

Cirugía y Cirujanos

Volumen **71**
Volume

Número **3**
Number

Mayo-Junio **2003**
May-June

Artículo:

Inmunoterapia mediada por linfocitos T en pacientes con cáncer

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Academia Mexicana de Cirugía

Otras secciones de
este sitio:

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)

Immunoterapia mediada por linfocitos T en pacientes con cáncer

Dr. Víctor M Valdespino-Gómez,* Dra. Leticia Rocha-Zavaleta**

Resumen

En los últimos 20 años a través de un arduo trabajo experimental, se han logrado conocer los fenómenos celulares y moleculares que participan en la respuesta inmune antitumoral. Esto ha permitido identificar 30 antígenos tumorales de algunas proteínas que se expresan en las células tumorales, los cuales sirven de blanco para la respuesta inmune. Múltiples estudios *in vitro* y en animales han demostrado que clonas específicas de los linfocitos T CD4+ y CD8+ reconocen oligopéptidos inmunogénicos tumorales y realizan la principal respuesta efectora contra los tumores. La inmunomodulación positiva en las fases de reconocimiento y efectora de los linfocitos T ha provocado respuestas objetivas antitumorales en modelos experimentales. Similares estrategias han sido utilizadas en protocolos clínicos de inmunoterapia celular demostrando respuestas objetivas parciales en pacientes con cáncer avanzado.

Actualmente se investiga en la identificación de nuevos antígenos tumorales, en nuevos mecanismos por los cuales el tumor escapa al ataque inmunológico, así como en la aplicación de protocolos de inmunoterapia celular en pacientes con cáncer no-avanzado.

En los próximos años nos asombraremos de los efectos terapéuticos de la inmunomodulación celular positiva en pacientes con cáncer.

Palabras clave: inmunoterapia celular, cáncer, linfocitos T.

Summary

Several experimental developments in the last 20 years have hallmarked progress in understanding the cellular and molecular basis of the immune response to cancer. Identification of 30 tumor antigens associated from some expressed proteins in neoplastic cells are used as targets of immune response cells. Multiple studies have proved *in vitro* and in animal models that specific clones of lymphocytes T CD4+ and CD8+ recognize the tumoral immunogenic-oligopeptides and carry out the principal effecting phase in anti-tumor response. Positive immunomodulation of recognition and effecting phases have obtained objective anti-tumoral response in these experimental models. Similar strategies have been used in immunotherapy cancer patient clinical trails and have demonstrated partial objective responses.

Current studies emphasize identification of new tumor molecular-antigens, in understanding new tumor mechanisms enabled to escape immunologic attack and in use of positive immunomodulation in patients with non-advanced cancer.

Over the coming years, we will be surprised at the impact of this type of anti-tumor treatment.

Key words: Cellular immunotherapy, Cancer, T lymphocytes.

* División de Cirugía del Hospital de Oncología CMN Siglo XXI del IMSS y División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Xochimilco de la UAM.

** Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Solicitud de sobretiros:

Dr. Víctor M. Valdespino
Angel Urraza 517
Colonia del Valle
México D.F. 03100.
Tel y fax. 5559 7768
E-mail: valdespinov@ yahoo.com

Recibido para publicación: 24-01-2003

Aceptado para publicación: 01-04-2003

El concepto de "cáncer" en el ejercicio médico clínico quirúrgico corresponde a más de 100 entidades diferentes, que guardan en común ser enfermedades en las que se destaca el crecimiento progresivo invasor local y a distancia de conjuntos de células propias del sujeto, que le provocan diferentes grados de morbilidad e incluso la muerte.

A su vez, dentro de cada entidad clínica se presentan múltiples condiciones oncogénicas específicas que interactúan en red para modificar el fenotipo celular y tisular. Las células tumorales presentan un genotipo inestable con múltiples mutaciones, rearrreglo de genes y amplificación o delección de material genético⁽¹⁾. Seis pasos esenciales sufren las células para convertirse en un tumor agresivo: las células tienen que mutar y con ello esquivar las señales celulares que suprimen su crecimiento, luego ellas deben adquirir su propia vía de señalización de crecimiento, independiente de las se-

ñales externas. Las células deben también evadir la apoptosis y desarrollan un ilimitado potencial de proliferación. Los dos últimos pasos se aplican preferentemente a los tumores sólidos, al crecer deben crear su propia red de vasos sanguíneos para obtener los nutrientes y el oxígeno que necesitan; y los tumores más peligrosos desarrollan mecanismos que permiten que las células tumorales se separen del tumor principal y penetren al torrente sanguíneo y linfático y alcancen tejidos distantes donde crecen como tumores secundarios o metástasis⁽²⁾. Con ello la célula tumoral escapa de los controles de homeostasis dentro del sistema tisular.

En particular, diferentes alteraciones genéticas que acompañan el desarrollo de un tumor inciden en los mecanismos naturales involucrados en la respuesta inmune antitumoral. Así se ha encontrado que en diversos tumores los mecanismos de procesamiento y presentación de antígenos se encuentran alterados en grado diferente, y expresan también algunas citocinas, quimiocinas, o factores de crecimiento, que inducen finalmente a tolerancia o anergia de la respuesta inmune en contra del tumor inhibiendo la respuesta de los linfocitos T CD8+ citotóxicos (LCT)⁽³⁾; debido a ello las células tumorales difícilmente provocan respuesta inmune antitumoral eficiente.

En esta breve revisión se listarán los principales conceptos modernos que nos han permitido entender la dimensionalidad celular y molecular de la interrelación entre el tumor y la respuesta inmunológica del hospedero. Revisaremos someramente la participación de los linfocitos T como células efectoras a partir de su reconocimiento y activación contra los antígenos asociados al tumor, nos centraremos en la identificación de los antígenos asociados al tumor, en los mecanismos de procesamiento y presentación antigénica, en los mecanismos de acción antitumoral de los linfocitos T y su valoración *in vitro* y en algunas estrategias que los tumores han desarrollado para evadir al sistema inmune, y comentaremos sobre las expectativas presentes de los protocolos clínicos de inmunomodulación positiva antitumoral.

Inmunoterapia, cuarta arma terapéutica contra el cáncer

La demostración de que incluso tumores invasores avanzados pueden sufrir una regresión completa cuando se estimula adecuadamente la respuesta inmunológica⁽³⁻⁶⁾, abrió la puerta a la posibilidad de desarrollar tratamientos contra el cáncer basados en la modulación del sistema inmune. El objetivo de la inmunomodulación positiva es inducir al sistema inmune para que responda exitosamente ante la presencia de antígenos asociados o específicos tumorales (AAT), ya que frecuentemente no son reconocidos como extraños, o que esta estrategia rompa la respuesta de tolerancia inmune contra los AAT⁽⁷⁾.

En los últimos 20 años a través de un arduo trabajo experimental, se ha acumulado un gran acervo de conocimientos sobre las bases celulares y moleculares de la interacción entre los tumores y su hospedero, dando origen a la inmunología tumoral. La respuesta inmune celular de linfocitos T CD8+ contra los antígenos tumorales ha sido identificada en algunos modelos tumorales y mediante diferentes estrategias de inmunomodulación positiva se ha demostrado respuestas objetivas antitumorales en modelos experimentales. Estas estrategias han sido utilizadas en protocolos clínicos de inmunoterapia celular, demostrando asimismo respuestas objetivas parciales en pacientes con cáncer avanzado.

Aunque la mayoría de los protocolos de inmunoterapia se han aplicado en grupos de pacientes terminales, es muy probable que este grupo de pacientes no sea el idóneo para demostrar su eficiencia; pero, como cualquier terapia innovadora, la inmunoterapia debe mostrar primero su potencialidad en pacientes en los cuales la aplicación de las terapias vigentes ha fracasado.

En Europa, Asia y los Estados Unidos se han aplicado diferentes protocolos de inmunoterapia celular antitumoral en pacientes con cáncer avanzado recidivante a los tratamientos convencionales, y han provocado globalmente respuestas antitumorales completas en 5-10% y parciales en 10-20%⁽³⁻⁶⁾. En nuestro país la aplicación de la inmunoterapia antitumoral mediada por linfocitos T está por iniciarse.

Se pueden separar cronológicamente dos grandes etapas en la aplicación de protocolos clínicos de inmunoterapia celular antitumoral, la primera usando células tumorales atenuadas u oncolisados como antígenos tumorales, y la segunda con moléculas específicas o AAT, en sus modalidades de secuencias génicas u oligopéptidos^(6,9). A principio de los 90 Rosenberg del National Cancer Institute en colaboración con investigadores de 22 instituciones hospitalarias diferentes, evaluaron la administración de altas dosis de IL-2 recombinante en pacientes con melanoma y cáncer renal metastáticos y linfomas no Hodgkin, obteniendo respuestas objetivas de 5-22%, y remisión completa de la enfermedad en 7-9%; de este último grupo el 19% de pacientes tuvo control prolongado, presentando recurrencia hasta 7 años después^(3,10,11). La identificación molecular de los antígenos tumorales permitió iniciar una inmunoes-trategia más específica. Así en un protocolo para pacientes con melanoma avanzado sus linfocitos que infiltraban el tumor (LIT) fueron expandidos *in vitro* mediante su estimulación con el AAT y transferidos al paciente empleando como adyuvante IL-2, obteniendo respuesta clínica en 35%^(6,11). En un protocolo más reciente en pacientes HLA-A2 con melanoma metastático, se administró el péptido 209-217 ITDQVPFSV de la proteína gp 100 por vía subcutánea más dosis altas de IL-2, obteniendo respuesta objetiva clínica en 30-35% de los pacientes⁽¹²⁾.

Aunque los protocolos de inmunoterapia en pacientes con cáncer mediados por linfocitos T empleando a los AAT cursan en sus primeras etapas de desarrollo diferentes evidencias han demostrado respuestas objetivas. Es importante considerar que en general son aplicados a pacientes con tumores avanzados en quienes la respuesta inmune antitumoral está deprimida, y sin embargo los actuales resultados demuestran su potencialidad.

Respuesta inmune contra el cáncer

El tratamiento de tumores malignos por inmunoterapia tiene más de 100 años. La idea de activar la respuesta inmune contra los tumores no es reciente, en 1898 William Coley inyectaba a pacientes con cáncer inoperables una preparación de extractos bacterianos con *Streptococcus pyogenes* y *Serratia marcescens* conocida como toxina de Coley, con lo cual observó regresiones tumorales en algunos de sus pacientes^(10,11).

El empirismo acerca de los mecanismos que participan en la inmunología tumoral predominó en los dos primeros tercios del siglo XX. La comprensión de los fenómenos inmunitarios subyacentes fue posible a partir de los descubrimientos en las dos últimas décadas, relacionados al reconocimiento y funciones citotóxicas de los linfocitos T. Diferentes paradigmas han aparecido como base del conocimiento moderno de la respuesta inmune celular contra los tumores. Múltiples estudios *in vitro* y en modelos animales han demostrado que las reacciones inmunes contra los tumores son mediadas por la inmunidad celular adquirida, principalmente aquella en la que intervienen los linfocitos T tanto CD4+ como CD8+, mientras que la respuesta humoral no parece tener un efecto significativo en el ataque contra la mayoría de los cánceres humanos.

Las bases científicas modernas de la posible manipulación y direccionalidad de la respuesta humana antitumoral se basan principalmente en cuatro logros⁽¹⁴⁾: a) la identificación de los AAT; b) la identificación de los mecanismos subcelulares involucrados en el procesamiento y presentación antigénica, y de las células presentadoras profesionales de antígenos (CPPA); c) el conocimiento de los mecanismos de acción antitumorales de los linfocitos T y la valoración de su actividad *in vitro*, y d) el conocimiento de cómo los diferentes tumores evaden la respuesta inmune. Con esto, ahora la inmunología tumoral se ha ganado el respeto de la comunidad científica y ello abrió nuevas posibilidades para el tratamiento de pacientes con cánceres incurables.

Antígenos asociados al tumor o antígenos tumor específicos (AAT).

La identificación y clonación de genes de líneas celulares tumorales fue obtenida a partir de la construcción de librerías de cADN y no fue hasta 1991, cuando se identificaron los

primeros AAT en su configuración génica. Un año después empezaron a conocerse los péptidos inmunogénicos tumorales que fueron reconocidos por los LCT restringidos en el polimorfismo de moléculas clase I del antígeno de histocompatibilidad leucocitario humano (HLA). Debido a que alelo HLA-A2+ es el antígeno de histocompatibilidad más frecuentemente identificado en las poblaciones caucásicas, éste y otros cercanamente frecuentes fueron los más estudiados para identificar péptidos-AAT. Esto permitió demostrar que las células tumorales expresan péptidos antigénicos derivados de la degradación de proteínas tumorales que pueden ser reconocidos por los linfocitos T del huésped. Desde entonces cerca de 30 AAT de expresión génica y un poco más de 100 AAT epítopes humanos han sido identificados y caracterizados molecularmente^(10,15).

Las células cancerosas exhiben patrones cuasi-específicos de expresión génica debido al rearrreglo de protooncogenes, a la modificación de genes celulares o por la inserción de oncogenes virales, lo cual permite la transcripción de nuevas señales moleculares que finalmente son traducidas como nuevas proteínas. Estas proteínas son digeridas intracelularmente de manera "natural" por proteosomas, produciendo pequeños fragmentos peptídicos antigénicos o epítopes que son transportados al retículo endoplásmico, se combinan con las diferentes moléculas clase I y clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, conocido en humanos como HLA) y llevados a la membrana celular para ser presentados a los linfocitos T. Las proteínas tumorales al ser procesadas o degradadas intracelularmente por los proteosomas pueden presentar varios o múltiples epítopes reconocibles por los linfocitos T, los cuales pueden ser inmunogénicos en diversos grados. La mayoría de AAT han sido identificados como oligopéptidos de 8-10 aminoácidos ensamblados con moléculas de clase I del HLA y son presentados a los linfocitos T CD8+, mientras que otros menos abundantes son cadenas de 13-20 aminoácidos ensamblados con moléculas de clase II del HLA y son presentados a los linfocitos T CD4+. El complejo péptido-HLA es reconocido por el receptor específico del linfocito T (TCR) en su superficie celular y así puede iniciar su respuesta efectora⁽¹⁴⁾. Aunque la mayoría de los AATs son derivados de proteínas o glicoproteínas, otros muy escasos pueden derivarse de carbohidratos, glicolípidos, glicolípidos o mucinas.

La identificación molecular de los péptidos-AAT presentados naturalmente por los diversos tumores malignos requiere de técnicas experimentales complejas. La más conocida consiste en la elusión ácida de complejos HLA-2 + péptidos de la superficie de los linfocitos TCD8+, los cuales son inmunoprecipitados y separados de las moléculas del HLA y purificados mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) o espectrometría de masa. Para probar su reactividad *in vitro* con LCT específicos anti-

tumor, primero se identifica su secuencia peptídica, se sintetizan artificialmente, luego son pulsados a las CPPA, las cuales sirven de blanco para la respuesta de los LCT. Con esta metodología se pueden identificar epítopes-AAT dominantes (muy inmunogénicos) y subdominantes relacionados a la magnitud de respuesta de los LCT. Otra metodología igualmente compleja, que ayuda en la identificación de los péptidos tumorales unidos a moléculas clase II del MHC es el análisis serológico de librerías de expresión de cDNA de tumores humanos (SEREX). En la actualidad se han logrado identificar aproximadamente 100 péptidos inmunodominantes provenientes de tumores humanos, los cuales están en su mayoría conformados por oligopéptidos de 8-10 aminoácidos. Esta cifra es una cantidad relativamente escasa considerando las más de 11,000 alteraciones genómicas potenciales en los diferentes cánceres^(8,9,16).

Los péptidos-AAT pueden ser presentados por las células tumorales a los linfocitos T, sin embargo es condición necesaria para generar una adecuada respuesta que su presentación la realicen las CPPA. La célula dendrítica de origen hematopoyético (DC) es la más potente o eficiente de las CPPAs. La utilización de DCs cargadas con péptidos-AAT como adyuvante celular en protocolos experimentales o aplicativos de inmunomodulación positiva, genera las más frecuentes e intensas respuestas de los LCT específicos⁽¹⁷⁾.

La mayoría de los péptidos-AAT identificados corresponden a epítopes de proteínas a) que muestran mutaciones puntuales o que son sintetizadas a partir de transcripción atípica, como p21/ras, p53, bcl/abl, CDK4, beta-catenina, CASP-8, MUM-1, inmunoglobulinas y proteínas del receptor para linfocitos T; b) sobreexpresadas, las cuales están presentes en las células tumorales en mucho mayor nivel que en los tejidos normales como p53 (wild type), HER-2/neu, ACE, telomerasa; c) de desarrollo, que son usualmente expresados en células germinales de testículo pero que son re-expresados en algunos tumores como MAGE-1, -2, -3, BAGE, CAGE, PRAME, NY-ESO-1; d) de diferenciación, que están presentes tanto en las células normales de las cuales se originó el tumor como en las células tumorales, como MART/Melan, gp100 y tirosinasa PSA, MUC. Y de otras proteínas de tipo viral asociados a algunos tipos de cáncer, como E6 y E7 del Virus del Papiloma Humano y EBNA-1 del Virus de Epstein-Barr^(10,16).

Muchos de todos estos AATs fueron originalmente descritos en melanoma, MAGE fue el primer AAT identificado. Debido que en las células de melanoma se han identificado una gran cantidad de AATs y de ellos algunos (MART-1) son elevadamente inmunogénicos, el melanoma maligno ha sido el modelo inmunológico más estudiado. Esto ha favorecido la aplicación de un gran número de protocolos de inmunoterapia antitumoral específica en pacientes con melanoma avanzado^(12,17,18).

La utilización de los AAT en su presentación génica en protocolos de inmunoterapia antitumoral en humanos ha sido limitado por su eventual riesgo de inducir carcinogénesis, y se prefiere usarlos en su forma de péptidos-AAT. Pero la aplicación de estos últimos se limita sólo a pacientes de poblaciones caucásicas restringidas con alelos HLA A1+ y A2+. En condiciones muy seleccionadas se pueden utilizar las secuencias génicas-AAT, las cuales pueden ser insertadas en vectores de expresión para ser transferidas (transducidas o transfectadas) a las células presentadoras profesionales de antígenos, integrarse a la maquinaria de transcripción y traducción celular, para su posterior procesamiento y presentación natural de los diferentes complejos de péptidos-HLA -sin restricción de alelos de HLA.

Procesamiento y presentación antigénica de los antígenos asociados o específicos tumorales.

Se ha demostrado que para que la célula tumoral o su CPPA de AAT genere una respuesta inmune efectiva deben coincidir varias señales moleculares simultáneas: 1) presentar epítopes tumorales dominantes vía moléculas MHC I y II en la superficie celular en concentración suficiente para ser reconocidos por los receptores TCR de los linfocitos T específicos, 2) expresar moléculas coestimuladoras como B7.1 y B7.2 y de adhesión en su superficie celular como ICAMs que estabilizan la inmunosinapsis entre la célula presentadora y el linfocito T, 3) todo esto en un ambiente local de señalización de "peligro" correspondiente a la liberación paracrina de citocinas Th1-proinflamatorias IL2, IL7, e INF-g producidas principalmente por células adyuvantes o CPPAs⁽¹⁴⁾.

Debido a que las células tumorales no son buenas presentadoras de antígenos⁽¹⁹⁾, la identificación de que las CPPA ejecutan esta acción de manera eficiente fue un adelanto importante en el desarrollo de la terapia inmunológica. El grupo de las CPPA está conformado por monocitos/macrófagos, linfocitos B y células dendríticas. Las CPPA deben ser activadas para inducir respuesta inmune efectiva a través de los linfocitos T, participando estrechamente tanto en los procesos de la inmunidad innata como adquirida. Las DC son el componente celular de mayor capacidad para iniciar la respuesta inmune primaria y secundaria, y son las únicas con la capacidad para estimular a los linfocitos T vírgenes, y expresan comparativamente a otras CPPAs mucha mayor cantidad de moléculas MHC clase I y II como de moléculas coestimuladoras y de moléculas de adhesión, sin embargo la cantidad de DCs circulantes y en los tejidos es muy escasa^(20,21).

Las DCs funcionan como centinelas tisulares que muestran lo propio y lo extraño y participan en la inducción primaria y secundaria de la respuesta dependiente de linfocitos T. En el sitio tumoral, las DC pueden internalizar y procesar y presentar los AATs, existen fuertes evidencias que indican

que las DC maduras activas influyen directamente en la activación de linfocitos T CD4+ y CD8+ como efectores antitumorales. La vida media de las DC maduras es en promedio de 10-12 días, y durante sus primeras horas pueden viajar desde sitios periféricos por la circulación sanguínea y linfática para llegar hasta los ganglios linfáticos y activar a los linfocitos T^(22,23).

Actualmente el uso clínico de las DC como adyuvantes celulares para potenciar la respuesta inmune de los linfocitos T contra los antígenos tumorales ha sido posible en humanos, gracias a nuevos métodos y tecnologías *ex vivo* que permiten la generación y obtención *in vitro* de un gran número de DCs autólogas derivadas de monocitos o células hematopoyéticas-CD34⁽¹⁷⁾.

Acción antitumoral de los linfocitos T y su valoración *in vitro*.

El conocimiento de los mecanismos de activación de los linfocitos T ha sido crucial para el desarrollo de la inmunología tumoral. Un avance significativo fue la identificación molecular del complejo péptido-AAT-HLA/ TCR del linfocito T y de que el ambiente de citocinas (respuesta Th1 o Th2) en el cual un antígeno es presentado a los linfocitos vírgenes determina el tipo de respuesta contra dicho antígeno. Así cuando el antígeno es presentado por las CPPA con una elevada expresión de moléculas del HLA y de moléculas co-estimuladoras, éstos responden de manera efectiva contra la célula presentadora del antígeno generándose respuesta citotóxica antitumoral por los linfocitos T CD8+. Las DC activadas y los linfocitos T CD4+ intercambian señales moleculares y ambos liberan paracrinamente citocinas de respuesta Th1 que favorecen la activación y expansión de los LCT para realizar con mayor eficiencia su respuesta de lisis contra la célula tumoral⁽¹⁴⁾.

Los linfocitos T CD8+, junto con los CD4+, los NK y los macrófagos son las principales células efectoras en la respuesta inmune antitumoral. Los linfocitos T CD8+ responden contra antígenos tumorales presentados como oligopéptidos de 8-10 aminoácidos en la hendidura de las moléculas del HLA. Cuando los linfocitos T CD8+ específicos de memoria reconocen las células con los péptidos-AAT se establece la inmunosinapsis y liberan directamente perforinas, granzimas y Fas para provocar lisis y apoptosis a la célula tumoral.

La terapia ideal antitumoral induciría destrucción tumoral sin lesionar las células normales. La fase efectora de los linfocitos T CD8+ antitumoral es muy difícil evaluarla *in vivo*, sin embargo desde hace más de dos décadas es posible evaluar su acción citotóxica mediante sistemas *in vitro*.

El repertorio inmune de linfocitos T en sujetos sanos y pacientes con cáncer que reconocen los epítopes-AAT representa una innumerable cantidad de linfocitos T. Sin embargo los linfocitos T que son activados exitosamente contra

péptidos-AAT presentados por CPPAs, pueden fallar al reconocer los mismos péptidos en células neoplásicas. Diferentes factores pueden explicar la falta del reconocimiento por las células T, siendo probablemente la más importante, la baja cantidad de complejos péptido-HLA inmunodominantes presentados en la superficie de la célula tumoral.

La valoración de la respuesta antitumoral de los linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos en el laboratorio ha permitido construir modelos reduccionistas *in vitro* para ello. En general los linfocitos T a valorar deben ser expandidos *in vitro* con ciclos de 7-8 días de estimulación empleando CPPAs de antígenos tumorales, al cabo de los cuales se valora su función efectora contra células blanco (p.ej. células tumorales). En los ensayos clásicos de citotoxicidad para valorar la respuesta específica antitumoral de linfocitos T CD8+, las células blanco son marcadas con isótopos como ⁵¹Cr que se une a las proteínas del citosol, luego se mezclan con los linfocitos T estimulados, y la respuesta se determina midiendo la liberación del ⁵¹Cr en el sobrenadante de la mezcla celular a partir de la lisis de las células blanco; estos ensayos han sido los pioneros y aún se mantienen vigentes por su gran sensibilidad para valorar la función de los LCTs específicos. Entre otras metodologías que han se han desarrollado más recientemente destacan, los ensayos de cuantificación de la liberación de citocinas específicas o ELISPOT, en las cuales se determina la liberación de INF-g e IL-2 como indicador de respuesta de LCT, y ensayos de identificación (y eventual separación) de clonas específicas citotóxicas de linfocitos CD8+ mediante su unión a moléculas tetraméricas recombinantes constituidas por el péptido-AAT unido a molécula HLA alelo-específica (afinidad antigénica previamente comprobada) en complejos de 4 monómeros. Últimamente la respuesta de LCT específicos también puede establecerse mediante la determinación de citocinas intracelulares o su RNAm transcrito por medio de PCR de tiempo real de linfocitos previamente separados por inmunofenotipaje⁽⁴⁶⁾.

Tanto los sujetos sanos como los pacientes con cáncer difieren no sólo en el número absoluto de linfocitos T circulantes dirigidos contra un AAT específico, sino también en su actividad funcional como célula efectora. La identificación de clonas específicas de linfocitos CD8+ específicas mediante su unión a moléculas tetraméricas recombinantes ha permitido identificar varios estados con relación a su función a través de utilizar otras marcas, p.ej. los linfocitos “naives” o inocentes corresponden CD45RA+ y las poblaciones de linfocitos T de memoria a CD45RO+, más aún los linfocitos T específicos naives y no-respondedores correspondieron a CD45RA+/CCR7+, y los linfocitos T específicos de memoria y respondedores a CD45RO+/CCR7-⁽⁴⁷⁾, donde el CCR7 marca al receptor de quimiocina 7.

Los linfocitos T por sí mismos pueden presentar alteraciones subcelulares que se asocian a deficiente respuesta por

los LCT, estas condiciones sin embargo, son todavía difíciles de determinar. Muy ocasionalmente se han descrito diferentes alteraciones en la expresión de los componentes del TCR como el CD3 zeta, y de las tirosin-cinasas P56^{lck} y Zap 70 que son parte de la maquinaria de señalización de traducción del linfocito T; estas tres condiciones se asocian a la producción de IL-2 y por ende la inadecuada respuesta inmune antitumoral⁽⁸⁾.

Cómo evaden los tumores la respuesta inmune celular.

El tumor escapa del control inmunológico debido a un mecanismo activo de producción local de moléculas inhibitoras de la respuesta inmune celular y un proceso pasivo relacionado a la pérdida de presentación del complejo péptido-AAT-HLA, lo cual conlleva a anergia o ignorancia del sistema inmune hacia las células tumorales⁽¹⁹⁾.

En general, la mayoría de los tumores malignos son pobremente inmunogénicos, y resulta claro que, frecuentemente el sistema inmune no elimina a los tumores, de tal forma éstos pueden desarrollarse provocando alta morbilidad y hasta la muerte de quien los padece. El proceso de malignización celular es largo y complejo, durante las primeras etapas del desarrollo de un tumor la mayoría de las células aunque expresan antígenos extraños, no son detectados como algo peligroso⁽²⁴⁾. Se ha calculado que para que una célula se transforme en maligna deben incidir en ella un mínimo de 6 mutaciones, mismas que le deben conferir ventajas proliferativas. De tal forma el desarrollo tumoral se asocia a la acumulación de mutaciones (inestabilidad genética) en células que se multiplican por expansión clonal, es entonces un proceso gradual de microevolución, donde aquellos clones que obtengan mayores ventajas de crecimiento, replicación y capacidad de sobrevivencia predominarán en el tumor⁽²⁵⁾, provocando gran cantidad de variantes de las células tumorales que escapan al reconocimiento de las células inmunes. Se ha calculado que por cada duplicación de la célula tumoral se agregan entre 6 a 60 mutaciones⁽⁹⁾.

Múltiples mecanismos coinciden en el paciente con cáncer para que se presente inmunosupresión local y sistémica^(19,25), entre ellos destacan, el tipo de cáncer, grado de progresión tumoral y efecto del tratamiento antitumoral. Las células tumorales son capaces de evadir el ataque del sistema inmune desarrollando diferentes estrategias para enfrentar los diferentes mecanismos de la inmunidad, p.ej. cambiando sus blancos antigénicos, no expresando constitutivamente moléculas coestimuladoras en la superficie celular y no secretando citocinas inmunoestimuladoras de la respuesta Th1. Un paso esencial para la generación de una respuesta inmunológica efectiva es la adecuada presentación de los antígenos que distinguen como “extraña” a una célula. Como se ha mencionado dicha presentación debe darse en el contexto de las moléculas del MHC. Alteraciones en la expresión de dichas moléculas, que van desde la

pérdida parcial a total, han sido reportadas en varios tipos tumorales^(26,27). La alteración más comúnmente encontrada en tumores humanos es la pérdida parcial de la expresión de moléculas del MHC, la que ha sido reportada en tumores cervicouterinos⁽²⁸⁾, de mama⁽²⁹⁾, de cabeza y cuello⁽³⁰⁾, sarcomas de Kaposi asociados con virus del herpes⁽³¹⁾ y en carcinomas de pulmón. Adicionalmente se ha observado que la presentación de antígenos en algunos tumores se ve reducida por un deficiente transporte de los mismos hacia la membrana celular. Dicho transporte está a cargo de moléculas transportadoras conocidas como TAP, un decremento en su expresión fue primeramente descubierto en tumores cervicales⁽³²⁾, y más recientemente se ha detectado su pérdida en otros tipos⁽³³⁾.

Durante su microevolución algunos tumores tienden a expresar genes que en condiciones normales deberían encontrarse inactivos. Los productos de dichos genes suelen ser de ayuda para la evasión inmunológica. Así se ha observado la expresión de moléculas como el antígeno HLA-G, que de manera natural están restringidas a tejidos como el trofoblasto y que sirven para establecer una tolerancia inmunológica hacia el feto, el cual se ha encontrado en melanoma y se ha demostrado que inhibe el ataque por células NK. De igual forma se ha observado que algunos linfomas cutáneos presentan una sobre-expresión de las moléculas HLA-G⁽³⁴⁾. La expresión de citocinas como TGF-beta, VEGF e IL-10 que regulan negativamente la respuesta inmunológica han sido detectada en algunos tumores. El TGF-beta, es un potente factor inmunosupresivo, que afecta la activación, proliferación y diferenciación de diversas células inmunocompetentes⁽³⁵⁾. Diversos estudios han demostrado la expresión y secreción de TGF-beta por células de tumores de vejiga, carcinoma gástrico^(36,37), carcinoma hepatocelular y de mama, lo cual incide en su capacidad de inhibir el ataque inmunológico. La interleucina 10 (IL-10), juega un papel muy importante en la inhibición de la inmunidad mediada por células, la secreción de IL-10 ha sido observada en varios tumores incluyendo el carcinoma renal, de colon, melanoma y el neuroblastoma y se ha demostrado que la secreción de IL-10 confiere una total resistencia de los tumores a la lisis por linfocitos T citotóxicos⁽³⁸⁾.

La evasión inmunológica en el cáncer no se ha limitado a la inhibición de ciertos mecanismos inmunes, sino que algunos tumores han desarrollado estrategias de contraataque por medio de las cuales eliminan a las células de defensa. Esto se logra a través de la expresión en la membrana de las células tumorales de la molécula conocida como el ligando de Fas (Fas-L). Fas-L es una proteína transmembranal que induce apoptosis mediante la unión y activación del receptor Fas. El sistema Fas-L/Fas es esencial para mantener la homeostasis inmunológica⁽³⁹⁾, pues es a través de éste que se regula el número de linfocitos circulantes después de un ataque inmunológico, y participa también en la reacción de

citotoxicidad mediada por linfocitos T. Fas-L es naturalmente expresado en las células del testículo, el ojo el cerebro y la placenta, donde contribuye a la eliminación de linfocitos infiltrantes y así mantener el estado de privilegio inmunológico de estos tejidos. Sin embargo, se ha encontrado que Fas-L también es expresado por células de melanoma⁽⁴⁰⁾, astrocitoma⁽⁴¹⁾, linfomas⁽⁴²⁾, sarcoma de Ewing, carcinoma de colon, cáncer de hígado⁽⁴³⁾ y carcinoma de pulmón⁽⁴⁴⁾, y en estas condiciones el tumor es capaz de contraatacar y eliminar a los linfocitos T que lograron ser activados y llegar al tejido tumoral para ejercer acción citotóxica.

Es importante hacer notar que en la evasión de los tumores a la respuesta inmune, algunos de ellos son capaces de ejecutar varias de las estrategias simultáneamente^(34,45). Es muy probable que esta capacidad incrementada de evadir al sistema inmune represente una ventaja de supervivencia del tumor y tenga, por lo tanto, relación con la agresividad de diversos cánceres en particular.

Las expectativas presentes

Diversas metodologías experimentales utilizadas para entender los mecanismos celulares, subcelulares y moleculares de la respuesta inmune celular antitumoral han podido ser aplicadas para inmunodiagnóstico y en protocolos de inmunoterapia celular en pacientes con cáncer⁽⁴⁾.

Un paso esencial para el éxito de inmunoterapia celular en cáncer es que los LCT identifiquen las células con AAT como extrañas y realicen su acción citolítica. Los antígenos tumorales, tanto en su presentación génica, como de proteína recombinante, o como péptidos sintéticos, pueden ser pulsados, transfectados o transducidos a CPPAs *in vivo* o *ex vivo*. Diferentes péptidos sintéticos han sido utilizados en protocolos de inmunomodulación positiva antitumoral adicionándoles simultáneamente una gran variedad de adyuvantes moleculares y/o citocinas⁽¹¹⁾ para estimular la respuesta inmune de tipo Th1.

Los factores que limitan el impacto terapéutico de los linfocitos T contra el tumor pueden dividirse en factores intrínsecos de linfocitos, y en los propios de la célula tumoral. Evidencias experimentales sugieren que la sobrevida y efectividad de los LCT dependen de factores de ayuda de los linfocitos T CD4+, por lo que el éxito de la reacción inmune depende esencialmente de la interacción antitumoral de linfocitos T CD4+ y de CD8+ específicos⁽⁴⁸⁾.

Se conocen actualmente algunos mecanismos que pueden limitar la efectividad de la respuesta inmune antitumoral en cada tipo de cáncer, los cuales hemos comentado, sin embargo probablemente una mayor cantidad de mecanismos esté aún por identificarse.

Estamos aprendiendo últimamente, que la respuesta inmune innata antitumoral es la primera en fallar al no recono-

cer al tumor como una condición de “peligro”. Si la presencia del tumor no genera señales de “peligro”, las CPPAs no son suficientemente activadas y no expresarían suficientemente moléculas co-estimulatorias para activar a los linfocitos T específicos anti-AAT.

Recientemente se ha encontrado que en la respuesta inmune antitumoral además de participar las CPPAs, los linfocitos T CD4+ y CD8+, y los NK, intervienen otras células como poblaciones de linfocitos T que expresan algunas marcas de los NK (NKT) y los linfocitos T CD25+CD4+. Estas dos últimas células funcionan como supresoras naturales regulando negativamente la respuesta inmune antitumoral y participan en la tolerancia al tumor⁽¹³⁾. Dichas células se han identificado en tumores avanzados e incluso en el infiltrado tumoral, y su activación requiere de la cooperación de citocinas como el IFN-g, TNF-a y TGF-b. Cuando las células NKT son estimuladas vía interacción con su TCR con la molécula CD 1d (parecidas a las moléculas clase I del MHC), producen una gran cantidad de citocinas-Th2 p.ej. IL-13, IL-4, IL-10 muchas de las cuales son anti-inflamatorias y tienen el potencial de inhibir la destrucción tumoral mediada por linfocitos T CD4+ y CD8+ y pueden debilitar las CPPAs^(13,49). La identificación de nuevas poblaciones de linfocitos T que regulan la tolerancia tumoral van aclarando la interacción de las células transformadas con el sistema inmune.

Con estos últimos conceptos, se ha considerado que para mejorar la respuesta inmune antitumoral en una enfermedad establecida, podrían adicionarse señales de “peligro” como estrategia de protocolos clínicos. Al respecto, se han identificado algunas moléculas endógenas que funcionan como señales locales de “peligro”, entre ellas la liberación de nucleótidos intracelulares, de cadenas de DNA de doble cadena o de proteínas de choque térmico de células moribundas; éstas podrían utilizarse simultáneamente a la administración de diferentes citocinas como el GM-CSF, IL-2, IL-15 y los interferones de tipo I, u otras citocinas pro-inflamatorias que estimularan la inmunidad innata. Asimismo en otra estrategia con el mismo fin, podría depletarse transitoriamente las células NKT y los linfocitos T CD25+CD4+, o inhibir sus moléculas efectoras, p.ej. con la aplicación de IL-13.

Estrategias clínicas para mejorar la respuesta inmune antitumoral (ver Moingeon 2001).

Dos grandes líneas de estrategias se han propuesto para mejorar la respuesta clínica del paciente tratado con inmunoterapia antitumoral. La primera, relacionada con la aplicación de diferentes sistemas o plataformas de presentación de los AATs a los linfocitos T específicos, utilizando péptidos, construcciones génicas y proteínas recombinantes de AATs en diferentes combinaciones y secuencias para cebar, aumentar o reforzar la respuesta celular antitumoral; esto,

en adyuvancia con adicionar señales que faciliten la activación y maduración de DC, como p.ej. CD40, LPS detoxificado, poli I:C. GM-CSF e IL-2.

La segunda línea es aumentar la dominancia o inmunogenicidad de los AATs. En esta estrategia puede haber diferentes variantes: a) utilizar la aplicación de AATs específicos múltiples simultáneos, como MAGE1 y MAGE3 en caso de melanoma; b) construir antígenos más potentes que los naturales, p.ej. mediante mutaciones puntuales en el segundo y penúltimo aminoácido del oligopéptido basados en el uso de softwares de predicción antigénica de péptidos; c) agregar a las construcciones génicas-AATs, secuencias génicas de señalamiento que faciliten el procesamiento natural y presentación de éstos para aumentar su cantidad en la superficie celular; d) realizar la identificación dinámica de la expresión de los AATs en la evolución clínica del tumor y utilizarlos como blancos antitumorales⁽⁵⁰⁾ y e) incorporar otros tipos de tratamientos sincronizados a la transferencia de linfocitos T antitumorales autólogos activados *ex vivo*, como el uso de quimioterapia para depletar sus linfocitos circulantes antes de la transferencia⁽¹⁸⁾.

Otra serie de estrategias propuestas son: aplicar inmunoterapia multimodal antitumoral, usar vacunas con múltiples epítopes, usar citocinas como adyuvantes (GM-CSF, IL-2, IL-12), usar INF-g para aumentar la expresión de péptidos-HLA en las células blanco, y usar péptidos-MHC clase II adicionales, para aumentar la potencia y duración de la respuesta inmune celular⁽⁵¹⁾, y emplear inmunoterapia en pacientes en etapas clínicas tempranas o con mínima enfermedad residual^(5,13).

En relación con el uso de DCs como adyuvante celular, actualmente se aplica en gran número protocolos de inmunoterapia anti-tumoral. La estrategia más frecuente es pulsar a las DC con péptidos-AAT, Thurner y col. demostraron que la vacunación con DC pulsadas con el péptido Mage-3A1 en pacientes con melanoma avanzado provoca regresión temporal de las metástasis, estos resultados y otros similares^(17,23), son estimulantes. Aunque el uso de las DCs como adyuvante en este tipo de protocolos se encuentran en sus primeras etapas, gran cantidad de parámetros necesitan ser establecidos, p.ej.: emplear poblaciones específicas de DC, escoger el estado óptimo de maduración celular y de estímulo específico, y seleccionar dosis de aplicación, frecuencia, periodicidad, ruta de aplicación, la fuente de obtención, la preparación y estrategia para cargarlas con el antígeno, así como identificar otras las “marcas” inmunológicas que nos permitan predecir su eficacia clínica⁽¹⁷⁾.

Siendo que en los pacientes con cáncer el número de DCs competentes está significativamente disminuido en sangre periférica y que predominan las poblaciones de DCs inmaduras no activadas⁽²¹⁾; diferentes estrategias pretenden incrementarlas y tornarlas competentes. Otro muy reciente

aspecto del estudio de las DC es entender su flexibilidad y cooperación para polarizar a los linfocitos T CD4+ hacia su respuesta Th1 o Th2. Se sabe que distintas poblaciones de DC inducen distintas poblaciones de linfocitos T, también se ha encontrado que la activación de la DC maduras tiene estrecha relación con su cinética de activación (producción INF-g) la cual es óptima por 8 h (DC-activada) y a las 48 h se debilita (DC-exhausta), siendo también que esta condición está directamente relacionada con la dosis antigénica (ng/ml). Por ello ahora se considera que la activación de los linfocitos T está directamente relacionada con el tipo, cinética de activación y densidad de las DC, tanto por la concentración *in situ* del péptido antigénico^(22,23). Otra nueva etapa que se vislumbra, es la manipulación *in vivo* de DC medianamente el uso de DC-poyetinas.

Por otra parte, la identificación de la secuencia del genoma humano, el desarrollo de las tecnologías en genómica y proteómica más la inmunológica analítica han hecho factible escudriñar cualquier proteína con la intención de identificar péptidos tumorales inmunogénicos⁽⁵²⁻⁵⁴⁾. La tecnología de “microarrays” de ADN o chips de genes, herramienta nueva muy poderosa que permite identificar el ADN o del ARNm de muchos cientos o miles de genes simultáneamente en las células tumorales. Esto permitiría obtener una imagen más completa de su perfil y expresión genómica a la conocida, la cual pudiera ser la base para nuevas clasificaciones del cáncer y predicciones más precisas en la respuesta al tratamiento, tanto como para identificar blancos terapéuticos potenciales, incluso blancos inmunológicos^(55,56). Otros “microarrays” de proteínas pueden determinar en las células tumorales su diversidad en su expresión^(54,57).

Una muy reciente posibilidad es identificar oligopéptidos antigénicos en las células tumorales a la partir de la estrategia denominada “inmunología reversa”, la cual está basada la integración de metodologías para predecir epítopes tumorales a partir de la estructura primaria de las proteínas sobreexpresadas y su afinidad de unión a moléculas HLA y en su exploración de su inmunogenicidad basado en la medición de la respuesta de LCT específicos contra CPPA cargadas con el péptido en estudio. Los genes sobreexpresados en células cancerosas podrían ser identificados por expresión diferencial con células normales p.ej. con “microarrays de ADN”; los exones correspondientes que expresen proteínas relacionados con carcinogénesis u oncogénesis serán explorados con el método de deducción de epítopes que incluye: 1) el usar algoritmos de diferentes softwares o paquetes bioinformáticos relacionados con el corte de la proteína en múltiples oligopéptidos y su afinidad de cada uno en su unión con las diferentes moléculas del HLA, y relacionados al procesamiento de la proteína en el inmunoproteosoma y su degradación en oligopéptidos; 2) determinar experimentalmente la estabilidad del complejo péptido-HLA predicho e identifi-

car y comprobar la presencia de los complejos de dichos complejos péptidos-HLA en la célula tumoral, mediante su elusión por diferentes técnicas p.ej. análisis por CLAR/espectrometría de masas. El siguiente paso es demostrar la generación de respuesta de CTLs, mediante la valoración cuantitativa y cualitativa *in vitro* de respuesta de linfocitos T específicos tanto en donadores sanos como en pacientes con cáncer (ver Acción antitumoral de los linfocitos T y su valoración *in vitro*). Para después realizar los ensayos *in vivo* de protección antitumoral en ratón y finalmente iniciar los ensayos clínicos-fase I. Con esta estrategia podrán identificarse los antígenos tumorales de "segunda generación" con mucha mayor diversidad y en mucho menor tiempo. Esto podría redituarse gran beneficio en el diseño de vacunas profilácticas y terapéuticas contra los diversos tumores^(52,54).

La inmunoterapia celular mediada por linfocitos T se suma actualmente al arsenal terapéutico contra los diferentes cánceres.

La identificación de los AAT, de los mecanismos subcelulares involucrados en el procesamiento y presentación de antígenos, de las CPPAs, de las fases reconocimiento y activación de los linfocitos T y de las estrategias que emplean los tumores para evadir la respuesta inmune son las principales bases científicas para entender la inmunología tumoral. Múltiples estudios experimentales han demostrado que clonas específicas de los linfocitos T CD4+ y CD8+ reconocen oligopéptidos inmunogénicos tumorales y realizan la principal respuesta efectora contra los tumores. La inmunomodulación positiva en las fases de reconocimiento y efectora de los linfocitos T ha provocado respuestas antitumorales objetivas en los modelos experimentales.

El paradigma de este cuerpo de conocimientos, se ha extrapolado a los diferentes protocolos de inmunoterapia mediada por linfocitos T en pacientes con cáncer avanzado y los resultados demuestran respuestas objetivas parciales.

La identificación de nuevos antígenos asociados tumorales, y de otros mecanismos adicionales que la célula tumoral emplea para evadir la respuesta inmune, permitirán enriquecer las estrategias de inmunomodulación positiva antitumoral. Por la gran diversidad de blancos antigénicos tumorales y las particulares estrategias de evasión inmune de los diferentes tumores, los futuros protocolos de inmunoterapia probablemente serán diseñados cuasi-personales para cada paciente.

En los próximos años nos sorprenderemos de los efectos terapéuticos de la inmunomodulación positiva en pacientes con cáncer.

Referencias

- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396:643-649.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2001; 100: 57-70.
- Yang JC. Tumor immunology. In: Rich RR, editor. *Clinical Immunology*. 2th ed. London: Mosby; 2001.pp.100.1-100.15.
- Chattopadhyay U. Tumor immunotherapy: developments and strategies. *Immunol Today* 1999;20:480-482.
- Ockert D, Schmitz M, Hampl M, Rieber EP. Advances in cancer immunotherapy. *Immunol Today* 1999;20:63-65.
- Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology, immunotherapy. *Nature* 2001;411:380-384.
- Todryk S. Roads that lead to tumor immunotherapy? *Mod Asp Immunobiol* 2000; 1(3):114-118.
- Moingeon P. Cancer vaccines. *Vaccine* 2001;19:1305-1326.
- Goldman B. Cancer vaccines: finding the best way to train the immune system. *JNCI* 2002;94(20):1523-1526.
- Rosenberg SA. Principles of cancer management: Biologic therapy. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer. Principles and practice of oncology*. 6th ed. Philadelphia, PA, USA: Lippincott, Williams/Williams; 2001:307-333.
- Rosenberg SA. Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *J Intern Med* 2001;250:462-475.
- Rosenberg SA, Yang JC, Topalian SL, et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 1998;4(3):321-327.
- Smyth M, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001;2(4):293-299.
- Schreiber H. Tumor immunology. In: Paul WE, editor. *Fundam Immunol*, 4th ed. Philadelphia PA, USA: Lippincott-Raven;1999. pp.1237-1270.
- Hirschmann-Jax C, Takahashi S, Brenner KM. Cancer vaccines. *Hematol Oncol Clin N Amer* 2001;15-4:741-773.
- Parmiani G, Castelli C, Anichini A, et al. Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *JNCI* 2002;94(11):805-818.
- Banchereau J, Schuler TB, Palucka AK, Schuler G. Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell* 2001;106:271-274.
- Dudley ME, Wunderlich JR, Rosenberg SA, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002;298:850-854.
- Seiter S, Marincola M. The multiple ways to tumor tolerance. *Mod Asp Immunobiol* 2000;1(3):121-124.
- Corbi AL, Relloso M, Puig KA. Células dendríticas: biología, funciones efectoras y utilidad terapéutica anti-tumoral. *Hematol Cito-cin Immunoter Ter Cel* 2001;4(1):45-71.
- Almand B, Resser JR, Lindman B, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:1755-1766.
- Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized cells. *Nat Immunol* 2000;1(4):311-316.
- Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 2001;106:263-266.
- Fuchs EJ, Matzinger P. Is cancer dangerous to the immune system? *Semin Immunol* 1996;8:271-280.
- Pettit SJ, Seymour K, Kirby JA, et al. Immune selection in neoplasia: towards a microevolutionary model of cancer development. *Br J Cancer* 2000;82:1900-1906.
- Marincola FM, Jaffe EM, Ferrone S, et al. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000;74:181-273.
- Garrido F, Cabrera T, Stern PL, et al. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today* 1993;14:491-499.
- Keating PJ, Cromme FV, Stern PL, et al. Frequency of downregulation of individual HLA-A and HLA-B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. *Br J Cancer* 1995;72:405-411.

29. Solana R, Romero J, Alonso C, et al. MHC class I antigen expression is inversely related with tumor malignancy and ras oncogene product (p21ras) levels in human breast tumors. *Invasion Metastasis* 1992;12:210-217.
30. Vora AR, Rodgers S, Murray AK, et al. An immunohistochemical study of altered immunomodulatory molecule expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1997;76:836-844.
31. Ishido S, Wang C, Jung JU, et al. Downregulation of major histocompatibility complex class I molecules by Kaposi's sarcoma-associated herpes virus K3 and K5 proteins. *J Virol* 2000;74:5300-5309.
32. Cromme FV, Van Bommel PFJ, Meijer C, et al. Differences in MHC and TAP-1 expression in cervical cancer lymph node metastasis as compared with the primary tumours. *Br J Cancer* 1994;69:1176-1181.
33. Johnsen AK, Templeton DJ, Harding CV, et al. Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis. *J Immunol* 1999;163:4224-4231.
34. Urošević M, Wilers J, Dummer R, et al. HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. *Blood* 2002;99: 609-617.
35. Chouaib S, Asselin-Paturel C, Blay JY, et al. The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today* 1997;18:493-497.
36. Eder IE, Stenzl A, Klocker H, et al. Expression of transforming growth factors beta 1, beta 2 and beta 3 in human bladder carcinomas. *Br J Cancer* 1997;75:1753-1760.
37. Morisaki T, Katano M, Torisu M, et al. Immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta) genes expression in human gastric carcinoma tissues. *J Surg Oncol* 1996;63:234-239.
38. Matsuda M, Salazar F, Kiessling R, et al. Interleukin-10 pretreatment protects target cells from tumor-specific and allo-specific cytotoxic T cells and down regulates HLA class I expression. *J Exp Med* 1994;180:2371-2376.
39. Ju ST, Panka DJ, Marshak-Rothstein A, et al. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995;373:444-448.
40. Hahne M, Rimoldi D, Tschopp J, et al. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996;274:1363-1366.
41. Saas P, Walker PR, Dietrich PY, et al. Fas ligand expression by astrocytoma *in vivo*: maintaining immune privilege in the brain? *J Clin Invest* 1997;99:1173-1178.
42. Mullauer L, Mosberger I, Chott A. Fas ligand expression in nodal non-Hodgkin's lymphoma. *Mod Pathol* 1998;11:369-375.
43. Strand S, Hofmann WJ, Galle PR, et al. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells—a mechanism of immune evasion?. *Nat Med* 1996;2:1361-1366.
44. Niehans GA, Brunner T, Kratzke RA, et al. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res* 1997;57:1007-1012.
45. Real LM, Jiménez P, Ruíz-Cabello F, et al. Multiple mechanisms of immune evasion can coexist in melanoma tumor cell lines derived from the same patient. *Cancer Immunol Immunother* 2001;49:621-628.
46. Whiteside TL. Monitoring of antigen-specific cytolytic T lymphocytes in cancer patients receiving immunotherapy. *Clin Diag Lab Immunol* 2000;7:327-332.
47. Dunbar PR, Smith CL, Cerundolo V, et al. A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response. *J Immunol* 2000;165:6644-6652.
48. Baxevasis CN, Voutsas IF, Papamichail M, et al. Tumor-specific CD4+ T lymphocytes from cancer patients are required for optimal induction of cytotoxic T cells against the autologous tumor. *J Immunol* 2000;164:3902-3912.
49. Smyth MJ, Godfrey DI. NKT cell as tumor immunity—a double-edged sword. *Nat Immunol* 2000;1,6:459-460.
50. Wang E, Miller LD, Marincola FM, et al. Prospective molecular profiling of melanoma metastases suggests classifiers of immune responsiveness. *Cancer Res* 2002;62:3581-3586.
51. Zeng G, Li Y, Robbins PF, et al. Generation of NY-ESO-I-specific CD4+ and CD8+ T cells by a single peptide with dual MHC class I and class II specificities: a new strategy for vaccine design. *Cancer Res* 2002;62:3630-3635.
52. Schultze JL, Vonderheide RH. From cancer genomics to cancer immunotherapy: toward second-generation tumor antigens. *Trends Immunol* 2001;22,9:516-523.
53. Monzavi KB, Keiber ET. Current concepts in cancer vaccine strategies. *Biotechniques* 2001;30:170-189.
54. Weinschenk T, Gouttefangeas C, Rammensee HG, et al. Integrated functional genomics approach for the designs of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res* 2002;62:5818-5827.
55. van't Veer LJ, De Jong D. The microarray way to tailored cancer treatment. *Nat Med* 2002;8(1):13-14.
56. van't Veer LJ, Dai H, Friend SH, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530-536
57. Foucar K. Application of tissue microarrays to hematolymphoid specimens: the minimalist perspective. *Hum Pathol* 2002;33:951-952.

