



2016

**Universidad de la República
Facultad de Medicina
Departamento de Inmunobiología**

Metodología Científica II

**Bloqueo de puntos
de control inmunológico
en terapias contra el
Cáncer.**

Integrantes: (grupo 53)

Br. Luciana Braga

Br. Rocío Ferreira

Br. Stephanie González

Br. Paula Lima

Br. Ignacio Mattos

Docente Orientador:

Dra. Mercedes Segovia

INDICE:

Resumen	2
1. Introducción	2
1.1 Importancia del tema	2
1.2 Generalidades del sistema inmune	4
1.3 Inmunidad Innata	6
1.4 Inmunidad Adaptativa	6
1.5 Activación Linfocitaria	8
1.6 Moléculas de coestimulación	8
2. Inmunidad y cáncer	10
2.1 Eliminación	10
2.2 Equilibrio	11
2.3 Escape	11
3. Inmunoterapia contra el cáncer	12
3.1 CTLA-4 y PD1	13
3.2 CTLA-4 como blanco terapéutico	14
3.3 PD-1/PD-L1 como blancos terapéuticos	16
3.4 Evaluación clínica	19
Ipilimumab y Tremelimumab	19
Nivolumab y Pembrolizumab	19
3.5 Consideraciones clínicas del bloqueo de checkpoints	20
3.6 Terapia combinada CTLA-4 y PD-1	22
3.7 Terapias combinadas con otros agentes terapéuticos	23
3.8 Otras terapias	26
Conclusiones	27
ANEXOS	28
ABREVIATURAS	28
Referencias bibliográficas	29

Resumen

El cáncer es una de las principales causas de morbi-mortalidad en el mundo. El sistema inmune tiene la capacidad natural de detectar y destruir células anormales y esto puede prevenir la formación y/o proliferación de varios tipos de cáncer. Aun así gran parte de los procesos cancerígenos evaden los mecanismos de detección del sistema inmune lo que les permite expandirse e invadir tejidos circundantes, en algunos casos, de manera agresiva y descontrolada con una expresión clínica progresivamente invalidante determinando la muerte.

En función de esto se han caracterizado ciertas vías inhibitoras, que amortiguan o bloquean la respuesta inmunológica en estos procesos, llamados “puntos de control” o “checkpoints”. La inmunoterapia es una intervención innovadora que está ganando cada vez más terreno y un rápido avance en los últimos años. Las terapias inmunes están diseñadas para bloquear estas vías inhibitoras que permiten al tumor evadir la respuesta antitumoral y aunque hay muchos tipos de inmunoterapia, esta es una de las estrategias que más se han estudiado recientemente.

Los fármacos utilizados son Anticuerpos Monoclonales (AcMo) que actúan a nivel de receptores de los linfocitos (CTLA-4, PD-1), liberando la inhibición que el tumor provoca sobre los mismos, es decir, que el propio sistema inmunológico del paciente recupere la capacidad para atacar el tumor. En 2011 la FDA (del inglés Food and Drug Administration) de Estados Unidos aprobó el primero de estos fármacos, el Ipilimumab un anti-CTLA-4 y en 2014 el Nivolumab un anti-PD-1.

A pesar de los prometedores resultados no todos los pacientes ni todos los tumores responden clínicamente a esta terapia e incluso en ocasiones los efectos secundarios han sido letales. En este sentido se han desarrollado nuevos scores para su evaluación de la respuesta y algoritmos de manejo de los efectos secundarios.

Esta revisión tiene como objetivo repasar los mecanismos mediante el cual el bloqueo de estos puntos de control inmunológico (checkpoints) restaura la inmunidad antitumoral, la evaluación clínica de los mismos y realizar una comparación con otras terapias contra el cáncer.

Palabras clave: Inmunoterapia, Microambiente tumoral, Checkpoints, CTLA-4, PD-1/PD-L1, Ipilimumab, Nivolumab, irRAE, irRC.

1. Introducción.

1.1 Importancia del tema.

El cáncer es una de las principales causas de morbi-mortalidad en el mundo; en 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer, afectando a las poblaciones de todos los países y regiones y se prevé que supere los 20 millones de nuevos casos de cáncer al año en 2025.¹

La mayoría de los cánceres están asociados a determinada predisposición genética y factores de riesgo medioambientales, estilo de vida o exposiciones comportamentales. Los tipos más frecuentes de cáncer son diferentes en el hombre y en la mujer siendo los que causan un mayor número anual de muertes los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama. [Fig. 1]

Es por este motivo que reside el importante valor de la investigación básica, clínica y la unión de ambas para dar lugar a la investigación traslacional.

Según un informe realizado por el Ministerio de Salud Pública en el año 2010, el 23.8% de las defunciones por año en Uruguay son causadas por cáncer; algunos factores que han contribuido a estas cifras son el mayor control de enfermedades infecciosas y el aumento de la sobrevida de la población.

Según el proyecto GLOBOCAN de la OMS, en una estimación realizada en el 2008, Uruguay ocupa el quintil de mayor incidencia a nivel internacional.²

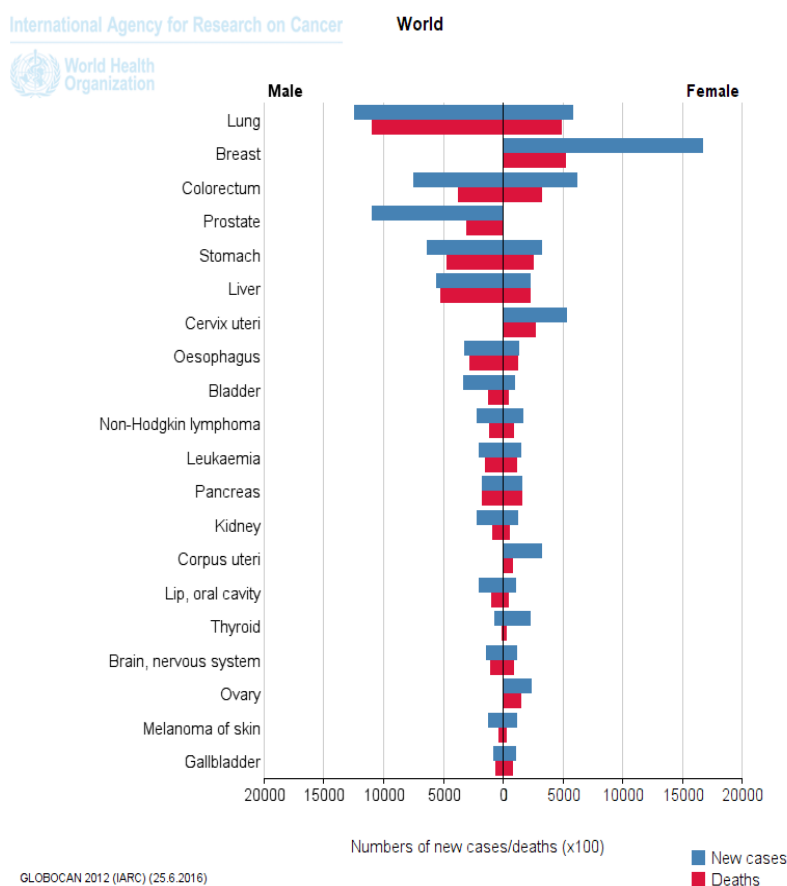


Fig. 1: Incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial. Proyecto GLOBOCAN 2012. “El objetivo del proyecto GLOBOCAN es proporcionar estimaciones contemporáneas de la incidencia de la mortalidad y la prevalencia de los principales tipos de cáncer a nivel nacional para 184 países del mundo”

Es por ello que se ubica al cáncer como un problema sanitario actual, y demuestra la importancia de las estrategias de salud para la detección precoz, tratamiento y seguimiento adecuado de estos pacientes.

Actualmente, gracias a los avances en el conocimiento de las ciencias básicas y en tecnología molecular se han podido establecer nuevos blancos terapéuticos como CTLA-4 y PD-1, moléculas actualmente fundamentales en el tratamiento contra el cáncer. Estos conocimientos

han revolucionado el enfoque de la inmunoterapia contra el cáncer y están generando un optimismo justificado porque es posible que pronto se pueda curar un conjunto de pacientes con algunos tipos de cáncer.

Para comprender este enfoque de inmunoterapia, entendemos necesario realizar una introducción sobre la respuesta inmune normal, para luego entender la inmunidad antitumoral, y las moléculas de coestimulación más relevantes en la activación linfocitaria ya que estas están directamente relacionadas con el sujeto de esta monografía.

1.2 Generalidades del sistema inmune.

Constantemente nuestro organismo defiende su integridad biológica frente a agresiones procedentes tanto del exterior como del propio organismo. Para que estos fenómenos de defensa se lleven a cabo, los organismos disponen de un sistema especializado conocido como sistema inmune.

El término inmunidad históricamente hace referencia al estado de resistencia de los organismos frente a enfermedades infecciosas pero hoy sabemos que su rol es mucho más amplio y que desempeña un importante papel en la homeostasis del organismo. **Podemos definir al sistema inmunológico como una compleja red de elementos celulares, tisulares y moleculares que interaccionan entre sí para mantener al organismo libre de amenazas internas** (manejando finamente procesos que determinan por ejemplo la aparición de autoinmunidad) **y externas** (por ejemplo, microorganismos patógenos o procesos tumorales).

Tan importante como la activación de este sistema para la defensa del huésped es la tolerancia inmunológica. Esta puede definirse como una respuesta inmune que no destruye al antígeno, provocada por la exposición previa al mismo. La tolerancia puede darse ante antígenos externos a nuestro organismo, así como para los que se encuentran en el interior del mismo (tolerancia a lo propio). Buenos ejemplos de esto son el embarazo y la tolerancia oral a la ingesta de antígenos proteínicos por vía enteral.

Cuando fallan los sistemas de regulación de la respuesta inmune pueden aparecer patologías autoinmunitarias y autoinflamatorias. Las enfermedades autoinflamatorias y autoinmunes difieren en términos de mecanismos de la enfermedad y las respuestas terapéuticas.

Hace aproximadamente una década, se propuso una clasificación de las enfermedades inmunológicas con trastornos prototípicos, en su mayoría autoinflamatorias monogénicas por un lado y trastornos autoinmunes clásicos en el otro.³ Mientras que las enfermedades autoinflamatorias son impulsadas por señales de peligro endógeno, mediadores metabólicos y citocinas, la autoinmunidad implica la activación de células T y B.⁴

Clásicamente se divide a la respuesta inmune en dos grandes brazos. Uno que actúa de forma inmediata y por eso lo denominamos **respuesta inmune innata** y otro brazo al que se denomina **respuesta inmune adaptativa**.

El sistema inmune innato (SII) es la primera línea de defensa y está compuesto por barreras físicas (piel y mucosas), barreras fisiológicas (variaciones en la temperatura y pH), componentes celulares que actúan de manera no específica (células dendríticas, fagocitos y linfocitos NK), componentes solubles como proteínas del complemento (proteínas pre-formadas solubles en plasma activadas por la vía alternativa y de las lectinas) y citocinas y quimioquinas que actúan como mensajeros intercelulares sincronizando la respuesta. Luego se pone en marcha el segundo componente del sistema inmune que es la respuesta adaptativa. [Fig. 2] La misma está mediada por un tipo celular especializado, los linfocitos y componentes humorales (anticuerpos), hablamos entonces de la respuesta inmune de tipo celular y humoral respectivamente.

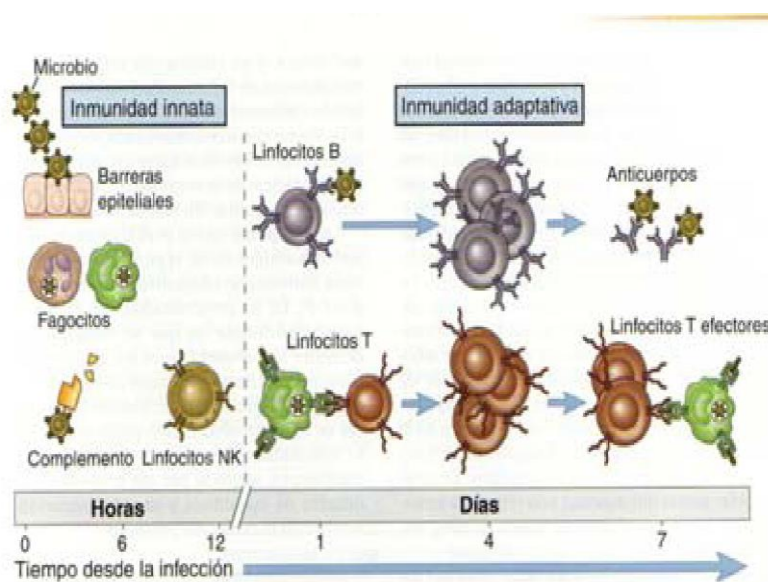


Fig.2: Inmunidad innata y adaptativa. Los mecanismos de la inmunidad innata proporcionan la defensa inicial contra las infecciones. Las respuestas inmunitarias adaptativas aparecen después y consisten en la activación de los linfocitos. Tomado de Abbas 7ª edición, *Inmunología celular y molecular*.

A diferencia de la inmunidad innata que está lista para actuar frente a una amenaza, la inmunidad adaptativa depende de la exposición a un antígeno por ejemplo, entendiendo esto como todo organismo o molécula que genere una reacción inmune, sólo se activa cuando estos se encuentran presentes y cuanto mayor sea la exposición más se va a amplificar.

Esta división de la respuesta inmunitaria es meramente esquemática ya que en realidad funcionan como un sistema integrado, interactuando de forma dinámica, los componentes de ambas actúan coordinadamente y siendo los dos importantes para la erradicación del proceso patológico. **Un concepto muy importante a resaltar es que la inmunidad innata va a alertar e instruir a la respuesta inmune adaptativa. A su vez, ésta última va a proveer al SII de mecanismos efectores.** Para ello un tipo celular clave que juega como nexo son las células dendríticas (DC, del inglés dendritic cell); éstas son capaces de viajar hasta el ganglio linfático y presentar los antígenos (Ag) a los linfocitos T vírgenes. Estos se diferencian y maduran y son reclutados por ejemplo al sitio de infección.

1.3 Inmunidad Innata.

Se caracteriza por ofrecer al organismo una respuesta inmune inmediata (en horas) pero inespecífica. Sus principales funciones son proteger frente a patógenos, activar la inmunidad adaptativa e iniciar el proceso de reparación tisular. Las estructuras microbianas reconocidas por el SII se llaman patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos –PAMPs- (del inglés Pathogen-Associated Molecular Patterns), y en general son estructuras críticas para la supervivencia de los microorganismos como: el ARN doble cadena, las lipoproteínas, glicoproteínas, la flagelina, o los lipopolisacáridos.

El sistema inmune también reconoce sustancias endógenas que producen o liberan células dañadas o que están muriendo. Estas sustancias se llaman patrones moleculares asociados a daño -DAMPs- (del inglés Damage-Associated Molecular Patterns). Los DAMPs pueden producirse como resultado del daño celular causado por infecciones, toxinas químicas, quemaduras, traumatismos o disminución del flujo sanguíneo.

El sistema inmune innato usa varios tipos de receptores presentes en diferentes localizaciones en las células y moléculas solubles en la sangre y secreciones mucosas, que reconocen PAMPs y DAMPs. Estos receptores son expresados por fagocitos, (células dendríticas, macrófagos) y también células epiteliales que componen la interfaz de barrera entre el cuerpo y el ambiente externo. Se denominan receptores para el reconocimiento del patrón-PRR- (del inglés Pattern Recognition Receptors). Se expresan en la membrana plasmática o en la membrana endosómica de los fagocitos y en el citoplasma. Una vez detectados los patógenos, son activados los componentes celulares y humorales de la inmunidad innata que van a desarrollar los mecanismos efectores. Las primeras células en intervenir son los fagocitos. Los llamados profesionales son los neutrófilos y macrófagos. Inmediatamente se incorporan los NK (del inglés Natural Killer).⁵

Los componentes solubles de la inmunidad innata son los anticuerpos naturales, el complemento, pentraxinas y catelicidinas y ficolinas.

Una función esencial de la respuesta inmune innata es preparar el terreno para inducir una respuesta inmunitaria adaptativa (RIA) efectiva. Una respuesta inmune efectiva del huésped frente a organismos extraños requiere de la acción coordinada y conjunta del sistema inmune innato y adaptativo.

1.4 Inmunidad Adaptativa.

La inmunidad adaptativa aparece un tiempo luego de la respuesta inmune innata (RII) e incluye la destrucción inmunológica de la amenaza y la reparación del daño causado. Por lo que cuenta con mecanismos de regulación muy importantes. La RIA se caracteriza por ser:

1. **Específica** porque asegura que la respuesta inmune frente a un antígeno se dirija a ese antígeno y no a otro. Además tiene la capacidad de aumentar el número de linfocitos específicos contra un antígeno determinado por medio de la expansión clonal.
2. **Diversa** porque capacita el sistema inmune para responder a una gran variedad de antígenos (tiene un repertorio de especificidades mucho más grande que la respuesta inmune innata)
3. **Especializada** porque genera respuestas que son óptimas para la defensa contra diferentes tipos de microorganismos o agresiones, o situaciones fisiopatológicas o fisiológicas como el embarazo.
4. Es capaz de desarrollar **memoria** inmunológica, esto implica que frente a una re exposición al mismo antígeno el sistema inmune responderá más rápido y más robustamente.

Existen dos tipos de respuesta inmunitaria adaptativa, la inmunidad humoral y la inmunidad celular.

La **inmunidad humoral** se basa en el sistema de complemento y proteínas producidas por los linfocitos B, los anticuerpos. Estos se encuentran en dos formas: en la sangre y en secreciones mucosas y tienen como función reconocer antígenos, neutralizarlos y marcarlos como diana para su eliminación por diversos mecanismos efectoros (opsonización); y unidos a la membrana de los Linfocitos B (LB), formando parte del receptor de linfocitos B-BCR- (del inglés B-cell receptor).

La producción de anticuerpos puede iniciarse de forma dependiente o independiente de linfocitos T según la naturaleza del antígeno.

Existen microbios intracelulares, como algunas bacterias y los virus, que pueden proliferar en el interior de los fagocitos y en otras células. Cuando esto ocurre los mediadores de la inmunidad humoral no son eficaces. En éste caso la **inmunidad de tipo celular** toma importancia. La misma es llevada a cabo por los linfocitos T (LT), los cuales fomentan la destrucción de células infectadas o transformadas.

Los principales linfocitos T efectoros son: los LT CD4 (Th1,Th2,Th9 o Tregs), que se encargan de secretar citocinas y reclutar más células inmunitarias. Los CD8 citolíticos o CTL- (del inglés Cytolytic T Lymphocyte), encargados de eliminar células infectadas o transformadas mediante la inducción de su apoptosis a través de interacciones con moléculas de membrana y por la liberación de enzimas: población importante en la respuesta antitumoral.

La inmunidad adaptativa también permite al sistema inmune recuperarse de una respuesta. Hay entonces mecanismos de regulación de la respuesta inmune, de modo de mantener la homeostasis del organismo y prevenir procesos infecciosos o inflamatorios por ejemplo.

1.5 Activación Linfocitaria.

Para que un LT se active tiene que haber presentación de antígeno. Las células presentadoras de antígenos profesionales son los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos B. Las DC son las únicas capaces de activar un linfocito T virgen.

Las DC son llamadas centinelas del SI porque censan el peligro en la periferia y migran hasta el ganglio linfático de la región donde presentan el antígeno a los linfocitos T vírgenes que allí se encuentran.

El objetivo de la activación es a partir de una pequeña población de linfocitos T vírgenes específicos obtener un gran número de clones capaces de combatir la infección y una porción de células memoria que permanezcan largos periodos y puedan actuar rápidamente en un nuevo encuentro con el mismo antígeno.

Cuando hablamos de activación linfocitaria, hablamos de la necesidad de 3 señales.

El antígeno, siempre es la **primera señal** necesaria para la activación linfocitaria. Esto asegura que la respuesta sea específica. Una **segunda señal** es proporcionada por las moléculas coestimuladoras. Estas moléculas pueden ser activadoras o inhibitoras (CTLA4), lo que garantiza que la respuesta no se desarrolle frente a estímulos inocuos y asegurando que la misma se inicie en el momento y lugar apropiado. La **tercera señal** está mediada por citocinas que promueven la proliferación y diferenciación linfocitaria.

Sin estas señales, los LT que reconocen antígenos mueren por apoptosis o entran en un estado de falta de actividad llamada anergia o inactivación funcional.

En el reconocimiento participan otras moléculas de superficie, entre ellas moléculas de adhesión que estabilizan la unión y moléculas coestimuladoras, por ejemplo CD28-B7 y CD40-CD40L.

1.6 Moléculas de coestimulación.

La familia más importante y más estudiada de coestimuladores/coinhibidores de los LT es el complejo B7:CD28, comprende las siguientes moléculas coestimuladoras **[Fig. 3]**: CD28: CD80/CD86; CTLA-4 (Antígeno 4 de Células T Citolíticas) es un receptor inhibitor; ICOS (coestimulador inducible); PD-1 (muerte programada 1) también es un receptor inhibitor que participa en la finalización de la respuesta inmune.

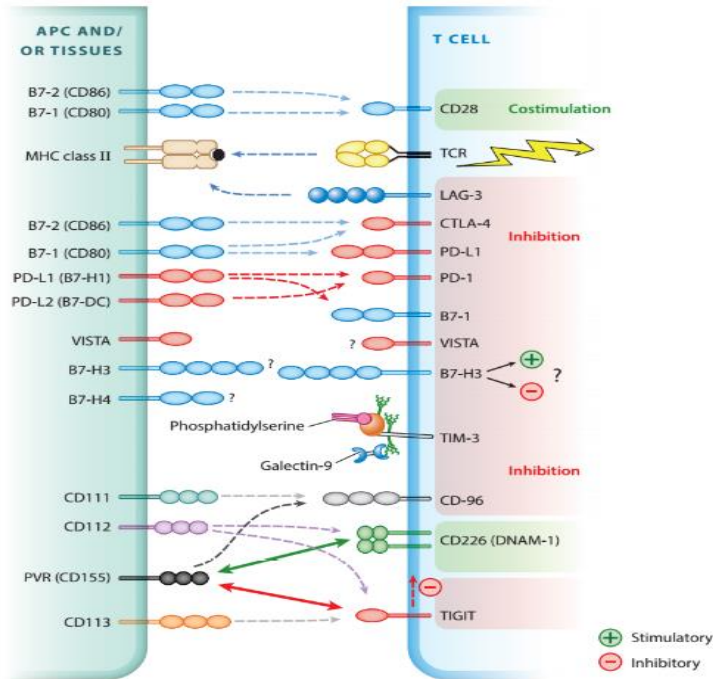


Fig. 3: Vías de estimulación e inhibición en la activación de los linfocitos T (mediada por el reconocimiento de antígenos presentados por APCs a través del TCR y la interacción mediante B7:CD28). Tomado de Susanne H. Baumeister, Arlene H. Sharpe, 2016

La molécula B7 se expresa en la superficie de las células presentadoras de antígeno y es más abundante en las DC. Su expresión es inducida por la unión de los PAMPs a los TLR y citocinas como $\text{INF}\gamma$. Además los linfocitos T activados expresan el ligando para CD40 que también potencian la coestimulación B7-CD28. Esta asa de retroalimentación positiva sirve para amplificar la respuesta. La cola citoplasmática desencadena una cascada de fosforilación que inactiva la vía apoptótica y estimula factores antiapoptóticos, lo que contribuye a la supervivencia. También induce la unión del NF- κ B a una zona del promotor del gen de la IL-2, dando como resultado mayor expresión de proteínas antiapoptóticas. La IL-2, es un factor de crecimiento, supervivencia y diferenciación del linfocito. Sus funciones son aumentar la supervivencia al inducir la proteína antiapoptótica Bcl-2 y estimular la progresión del ciclo celular al degradar p27. Además aumenta la producción de citocinas efectoras como IL-4 y el $\text{INF}\gamma$. Es indispensable para la supervivencia y función de los Treg.

Otra vía de coestimulación conocida es CD40L-CD40; su interacción en las células presentadoras de antígeno aumenta la respuesta de los linfocitos T al activar a las células presentadoras de antígeno. El CD40L es una proteína de membrana de la superfamilia TNF que se expresa en los linfocitos T activados. El CD40 se expresa en linfocitos B, macrófagos y células dendríticas.

El resultado de la activación del linfocito T está influido por un equilibrio entre la unión de los ligandos a los receptores activadores e inhibidores de la familia del CD28.

Los receptores inhibidores de la familia CD28 son el **CTLA-4** y **PD-1** que son el sujeto de interés en esta monografía y serán desarrollados más adelante.

2. Inmunidad y cáncer

Actualmente está fuertemente demostrado que la inmunidad juega un papel fundamental en todo proceso neoplásico. Ya desde mitad de siglo XX, Burnet y Thomas proponen el término vigilancia inmunológica. Este deriva del concepto de que el sistema inmune puede discriminar entre lo propio y lo no propio.⁹ Posteriormente Dunn y Schreiber sugieren utilizar el término de Inmunoección, que destaca el rol dual de la inmunidad no sólo en la prevención, sino también en la conformación de enfermedad neoplásica.¹³

El proceso de Inmunoección comprende tres fases conocidas como “tres E”: Eliminación, Equilibrio y Escape. [Fig.4]

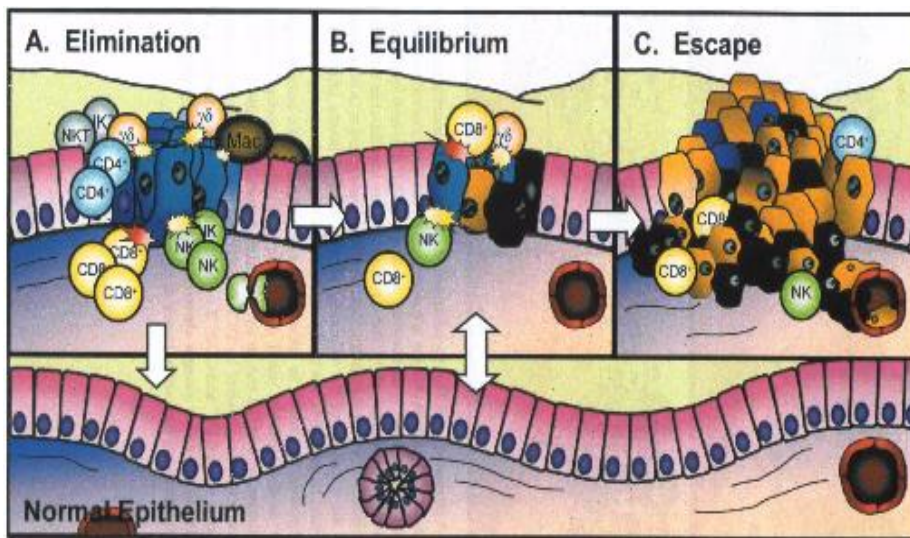


Fig.4 Fases de la Inmunoección. Tomado de Gavin P. Dunn, Robert D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoection* 2004

2.1 Eliminación

En esta fase se requiere la participación en conjunto del sistema inmune innato y adaptativo. Durante el desarrollo tumoral se produce una remodelación del estroma que lleva a la liberación de moléculas pro-inflamatorias. Éstas junto con las citocinas producidas por las propias células neoplásicas atraen a los componentes del sistema inmune innato. Las células NK, macrófagos, LT, y NKT, una vez reclutados reconocen los antígenos tumorales lo que conduce a la producción de $INF\gamma$. Se activan procesos dependientes de $INF\gamma$ proapoptóticos, antiproliferativos y antiestáticos que sumados a la acción de los macrófagos y NK activados resultan en la destrucción de una proporción del tumor. Como resultado, antígenos provenientes de restos de células tumorales estimulan al sistema inmune adaptativo. Estos son capturados por las DC, las cuales activan principalmente linfocitos T CD4 Th1 y CD8 CTL. Las células tumorales antígeno positivas van a ser destruidas por acción directa e indirecta de los CD4 y CD8. Este proceso de eliminación debe repetirse cada vez que surjan cambios en los antígenos de las células neoplásicas.

2.2 Equilibrio

Las células tumorales que hayan sobrevivido a la fase de eliminación entran en un dinámico equilibrio, en el que los linfocitos y el $\text{INF}\gamma$ ejercen una potente e implacable presión que es suficiente para contener pero no para eliminarlas en su totalidad. De este modo se crea un ambiente tumoral que contiene células genéticamente inestables con tendencia a mutaciones. El resultado es la proliferación de clones con inmunogenicidad reducida y mayor resistencia al ataque del sistema inmune.

Esta fase es el proceso más prolongado de la Inmunoedición. Se estima que hay un período de aproximadamente 20 años entre la exposición al estímulo cancerígeno y la detección clínica del tumor.¹³

2.3 Escape

En esta fase las células que fueron seleccionadas en el equilibrio pueden desarrollarse en el ambiente inmunológicamente modificado, que permite su crecimiento y posterior detección clínica.

La célula tumoral desarrolla estrategias inmunoevasivas para poder eludir la respuesta innata y adaptativa.

Actualmente se conoce que se utilizan mecanismos denominados intrínsecos y extrínsecos para impedir el desarrollo de una respuesta antitumoral.

Extrínsecamente, creando un microambiente tumoral (-TME- del inglés Tumor Microenvironment) con estado inmunosupresor mediante:

- la enzima IDO (del inglés indoleamine-2,3-dioxygenase), que metaboliza el triptófano necesario para la proliferación del linfocito T. Su producción puede ser inducida en las células tumorales y en las APC mediante estímulo proinflamatorio como el $\text{INF}\gamma$, el cual es generado por la respuesta inmune antitumoral del hospedero siendo este el inductor más importante de IDO.

Al producirse por las células tumorales puede inducir inmunosupresión en el tumor disminuyendo la función y la proliferación de las células T dentro del tumor o mediante la limitación de la supervivencia de células T infiltrantes mediante metabolitos tóxicos del triptófano.²¹

- VEGF (del inglés vascular endotelial growth factor) y citocinas inmunosupresoras como TGF β e IL-10.

- el reclutamiento de células T reguladoras y células mieloides supresoras (MDSCs) que a su vez inducen el desarrollo de Treg y determinan un cambio en el fenotipo de los T cooperadores a Th2.¹⁵

- la promoción de la expresión de moléculas cohibidoras como CTLA-4, PD-1 y PD-L1.⁹

- la formación de estructuras linfoides terciarias dada por la atracción de células T y B determinando una arquitectura organizada. En estas se ha detectado la expresión de CCL21, un receptor capaz de inducir tolerancia inmunológica a partir del reclutamiento de células T naive específicas para antígenos tumorales en un contexto de baja coestimulación.¹⁶

Los mecanismos intrínsecos, afectan el reconocimiento mediado por las células efectoras del sistema inmune. Por ejemplo, pérdida de expresión antigénica y de los componentes del MHC, la disminución de ligandos de NKG2D y el desarrollo de desensibilización a INF γ . Además se abastece de mecanismos para escapar de la destrucción inmune, mediante defectos en los receptores de las vías de señalización de muerte celular o la expresión de señales antiapoptóticas.¹³

3. Inmunoterapia contra el cáncer

Al principio, muchos trabajos se basaron en los descubrimientos sobre la relación del SI y los tumores y se interesaron en el desarrollo de vacunas anti-antígenos tumorales.²² Luego otros encares de inmunoterapia comenzaron a desarrollarse. En 1994 se describe que CTLA-4 disminuye la respuesta de los linfocitos T inhibiendo la coestimulación de CD28 con el que comparte los ligandos CD80/CD86.²³ Este avance ha llevado a la comprensión de los procesos inmunorreguladores que están más activos en el TME y al desarrollo de terapias dirigidas a bloquear estos puntos de control inmunológico o checkpoints.⁸

Puntos de Bloqueo.

El rol crítico de los checkpoints en la inmunidad antitumoral queda demostrado por la clara eficacia del bloqueo de estos como inmunoterapia para el cáncer.

En 2011 en Estados Unidos la FDA aprobó el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4: Ipilimumab, para el tratamiento de pacientes con melanoma avanzado.⁹ El bloqueo de otros puntos de control (PD-1 PD-L1) llevó a impactantes resultados clínicos con 20-50% de respuesta clínica y a la aprobación por la FDA del anticuerpo monoclonal anti-PD-1 Nivolumab para melanoma avanzado en 2014, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC del inglés Non Small Cells Lunge Cancer) y carcinoma renal en 2015⁹, y en anti-PD-L1 Atezolizumab para carcinoma urotelial en mayo de este año³⁶.

Estas drogas representan un cambio radical en las terapias para el cáncer en dos sentidos. Primero no se dirigen a la célula tumoral, se dirigen a moléculas involucradas en la regulación de las células T efectoras antitumorales. Y segundo, el objetivo de la terapia no es activar el sistema inmune para que ataque una diana particular en las

células tumorales sino que elimina la vía de inhibición que bloquea la respuesta inmune antitumoral ²⁴, es decir, inhibe al inhibidor.

3.1 CTLA-4 y PD1

Los receptores inhibidores como CTLA-4 y PD-1 contribuyen a regular la respuesta inmune y que no se genere una activación continua, manteniendo la homeostasis del sistema.

Los linfocitos T vírgenes y memoria expresan CD28 pero no CTLA-4 ni PD-1 en su superficie, permitiendo que domine la coestimulación al reconocer el antígeno. Sin embargo, una vez que el linfocito T es activado, CTLA-4 es movilizado rápidamente a la superficie celular desde el depósito intracelular, llevando a la retroalimentación negativa una hora después del reconocimiento del antígeno. La expresión de PD-1 requiere activación transcripcional y aparece 6-12 horas después. ⁸

El CTLA-4 y PD-1 expresados en la célula T llevan a una dificultad en la activación y a un efecto supresor de funciones como la secreción de citocinas y de la proliferación. El CTLA-4 ejerce su acción principalmente mediante:

-La inhibición intrínseca de la activación de células T tanto por competencia con CD28 por la unión al ligando CD80/CD86 o por el reclutamiento de fosfatasa al dominio citoplasmático de CTLA-4 resultando en una reducción de las señales de TCR y CD28. Kong et al mostró que la quinasa PKC- η se une constitutivamente al dominio citoplasmático de CTLA-4 en Treg y que esta interacción es un mediador importante de la función de CTLA-4 en estas células. Por otro lado PD-1 retrasa la diferenciación y función de las Treg foliculares. ⁹

-La inhibición extrínseca de la activación de otras células T por la reducción en la expresión de CD80 y CD86 en las APC, tanto indirectamente por la regulación en menos (por citoquinas tales como IL-10) o directamente por la remoción de estos de las APC por transendocitosis resultando en la menor disponibilidad para unirse a CD28⁹. El CTLA-4 también puede señalar en las DC por la unión a CD80 y CD86 e inducir a la enzima inmunorreguladora IDO que llevan a la supresión de la respuesta de las células T. ⁹

La modulación de estos receptores utilizando anticuerpos monoclonales [Fig.5] es un nuevo objetivo terapéutico, que tiene como finalidad mejorar la función efectora de los LT. ^{10,11,12}

Esto dentro del contexto del cáncer cobra importancia debido a que en la génesis de la malignidad existen múltiples mecanismos de supresión inmune para prevenir una inmunidad antitumoral efectiva, como se describe en el siguiente punto. La terapia con anticuerpos dirigida contra varias moléculas reguladoras o como son conocidos actualmente en la literatura **checkpoints inmunológicos**. Éstos pueden reactivar la respuesta antitumoral mermada por el ambiente inmunorregulador característico de los procesos tumorales ^{20,30}.

Actualmente son un blanco terapéutico en la inmunoterapia contra el cáncer como por ejemplo el cáncer de mama y el melanoma pero también cobran relevancia en enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Crohn.

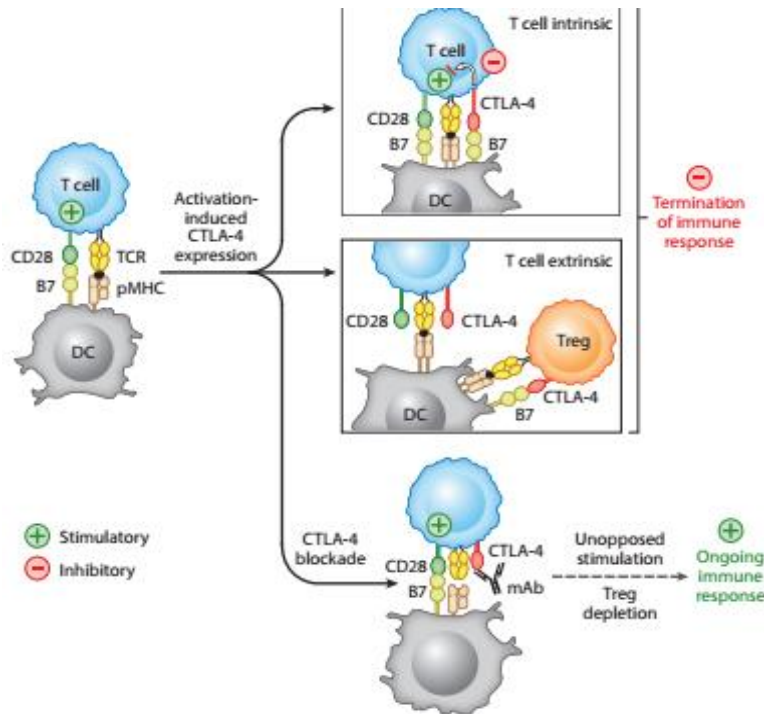


Fig.5: Mecanismo de acción de CTLA-4 y efecto de su bloqueo. Tomado de Susanne H. Baumeister, Arlene H. Sharpe, 2016.

3.2 CTLA-4 como blanco terapéutico.

Como fue mencionado anteriormente, CTLA-4 es un potente regulador negativo de la respuesta inmune de las células T periféricas. Es expresado de manera inducible en las células T naive y constitutivamente en células Treg FOXP3⁺ porque CTLA-4 es un blanco transcripcional directo de FOXP3. Es homólogo del receptor coestimulador CD28 de las células T y se une a los mismos ligandos CD80 y CD86 pero con mayor afinidad.

La interacción con sus ligandos disminuye la transcripción de IL-2, la proliferación de células T y el tiempo de contacto entre la célula T y la APC.

Tiene un rol crítico en el control de las células T autorreactivas y la homeostasis de las células T. CTLA-4 ejerce una función inmunorreguladora controlando células CD4⁺ y células CD8⁺ así como también Treg.

Se ha demostrado que en el sitio del tumor se generan infiltrados significativos de células T y que responden favorablemente a la terapia con anti-CTLA-4⁸

Efecto terapéutico: Los anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 Ipilimumab (IgG1 completamente humana) y Tremelimumab (IgG2 completamente humana) fueron los primeros fármacos bloqueadores de un punto de control inmunológico que entraron en ensayos clínicos en oncología.⁹

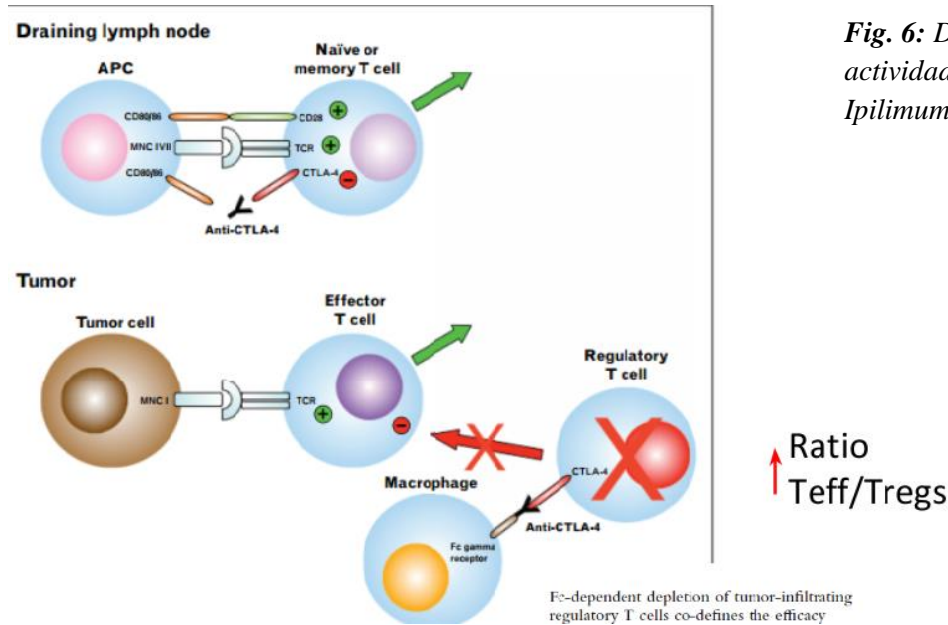


Fig. 6: Doble mecanismo de actividad anti-tumoral de Ipilimumab

Su aplicación da como resultado un aumento de la relación de células T efectoras CD4+ y CD8+/Tregs FoxP3+ en el infiltrado tumoral. [Fig6] Las células T efectoras y las T reguladoras son dirigidas por los anticuerpos anti-CTLA-4, lo que sugiere múltiples mecanismos de acción. Las células T CD8+ parecen ser necesarias siempre para el beneficio terapéutico con anticuerpos anti-CTLA-4, mientras que las células T CD4+ se requieren en algunos, pero no en todos los modelos tumorales en ratones. Esto refleja el papel fundamental de las células T CD8+ citotóxicas en la inmunidad antitumoral a través de la muerte directa de las células tumorales. Trabajos recientes sugieren que el efecto terapéutico de los anticuerpos anti-CTLA-4 puede ser debido no solo al bloqueo de la interacción de CTLA-4 con sus ligandos, sino también al agotamiento de células Treg intratumorales que sobreexpresan CTLA-4, mediada por el receptor de Fc generando citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos-ADCC-(del inglés antibody dependent cell mediated cytotoxicity). Como fue mencionado anteriormente el Ipilimumab es un anticuerpo completamente humano IgG1 que fue seleccionado para inhibir la interacción CTLA-4-B7. Sin embargo, en un estudio se mostró que la actividad antitumoral con anti-CTLA-4 mejora cuando contiene IgG2a en la región constante y observó una ausencia de actividad antitumoral cuando se utilizó IgG1. El anticuerpo anti-CTLA-4 IgG2a media su efecto a través de eliminación de Tregs intratumorales; las células T CD4 y CD8 intratumorales y las Teffs se preservan, así como Tregs periféricos. En suma, la interacción CTLA-4 IgG2a demostró una disminución de los Treg intratumorales, promoviendo un aumento en la relación Teff/Treg.³³ Recientes estudios en ratones explican los mecanismos moleculares por los cuales actúa el anti-CTLA-4. En el trabajo realizado por T. Simpson y colaboradores³⁵ se analizó la interacción de este anticuerpo con la vacuna GVAX en ratones con melanoma, se vio que tanto en los que fueron tratados con la vacuna más el anticuerpo como en los que recibieron anti-CTLA-4 en

monoterapia, se redujo notablemente el número de Tregs y aumentó considerablemente la relación intratumoral de Teff/Tregs. Esto demuestra que el efecto es independiente de la administración de la vacuna. También se demostró que el anticuerpo induce la eliminación de Tregs CD4+ que infiltran el tumor. Para esto transfirieron Tregs a ratones CD4+/+ y a ratones que CD4 -/- y midieron la acumulación de Treg intratumorales, en tratados con anticuerpo y GVAX, y en otros tratados solamente anticuerpo. En los CD4+/+ se notó una marcada reducción de Tregs, sin embargo, en CD4-/- no se presentaron cambios. También se planteó si la depleción de Tregs está mediada por el complemento y/o por ADCC. Para comprobar esto se utilizaron dos modelos de raton, uno sin un componente clave del complemento (C3 -/-) y otro sin la cadena γ de las IgG (γ -/-). En los C3 -/-, no se observó disminución los Treg ante el tratamiento con CTLA-4, por lo que el complemento no parece cumplir ningún rol en el proceso. Se vio que en los wild type (WT) tratados con el anticuerpo hubo efectivamente una disminución de Tregs, al contrario de lo que sucedía en los γ -/-, por lo que concluye que es un mecanismo dependiente de Fc γ R. Luego se trató de analizar qué tipo de receptor tenía mayor implicancia; para ello se analizaron ratones Fc γ RIII-/- y Fc γ RIV-/- y se concluyó que con Fc γ RIV-/- no habían disminuciones, por lo que el receptor Fc γ RIV tiene relevancia en la eliminación de Tregs intratumorales. Considerando que en ratones la ADCC es mediada predominantemente por macrófagos se evaluó la expresión de Fc γ RIV en éstas y otras células del sistema inmune en el tumor, observando un aumento de la densidad de este tipo celular, comparado con nódulos linfoides, y un aumento en la expresión de Fc γ RIV en células intratumorales en comparación con células de nódulos linfoides. Por otro lado se demostró que el tratamiento con CTLA-4 no alteró el porcentaje de macrófagos ni la expresión de Fc γ RIV, lo que sugiere que la reducción de los Tregs no depende de un aumento de macrófagos en el tumor en respuesta al CTLA-4. Para determinar si la pérdida de Fc γ RIV y su disminución intratumoral afectaban la protección tumoral, se evaluó la actividad antitumoral con GVAX y CTLA-4 en ratones wild type y Fc γ RIV-/- . Se observó que en los ratones WT había un aumento de la relación LTeff/Treg, al contrario de lo que sucedía con Fc γ RIV-/-, lo que contribuye a afirmar el rol fundamental de Fc γ RIV en la disminución de los Tregs. En este estudio se analizaron los distintos mecanismos mediante los cuales CTLA-4 puede modificar la relación Teff/Treg intratumoral, los puntos específicos en los que actúa el CTLA-4, el rol crucial del microambiente tumoral y la especificidad de los receptores, éstos son algunos ejemplos claves para dar continuidad a la investigación de esta terapia.⁷

3.3 PD-1/PD-L1 como blancos terapéuticos.

Recordemos que el PD-1 es un receptor transmembrana que funciona como un receptor de coestimulación negativo [Fig7], controlando la activación de los LT, LT senescentes, la tolerancia de los LT y la resolución de la inflamación. El PD-1 también puede estar expresado

en las NK y en los LB, limitando sus funciones efectoras, en los macrófagos limitando la duración de la inmunidad innata y en las Treg y Treg foliculares modulando su inducción y función.

Sus principales ligandos son PD-L1 siendo este el más expresado, presente en las APC, así como en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas, y PD-L2 presente principalmente en células dendríticas y macrófagos. Además PD-L1 puede servir como receptor de CD80 expresado en los LT lanzando otra señal inhibidora.

La unión del PD-1 a sus ligandos resulta en a) una cascada de fosforilación que termina atenuando las señales estimuladoras del TCR, disminuyendo la activación del LT y la activación de citoquinas; b) estimula la producción de factores de transcripción que impiden la proliferación y supervivencia de los LT; c) al reducir la producción de citocinas disminuye la capacidad citolítica, la motilidad y el encuentro con las DC y las células blanco; d) cambia el metabolismo de los LT inhibiendo la glucólisis, promoviendo la lipólisis y aumentando la oxidación de los ácidos grasos y e) puede promover el fenotipo Treg desde T vírgenes que suprimen la función de las células T efectoras.

Las señales inhibitoras del PD-1 controlan la tolerancia periférica en varios sentidos, mantiene las células T tolerantes, inhibe la activación de las células T CD4+ y CD8+ autorreactivas y sus respuestas efectoras, y restringe las células T autorreactivas en órganos blancos.

El PD-1 aparece a las 6-12 horas de la activación de los LT y declina con la desaparición del antígeno. Cuando los LT son estimulados repetitivamente por un antígeno como en las infecciones crónicas o en el cáncer, los niveles del PD-1 aumentan y los LT sufren modificaciones epigenéticas y cambios en los factores de transcripción que llevan a la diferenciación en un estado llamado *senescencia*. Además de expresar PD-1 los LT senescentes pueden expresar múltiples receptores inhibidores haciéndolos susceptibles a la inhibición por múltiples vías de puntos de control.⁹

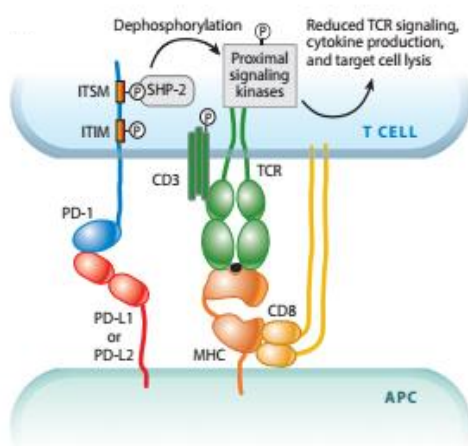


Fig. 7: La expresión de PD-1 es inducida en los LT.

La unión de PD-1 a sus ligandos PD-L1 o PD-L2 resulta en una reducción de la fosforilación de las moléculas de señalización del TCR, limitando así sus funciones efectoras. Tomado de Susanne H.

Baumeister, Arlene H. Sharpe, 2016,

Efecto terapéutico: Numerosos anticuerpos que inhiben el eje PD-1 entraron en evaluación clínica. Aunque estos difieren ampliamente en su estructura

se clasifican en dos grandes grupos: los que apuntan a PD-1 (Nivolumab, Pidilizumab) y los que apuntan a PD-L1 (MPDL3280A, MEDI4736).²⁰ En 2014 la FDA aprobó el anticuerpo monoclonal Nivolumab para el tratamiento de melanoma avanzado y cáncer de pulmón y en 2015 el Pembrolizumab para NSCLC refractario y carcinoma renal.

En el TME, las células tumorales pueden expresar PD-L1 o PD-L2 como muchas otras células. Cambios en el metabolismo de las células T y en las células tumorales regulan la respuesta inmune. La alta glucólisis de las células tumorales reduce los niveles de glucosa del microambiente tumoral, reduciendo de este modo la capacidad de linfocitos infiltrantes-tumorales (TILs del inglés Tumor-Infiltrating Lymphocyte) de montar una respuesta antitumoral.⁸ El bloqueo de PD-1 aumenta la concentración de glucosa en el TME y de glucólisis en los LT produciendo altos niveles de INF γ .

En muchos modelos preclínicos el uso de anticuerpos monoclonales anti-PD-1/PD-L1 mejora la citotoxicidad antitumoral, la producción de citocinas proinflamatorias y la proliferación de los LT promoviendo de este modo la destrucción del tumor. El blanco contra PD-L1 puede resultar en efectos biológicos distintos que aquellos contra el PD-1. Se cree que PD-L1 produce señales negativas en células por interacción con B7. Anticuerpos que bloquean PD-L1 previenen esta interacción pero los que bloquean PD-1 no. Otra diferencia es que los anticuerpos anti PD-L1 no previenen que el PD-1 interactúe con PD-L2, pero el efecto de esta diferencia aún se desconoce.

Una diferencia importante surgida de un estudio en animales demuestra que la acción antitumoral de los anticuerpos anti-PD-L1 dependen la región Fc y de la unión de estos a al receptor (Fc γ R), mientras que la acción de los anti-PD-1 es independiente de esto. Los autores realizan varios experimentos en ratones midiendo la reducción del volumen tumoral en distintas condiciones. Cuando un ratón carece de Fc γ R activador, sólo tiene Fc γ R inhibidores o se le administran AcMo anti-PD-L1 con una región Fc incapaz de unirse al receptor el volumen tumoral no se ve reducido. Por otra parte, en ratones wild type o cuando la región Fc es capaz de unirse a un Fc γ R activador, se observa una reducción del volumen tumoral de un 60%. En cambio, cuando se repiten estas condiciones pero para AcMo anti-PD-1 el volumen sí se ve reducido, mientras que este permanece incambiado en ratones wild types o con regiones Fc capaces de unirse al Fc γ R activador.

Esta diferencia es relativamente inesperada ya que el PD-1 se expresa sobre todo en los linfocitos T CD8⁺ dentro del TME y su bloqueo con AcMo que mediaran ADCC implicaría la eliminación de los mismos. Por otro lado PD-L1 se encuentra sobre la superficie de células tumorales por lo que la unión de la región Fc del anti-PD-L1 a su receptor ayudaría a la eliminación de estas células.

Estos estudios son importantes para la óptima selección de la región Fc en los anti-PD1/PD-L1.

El Nivolumab y el Pembrolizumab son anticuerpos de tipo IgG4 que se unen a los FcγR con baja afinidad y evitan la ADCC de las células que expresan PD-1. Los anti-PD-L1 que se están desarrollando son diferentes isotipos de IgG, y su evaluación clínica pueden aportar más datos sobre las distintas propiedades y el papel de los FcγR en la actividad antitumoral de estos anticuerpos.⁶

3.4 Evaluación clínica

Ipilimumab y Tremelimumab

Un estudio de referencia demostró que Ipilimumab duplica la supervivencia global de pacientes con melanoma metastásico previamente tratados. Los pacientes que recibieron Ipilimumab en monoterapia o vacuna de gp 100 en combinación con Ipilimumab tuvieron una supervivencia media de 10 meses en comparación con 4 a 6 meses para los pacientes que recibieron solo la vacuna de péptido gp100¹⁹. En un segundo ensayo en fase III se comparó la terapia con dacarbazina en monoterapia o frente a Ipilimumab más dacarbazina, demostrando tasas de supervivencia significativamente más altas con esta terapia combinada al año (47,3% frente a 36,3%) y a los 3 años (28,5% frente a 17,9%) en pacientes con melanoma metastásico no tratados previamente. Sobre la base de estos estudios, el Ipilimumab fue aprobado para el melanoma metastásico en los Estados Unidos y Europa en 2011.

Desafortunadamente Tremelimumab no mostró un aumento significativo de la sobrevida en un estudio en fase III que comparaba la respuesta a Tremelimumab frente a decarbazina/temozolomida en pacientes con melanoma en estadio avanzado²⁰, tal vez debido a la utilización de un Fc que no media citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y el agotamiento de Tregs o quizá a otros aspectos del diseño de los ensayos clínicos.⁸

Los efectos antitumorales de Ipilimumab apenas están demostrados para cánceres distintos del melanoma y Tremelimumab aún está en estudios tempranos. El cáncer de riñón, pulmón y próstata son los más estudiados. La terapia combinada de Ipilimumab y quimioterapia o radioterapia han mostrado un pequeño aumento del periodo libre de enfermedad pero sin impacto en la sobrevida global.

Nivolumab y Pembrolizumab

El primer estudio que evaluó un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 (Nivolumab) demostró beneficios a nivel clínico en pacientes con melanoma, cáncer renal, NSCLC y cáncer colorrectal. Análisis inmunohistoquímicos sugerían además una respuesta proporcional al nivel de expresión de PD-L1 en el tumor. A su vez un anti-PD-L1 fue conocido por tener regresiones tumorales duraderas. Estos hallazgos impulsaron la realización y desarrollo de estrategias con

anticuerpos monoclonales anti-PD-1 y anti-PD-L1 con la elaboración de numerosos ensayos clínicos, especialmente en pacientes con poca respuesta a los tratamientos quimioterápicos habituales.⁹

Un ensayo randomizado entre Pembrolizumab (anti-PD-1) y un agente quimioterápico en pacientes con melanoma refractario a Ipilimumab (anti-CTLA-4) demostró una PFS (progression-free survival) mayor en el grupo tratado con Pembrolizumab.³⁷

Una comparación randomizada entre el bloqueo de PD-1 y de CTLA-4 en melanoma avanzado, demostró una clara superioridad del Pembrolizumab sobre Ipilimumab. Además evidencia una menor tasa de irAE (immune related Adverse Events) que en el tratamiento con Ipilimumab.⁹

Del resultado de diversos ensayos se podrían obtener ciertas conclusiones sobre el tratamiento: 1) es útil en un número considerable de tumores; 2) ciertos tumores tienen baja tasa de respuesta; 3) la respuesta al bloqueo de PD-1 es más frecuente cuando en el TME se expresa PD-L1; 4) la respuesta puede ser duradera; 5) presenta un 10% de irAE comparado con 15-30% en los pacientes tratados con anti-CTLA-4; 6) si hay recaída de la enfermedad durante la discontinuación del fármaco se puede volver a administrar para el control de la enfermedad; 7) es una terapia segura y efectiva combinable con otras terapias, aumentando la tasa de respuesta.

3.5 Consideraciones clínicas del bloqueo de checkpoints

La experiencia clínica ganada a partir de estudios con anticuerpos anti-CTLA-4 abrió el camino para el desarrollo de otros fármacos y para estrategias de tratamiento, manejo de toxicidad y evaluación de la eficacia.

Por un lado, surge la observación de que algunos tumores pueden tener una regresión mayor y más duradera luego de una aparente progresión inicial de la enfermedad en tratamiento. El agrandamiento del tumor medido por exámenes radiológicos puede reflejar un crecimiento tumoral real o deberse a la inflamación inducida por el fármaco en el sitio tumoral seguido de una regresión retardada. Este fenómeno determina un desafío en la selección de criterios de valoración para los ensayos clínicos de fármacos que bloquean los puntos de control inmunológicos. Los investigadores propusieron un criterio de respuesta llamado criterio de respuesta inmune relacionado (irRC del inglés immune-related response criteria) para capturar los efectos beneficiosos en la terapia mediante el bloqueo de checkpoints.

Los irRC habilitan la inclusión de nuevas lesiones en la evaluación total de la carga tumoral sin que ello se considere una progresión de la misma, requiriendo para su confirmación, un seguimiento radiológico posterior. Los irRC todavía deben establecerse con exactitud. Dado que la eficacia en el bloqueo con anticuerpos anti PD-1/PD-L1 sigue midiéndose el criterio RECIST (del inglés Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) se ha propuesto un irRC unidimensional.²⁰

Por otro lado, aunque el bloqueo de checkpoints inmunológicos puede significar en beneficios antitumorales significativos, dado que el efecto no solo aumenta la respuesta inmune tumor-específica, pueden ocurrir efectos adversos por la activación inmunológica no específica. En este sentido una nueva categoría de irAEs fue reconocida y caracterizada, llevando al desarrollo de algoritmos para una detección precoz y un correcto manejo.⁸

Los irAEs severos estuvieron en torno al 15-30% en pacientes que recibían anti-CTLA-4. Estos irAEs se asocian con inflamación en tejidos normales, tales como intestino, piel, glándulas endocrinas y fenotipos reensamblados en humanos heterocigotos para CTLA-4 con una expresión reducida de CTLA-4²⁵. En pacientes que recibían anti-PD1 la incidencia de irAEs severos rondó el 10% siendo relevante la aparición de neumonitis puesto que se han descrito casos de muerte relacionadas al tratamiento contra PD-1. Algunos de estos efectos pueden ser tratados con inmunosupresores y deben seguir algoritmos establecidos. La inmunosupresión prolongada requerida para tratar los irAEs desafortunadamente acarrea el riesgo de la predisposición a infecciones oportunistas. Debido a esto es que se recomienda la profilaxis contra microorganismos infecciosos tales como *Pneumocystis jirovecii*, siguiendo la guía establecida por la National Comprehensive Cancer Network.²⁰

La presencia de estos efectos adversos en individuos sin historia previa de autoinmunidad demuestra que los mecanismos de acción de los anticuerpos anti-checkpoints liberan los bloqueos de la respuesta inmunológica y acentúan la fina línea que existe entre la autotolerancia y la autoinmunidad.⁸

Dado que los pacientes con enfermedades autoinmunes no son incluidos en los ensayos de CTLA-4 y PD-1/PD-L1 no está claro si presentan mayor tasa de irAEs. Aun así algunos estudios vieron que el tratamiento con Ipilimumab no mostró exacerbaciones inmunológicas adversas en pacientes con patologías autoinmunes subyacentes.

Por último, la inmunoterapia beneficia sólo a una fracción de pacientes por lo que hay esfuerzos para identificar biomarcadores que puedan ser usados para seleccionar los pacientes a tratar. Los datos obtenidos por análisis de tejido tumoral pueden luego guiar las bases lógicas para la búsqueda de marcadores relevantes en la sangre (monitorización basada en tejidos).

En el análisis de tumores que requirieron tratamiento con anti-CTLA-4 la diferencia más marcada al comparar con los que no recibieron tratamiento, fue un incremento en las células T que expresan ICOS. El aumento de la frecuencia de LT ICOS+ en el tumor fue acompañado de un incremento similar en sangre. Estos datos acoplados a otros estudios demostraron que el incremento de LT ICOS+ sirve como marcador farmacodinámico del tratamiento con anti-CTLA-4.²⁴

También un alto número de Treg, la presencia de IDO y el perfil genético inmunoactivo se vieron asociados a un mayor beneficio con Ipilimumab, así como un aumento en la leucocitosis

fue encontrado como un marcador farmacodinámico específico para Ipilimumab, y el subsecuente aumento linfocítico fue asociado a un aumento en la sobrevida en pacientes con melanoma.²⁰

En el tratamiento con anti-PD-1/PD-L1, en un principio la expresión de PD-L1 fue elegida como criterio para seleccionar pacientes. Los datos reportados concluyeron que la respuesta al Nivolumab no se relaciona de manera directa con los niveles de expresión de PD-L1, de manera que la determinación de este no predice de manera eficaz la probabilidad de una buena respuesta al tratamiento.^{9,24} Es importante notar que en pacientes en los que el tejido tumoral fue positivo tanto para PD-L1 como para infiltrado tumoral se observó un aumento de la sobrevida comparado con pacientes con solo uno de estos dos factores positivos o ninguno de ellos. Estos datos sugieren que la expresión de PD-L1 en el tumor es más concluyente cuando se observa en el contexto de una respuesta T activa y que es la capacidad de respuesta de las células T por sí misma y no la expresión de PD-L1 el factor clave.²⁴

Sin embargo la expresión de PD-L1 en algunos tumores es constitutiva y no está asociada ni a la infiltración de células T ni a la inducción por INF γ . En estos casos la presencia de PD-L1 puede guiar el tratamiento. Por ejemplo, el linfoma de Hodgkin expresa PD-L1 y PD-L2 de forma constitutiva y muestra un 87% de respuesta al tratamiento con Nivolumab.²⁴ De manera controversial otro estudio mostró una recurrencia en las anomalías genéticas que codifican los receptores PD-L1 y PD-L2 en los linfomas Hodgkin y pronostican una menor respuesta al tratamiento con anti-PD1. En estos casos se reportó la existencia de un aumento en la expresión de PD-L1 en un subtipo particular de célula cancerígena. Por lo que la modificación del receptor por cambios en el genoma y la aparición de mecanismos que aumenten su expresión determinan una menor eficacia terapéutica.⁹

Otros factores, como las anomalías genéticas, podrían explicar en parte una respuesta inadecuada y menor eficacia terapéutica generada por la síntesis de un receptor PD-L1 mutado. Este fenómeno sería más predominante en cánceres tabaco-dependientes donde se encuentra aumentada la posibilidad de aparición de neoantígenos y otras características ligadas a un mayor daño del ADN.

3.6 Terapia combinada CTLA-4 y PD-1.

La mayoría de los antígenos contra el cáncer de hoy en día provienen de genes con alguna expresión en los tejidos normales, de esta manera la inmunidad antitumoral se relaciona con la autoinmunidad.

De esta forma se genera la interrogante de si podemos tratar el cáncer sin generar enfermedades autoinmunes severas; utilizando modelos con ratones se trató de modular por separado autoinmunidad de inmunidad contra el cáncer.

El doble bloqueo de CTLA4 y PD1 con Ipilimumab y Nivolumab mostró una mayor efectividad en pacientes con melanoma y la FDA aprobó su uso combinado.³⁶ Diversos estudios preclínicos demostraron un aumento en la eficacia terapéutica del uso de la terapia combinada en ratones con adenocarcinoma de colon y melanoma.⁹ El melanoma es uno de los tipos de cáncer más extensamente estudiados con esta terapia; uno de estos combinó Ipilimumab y Nivolumab en el melanoma avanzado, se realizaron a dosis creciente tanto en simultáneo como secuenciado. Los resultados mostraron que el régimen simultáneo tenía mayor ORR (40% para todos los pacientes), sin embargo, también se observó una mayor incidencia de irAEs, potencialmente reversibles, similares a los presentados en la monoterapia con Ipilimumab. En otro estudio doble ciego de melanoma no tratado dividió a los pacientes en dos cohortes, una de ellas recibió Ipilimumab con Nivolumab y otra con placebo, se demostró la eficacia de la terapia combinada con un ORR de 61% en comparación con la utilización del placebo.⁹

3.7 Terapias combinadas con otros agentes terapéuticos

En la bibliografía actual hay numerosas publicaciones que estudian los resultados de las terapias combinando anti-CTLA-4 y anti-PD-1/PD-L1 con quimioterapia, radioterapia y otras inmunoterapias [Tabla 1]. Dado que los tumores emplean múltiples estrategias para escapar de la inmunidad antitumoral y estas pueden ser diferentes en cada tumor y en cada paciente la inmunoterapia debería ser personalizada, identificando el proceso alterado en cada caso para luego combinar estrategias para vencerlo.³⁵ A continuación se citan algunos ejemplos de posibles combinaciones.

CONVENTIONAL THERAPIES	INHIBITORY IMMUNE SIGNALS	STIMULATORY IMMUNE SIGNALS
Chemotherapy	CTLA-4	ICOS
Radiation	PD-1/PD-L1	Ox40
Surgery	LAG-3	41BB
Genomically targeted	TIM-3	Vaccines
Anti-angiogenic	VISTA	Cytokines
Hormonal	BTLA	Oncolytic virus

Tabla 1: Lista de algunas terapias convencionales, señales inhibitorias y señales estimuladoras que pueden ser consideradas como estrategias combinadas para promover respuestas antitumorales y beneficios clínicos duraderos.

4-1BB

El 4-1BB se expresa en la membrana de linfocitos T y NK activados, pero no en linfocitos en reposo. Se ha detectado también su expresión en células dendríticas y en granulocitos. La función principal de esta proteína parece ser coestimular la proliferación y favorecer la supervivencia de linfocitos T activados por antígeno. Tiene un único ligando denominado CD137-Ligando, que se expresa en la membrana de células presentadoras de antígeno activadas

(células dendríticas, células B y macrófagos).²⁶ Se plantea que el uso de una terapéutica combinada entre el CTLA-4 y el 4-IBB mejora la inmunidad antitumoral y reduce los efectos de autoinmunidad. Esto es debido a que el anticuerpo anti- 4-I-BB reduce la producción de autoanticuerpos contra el CTLA-4 y también demostró que el efecto de la combinación de anticuerpos era dependiente del agotamiento de los LT CD8+. Los autores plantean que la supresión de la autoinmunidad por parte de la terapia combinada se deba a la modulación de la actividad de los Treg, aumentando su actividad.²⁷ Es en este contexto que se planteó realizar pruebas en ratones para ver el efecto de la terapia combinada en la activación de LT CD8 y su papel en la inmunidad antitumoral; para el experimento se utilizó ratones a los cuales se les había inyectado Mc38 (células de cáncer de colón). Horas después de la inoculación se les dio el tratamiento con anticuerpos. Separándolos en dos poblaciones, una con anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 y otra población con terapia combinada CTLA-4; 4-IBB. Se los controló en los días 2, 9 y 16. Los resultados mostraron que la terapia con CTLA-4 redujo el tamaño tumoral en 4,6mm² (P=0.0094).

Mientras que la combinación CTLA-4; 4-IBB redujo el tamaño del tumor en promedio 8,4 mm² (P=0,0006). Estos resultados permitieron concluir que la terapia combinada de CTLA-4 con 4-IBB genera una reducción significativamente mayor del tamaño tumoral en comparación con CTLA-4 en monoterapia. También permite concluir que la terapia combinada reduce en mayor medida la velocidad de crecimiento tumoral.

IL-2

La capacidad de la interleucina-2 (IL-2) para expandir las células T con el mantenimiento de la actividad funcional se ha traducido en las primeras inmunoterapias de cáncer humano eficaces reproducibles. El crecimiento de grandes cantidades de linfocitos infiltrantes de tumor con actividad antitumoral in vitro de la IL-2 ha conducido al desarrollo de terapias de transferencia de células que son altamente eficaces en pacientes con melanoma.²⁸

El CTLA-4 inhibe la transcripción de IL-2 en los linfocitos CD4+. Cuando es bloqueado con Ipilimumab, reduce un subconjunto de células T CD4+ que expresan Lag 3, ICOS, IL-10 y Egr2 (del inglés early growth response gene-2) con un aumento concomitante de Teff productoras de IL-2 que pierden la expresión de FoxP3. La neutralización de IL-2 mediante el bloqueo de las subunidades α y β del receptor de IL-2 (IL-2R $\alpha\beta$) CD25 y CD122 respectivamente, mejora la relación Teff/Tregintratumoral. Es por esto que el efecto antitumoral del bloqueo de CTLA-4 depende de la IL-2 y su receptor (IL-2R $\alpha\beta$).³²

La inmunoterapia del cáncer con IL-2 ha demostrado control de la enfermedad a largo plazo en el carcinoma metastásico de células renales y melanoma maligno. Con la introducción de nuevos inhibidores de quinasas, moléculas inmunomoduladoras, citoquinas y las vacunas para el

tratamiento de cáncer existe un mayor interés en la combinación de estas estrategias terapéuticas con IL-2.²⁹

IDO

En el melanoma se observó a IDO como contribuyente potencial de inmunosupresión. La inhibición farmacológica de IDO con 1MT (del inglés 1-methyl-tryptophan) ha demostrado que resulta en la respuesta antitumoral dependiente de célula T en modelos de ratón. La eliminación del tumor con terapia combinada de anti-CTLA-4 y 1MT está asociada con una mejor infiltración de CD8+ y CD4+T en el tumor.²¹

ICOS

Estudios en modelos de ratón mostraron una pérdida de eficacia en el bloqueo de CTLA-4 en ausencia de ICOS indicando una importancia crítica en la presencia de esta molécula para los efectos terapéuticos de los anticuerpos anti CTLA-4. Se ha observado que dando una señal agonista a ICOS sumado a un anti-CTLA-4 aumenta la eficacia 4 a 5 veces más que con anti-CTLA-4 en monoterapia.³⁹ Así ICOS es un nuevo blanco para estrategias de inmunoterapia combinada. Anticuerpos para ICOS están siendo desarrollados para evaluación clínica.²⁴

CAR-T

Otra terapia combinada que se ha desarrollado utiliza las herramientas de ingeniería genética para crear células T con modificaciones en el receptor llamadas CAR-T (chimeric antigen receptor T) que secreten inmunomoduladores humanos como PD-L1. Esto permite modificar el microambiente disminuyendo el agotamiento de las células T en la región del tumor. En este estudio clínico con pacientes con carcinoma de células renales las CAR-T son dirigidas a la enzima CAIX, seleccionada por su expresión en distintos tipos de tumores hipóxicos sólidos.³¹

Radioterapia

Actualmente la radioterapia es requerida para el tratamiento de múltiples cánceres. Un estudio combinó el tratamiento anti-CTLA-4 con radiación y encontró una mayor regresión tumoral en los irradiados frente a los no irradiados³⁴. Sin embargo se observó el desarrollo de resistencia, que se atribuyó a la regulación en más de PD-L1 asociada al agotamiento de los LT. Debido a esto la respuesta óptima del tratamiento con radiación más anti-CTLA-4 se consigue agregando un agente anti-PD-1/PD-L1.

La radiación aumenta el repertorio de TCR en las células intratumorales por lo que junto al bloqueo de CTLA-4 que promueve la expansión linfocitaria, moldea el repertorio TCR de los clones periféricos expandidos y además el bloqueo de PD-L1 revierte los LT agotados. En este estudio se observaron resultados similares en melanoma tanto en ratones como en humanos demostrando que la combinación promueve la respuesta y la inmunidad por mecanismos no redundantes.

3.8 Otras terapias

El estudio de CTLA-4 y PD-1 como blancos terapéuticos contra el cáncer ha incentivado el descubrimiento de otras moléculas coinhibidoras que permiten el estudio de nuevas terapias alternativas [Fig.8]. Muchas de éstas son coexpresadas con PD-1 en las células T tumorales, incluso se considera que aquellas que expresan un mayor número de éstas moléculas son más

disfuncionales que las que expresan solamente PD-1.

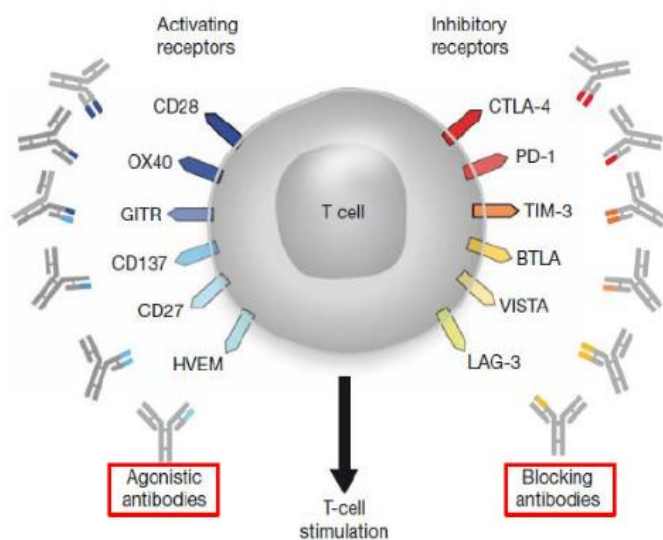


Fig.8: Moléculas coinhibidoras estudiadas como posibles puntos de control para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.

Tomado de Mellman et al. Nature (2011)

Algunos ejemplos de estas moléculas son:

- LAG-3 (Lymphocyte Activation Gene 3)

El Gen de Activación Linfocitaria es un ligando homólogo al CD4, que une, aún con mayor afinidad que éste, a moléculas MHC II, y regula negativamente la proliferación y función de los linfocitos T. Estudios preclínicos han demostrado que el bloqueo de ambas vías de forma sinérgica logra mejores resultados que el bloqueo único, con una remisión del 80% versus 15% respectivamente.⁸

- TIGIT (Célula T Inmunoglobulina y Dominio ITIM)

Es un receptor coinhibidor perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas. El TIGIT ejerce mecanismos supresores por distintas vías, entre ellas induce la producción por células dendríticas de IL-10 e inhibe la de IL-12. Inhibe la activación de linfocitos CD4+ y CD8+ y regula la tolerancia celular al actuar sobre las células T autorreactivas y los Treg. La combinación de ésta molécula con PD-1 ha demostrado un aumento de la proliferación, producción de citocinas y antígenos tumorales específicos por parte de los CD8+ en estudios in vitro, esto lleva a la conclusión que la terapia combinada permite limitar la inmunidad tumoral, y mejorar la regresión tumoral y supervivencia, esto sumado a un menor número de efectos adversos, en contraste con la monoterapia.⁸

- VISTA (V-Domain Immunoglobulin-Containing Suppressor of T Cell Activation)

Es un receptor perteneciente a la familia de inmunoglobulinas, homólogo a PD-1, que se expresa en linfocitos CD4+, CD8+ y en algunos subtipos de monocitos, neutrófilos y células dendríticas. Tiene funciones inhibitorias sobre linfocitos T que regulan la activación y tolerancia, y sobre las células presentadoras de antígeno.⁸

- TIM-3 (T Cell–Immunoglobulin–Mucin Domain 3)

Es un receptor de la familia de proteínas TIM. Debido a que TIM-3 puede mediar el reconocimiento y la fagocitosis celular su mecanismo de acción es diferente al de las demás moléculas mencionadas. Sin embargo, los puntos de bloqueo en la terapia monoclonal aún no están bien dilucidados.⁸

Conclusiones

La falta de una respuesta inmunitaria eficaz y los mecanismos de evasión de las células tumorales contribuye al desarrollo y progresión tumoral.

La Inmunoterapia tiene actividad potencial en diferentes tumores al actuar sobre el sistema inmune y no directamente sobre las células tumorales. El bloqueo de los checkpoints inmunológicos mediante los AcMo se asocia a una respuesta antitumoral de larga duración y la capacidad de adaptación inmune, y la memoria ofrece la posibilidad de supervivencia a largo plazo.

Estos AcMo han demostrado resultados prometedores en los ensayos clínicos llevados a cabo hasta el momento, como agentes para tratar a los pacientes con melanoma metastásico irresecable. Se están realizando nuevos estudios a fin de confirmar estos datos y para evaluar su eficacia en el tratamiento de otros tumores, ya sea como agentes únicos o en combinación con otros fármacos.

La posibilidad de combinación entre los diferentes Ac monoclonales (doble bloqueo de checkpoint CTLA4 y PD1), así como la combinación con radioterapia y algunas drogas ha mostrado mayor beneficio en la respuesta al tratamiento y mejor pronóstico en comparación con los que recibían monoterapia.

De su uso en la práctica clínica se desprenden tres grandes observaciones, en primer lugar no todos los individuos se benefician igual de la terapia y es necesario encontrar parámetros que pronostiquen quienes son candidatos a esta. Por otro lado, no se pueden usar scores habituales para evaluar la respuesta a este tratamiento. Por último, la aparición de efectos adversos llevó a la realización de algoritmos para su rápida identificación y solución.

La recuperación de la respuesta inmune del ambiente tumoral supresor a través del bloqueo de checkpoints es el inicio de una nueva inmunoterapia contra el cáncer, y como fue mencionado en esta revisión, se están realizando numerosos estudios que permitirán encontrar nuevos puntos de control inmunológico, y de esta forma desarrollar más terapias específicas.

ANEXOS

ABREVIATURAS

AcMo: Anticuerpo monoclonal

ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Ag: Antígeno

APC: Células presentadoras de antígenos (del inglés antigen-presenting cell)

BCR: receptor de linfocito B (del inglés B-cell receptor)

CTL: linfocito T citolítico (del inglés Cytolytic T Lymphocyte)

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño (del inglés Damage-associated molecular patterns)

DC: célula dendrítica (del inglés dendritic cell)

Egr2: del inglés early growth response gene-2

IDO: indoleamine-2,3-dioxygenase

irAEs: Efectos adversos relacionados a la inmunidad (del inglés immune related Adverse Events)

irRC: criterio de respuesta inmune relacionado (del inglés immune-related response criteria)

LT: linfocito T

MDSCs: células supresoras mielocíticas (del inglés Myeloid-derived suppressor cells)

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés major histocompatibility complex)

NK: natural killer.

PAMPs: Patrones moleculares asociadas a microorganismos patógenos (del inglés Pathogen-associated molecular patterns)

PFS: (progression-free survival)

PRR: Receptores para el reconocimiento del patrón (del inglés Pattern recognition receptor).

RECIST: del inglés Response Evaluation Criteria In Solid Tumors

RIA: Respuesta Inmune Adaptativa

RII: Respuesta Inmune Innata

TCR: Receptor de linfocito T (del inglés T-cell receptor)

TILs: Linfocitos infiltrantes-tumorales (del inglés Tumor-Infiltrating Lymphocyte)

TME: Microambiente tumoral (del inglés Tumor MicroEnvironment)

VEGF: del inglés Vascular Endothelial Growth Factor.

Referencias bibliográficas

1. Bernard W, Stewart CPW. WorldCancerReport. 2014.
2. Situación Epidemiológica del Uruguay en relación al Cáncer. Comisión honoraria de Lucha contra el Cáncer. MSP, Mayo 2013.
3. Hedrich CM. Shaping the spectrum-From autoinflammation to autoimmunity. Clinimmunol. 2016;165:21-8.
4. van Kempen TS, Wenink MH, Leijten EF, Radstake TR, Boes M. Perception of self: distinguishing autoimmunity from autoinflammation. NatRevRheumatol. 2015;11(8):483-92.
5. Abul K Abbas, Andrew H Lichtman, ShivPillai. Inmunidad innata. Inmunología Celular y Molecular. 7 ed. Barcelona: Elsevier; 2012. p.55-88
6. Dahan R, Segal E, Engelhardt J, Selby M, Korman AJ, Ravetch JV. FcγRs Modulate the Anti-tumor Activity of Antibodies Targeting the PD-1/PD-L1 Axis. CancerCell. 2015;28(3):285-95.
7. Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. J ExpMed. 2013;210(9):1695-710.
8. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. CancerCell. 2015;27(4):450-61.
9. Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. AnnuRevImmunol. 2016;34:539-73.
10. Patrick A. Immune Checkpoint Blockade in Cancer: Inhibiting CTLA-4 and PD-1/PD-L1 With Monoclonal Antibodies. 2014.
11. Wolchok JD, Saenger Y. The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of T-cell activation. Oncologist. 2008;13Suppl 4:2-9.
12. Saavedra D. La molécula CD28 y su función en la activación de células T. Rev Cubana HematolInmunolHemoter 2013;29(4) : 359-67
13. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. AnnuRevImmunol. 2004;23:329-60.
14. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases- elimination, equilibrium and escape. CurrOpinImmunol. 2014;27:16-25.
15. Abul K Abbas, Andrew H Lichtman, ShivPillai. Inmunidad antitumoral. Inmunología Celular y Molecular. 7 ed. Barcelona: Elsevier; 2012. p.389-405
16. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and Adaptive Immune Cells in the Tumor Microenvironment. NatureImmunology. 2013;14:1014-22.

17. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell Recognition: Molecular Mechanism and Functional Significance. *AdvImmunol.* 2000;74:181-273.
18. García LA, Algarra I, Garrido F. MHC Class I Antigens, Immune Surveillance, and Tumor Immune Scape. *J CellPhysiol.* 2003;195:346–55.
19. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(8):711-23.
20. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J ClinOncol.* 2015;33(17):1974-82.
21. Holmgaard RB, Zamarin D, Munn DH, Wolchok JD, Allison JP. Indoleamine 2,3-dioxygenase in a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *J ExpMed.* 2013; 210(7): 1389–1402.
22. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocyte son a human melanoma. *Science.* 1991;254(5038):1643-7.
23. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.* 1994;1(5):405-13.
24. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint. *Science.* 2015;348(6230):56-61.
25. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving Nivolumab. *J ClinOncol.* 2014;32(10):1020-30.
26. Alfaro C, Murillo O, Tirapu I, Azpilicueta A, Huarte E, Arina A, et al. El potencial de la inmunomodulación con anticuerpos monoclonales anti-CD137 (4-1BB) para terapia de enfermedades malignas e infecciones virales crónicas. *Anales Sis San Navarra.* 2006;29.
27. Kocak E, Lute K, Chang X, May KF Jr, Exten KR, Zhang H, et al. Combination therapy with anti-CTL antigen-4 and anti-4-1BB antibodies enhances cancer immunity and reduces autoimmunity. *Cancer Res.* 2006;66(14):7276-84.
28. Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol.* 2014;192(12):5451-8.
29. Antony GK, Dudek AZ. Interleukin 2 in cancer therapy. *CurrMedChem.* 2010;17(29):3297-302.
30. Kakimi K, Karasaki T, Matsushita H, Sugie T. Advances in personalized cancer immunotherapy. *BreastCancer.* 2016

31. Suarez ER, Chang DK, Sun J, Sui J, Freeman GJ, Signoretti S, et al. Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model. *Oncotarget*. 2016.
32. Hannani D, Vétizou M, Enot D, Rusakiewicz S, Chaput N, Klatzmann D, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade: obligatory contribution of IL-2 receptors and negative prognostic impact of soluble CD25. *Cell Res*. 2015;25(2):208-24.
33. Selby MJ, Engelhardt JJ, Quigley M, Henning KA, Chen T, Srinivasan M, et al. Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumor alregulatory T cells. *Cancer Immunol Res*. 2013;1(1):32-42.
34. Twyman-Saint Victor C, Rech AJ, Maity A, Rengan R, Pauken KE, Stelekati E, et al. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature*. 2015;16:520(7547):373-7
35. Kakimi K, Karasaki T, Matsushita H, Sugie T. Advances in personalized cancer immunotherapy. *BreastCancer*. 2016.
36. Brodsky NA, Ph.D. Checkpoint Immunotherapy Advances in Solid Cancers. ASCO 2016 update. 2016.
37. Brodsky NA, Ph.D. Immunotherapy y Melanoma: The Path to Progress. ASCO 2016 update. 2016