

COMPARACIÓN DE MÉTODOS UTILIZADOS EN LA INMUNOTERAPIA CONTRA MELANOMA MALIGNO

Tutor: Flavio Salazar. A

Alumnos: José Vergara, Francisco Samaniego Michelle Meller, Agustín Sepúlveda.v

Introducción

El melanoma maligno es un tumor para el que no existen actualmente terapias efectivas. La inmunoterapia, es decir, la utilización del sistema inmune para destruir células tumorales, ha surgido y avanzado rápidamente en los últimos años como una opción de tratamiento.

El uso de células dendríticas cargadas con antígenos tumorales ha mostrado resultados promisorios. Sin embargo, el problema que se presenta actualmente es la fuente de antígenos asociados a tumor (AAT) a utilizar dado que no todos presentan el mismo potencial inmunogénico ni se encuentran en igual cantidad en todos los tumores. Se analizarán los distintos tipos de vacunas de células dendríticas y sus resultados clínicos e inmunológicos.

Melanoma Maligno

El cáncer constituye la principal causa de muerte en países desarrollados. En este contexto, el melanoma, tumor maligno originado de melanocitos cutáneos y células pigmentarias de iris y uvea [1], es la primera causa de muerte por cáncer de piel y su incidencia ha aumentado considerablemente en las últimas décadas [2]. En el mundo, cada año aparecen aproximadamente 160.000 casos nuevos de melanoma. Así en el año 2002 se registraron 160.177 casos nuevos, representando el 1.47% del total de casos de cáncer de ese año [11]. En Chile, las tasas de mortalidad aumentaron un 14% entre 1988 y 1998 y las tasas de incidencia se elevaron un 105% entre los años 1992 y 1998 [13].

La exposición a luz UV, a través del daño al DNA, alteración del sistema inmune y supresión de la inmunidad local, asociado a la susceptibilidad genética juega un rol fundamental en el desarrollo del melanoma.

A pesar de que en etapas tempranas el melanoma puede tratarse quirúrgicamente con un 95% de sobrevida, una vez que metastatiza es altamente resistente a los tratamientos convencionales de quimio y radioterapia, con una sobrevida media menor al 10% [2]. La ausencia de terapias efectivas y el hecho de que exprese múltiples antígenos reconocibles por el sistema inmune [9] han llevado a plantear diversas técnicas de inmunoterapia para combatirlo.

Células Dendríticas

Las células dendríticas (DC), células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales, son un elemento esencial para gatillar la inmunidad específica, ya que son capaces de presentar antígenos a linfocitos T e inducir su activación [1].

Corresponden a células derivadas de precursores hematopoyéticos de la médula ósea, que migran por el torrente sanguíneo para ubicarse en tejidos periféricos del organismo como DC inmaduras, es decir, con una alta capacidad fagocítica. Ahí capturan antígenos infecciosos o tumorales e inician un proceso de maduración; mientras van procesando el antígeno para expresarlo en moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), adquieren motilidad, comienzan a expresar moléculas coestimuladoras y migran hacia los órganos linfoides secundarios, donde darán señales de activación a los linfocitos T [1]. Sin embargo, esta acción dependerá del estado de maduración en el que se encuentre la célula dendrítica [2], así en ausencia de productos microbianos (PAMPS) o de señales de peligro (DAMPs) se mantienen en estado inmaduro expresando

bajas cantidades de moléculas coestimuladoras y en este estado la interacción con un linfocito T inducirá, por el contrario, anergia [3].

Por su función de CPA, las DC constituyen una herramienta fundamental en la inmunoterapia contra el cáncer ya que son capaces de capturar antígenos asociados a tumor (AAT) y presentarlos a linfocitos T en el contexto MHC adecuado para que éstos monten una respuesta específica contra dichos antígenos y en definitiva contra el tumor que primariamente los expresa [2].

En base a lo anterior, es posible cargar DC con antígenos tumorales y administrarlas a modo de vacuna para lograr que éstas migren a los linfonodos y lleguen a activar linfocitos T tumor específicos y que finalmente éstos monten una respuesta tanto CD4 como CD8 que sea capaz de destruir células tumorales y lograr la regresión de metástasis o evitar su diseminación [1].

El melanoma maligno es un tumor altamente inmunogénico y de tratamiento poco efectivo hasta la fecha, planteándose la inmunoterapia como una alternativa viable para combatirlo.

Vacunas DC: generación DC, aporte de AAT y resultados.

Se han utilizado diversos métodos para generar DC y para cargarlas con AAT. En cuanto a las DC, es posible obtenerlas a partir de monocitos de sangre periférica o a partir de precursores hematopoyéticos de médula ósea. Para el aporte de AAT se han utilizado mRNA, péptidos y lisados tumorales. Tanto las DC como la fuente de AAT pueden ser autólogos o alogénicos.

En el año 1988 se publicó el trabajo de Nestle y

cols. [4] donde utilizaron DC autólogas, obtenidas de monocitos de sangre periférica incubados con IL-4 y GM-CSF, cargadas con péptidos o lisado tumoral alogénico para vacunar a 16 pacientes con melanoma maligno avanzado. Los péptidos usados fueron derivados de antígenos asociados a molécula HLA-A2 (tyrosinase, Melan-A/MART-1 ygp100) o a molécula HLA-A1 (MAGE-1 y MAGE-3). Como coadyuvante se agregó hemocianina de keyhole limpet (KLH) a la vacuna. A cada paciente se le administró intranodalmente 4 vacunas separadas por intervalos de 1 semana, una quinta vacuna durante la sexta semana y luego una vacuna mensual hasta completar diez. Del total de pacientes 4 fueron vacunados con DC cargadas con lisado tumoral alogénico y 12 con DC cargadas con péptidos tumorales. La respuesta tumoral, dada por regresión de metástasis, medida a través de radiografía y tomografía (TC) entre la sexta y décima semana, fue buena en 5/16 pacientes; dos con respuesta completa (CR) y tres con respuesta parcial (PR). En cuanto a la respuesta de células T medida por test cutáneo de hipersensibilidad tardía (DTH), fue positiva en 11/12 pacientes vacunados con péptidos y en 2/4 pacientes vacunados con lisado tumoral. Dos de 4 pacientes vacunados con lisado tumoral desarrollaron DTH positivo tanto para lisado como para péptidos y mostraron buena respuesta clínica (1 PR y 1 CR). La otra CR fue obtenida en un paciente vacunado con péptidos tumorales que desarrolló DTH positivo tanto para péptidos como para lisado. Solo 5/16 pacientes mostraron DTH significativamente positivo (>10mm) y de estos, 4 asociaron buena respuesta clínica, indicando que existe relación entre la positividad del test cutáneo y la buena respuesta clínica.

En un trabajo publicado por JA Kyte y cols [5] en mayo del 2006 se vacunó a 22 pacientes con melanoma maligno avanzado utilizando DC autólogas cargadas con m RNA tumoral autólogo. Las DC se obtuvieron de la forma anteriormente mencionada. El m RNA tumoral se extrajo de muestras de lesiones de cada paciente. A través de electroporación se transfectaron las DC inmaduras con el m RNA tumoral y posteriormente se indujo su maduración con IL-1, IL-6, TNF α y PGE $_2$. Las 4 vacunas separadas por intervalos de una semana fueron administradas intranodalmente en 12 pacientes y subcutánea en el resto de ellos. A las 13 semanas se evaluó la respuesta clínica de cada paciente según los criterios para evaluar respuesta en tumores sólidos (RECIST) por medio de TC; 4/22 pacientes mostraron enfermedad estable (SD) y 18/22 progresión de enfermedad (PD). Al evaluar la respuesta inmune antitumoral se obtuvo que 8/18 pacientes desarrollaron DTH positivo y 9/19 pacientes presentaron proliferación de células T tumor específicas. La sobrevida media de pacientes desde el momento de la vacunación fue de 12,3 meses mientras que la sobrevida media de pacientes con melanoma maligno avanzado se estima en 7,5 meses.

O'Rourke y cols [7], el 2003, desarrollaron vacunas utilizando DC autólogas obtenidas de monocitos a través de un método similar al ya descrito cultivadas con células tumorales también autólogas. Se incluyeron 17 pacientes con melanoma maligno estadio IV. El protocolo incluyó inyecciones intradérmicas en un solo sitio en pared abdominal de vacunas con bajas o altas dosis de DC, con un régimen primario de 6 vacunaciones que se realizaron a intervalos de 15 días. Posteriormente, y mientras fue posible, se vacunó a los pacientes semanalmente en 6 ocasiones. De

12 pacientes que lograron completar el régimen primario de vacunación en 3 se logró CR (media sobrevida de 35 meses), 3 PR, 6 PD. Además se encontró que la regresión de la enfermedad no se relacionaba con las dosis de las vacunas o con la presencia de DTH positivo. En este trabajo además destaca la medición de los niveles de proteína S-100B, cuyos niveles elevados previos al tratamiento se correlacionaron con mayor masa tumoral y una pobre respuesta clínica.

Por otra parte, también se han utilizado vacunas compuestas por híbridos de DC y células tumorales (Trefzer U. y cols. 2005) [8], utilizando DC alogénicas de donantes sanos electrofusionadas con células tumorales autólogas irradiadas. Dichas vacunas se inyectaron intradérmico cada 4 semanas, en piel sana, lejos de tumores y cercana a linfonodos no afectados, recibiendo los pacientes entre 3 y 25 vacunas. Se incluyeron 17 pacientes, obteniéndose una mediana global de sobrevida de 22.4 meses (rango de 5-58 meses), con 1 CR, 1 PR, 6 SD; los autores incluyeron a estas tres últimas condiciones bajo la categoría de “respuesta clínica”, encontrándose en ellos una mediana de sobrevida de 28 meses (rango de 12-58 meses), mientras que los pacientes con PD mostraron una mediana de sobrevida de 12.5 meses (rango de 5 a 22 meses), que logra ser mayor que la mediana de 8 meses descrita para melanoma maligno estadio IV.

Se encontró además una respuesta DTH positiva en 14/17 pacientes y 11/14 (con o sin respuesta clínica) mostraron respuesta de LT contra varios AAT. Los autores atribuyeron la falta de respuesta clínica a la pérdida/modificación de la antigeneidad tumoral del paciente ya que se evidenció evasión tumoral al desaparecer AAT en metástasis de 6 pacientes.

López et al [9], desarrollaron vacunas de DC autólogas generadas en forma similar a lo descrito anteriormente, pulsadas con un lisado tumoral alogénico standard (TRIMEL).

Se incluyeron 43 pacientes en estadio IV y 7 en estadio III de melanoma maligno. El protocolo de vacunación incluyó 4 dosis de la vacuna junto con KLH, en alguna extremidad, cercana a linfonodos indemnes, (días 0, 10, 30 y 50) y en 12/50 pacientes se inyectó (s.c.) IL-2 recombinante (rhIL-2, PROLEUKIN) después de la 2, 3 y 4 vacunación. En 5 pacientes se realizó una segunda ronda de vacunación 1 año después del primer ciclo.

En más del 60% se encontró una respuesta DTH (+) a TRIMEL; en este grupo de pacientes se observó una mediana de sobrevida de 33 meses, comparado con la mediana de sobrevida de 11 meses en aquellos con respuesta DTH(-). Además se encontró que todos los pacientes en estadio III fueron DTH(+) y permanecieron vivos y libres de tumor durante un período de tiempo entre 33 a 64 meses, con 48 meses de mediana.

Respecto a la respuesta inmune, los pacientes DTH(+) mostraron una reducción significativa en la proporción de LT CD4+ productores de TFG-B, al compararlos con pacientes DTH(-).

Discusión

A pesar de que las diversas formas de generación de vacunas tienen fundamentos teóricos lógicos respecto al conocimiento actual de la inmunología, los resultados obtenidos podrían indicar que existen ventajas de algunos métodos sobre otros. En cuanto a los mecanismos de generar DC analizados no existen mayores diferencias salvo en la cantidad de días que los monocitos precursores

son incubadas con IL-4 y GM-CSF y las citoquinas usadas para inducir la maduración DC (IL-1, IL-6, TNF α). En todos se consideran estas células como fundamentales para inducir la respuesta de linfocitos T antitumoral ya que son capaces de expresar cualquier antígeno proteico usado en el contexto de MHC. La diferencia fundamental entre estos trabajos es la fuente de AAT usada. Al utilizar péptidos tumorales identificados [4], idealmente debiese ser un conjunto de estos de modo de minimizar las posibilidades de que el tumor logre escapar o de que no exprese alguno de ellos y de maximizar la probabilidad de inducir una respuesta inmune antitumoral policlonal efectiva. Al administrar el adyuvante KLH como antígeno para linfocitos CD4 se pretende gatillar la secreción de citoquinas por linfocitos T helper necesaria para desarrollar una respuesta CD8 en el microambiente linfonodal. Respecto al mRNA tumoral alogénico [5,6], la ventaja teórica de este método es que permite gatillar una respuesta inmune específica contra los antígenos tumorales particulares que se expresan en el paciente ya que los autores sostienen que la gran mayoría de los AAT son propios para cada individuo. Otro factor relevante es la capacidad para activar tanto células CD4 como CD8. Esto sería posible puesto que las DC sintetizan los péptidos codificados por el mRNA tumoral y algunos de estos quedan en el citoplasma y pasan a moléculas MHC I y otros son exocitados o expresados en la membrana de la DC y luego ésta puede incorporarlos a un fagosoma y posteriormente a moléculas de MHC II. También se ha postulado que los péptidos citoplasmáticos pueden ser incorporados por autofagosomas y así terminar en la vía del MHC II. Las células tumorales autólogas [7] serían utilizadas para aprovechar epítopes mutados particulares

de cada paciente y montar la respuesta inmune contra ellos. Al crear híbridos de DC con células tumorales [8] se quiere combinar la antigenicidad del tumor con la capacidad para estimular inmunidad celular citotóxica o CD8. Finalmente el uso de lisado tumoral alogénico [9] proporcionaría un pool de antígenos estandarizados, que con alta probabilidad están también expresados por el tumor del paciente y adicionalmente, al lisar células brinda una serie de señales de peligro o DAMPS que aumentan la expresión de moléculas MHC y coestimuladores en las DC potenciando su capacidad presentadora de antígenos. El TGF- β , una citoquina expresada tanto por el tumor como por linfocitos T reguladores está involucrada en la inhibición de los linfocitos CD8+ y NK [9,10]. Luego de la vacunación con lisado tumoral, se observó que los pacientes DTH(-) tienen niveles significativamente mayores de TGF- β que los pacientes DTH(+) [9], por lo que la mala respuesta clínica podría asociarse a la presencia de Linfocitos T reguladores que inhiben la respuesta inmune antitumoral [10].

En el trabajo realizado por Nestle y cols [8] se obtuvo buena respuesta clínica en 5/16 pacientes, de estos pacientes, cuatro mostraron DTH significativamente positivo, lo que posiblemente indica que existe una relación entre DTH positivo y buena respuesta clínica. De los cuatro pacientes con DTH positivo y buena respuesta clínica, dos fueron vacunados con péptidos y dos con lisado tumoral. Considerando que un total de 12 pacientes fueron vacunados con péptidos y solo cuatro con lisado tumoral, probablemente éste último método brinda mejores resultados.

En cuanto a la utilización de mRNA autólogo [5,6], se obtuvo respuesta inmune, medida por DTH y ensayos de proliferación de células T, en

el 50% de los pacientes aproximadamente pero esto tuvo poca correlación con buena respuesta clínica ya que solo se observó en 4/22 pacientes. La supervivencia media observada tampoco fue muy promisorio en comparación con la alcanzada en otros trabajos analizados; 12,3 meses versus 35, 28 y 33 meses.

Al parecer se obtuvieron mejores resultados al utilizar DC autólogas cultivadas en presencia de células tumorales [7]. En este estudio la mitad de los pacientes (6/12) mostraron buena respuesta tumoral y dentro de éstos, los tres que desarrollaron CR tuvieron una supervivencia media de 35 meses en comparación con los 7 a 8 meses de supervivencia media de pacientes con melanoma maligno avanzado. Sin embargo, estos resultados no se asociaron a respuesta DTH.

Resultados similares se obtuvieron al vacunar a pacientes con híbridos de DC alogénicas y células tumorales autólogas [4]. Casi la mitad de los pacientes (8/17) mostraron buena respuesta clínica y una supervivencia media de 28 meses en comparación con el resto de pacientes, en los que la enfermedad progresó (PD) y cuya supervivencia media fue de solo 12 meses. En este trabajo se obtuvo respuesta inmune antitumoral en más de la mitad de los pacientes.

En el trabajo que utilizó DC autólogas cargadas con lisado tumoral alogénico [9] se observaron resultados similares a los anteriores; en más del 60% de los pacientes se desarrolló respuesta inmune antitumoral, evaluada por DTH, la cual se asoció a buena respuesta clínica con una supervivencia media de estos pacientes de 33 meses en comparación con los que no mostraron DTH positivo cuya supervivencia media fue de 11 meses.

Según lo analizado a partir de estos resultados, postulamos que la utilización de células tumor-

ales como fuente de antígenos, ya sea enteras, como lisado o como híbrido con DC, tiene ventajas sobre el uso de péptidos o mRNA tumoral. Esto probablemente se debe a la gran variedad de antígenos que puede aportar la totalidad de la célula tumoral y a las señales de peligro (DAMPs) que contribuyen a la activación y maduración de las DC al unirse a los receptores tipo Toll (TLR).

Por otro lado, en los trabajos en que se obtuvo buena respuesta clínica, las supervivencias medias fueron del orden de 30 meses, lo que es considerable si se compara con la supervivencia media de aquellos en que no se logró buena respuesta o con la del melanoma maligno avanzado que no recibe inmunoterapia; 12 y 8 meses respectivamente.

Finalmente podemos agregar que a pesar de que el porcentaje de pacientes que responde a la inmunoterapia es relativamente pequeño en comparación con las tasas de respuesta de otros cánceres a las terapias convencionales, ésta sí prolonga significativamente la supervivencia de pacientes con melanoma maligno metastásico, logrando la regresión de lesiones o al menos manteniendo la enfermedad sin progresión, por lo que nos parece un campo promisorio el investigar formas de predecir qué grupo de pacientes se beneficiaría con inmunoterapia de forma de aplicarla selectivamente.

1. López M., Escobar A., Alfaro J., Fodor M., Larrondo M., Ferreda C., Salazar-Onfray F. Avances en inmunoterapia celular contra el melanoma maligno. Rev Med Chile, 2004; 132: 1115-1126.
2. López M., Aguilera R., Pérez C., Mendoza-Naranjo A., Pereda C., Ramírez M., Ferrada C., Agullón J., Salazar-Onfray F. The role of regulatory T lymphocytes in the induced immune response mediated by biological vaccines. Immunobiology 211 [2006] 127-136.
3. Tuettenberg A., Schimtt E., Knop J., Jonuleit H. Dendritic Cell-Based Immunotherapy of Malignant Melanoma: Success and Limitations. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft Volume 5, Issue 3, pages 190-196, March 2007
4. Nestlé F., Alijagic S., Gilliet M., Sun Y., Grabbe S., Dummer R., Burg G., Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide or tumour lysate-pulsed dendritic cells. Nature Medicine v. 4 n.3 march 1998.
5. P Kyte JA, Mu L., Aamdal S., Kvalheim G., Dueland S., Hauser M., Gullestad HP., Ryder T., Lislerud K., Hammerstad H, Gaudernack G. Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-m RNA. Cancer Gene Therapy [2006] 13, 905-918
6. Kyte J., Kvalheim G., Lislerud K., Straten p., Dueland S., Aamdal S., Gaudernack G. T cell responses in melanoma patients after vaccination with tumor- m RNA transfected dendritic cells. Cancer Immunol Immunotherapy [2007] 56:659-675.
7. O'Rourke MG, Johnson M, Lanagan C, et al: Durable complete clinical responses in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine. Cancer Immunol Immunotherapy 52:387-395, 2003
8. Trefzer U, Herberth G, Wohlan K, et al: Tumour-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: Immunological effects and clinical results. Vaccine 23:2367-2373, 2005
9. López, M., Pereda C., Segal, G et al. Prolonged Survival of dendritic Cell-Vaccinated Melanoma Patients Correlates With Tumor-Specific Delayed Type IV Hypersensitivity Response and Reduction of Tumor Growth Factor γ -Expressing T Cells. Journal of Clinical Oncology v.27 n.6 2009.
10. El sistema immune, herramienta estratégica en la batalla contra el cáncer. Salazar-Onfray F. Rev. Chil. Pediatría v. 71 n.4 2000.
11. Gutiérrez C, Alarcón E, Valle R, Calderón G. Epidemiología del melanoma maligno en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, Perú, 2000-2004. Folia dermatol. Peru 2007; 18 [1]: 23-27
12. Iribarren O, Sepúlveda M, Hidalgo J, Madariaga J. Estudio epidemiológico de melanoma maligno en la IV Región de Chile. Cuad. Cir. 2005; 19: 33-38
13. Zelman V, Molina P, Valenzuela C, Honeyman J. Análisis de la densidad y distribución anatómica de nevos melanocíticos adquiridos, en adolescentes del estrato socioeconómico bajo de Santiago de Chile. Rev Méd Chile 2008; 136: 747-752.