

Influencia de la edad en los niveles de anticuerpos anti-NeuGcGM3 citotóxicos sobre células tumorales y en la población de linfocitos B-1 que los secretan

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Centro de Inmunología Molecular (CIM)

AUTORAS PRINCIPALES: Ana María Hernández Vázquez y Nely Rodríguez Zhurbenko.

COLABORADORES: Maura Rábade Chediak, Rancés Blanco Santana, Teresa Rondón Corrales, Tania Griñán, Ramirez, Darel Martínez Bedoya.

AUTORA PARA LA CORRESPONDENCIA:

Ana María Hernández Vázquez

Dirección Postal: Centro de Inmunología Molecular, Calle 216, esq 15, Atabey, Playa, Habana 11 600, Cuba.

Dirección de correo electrónico: anita@cim.sld.cu

Tel: 7 214 3162 Fax: (53-7) 272 0644

RESUMEN:

La expectativa de vida en el mundo se está incrementando rápidamente. En Cuba, más del 19% de la población tenía más de 60 años en el año 2014. Las enfermedades infecciosas, el Alzheimer, la aterosclerosis y el cáncer están asociadas al envejecimiento y comprometen la calidad de vida de este grupo etario. En particular, el cáncer constituye una de las principales causas de muerte a nivel mundial y aún no se comprenden con claridad los fallos en los mecanismos inmunes que provocan su mayor incidencia en la vejez. Numerosas evidencias sugieren la existencia de anticuerpos naturales contra antígenos tumor asociados en individuos sanos y pacientes con cáncer. Un antígeno muy atractivo para la terapia del cáncer es el gangliósido NeuGcGM3, ya que no se expresa naturalmente en los tejidos humanos normales pero sí se sobre-expresa en tumores de colon, mama, pulmón y melanoma. El presente trabajo se propuso estudiar la existencia de anticuerpos naturales contra este antígeno tumoral, identificar las células que los secretan y los cambios que sufren con el aumento de la edad. Los resultados obtenidos evidencian, en un alto porcentaje de individuos sanos, la existencia de anticuerpos anti- NeuGcGM3, capaces de reconocer y eliminar células tumorales. Los niveles séricos de estos anticuerpos decrecen significativamente con el avance de la edad y no se detectan en pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas. Un resultado importante fue la identificación de las células B-1 como responsables de la secreción de dichos anticuerpos. Se conocía la participación de estas células en la defensa contra infecciones y en el mantenimiento de la homeostasia, sin embargo, los resultados del presente trabajo las vinculan, por primera vez, con la vigilancia contra los tumores. También se demostró que con el avance de la edad disminuyen los niveles de células B-1, así como su capacidad de secretar anticuerpos

naturales y la variabilidad de su repertorio. Estos resultados ponen de manifiesto el efecto de la inmunosenescencia en una rama efectora del sistema inmune no descrita anteriormente, cuyo mal funcionamiento puede contribuir a la mayor incidencia del cáncer, pero también de enfermedades infecciosas y autoinmunes en individuos envejecidos, y pueden traducirse en el diseño de tratamientos más eficaces para este segmento de la población. Esta es una tarea fundamental en una sociedad como la cubana, que cuenta en la actualidad con una expectativa de vida de las más altas del mundo. Además contribuyen a profundizar en los mecanismos de acción de agentes terapéuticos que tienen como diana al NeuGcGM3. La identificación de las células B-1 como productoras de anticuerpos anti-NeuGcGM3 permite su utilización como un predictor de respuesta clínica en pacientes tratados con vacunas que inducen respuestas de anticuerpos contra este antígeno y posibilita el diseño más racional de terapias dirigidas específicamente a activar estas células. Por otra parte, abre el camino para la obtención, a partir de linfocitos B-1, de anticuerpos humanos antitumorales, que se pueden convertir en futuros productos para el tratamiento del cáncer. Los resultados de la presente investigación se encuentran publicados en tres artículos científicos aparecidos en revistas internacionales de alto impacto, en una tesis de Diploma y una tesis de Doctorado. También han sido presentados en 12 eventos nacionales e internacionales.

COMUNICACIÓN CORTA DEL RESULTADO

Antecedentes:

La expectativa de vida se incrementa rápidamente a escala mundial. En Cuba, más del 19% de la población tenía más de 60 años en el año 2014 (1). A pesar del incremento de la expectativa de vida, aún enfermedades como el Alzheimer, las infecciones, la aterosclerosis y el cáncer están asociadas al envejecimiento y comprometen la calidad de vida de este grupo etario. En particular, el cáncer constituye una de las principales causas de muerte a nivel mundial por lo que se hace necesario profundizar en las bases moleculares y celulares que facilitan el desarrollo de esta enfermedad en las edades avanzadas. Numerosas evidencias sugieren que el sistema inmune tiene la capacidad de reconocer y eliminar las células malignas. Varios estudios han demostrado la existencia de anticuerpos naturales (AcNs) contra antígenos tumorales, tanto en individuos sanos como en pacientes con cáncer (2). No obstante, no se ha estudiado a profundidad el comportamiento de estos AcNs con el avance de la edad.

Entre las moléculas de naturaleza sacarídica consideradas de mayor interés para la inmunoterapia del cáncer se encuentran los gangliósidos *N*-glicosilados tales como el NeuGcGM3. Estos glicoesfingolípidos no se expresan naturalmente en las células normales humanas, sin embargo se sobre-expresan en tumores de colon, mama, pulmón y melanoma (3). No se han estudiado los niveles y capacidad citotóxica de anticuerpos anti-NeuGcGM3 en individuos sanos y pacientes con cáncer de diferentes grupos etarios. Tampoco se han identificado las células que secretan este tipo de anticuerpos.

Las células B-1 son fundamentales en las respuestas contra antígenos no proteicos. Una de sus funciones principales es la secreción de AcNs, los cuales se detectan independientemente de una inmunización y reconocen antígenos propios, alterados y agentes patógenos. Los AcNs y las células B-1 que los producen son importantes para la

defensa contra las infecciones, en enfermedades autoinmunes y cardiovasculares, patologías cuya incidencia aumenta en individuos envejecidos. No obstante, hasta el momento no se conoce si las células B-1 reconocen antígenos tumorales, como el NeuGcGM3, participando así en la inmunovigilancia contra el cáncer, ni se ha estudiado el comportamiento de esta población celular con el avance de la edad.

Los objetivos de este trabajo fueron, primeramente, evaluar la existencia de AcNs anti-NeuGcGM3 citotóxicos sobre células tumorales en individuos sanos y pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). También estudiar la capacidad de los linfocitos B-1 de secretar este tipo de anticuerpos, en comparación con otras células B. Finalmente, analizar el efecto de la edad sobre los niveles de anticuerpos anti-NeuGcGM3 citotóxicos anti-tumorales y en la frecuencia y funcionalidad de los linfocitos B-1, en base a su capacidad para secretar anticuerpos y la diversidad de su repertorio.

Resultados:

Los individuos sanos poseen anticuerpos anti-NeuGcGM3 capaces de reconocer e inducir la muerte de células tumorales que expresan NeuGcGM3.

La existencia de anticuerpos reactivos por el antígeno tumoral NeuGcGM3, se confirmó en 65 de los 100 sueros de individuos sanos analizados. De estos 65 sueros, 40 fueron capaces de reconocer células tumorales de mieloma L1210, que expresan altos niveles de NeuGcGM3. De los 40 individuos cuyos sueros reconocieron la línea L1210, 38 poseían anticuerpos capaces de inducir más de un 20% de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) sobre estas células tumorales. Además, se observó que 11 de las 38 muestras de suero que mostraron CDC indujeron la muerte de las células L1210 también en ausencia del complemento. Esta citotoxicidad estuvo mediada por un mecanismo de necrosis oncótica, un tipo de muerte celular inmunogénica, que puede potenciar la respuesta inmune contra el tumor. Este trabajo muestra por primera vez que los anticuerpos anti-NeuGcGM3 existentes en individuos sanos son capaces de inducir la muerte de las células tumorales por un mecanismo independiente de la activación del complemento. Por primera vez también se demuestra la capacidad de anticuerpos de isotipo IgM de mediar la muerte celular por un mecanismo de este tipo.

Los niveles de anticuerpos anti-NeuGcGM3 presentes en los sueros de los individuos sanos disminuyen con el avance de la edad y en pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Los niveles séricos de anticuerpos anti-NeuGcGM3, así como el número de individuos con anticuerpos capaces de reconocer e inducir citotoxicidad independiente del complemento sobre células tumorales disminuyeron significativamente con el avance de la edad. Debido al potencial efecto antitumoral de los anticuerpos anti-NeuGcGM3 presentes en los individuos sanos, se estudiaron sus niveles en 53 pacientes de CPCNP que no habían recibido tratamiento previo, detectándose solamente anticuerpos anti-NeuGcGM3 en seis de los pacientes y en niveles significativamente menores que los detectados en individuos sanos de edades similares.

Las células B-1 secretan anticuerpos anti-NeuGcGM3 capaces de reconocer células

tumorales que expresan este antígeno.

A continuación se realizaron experimentos enfocados en determinar qué población de células B secretaba estos anticuerpos. Tanto en ratones como en humanos se demostró que la reactividad contra el gangliósido NeuGcGM3 está concentrada fundamentalmente en la población de linfocitos B-1. Estas células secretan anticuerpos anti-NeuGcGM3 capaces de reconocer y eliminar células tumorales que expresan este antígeno. Estos resultados evidenciaron por primera vez la participación de las células B-1 y los AcNs secretados por ellas en la vigilancia inmunológica contra los tumores.

La frecuencia, la capacidad de secretar espontáneamente IgM y la diversidad del repertorio de los linfocitos B-1 humanos disminuyen con el avance de la edad.

Una vez identificadas las células B responsables de la secreción de los anticuerpos anti-NeuGcGM3 y teniendo en cuenta que los niveles de estos anticuerpos disminuyen con el avance de la edad se analizó el comportamiento de estas células en individuos sanos de diferentes edades. Primeramente, se comprobó que la frecuencia de linfocitos B-1 disminuyó con el avance de la edad. Además, se demostró por primera vez que el porcentaje de linfocitos B-1 capaces de secretar espontáneamente IgM, una de las funciones principales de estas células, fue significativamente menor en el grupo de individuos de edad avanzada en comparación con los sujetos jóvenes. En los linfocitos B-1 provenientes de individuos envejecidos, se observó menor expresión de los genes promotores de un fenotipo secretor de inmunoglobulinas *Blimp1* y *Xbp1*, mientras que los niveles de *Pax5*, factor de transcripción inhibidor del fenotipo secretor, fueron significativamente mayores. Este resultado, junto a la disminución con la edad de la frecuencia de los linfocitos B-1, podrían explicar los menores niveles de anticuerpos IgM anti-NeuGcGM3 con capacidad citotóxica sobre células tumorales en individuos envejecidos.

Adicionalmente, al analizar el repertorio de las regiones variables de las IgM de las células B-1 de individuos envejecidos se apreció una disminución de la variabilidad con respecto al de los individuos jóvenes. Además, en los individuos envejecidos se observó un incremento en la frecuencia de uso de los genes VH3-23 y VH4-34, los que se han asociado con enfermedades autoinmunes y malignidades hematopoyéticas (4,5). Por otra parte, en las células B-1 de individuos envejecidos se apreció una disminución significativa en el porcentaje de secuencias VH3-33, las que han sido vinculadas con funciones de mantenimiento de la homeostasis del organismo (6).

En conjunto los resultados de este trabajo reafirman la importancia de la inmunidad natural en la vigilancia inmunológica contra los tumores. Debido a la capacidad citotóxica sobre células tumorales de los anticuerpos anti-NeuGcGM3 secretados por los linfocitos B-1, la disminución de sus niveles en sangre pudiese contribuir al incremento en la incidencia de cáncer en los individuos de edad avanzada. Además, teniendo en cuenta las otras reactividades descritas en la literatura para las células B-1, los cambios que ocurren con la edad en esta población de linfocitos pueden aumentar la susceptibilidad de los sujetos envejecidos a otras enfermedades tales como infecciones, enfermedades autoinmunes y cardiovasculares. Estos resultados ponen de manifiesto el efecto de la inmunosenescencia en una rama efectora del sistema inmune no descrita anteriormente.

Además del aporte teórico, el presente trabajo tiene importancia práctica e impacto social. Primeramente contribuye a la comprensión de los mecanismos de acción de vacunas del CIM que generan una respuesta de anticuerpos contra el gangliósido NeuGcGM3. La identificación de las células B-1 como productoras de anticuerpos anti-NeuGcGM3 sugiere que esta población pudiera ser utilizada como un predictor de respuesta clínica en pacientes tratados con vacunas que inducen respuestas de anticuerpos contra este antígeno. Las mediciones de los niveles de anticuerpos anti-NeuGcGM3 y la frecuencia y funcionalidad de las células B-1 se están validando actualmente como valores pronóstico y predictores de eficacia en un ensayo clínico con pacientes de cáncer de células no pequeñas tratados con la vacuna Vaxira en el Hospital de Oncología y Radiología de Ciudad de la Habana. Ya se ha demostrado en estudios clínicos que la inducción de anticuerpos como los descritos en el presente trabajo se correlaciona con una mayor supervivencia de los pacientes. Estos resultados abren el camino al desarrollo de preparados vacunales dirigidos específicamente a activar este tipo de células. Por otra parte, este estudio sugiere la posibilidad de obtener, a partir de linfocitos B-1, anticuerpos humanos con propiedades antitumorales que se pueden convertir en futuros productos para el tratamiento del cáncer. Los conocimientos derivados de este trabajo pueden traducirse en el diseño de tratamientos más eficaces no solo para el cáncer, sino también para otras enfermedades de alta incidencia en el adulto mayor, como son las infecciones y la aterosclerosis.

REFERENCIAS:

1. Fernández J.C. y González E. (2015). El envejecimiento de la población cubana por provincias y municipios. O. N. d. E. e. Información. Cuba.
2. Vollmers H.P. y Brandlein S. (2009). Natural antibodies and cancer. *N Biotechnol* 25(5): 294-298.
3. van Crujisen H., Ruiz M.G., van der Valk P., de Gruijl T.D. y Giaccone G. (2009). Tissue micro array analysis of ganglioside N-glycolyl GM3 expression and signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 activation in relation to dendritic cell infiltration and microvessel density in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 9: 180.
4. Arons E., Suntum T., Stetler-Stevenson M. y Kreitman R.J. (2009). VH4-34+ hairy cell leukemia, a new variant with poor prognosis despite standard therapy. *Blood* 114(21): 4687-4695.
5. Tipton C.M., Fucile C.F., Darce J., Chida A., Ichikawa T., Gregoret I. y cols. (2015). Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol* 16(7): 755-765.
6. Gronwall C., Charles E.D., Dustin L.B., Rader C. y Silverman G.J. (2014). Selection of apoptotic cell specific human antibodies from adult bone marrow. *PLoSOne* 9(4): e95999.