



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN**

**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**  
**SECRETARÍA DE SALUD**

## **INMUNOTERAPIA CELULAR POST TRASPLANTE**

**TRABAJO DE TESIS PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN:**

**ONCOLOGIA PEDIATRICA**

**PRESENTA:**  
**DRA. MAYRA IVETTE LOPEZ RUIZ**

**TUTOR DE TESIS**  
**DR. ALBERTO OLAYA VARGAS**





**MÉXICO, D. F. 2010**

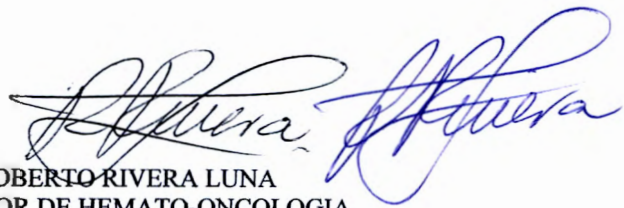
# INMUNOTERAPIA CELULAR POST TRASPLANTE



DR. JOSE N. KEYNES MANZUR  
DIRECTOR DE ENSEÑANZA



DRA. MIRELLA VAZQUEZ RIVERA  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



DR. ROBERTO RIVERA LUNA  
SUBDIRECTOR DE HEMATO-ONCOLOGIA  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO



DR. ALBERTO OLAYA VARGAS  
TUTOR DE TESIS

## DEDICATORIA.

Gracias a Dios por permitirme cumplir este sueño. Por haberse llevado a mi padre a descansar y permitir que mi madre y mis hermanos me acompañaran en la culminación de este proyecto.

Gracias a mis padres Erasmo y Yolanda, sin su apoyo no hubiese podido lograrlo. Gracias por enseñarme que todo se logra con perseverancia y trabajo duro. Y por enseñarme a vivir.

Gracias a mis hermanos, Alejandro y Daniel, sin ustedes no lo hubiese logrado. Alex eres un ejemplo para nosotros por haber aguantado en ese proceso tan difícil, a ambos gracias por existir. Saben que pueden contar conmigo.

Dra. Lourdes Vega Vega y Dra. Aracely Castellanos les agradezco que me hayan enseñado el camino de la Oncología Pediátrica, cambiar mi visión sobre el paciente oncológico y su apoyo para llegar hasta aquí. Gracias por confiar en mí.

Dra. Rocío Cárdenas Cardós, gracias por hacerme entender la importancia de seguir adelante sin mirar atrás, así como el apoyo en la toma de decisiones.

Dr. Alberto Olaya Vargas, muchas gracias por haberme permitido ser parte de su equipo, compartir el gusto por el trasplante y el apoyo y la seguridad de que este proyecto finalmente llegaría a su culminación.

A mis maestros, por su apoyo cuando tuve una de las pérdidas grandes que uno puede tener en la vida, al mismo tiempo que estaba ganando algo que nunca se podrá comparar con lo que perdí.

A mis compañeros y amigos de la residencia, gracias por su apoyo en esta etapa de la vida en que caminamos juntos y maduramos juntos también.

Fabiola y Joanna gracias por haberme hecho mi vida más ligera durante uno de los tiempos más difíciles de mi vida.

## INDICE

1. HISTORIA.....	1
2. INTRODUCCION.....	4
3. CELULAS T REGULADORAS.....	5
4. CELULAS NK.....	17
5. CELULAS DENDRITICAS.....	23
6. TERAPIAS DE COMBINACION.....	28
7. INFUSION DE LINFOCITOS DE DONADOR EN RECAIDA POSTRASPLANTE.....	29
8. BIBLIOGRAFIA.....	33

## **INMUNOTERAPIA CELULAR POS TRANSPLANTE.**

### **HISTORIA.**

En 1891, William Coley, un cirujano en el Memorial Hospital en Nueva York notó que algunos pacientes con cáncer que desarrollaron y sobrevivieron a la erisipela (una enfermedad frecuentemente fatal en ese tiempo), exhibieron regresión de su cáncer. (1) Coley creyó que algunas propiedades de los microorganismos involucrados en la erisipela mediaba este efecto antitumor, quizá al vacunar a los pacientes contra una causa infecciosa para su cáncer. Desarrolló un extracto de *Streptococcus* y *Serratia*, denominada “toxinas mixtas de Coley” con el cual trató una serie inicial de 10 pacientes hasta llegar a 800. (2) Aunque su tratamiento era burdo y la metodología usada en ese entonces dista mucho de la actual, una proporción significativa de los pacientes de Coley demostró regresiones de sus tumores y algunos de estas regresiones duraron varias décadas. Hasta 1934 “la toxina de Coley” fue el único tratamiento sistémico conocido para el cáncer. Sin embargo el mecanismo de acción de “las toxinas de Coley” fue y se mantiene hasta el momento desconocida. (3,4)

En retrospectiva “la toxina de Coley” fue la primera intervención inmunoterapéutica efectiva en cáncer basada en una observación clínica. Fue el inicio empírico de la inmunoterapia en cáncer. (4)

El trabajo de Coley animó a otros investigadores a iniciar estudios con microorganismos. Un ejemplo de esto es el uso de agentes como Bacilo de Calmette-Guerin ó *Corynebacterium parvum* que al inyectarse directamente en tumores pueden mediar

regresión tumoral. Actualmente el BCG tiene un rol establecido en el tratamiento del cáncer de vejiga superficial ya que reduce la tasa de recurrencia de dicho tumor de un 42 a 100% hasta un 15 a 40% cuando se aplica por vía intravesical. Esto es superior a los efectos de agentes tales como doxorubicina. (5)

Aunque se conocía el poder inmunogénico de los tumores de ratón desde 1940, fue hasta 1960 en que el antígeno carcinoembrionario fue descrito en el carcinoma colorectal seguido de la alfafetoproteína en carcinoma hepatocelular. En 1989 Knuth et al describió el primer antígeno que se convertiría en la gran familia de los genes MAGE y demostró que este antígeno podía estimular una respuesta de células T. Este descubrimiento fue una de las piedras angulares de la inmunoterapia del cáncer. (1)

Desde la década de 1970, Chester Southam y colegas demostraron que el crecimiento subcutáneo de autoinjertos de tumor humano en pacientes portadores de cáncer avanzado era inhibido por la cotransferencia de leucocitos autólogos en cerca de la mitad de los pacientes. Este hallazgo sugirió que los linfocitos con efecto inhibitorio específico en la implantación y crecimiento de células cancerígenas estaban presentes en muchos pacientes que podían ser candidatos potenciales para inmunoterapia adoptiva. (6)

En 1971, Gershon y Kondo identificaron supuestas células supresoras cuando transfirieron tolerancia específica de antígeno a animales no estimulados al transferir células T antígeno estimuladas. Debido a resultados conflictivos, el concepto de supresión de células T se desvaneció en una obscuridad relativa a finales de los 80's. Sin embargo, reportes que describían células T murinas responsables de supresión de respuestas inmunes antitumor y la identificación de clonas de células T CD4+ humanas que suprimían la respuestas

inmunes antitumor citotóxicas autólogas sugirió que los mecanismos in vivo de supresión inmune celular dirigidas contra tumor debían existir. (7)

Sakaguchi et al fueron uno de los primeros en levantar el interés en los ahora llamados células T reguladoras (Treg cells) al identificar una población de células T CD4 (+) altamente positivas a CD25 y que prevenían autoinmunidad en un modelo murino. Reportes numerosos en los siguientes años iluminaron los mayores aspectos de la biología de las células Treg, caracterizaron diferentes subpoblaciones de células T con propiedades reguladoras incluyendo a células TregCD25highCD4+ naturales, células Treg inducidas, células TH3 y Tr1, así como células Treg CD25highCD4+ en desarrollo en la periferia por conversión de células T CD4+CD25-. Todas las poblaciones de células T diferentes con función reguladora coexisten y contribuyen a la supresión inmune. (7)

A finales de los 90's el trasplante de células hematopoyéticas para el tratamiento de hemopatías fue inicialmente considerado para reemplazar la médula ósea enferma con una médula sana de un donador sano. El trasplante era considerado como un tratamiento de apoyo para restaurar la hematopoyesis. Con el tiempo se encontró que el tratamiento con altas dosis de quimioterapia no erradicaba la enfermedad en muchos pacientes y que el trasplante de médula ósea por sí mismo confería una respuesta contra tumor mediada por el sistema inmune a lo cual se denominó efecto injerto contra leucemia, la cual se encontró que es mediada por células T aloreactivas derivadas del donador. Estudios subsiguientes encontraron que el efecto injerto contra leucemia está virtualmente ausente en el trasplante de células hematopoyéticas autólogo y singénico ya que no existen diferencias entre el complejo mayor de histocompatibilidad menor y mayor y por tanto no existe aloreacción.



Con esto se ha considerado que el trasplante alogénico de células madres hematopoyéticas es un arma de inmunoterapia fundamental en el tratamiento del cáncer.

## INTRODUCCION

Los tumores han desarrollado numerosos mecanismos para evadir la respuesta inmune adoptada e innata. Esto incluye:

- Modulación de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y moléculas coestimuladoras.
- Expresión de ligandos Fas y otras moléculas proapoptóticas en la superficie células
- Producción de factores inhibidores como factor de crecimiento tumoral Beta (TGF B) e IL10.
- Expresión constitutiva de la enzima depletores de triptófano, indoleamina 2,3 deshidrogenasa y reclutamiento de células T reguladoras.

Todos estos puntos deben ser tomados en cuenta al momento de iniciar cualquier protocolo de inmunoterapia celular.

La inmunoterapia por adopción se basa en la capacidad de caracterizar y aislar células T citotóxicas específicas de tumor de donadores sanos ó pacientes con cáncer. La generación de linfocitos T citotóxicos específicos de tumor para inmunoterapia se puede alcanzar a través de estimulación repetitiva de células mononucleares en sangre periférica con una célula presentadora de antígeno cargada con el antígeno de interés. Teóricamente esto permite una destrucción selectiva de la célula tumoral sin efectos adversos en tejidos normales. Sin embargo, a pesar de la expresión aberrante de antígenos asociados en las células tumorales, muchas de estas proteínas también se expresan en alguna proporción en



tejidos sanos. Debido a que el sistema inmune puede reconocer los antígenos asociados a tumor como autoantígenos y limitar la respuesta inmune de células T a través de mecanismos de tolerancia, que incluyen la delección clonal y anergia. Debido a esta inmunotolerancia las células T dirigidas con antígenos tumorales pueden tener baja afinidad por los receptores de células T y ser menos efectivos para matar células tumorales. Por tanto se ha estudiado otras opciones para estos casos y a continuación se describen otros enfoques en cuanto a inmunoterapia celular.

#### CELULAS T REGULADORAS.

El sistema inmune discrimina entre lo propio y extraño al establecer y mantener ausencia de respuesta a lo propio (autotolerancia). La tolerancia se divide en 2 categorías: la tolerancia central y la tolerancia periférica. La tolerancia central se aplica a la diferenciación de linfocitos en órganos linfoides primarios donde las células T autoreactivas son borradas clonalmente ó inactivadas. La tolerancia periférica aplica a las células autoreactivas que escapan al timo y se mantienen a través de varios mecanismos, incluyendo una población autoreguladora de células T (Treg) que activamente suprimen la función de las células T autoreactivas.

Las células Treg protegen al huésped de enfermedades autoinmunes al suprimir células autoreactivas. Como tales, las células Treg pueden bloquear también las respuestas inmune antitumor. Particularmente en el contexto del cáncer, la función y frecuencia de las células Treg- es importante porque a grandes cantidades favorecen el desarrollo de tumor ó crecimiento e influyen el curso de la enfermedad.

Hay dos categorías generales de células Treg CD4+CD25+ que difieren en su origen, especificidad de antígeno y mecanismo efector. Un subtipo de células Treg se desarrolla durante el proceso normal de maduración de células T en el timo, que da como resultado la generación de una población Treg CD4+CD25+ natural que sobrevive en la periferia marcada para prevenir potenciales respuestas autoinmunes. El segundo subtipo de células Treg CD4+CD25+ (Tr1) se desarrolla como consecuencia de activación periférica de células TCD4+CD25- bajo condiciones particulares de exposición subóptima de antígenos y/o coestimulación.

#### CELULAS REGULADORAS T CD4+CD25+.

La mejor célula inmunoreguladora caracterizada son las células reguladoras T naturales CD4+CD25+. Representan un linaje distinto funcional de células T cruciales para el mantenimiento de la tolerancia periférica in vivo. Una distinción mayor de otros tipos celulares reguladoras es que las células Treg se diferencian bajo condiciones normales en el timo en un subtipo regulador maduro, opuesto a ser inducido en la periferia por células T CD4+ maduras.(8) Las células Treg representan aproximadamente 5-10% de las células periféricas CD4+ y constitutivamente expresan CD25 (IL 2 Ralfa), el receptor de factor de necrosis de tumor inducido por glucocorticoides, antígeno CTL (CTLA-4) y el factor de transcripción Foxp3. (9, 10, 11, 12). El mecanismo exacto de acción de Treg está en debate, así como la naturaleza de su reconocimiento de antígeno. Estudios recientes sugieren que las células Treg pueden reconocer autoantígenos, incluyendo antígenos asociados a tumor con alta avidéz y cuando se estimulan suprimen autoinmunidad, inmunidad tumoral y rechazo de injerto. (13, 14).

En ratones, la ausencia ó depleción de células Treg lleva a la destrucción autoinmune de una variedad de tejidos (15, 16). Además, la inhibición de células Treg ó depleción antes de desafío tumoral han demostrado que inducen repuestas inmunes efectivas contra tumores singénicos múltiples en un número de cepas de ratón diferente (17, 18, 19). Esta inmunidad antitumoral aumentada está mediada en forma primaria por células T CD8+, pero hay alguna evidencia que las células NK y CD4+ pueden estar involucradas. El tratamiento anti-CD25 también incrementa la eficacia de las vacunas tumorales, inducen un respuesta de memoria a largo plazo más fuerte (19). La remoción de las células Treg ha demostrado que provocan inmunidad antitumor efectiva contra tumores murinos establecidos. En un modelo de inmunoterapia por adopción de melanoma, la transferencia de células Treg CD4+CD25+, pero no células T CD4+CD25-, efectivamente previno la destrucción tumoral mediada por células T CD8+. (20) Estudios recientes de células Treg en cáncer humano ha demostrado niveles elevados de Treg en la sangre periférica y/o el microambiente tumoral de pacientes con melanoma, linfoma de Hodgkin, cáncer de células no pequeñas en el pulmón, cáncer de mama, páncreas, gastrointestinal y de ovario. En un estudio a gran escala de 104 pacientes con carcinoma de ovario, las células CD4+CD25+Foxp3+ se acumularon en los tumores, en los cuáles suprimieron la inmunidad de células T específicas de tumor. El número de células Treg presentes dentro de los especímenes de la biopsia de tumor de pacientes diferentes estaba inversamente correlacionado con la supervivencia del paciente. (21)

Los mecanismos por los cuales las células Treg suprimen la activación, proliferación y producción de citocinas de las células T CD8+ citotóxicas y CD4+ ayudadoras específicas de antígeno está pobremente entendido, pero se sabe que requieren la activación de células

Treg a través de su receptor de células T y el contacto directo de la célula Treg con la célula T correspondiente. La ausencia de marcadores específicos de tipo celular con cual identificar y aislar las células Treg ha obstaculizado los esfuerzos para el mejor entendimiento de su mecanismo de acción y permitir el diseño de reactivos que pudieran específicamente marcar estas células in vivo.

#### CELULAS T REGULADORAS TIPO 1.

Las células T reguladoras tipo 1 (Tr1) comprenden un subtipo de células T CD4+ que son inducidas por activación específica de antígeno en presencia de IL 10. (22) Tales células Tr1 pueden inducir anergia de células T y supresión de respuestas inmunes, primariamente por medio de la producción de altos niveles de citocinas IL10 y TGF beta. (23) En general, su rol fisiológico parece ser la regulación a la baja de la respuesta inmune contra autoantígenos, patógenos y la inducción de tolerancia a alérgenos ambientales. (24, 25, 26, 27, 28, 29, 30) La estimulación de receptores de células T a largo plazo de células T CD4+ específicas de antígeno tumoral en la presencia de IL10 pudieron proveer condiciones que favorecerían la inducción de células Tr1 en el microambiente tumoral. Las células T CD4+ parecidas a Tr1, aisladas ya sea por sangre de pacientes con melanoma ó inducidas por estimulación repetida in vitro con células tumorales, han demostrado secreción de IL10 en respuesta al reconocimiento de CMH clase II restringidas antígenos tumorales expresados en células de melanoma. (31, 32).

Las dos citocinas de mayor efecto producidas por células Tr1, IL10 y TGF beta, son citocinas inmunoreguladoras potentes con efectos complejos en múltiples tipos celulares. La IL10 puede suprimir las respuestas de células T indirectamente a través de la inhibición

de CMH y expresión de moléculas coestimuladoras y producción de citocinas por células presentadoras de antígeno incluyendo células dendríticas, células de Langerhans y macrófagos. La IL10 también puede directamente regular células T al inhibir su capacidad de proliferar y producir citocinas, incluyendo IL2 y FNT alfa y también ha sido implicada en la muerte celular inducida por activación de células T. (33, 34, 35, 36, 37) El TGF beta inhibe la proliferación de células T, la producción de citocinas y la citotoxicidad y puede actuar en todos los estadios de diferenciación de células T. Bajo las mismas condiciones, TGF beta puede también inhibir la función celular presentadora de antígeno al suprimir la maduración y producción de IFN gamma e inducir regulación a la baja de CMH clase II. El amplio rol inmunosupresor de citocinas producidas por células Tr1 sugiere que estas células pudieran jugar un rol significativo en moldear el microambiente tumoral a favor del crecimiento de las células tumorales. (8)

El desarrollo de células Treg durante la progresión tumoral se ha señalado en un modelo de fibrosarcoma de ratón C57BL/6N así como en un modelo de adenocarcinoma de colon en el ratón BABL/c. La transferencia de células de ganglios linfáticos con tumor no fraccionado aislados en el día 9 después de estímulo tumoral alcanzaron rechazo completo de tumores establecidos, mientras que el aumento en 4 veces el número de células cosechadas en el día 12 rara vez previnieron la progresión letal del tumor. Esta falla al tratamiento se consideró secundario a la cotransferencia de células Treg inducidas por tumor, indicando que durante este corto periodo de tiempo de desarrollo de tumor ocurrió la inducción de población de células Treg- altamente supresoras.(38) La inducción temprana relativa de células Treg durante el desarrollo tumoral tiene un impacto significativo en la enfermedad humana así



como el inicio de la inducción de células Treg- en pacientes con cáncer, ciertamente precede al tiempo de diagnóstico en la mayoría de los pacientes.

El efecto supresor de las células Treg ocurridas naturalmente contra células T CD8+ específicas de tumor se estableció en un modelo de melanoma B16 pobremente inmunogénico. Las cels Treg suprimieron efectivamente la inmunidad mediada por linfocitos T citotóxicos contra un segundo estímulo por el mismo tumor, demostrando que las cels Treg precursoras en huéspedes no estimuladas dieron lugar a supresiones efectivas durante el desarrollo tumoral. Estos hallazgos claramente sugieren que las cel Treg son reguladoras mayores de la inmunidad tumoral concomitante. (40) Se halló más evidencia de interferencia de las células Treg con la respuesta inmune antitumor mediada por células T CD8+ in vivo en un modelo de carcinoma de colon murino transgénico donde las células Treg abolieron el rechazo del tumor mediado por células T CD8+ al suprimir la citotoxicidad por CTL específicamente. (41)

La acumulación selectiva de las cels Treg en el ambiente tumoral se estudió en un modelo de fibrosarcoma murino donde la mayoría de los linfocitos infiltrantes del tumor en estadio tardío de progresión tumoral eran cels Treg. Su vaciamiento durante la fase efectora más que en la de sensibilización aumentó exitosamente la inmunidad antitumoral. El bloqueo de TGF beta e IL10 revirtió parcialmente la supresión impuesta por células T CD4+. Además la depleción local de las células T CD4+ dentro del tumor llevó a la erradicación de tumores bien establecidos y el desarrollo de memoria antitumor a largo plazo. Este estudio sugirió que la supresión de la inmunidad antitumoral por células Treg ocurre predominantemente en el sitio del tumor y que la reversión local de la supresión, aun tardía durante el desarrollo tumoral, puede ser un tratamiento efectivo. (42) Esto se ha confirmado



en un modelo de cáncer pancreático murino que sugiere que el tumor promueve el reclutamiento de células Treg a través de varios mecanismos que involucran la activación de células Treg naturales así como la conversión de células no Treg- a cels Treg. (43)

#### DEPLECION DE CELULAS TREG

En estudios tempranos se encontró que la depleción no específica de células T CD4+ puede llevar a la inducción de inmunidad antitumor eficiente, pero también a autoinmunidad como se muestra en la figura 1.

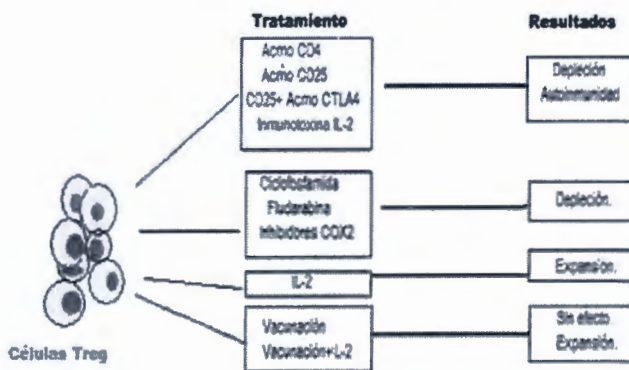


Figura 1. Se muestran los diferentes tipos de tratamiento y como afectan la función de las células Treg. En algunos tumores humanos la alteración a nivel de células Treg no siempre provocan su reducción, en algunos casos se ha ligado a la inducción de autoinmunidad ó expansión ó desarrollo de las células Treg. (7)

Más específicamente al marcar las células Treg con anticuerpo monoclonal CD25 abolió la falta de respuesta inmunológica a tumores e indujo desarrollo espontáneo de células NK y células T efectoras CD8+ específicas de tumor. (44) El tiempo de eliminación de células Treg también parece ser un aspecto importante. La administración del AcmoCD25 2 días después de la inoculación de las células de mieloma no causó regresión tumoral independientemente de la depleción de células Treg. (45)

#### CELS TREG HUMANAS EN CANCER: CONOCIMIENTO ACTUAL.

Hasta el momento no se ha identificado un marcador de antígeno específico para las células Treg humanas. Actualmente se reconocen como células T CD4+CD25high y el marcador más específico FOXP3.

#### FRECUENCIA AUMENTADA DE CELS TREG EN CANCERES SOLIDOS.

Woo et al fueron los primeros en reportar los porcentajes aumentados de cels Treg CD4+CD25+ en cáncer de ovario y cáncer de pulmón de células no pequeñas. Estas células secretaban TGF B proveyó la primer evidencia que las células Treg contribuía a la disfunción inmune en pacientes con cáncer. Las céls Treg mediaron la inhibición potente de la proliferación de células T. (46) En base a este reporte un estudio más grande concluyó que la prevalencia de células Treg CD4+CD25+ está aumentada no solo en el microambiente del tumor de los pacientes con cáncer de páncreas ó mama invasivo, sino también en sangre periférica sugiriendo que el aumento de cels Treg es un fenómeno generalizado. (47)

Interesantemente en pacientes con carcinoma gástrico, la tasa de supervivencia bajos y el peor pronóstico se correlacionó con frecuencia alta de células Treg. Después de resección curativa, los niveles elevados de cels Treg disminuyeron. Al contrario, las cels Treg aumentaron otra vez en pacientes con recaída después de la resección tumoral. (48, 49, 50)

Curiel et al demostró que las células Treg CD4+CD25+FOXP3 suprimen la inmunidad de células T específica de tumor en cáncer de ovario, contribuye al crecimiento de tumor y se acumula durante la progresión. Además las frecuencias aumentadas de células Treg se asoció con una tasa alta de mortalidad y la supervivencia reducida. (51)

Las células Treg de preferencia se acumularon en tumores y ascitis, pero rara vez en ganglios linfáticos supurados en estadios avanzados. Las células tumorales y los macrófagos circundantes produjeron la citocina CCL22 el cual medió el tráfico de células Treg al tumor a través de CCR4. Este reclutamiento específico de células Treg puede representar un mecanismo por el cual los tumores adoptan un privilegio inmunológico.

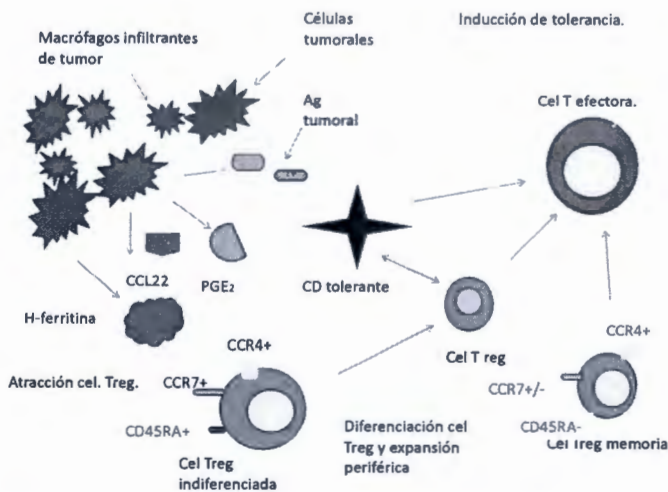


Figura 2. Modelo de acumulo de células Treg en tumores humanos. Uno de los posibles escenarios de cómo la atracción de las células Treg- al sitio de tumor y expansión de las células Treg puede ocurrir secundario a la liberación de CCL22 así como de H Ferritina por las células tumorales y los macrófagos infiltrantes de tumor llevan a la acumulación de células Treg indiferenciadas CCD4+ en el microambiente tumoral. La interacción con la célula dendrítica (CD) tolerante inducida por PGE<sub>2</sub> entonces da lugar a la diferenciación y expansión periférica de las células Treg indiferenciadas a células Treg de memoria. Junto con la CD tolerante, estas células Treg inhiben la generación de células efectoras, lo cual resulta en inducción de tolerancia contra el tumor. (7)

Al parecer existe un incremento de células Treg dependiendo del estadio, que se correlaciona con la supervivencia global. Sin embargo se conoce poco acerca del mecanismo que lleva a este incremento. El primer estudio por Wolf et al pudiera ayudarnos a entender los mecanismos moleculares subyacentes. Este estudio demostró que la

frecuencia incrementada de células Treg en sangre periférica de pacientes con cáncer se debe a la proliferación activa más que a redistribución de otros compartimentos (por ejemplo órganos linfoides secundarios ó médula ósea). (52) Este hallazgo en combinación con la propuesta de que las células Treg son atraídas al tumor a través de CCR4/CCL22 e induce la conversión a células Treg por ferritin H ó PGE2, pudiera ser uno de los mecanismos posibles responsable de la expansión de células Treg en pacientes con cáncer.

En la Tabla 1 se muestra un resumen de las células Treg y sus funciones.

Tipo celular.	Funciones efectoras.
Treg (CD4+CD25+)	Inhibición de proliferación de células T CD4+ y CD8+ a través de interacción directa célula a célula
Tr1 (CD4+CD25-)	Supresión de respuesta de células T de memoria y no comprometidas a través de la producción de altos niveles de IL-10 y TGF-B.
Mieloides inmaduras	Inhibición de células T CD4+ y CD8+ al producir radicales libres de oxígeno, nitrógeno y arginasa.
iNKT	Liberación de diversas citocinas Th1 y Th2(puede prevenir ó incrementar la inmunidad antitumoral.

Tomado de Lizée G, Radvanyi L, Overwijk W, Hwu P. Improving antitumor immune responses by circumventing immunoregulatory cells and mechanisms. Clin Cancer Res 2006;12 (16) 4794-4803.

## CELULAS Treg en hemopatías

Mientras la pregunta de células Treg en tumores sólidos despierta interés relativamente temprano, los estudios dirigidos a hemopatías se han iniciado recientemente.

El primer estudio por Marshall et al demostró que grandes poblaciones de células Treg CD4+CD25+ y Tr1 secretora de IL10 en linfoma de Hodgkin infiltraba linfocitos y células mononucleares de sangre periférica. La función supresora fue mediada por la secreción de IL10, contacto de célula a células y expresión de CTLA-4. (53) Al intentar utilizar FOXP3 como un marcador específico de células Treg en pacientes con linfoma de Hodgkin, fue imposible debido a su baja expresión por lo que se necesitan más estudios para establecer el verdadero rol de éstas células en linfoma de Hodgkin. (54)

## PRIMEROS ESTUDIOS HACIA ELIMINACION SELECTIVA DE CELS TREG.

Los modelos murinos han establecido que la eliminación selectiva de células Treg sola ó en combinación con opciones de tratamiento puede inducir regresión en tumores ya establecidos. Un enfoque prometedor es usar como blanco el CD25 en la superficie de células Treg. Danull et al usaron IL-2 DAB con toxina conjugada de difteria para eliminar selectivamente células Treg CD25+ de las células de sangre periférica en pacientes con cáncer sin inducir toxicidad en otras células más que aquéllas que expresaran las células CD25 en niveles bajos ó intermedios. DAB-IL2 disminuyó significativamente el número de células Treg presentes en la sangre periférica de pacientes con carcinoma de células renales



metastásico e invalidó la actividad inmunosupresora in vivo de células Treg. Además la eliminación de células Treg seguida de vacunación por células dendríticas transferida con RNA mejoró significativamente la respuesta de células T específica de tumor cuando se comparó con la aplicación únicamente de vacunas. Este es el primer estudio clínico en el cual se elimina específicamente a las células Treg con resultados prometedores aunque se necesitan más evaluaciones para establecer la ventana terapéutica de las células Treg ya que también es el encargado de salvaguardar el reconocimiento de autoantígenos y evitar autoinmunidad. (55)

Hasta el momento el papel de las Treg in transplante hematopoyético de células madre aún no está esclarecido y actualmente se encuentra en estudio. Si en los modelos de ratón se puede demostrar que son cruciales para la prevención de enfermedad injerto contra huésped entonces podría considerarse como una opción terapéutica. Si se halla que causan supresión de respuestas inmune antitumor, entonces su depleción de los productos de infusión de linfocitos de donador puede ser recomendable para alcanzar altas tasas de remisión. (7)

#### CELULAS NK.

Las células natural killer (NK) descritas originalmente por su capacidad de matar células infectadas por virus y tumorales sin estimulación previa no expresan receptores re-arreglados para detectar antígenos. Se localizan principalmente en médula ósea, bazo y sangre periférica donde comprenden aproximadamente el 10% de los linfocitos de sangre

periférica. Los receptores de superficie que inhiben ó activan a las células NK para lisar blancos celulares incluyen:

- Receptores semejantes a inmunoglobulina asesina de células (KIRs)
- Lectinas
- Receptores de citotoxicidad natural (NCRs).

Las células NK reconocen moléculas clase I de CMH a través de receptores, muchos de los cuáles tienen efectos inhibitorios en las células NK. Las señales inhibitorias son mediadas por KIRs y por el heterodímero CD94:NKG2A receptor de lectina tipo C el cual interactúa con las moléculas de CMH clase I en la célula blanco. La ausencia de unión provoca lisis de células blanco. Este sistema es la base de la hipótesis de pérdida de autoconocimiento y ejemplifica los mecanismos del sistema inmune para contrarrestar la regulación a la baja del CMH inducida por tumores e infecciones virales al escapar del reconocimiento de las células T.

Mientras que los KIRs desactivan células NK, los receptores activadoras (NCR) son responsables de la activación de células NK. El repertorio de células NK está incompletamente comprendido. La ausencia de genes para ciertas familias de receptores activos puede jugar un papel en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. Los receptores de citotoxicidad natural son específicos para las células NK. Las células NK responden a citocinas, por lo que la actividad asesina se puede estimular al cultivarlos en IL2.

La aloreactividad de las células NK puede ser ampliamente definida como cualquier efecto celular NK en contra de células basado en alguna forma de reconocimiento. Basado en el

HLA clase I del receptor y donador, la reactividad de las células NK, estos es, la ausencia de inhibición de las células NK del donador, se puede estimular la actividad citotóxica.

Las células NK pueden ejercer aloreactividad ya sea en el injerto contra huésped ó en el huésped contra injerto. La reactividad de las células NK en el huésped contra injerto se describió por primera vez en 1960 en modelos de trasplante en ratón. En el escenario clínico, después del acondicionamiento mieloablativo, raramente tiene efectos medibles debido a la naturaleza intensa del régimen de acondicionamiento que efectivamente abate las células NK del huésped antes del trasplante. En los regímenes de trasplante con acondicionamiento menos intenso, la contribución de la reactividad de las células NK no es claro, ya que en este transfondo está asociado a mayor número de células T del receptor presente después del acondicionamiento y responsable de rechazo. La reactividad en dirección de injerto contra tumor es de interés específico en el caso de células NK ya que pueden mediar el efecto de leucemia contra tumor y la actividad antirechazo. (56)

En modelos animales se ha encontrado los siguientes efectos benéficos:

1. Disminuye el riesgo de rechazo al apuntar a los linfocitos T del huésped.
2. Disminuye la presentación de antígeno por las células dendríticas del hospedero e incrementa el efecto injerto contra tumor.
3. Disminuye el riesgo de recaídas al marcar a las células leucémicas.
4. Mejora la reconstitución inmune, con lo cual disminuye el riesgo de infecciones.

Además la restricción de las células NK a las células hematopoyéticas puede explicar su falta de asociación con enfermedad injerto contra huésped.

En un estudio de 175 pacientes receptores de trasplante de donador no relacionado con incompatibilidad a nivel de receptor KIRs no se encontró diferencias a nivel de falla de injerto, efecto injerto contra tumor ó recaídas. En un estudio similar con 130 pacientes, todos recibieron gamaglobulina antitimocito como parte de régimen de acondicionamiento, con al menos depleción parcial in vivo de células T, los pacientes con aloreactividad de células NK tuvieron mayor posibilidad de supervivencia total y supervivencia libre de enfermedad comparado con aquéllos sin aloreactividad de células NK. La mortalidad relacionada a trasplante fue de 6 y 40% respectivamente. Las tasas de recaída para pacientes que recibieron trasplantes de un donador con ó sin incompatibilidad del ligando KIR fue de 6 y 21%. Además en hospitales donde se realiza depleción de células T en trasplantes de donador relaciona con HLA idéntico, los pacientes con LMA que carecen de ligando KIR para KIR del donador tienen probabilidades más altas de supervivencia. Algunos de estos hallazgos se pueden explicar por la reactividad de las células NK en ausencia de linfocitos T mientras que en trasplantes sin depleción de linfocitos T, puede existir una respuesta más fuerte mediada por células T.

La diferencia enorme observada en algunos estudios entre la susceptibilidad de las células de leucemia mieloide aguda vs células de leucemia linfoblástica aguda aún sigue sin explicación. Las hipótesis concluyen que las moléculas de adhesión tales como LFA1 ausentes en las células de LAL, pueden ser necesarias para mediar el efecto asesino de las células NK.

Se ha investigado la preparación e infusión de linfocitos NK del donador, con trasplante con depleción de células T con el objetivo de:

- Consolidar el injerto
- Inducir el efecto de injerto contra leucemia en pacientes con trasplante de células hematopoyéticas haploidéntico.

Los prerrequisitos para un número adecuado de células NK en infusión de linfocitos de donador son un alto número de células CD56+, el cual se ha fijado en  $1.0 \times 10^6$  a  $7 \times 10^6$  células NK/kg peso y la eficiencia de procesamiento in vitro.

Uharek et al describió 6 receptores de injertos de células CD34+ haploidéntico que recibieron además  $1 \times 10^6$  a  $7 \times 10^6$  células NK CD56+/CD3- activados con IL-2 en el día +2 después del trasplante. 3 tuvieron aloreactividad de células NK predicha en enfermedad injerto contra tumor, 2 en dirección de rechazo. El fallo tardío del injerto ocurrió en un paciente con aloreactividad NK en dirección del injerto. Este paciente tuvo injerto posteriormente con otro donador con aloreactividad de células NK en dirección de enfermedad injerto contra tumor. Un paciente recayó a pesar de la respuesta de células NK. El análisis de los mecanismos de escape de tumor reveló que los blastos leucémicos fueron resistentes a la lisis mediada por perforinas. 4 pacientes desarrollaron enfermedad injerto contra huésped grado II pos trasplante, es imposible diferenciar si se debió al injerto ó a las células NK. 2 de 6 pacientes permanecen vivos y estables. 3 murieron secundario a complicaciones infecciosas y una por recaída. (45)

Slavin et al usó células NK activadas por IL2 (CD56+ seleccionadas) seguidas de trasplante haploidéntico de donador relacionado ó no relacionado. Los pacientes con hemopatías malignas (leucemia aguda y linfoma) con edades de 4-63 años tuvieron recaída ó estuvieron en un riesgo muy alto. Los linfocitos donadores se incubaron por 4 días con



IL2 y después seleccionados por marcador CD56+. La pureza de las células CD56+ fue de 120 (10-600) x 10 a la 6 células. La infusión se realizó sin problemas. No se observó injerto contra huésped. Un paciente recayó de LAL y un paciente con síndrome mielodisplásico transplantado de una madre no aloreactiva a KIR alcanzaron remisión. 4 pacientes están vivos, uno con enfermedad 3 sin evidencia de enfermedad a 9-22 meses pos trasplante. (48)

Koehl et al reportó 3 pacientes pediátricos con LAL en recaída múltiple y LMA tratado con transfusiones repetidas de células NK activada por IL2 pos trasplante haploidéntico de donador relacionado. Se demostró la persistencia de blastos en la médula ósea pre trasplante en 3 pacientes. Las diferencias a nivel de KIR en dirección de enfermedad injerto contra leucemia se demostró en todos los pares de donador-receptor. Todos los pacientes alcanzaron remisión completa a las 4 semanas posttrasplante, acompañado de quimerismo de donador completo. La infusión de células NK fue bien tolerada, sólo 2 pacientes murieron de complicaciones relacionadas a trasplante y un paciente murió de recaída. (43)

Se necesitan más estudios para establecer la eficacia y el papel que juegan las diferencias a nivel de alo trasplante de células hematopoyéticas junto con el uso de células NK como efecto antitumor en el tratamiento de algunos tumores.



## CELULAS DENDRITICAS.

El enfoque más común para usar las células dendríticas como vacunas es preparar un gran número de células dendríticas maduras *ex vivo*, cargarlas con antígenos e inyectarlas en el sujeto.

1. Se han descrito 3 métodos en general, que involucran respectivamente células dendríticas en diferenciación por leucoféresis derivado de monocitos con IL4, FSCGM (el enfoque más popular, IL13 ha sido usado en algunos grupos en lugar de IL4.

2. Células progenitoras hematopoyéticas CD34+ con diferenciación mediada por FNT alfa y FSCGM con mezclas de células de Langerhans y células dendríticas (Flt3L ó factor de células madres debe añadirse para expandir las células dendríticas y la diferenciación guiada hacia células de Langerhans al añadir FGT beta al cultivo).

3. Aislamiento directo de células dendríticas por productos de leucoféresis con centrifugación con gradiente de densidad ó con sistemas cerrados disponibles que usan cuentas inmunomagnéticas.

Las cosechas de las células dendríticas de tipo mielóide clásicas y plasmacitoides purificadas de la sangre pueden ser significativamente aumentadas al estimular al paciente con Flt3L previo a leucoféresis, aunque la aprobación farmacéutica de Flt3L no está autorizada. Los 3 tipos de preparaciones de células dendríticas pueden estimular las respuestas de células T antígeno específicas en humanos y se han asociado con respuestas clínicas en pacientes con cáncer.

Las células dendríticas frecuentemente son maduras en cultivos previos a la inyección. Actualmente, muchos laboratorios usan células dendríticas derivadas de monocitos al inducir maduración con un cóctel de IL-1beta, IL-6, FNT alfa y PGE2. Varios grupos han observado que las células dendríticas maduras en esta forma no secretan IL-12p70 bioactiva detectable, pero expresan CCR7 e inducen respuestas de células T CD8+ y Th1. Cómo las células dendríticas inducen estas respuestas de células T está bajo investigación.

La elección del antígeno tumoral es importante. Debido a que las vacunas pueden seleccionar a las células tumorales que escapan a la detección inmune por pérdida de la expresión de antígenos blancos, los antígenos críticos para el crecimiento del tumor son preferidos. Los antígenos peptídicos restringidos al CMH son usados frecuentemente, incluyendo los péptidos aumentados ó alterados que disparan la inmunidad a autoantígenos menos inmunogénicos ó que mejoran la presentación de antígenos ó la afinidad por el receptor de células T. Una desventaja de usar péptidos es que deben ser compatibles con el tipo HLA del paciente, con frecuencia restringiendo los estudios de vacunación de péptidos a individuos con HLA comunes. En resumen, la vida media de los complejos peptídicos puede ser corta y la competitividad puede prevenir el cebado a epítomos de baja afinidad cuando se usan mezclas de péptidos.

Las células dendríticas pueden ser cargadas con proteínas recombinantes ó purificadas, transducidas con vectores virales recombinantes no replicables, ó transducidos con RNA ó menos comúnmente, vectores plásmidos que codifican antígenos asociados a tumor. Todos estos enfoques permiten a las moléculas MHC del huésped seleccionar los epítomos de una secuencia de aminoácidos. La inmunogenicidad se puede aumentar al usar antígenos pareados ó con expresión de otras moléculas inmunogénicas tales como proteínas extrañas

(KLH, citocinas IL12, IL5), moléculas co-estimuladoras (B7-2, CD40L) ó quimosinas (CCL21). Las células dendríticas también pueden ser cargadas con células tumorales completas ó lisados de células tumorales ó células alteradas con RNA completo del tumor, el cual permite la vacunación con el contenido completo antigénico del tumor. Los estudios que comparan las rutas y la frecuencia de inyección, dosis de células dendríticas y subtipos de células dendríticas serán esenciales para optimizar la inmunoterapia con células dendríticas. Las vacunas con células dendríticas se pueden almacenar en congelación previo a la vacunación y son aplicadas intradérmicas, subcutáneas ó intravenosas en dosis de 2 a 100 millones de células. La ruta de administración puede afectar directamente la naturaleza del cebado de células T. Las inyecciones cutáneas pueden ser requeridas para inducir inmunidad a tumores cutáneos, mientras que las inyecciones intravenosas son menos efectivas en la inducción de Th1 pero más efectivas a la inducción de inmunidad humoral. La inyección en ganglios linfáticos ó vasos linfáticos también se ha intentado, pero sólo el 5% ó menos de células dendríticas pueden migrar a ganglios de drenaje seguidos de inyección subcutánea. La inyección directa al tumor está bajo investigación.

#### LECCIONES APRENDIDAS DE ENSAYOS CON VACUNAS DE CELULAS DENDRITICAS INICIALES.

Las vacunas con células dendríticas tienen efectos mínimos adversos y han inducido respuestas Th1 y respuestas de linfocitos T citotóxicos específicos de antígenos en voluntarios sanos y en pacientes con una variedad de cáncer avanzado. La mayoría de los ensayos en paciente con cáncer se han enfocado en la seguridad e inmunogenicidad de las vacunas de células dendríticas y no fueron designadas para evaluar respuestas clínicas. Los ensayos controlados más grandes están bajo estudio para establecer objetivamente la

eficacia clínica al documentar las respuestas siguiendo los criterios estandarizados tales como de la OMS ó RECIS.

Algunas lecciones fundamentales aprendidas de los ensayos con vacunas de células dendríticas más pequeños publicados, aunque no han llevado a un consenso sobre la dosis ó fuente de antígenos óptima, dosis de células dendríticas, subtipo de célula dendrítica ó frecuencia, ó ruta de administración. La mayoría de los investigadores ahora evitan la administración intravenosa, ya que los estudios han sugerido que la vacunación intradérmica ó subcutánea lleva a mejor migración de células dendríticas a los ganglios linfáticos y aumentan la polarización de Th1. Varios estudios indican que las células dendríticas necesitan madurarse para generar respuestas inmunes antígeno específicas en humanos. La inyección de voluntarios sanos con células dendríticas inmaduras cargadas con antígenos se ha asociado con respuestas de tolerancia y en un ensayo randomizado en pacientes con melanoma metastásico comparando células dendríticas inmaduras con pulsos de péptidos administrados con adyuvantes y FSCGM demostró significativamente menor inmunogenicidad en pacientes que recibieron la vacuna. En resumen, en la comparación directa de células dendríticas maduras e inmaduras cargadas con péptidos en paciente con melanoma metastásico demostraron que sólo las células dendríticas maduras inducían respuestas de linfocitos T citotóxicos antígeno específicas.

La capacidad de las técnicas específicas y sensibles a monitorizar la inducción de respuestas de células T antígeno específicas ha provisto una mirada a la capacidad de las CD de inducir respuestas primarias antígenos tumorales. Por ejemplo, es claro que la inmunización con CD puede producir respuestas de células T CD8<sup>+</sup> y Th1 específicas a los antígenos inmunizantes (medidas como ELISPOT, proliferación de linfocitos, ensayos

citológicos, tinción tetrámera de péptido de CMH). La correlación con regresión del tumor ó estabilización de la enfermedad ha sido variable y necesita establecerse en estudios más grandes.

Las respuestas clínicas objetivas más impresionantes se han asociado con el uso de proteínas enteras, células tumorales muertas ó lisados de tumor. Esto puede ser porque las fuentes de antígeno exógenas que fijan al CMH II para generar la ayuda de células T CD4+ y también fijan al CMH I al presentar un cruce para generar CTL CD8+. Utilizando idiotipos específicos de tumor, Timmerman et al reportó con respuestas completas duraderas y una respuesta parcial entre 10 pacientes con enfermedad medible en la fase piloto del estudio. 25 pacientes más fueron vacunados después de la mejor respuesta clínica alcanzada con la quimioterapia y la regresión de tumor objetiva se vió en 4 de 18 pacientes con enfermedad residual. Holt reportó un ensayo de 35 pacientes con carcinoma de células renales metastásicas que recibieron inyecciones mensuales de células dendríticas derivadas de monocitos maduros cargados con lisados de tumor. De los 27 pacientes valorables, 2 tuvieron respuesta completa objetiva, 1 tuvo respuesta parcial y 7 tuvieron enfermedad estable. Las respuestas objetivas y la estabilización de la enfermedad fueron de larga duración, con rango de 6 meses a 3 años. Las respuesta completas duraderas fueron reportadas por O Rourke et al en un ensayo de 17 pacientes con melanoma metastásico que recibieron células dendríticas derivadas de monocitos maduras cargadas con células tumorales irradiadas autólogas. Por criterios de OMS hubieron 3 respuestas completas (con remisiones duraderas de más de 3 años) y 3 respuesta parciales entre 12 pacientes que completaron las vacunaciones. Un paciente con enfermedad progresiva fue vacunado cada 6 semanas por más de 3 años indicando que la vacunación de mantenimiento puede ser útil



aun para pacientes con enfermedad progresiva lenta. Finalmente otro estudio que usó lisados de tumor autólogos con pulsos de células dendríticas demostró respuestas objetivas en pacientes con linfoma de células T cutáneo refractario después de vacunación intraganglionar.

#### TERAPIAS DE COMBINACION.

Cui et al demostró que la transducción células progenitoras hematopoyéticas con un modelo antígeno tumoral y transplantando estas células en un ratón receptor irradiado resultó en la expresión del antígeno en las células dendríticas derivadas del donador en los órganos linfoides del huésped. Cuando se combinó con agentes sistémicos que generaron y activaron células dendríticas y transferencia adoptiva de células T del donador, este tratamiento produjo expansión de células T antígeno específicos y tratamiento exitoso del tumor portador del antígeno.

La vacunación antitumor en combinación con los tratamientos que tienen como objetivo el aporte vascular del tumor se han mostrado promisorios en modelos de ratones así como la vacunación durante la recuperación linfoide posterior a un trasplante de médula ósea.

#### USO DE CELULAS DENDRITICAS REGULADORAS PARA LA INDUCCION DE TOLERANCIA AL TRANSPLANTE.



La inmunoterapia basada en células dendríticas ha probado ser altamente selectiva para inducir tolerancia al injerto en trasplante de células hematopoyéticas ó de órganos ó inducir tolerancia en pacientes con enfermedad autoinmune. Estudios en ratones y humanos han demostrado que las células dendríticas reguladoras pueden ser inducidas ex vivo al cultivar células dendríticas inmaduras al modular citocinas ó factores de crecimiento tales como IL 10 y factor de crecimiento tumoral beta. En un modelo de ratón para el tratamiento de la leucemia las células dendríticas reguladoras se han usado para tratar enfermedad injerto contra huésped y recaídas de leucemia junto con trasplante alogénico de médula ósea. (56)

#### INFUSION DE LINFOCITOS DE DONADOR EN RECAIDA POSTTRANSPLANTE.

La infusión de linfocitos de donador consiste en la transfusión de células T previamente estimuladas con antígenos tumorales específicos e infundidas en el receptor posterior a trasplante de células madres hematopoyéticas. La infusión retardada de los linfocitos T del donador toma ventaja de la tolerancia inducida por el trasplante de células progenitoras y así producir menor incidencia de enfermedad injerto contra huésped. (57)

Los mejores resultados obtenidos con infusión de linfocitos de donador ha sido en tratamiento de recaídas de leucemia mieloide crónica (LMC) posterior a trasplante, en los cuáles entre el 70 y 80% de los pacientes han obtenido respuesta hematológica y citogenética completa. (58,59,60,61).

Baron et al, en un estudio con 24 pacientes con enfermedades hematológicas malignas (LAL, LMA, LMC, LNH), con edades entre 14-56 años, concluyó que el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica seleccionado de células CD34+

seguido de infusión de linfocitos de donador depletado en CD8+ de manera preventiva, es una estrategia prometedora para separar el efecto de injerto contra leucemia del EICH, al reportar incidencias de EICH agudo, crónico y crónico extendido de 13%,12% y 0%.(62)

Kolb et al, en 31 pacientes con LMC que recayeron posterior a trasplante, realizó en 21 pacientes infusión de linfocitos de donador contra 10 pacientes que recibieron imatinib a dosis de 400-800 mg al día dependiendo de la respuesta. Las dosis de células infundidas varió de  $1 \times 10^8$  CD3+/kg hasta  $5 \times 10^5$  CD3+/kg a dosis escaladas cada 4-6 semanas siempre y cuando no hubiera presencia de EICH. El 60% de los pacientes que recibieron imatinib recayeron y recibieron infusión de linfocitos de donador con lo cual se logró respuesta completa. En cuanto a los pacientes con infusión de linfocitos de donador la tasa de mortalidad fue del 10% atribuido a EICH y la supervivencia total a 5 años fue del 76% Estos datos sugieren que el imatinib no provee la cura definitiva en LMC en recaída pos trasplante en contraste con los resultados de infusión de linfocitos de donador. (63)

Schmid et al, en un estudio realizado en 399 adultos con tiempo de recaída pos trasplante de 5.5 meses, comparó el pronóstico de aquéllos pacientes que recibieron infusión de linfocitos de donador (171 pacientes) vs aquéllos que no lo recibieron. La dosis media de células infundidas fue de  $2.8 \times 10^8$  cels CD3+/kg. Se logró remisión posterior a la infusión en el 34% de los casos y el 66% tuvieron enfermedad persistente. La incidencia de EICH aguda fue de 43% y EICH crónica de 46%. La supervivencia total a 2 años en el grupo de infusión de linfocitos de donador fue de 20%. Entre los factores pronósticos favorables para supervivencia fueron: pacientes jóvenes, de sexo femenino, citogenética favorable, antecedente de acondicionamiento reducido e intensidad para trasplante, mayor intervalo de tiempo entre el trasplante y la recaída, baja carga tumoral al momento de la recaída y

tiempo en alcanzar la remisión con infusión de linfocitos de donador. La presencia de EICH posterior a la infusión de linfocitos de donador se asoció con supervivencia inferior. (64)

Huang et al, por su parte en 21 pacientes con recaída posterior a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas haploidéntico, con recaída a los 4.5 meses realizó infusión de linfocitos de donador. Las enfermedades estudiadas fueron LAL, LMA y LMC. Las dosis variaron de 1 a  $5.6 \times 10^6$  células CD3+/kg. El evento libre de leucemia a 2 años fue de 40%. 11 de los 21 pacientes tuvieron EICH y de estos, 3 murieron a consecuencia de ésta. Este estudio demostró que el tratamiento en etapa temprana de recaída fue predictivo de mayor posibilidad de remisión completa y supervivencia libre de leucemia, lo cual indica que la infusión de linfocitos de donador debe ser lo antes posible. Es el primer estudio que demuestra que la infusión de linfocitos de donador es una terapéutica efectiva en pacientes con recaída por hemopatías malignas posterior a trasplante haploidéntico y que para ser efectivo se debe disminuir la incidencia de EICH sin afectar el efecto injerto contra leucemia (65)

Se han realizado estudios en los cuáles no se ha aplicado quimioterapia previo a infusión de linfocitos de donador con el fin de disminuir la incidencia de EICH. El primer estudio descrito fue en una paciente con leucemia mielomonocítica juvenil, la cual recayó posterior a trasplante se trató con infusión de linfocitos de donador sin QT de acondicionamiento y la paciente al momento de la publicación se encontraba en remisión, con EICH grado II e hiperesplenismo como complicación. (66). Miller et al, en un estudio en que comparó la infusión de linfocitos de donador con quimioterapia a base de ciclofosfamida/fludarabina vs ILD sin quimioterapia, reportó mayor incidencia de EICH, así como linfopenia en el grupo que recibió QT+ ILD. El 45 % de las muertes en este grupo fue secundario a EICH lo cual

influyó para detener el estudio. Así también se encontró que la QT causó expansión de los linfocitos in vivo con incremento en la activación inmune demostrado por las altas tasas de EICH severo agudo (67).

Dudley et al fueron los primeros en demostrar que la aplicación de quimioterapia basada en ciclofosfamida/fludarabina alteraba el medio del huésped y permitir la expansión in vivo de linfocitos T citotóxicos específicos para melanoma. (68)

Actualmente los estudios de investigación van dirigidos a la mejor manera de disminuir el EICH posterior a la infusión de linfocitos de donador, ya sea con regímenes de acondicionamiento de intensidad baja, ó bien sin recibir quimioterapia previo a la infusión, sin poner en peligro el efecto injerto contra tumor que se pretende alcanzar con esta modalidad terapéutica, por lo que lo mejor está por venir.

## BIBLIOGRAFIA.

1. Davis, I. Jefford, M. Parente, P, Cebon J. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 73:3-29;2003.
2. Coley, W.B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am J Med. Sci.* 105, 487-511;1893.
3. Leech, P.N. Erysipelas and prodigious toxins (Coley). *J Am Med. Assoc.* 103, 1067-1069; 1934.
4. Starnes, C.O. Coley's toxins in perspective. *Nature* 357, 11-12; 1992.
5. Lamm, D.L., Blumenstein, B.A., Crawford, E.D., Montie, J.E., Sacrdino, P., Grossman, H.B., et al. A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacilli Calmette-Guérin for transitional-cell carcinoma of the bladder. *N. Engl. J. Med.* 325, 1205-1209;1991
6. June C.H. Principles of adoptive T cell cancer therapy. *J Clin Invest* 117:1204-1212;2007.
7. Beyer, M. Schultze J. Regulatory T cells in cancer. *Blood* 2006 108;804-811.
8. Lizee, G. Radvanyi L. Overwijk, W. Hwu, P. Improving antitumor immune responses by circumventing immunoregulatory cells and mechanism. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (16) 2006.
9. Sakaguchi S. Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-64.
10. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, et al. CD4(+) CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; 16: 311-23.
11. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25 (+) CD4 (+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000; 192: 295-302.
12. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp 3. *Science* 2003; 299: 1057-61.
13. Wang HY, Lee DA, Peng G, et al. Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity* 2004;20:107-18.
14. Kronenberg M, Rudensky A. Regulatory of immunity by self-reactive T cells. *Nature* 2005; 435: 598-604.
15. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996;184:387-96.
16. McHugh RS, Shevach EM. Cutting edge: depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells is necessary, but not sufficient, for induction of organ-specific autoimmune diseases. *J Immunol* 2002;168:5979-83.
17. Shimizu J, Yamasaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 1999;163: 5211-8.
18. Omizuka S, Tamara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 1999;59:3128-33.



19. Golgher D, Jones E, Powrie F, Elliott T, Gallimore A. Depletion of CD 25+ regulatoru cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur J Immunol* 2002; 32: 3267-75.
20. Antony PA, Piccirillo CA, Akpinarli A, et al. CD8+T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 2005;174:2591-601.
21. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, eta l. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10:942-9.
22. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type I T regulatory cells. *Immunol Rev* 2001;182:68-79.
23. Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF-B in the differentiation and effector function of T regulatoru cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129:263-76.
24. Kitani A, Chua K, Nakamura K, Strober W. Activated self-MHC reactive T cells have the cytokines phenotype of Th3/T regulatory cell I T cells. *J immunol* 2000;165:691-702.
25. Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Yonezawa T, Kimura T. Reduced expression of the regulatory CD4+ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:617-27.
26. Khoo JY, Proctor IE, Macpherson AJ. CD 4+ T cell down-regulation in human instestinal mucosa: evidence for intestinal tolerance to luminal bacterial antigens. *J Immunol* 1997;158:3626-34.
27. Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ et al. IL 10 producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients *J Clin Invest* 2000;105:1317-25.
28. Plebanski M, Flanagan KL, Lee EA, et al. Interleukin 10 mediated immunosupresion by a variant CD 4 T cell epitope of Plasmodium falciparum. *Immunity* 1999;10:651-60.
29. Akdis CD, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Ciin Invest* 1998;102:98-106.
30. Cavani A, Nasorri F, Prezzi C, Sabastiani S, Albanesi C, Girolomoni G. Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J Invest Dermatol* 2000;114:295-302.
31. Brady MS, Eckels DD, Lee F, Ree SY, Lee JS. Cytokine production by CD4+ T-cells responding to antigen presentation by melanoma cells. *Melanoma Res* 1999;9:173-80.
32. Chakraborty NG, Li L, Sporn JR, Kurtzman SH, Ergin MT, Mukherji B. Emergence of regulatory CD4+ T cell response to repetitive stimulation with antigen-presenting cells in vitro: implications in designing antigen-presenting cell-based tumor vaccines. *J Immunol* 1999; 162: 5576-83.
33. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev immunol* 20001;19:683-765.
34. De Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 1993;150:4754-65.
35. Taga K, Mostowski H, Tosato G. Human interleukin-10 can directly inhibit T cell growth. *Blood* 1993;81-2964-71.



36. Bejarano MT, de Waal Malefyt R, Abrams JS, et al. Interleukin 10 inhibits allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses generated in primary mixed lymphocyte cultures. *Int Immunol* 1992;4:1389-97.
37. Georgescu L, Vakkalanka RK, Elkon KB, Crow MK. Interleukin-10 promotes activation-induced cell death of SLE lymphocytes mediated by Fas ligand. *J Clin Invest* 1997;100:2622-33.
38. Ayala A, Chung CS, Song GY, Chaundry IH. IL-10 mediation of activation-induced TH1 cell apoptosis and lymphoid dysfunction in polymicrobial sepsis. *Cytokine* 2001;14:37-48.
39. Peng L, Kjaergaard J, Plautz GE, et al. Tumor-induced L-selectin high suppressor T cells mediate potent effector T cell blockade and cause failure of otherwise curative adoptive immunotherapy. *J Immunol*. 2002;169:4811-4821.
40. Turk MJ, Guevara-Patiño JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Sakaguchi S, Houghton AN. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med*. 2004;200:771-782.
41. Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, et al. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:419-424.
42. Yu P, Lee Y, Liu W, et al. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med*. 2005; 201: 779-791.
43. Linehan DC, Goedegebuure PS. CD25+CD4+ regulatory T cells in cancer. *Immunol Res*. 2005; 32:155-168.
44. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*. 1999;163:5211-5218.
45. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1999;59:3128-3133.
46. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. Regulatory CD4+CD25+ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res*. 2001;61:4766-4772.
47. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*. 2002;169:2756-2761.
48. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 2003;98: 1089-1099.
49. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res* 2003;9: 4404-4408.
50. Kono K, Kawaida H, Takahashi A, et al. CD4+CD25(high) regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55: 1064-1071.

51. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10:942-949.
52. Wolf D, Rumpold H, Koppelstatter C, et al. Telomere length of in vivo expanded CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells is preserved in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2005;1-11.
53. Marshall NA, Chritie LE, Munro LR, et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2004; 103: 1755-1762.
54. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res.* 2005;11: 1467-1473.
55. Dannull J, Su Z, Rizziere D, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest* 2005, 115:3623-3633.
56. Passweg JR, Stern M, Uharek L, Tichelli A. Use of natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2005;35:637-643.
57. Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 2008;112:4371-4383.
58. Slavin S, Naparstek E, Nagler A, et al. Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87:2195-2204.
59. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood.* 1995;86:2041-2050.
60. Hertenstein B, Wiesneth M, Novotny J, et al. Interferon alpha and donor buffy coat transfusions for treatment of relapsed chronic myeloid leukemia after allogeneic marrow transplantation (abstract). *Transplantation* 1993;56:1114-1118.
61. Helg C, Roux E, Beris P, et al. Adoptive immunotherapy for recurrent CML after BMT. *Bone Marrow Transplant.* 1993;12:125-129.
62. Baron F, Siquet J, et al. Preemptive immunotherapy with CD8- depleted donor lymphocytes after CD34- selected allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Haematologica.* 2002;87:78-88.
63. Kolb HJ, Weisser M, Tischer J, et al. Comparison of DLI vs imatinibi for patients with CML who relapsed after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006;91:663-666.
64. Schmid C, Labopin M, Nagler A, et al. DLI in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem cell transplantation. *JCO* 2007(25);4938-4943.
65. Huang XJ, Liu DH, Liu KY, Xu LP, Chen H. Donor lymphocyte infusion for the treatment of leukemia relapse after HLA mismatched/haploidentical T cell replete hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2007;92:414-417.
66. Worth A, Rao K, Webb D, Chessels J, Passmore J, Veys P. Successful treatment of juvenile myelomonocytic leukemia relapsing after stem cell transplantation using donor lymphocyte infusion.
67. Miller JS, Weisdorf D, Burns L, Slungaard A, Wagner JE, Verneris MR, et al. Lymphodepletion followed by donor lymphocyte infusion (DLI) causes significantly more acute graft-versus-host disease than DLI alone. *Blood* 2007;110:2761-2763.

68. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 2002;298:850-854.