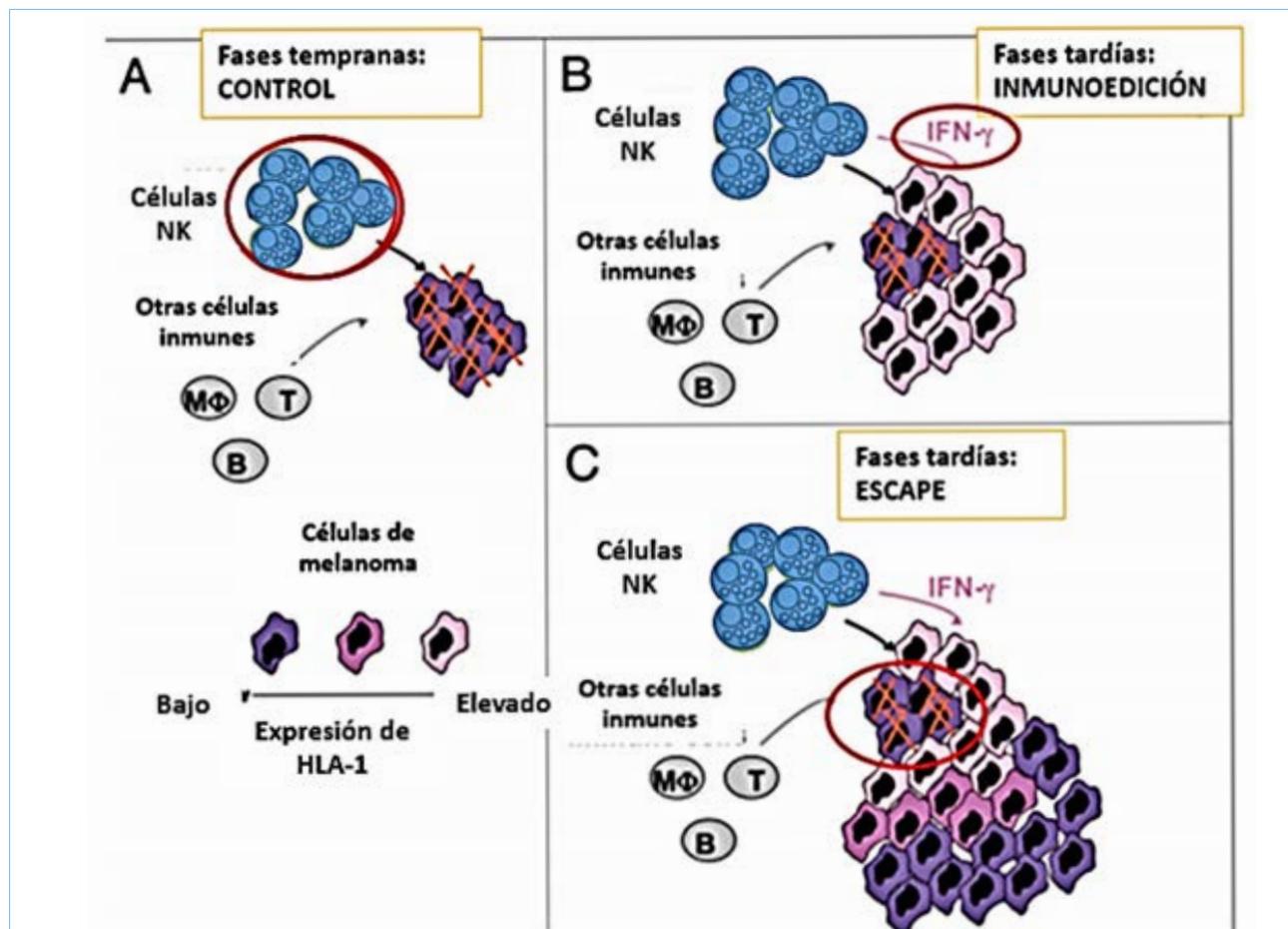


Figura 2. Inmunoedición de melanoma mediada por células NK. A.- Células NK en conjunto con otras células inmunitarias, controlan las primeras fases del crecimiento tumoral. B.- Bajo estímulo de citocinas proinflamatorias y la interacción con células diana, las células NK producen IFN- γ e inducen sobre regulación de HLA-I en células de melanoma. C.- Aumento de la proliferación de células de melanoma resistentes a las células NK, produce la disminución de las proporciones de células NK / células de melanoma.

Adaptado de: Balsamo M, Pietra G, Vermi W et al. *Oncoimmunology*. 2012; 1:1607–1609.

control inmunitario (Figura 3). Esta estrategia terapéutica tiene como objetivo liberar directamente la respuesta inmune antitumoral en lugar de atacar a las células cancerosas, superando la necesidad de identificar antígenos tumorales específicos pero generando una respuesta inmune específica. Los dos anticuerpos monoclonales (mAbs) de punto de control antiinmunitario ya utilizados en pacientes con melanoma son el Anti CTLA-4 (ipilimumab) y anti PD-1 (nivolumab). El ipilimumab fue uno de los primeros empleados en pacientes con melanoma, indujo un beneficio de supervivencia significativo, con un 15% de pacientes tratados que sobrevivieron más de 5 años, y una proporción de sobrevivientes a largo plazo mayor que los respondedores objetivos. En 2010, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos aprobó el ipilimumab para el tratamiento del melanoma avanzado como la primera terapia que demuestra un beneficio de supervivencia. El nivolumab ha sido el primer anticuerpo anti-PD-1 probado en pacientes con melanoma, mostrando tasas de respuesta objetiva rápida y duradera, con un 45% de los pacientes que respondieron, logrando una respuesta parcial o completa en 8 semanas y una duración media de respuesta de 104 semanas. Dado que diferentes puntos de control juegan diferentes roles en la regulación de la inmunidad y los tumores pueden suprimir el sistema inmune en varios niveles, es razonable especular que los

enfoques de inmunoterapia combinada serían más efectivos en comparación con las monoterapias, como por ejemplo la administración concurrente de ipilimumab y nivolumab con una reducción de la carga tumoral superior al 80%.

Considerando que no todos los pacientes responden a las inmunoterapias actuales y los efectos adversos severos que pueden ocurrir durante la terapia, surgen nuevas terapias como la inmunoterapia con células Natural Killer^{7,18-22} (Figura 4).

4.- Células NK como inmunoterapia contra el melanoma

Las inmunoterapias basadas en células NK se han utilizado ampliamente y con éxito para diferentes tumores malignos hematológicos, particularmente leucemia mieloide aguda y contra tumores sólidos con un éxito modesto^{23,24}. Sin embargo, los tumores sólidos continúan planteando desafíos terapéuticos únicos, y las terapias citorreductoras convencionales han demostrado tener una eficacia limitada, ya que escapan de la vigilancia inmunológica, proliferan rápidamente y hacen metástasis. Por otra parte, se suman las anomalías en las células NK, como la disminución de la expresión de los receptores de activación o la sobreexpresión de los receptores inhibitorios, disminución de la activación y

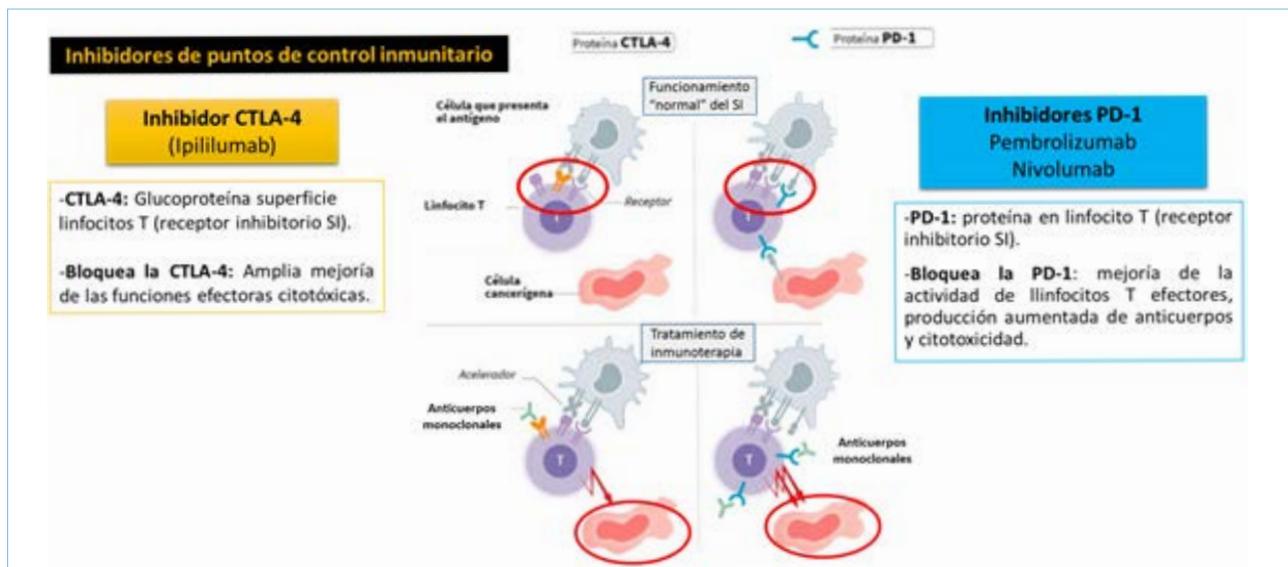


Figura 3. Inmunoterapia actual contra el melanoma

la persistencia, la producción defectuosa de citocinas, señalización intracelular anormal, el seguimiento ineficaz del sitio del tumor y la senescencia que resulta en una respuesta citolítica defectuosa. Todos estos factores son los principales contribuyentes a la pobre respuesta de las estrategias basadas en células NK contra tumores sólidos²⁵. Además, las células NK de pacientes con cáncer muestran fenotipo alterado, debido a los mecanismos de supresión inducidos por el tumor resultando en progresión del cáncer, esto puede implicar una baja regulación de los receptores de activación y / o una sobre regulación de los receptores inhibitorios. Esto se evidencia en pacientes con melanoma metastásico, donde las NK muestran un fenotipo con alta expresión de KIR, y baja regulación de los receptores de citocinas estimulantes, que dan como resultado defectos funcionales en su capacidad de proliferar, secretar citocinas y matar células diana, por lo que el objetivo de la inmunoterapia con NK es impulsar la activación inmune a través de estrategias que mejoren la cantidad y calidad de la respuesta inmune antitumoral^{6,7}.

Las estrategias terapéuticas basadas en las células NK para superar la resistencia en tumores sólidos son: 1) Transferencia de estimulantes inmunes para producir efectos sinérgicos, 2) Transferencia adoptiva de células NK expandidas in vitro o modificadas genéticamente para que sean más fuertes y resistentes y 3) Transferencia de vesículas extracelulares secretadas por las células NK⁶.

1) Transferencia de estimulantes inmunes:

Citocinas: se emplean citocinas que promuevan la supervivencia, la proliferación, la diferenciación y la activación de los linfocitos y mejoren la función antitumoral de las NK, como la IL-2 e IL-15. La IL-2 es una de las citocinas más utilizadas para aumentar la citotoxicidad de las células NK, sin embargo, una terapia con dosis altas de IL-2 conduce a efectos adversos graves como fugas vasculares y lesiones orgánicas causadas por la activación del endotelio vascular, donde se expresa el receptor de alta afinidad para IL-2 (IL-2Rabg). Los linfocitos T reguladores también expresan el IL-2Rabg, por lo cual, pueden inhibir la proliferación y citotoxicidad de las NK. Para superar estos efectos se desarrolló un nuevo mutante de IL-2 llamado "super-IL-2" con mayor afinidad por la subunidad IL-2 /15Rb presente en las células NK. También se probó una proteína de fusión recombinante compuesta por una proteína de unión a NKG2D codificada por el virus de la viruela que estimula de manera preferencial a las células que llevan NKG2D, sin activar células portadoras de IL-2Ra y no induce efectos secundarios en animales.

Una alternativa superior a IL-2 es la IL-15, que estimula preferentemente las células T CD8+ de memoria y células NK maduras e inmaduras. La IL-15 es la principal citocina involucrada en la citotoxicidad, la homeostasis y el desarrollo de células NK. En el primer ensayo clínico en el que se infundió IL-15 humana recombinante (IL15rh) a pacientes con neoplasias malignas metastásicas, se observó proliferación de células NK. ALT-803 es un superagonista de IL-15 diseñado para simular la típica presentación trans de IL-15 sin la participación de las células presentadoras de antígeno⁶, tiene una vida media mucho más larga que la IL-15rh (25 h vs <40 min), lo que puede conducir a un aumento de la ADCC.

Anticuerpos monoclonales (mAbs): para promover directa y/o indirectamente las funciones de las células NK in vivo y ayudar a redirigir su citotoxicidad.

a) El uso de anticuerpos específicos de tumor para mediar ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) de células NK a través de la unión de la parte Fc del mAbs antígeno asociado a tumor (TAA) y el receptor de activación CD16A expresado en la célula NK. b) La aplicación de mAbs enganchadores de células NK bi-específicos o tri-específicos (BiKEs o TriKEs) que contienen fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) contra los TAA y los receptores activadores de las células NK (CD16 o NKG2D) para crear una sinapsis inmunológica entre las células NK y célula tumoral, potenciando la actividad lítica y la liberación de citocinas de las células NK para atacar tumores. c) Los mAbs dirigidos a los puntos de control inmunológico para liberar la inhibición de células NK y aumentar la actividad antitumoral.

En conclusión, la administración de citocinas estimuladoras (IL-2, IL-15) y anticuerpos a pacientes desencadena la activación y expansión de las células NK autólogas y aumenta su citotoxicidad⁶.

2) Transferencia adoptiva de células NK:

La transferencia adoptiva de células NK autólogas expandidas ex vivo para el tratamiento de pacientes con linfoma, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de pulmón se ha probado en una variedad de ensayos clínicos observándose un efecto antitumoral muy limitado. La razón principal es que los receptores inhibidores en las células NK autólogas coincidían con MHC clase I propia presentada en las células tumorales, y estas señales de "auto" reconocimiento inhibieron posteriormente la activación de las células NK. Por lo anterior, se realizaron ensayos clínicos de tumores malignos hematológicos y tumores sólidos

(melanoma, neuroblastoma, cáncer de mama, ovario, carcinoma de células renales, colorrectal y hepatocelular), empleando como inmunoterapia: A.- Las células NK derivadas de PBMC aloreactivas. Estas células se obtuvieron de NK primarias de sangre periférica (PB), de una línea celular NK clonal (NK-92- aprobada por la FDA/EEUU), y células NK diferenciadas de células madre pluripotentes humanas (hPSC), incluidas las células madre / progenitoras hematopoyéticas (HSPC) de la sangre del cordón umbilical (UCB), las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) y los embrionarios humanos. Posteriormente estas NK expandidas se infunden a los pacientes directamente o junto con estimulantes inmunes con el fin de obtener una mayor actividad de destrucción tumoral. B.- Las células NK con modificación genética. A diferencia de las estrategias inoestimuladoras que implican el suministro de moléculas para ayudar a las células NK, las estrategias de modificación genética inducen cambios en la genética de las células NK directamente, lo que conduce a cambios prolongados y sostenidos en las células. Entre ellos, la modificación genética de las células NK para expresar receptores de antígeno quimérico (CAR) ha llamado cada vez más la atención. Los receptores de antígenos quiméricos son proteínas que permiten a las células T reconocer un antígeno en las células objetivo. Estas células modificadas se pueden producir a grande escala a partir de las diferentes fuentes de células NK mencionadas anteriormente, para transfundirse al paciente. CAR está compuesto principalmente por dominios extracelulares, de bisagra, transmembrana e intracelulares. El dominio extracelular puede unirse fuertemente a los antígenos asociados a tumores expresados en la superficie de las células tumorales, lo que determina su especificidad y facilita la lisis tumoral. Hasta la fecha, las células NK-CAR se han evaluado para el tratamiento de cánceres hematológicos y tumores sólidos en estudios preclínicos con muy buenos resultados.

La transferencia adoptiva de células NK con altos rendimientos y alta calidad es un enfoque directo y fundamental para reemplazar, restaurar y mejorar la función del SI a través de infusión de poblaciones de NK alogénicas activadas ex vivo o modificadas para que expresen el receptor de antígeno quimérico (CAR), demostrando que es una inmunoterapia celular prometedora contra los tumores⁵.

3) Transferencia de vesículas extracelulares (EV) secretadas por las células NK:

Las EVs se obtienen del medio de cultivo de células NK expandidas o células NK-CAR y luego se infunden al paciente. Las EVs son partículas liberadas por las células que están delimitadas por una bicapa lipídica, no pueden replicarse y

son producidas como mecanismo de comunicación paracrina/endocrina. Según su origen y tamaño se han diferenciado en exosomas (70-150 nm, origen endosomal) y microvesículas (150-1000 nm, originadas de la membrana plasmática). Las EVs transmiten señales biológicas reguladoras mediante la transferencia de proteínas de membrana y citosólicas, lípidos, DNA mitocondrial y genómico, RNA mensajero (RNAm) y microRNA (miRNA) que regulan diversos procesos fisiológicos⁶.

Las EVs derivados de células NK humanas (EVs NK) contienen marcadores típicos de NK (ej. CD56) y proteínas líticas (ej. FasL, perforina)¹²⁶. Fais y col. informaron que los EVs NK podrían desencadenar la muerte de las células diana mediante dos mecanismos distintos, incluidas las interacciones ligando-receptor y la fusión de la membrana plasmática²⁷. Los primeros estudios empleando EVs NK mostraron que aquellas provenientes del cultivo de células NK purificadas, tuvieron efectos citotóxicos sobre líneas celulares hematológicas malignas, pero no sobre células de tumores sólidos, sin embargo, las EVs NK obtenidas de células NK activadas y expandidas in vitro, mostraron efectos citotóxicos significativos sobre líneas celulares tumorales, neuroblastomas y carcinomas de mama; lo cual sugiere que las células NK activadas pueden producir EVs con mayor actividad inmunitaria en comparación con las células NK vírgenes. Investigaciones recientes en modelos de ratones han demostrado el efecto antitumoral de las EVs NK sobre el melanoma. Las EVs NK se aislaron por ultracentrifugación de un gradiente de densidad de una línea celular alogénica NK-92 y se inyectaron localmente en el melanoma, evidenciándose una inhibición significativa de la progresión del tumor^{6,26}. La capacidad para transferir cargas bioactivas (es decir, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas) a las células receptoras o activar vías de señalización en las células diana, hace que las EVs sean consideradas como alternativas potenciales a la terapéutica basada en células, con características posiblemente superiores a las células en algunos aspectos: el tamaño nanométrico de las EVs permite su difusión pasiva a través de los tejidos, el ambiente ácido de los tumores sólidos promueve la fusión entre EVs y las células tumorales (por lo tanto, se minimiza la inmunosupresión creada en el TME), la capacidad para atravesar barreras biológicas como la barrera hematoencefálica y la barrera hematotumoral, la fácil conservación, almacenamiento y acceso como suministro inmediato (estables a -80 ° C, y duran hasta 12 meses) todas estas grandes ventajas de esta terapia²⁶, las cuales han sido evidenciadas en estudios publicados recientemente donde establecen como objetivo mejorar las respuestas de los tumores, uno de ellos el melanoma, aumentando la actividad, especificidad y / o disminuyendo la supresión de las células NK con resultados satisfactorios^{28,29,30}.

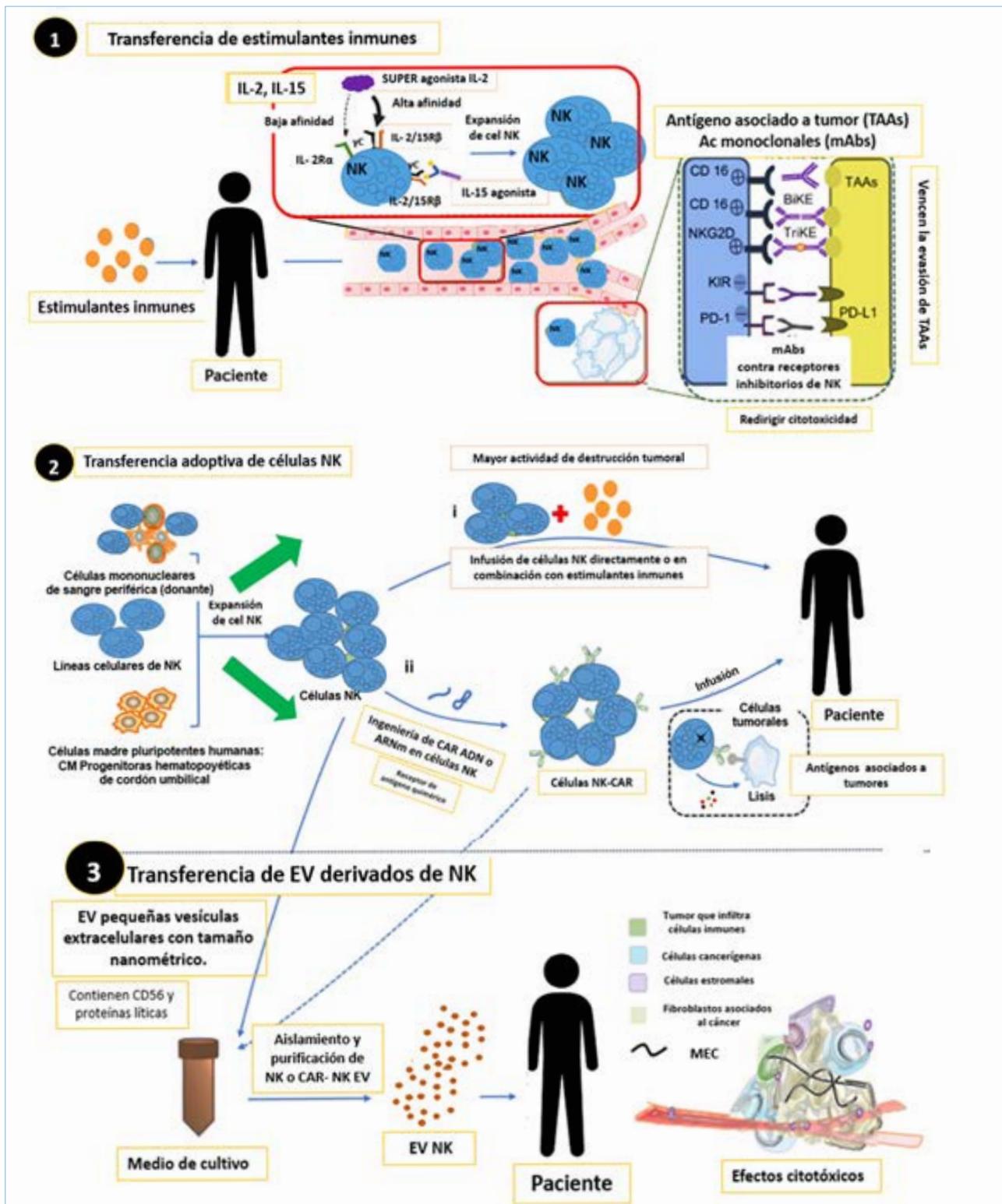


Figura 4. Estrategias terapéuticas basadas en células NK para superar la resistencia en tumores sólidos. Adaptación de Hu W, Wang G, Huang D, et al. Front Immunol. 2019; 1205:1-16.

Conclusiones

La inmunoterapia adecuada administrada en la fase apropiada de la progresión tumoral, tiene el potencial de modificar la respuesta inmune en el TME de un efecto protumoral a uno antitumoral. La eficacia de la inmunoterapia mediada por células NK puede potenciarse con múltiples estrategias basadas en sus propiedades biológicas, convirtiéndose en una terapia prometedora para el tratamiento del melanoma y otros tipos de cáncer, además, todos los enfoques para impulsar las funciones inmunitarias antitumorales basadas en las células NK derivan de su naturaleza homóloga que proporciona grandes ventajas para la traducción clínica de enfoques terapéuticos basados en ellas, como son las moléculas inmunoestimuladoras que pueden mejorar selectivamente la actividad de las NK, la transferencia adoptiva y enfoques para modificarlas genéticamente, son armas poderosas en la lucha contra el cáncer y por último, las vesículas extracelulares derivadas de las NK que son una estrella cada vez más en ascenso ●

Referencias

- 1 Acosta A, Fierro E, Velásquez V *et al.* Melanoma: patogénesis, clínica e histopatología. *Rev Asoc Col Dermatol.* 2009; 17:87-108.
- 2 Alonso CE, Salemi G. Breve historia del melanoma. De Hipócrates a Handley. *Med Cutan Iber Lat Am.* 2016; 44: 64-67.
- 3 Skin Cancer Foundation. Melanoma Overview. skincancer.org. [Internet]. [Consultado 3 Jul 2012]. Disponible en: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma/>
- 4 American Cancer Society. Key Statistics for Melanoma Skin Cancer. cancer.org. [Internet]. [Consultado 06 Jun 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html>
- 5 Urbonas V, Smalyte G, Urbonaite G *et al.* Natural killer cell-based immunotherapy: a new fighter against melanoma?. *Melanoma Res.* 2019; 29: 208-211.
- 6 Hu W, Wang G, Huang D *et al.* Cancer Immunotherapy Based on Natural Killer Cells: Current Progress and New Opportunities. *Front Immunol.* 2019; 1205:1-16.
- 7 Cristiani C, Garofalo C, Passacatini L *et al.* New avenues for melanoma immunotherapy: NK cells? NK cells and solid tumors immune therapy. *Scand J Immunol.* 2020; 91:128-161.
- 8 De Leon J, Joel, Pareja A. Inmunología del cáncer I: bases moleculares y celulares de la respuesta inmune antitumoral. *Horiz. Med.* 2018; 18: 80-89.
- 9 Jacobo VPM, Huerta J, Cravioto P. Interacciones entre el cáncer y el sistema inmunológico. *Alerg Asma Inmunol Pediatr.* 2017; 26: 56-63.
- 10 Agulera R. Sistema inmune y cáncer. *Cáncer online.* 2018. Disponible en: <http://canceronline.cl/2018/11/07/sistema-inmune-y-cancer/>
- 11 Malvicini M, Puchulo G, Matar P *et al.* Inmunoterapia del cáncer. Importancia de controlar la inmunosupresión. *Medicina.* 2010; 70:565-570.
- 12 American Cancer Society. Immunotherapy for Melanoma Skin Cancer. cancer.org. [Internet]. [Consultado 06 Jun 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-piel-tipo-melanoma/tratamiento/inmunoterapia.html>
- 13 Melaiu O, Lucarini V, Loredana Cifaldi L *et al.* Influence of the Tumor Microenvironment on NK Cell Function in Solid Tumors. *Front Immunol.* 2020; 3038:1-18
- 14 Balsamo M, Pietra G, Vermi W *et al.* Melanoma immunoediting by NK cells. *Oncoimmunology.* 2012; 1:1607-1609.
- 15 Jacobo P, Huerta J, Cravioto P. Interacciones entre el cáncer y el sistema inmunológico. *Alerg Asma Inmunol Pediatr.* 2017; 26:56-63.
- 16 Cutuli MT. La compleja interacción entre el sistema inmunitario y células tumorales. *Anales de la Real Academia de Doctores.* 2018; 3: 348-365.
- 17 Rondón-Mercado R, Mogollón N, Bonfante-Cabarcas R *et al.* Antígenos parasitarios de O-Glicosilación incompleta: Un enfoque inmunoterapéutico contra el cáncer. *Bol Mal Salud Amb.* 2014; 54:8-19.
- 18 ¿La inmunoterapia reemplazará un día la quimioterapia en la lucha contra el cáncer?. *El Universo* [Internet]. 2018 [citado 13 mayo 2020]; Disponible en: <https://www.eluniverso.com/larevista/2018/10/01/nota/6980879/inmunoterapia-reemplazara-dia-quimioterapia-lucha-contra-cancer/>
- 19 Freeman A, Vervoort S, Ramsbottom K *et al.* Natural Killer Cells Suppress T Cell-Associated Tumor Immune Evasion. *Cell Rep.* 2019; 28:2784-2794.
- 20 Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol.* 2020; 17:807-821.
- 21 Infantes S. Una de las mejores terapias contra el cáncer: la Inmunoterapia. *REDS.* 2016; 9: 93-106.
- 22 Prado G, Svoboda RM, Rigel DS. What's New in Melanoma. *Dermatol Clin.* 2019;37:159-168.
- 23 Dianat-Moghadam H, Rokni M, Marofi F, Panahi Y, Yousefi M. Natural killer cellbased immunotherapy: From transplantation toward targeting cancer stem cells. *J Cell Physiol.* 2018; 234:259-73.
- 24 Tallero R, Conti L, Lanzardo S *et al.* NK cells control breast cancer and related cancer stem cell hematological spread. *Oncoimmunology.* 2017; 6:1-11.
- 25 Nayyar G, Yaya Chu Y, Cairo M. Overcoming Resistance to Natural Killer Cell Based Immunotherapies for Solid Tumors. *Front Immunol.* 2019; 51:1-28.
- 26 Rodríguez OL. Vesículas extracelulares derivadas de Células Natural Killer: posible inmunoterapia contra el melanoma. *Piel-L.* 2020. Disponible en: <https://piel-l.org/blog/48464>
- 27 Fais S. NK cell-released exosomes: natural nanobullets against tumors. *Oncoimmunology.* 2013; 22:23-37.
- 28 Romee R, Maximilian Rosario M, Berrien-Elliott M, *et al.* Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Sci Transl Med.* 2016. 21; 8: 1-26.
- 29 Berrien-Elliott M, Romee R, Fehniger T. Improving natural killer cell cancer immunotherapy. *Curr Opin Organ Transplant.* 2015; 20: 671-680.
- 30 Quiroga V, Fernández L, Martín I *et al.* Kill the Killers: terapia con células Natural Killer en pacientes pediátricos con cáncer refractario. *Sanid mil.* 2012; 68:141-146.