



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO DE FIN DE GRADO
CÉLULAS NATURAL KILLER Y CÁNCER

Autor: ANDREA ALICE KONTA

TUTOR: MARTA RODERO MARTÍNEZ

CONVOCATORIA: JUNIO 2017

ÍNDICE

1. Resumen y palabras clave	3
2. Abstract	3
3. Introducción	3
4. Objetivos	4
5. Materiales y métodos	4
6. Resultados y discusión	4
6.1 Cáncer y desarrollo del proceso tumoral	4
6.2 Células NK	7
6.2.1 Introducción	
6.2.2 Fenotipo	
6.2.3 Receptores de inhibición	
6.2.4 Receptores de activación	
6.2.5 Funciones/Biología	
6.2.6 Citoquinas y células NK	
6.3 Inmunoterapia del cáncer con células NK	11
6.3.1 Tratamientos con IL-2 y células NK autólogas	
6.3.2 Tratamiento mediante células NK alogénicas	
6.3.3 Tratamiento con células NK que expresan el receptor de antígeno quimérico (CAR)	
6.3.4 Tratamiento a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)	
7. Conclusiones	17
8. Bibliografía	18

1. Resumen y palabras clave

El cáncer es uno de los mayores problemas de salud pública global a día de hoy siendo, según datos del INE(Instituto Nacional de Estadística), la primera causa de muerte en los hospitales españoles. Múltiples frentes en investigación y tratamiento se encuentran abiertos actualmente y uno de ellos es la inmunoterapia con células natural killer (NK). En ella, mediante diferentes técnicas, se usan a las células NK para detectar y erradicar células tumorales. Pueden usarse bien como monoterapia o bien en combinación con otras células u otros fármacos, como los anticuerpos monoclonales.

Palabras clave: cáncer, inmunoterapia, células natural killer, citotoxicidad.

2. Abstract

Cancer is one of the major global public health issues nowadays. According to the Statistics National Institute's data, cancer is the first cause of death in Spanish hospitals. Multiple research pathways and treatments are being looked into at the moment and one of them is immunotherapy with Natural Killer(NK) cells. Its purpose is to use NK cells to detect and eradicate malign cells. They can be used either as monotherapy or combined with other cells or drugs, as mAbs (monoclonal antibodies).

Key words: cancer, immunotherapy, Natural Killer cells, cytotoxicity.

3. Introducción

La inmunoterapia ha sido un sueño de muchos investigadores desde hace décadas. La agresividad de los tratamientos iniciales con citostáticos del siglo XX y las bajas tasas de supervivencia dejaban clara la necesidad de encontrar otras formas de tratamiento. Conseguir que el propio sistema inmune del organismo luchase contra las células malignas y las eliminase era una idea muy atractiva pero también ardua y complicada, debido a la complejidad del cuerpo humano y de la enfermedad. Tras décadas de investigación para superar todo tipo de dificultades, lo que era un sueño hace tiempo se ha convertido en realidad a día de hoy. Aún hacen falta realizar muchas investigaciones acerca del uso del sistema inmune y las células natural killer en el tratamiento del cáncer pero ya se ha iniciado el camino.

4. Objetivos

El objetivo de este trabajo se basa en la revisión bibliográfica sobre la inmunoterapia con células NK para el tratamiento del cáncer, centrándose en artículos recientes para ofrecer una visión general y actualizada sobre el tema en cuestión. De esta manera, ofrece un punto de vista global sobre las funciones biológicas de estas células y sus características enfocándose hacia su utilidad en la inmunoterapia. Además, se comentan brevemente las diferentes técnicas del tratamiento del cáncer con células NK que pueden aplicarse hoy en día.

5. Material y métodos

Se ha realizado una revisión bibliográfica de la literatura científica, principalmente artículos, centrada en cáncer e inmunoterapia. Para ello se ha hecho uso de la base de datos electrónica MEDLINE(PUBMED), de la página web de la SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica) o de libros de inmunología. Se han excluido aquellas publicaciones que no estuviesen redactadas en inglés o en español.

6. Resultados y discusión

6.1. Cáncer y desarrollo del proceso tumoral

Según la SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica) el cáncer “engloba un grupo de numerosas enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células anormales, que se dividen, crecen y se diseminan sin control en cualquier parte del cuerpo”.

Aunque ha sido a partir del siglo XX en adelante cuando se ha acentuado más la atención sobre esta enfermedad^{1,2} la primera descripción sobre el cáncer, concretamente sobre un cáncer de mama, se realiza en el papiro Edwin Smith, escrito en el año 3000 a.c. Por otra parte, descripciones de tumores de tejidos blandos o grasos y referencias a posibles tumores de piel, útero, estómago y colón se pueden encontrar en el papiro de Ebers, escrito en el año 1500 a.c.³ Fue a partir de 1910 cuando comenzaron a hacerse muchos avances en la investigación sobre esta enfermedad. De hecho, entre 1910 y 1940 hubo más avances que en los siglos anteriores combinados. El descubrimiento de diferentes carcinógenos, de condiciones pre-cancerígenas (por ejemplo, en 1918 se observó que el carcinoma de estómago estaba relacionado con las úlceras de estómago) o el de los cánceres hereditarios (que se describieron por primera vez en 1913)

comenzaron a cambiar las antiguas teorías sobre la generación del cáncer y su tratamiento. A pesar de los muchos avances que se consiguieron en esa época, en 1930 el cáncer ya era la segunda causa de muerte en Estados Unidos⁴.

A partir de principios del siglo XX y hasta el día de hoy, se han hecho muchos avances y se han conseguido grandes logros con respecto a esta enfermedad pero, aún así, el cáncer sigue siendo un gran problema de salud pública global. En el año 2012 hubo 14 millones de casos nuevos de cáncer en el mundo y se espera que la cifra alcance los 24 millones en 2035⁵.

En España concretamente, de acuerdo a los últimos datos proporcionados por el Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III, la primera causa de muerte entre los varones en el año 2014 fueron los tumores (65.014 fallecidos). En el caso de las mujeres, fue la segunda causa de muerte con 41.020 fallecidas, sólo por detrás de las enfermedades cardiovasculares (63.546 muertes). Por otra parte, acorde a los datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística (INE), la primera causa de muerte en los hospitales españoles fueron los tumores, que causaron el 24,2% de los fallecimientos en el año 2015.

Las anormalidades por las que se caracterizan las células cancerosas suelen producirse a partir de mutaciones en genes que codifican para proteínas que regulan el ciclo celular. Al producirse estas mutaciones, los inhibidores del ciclo celular y los reguladores positivos del mismo se encuentran alterados y esto da lugar a una división celular incontrolada⁶.

Las células poseen diferentes mecanismos para reparar los daños producidos en el ADN y la división incontrolada. Cuando se detectan daños en los genes de las células, enzimas como polimerasas, ligasas o nucleasas entran en acción para reparar estos daños y, en caso de no conseguirse, se activa la muerte celular programada (apoptosis) que, mediante la activación de la vía de las caspasas se encarga finalmente de lisar la célula diana, produciendo su muerte^{7,8}. Por tanto, para conseguir evadir estos mecanismos y producirse la transformación de la célula sana en célula cancerígena, es necesaria la presencia de varias mutaciones que permitan una mayor división que hagan que se eviten los sistemas de control del ciclo celular y que permitan una evasión de la apoptosis⁸.

Por tanto, si una célula sufre una mutación que afecte a la actividad de algún inhibidor del ciclo celular (por ejemplo, la proteína p53, que detiene el ciclo si detecta daños en el ADN y es una de

las mutaciones más habituales en el cáncer) sus células descendientes se multiplicarán con mayor rapidez. Esto podría dar lugar a un tumor benigno, es decir una masa de células con elevada capacidad de división pero sin capacidad de invadir otros tejidos (metastatizar)⁹. Más adelante, la presencia de una segunda mutación que aumentase la acción de los reguladores positivos del ciclo celular (por ejemplo, la proteína Ras) provocará que se estimulando continuamente la división celular^{10, 11}. Éstas y varias mutaciones más, conseguirían transformar células normales en cancerosas y dar lugar a tumores malignos, que son grupos de células capaces de invadir otros tejidos y diseminarse por todo el organismo (metástasis)⁹.

Otro rasgo muy importante de las células tumorales es su inmortalidad a la hora de replicarse. Esto se debe fundamentalmente a la reactivación de la telomerasa, una enzima que revierte el desgaste de los extremos de los cromosomas que se produce con cada división celular, pues la longitud de estos extremos está relacionada con la longevidad celular⁶.

Pero no sólo los factores biológicos y genéticos influyen en el desarrollo de esta enfermedad. El cáncer es una enfermedad multifactorial donde los factores físicos (radiación), químicos (compuestos del tabaco, alcohol, contaminación aérea...) o incluso virus (como el virus del papiloma humano) son también determinantes para su desarrollo⁶.

Debido a su gran complejidad, el cáncer sigue siendo uno de los problemas de salud globales más importantes de nuestro siglo. Múltiples investigaciones frente a esta enfermedad están siendo realizadas y uno de ellos es la inmunoterapia, que trata de estimular el sistema inmune para que éste sea capaz de detectar y erradicar a las células tumorales¹². Una de las múltiples opciones dentro de la inmunoterapia, es la terapia con células Natural Killer (NK).

6.2. Células NK

6.2.1. Introducción

Las células NK fueron identificadas a mediados de los años 70 como una subpoblación de linfocitos que se caracteriza por ser de mayor tamaño que los linfocitos B y T, y ser capaces de reconocer y eliminar aquellas células que han sido infectadas por virus o que son tumorales sin necesidad de una sensibilización previa^{13, 14}. Las células NK se desarrollan en la médula ósea a partir del progenitor linfoide, tras lo cual se diseminan por los tejidos tanto linfoides como no linfoides, siendo éstos la propia médula ósea, el bazo, los nódulos linfáticos, la sangre periférica, el hígado y los pulmones. Éste tipo de células conforma entre el 10-15% de los linfocitos circulantes y se caracterizan por expresar los marcadores de superficie CD56 y CD16 pero no CD3(característico de Linfocitos T)¹⁴.

6.2.2. Fenotipo

Según la densidad de los marcadores CD56 y CD 16 presentes en su superficie, las células NK se dividen en dos subgrupos: CD56^{dim} y CD56^{bright}. Las CD56^{dim} presentan una baja expresión del marcador CD56 y alta del CD16, constituyen un 90-95% de la población de células NK de la sangre periférica y tienen una elevada capacidad citotóxica. Las CD56^{bright} presentan una elevada expresión del marcador CD56 y baja del CD16, constituyen alrededor de un 10% de las células NK presentes en sangre periférica y son capaces de secretar citoquinas inmunorreguladoras tras su activación¹⁴. El marcador CD16 se caracteriza por ser un receptor de baja afinidad para el fragmento Fc de la inmunoglobulina IgG y es capaz de provocar la activación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, de ahí que el subgrupo de células NK con mayor expresión de este marcador, destaque por una mayor actividad citotóxica¹⁵.

Las células CD56^{dim}, a diferencia de las CD56^{bright}, se caracterizan por presentar una elevada densidad de receptores KIR (“killer-cell immunoglobulin-like receptor”) y baja de receptores NKG2, lo que implica el tipo de células tumorales que van a eliminar, así como las propiedades aloreactivas de las CD56^{dim}. Las CD56^{bright} de los nódulos linfáticos se cree que son capaces de modular la respuesta inmune regulando las células dendríticas y estimulando la activación de linfocitos T hacia un perfil Th1. Por tanto, las células NK influyen tanto en la respuesta innata como en la adaptativa del sistema inmune mediante la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y mediante la interacción célula a célula¹⁴.

6.2.3. Receptores de Inhibición

Las células NK son capaces de reconocer moléculas del CMH-I (complejo mayor de histocompatibilidad) del tipo HLA-A, HLA-B y HLA-C mediante los receptores de la familia KIR, independientemente del tipo de péptido presente la molécula del CMH-I.

La interacción KIR/CMH-I provoca una señal inhibitoria a la célula NK a través de los motivos ITIM (intracellular tyrosine-based inhibitory motifs) presentes en sus receptores. Por tanto, aquellas células que tengan disminuida la expresión de CMH-I serán más susceptibles a la acción citotóxica de las células NK debido a que éstas no recibirán la señal inhibitoria necesaria que evite la destrucción de la célula diana.

Otra familia de receptores inhibidores, distintos estructuralmente a los KIR, son los CD94/NKG2A, que también reconocen moléculas del CMH-I del tipo HLA-E (antígeno leucocitario humano E). La interacción entre NKG2A/HLA-E, como en el caso anterior, envía señales inhibitorias a la célula NK y evita la acción de su mecanismo citotóxico¹⁶.

6.2.4. Receptores de activación

Las células NK expresan en su superficie tanto receptores activadores KIR2DS y KIR3DS; NKG2C, NKG2E/H y NKG2F; como receptores citotóxicos (NKp30, Nkp44 y NKp46); Nkp80, DNAM-1 y 2B4¹⁴. Éstos, al igual que los receptores de inhibición, también se caracterizan por presentar vías intracelulares de tirosina las cuales transmiten la señal activadora a la célula a través de motivos ITAMs (intracellular tyrosine-based activation motifs)¹³.

Algunos de estos receptores se unen a proteínas propias que se encuentran sobre-expresadas en células alteradas o infectadas. El receptor NKG2D reconoce proteínas de unión UL16 (UL16-binding protein) y genes A/B del complejo mayor de histocompatibilidad I (MICA/MICB)¹³. Los receptores citotóxicos (NKp30, NKp44, NKp46) naturales reconocen heparina sulfato que expresan las células malignas en su superficie. El receptor NKp30 también reconoce determinadas moléculas de HLA-B expresadas en situaciones de estrés celular o en células alteradas (BAT3 y B7H6) y proteínas de citomegalovirus^{13, 14} mientras que los receptores Nkp44 y Nkp46 pueden reconocer también hemaglutininas de los virus influenza y sendai. NKp44 por sí mismo se une a glicoproteínas de las envolturas de los virus del dengue y del Oeste del Nilo¹⁷ y

Nkp46 es capaz de unirse a vimentina expresada en la superficie de células infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*¹⁶.

DNAM-1, NKp80 y 2B4 (CD244) se unen a proteínas sobre expresadas tanto en células normales como malignas y el receptor 2B4, a su vez, reconoce LB infectadas por virus Epstein-Barr¹³.

La gran mayoría de las células de nuestro organismo expresan en su superficie moléculas del CMH-I. Esta molécula actúa como ligando de los receptores inhibitorios presentes en la superficie de las células NK¹⁴.

Sin embargo muchas de las células tumorales o infectadas por virus disminuyen la expresión de CMH-I en su superficie para no ser detectadas por los linfocitos T citotóxicos y evitar su eliminación. No obstante, esto las hace susceptibles al efecto citotóxico de las células NK, puesto que sus receptores de inhibición detectan esta falta de CMH-I y ejercen por tanto su efecto citotóxico sobre las mismas¹⁴.

Al encontrarse en contacto con la célula diana, las células NK reciben un conjunto de señales de activación e inhibición mediante los receptores anteriormente mencionados y si el umbral de activación alcanzado supera al de inhibición las células NK ejercerán el mecanismo citotóxico¹⁶.

6.2.5. Funciones/Biología

Las células NK son un tipo de linfocitos citotóxicos que contribuyen a la defensa del organismo, por parte del sistema inmune, frente a procesos infecciosos o tumorales. Son capaces de lisar células diana sin necesidad de sensibilización previa a través de tres vías principalmente: a) Citotoxicidad directa mediante la liberación de perforinas y granzimas de sus gránulos que inducen la apoptosis de las células diana¹³. b) Lisis celular mediante un mecanismo no secretor a través de la activación de las vías de apoptosis por ligandos de la familia del TNF, como FasL (Fas ligando) o TRAIL, que las células NK expresan en su superficie¹³. Estos ligandos se presentan en mayor densidad en las células CD56^{dim} y provocan una apoptosis más lenta que el mecanismo citotóxico anterior de perforina/granzima¹⁶. En este caso, la unión, por ejemplo, de la molécula Fas (CD95) a su ligando FasL (CD95-L) produce la polimerización del receptor y la agregación de sus dominios de muerte intracitoplasmáticos, lo que finalmente desemboca en la activación de la vía de las caspasas, produciéndose la apoptosis celular dependiente de esta vía¹⁸.¹⁹ c) Lisis mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) por activación del

receptor CD16, que se une a la fracción Fc de la inmunoglobulina IgG que se encuentra fijada a los antígenos expresados sobre la superficie de la célula diana¹³.

Las células NK son capaces de regular diferentes células del sistema inmune ya sea por contacto directo o mediante la liberación de citoquinas. La mayor fuente de IFN- γ dentro del organismo proviene de las células NK y esta citoquina es esencial en la activación de los macrófagos por la vía clásica y tras la explosión respiratoria provocarán la liberación de TNF el cual generará trombosis en los vasos que irrigan el tumor provocando una disminución del mismo. Además el IFN- γ , favorece la diferenciación de linfocitos T hacia un perfil Th1 y ayuda a desencadenar la respuesta citotóxica de los linfocitos T citotóxicos (LTC)¹³.

Si embargo, las células NK también son capaces suprimir la respuesta de LT mediante la liberación de citoquinas inmunosupresoras como la IL-10 y el TFG-beta^{20, 13}.

6.2.6. Citoquinas y células NK

Las células NK son capaces de regular la respuesta inmune adaptativa mediante la producción de citoquinas y a su vez diferentes citoquinas, están implicadas en el desarrollo, proliferación y el correcto funcionamiento de las células NK^{21, 22}.

Así las citoquinas IL-2, IL-15, IL-18, IL-21 e IFN-alfa son necesarias para que las células NK se activen y actúen de forma correcta frente a sus células diana. Por otra parte, TGF-beta inhibe la activación de las células NK²³.

La IL-2 es producida por LT activados y por células dendríticas ante estímulos microbianos y estimula la supervivencia de las células mediante la inducción de mecanismos anti-apoptosis. Se encarga también de estimular secreción de IFN-gamma, la citotoxicidad y la proliferación de las células NK²³.

La citoquina IL-15 también estimula la supervivencia celular de la misma manera que la IL-2 y regula la activación, proliferación y citotoxicidad celular²³. Esta es una citoquina producida por macrófagos y células dendríticas frente a agentes infecciosos u otros estímulos ambientales y es capaz de activar a las células NK en reposo con mayor eficacia que la IL-2 y, a diferencia de IL-2 que a altas concentraciones administradas produce toxicidad en el organismo, la IL-15 no la genera y activa la expansión de ambas subpoblaciones de células NK, CD56^{bright} y CD56^{dim} (las bajas dosis de IL-2 estimulan CD56^{bright})^{14, 23}.

La citoquina IL-18, secretada por macrófagos en respuesta a LPS (lipopolisacárido expresado en

la membrana externa de bacterias gram negativas) y otros productos microbianos, estimula la migración de células NK hacia los nódulos linfáticos, donde entran en contacto e interaccionan con células dendríticas, facilitando así la comunicación entre ellas²³.

La IL-21, es secretada por células dendríticas y linfocitos Th1 frente a estímulos infecciosos, estimula la supervivencia, citotoxicidad (caracterizada por la producción de intermediarios de oxígeno (ROI) o de nitrógeno (RNI)) y la secreción de IFN- γ , efectos que determinan la capacidad anti-tumoral de esta citoquina²³.

INF-alfa actúa sobre la citotoxicidad, proliferación, secreción de IFN- γ y homeostasis de las células NK. Esta citoquina también es capaz tanto de estimular como inhibir la secreción de IFN- γ , indicando así que posee diferentes vías de señalización para cada proceso²³.

6.3. Inmunoterapia del cáncer con células NK

Debido a su capacidad para detectar y eliminar células tumorales, las células NK se han estudiado a nivel experimental como una herramienta útil en la inmunoterapia frente a el cáncer¹⁷. Algunas características destacables para su uso, son el hecho de no necesitar una sensibilización previa para provocar la lisis de la célula diana, la falta de especificidad ligada a antígeno, su corto tiempo de vida y la facilidad que presentan para ser aisladas y expandidas *in vitro*¹⁴.

No obstante, muchas células malignas desarrollan habilidades para evadir la respuesta inmune generada. Algunas de los mecanismos por los que las células tumorales evitan ser detectadas y eliminadas por las células NK, son la incapacidad de estas células de llegar a los tumores debido a la ausencia de una vascularización eficiente al comienzo del desarrollo de estos^{13, 24}.

Otro mecanismo de evasión consiste en la baja expresión de moléculas de adhesión o de receptores de activación en la superficie de la célula tumoral lo que dificulta su reconocimiento por parte de las células NK. Además una sobreexpresión de moléculas de CMH-I en las células tumorales provocará una estimulación de los receptores de inhibición impidiendo que estas actúen sobre las células malignas. Además se ha visto que las células tumorales son capaces de secretar citoquinas inmunosupresoras como IL-10 o TGFbeta que inhibirán la producción de citoquinas activadoras de la inmunidad así como la proliferación de linfocitos^{13, 24}. Con el fin de potenciar la capacidad citotóxica de las células NK, éstas células fueron cultivadas en presencia de IL-2 y posteriormente se realizaron trasplantes de células NK autólogas o alogénicas para el

tratamiento de diferentes tipos de cáncer^{13, 16}. Se sabe, además, que las células NK contribuyen al efecto injerto contra tumor pero no producen enfermedad de injerto contra huésped (EICH), en la que las células del sistema inmune de la persona que recibe el trasplante no reconocen como propias las moléculas del HLA de las células del donante, provocando así que las ataquen. El que las células NK no produzcan EICH pero sí actúen contra el tumor las hace aún más adecuadas para los trasplantes anteriormente mencionados¹³.

6.3.1. Tratamientos con IL-2 y células NK autólogas

Como ya se ha mencionado previamente, la citoquina IL-2 es capaz de activar a las células NK y aumentar sus mecanismos de citotoxicidad frente a las células tumorales. Se han realizado cultivos de células NK *in vitro* en presencia de IL-2 y posteriormente han sido infundidas al paciente mediante un trasplante autólogo, observándose que dichas células mantenían su capacidad citotóxica, pero junto a estas observaciones, aparecieron alguna más: a) Altas dosis de IL-2 producen elevada toxicidad en el individuo cuando se administra *in-vivo*, pues provocan el síndrome de extravasación capilar, ya que aumenta la permeabilidad capilar produciéndose fuga de líquido desde el sistema circulatorio al líquido intersticial, lo que ocasiona hipotensión, hipovolemia, edema y shock. b) Los linfocitos T reguladores (Treg), que son capaces de inhibir la acción de LT citotóxicos o células NK, por ejemplo, y que se caracterizan por tener receptores de alta afinidad para IL-2 (CD25), son más sensibles a bajas dosis de IL-2. Este hecho hace que puedan competir por la IL-2 con las células NK CD56^{bright}, estimulándose así la función inmunoreguladora de los Treg en vez de la acción de las células NK^{13, 25}.

En el año 2003 Burns y colaboradores seleccionaron un total de 57 pacientes (de edad comprendida entre 18-56 años) con diferentes tipos de cáncer (linfomas no Hodgkin, cáncer de mama o de riñón) y les administraron, en primer lugar, células NK cultivadas *in vitro* en presencia de IL-2 y posteriormente, los pacientes recibieron por vía subcutánea bajas dosis diarias de IL-2. Dichos autores observaron que además de la ausencia de toxicidad de la IL-2 a las dosis administradas, esta citoquina era capaz de producir un aumento en la población de linfocitos citotóxicos, sobre todo a nivel de células NK.

Además los receptores KIR de las células NK autólogas reconocen las moléculas del CMH del huésped, pudiendo la interacción entre ambos inhibir la acción de las células NK autólogas. Observaron también que la inmunosupresión que los tumores provocan en el individuo, mediante la liberación de citoquinas inmunorreguladoras, por ejemplo, afecta a las funciones de las células

NK. Además la citoquina IL-2 puede estimular también LT reguladores aumentando su número y estos linfocitos pueden inhibir la acción citotóxica de las células NK autólogas^{25, 26, 27}. Por tanto, el uso de esta técnica debería contemplar disminuir primero los niveles de LT reguladores para así evitar su expansión y después administrar la citoquina, de esta manera, la acción antitumoral se vería aumentada^{16, 28}.

El tratamiento de los pacientes con esta técnica produjo mejoras en algunos casos de cáncer. Así Miller y colaboradores en el año 2005 realizaron un estudio sobre 43 pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA), carcinoma renal y melanoma y observaron que en el 30% de los pacientes se consiguió remitir la enfermedad. Sin embargo, posteriormente aparecieron recaídas y las células no alcanzaban su máxima capacidad citotóxica *in vivo*¹⁴ debido, en parte, a que las células tumorales presentaban en su superficie moléculas propias del CMH-I que interaccionaban con los receptores KIR inhibitorios de las células NK, disminuyendo su capacidad citotóxica. Debido a esto, se comenzó a dirigir la investigación hacia trasplantes de células NK alogénicas²⁹.

6.3.2. Tratamiento mediante células NK alogénicas

La incompatibilidad entre los receptores KIR (receptores de inhibición de las células NK) y sus ligandos es un requisito previo necesario para la aloreactividad de las células NK. Es necesario que, en el paciente que recibe las células NK alogénicas, haya una falta de uno o varios ligandos KIR que sí están presentes en el donante, para que así haya una respuesta clínica al tratamiento ya que, en caso de no ser así, los receptores de inhibición reconocerían sus ligandos en las células NK alogénicas e inhibiría la acción de éstas. Al inhibirlas, no podrían actuar frente al tumor y la terapia antitumoral sería un fracaso¹⁴.

Se ha observado que en pacientes diagnosticados de leucemia, las células NK aloreactivas administradas han estado implicadas en la supresión de la enfermedad injerto contra huésped así como en la liberación de GM-CSF (factor estimulante de colonias) al reconocer los receptores de las células NK aloreactivas moléculas del CMH-I del huésped en los trasplantes de médula ósea, facilitando después la producción de células en la médula tras el trasplante^{14,30}.

En un ensayo clínico del año 2005 Miller y colaboradores suministraron a pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA) – tanto niños (0-18 años), adultos (18-65 años), como mayores(>65 años) – células NK alogénicas. El 26% de los pacientes presentó una remisión completa de la enfermedad.

En otro ensayo realizado en el año 2010 por Rubnitz y colaboradores sobre 10 pacientes de edades entre 0.7 y 21 años con LMA, a los cuales se les administraron células NK alogénicas y posteriormente IL-2, ningún paciente presentó complicaciones a los dos años de recibir el tratamiento^{13, 16, 31}. Por otra parte, el tratamiento con células NK alogénicas no sólo está ligado exitosamente a leucemias, si no que también ha obtenido resultados significativos y positivos en tumores sólidos, como el cáncer de pecho o de ovarios¹³.

Hay ventajas respecto a este tipo de tratamiento como el hecho de que las moléculas de CMH-I del organismo no pueden inhibir a las células NK alogénicas y por tanto pueden actuar frente a las células tumorales, y que se ha demostrado mediante ensayos clínicos que puede remitir los cánceres (leucemia, de mama o de ovario, por ejemplo) en porcentajes superiores al 20%. No obstante, debe tenerse en cuenta que el tratamiento con células NK aloreactivas presenta como desventaja un elevado riesgo de desarrollar toxicidad precisamente por no presentar ligandos compatibles con los receptores KIR, lo que puede a veces producir rechazo del organismo frente a estas células NK alogénicas administradas^{14, 16}.

6.3.3. Tratamiento con células NK que expresan el receptor de antígeno quimérico (CAR)

Los receptores de antígenos quiméricos son receptores obtenidos por ingeniería genética que están formados por la fusión de la zona de unión al antígeno de un anticuerpo monoclonal con uno o varios dominios intracelulares de señalización. El dominio externo se encarga de detectar antígenos sobre expresados o bien expresados únicamente en la superficie de células tumorales mientras que el dominio intracelular se encarga del envío de la señal de activación a la célula NK sobre la que se encontrarán expresados estos receptores¹³.

Los linfocitos que expresan CAR pueden ser dirigidos hacia dianas específicas actuando así sobre diferentes tipos de tumores¹³.

Este tipo de receptores comenzaron a crearse para Linfocitos T y éstos se empezaron a utilizar en la inmunoterapia. No obstante, debido a que producen EICH (necesitan sensibilización previa de sus receptores con las moléculas de CMH-I del organismo y en el caso de que los receptores quiméricos no reconozcan éstas moléculas como propias, se producirá enfermedad injerto contra

huésped), su uso debe estar restringido a células autólogas (en este caso, los LT-CAR sí reconocen las moléculas CMH-I del organismo como propias y no atacan a las células del huésped). En cambio, en el caso de las células NK, al no producir EICH, se pueden aplicar a células alogénicas^{13, 32}.

Una línea celular modificada de células NK que se usa con los CAR es la de las células NK-92. Estas células se caracterizan por poseer las características propias de las NK como la citotoxicidad y las producción de citoquinas y, por otra parte, comparten con las células tumorales su capacidad de reproducirse de manera ilimitada. Este tipo de células, modificadas para expresar CARs, se han utilizado como tratamiento en diferentes tipos de cánceres¹⁴.

En la leucemia linfoblástica aguda (LLA) hay una sobreexpresión de marcador CD5 sobre la superficie de las células T, por lo que se han desarrollado células NK-92 que expresan en su superficie CAR dirigidos frente ese marcador³³. Las células NK-92-CAR-CD5 han demostrado su eficacia en ensayos *in vitro* realizados en el año 2017 por Chen y colaboradores, y en ensayos con injertos en modelos murinos³³. Para otros tipos de leucemias, como la linfocítica crónica primaria o la mieloide aguda, donde hay sobreexpresión de CD19, también se han desarrollado células NK-92-CAR-CD19 que han demostrado tener una gran capacidad citotóxica^{13, 33}.

En el caso de neuroblastoma, un tumor neuroendocrino muy frecuente en niños, se encuentran sobreexpresado el gangliósido GD2 y para su tratamiento se han desarrollado CAR frente a esta molécula en el año 2012 por Esser y colaboradores observándose que las células NK-92-CAR-GD2 eliminan con éxito aquellas células tumorales con ese marcador en su superficie³³.

En el caso del glioblastoma, un tumor cerebral, se puede combatir con CAR dirigido frente al receptor EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico). Este tipo de tratamientos han demostrado su eficacia en ensayos *in vitro* y se está a la espera de resultados *in vivo* en ensayos clínicos³³.

Como se ha mencionado, las células NK-92-CAR pueden ser dirigidas a todo tipo de tumores como por ejemplo, la sobreexpresión de HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) en cáncer de mama o los ejemplos destacados anteriormente (EGFR en glioblastoma o GD2 en neuroblastoma). Sin embargo ante la presencia de células con una elevada capacidad citotóxica y de proliferación es necesario la presencia de un mecanismo de regulación negativa

que permita controlar el tiempo que estas células circulan por el organismo para evitar la aparición de EICH al reconocer moléculas propias como extrañas.

Este control sigue bajo investigación a día de hoy, esperando conseguir algún sistema de autorregulación que permita obtener tratamientos seguros con CAR^{13, 33}.

6.3.4. Tratamiento a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

Las células NK presentan en su superficie el marcador CD16, el cual reconoce la fracción Fc de la inmunoglobulina IgG así como a células diana recubiertas por estos anticuerpos. El CD16, al reconocer células diana, manda a través de los motivos ITAMs presentes en sus receptores señales de activación a la célula NK, que provocará la lisis de la célula tumoral^{34, 35}.

Los tratamientos frente al cáncer con anticuerpos monoclonales son amplios y variados, habiéndose desarrollado diferentes tipos como el anticuerpo anti-CD20 (Rituximab) o anti-HER2 (Trastuzumab) frente al linfoma no-Hodgkin o cáncer de mama respectivamente. En la terapia antitumoral con anticuerpos monoclonales, se ha visto que el mecanismo de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de las células NK juegan un papel importante, ya que en 2010 Junttila y colaboradores observaron que cuando se utilizaba Trastuzumab mutado en el tratamiento del cáncer de mama, este anticuerpo monoclonal carecía de efecto antitumoral al perder su capacidad para unirse a CD16, demostrando así la implicación de la ADCC en la terapia anticancerosa^{34, 36}.

Por otra parte, en ensayos realizados en el año 2006 por Ferrara y colaboradores en ratones con Rituximab, en los que se aumentó por ingeniería genética la afinidad a estos anticuerpos monoclonales hacia el marcador CD16, se observó un mayor efecto citotóxico por parte de las células NK. Este nuevo anticuerpo se denominó Obitunuzumab y se observó que tenía capacidades antitumorales mayores y más efectivas que Rituximab³⁴.

En un ensayo clínico de fase III realizado en el año 2014 por Goede y colaboradores sobre pacientes enfermos de leucemia linfóide crónica que estaban también tratados con quimioterapia, se administró a éstos Obitunuzamb junto con Clorambucilo (antineoplásico análogo de la

mostaza nitrogenada que interfiere en la transcripción y replicación del ADN celular) y se vio que la tasa de supervivencia y de progresión libre de enfermedad (LLC) era más alta en estos pacientes tratados con Obitunuzamb y Clorambucilo que en aquellos pacientes tratados con Rituximab y Clorambucilo³⁴.

7. Conclusiones

1.- El cáncer es uno de los mayores problemas de salud a escala global hoy en día. Múltiples investigaciones se han llevado a cabo para obtener tratamientos eficaces contra esta enfermedad y una de ellas, la inmunoterapia con células NK, está comenzando a dar sus frutos mediante avances en los últimos años.

2.- Los tratamientos iniciales con células NK autólogas y con la citoquina IL-2 eran capaces de remitir la enfermedad pero las recaídas eran frecuentes y las células no alcanzaban su máxima capacidad citotóxica *in vivo*.

3.- Diferentes ensayos clínicos realizados del año 2000 en adelante han demostrado que el tratamiento de cánceres con células NK alogénicas o mediante células NK-92 produce remisión de la enfermedad en porcentajes superiores al 20%.

4.- Los tratamientos con células NK alogénicas producen menos recaídas y complicaciones que los realizados con células NK autólogas pero presentan mayor riesgo de desarrollar citotoxicidad debido a que los receptores inhibitorios de las células NK alogénicas no presentan compatibilidad con sus ligandos en el huésped.

5.- La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos juega un papel importante en la acción antitumoral de los anticuerpos monoclonales.

6.- Los anticuerpos monoclonales que tienen potenciada su unión a los marcadores CD16 (mediante ingeniería genética) poseen mayor actividad antitumoral que aquellos que no han sido sometidos a este proceso.

7.- La inmunoterapia con células NK se ha utilizado como tratamiento en diferentes tipos de cánceres, como LMA, cáncer de mama o de ovario.

8. Bibliografía

-
- ¹ Steven I. Hajdu, Manjunath Vadmal. A Note from History: Landmarks in History of Cancer, Part 6. Cancer. 2013; 119(23): 4058–82.
- ² Steven I. Hajdu, Manjunath Vadmal, Ping Tang. A Note from History: Landmarks in History of Cancer, Part 7. Cancer. 2015; 121(15): 2480–2513.
- ³ Steven I. Hajdu. A Note from History: Landmarks in History of Cancer, Part 1. Cancer. 2011; 117(5): 1097–1102.
- ⁴ Steven I. Hajdu, Farbod Darvishian. A Note from History: Landmarks in History of Cancer, Part 5. Cancer. 2013; 119(8): 1450–66.
- ⁵ Sandeep K. Singh, Mehmet Tevfik Dorak. Cancer Immunoprevention and Public Health. Frontiers in Public Health. 2017; 5 (101): 1-8.
- ⁶ Douglas Hanahan, Robert A. Weinberg. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011; 144(5): 646–74.
- ⁷ Andreas C. Joerger, Alan R. Fersht. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. Annual Review of Biochemistry. 2016; 85(1): 375–404.
- ⁸ Bert Vogelstein, Kenneth W Kinzler. Cancer Genes and the Pathways They Control. Nature Medicine. 2004; 10(8): 789–99.
- ⁹ Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V. , Jackson, R. B. Campbell biology. 10^a ed. San Francisco, CA: Pearson; 2011.
- ¹⁰ P J Roberts, C J Der. Targeting the Raf-MEK-ERK Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade for the Treatment of Cancer. Oncogene. 2007; 26(22): 3291–3310.
- ¹¹ Libero Santarpia, Scott M Lippman, Adel K El-Naggar. Targeting the MAPK–RAS–RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy. Expert Opinion on Therapeutic Targets. 2012; 16(1): 103–19.
- ¹² Mariela A. Moreno Ayala et al. Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer. Expert Opinion on Biological Therapy. 2017; 17(7): 1–16.
- ¹³ Yang Li et al. NK Cell-Based Cancer Immunotherapy: From Basic Biology to Clinical Application. Science China Life Sciences. 2015; 58(12): 1233–45.

-
- ¹⁴ Lakshmi Narendra Bodduluru et al. Natural Killer Cells: The Journey from Puzzles in Biology to Treatment of Cancer. *Cancer Letters*. 2015; 357(2): 454–67.
- ¹⁵ Elisa Montaldo et al. Human NK Cell Receptors/Markers: A Tool to Analyze NK Cell Development, Subsets and Function. *Cytometry Part A*. 2013; 83A(8): 702–13.
- ¹⁶ Erik Ames, William J. Murphy. Advantages and Clinical Applications of Natural Killer Cells in Cancer Immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2014; 63(1): 21–28.
- ¹⁷ Oren HersHKovitz et al. NKp44 Receptor Mediates Interaction of the Envelope Glycoproteins from the West Nile and Dengue Viruses with NK Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 2009; 183(4): 2610–21.
- ¹⁸ Óscar Rojas-Espinosa. *Inmunología (de memoria)*. México: Ed. Médica Panamericana; 2006.
- ¹⁹ Yanting Zhu, Bo Huang, Jue Shi. Fas Ligand and Lytic Granule Differentially Control Cytotoxic Dynamics of Natural Killer Cell against Cancer Target. *Oncotarget*. 2016; 7(30): 47163-47172.
- ²⁰ Diego Piccioli et al. Contact-Dependent Stimulation and Inhibition of Dendritic Cells by Natural Killer Cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2002; 195(3): 335–41.
- ²¹ Katayoun Rezvani, Rayne H. Rouse. The Application of Natural Killer Cell Immunotherapy for the Treatment of Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2015; 6: 578.
- ²² Hyung-Joon Kwon, Nayoung Kim, Hun Sik Kim. Molecular Checkpoints Controlling Natural Killer Cell Activation and Their Modulation for Cancer Immunotherapy. *Experimental & Molecular Medicine*. 2017; 49(3): e311.
- ²³ Norberto W. Zwirner, Carolina I. Domaica. Cytokine Regulation of Natural Killer Cell Effector Functions. *BioFactors*. 2010; 36(4): 274–88.
- ²⁴ Miguel A. Hernández Urzúa, Anabell Alvarado-Navarro. Interleucinas E Inmunidad Innata. *Revista Biomédica*. 2001; 12(4): 272-80.
- ²⁵ Veronika Bachanova, Jeffrey S. Miller. NK Cells in Therapy of Cancer. *Critical Reviews in Oncogenesis*. 2014; 19(2): 133-41.
- ²⁶ L J Burns et al. IL-2-Based Immunotherapy after Autologous Transplantation for Lymphoma and Breast Cancer Induces Immune Activation and Cytokine Release: A Phase I/II Trial. *Bone Marrow Transplantation*. 2003; 32(2): 177–86.
- ²⁷ J. S. Miller. Therapeutic Applications: Natural Killer Cells in the Clinic. *Hematology*. 2013; 2013(1): 247–53.

-
- ²⁸ William H. D. Hallett et al. Combination Therapy Using IL-2 and Anti-CD25 Results in Augmented Natural Killer Cell-Mediated Antitumor Responses. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008; 14(10): 2088-99.
- ²⁹ David H Raulet, Werner Held. Natural Killer Cell Receptors: The Offs and Ons of NK Cell Recognition. *Cell.* 1995; 82(5): 697-700.
- ³⁰ M. Alvarez, K. Sun, W. J. Murphy. Mouse Host Unlicensed NK Cells Promote Donor Allogeneic Bone Marrow Engraftment. *Blood.* 2016; 127(9): 1202-5.
- ³¹ Jeffrey E. Rubnitz et al. NKAML: A Pilot Study to Determine the Safety and Feasibility of Haploidentical Natural Killer Cell Transplantation in Childhood Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology.* 2010; 28(6): 955-59.
- ³² Eric Vivier et al. Functions of Natural Killer Cells. *Nature Immunology.* 2008; 9(5): 503-10.
- ³³ Dongfang Liu et al. Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Modified Natural Killer Cell-Based Immunotherapy and Immunological Synapse Formation in Cancer and HIV. *Protein & Cell.* 2017; 5: 1-17.
- ³⁴ Wei Wang et al. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology.* 2015; 6(368): 1-15.
- ³⁵ Mark J. Smyth et al. Activation of NK Cell Cytotoxicity. *Molecular Immunology.* 2005; 42(4): 501-10.
- ³⁶ T. T. Junttila et al. Superior In Vivo Efficacy of Afucosylated Trastuzumab in the Treatment of HER2-Amplified Breast Cancer. *Cancer Research.* 2010; 70(11): 4481-89.