



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**  
**Departamento de Medicina**

*“Genes KIR y sus ligandos como predictores de  
respuesta a anticuerpos monoclonales anti-EGFR en  
tumores sólidos”*

Trabajo presentado por Cristina Morales Estévez, licenciada en Medicina, para  
optar al grado de Doctor.

Programa de doctorado en Biomedicina.

Línea de “Nuevas terapias en cáncer”

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a horizontal stroke at the bottom.

Fdo.: Cristina Morales Estévez  
Córdoba, a 24 Abril, 2017

TITULO: *Genes KIR y sus ligandos como predictores de respuesta a anticuerpos monoclonales anti-EGFR en tumores sólidos*

AUTOR: *Cristina Morales Estévez*

---

© Edita: UCOPress. 2017  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---





**TÍTULO DE LA TESIS:** GENES KIR Y SUS LIGANDOS COMO PREDICTORES DE RESPUESTA A ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-EGFR EN TUMORES SÓLIDOS

**DOCTORANDO:** CRISTINA MORALES ESTÉVEZ

**INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS:**

**D. JUAN DE LA HABA RODRÍGUEZ, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA Y D. ENRIQUE ARANDA AGUILAR, CATEDRÁTICO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA,**

**HACEN CONSTAR:**

Que el trabajo titulado "GENES KIR Y SUS LIGANDOS COMO PREDICTORES DE RESPUESTA A ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-EGFR EN TUMORES SÓLIDOS" ha sido realizado por Dña. Cristina Morales Estévez, bajo nuestra dirección, en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), dentro del grupo GC06: Nuevas terapias en cáncer. Este trabajo ha conseguido un nivel científico de suficiente relevancia como para derivar en la publicación de un artículo en revista internacional en Q1 de su categoría (*Morales-Estevez C, De la Haba-Rodriguez J, Manzanares-Martin B, Porras-Quintela I, Rodriguez-Ariza A, Moreno-Vega A, Ortiz-Morales MJ, Gomez-España MA, Cano-Osuna MT, Lopez-Gonzalez J, Chia-Delgado B, Gonzalez-Fernandez R, Aranda-Aguilar E. KIR Genes and Their Ligands Predict the Response to Anti-EGFR Monoclonal Antibodies in Solid Tumors. Front Immunol. 2016 Dec 5;7:561*, con un índice de impacto de 5.695.

A nuestro juicio reúne los méritos suficientes para ser defendido ante el tribunal correspondiente y poder optar al grado de Doctor. Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, a 20 Abril, 2017

Firma de los directores

Fdo.: Dr. Juan de la Haba Rodríguez

Fdo.: Dr. Prof. Enrique Aranda Aguilar

## **Agradecimientos:**

Cuando empecé este trabajo, nunca pensé que redactar estas líneas ahora serían las más complicadas de escribir, por no saber cómo agradecer a la gran cantidad de gente que de una manera u otra han contribuido a que este proyecto sea hoy una realidad.

En primer lugar quería agradecerérselo a mis directores de tesis el Dr. Aranda Aguilar y el Dr. De la Haba Rodríguez, por su apoyo y confianza, por abrirme las puertas de la investigación y por alentarme a continuar y tener inquietudes.

Al Dr. González Fernández y Dra. Manzanares Martínez por su participación, entrega, paciencia y tiempo dedicado. Les estoy infinitamente agradecida.

A todos mis compañeros que han participado en este estudio y que con su colaboración desinteresada han hecho posible esta tesis.

Y como no agradecerérselo a mi familia y amigos; a mi padre por ser ejemplo de éxito y responsabilidad; a mis hermanos por su ayuda y apoyo incondicional. ¡MUCHAS GRACIAS!



# ÍNDICE





I.	RESUMEN.	10
II.	INTRODUCCIÓN	18
	1. Epidemiología del cáncer	19
	1.1. Cáncer de mama	21
	1.3. Cáncer de colon-recto	21
	1.4. Cáncer de cabeza y cuello	22
	2. Tratamiento del cáncer	22
	3. EGFR	24
	3.1. Inhibición EGFR	27
	3.2. Anticuerpos monoclonales Anti EGFR	28
	3.2.1. Estructura	28
	3.2.2. Mecanismo de acción	29
	3.2.3. Elaboración	30
	3.2.4. Cetuximab	32
	3.2.5. Trastuzumab	34
	4. Respuesta inmune y cáncer	36
	4.1. Respuesta inmune y terapia con AcMo	40
	4.2. Mecanismos de acción tumoral	42
	4.2.1. Células Natural Killer (NK)	45
	4.2.2. Receptores KIR	46
	4.2.2.1. Definición y estructura	46
	4.2.2.2. Función de los receptores KIR	51
	4.2.2.3. Expresión	57
III.	HIPÓTESIS	61
IV.	OBJETIVOS	64
V.	PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS	67
	1. Población	67
	2. Métodos	70
	2.1. Extracción y purificación de ADN	70
	2.2. Genotipaje KIR	71
	2.2.1. Amplificación por PCR-SSP	71
	2.2.2. Electroforesis en gel de agarosa	72
	2.2.3. Imágenes de electroforesis en gel de agarosa	73
	2.3. Tipaje HLA: Amplificación por PCR-SSO	74
	2.4. Hibridación y detección	76
	2.5. Análisis de resultados	78
	2.5.1. Tipaje HLA clase I de baja resolución	78
	2.5.2. Tipaje HLA clase I de alta resolución	79
	3. Análisis estadístico	81
	4. Material bibliográfico	83
VI.	RESULTADOS	86
	1. Características de la población	87
	2. Genotipos KIR y polimorfismos de ligandos HLA	91
	3. Combinaciones de KIR-ligando HLA	95
	4. Asociaciones de dos genotipos activadores KIR con sus ligandos con impacto en tiempo a fallo de tratamiento (TTF)	96

VII.	DISCUSIÓN	100
VIII.	CONCLUSIONES	115
IX.	ABREVIATURAS	117
X.	BIBLIOGRAFÍA	122
XI.	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA TESIS	131

# **I. RESUMEN**



**ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) regulate the killing function of NK cells, which play an important role in the antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) response exerted by therapeutic monoclonal antibodies (mAbs). However, it is unknown whether the extensive genetic variability of KIR genes and/or their HLA ligands might influence the response to these treatments.

**OBJECTIVE:**

This study aimed to explore whether the variability in KIR/HLA genes may be associated to the variable response observed to mAbs-based anti-EGFR therapies.

**MATERIALS AND METHODS:** One hundred and sixteen patients treated with anti-EGFR mAbs (trastuzumab for advanced breast cancer, or cetuximab for advanced colorectal or advanced head and neck cancer), were included in the study; of these patients, were selected those who had progressed to mAbs therapy and were grouped into two categories taking into account time to treatment failure (TTF  $\leq 6$  months and TTF  $\geq 10$  months). KIR genotyping (16 genetic variability) was performed in genomic DNA from peripheral blood by PCR sequence-specific primer technique and HLA ligand typing was performed for HLA-B & -C loci by reverse PCR-SSO methodology.

**RESULTS:** Subjects carrying the KIR/HLA ligand combinations KIR2DS1/HLAC2C2-C1C2 and KIR3DS1/HLABw4w4-w4w6 showed longer TTF than non-carriers counterparts (14,76 m vs 3,73 m,  $p < 0.001$ , and 14,93 m vs 4,6 m,  $p = 0.005$  respectively). No other significant differences were observed. Two activating KIR/HLA ligand combinations predict better response of patients to anti-EGFR therapy.

**CONCLUSIONS:** These findings increase the overall knowledge on the role of specific gene variants related with responsiveness to anti-EGFR treatment in solid tumours and highlight the importance of assessing gene polymorphisms related with cancer medications.



## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** Los receptores tipo inmunoglobulina (KIR) de células natural Killer (NK) regulan la función de muerte de las células NK, que desempeñan un papel importante en la respuesta de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) ejercida por anticuerpos monoclonales terapéuticos (AcMo). Sin embargo, se desconoce si la extensa variabilidad genética de los genes KIR y / o sus ligandos HLA podría influir en la respuesta a estos tratamientos.

**OBJETIVOS:** Nuestro objetivo es explorar si la variabilidad genética en el complejo KIR / HLA influye en el tiempo hasta el fracaso del tratamiento en pacientes tratados con AcMo anti-EGFR en tres tumores sólidos.

**POBLACIÓN, DISEÑO Y METODOLOGÍA:** Se incluyeron en el estudio 116 pacientes tratados con AcMo anti-EGFR (trastuzumab para cáncer de mama avanzado, o cetuximab para cáncer colorrectal avanzado o cáncer de cabeza y cuello avanzado), de los cuales se seleccionaron aquellos que habían progresado a la terapia de AcMo y se agruparon en dos categorías teniendo en cuenta el tiempo hasta el fracaso del tratamiento (TTF  $\leq 6$  meses y TTF  $\geq 10$  meses). El genotipo KIR (16 variables genéticas) se realizó en el ADN genómico de sangre periférica mediante técnica de cebador específico de la secuencia de PCR y se realizó el tipo de ligando HLA para los loci HLA-B & C mediante la metodología PCR-SSO inversa.

**RESULTADOS:** Los sujetos que llevan las combinaciones de ligando KIR / HLA KIR2DS1 / HLAC2C2-C1C2 y KIR3DS1 / HLABw4w4-w4w6 mostraron una TTF más larga que aquellos no portadores (14,76 m frente a 3,73 m,  $p < 0,001$  y 14,93 m frente a 4,6 m,  $p = 0,005$ , respectivamente). No se observaron otras diferencias significativas; por lo tanto, dos combinaciones de ligando KIR / HLA activadoras predicen una mejor respuesta de los pacientes al tratamiento con anti-EGFR.

**CONCLUSIONES:** Estos hallazgos aumentan el conocimiento general sobre el papel de variantes genéticas específicas relacionadas con la respuesta al tratamiento anti-EGFR en tumores sólidos y destacan la importancia de evaluar

los polimorfismos genéticos relacionados con los medicamentos contra el cáncer.



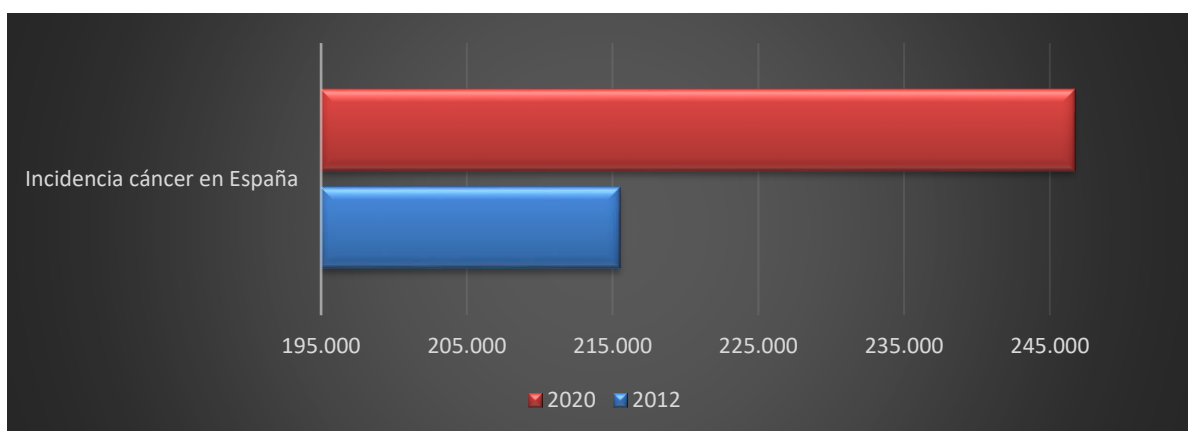




## **II. INTRODUCCIÓN**

## 1. Epidemiología del cáncer

La incidencia de cáncer en España en 2012 fue de 215.534 (alrededor de 2/3 partes en pacientes  $\geq 65$  años), con un riesgo de presentar cáncer antes de los 75 años de 25,1%; teniendo en cuenta las previsiones demográficas proporcionadas por Naciones Unidas, se calcula que en 2020 se diagnosticarán 246.713 casos nuevos de cáncer en España, 97.715 en mujeres y 148.998 en varones.



**Figura 1.** Evolución de las previsiones de incremento de la incidencia de cáncer en España.

El crecimiento de nuevos casos se produce en mayor medida a costa de la población  $\geq 65$  años, y el crecimiento de la población y su envejecimiento explicarían fundamentalmente este incremento[1].

Los tumores más frecuentemente diagnosticados para la población general en España en el año 2012 fueron el cáncer de colon (32.240 casos nuevos), seguido del cáncer de próstata (27.853 casos nuevos), pulmón (26.715 casos nuevos), mama (25.215 casos nuevos) y vejiga (13.789 casos nuevos)[2].

Sin embargo, si fragmentamos la incidencia de los distintos tumores por sexo, los casos que más frecuentemente se diagnosticaron en varones en España en 2012 fueron el cáncer de próstata (27.853 casos nuevos), el cáncer de pulmón (21.780 casos nuevos), el cáncer de colon (19.261 casos nuevos), el cáncer de vejiga (11.584 casos nuevos) y el cáncer gástrico (4.866 casos nuevos). La incidencia de estos tumores continúa aumentando en los años posteriores[3].

Y en el caso de las mujeres, los tumores más frecuentemente diagnosticados en España en 2012 fueron, por este orden, el cáncer de mama (25.215 casos nuevos), colon (12.979 casos nuevos), útero (5.121 casos nuevos), pulmón (4.935 casos nuevos) y ovario (3.236 casos nuevos)[4].

Según los últimos datos publicados por el instituto nacional de Estadística (inE) el 31 de enero de 2014, los tumores fueron la segunda causa de muerte en ambos sexos, responsables de 27,5 de cada 100 defunciones. La primera causa de muerte son las enfermedades del sistema circulatorio (30,3) y la tercera posición la ocupan las enfermedades del sistema respiratorio (11,7); y por sexo, los tumores fueron la primera causa de muerte en los hombres (con una tasa de 296,3 fallecidos por cada 100.000) y la segunda causa en mujeres (con 180,0).

Pero la perspectiva en cuanto a datos de mortalidad por cáncer en España es optimista, ya que ha disminuido a partir de los años 90, encontrándose en tasas similares a las de los países más desarrollados y a la tasa de todos los países del mundo. La disminución en mortalidad puede explicarse por los avances en diagnóstico precoz y en terapias más eficaces.

## **1.1. Cáncer de mama**

Si bien el diagnóstico con mayor frecuencia se realiza en estadios precoces, hay que señalar que la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico constituye un 5 o 6%, y el 30% de las mujeres diagnosticadas en un estadio precoz de la enfermedad experimentarán una recurrencia de la misma con metástasis a distancia [5, 6]; por tanto, la prevalencia de la enfermedad metastásica es alta debido a que muchas mujeres conviven con la enfermedad durante varios años. Sin embargo, existe una importante carencia de datos precisos sobre la prevalencia en casi todos los países, ya que la mayoría de los registros de cáncer no recogen datos sobre las recaídas. La supervivencia del cáncer de mama ha mejorado notablemente en los últimos 20 años. Cada año disponemos de mayor información para diagnosticar precozmente y tratar el cáncer de mama, lo que ha permitido que la supervivencia global a los 5 años del diagnóstico de este tumor sea del 82,8% en nuestro país, por encima de la media europea y similar a los países con las mejores cifras de supervivencia [7].

## **1.2. Cáncer de colon-recto (CCR)**

En el caso del cáncer de colon, en España cada año se diagnostican más de 28.000 nuevos casos, lo que supone el 15% de la incidencia de todos los tumores; es la segunda causa de muerte por cáncer en nuestro país, tan solo por detrás del cáncer de pulmón, con más de 14.000 fallecimientos anuales [8]; es además el tercer cáncer más frecuente en la población española, después del cáncer de próstata y mama [9]. Tienen una tasa de supervivencia baja, con sólo un 55% de los pacientes vivos a los 5 años tras el diagnóstico de la enfermedad [10], pero debemos resaltar que la supervivencia de los pacientes ha mejorado

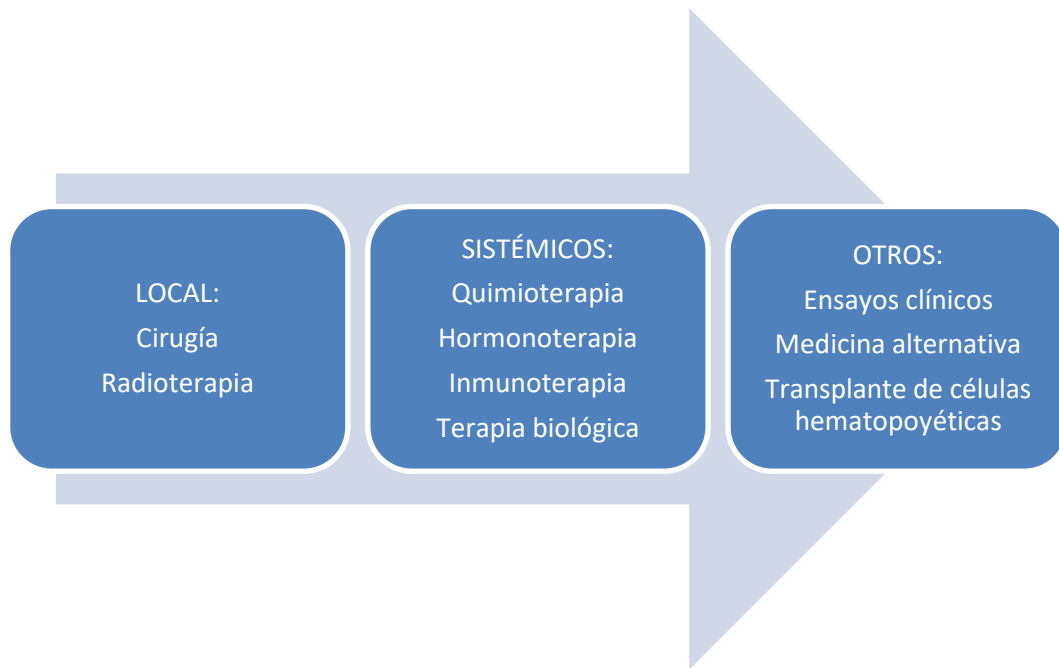
en los últimos 10 años [11] y que aproximadamente, más del 20% de los pacientes con CCR tiene enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico, siendo en este estadio del CCR, la tasa de supervivencia a los cinco años baja, alrededor de un 6%. Aproximadamente un 54% de los pacientes que sufren un cáncer de colon en España sobreviven más de 5 años. Se trata de una supervivencia global, sin tener en cuenta la edad, estado previo de salud de la persona, o el estadio en que se diagnostica la enfermedad.

### **1.3. Cáncer de cabeza y cuello (CyC)**

En cuanto al cáncer de cabeza y cuello, se diagnostican en el mundo en torno a unos 650.000 nuevos casos al año a nivel mundial y se producen cerca de 350.000 fallecimientos [12]. En España se estima que son diagnosticados entre 12000 y 14000 casos nuevos cada año[13] . Más del 80 por ciento de los pacientes presenta una enfermedad localmente avanzada al diagnosticarse [14]. La supervivencia media de los pacientes en recaída o con metástasis es de seis a nueve meses [15].

## **2. Tratamientos del cáncer**

La elección del tratamiento adecuado para el cáncer viene determinado por varios factores, incluyendo el tipo, las condiciones generales del paciente y por supuesto cuál sea el objetivo buscado: curarlo, evitar que se extienda, o aliviar los síntomas causados por éste. Dependiendo de todos estos factores, el paciente puede recibir uno o varios de los tratamientos siguientes:



A pesar de los grandes avances en el tratamiento del cáncer, la mayoría de los tipos de tumores sólidos siguen siendo resistentes a los tratamientos convencionales, y en cuanto a los tratamientos sistémicos, pilar básico del tratamiento de la enfermedad metastásica, hasta antes de la llegada de las terapias diana, eran los fármacos citotóxicos, los cuales son eficaces pero con un perfil de toxicidad que en ocasiones limita su uso. La introducción de terapias antidiana ha supuesto un avance importante en la selección, actividad y perfil de toxicidad, motivos por los que han tenido un amplio desarrollo en las últimas dos décadas.

En la actualidad, forma parte de nuestra práctica clínica habitual el uso de terapias dirigidas contra dianas moleculares concretas, bloqueando receptores e inhibiendo vías de crecimiento, angiogénesis y migración tumoral. Dentro del amplio dossier de terapias antidiana disponibles en la actualidad, son aquellas dirigidas la actividad dependiente de “receptor para el factor de crecimiento epidérmico” (EGFR) unas de las que han alcanzado mayor desarrollo.



Pese a la importancia demostrada de estas vías celulares en algunos tumores y la actividad demostrada en modelos in vitro, nos encontramos en la clínica respuestas y evoluciones muy heterogéneas. Al igual que se produce con la quimioterapia, se producen fallos en la actividad de estos fármacos que nos obliga a identificar qué pacientes van a responder a estas terapias.

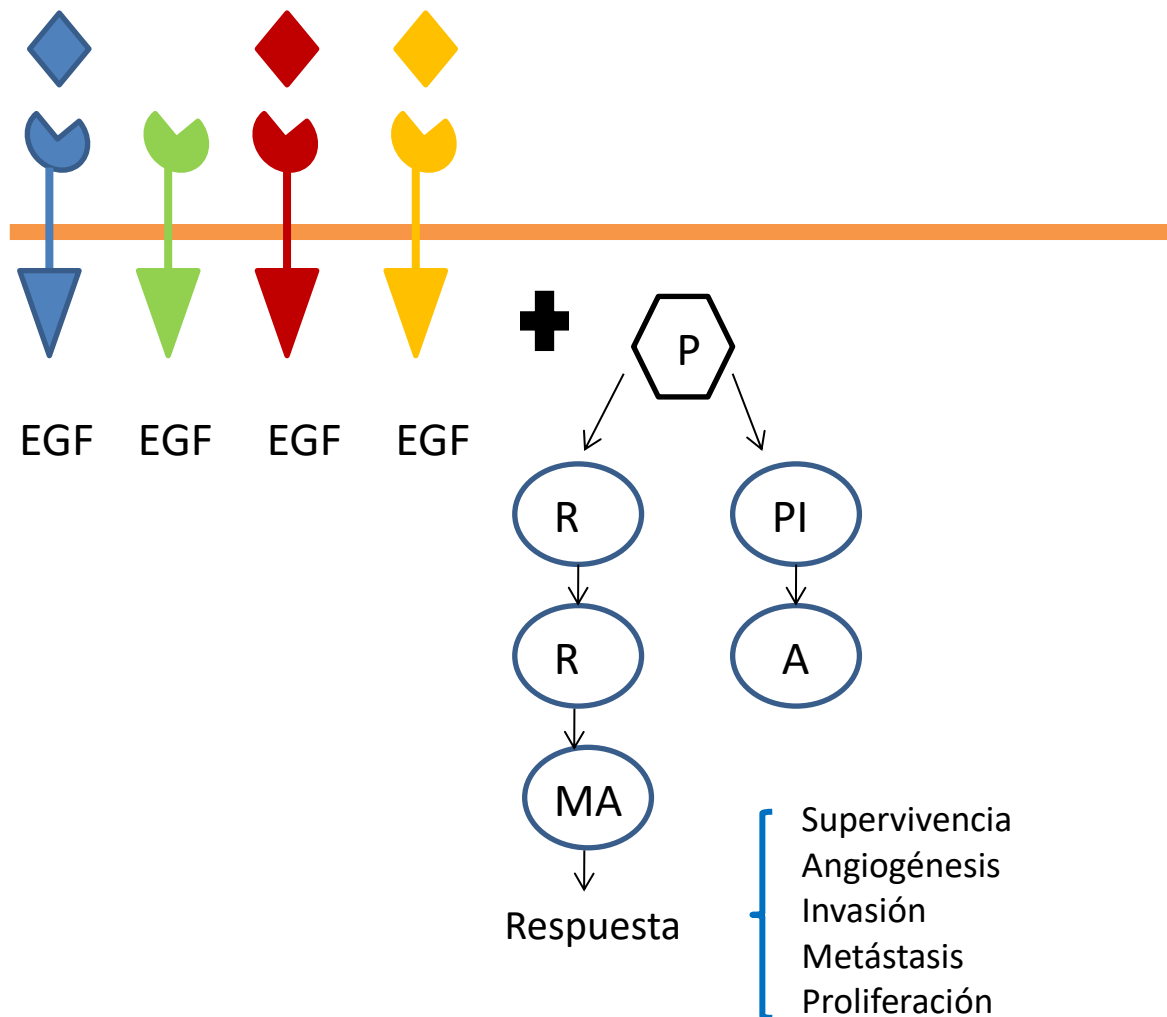
Nos encontramos por tanto ante la necesidad de marcadores predictivos de respuesta, biomarcadores que pueden estar influyendo en la eficacia del tratamiento, con el fin de seleccionar mejor a nuestros pacientes, aquellos que verdaderamente van a responder, y que van a evolucionar mejor, para ofrecer así un tratamiento óptimo, una medicina de precisión y disminuir así toxicidades y costes innecesarios.

### **3. EGFR**

Numerosas vías celulares tienen un impacto significativo en el crecimiento y el potencial metastásico de los tumores. De todas ellas, la familia de receptores de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB o HER) son una de las más estudiadas, y están constituidas por 4 tipos diferentes de receptores. Las vías dependientes de estos receptores están implicadas en el control de la supervivencia celular, la progresión del ciclo celular, la angiogénesis, la migración celular y la invasión celular/metástasis [16]. Estos receptores y sus vías se encuentran disregulados en algunos de los tumores sólidos más prevalentes habiéndose desarrollado estrategias terapéuticas dirigidas con actividad antitumoral clínicamente significativa. Tenemos así, fármacos dirigidos al receptor EGFR, entre los que se encuentran los anticuerpos monoclonales (AcMo). Estos AcMo bloquean la unión

del ligando al dominio extracelular del receptor (porque está ocupado por dicho AcMo), induciendo la internalización y la degradación de dicho receptor, resultando en la regulación negativa de la expresión de EGFR en la superficie y evitando los efectos derivados de su señalización intracelular[17].

Este receptor EGFR, es el miembro de la familia de 4 receptores, incluyendo EGFR1, EGFR2, EGFR3 y EGFR4, de los que algunos tienen actividad tirosina quinasa. Algunos de ellos se activan después de la unión de factores de crecimiento peptídicos de la familia de EGF. Tras la unión del ligando, los receptores EGFR forman o bien homo- o heterodímeros y, después de la dimerización, se produce la auto- y transfosforilación de residuos de tirosina producidos por la transmisión de señales intracelulares de estos receptores EGFR[18].



**Figura 2.** La familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) consta de 4 miembros: EGFR1, EGFR2, EGFR3 y EGFR4; la unión del EGFR a ligandos específicos (por ejemplo, EGF, TGF- $\alpha$ ) desencadena un cambio conformacional del receptor, exponiendo el dominio de dimerización y permitiendo la homodimerización con un segundo EGFR, o heterodimerización con otro miembro de la familia EGFR. Los resultados de la activación de EGRF conduce a la autofosforilación de los principales residuos de tirosina. Estos sitios fosforilados de tirosina conducen a su vez a la activación de las principales cascadas de señalización, incluyendo la vía Ras / Raf / MAPK y la vía / AKT PI3K. Estas vías actúan de forma coordinada para promover la supervivencia celular.

Este receptor puede estar anormalmente activado por diversos mecanismos como la sobreexpresión del receptor, la mutación, la dimerización del receptor dependiente del ligando, la activación independiente de ligando y se asocia con

el desarrollo de gran variedad de cánceres humanos. Por lo tanto, la inhibición del EGFR es uno de los objetivos clave para el tratamiento de muchos tumores.

### **3.1. Inhibición EGFR**

De las múltiples estrategias estudiadas para inhibir al receptor, dos aproximaciones terapéuticas se han mostrado como las más consistentes y son las más ampliamente desarrolladas en la clínica[19]:

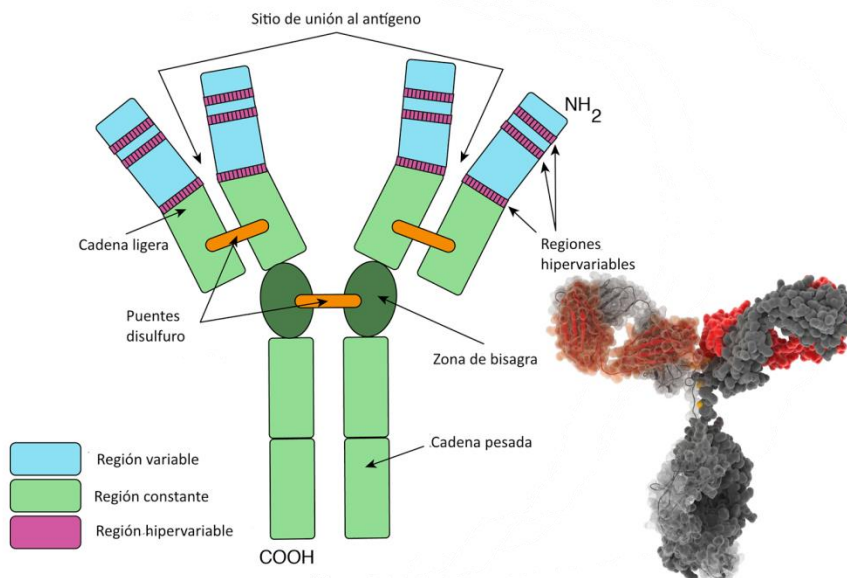
- Los anticuerpos monoclonales, que se unen al dominio externo del receptor con alta afinidad, compitiendo con sus ligandos naturales y bloqueando así, la activación de éstos. Ellos comparten una secuencia de distintos mecanismos de acción: la unión extracelular y la internalización del complejo receptor-anticuerpo, lo que provoca la inhibición de la vía de señalización mediada por EGF y potencial estimulación de la respuesta inmunológica, por ejemplo la citotoxicidad dependiente del complemento o de células NK[20].

- Las pequeñas moléculas inhibidoras de la actividad enzimática tirosina quinasa del receptor (TKIs). Son moléculas sintéticas fundamentalmente derivados quinazolínicos, de bajo peso molecular que interactúan con el dominio tirosina quinasa intracelular de varios receptores, incluyendo EGFR, inhibiendo la fosforilación inducida por ligando. Estas moléculas son generalmente competidores reversibles del sitio de unión al ATP en el dominio catalítico intracelular de la tirosina quinasa[21].

### 3.2. Anticuerpos monoclonales Anti EGFR

#### 3.2.1. Estructura

Los anticuerpos están compuestos por cadenas de proteínas, con una conformación especial en forma de Y, en la cual se pueden identificar dos cadenas pesadas idénticas (H) y dos cadenas ligeras idénticas (L) unidas por enlaces disulfuro intra e intercatenarias. Cada cadena tiene dominios estructurales, los cuales son formaciones globulares derivadas de la conformación terciaria proteica a esos niveles: dos en las cadenas ligeras (uno constante CL, y otro variable VL); las cadenas pesadas contienen un dominio variable (VH) y 3 ó 4 dominios constantes (CH), dependiendo del isotipo del anticuerpo[22, 23].



**Figura 3.** Estructura de los Anticuerpos monoclonales. Extraído de “La tarea de la vida es ordenar la materia (Neal Stephenson)”. ISSN 2386-7671.

#### 3.2.2. Mecanismo de acción

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) contra el EGFR comparten una secuencia de distintos mecanismos de acción:

- Unión extracelular
- Internalización del complejo receptor-anticuerpo
- Inhibición de la vía de señalización mediada por EGF
- Potencial estimulación de la respuesta inmunológica.

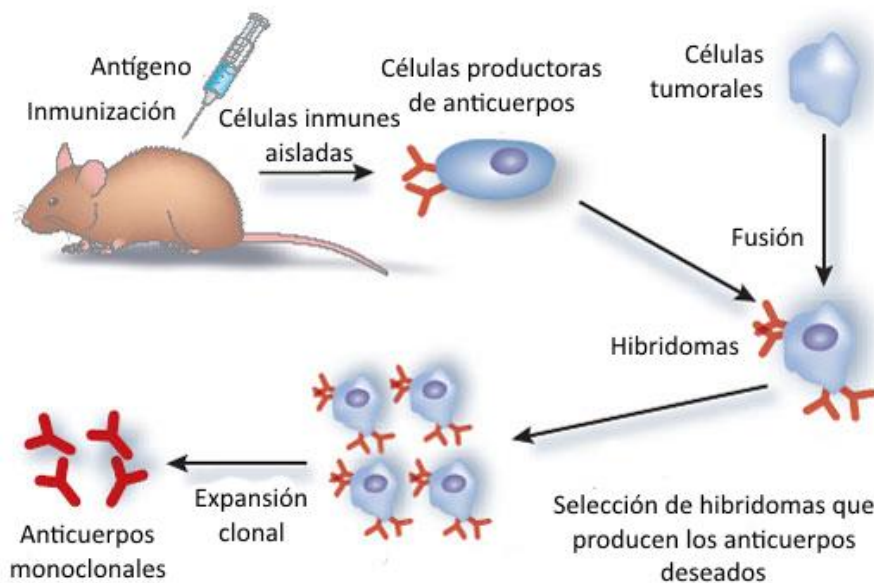
En muchos tipos diferentes de cáncer los receptores EGFR, y en particular EGFR1 y EGFR2, están constitutivamente activados como resultado de la producción autocrina de ligando, sobreexpresión del receptor, o mutación. Dada la clara correlación entre la sobreexpresión de EGFR1 y EGFR2 y la progresión de diversos cánceres humanos, estos receptores EGFR fueron propuestos como dianas terapéuticas[24, 25].

Entre estas terapias dirigidas, por su prevalencia en la práctica clínica diaria en el tratamiento del CCR y el cáncer de mama, destacan dos anticuerpos monoclonales (AcMo): Cetuximab (anticuerpo IgG1 monoclonal quimérico, con porción Fc humana y Fab murina, cuya diana específica es el receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR1) y Trastuzumab (anticuerpo monoclonal humanizado, los cuales sólo conservan como murina la parte hipervariable /regiones CDR), tipo Ig G1 que se une de forma selectiva al receptor EGFR2)[26, 27].

### **3.2.3. Elaboración**

Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos producidos en el laboratorio que se unen a un antígeno específico [28].

Se produce de forma industrial por una sola línea de células (el clon). Son de gran utilidad debido a la capacidad de reconocer a tan solo uno de los epítomos de un antígeno. Su utilidad clínica en oncología está dirigida a la localización de células tumorales (diagnóstica) o su destrucción (terapéutica)[29].



**Figura 4.** Elaboración de los anticuerpos monoclonales. Extraído de “La tarea de la vida es ordenar la materia (Neal Stephenson)”. ISSN 2386-7671.

En función de su composición los podemos clasificar en:

- Murinos: procedencia íntegra del ratón. Alta formación de anticuerpos frente a los mismos (lo que provoca que disminuya su eficacia o incluso que aparezcan problemas de tipo alérgico).

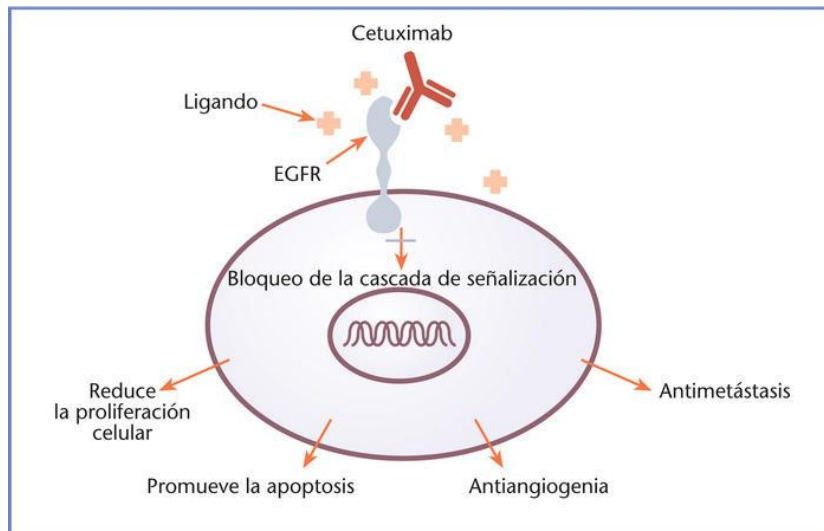
- Quiméricos: sustituyen región constante murina por una de procedencia humana. Reducción de inmunogenicidad.
- Humanizados: Además sustituyen la parte variable excepto regiones hipervariables.
- Humanos: “Completamente” humanos que se producen en animales transgénicos portadores de genes de Igs humanas; menor antigenicidad y mayor tiempo en circulación. Como toda proteína extraña son inmunogénicos. Además, al producirse en células no humanas, los puntos de glicación son diferentes[30].

Sería deseable que, para su aplicación terapéutica, los anticuerpos procedieran de linfocitos humanos y no de ratón. Pero, cuando se fusionan células humanas con células animales, hay una rápida pérdida preferencial de los cromosomas humanos en las células híbridas resultantes.

El primer anticuerpo monoclonal en ser aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de EE.UU. (FDA) en 1998 fue precisamente el trastuzumab para el tratamiento del cáncer de mama EGFR2 positivo, no sólo en estadios avanzados, sino también están aprobados a día de hoy para estadios precoces de la enfermedad. El otro agente específico anti-EGFR1, el cetuximab, también han recibido la aprobación para el cáncer colorrectal metastásico (CCRm) y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CECC)[17] .

#### **3.2.4. Cetuximab**





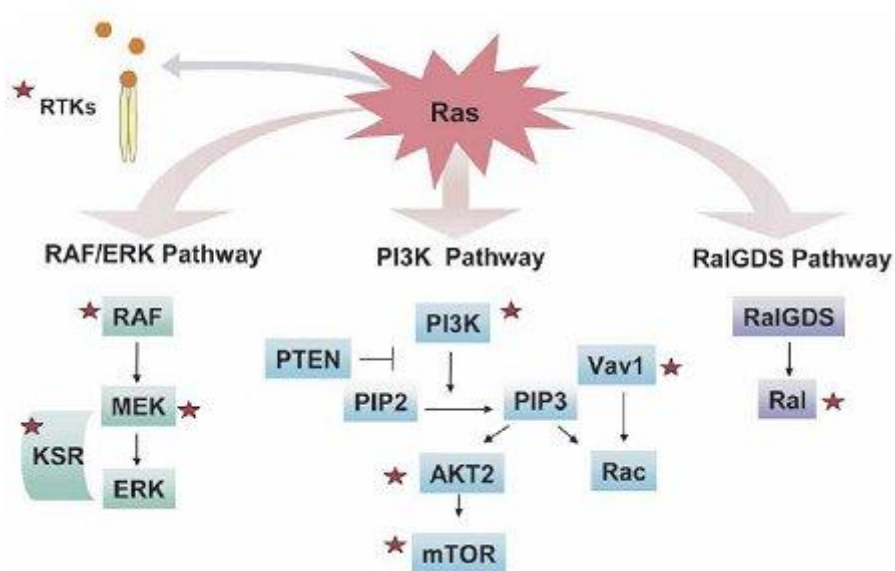
**Figura 5.** Mecanismo de acción del Cetuximab. “*Cetuximab: Inhibidor del crecimiento del cáncer colorrectal*” de Marián Carretero Colomer. *OFFARM* 2005; vol 24: n°6.

El cetuximab se une al EGFR1 con una afinidad aproximadamente 5 a 10 veces superior a la de los ligandos endógenos[31]. El cetuximab bloquea la unión de los ligandos endógenos al EGFR1, lo que provoca la inhibición de la función del receptor. Además induce la internalización de EGFR lo que puede conllevar una disminución de los receptores disponibles en la superficie celular (downregulation).

Como ya he mencionado, Cetuximab, como isoforma de IgG1, también tiene el potencial para mediar en las respuestas inmunes tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y puede fijar complemento[32].

Por otro lado, en los tumores, la activación del gen RAS mediante el EGFR contribuye al aumento, mediado por el gen EGFR, de la proliferación, supervivencia y producción de factores proangiogénicos. La familia de oncogenes RAS es una de las que se activan con mayor frecuencia en los cánceres humanos. Mutaciones de los genes RAS producen la activación

constitutiva de las proteínas RAS, independientemente de la señalización del EGFR[33].



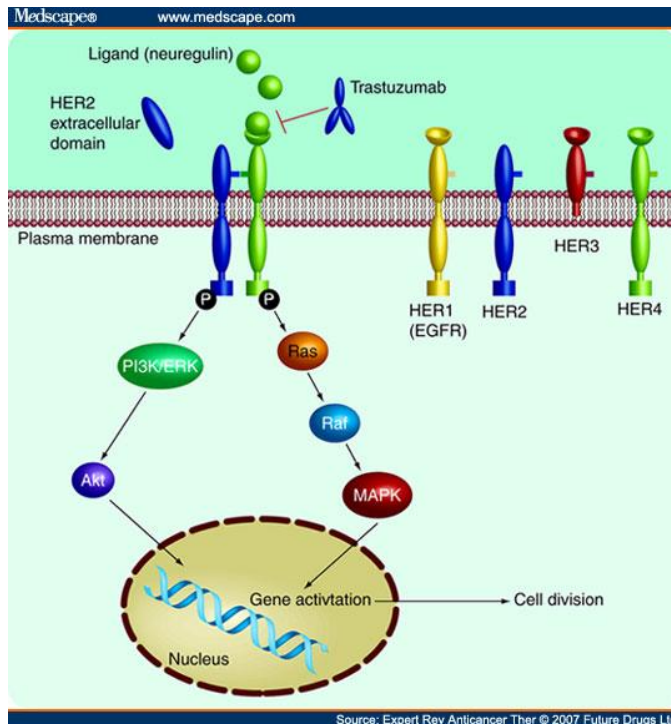
**Figura 6.** Vías de señalización RAS. *“Pancreatic cancer: new advances in molecular diagnosis”* de Carlos Alberto Rosas Chuñil. *Medwave* 2009 Jun;9(6):e3988 doi: 10.5867/medwave.2009.06.3988.

En pacientes con cáncer colorrectal metastásico, cetuximab se utiliza en monoterapia o en combinación con quimioterapia. Antes de iniciar el tratamiento con Cetuximab es necesario comprobar que el gen RAS es de tipo nativo (KRAS y NRAS) [34, 35]. La determinación del estado mutacional se debe realizar en un laboratorio con experiencia utilizando métodos validados para determinar mutaciones de KRAS y NRAS (exones 2, 3 y 4).

En pacientes con cáncer de células escamosas de cabeza y cuello localmente avanzado, cetuximab se utiliza de forma concomitante con radioterapia. Se recomienda iniciar el tratamiento con cetuximab una semana antes de la radioterapia y continuar el tratamiento con cetuximab hasta el final del periodo

de radioterapia. En pacientes con cáncer de células escamosas recurrente o metastásico de cabeza y cuello, cetuximab se utiliza en combinación con quimioterapia basada en platino, seguido de cetuximab como tratamiento de mantenimiento, hasta la progresión de la enfermedad.

### 3.2.5. Trastuzumab



**Figura 7.** Mecanismo de acción del Trastuzumab; Cascada de señalización de EGFR2. La familia de receptores del factor de crecimiento de tirosina quinasa transmembrana (EGFR) consiste en cuatro miembros (EGFR1, EGFR2, EGFR3 y EGFR4). Todos, excepto EGFR3, poseen un dominio de tirosina quinasa intracelular. No se ha descubierto ningún ligando para EGFR2. La activación de EGFR2 se produce mediante heterodimerización con uno de los otros miembros de la familia EGFR, para la que EGFR2 es el socio de dimerización preferido. Tras la activación de EGFR2, se inicia una cascada de transducción de señales que da como resultado la proliferación y supervivencia celular. “*Cardiotoxicity associated with the use of trastuzumab in breast cancer patients*”. Perik PJ, de Korte MA, van Veldhuisen DJ, Gietema JA, Sleijfer DT, de Vries EG. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2007 Dec;7(12):1763-71. Review.

El trastuzumab, que se une de forma selectiva al receptor EGFR2, presente en la superficie de las células tumorales, frenando el crecimiento y el desarrollo tumoral. Además trastuzumab es también un potente mediador de ADCC, demostrándose que la ADCC mediada por trastuzumab se ejerce preferentemente en las células EGFR2 +, induciendo una respuesta inmune celular específica[36] y puede fijar complemento[37, 38].

La sobre-expresión de EGFR2 se observa en el 20-30 % de los cánceres de mama primarios, y es en ellos donde tiene su indicación. Trastuzumab se une con una alta afinidad y especificidad al subdominio IV, una región yuxtamembrana del dominio extracelular de EGFR2. La unión del trastuzumab a EGFR2 inhibe la vía de señalización de EGFR2 independiente del ligando y previene la división proteolítica de su dominio extracelular, un mecanismo de activación de EGFR2[39, 40]. Como resultado, trastuzumab ha demostrado, tanto en ensayos in vitro como en animales, que inhibe la proliferación de células humanas tumorales que sobreexpresan EGFR2[41, 42].

Por lo tanto, trastuzumab debe ser empleado únicamente en pacientes cuyos tumores sobreexpresen la proteína EGFR2 o presenten amplificación del gen EGFR2 determinados mediante un método exacto y validado. La sobreexpresión de EGFR2 puede ser detectada empleando una evaluación basada en técnicas inmunohistoquímicas (IHC) de bloques tumorales fijados. Y la amplificación del gen EGFR2 puede ser detectada usando hibridación in situ por fluorescencia (FISH) o hibridación in situ por colorimetría (CISH) de bloques tumorales fijados. Los pacientes se elegirán para ser tratados con trastuzumab si muestran fuerte sobreexpresión de EGFR2, descrita como una calificación 3+ por IHC, o como resultado positivo por FISH o CISH, considerando un resultado como positivo por

CISH si existen más de 5 copias del gen EGFR2 por núcleo en más del 50 % de las células tumorales[43, 44].

#### **4. Respuesta inmune y cáncer**

La capacidad del sistema inmune de reconocer y eliminar células tumorales se denomina vigilancia inmunológica. El hecho de que el sistema inmune reaccione frente a muchos tumores, ha llevado a que la respuesta inmune sea vista como un arma terapéutica en el tratamiento del cáncer.

Para comprender la inmunidad frente a los tumores es necesario conocer las características que permiten al sistema inmune reconocer como células extrañas a los tumores[45]. En condiciones normales, las células de cada individuo expresan en su superficie proteínas (o antígenos), los cuales actúan como marcas de identidad, y en el caso de las células de una persona son reconocidos como propios por el sistema inmune, evitando que las células propias sean atacadas y eliminadas. Y si el sistema inmune se encuentra con antígenos que no son propios, como por ejemplo derivados de bacterias o virus, recibe señales de peligro que llevan a que se active una reacción del sistema inmune contra estos antígenos foráneos, resultando en la eliminación de todos los agentes que tengan los antígenos extraños. Esta reacción es lo que se conoce como respuesta inmune. El reconocimiento de Ags propios y extraños se hace a través de la presentación de los mismos por las moléculas HLA.

Al igual que las células normales, las células tumorales expresan antígenos tanto en su superficie celular como también secretados por las células. Éstos se han denominado antígenos asociados a tumor. Los antígenos tumorales son reconocidos como extraños por el sistema inmune, debido a que cuando las

células normales se convierten en células cancerosas, algunos de los antígenos de su superficie cambian o mutan, haciéndolos reconocibles por el sistema inmune como antígenos extraños[45].

Tanto en animales como en humanos se han identificado diversos tipos de antígenos tumorales que pueden ser reconocidos por las células del sistema inmune, principalmente por linfocitos T, linfocitos B y células Natural Killer. La identificación de estos antígenos ha sido fundamental para entender como ocurre el reconocimiento de los tumores por el sistema inmune, como para desarrollar estrategias que permitan modular las respuestas inmunes para atacar el cáncer.

Y existen dos tipos de inmunidad, según la especialización de cada una:

- La inmunidad innata, que corresponde a células y moléculas que actúan de manera rápida contra agentes extraños. Son la primera barrera defensiva, y no generan memoria inmunológica. Forman parte de ésta barreras como la piel y mucosas, secreciones antimicrobianas de estos tejidos, moléculas que favorecen la inflamación y células como macrófagos y células Natural Killer (NK). Las células NK son las células de la inmunidad innata más relacionadas con una respuesta antitumoral, ya que han demostrado la capacidad de erradicar tumores.
- Y la inmunidad adaptativa es la más relacionada con la respuesta inmune contra tumores. La inmunidad adaptativa se desarrolla después de un primer contacto con un agente extraño, lo que se conoce como memoria inmunológica. Tras este primer contacto, algunas células se especializan

en reconocer y reaccionar rápidamente ante un nuevo contacto con el mismo agente extraño.

En las respuestas inmunes contra tumores participan tanto la inmunidad innata como la adaptativa. En una respuesta inmune anti-tumoral, las células presentadoras de antígenos ubicadas a lo largo de todo el organismo (células dendríticas y macrófagos), son capaces de detectar y capturar a células tumorales. En ese momento, las células presentadoras expresan fragmentos de los antígenos de las células tumorales capturadas, presentándolos en el contexto de las moléculas HLA a los linfocitos T, células efectoras del sistema inmune. El linfocito T se activa con el contacto con la célula presentadora, y adquiere la capacidad de reconocer todo lo que tenga el antígeno o marcador presentado por la célula presentadora como extraño. El linfocito T activado viaja por el cuerpo, y cada vez que encuentra una célula que tiene el antígeno tumoral, la destruye. Esta respuesta es específica, ya que el linfocito T sólo puede reconocer un sólo antígeno, y no otros. Pero los linfocitos T no reconocen Ags directamente, sólo cuando son presentados por moléculas HLA (esto ocurre tanto con Ags propios como extraños). El linfocito T activado viaja por el cuerpo, y cada vez que encuentra una célula que tiene el antígeno tumoral, la destruye. Esta respuesta es específica, ya que el linfocito T sólo puede reconocer un solo antígeno, y no otros.

Si bien este proceso ocurre constantemente en nuestro organismo, muchas veces no ocurre de forma eficiente. Por un lado la mayoría de los tumores sólo expresan una baja cantidad de antígenos que pueden ser reconocidos como extraños, de modo que la capacidad de inducir una respuesta inmune potente tiende a ser escasa. Por otro lado, el rápido crecimiento y propagación de los

tumores muchas veces sobrepasan la capacidad del sistema inmune para erradicar todas las células tumorales, y para el control efectivo del tumor se requiere que todas las células neoplásicas sean eliminadas. Además muchos tumores disponen de mecanismos especializados para evitar las respuestas inmunes del organismo (evasión inmune por los tumores), dentro de los cuales se encuentran:

- Las células tumorales disminuyen o no expresan antígenos en su superficie, impidiendo el reconocimiento por parte de las células del sistema inmune.
- Secreción de sustancias que disminuyen el funcionamiento del sistema inmune, incapacitando a los linfocitos para cumplir su labor.
- El tumor puede crecer sin generar inflamación; esto provoca que no exista ninguna señal de peligro que indique la presencia de una enfermedad. Cuando ocurre esta situación, la respuesta inmune es de tipo tolerogénica o permisivas con respecto al tumor.
- Las células tumorales no expresan moléculas HLA.

Asociado a estos factores de evasión inmune de los tumores, se sabe también que en estados de déficit severo del sistema inmune (inmunodeficiencias), existe una mayor probabilidad de desarrollar ciertos tipos de tumores, como por ejemplo la mayor frecuencia de tumores del tejido linfático (linfomas) en pacientes con inmunodeficiencia por VIH.



#### 4.1. Respuesta inmune y terapia con AcMo

Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos producidos en el laboratorio que se unen a antígenos específicos expresados por células, como una proteína que está presente en la superficie de las células; y una característica de los AcMo es que reconocen proteínas a concentraciones muy bajas[46].

Para crear anticuerpos monoclonales, los investigadores inyectan a ratones con un antígeno. Luego, aíslan de los ratones las células que producen anticuerpos y las funden cada una con una célula de mieloma (linfocito B canceroso) para producir una célula de fusión que se conoce como hibridoma[47]. Cada hibridoma se divide luego para producir células hijas o clones, de ahí el término de "monoclonal", y los anticuerpos segregados por clones diferentes se analizan para identificar los anticuerpos que se unen con más fuerza al antígeno. Se pueden producir grandes cantidades de anticuerpos a partir de estos hibridomas inmortales. Ya que los anticuerpos murinos pueden ellos mismos desencadenar una reacción inmunitaria en los humanos, lo que reduciría su efectividad, los anticuerpos murinos se "humanizan" con frecuencia al reemplazar del anticuerpo la mayor porción posible de ratón con porciones humanas; por lo tanto, los Ac murinos son muy inmunogénicos, y hay que humanizarlos. Esto se logra por medio de ingeniería genética.

Algunos anticuerpos monoclonales estimulan una reacción inmunitaria que destruye células cancerosas; esta destrucción se produce por fijar el complemento, ADCC o por fagocitosis. De una forma semejante a los anticuerpos producidos naturalmente por los linfocitos B, estos anticuerpos

monoclonales "recubren" la superficie de las células cancerosas, lo que desencadena su destrucción por el sistema inmunitario[48]. Los anticuerpos monoclonales de este tipo son el rituximab, el cual se une al antígeno CD20 que se encuentra en las células del linfoma no Hodgkin, y el alemtuzumab, el cual se une al antígeno CD52 que se encuentra en las células de la leucemia linfocítica crónica (LLC) de linfocitos B[49].

Otro grupo de anticuerpos monoclonales estimula una reacción inmunitaria contra el cáncer al unirse a receptores en la superficie de células inmunitarias y al inhibir las señales que impiden a las células inmunitarias que ataquen los tejidos del mismo cuerpo, incluso las células cancerosas. Uno de esos anticuerpos monoclonales es el ipilimumab, aprobado para el tratamiento del melanoma metastásico[50].

Otros anticuerpos monoclonales interfieren con la acción de las proteínas que son necesarias para el crecimiento tumoral. Por ejemplo, el bevacizumab se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), una proteína segregada por las células tumorales y otras células en el microentorno del tumor que promueve la formación de vasos sanguíneos del tumor[51]. Cuando se une al bevacizumab, el VEGF no puede interactuar con su receptor celular, lo que impide la señalización que resulta en el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos.

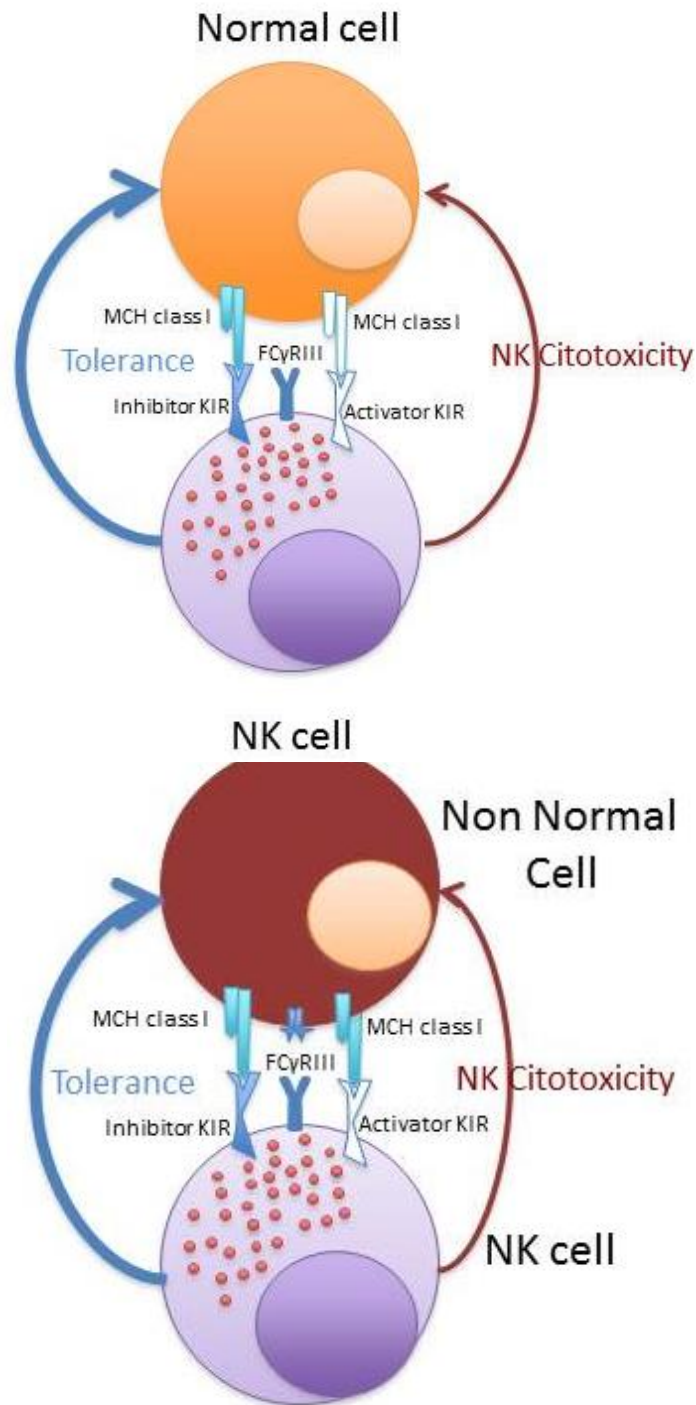
En forma semejante, el cetuximab y el panitumumab se unen al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR), y el trastuzumab se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano-2 (EGFR-2)[51, 52]. Los anticuerpos monoclonales que se adhieren a los receptores del factor de crecimiento de la superficie celular impiden que los receptores en el blanco

envíen sus señales normales que promueven el crecimiento. Ellos pueden también desencadenar la apoptosis y activar el sistema inmunitario para que destruya las células tumorales por los mecanismos anteriormente citados.

#### **4.2. Mecanismos de acción antitumoral**

La respuesta al tratamiento con anticuerpos monoclonales no es idéntica en todos los pacientes, debido a las diferencias innatas en la actividad / función del sistema inmune de un individuo, y la diferencia de expresión de biomarcadores genéticos que pueden influir de forma diferente en la respuesta a dichos tratamientos tal y como se plantea en nuestra hipótesis. La actividad antitumoral de estos anticuerpos terapéuticos se debe en parte, a la conocida citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC), que es dependiente de células efectoras inmunes, células NK, a través de su receptor ( $Fc\gamma RIII$ , CD16) para la porción Fc de estos AcMo[53]. Esto conduce a la activación de las células NK y la lisis de la célula tumoral[54].

Por lo tanto, estos anticuerpos monoclonales son potentes mediadores de ADCC, demostrándose que la ADCC mediada por Trastuzumab y Cetuximab induce una respuesta inmune celular específica.



**Figura 8.** Comportamiento de las células NK frente a células normales y células tumorales.

Algunos estudios han analizado la relación entre polimorfismos del receptor FcγRIII y la tasa de control de algunos tumores cuando se utiliza como tratamiento, Cetuximab o Trastuzumab. Dado que existen evidencias

contradictorias en este sentido, en la actualidad no se emplean como marcador predictivo de respuesta. En un estudio recientemente publicado por Rodríguez y cols., se encuentra relación entre el polimorfismo FcγRIIa-131H/H y una mayor tasa de control de cáncer colorrectal avanzado tratado con Cetuximab[55].

Existen también algunos trabajos en los que se han relacionado estos receptores con la evolución de algunas neoplasias y su respuesta a tratamiento. Estudios in vitro de citotoxicidad alogénica en líneas celulares de cáncer de mama con diferente expresión de EGFR-2 (SKBR-3, T47D y MCF-7), mostraron actividad citolítica dependiente de la exposición al anticuerpo monoclonal trastuzumab, sugiriendo los autores que la inmunoterapia NK alogénica y trastuzumab puede ser una combinación activa en el tratamiento del cáncer de mama[56]. De igual manera, se ha descrito, actividad inmune citolítica estimulada con interleukina (IL)-15 en estudios in vitro realizados con líneas de sarcoma, observándose que algunas de estas líneas y algunos de estos tumores expresan EGFR. Utilizando anticuerpo anti-EGFR (Cetuximab), es posible inducir una citotoxicidad NK dependiente de anticuerpo más eficaz que la inducida por IL-15 [57]. Con una aplicabilidad clínica relevante, en la leucemia mieloide aguda se emplea este tipo de reactividad NK alogénica entre el donante y receptor con un impacto favorable en la disminución en la tasa de recurrencias y mejora en la supervivencia.

#### **4.2.1. Células Natural Killer (NK)**

Las células NK son efectores críticos de la respuesta inmune innata temprana hacia células transformadas e infectadas por virus. Mientras que las células T y B se activan al detectar invasores extraños a través de la expresión de receptores específicos de antígeno, el estado de activación de células NK está regulado por un equilibrio de las señales intracelulares recibidas de una serie de receptores activadores e inhibidores codificados en la línea germinal[58]. Cuando una célula NK encuentra una célula anormal (por ejemplo, infectada por virus o tumor) predominante, las células NK pueden inducir rápidamente la apoptosis de la célula diana mediante la secreción dirigida de gránulos citolíticos que contienen perforinas y granzimas o el acoplamiento de receptores que contienen dominio de muerte[59]. Las células NK activadas también pueden secretar citoquinas que activan ambas células inmunes innatas y adaptativas.

Para que las células NK ejerzan sus funciones citotóxicas se requiere que las células blanco o diana sean identificadas a través de sus receptores[60].

Entre estos receptores destacan:

- Receptores del extremo Fc de Igs conocido como CD16: estos receptores median los procesos de lisis denominados citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), el cual implica la presencia de anticuerpos que se unen, por una parte, a antígenos presentes en las células diana y por el extremo Fc son reconocidos por los receptores CD16 presentes en las células NK. Como consecuencia de esta unión las células NK se activan y destruyen la célula diana implicada en este proceso.

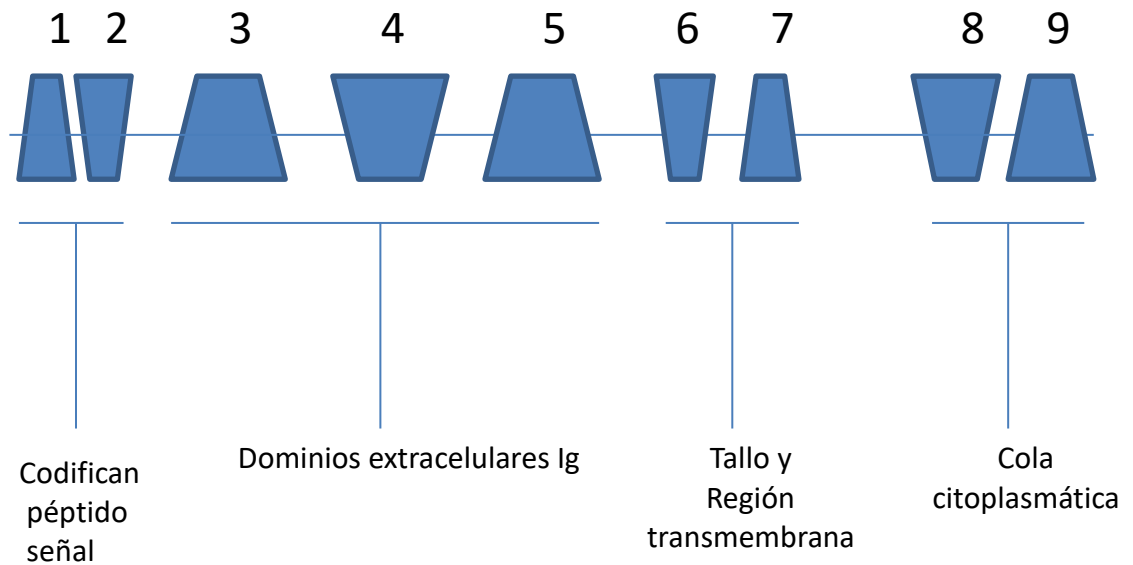
- Receptores de citotoxicidad natural (NCRs): responsables de la citotoxicidad natural de las células NK (CN) ó la lisis espontánea y directa de las células diana con las que interactúan.
- Receptores NK de HLA (NKRs): reconocen moléculas del CMH clase I y tienen capacidad de activar o de inhibir sus funciones. Precisamente del equilibrio de estas acciones, bien de activación o de inhibición, resultará del efecto final de las células NK, bien desarrollando sus funciones destructoras y secretoras o bien haciendo que queden bloqueadas. Existen tres familias de estos receptores:
  - Receptores tipo KIR (killer cell Ig-like receptors)
  - Receptores ILTs (immunoglobulin like transcripts)
  - Receptores tipo lectinas

## **4.2.2. Receptores KIR**

### **4.2.2.1. Definición y estructura**

Son receptores de superficie de la familia de las inmunoglobulinas (conocidos como CD 158), codificados en el brazo corto del cromosoma 19, región genómica altamente polimorfa; esta es una familia de glicoproteínas transmembrana expresadas en células NK y un subconjunto de células T.

Dentro del cromosoma 19 se organizan de manera consecutiva. Constan de 9 exones: exón 1 y 2 codifican el péptido señal, 3-4-5 los dominios extracelulares tipo Ig, 6-7 tallo y región transmembrana, 8 y 9 la cola citoplasmática. Los dominios extracelulares son los encargados de reconocer los ligandos y el tallo transmite la señal que regula la actividad de la célula NK, que pueden ser tanto activadores como inhibidores.



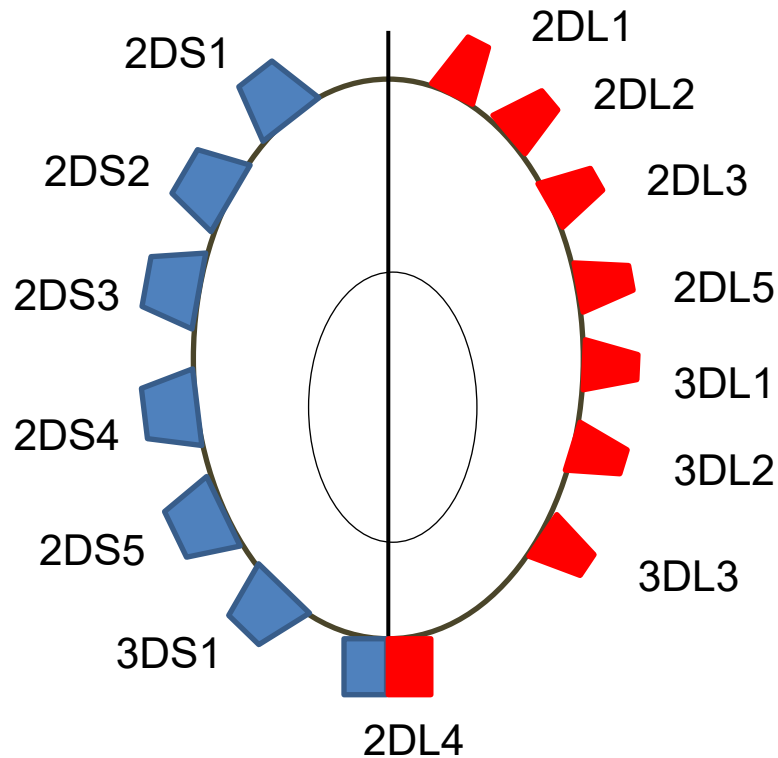
**Figura 9.** Distribución de los dominios dentro del gen que codifica el receptor KIR que se encuentra localizado en el cromosoma 19.

Hay descritos 16 polimorfismos de KIR, unos son activadores (KIR2DS1-5 y KIR3DS1), otros inhibidores (KIR2DL1-3, KIR 2DL5 y KIR3DL1-3), uno con función tanto activadora como inhibidora (2DL4) y 2 de ellos son pseudogenes, por lo que no se expresan como proteínas y no tienen clara su función (3DP1, 2DP1)[61].



## ACTIVADORES

## INHIBIDORES



**Figura 10.** Polimorfismos activadores (azules) e inhibidores (rojos).

Estructuralmente están formados por una región extracelular (donde pueden presentar 2 o 3 dominios; KIR2D y KIR3D respectivamente) y un tallo intracitoplasmático asociado a diferentes dominios tirosin-kinasa.

Y la nomenclatura de los receptores KIR está basada en sus características estructurales[62, 63]:

- Número de dominios extracelulares tipo inmunoglobulina: 2D o 3D (activadores o inhibidores indistintamente).
- Tamaño del tallo intracitoplasmático: L (Long; que son mayoritariamente inhibidores) o S (Short; siendo mayoritariamente activadores).
- Gen que codifica la proteína (Dígito final).

Los diferentes genotipos de KIR alcanzan un alto nivel de diversidad basándose en cuatro niveles de variación:

1. Cada gen KIR reconoce específicamente un subconjunto distinto de los haplotipos MHC-I disponibles.
2. Diferentes combinaciones de los 16 genes KIR se heredan como haplotipos distintos por individuos dentro de la población humana, y los diferentes haplotipos pueden variar su proporción de KIR activadores e inhibidores; por lo tanto, cada persona tiene un número variable de genes KIR[64].
3. Muchos alelos distintos de genes KIR han surgido a través de mutaciones puntuales que codifican variaciones menores de secuencias de uno a varios aminoácidos, que pueden afectar al nivel de expresión de la superficie del receptor, región de reconocimiento por anticuerpos anti-KIR y afinidad / avidéz por MHC-I, por lo que cada gen es polimórfico, presentando gran variabilidad de alelos.
4. La diversidad de NK en la sangre periférica se genera a través de la expresión estocástica de diferentes combinaciones de los productos de genes KIR disponibles en la superficie de las células NK individuales).

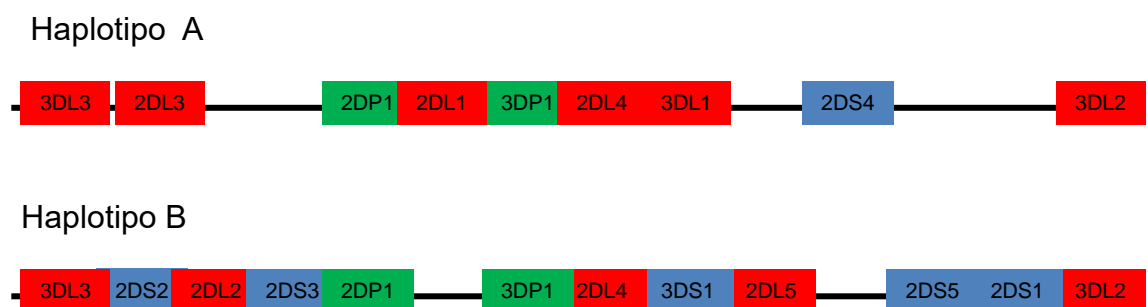
La comprensión de cómo la estructura molecular de KIR influye en la función se deriva de estudios mutacionales específicamente diseñados, variantes polimórficas naturales, estructuras cristalinas y la conservación de secuencias funcionalmente importantes en KIR durante la evolución de los mamíferos, particularmente entre los primates. Las relaciones estructura / función en KIR se organizarán centrándose por separado en:

- 1) el dominio de unión extracelular / ligando,

- 2) el dominio transmembrana,
- 3) el dominio citoplásmico, que comparten la responsabilidad de un aspecto distinto de la función KIR.

A su vez, los genes KIR se organizan en haplotipos con dos haplotipos descritos, 'A' y 'B'[65]. El haplotipo 'A' tiene sólo un KIR activador (2DS4) siendo por lo tanto predominantemente inhibidor, mientras que el haplotipo 'B' tiene un mayor número de receptores activantes adicionales y generalmente posee más KIRs que el haplotipo 'A'; dicho de otra manera, los haplotipos del grupo B se caracterizan por uno o más de los siguientes genes: KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 y KIR3DS1[65]. Por el contrario, los haplotipos del grupo A se caracterizan por la ausencia de todos estos genes.

Por lo tanto, el "haplotipo KIR" es la disposición de los genes KIR en cada cromosoma 19 y una característica diferencial de los haplotipos KIR es la variación en el contenido génico. De esta manera, existen unos genes que están presentes en el ~100% de los haplotipos KIR descritos y que se conocen como "framework genes". KIR3DL3 y KIR3DL2 delimitan respectivamente, los extremos centromérico y telomérico del haplotipo KIR, mientras que los loci KIR3DP1 y KIR2DL4 conforman la zona central. Estos genes definen las regiones centroméricas y teloméricas y dentro de ellas hay una gran variabilidad entre haplotipos por los genes que están presentes.



**Figura 11.** Genes KIR: haplotipos A y B**4.2.2.2. Función de los receptores KIR**

. Los KIR son reguladores claves del desarrollo, tolerancia y activación de células NK. Los ligandos principales para KIR son MHC de clase I (HLA -A, -B o -C), que se expresan en la superficie de casi todas las células normales nucleadas en el cuerpo, están codificadas a su vez por los genes más polimórficos en los seres humanos, y definen el yo inmune. La tolerancia de las células NK hacia células normales se consigue mediante su expresión de receptores inhibidores de unión al MHC-I, que incluyen KIR entre otros.

Las células tumorales se caracterizan, entre otras cosas, por la pérdida de expresión en su superficie de moléculas del HLA, escapando así de la respuesta inmune protagonizada por los linfocitos; es precisamente la falta de expresión de estas moléculas lo que hace que las células NK pasen a la acción de lisar células tumorales, mediante el reconocimiento de estas células con falta de expresión de moléculas HLA. Por lo tanto, característicamente las células NK detectan y destruyen las células que han perdido o expresan insuficientemente antígenos HLA clase I, una característica típica de las células tumorales o infectadas por virus (19).

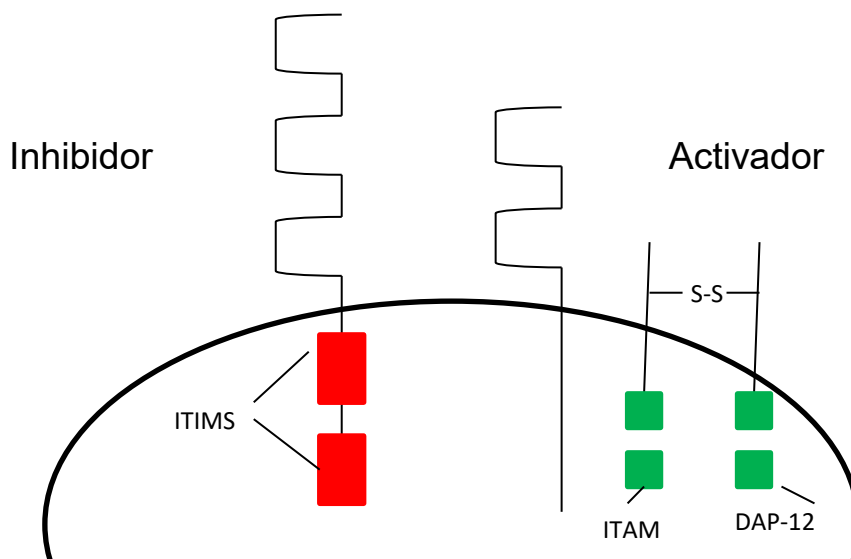
La gran variabilidad de genes HLA y KIR[66] y de las interacciones KIR / HLA proporcionan gran diversidad funcional[67]. Esto permite que las células NK sean capaz de discriminar entre material propio sano de células patógenas transformadas o infectadas, regulando de esta manera su función efectora[68,

69]. Y hay que saber que las moléculas HLA y los KIR se heredan de forma independiente, lo que aumenta la diversidad.

Hay que saber que la ADCC no es el único mecanismo por el que las células NK lisan células tumorales. Las funciones de las células NK están regulados por una gran variedad de receptores de activación e inhibición [70, 71]; uno de estos receptores son precisamente los receptores KIR[72], los cuales pueden inhibir o estimular la actividad de las células NK después del acoplamiento con su ligando [54, 73]. Pero las células NK tienen la capacidad de lisar las células tumorales directamente a través de estos receptores KIR, independientemente de la ADCC. La señal inhibidora resulta de la presencia de “moléculas de inhibición inmunorreceptoras basadas en tirosina (ITIMs)” en los dominios citoplasmáticos de los receptores de cola larga. Y los receptores de cola corta deben sus señales activadoras a su asociación con las “proteínas adaptadoras que llevan moléculas inmunoreceptivas basadas en la activación tirosina” (ITAMs); estos receptores activadores carecen por sí mismos de motivos señalizadores, pero en la región transmembrana tienen un residuo de lisina que les permite su asociación a la molécula activadora DAP-12[58, 74].

Así pues, se encuentran asociados a proteínas adaptadoras de señal como DAP-12 y otros mediadores como ZAP-70 y SKY para activar la ruta metabólica correspondiente que conlleve la activación de la célula

NK para lisar a la célula.



**Figura 12.** Los receptores KIR tienen 2 ó 3 dominios de inmunoglobulina (2D o 3D) y una cola citoplásmica larga (L) que contiene moléculas ITIM o una cola citoplásmica corta (S) y un dominio transmembrana de carga positiva que interacciona con la molécula DAP-12 que contiene el ITAM. Y dado que los KIR inhibidores tienen mayor afinidad por los ligandos del MHC de clase I, la coligación tanto de los receptores activadores como inhibidores da como resultado una señal neta negativa y ninguna activación de los programas citotóxicos o citotóxicos de las células NK.

La excepción a esta norma general la encontramos en el receptor KIR2DL4, ya que tiene acción activadora además de su acción inhibidora de la célula NK, teniendo un tallo citoplasmático largo.

Y como los receptores inhibidores están asociados a moléculas tirosin-quinasa inhibidoras o ITIM, que ejercen su acción de forma directa sin necesidad de proteínas adaptadoras de señal u otros mediadores, predominando de esta forma, en condiciones normales la acción de los receptores inhibidores sobre los activadores[75].

Como ya hemos dicho, el ligando para estos receptores KIR es el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que está conformado por un conjunto de genes cuyos productos son expresados en la superficie de las células del sistema inmune. La principal característica de estos genes es su elevado polimorfismo; esto es, la presencia de una gran cantidad de variaciones en cada uno de los individuos[76]. Localizados en el brazo corto del cromosoma 6, son fundamentales en la regulación y el desarrollo de la respuesta inmunitaria (fundamentalmente en el reconocimiento de antígenos por las células T). Son las principales responsables del rechazo en trasplantes y determinan el grado de susceptibilidad a algunas enfermedades inmunológicas e infecciones. Su herencia es codominante.

Clasificación de las moléculas HLA:

- Moléculas clase I. Se localizan en la superficie de la práctica totalidad de células nucleadas y en las plaquetas. Son el ligando principal de los receptores KIR, modulando con ello su actividad, siendo su función normal la de presentar antígenos (propios y extraños) generados en el interior de la célula, con lo que son la base de la autotolerancia que caracteriza al sistema inmunológico; estas moléculas pueden agruparse en:

a)"clásicas", cuya función consiste en la presentación de antígenos a los linfocitos T CD8: dentro de este grupo tenemos HLA-A, HLA-B y HLA-C.

b)"no clásicas" (también llamadas MHC clase IB), con funciones especializadas: no presentan antígenos a los linfocitos T, sino que se unen a receptores inhibidores de las células NK; dentro de este grupo se encuentran HLA-E, HLA-F y HLA-G, entre otros.

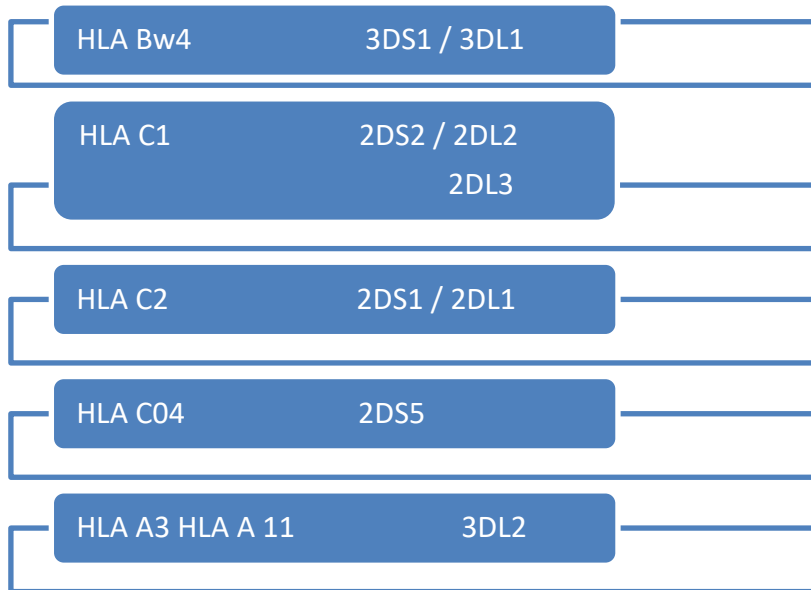
- Moléculas clase II: Presentes en la superficie de las células presentadoras de antígenos, células B, células T activadas y células epiteliales del timo. La expresión de HLA II es constitutiva en las células B e inducible en las células T (38). La célula T reconoce el conjunto formado por la MHC y el péptido fijado a la misma, en la superficie de la célula presentadora de antígeno; estas moléculas pueden agruparse en:

a)"clásicas", que presentan péptidos a los linfocitos T CD4; dentro de este grupo tenemos HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR.

b)"no clásicas", accesorias, con funciones intracelulares (no están expresadas en la membrana celular, sino en membranas internas, de los lisosomas); normalmente, cargan los péptidos antigénicos sobre las moléculas MHC-II clásicas; en este grupo se incluyen HLA-DM y HLA-DO.

Además de estos dos tipos, clásicamente se habla también de los genes clase III, que sin embargo no pertenecen al complejo HLA, pero al estar situado entre la región que codifica las moléculas HLA de clase I y las de clase II, se les da esta denominación.





**Figura 13.** Uniones KIR- HLA conocidas; los KIR inhibitorios (iKIRs) con ligandos HLA conocidos incluyen KIR2DL2 y KIR2DL3, que reconocen los alelos HLA-C-1 relacionada grupo se caracteriza por un residuo de asparagina en la posición 80 de la  $\alpha$ -hélice 1 (HLA-CAsn80); KIR2DL1, que reconoce los alelos HLA-C-2 relacionados grupo caracterizado por un residuo de lisina en la posición 80 (HLA-CLys80); y KIR3DL1, que reconoce los alelos HLA-Bw4 (9, 10). Las células NK también expresan varios receptores activadores que son potencialmente específicos para la auto-moléculas. KIR2DS1 se ha demostrado que la interacción con el grupo de 2 moléculas de HLA-C (HLA-C2), mientras que KIR2DS2 fue demostrado recientemente que reconocer HLA-A \* 11...y el resto: 3DS1, 2DS2, 2DS5 y 3DL2.

Grupo C1	Grupo C2
C*01= 01:02	C*02= 02:02, 02:10
C*03= 03:02, 03:03, 03:04	C*04= 04:01
C*07= 07:01, 07:02, 07:04, 07:12, 07:18	C*05= 05:01
C*08= 08:01, 08:02, 08:08	C*06= 06:02
C*12= 12:02, 12:03	C*15= 15:02, 15:04, 15:05
C*14= 14:02	C*16= 16:02
C*16= 16:01, 16:04	C*17= 17:01
	C*18= 18:01, 18:02

Especificidad de los alelos HLA-C que pertenecen a cada uno de los grupos C1 y C2 (cadena completa)

<b>Bw4</b>	<b>Bw6</b>
<p>A*23, 24, 32 (son ligandos de <a href="#">KIR3DL1</a>)  A*25 (¿se considera ligando de <a href="#">KIR3DL1</a>.)</p> <p>(A* 2501 protege débilmente frente a la lisis mediada por células NK KIR3DL1+, eso podría significar que sí es ligando de <a href="#">KIR3DL1</a>. Foley BA, Blood 2008;112:435-443)</p> <p>B*13 (pero no se considera ligando de <a href="#">KIR3DL1</a>)  B*15:13 (B77)  B*15:16, 15:17 (B63)  B*15:24 (B62)  B*15:25 (B)  B*27 (excluyendo 27:08)  B*37  B*38  B*44  B*47  B*49  B*51  B*52  B*53  B*57  B*58  B*59</p>	<p>B*07  B*08  B*14  B*15:01 (B62)  B*15:02, 15:08, 15:11 (B75)  B*15:03 (B72)  B*15:09 (B70)  B*15:10 (B71)  B*15:12 (B76)  B*18  B*27:08  B*35  B*39  B*40  B*41  B*42  B*45 (<b>*45:01 y *50:02</b>)  B*46  B*48  B*50  B*54, *55, *56  B*67  B*73  B*78  B*81  B*82</p>

Especificidad de los alelos HLA-B que pertenecen a cada uno de los grupos BW4 y Bw6 (trozo de la cadena)

#### 4.2.2.3. Expresión

##### a) Receptores KIR y cáncer

Se ha demostrado que los receptores KIR específicos para las moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC) de clase principal I, juegan un papel importante en el efecto anti-leucemia (mediación, ya sea por inhibición o activación de señales) [77]. Otros estudios han demostrado asociaciones entre genes KIR, sus ligandos y la protección o la susceptibilidad a tumores sólidos.

Sin embargo, la evidencia de un papel para KIR en tumores sólidos en gran medida ha sido discutido [78, 79].

## **b) Moléculas HLA y cáncer**

Recientemente se están desarrollando numerosos trabajos relacionados con el papel que juega el sistema inmune en la génesis y la evolución del cáncer, tanto en tumores hematológicos como en tumores sólidos, así como en el estudio de las moléculas que pueden estar implicadas en una mejor eficacia del tratamiento y por lo tanto una mejor evolución de la enfermedad.

En esta línea en 2006 Watson et al., tras analizar una serie de 462 pacientes sometidos a resección quirúrgica electiva de CCR, observó la relación que existe entre una alta expresión de MHC I y una mayor supervivencia (media de 68 meses IC 63-74 meses), seguidos de aquellos tumores en los que no se expresaban moléculas HLA I (media 60 meses IC 50-69 meses). Por el contrario, aquellos que expresaban bajos niveles de HLA I presentaban menor media de supervivencia (41 meses IC 26-56 meses)[80].

Además hay datos recogidos en la bibliografía que describen la asociación entre la expresión de HLA y cáncer, especialmente en la relación a aquellos en los que agentes infecciosos están implicados en la carcinogénesis. Martin et al. determinaron la participación de HLA-C en la modulación del riesgo de presentar cáncer de cérvix, principalmente en el subgrupo de mujeres infectadas con HPV 16 y 18. En otro estudio realizado en pacientes con carcinoma nasofaríngeo (NPC), asociado a VEB, los autores sugieren que la activación de las células NK puede estar asociada a su génesis.

En 2013 se publicó un estudio del Hospital de Porto-Alegre (Brasil) de casos controles que evaluó las diferencias de expresión de alelos HLA entre 230 pacientes con cáncer de mama y 272 controles sanas[81]. Se observó una mayor frecuencia de HLA- C1 en el grupo de pacientes con cáncer de mama (85.7% frente a 67.3% OR: 2.71, IC 1.75-4.20) siendo más frecuente el alelo heterocigoto C1-C2. No se encontraron diferencias significativas para los alelos HLA C2 y HLA BW4.

Dos estudios más recientes de 2014 y 2015 respectivamente, el primero de De Re, analiza la relación entre diferentes alelos HLA y la respuesta a tratamiento en pacientes con CCR metastásico en tratamiento con FOLFIRI. Así en su serie de 229 pacientes la presencia del alelo HLA BW4 se asoció a un aumento de la tasa de respuesta completa y una mayor supervivencia global. Sin embargo no se encontró asociación en cuanto al TTF[82].

En el segundo de ellos, Beksac et al. analizan la relación entre la presencia de diferentes alelos HLA-I y la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en pacientes con CCR estadio II y III tras cirugía. Se analizan 87 pacientes y se determina la presencia de HLA BW4 en los casos de recidiva de la enfermedad ( $p=0.017$ ). Del mismo modo en el grupo de no recurrencia C2 y C1 fueron menos frecuentes, así como la ausencia de C1 y C2 mejora la SLE[34].

### **c) Receptores KIR y terapias anticáncer**

Es bien conocido que las células NK en combinación con AcMo pueden conferir una lisis más rápida de las células tumorales, debido a la ventaja aditiva y la capacidad citotóxica potente de las células NK [56]. Actualmente, no se sabe si estos receptores KIR pueden influir en la respuesta al tratamiento con AcMo en

tumores sólidos. Debido a la extensa variabilidad genética KIR y / o sus ligandos HLA y la importancia de estas combinaciones en la respuesta de las células NK, el presente estudio tuvo como objetivo explorar si la variabilidad en los genes HLA / KIR puede estar asociado a la variable de respuesta observada con Mab basados en terapias anti-EGFR.

Estos son tiempos emocionantes para el estudio de las células NK; con los recientes avances en el campo de la biología de las células NK y la investigación traslacional, es probable que la inmunoterapia de células NK se moverá a la vanguardia de la inmunoterapia del cáncer sobre los próximos años.

Con el progreso acelerado en la investigación básica y clínica sobre el cáncer, nuevos descubrimientos y tecnologías de gran alcance nos ha permitido implementar un sistema de Medicina de Precisión del Cáncer (CPM) para pacientes con cáncer. Este sistema usa la información sobre genes, proteínas y otras características del cáncer de una persona a fin de determinar una amplia gama de gestión del cáncer, incluyendo el cribado del cáncer, el seguimiento de la recaída / recurrencia, la selección / predicción de medicamentos / tratamientos eficaces, y la inmunoterapia personalizada [83]

## **III. HIPÓTESIS**

Los anticuerpos monoclonales anti EGFR-1 y 2 han demostrado eficacia en el tratamiento del cáncer de colon, mama y cabeza y cuello. Pero en cualquiera de los casos, no todos los pacientes responden de igual forma.

Por otro lado, las células natural killer (NK) son linfocitos con actividad citotóxica contra células infectadas por virus y células tumorales. El reconocimiento de la células NK a las células tumorales se basa fundamentalmente en que dichas células presentan una baja expresión de HLA clase I, expresado con normalidad en todas las células del organismo. Estas células NK expresan receptores "KIR", cuyo ligandos son precisamente las moléculas HLA clase I (ligando de KIR). Y estos receptores KIR podrían tener un papel importante en la respuesta ADCC a través de la cual actúan estos anticuerpos monoclonales anti-EGFR-1 y 2. En la especie humana, existe una gran variabilidad en receptor KIR (genotipos KIR) y polimorfismos de las moléculas HLA tipo I.

Nuestra hipótesis es demostrar si la presencia o ausencia de diferentes genotipos de KIR y sus correspondientes alelos HLA tiene relación con la eficacia del tratamiento con AcMo, y la evolución de la enfermedad. La hipótesis nula es que ninguna combinación KIR-HLA demuestre diferentes respuestas a tratamientos anti-EGFR.





## **IV. OBJETIVOS**

Nuestro objetivo es explorar si la variabilidad genética en el complejo KIR / HLA influye en el tiempo hasta el fracaso del tratamiento (TTF; TTF  $\leq 6$  meses y TTF  $\geq 10$  meses) en pacientes tratados con AcMo anti-EGFR en tres tumores sólidos (trastuzumab para cáncer de mama avanzado, o cetuximab para cáncer colorrectal avanzado o cáncer de cabeza y cuello avanzado).



# **V. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS**

## PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Población

Los pacientes incluidos en este estudio (n = 116) fueron reclutados consecutivamente en la Unidad de Gestión Clínica (UGC) de Oncología Médica del Hospital Universitario Reina Sofía, en el período comprendido entre Junio del 2013 y Octubre del 2015. Dicho estudio fue aprobado previamente por el Comité Ético de nuestro hospital con fecha de 25 de Marzo 2013 ([anexo 1](#)). Para la selección de nuestra población se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

A) Mayor de 18 años.

B) Firmado el consentimiento informado. [Anexo 2](#).

C) Todos los pacientes debían haber sido previamente tratados con tratamiento anti-EGFR (trastuzumab para cáncer de mama avanzado, por lo que todas presentaban Her2 sobrepresado y cetuximab para cáncer de cabeza y cuello o colorrectal avanzado, que en el caso del cáncer de colon, todos los pacientes debían ser KRAS wild-type).

De todos estos pacientes, se seleccionaron aquellos que habían progresado antes de seis meses de tratamiento con AcMo anti-EGFR (TTF corto,  $TTF \leq 6m$ , n = 19) o después de diez meses (TTF largo,  $TTF \geq 10m$ , n = 20), estableciendo dos fenotipos extremos de respuesta  $TTF \leq 6m$  y  $TTF \geq 10m$ ). Estos dos grupos de análisis se establecen teniendo en cuenta el tiempo mediano hasta la progresión publicado en brazos de control y tratamiento en los estudios pivotaes[84, 85].

Como podemos observar en la tabla 1, la muestra seleccionada para el análisis de los datos era representativa al resto de nuestra población.

Tabla 1. Características de los pacientes en la población global y en nuestra muestra de pacientes seleccionada.

Características		TOTAL de ptes (n=116)	NUESTRA MUESTRA (n=39)
Género	Mujeres	61 (52,6%)	23 (59%)
	Hombres	55 (47,4)	16 (41%)
Tumor 1º	Mama	39 (33,6%)	15 (38,5%)
	Colon	55 (47,4%)	16 (41%)
	CyC	22 (19%)	8 (20,5%)
Grado	1	5 (4,3%)	0 (0%)
	2	61 (52,6%)	21 (53,8%)
	3	34 (29,3%)	10 (25,6%)
	X	16 (13,8%)	7 (17,9%)
Edad media al dx 1º		58,43	57,54
Edad media al dx M1		59,88	58,97

En cuanto al cáncer de mama se incluyeron pacientes con receptores de estrógeno y progesterona positivos y negativos. De forma global e incluyendo los tres tipos de tumores el grado de diferenciación histológica predominante fue el grado 2.

## 2. Métodos

### 2.1. Extracción y purificación de ADN

La extracción y purificación del ADN se ha realizado a partir de muestras de sangre periférica anticoagulada con ACD, previamente almacenadas a 4°C, utilizando el kit Maxwell® 16 Blood DNA Purification System (Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road Madison, WI 53711-5399 USA) junto con el Maxwell® 16 Instrument.

El kit de purificación está compuesto por cartuchos con diferentes canales en los que se incluyen el tampón de lisis, las partículas paramagnéticas y el tampón de lavado. Las partículas paramagnéticas de sílice permiten optimizar la captura del material de partida para su posterior lavado y elución. Con este método se consigue ADN apto para su uso en técnicas de amplificación estándar.

Para la extracción se parte de un volumen inicial de 400 µl de sangre periférica por muestra, que se añadió en el canal del cartucho que contiene el tampón de lisis. El volumen de tampón de elución usado fue de 400 µl por muestra. Una vez finalizada la extracción se esperó 2 minutos para atrapar en un imán las partículas paramagnéticas de los tubos de elución. De cada tubo de elución se almacenó 300 µl de ADN extraído en eppendorf a una temperatura de 4°C hasta su posterior uso. Una vez completado el estudio, se conservó la muestra restante a -40°C.

## **2.2. Genotipaje KIR**

### **2.2.1. Amplificación por PCR-SSP**

La determinación del tipaje KIR de las muestras de ADN extraído se realizó utilizando el KIR Genotyping SSP Kit (Invitrogen Corporation, 9099 N. Deerbrook Trail, Brown Deer, WI 53223 USA).

Este kit es un método basado en la PCR diseñado para detectar la presencia y/o ausencia de genes KIR de muestras de ADN mediante el uso de primers específicos de secuencia (SSP). Este método consiste en una mezcla de primers en el que una primera pareja de primers amplifica genes y/o alelos específicamente, mientras que una segunda pareja de primers amplifica secuencias no alélicas de las muestras y actúa como control interno del proceso de amplificación.

El tipaje se llevó a cabo añadiendo al tampón de PCR, que contiene el tampón de carga y los dNTPs, 133  $\mu$ l de agua y 1,8  $\mu$ l de Taq DNA polimerasa 5 U/ $\mu$ l (Industrial GMP Grade, Roche). Posteriormente se agitó la mezcla de PCR con Vortex, y de ésta se añadieron 10  $\mu$ l al pocillo 22 (control negativo) de la placa de PCR. A la mezcla de PCR se añadieron 50  $\mu$ l de ADN extraído por muestra y se homogeneizó mediante Vortex. De esta mezcla se añadió 10  $\mu$ l a los pocillos del 1 al 21 correspondientes a los primers específicos para los genes y/o alelos KIR. Una vez añadido el reactivo a todos los pocillos se selló la placa con el adhesivo y se realizó la reacción de amplificación con los siguientes parámetros:



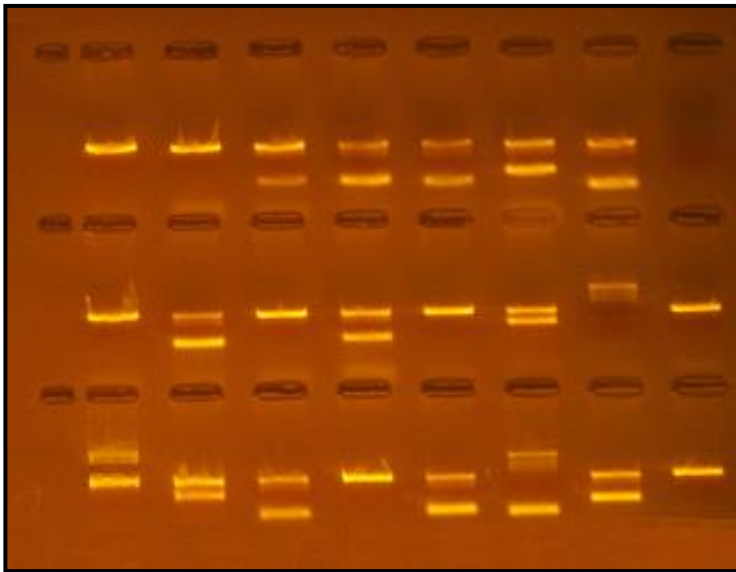
<b>Pasos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Duración (segundos)</b>	<b>Acción</b>
Desnaturalización inicial	95	60	Desnaturalización
30 ciclos	94	20	Desnaturalización
	63	20	Alineamiento
	72	90	Extensión

### 2.2.2. Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó el gel de agarosa al 2% añadiendo en un matraz 100 ml de tampón TAE 1x (0.04 M Tris Base, 0.04 M acetato, 0.001 M EDTA, pH 8) y 2 gramos de agarosa (MetaPhor Agarose, Lonza). Se agitó la mezcla y se calentó en microondas hasta punto de ebullición durante 75 segundos. A la mezcla se le añadió 100 µl de bromuro de etidio diluido y se dejó enfriar sobre la cama de electroforesis durante 30 minutos. Una vez solidificado el gel se cargó cada carril con 8 µl de cada pocillo de la placa de PCR y se dejó correr la electroforesis durante 10 minutos. Por último se fotografió el gel en un transiluminador UV de 312 nm y se analizó la imagen obtenida.

### 2.2.3. Imágenes de electroforesis en gel de agarosa

a) Imagen 1:



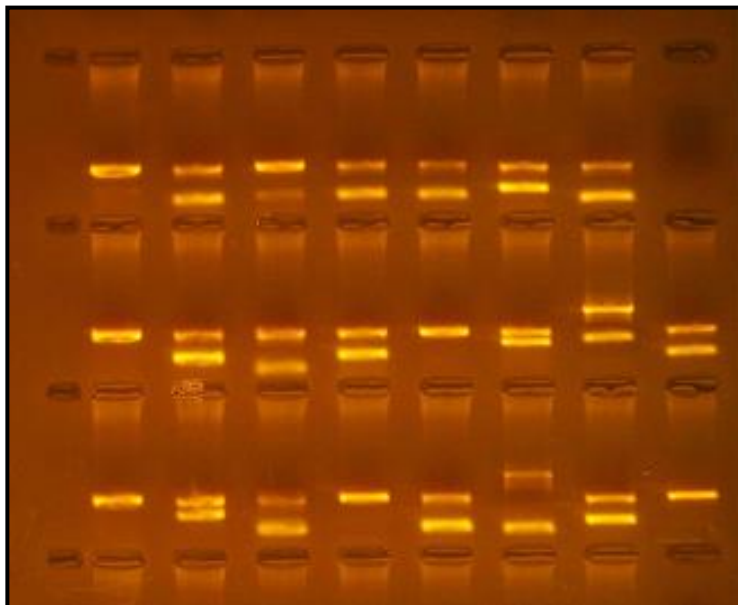
Calles con bandas específicas; 2, 3, 4, 5, 6, 11, 13, 15, 18, 19, 20, 22, 23 y 24; Calle 1 control negativo; Control interno calles 2-9, 11-18 y 20-24 con banda de 430 bp y calles 10 y 19 800 bp

Genes KIR presentes: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DS2, 2DS4, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DP1, 3DP1

Genes KIR ausentes: 2DL5, 2DS1, 2DS3, 2DS5, 3DS1

Corresponde a un genotipo del grupo Bx4

d) Imagen 2:



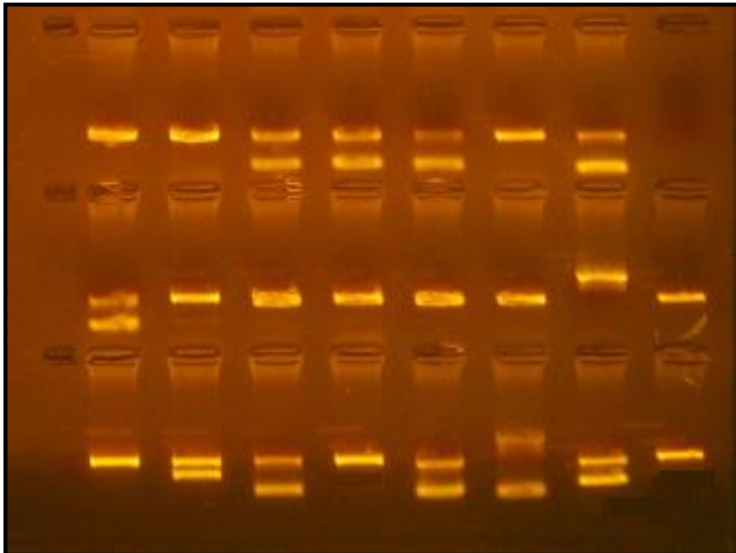
Calles con bandas específicas; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 22 y 23 ; Calle 1 control negativo; Control interno calles 2-9, 11-18 y 20-24 con banda de 430 bp y calles 10 y 19 con banda de 800 bp

Genes KIR presentes: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DP1, 3DP1

Genes KIR ausentes: 2DS1, 2DS5, 3DS1

Corresponde a un genotipo del grupo Bx5

e) Imagen 3:



Calles con bandas específicas; 2, 4, 5, 6, 16, 18, 19, 20, 22 y 23 ;  
Calle 1 control negativo; Control interno calles 2-9, 11-18 y 20-24 con banda de 430 bp y calles 10 y 19 con banda de 800 bp

Genes KIR presentes: 2DL1, 2DL3, 2DL4, 2DS4, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DP1, 3DP1

Genes KIR ausentes: 2DL2, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 3DS1

Corresponde a un genotipo del grupo AA-1

### 2.3. Tipaje HLA: Amplificación por PCR-SSO

El tipaje de las moléculas de histocompatibilidad de clase I: HLA- A, HLA-B y HLA-C se realizó utilizando los kits INNO-LiPA HLA-A Multiplex, INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus y INNO-LiPA HLA-C Amplification, respectivamente. Se realizó el tipaje de HLA-B para discriminar los alelos Bw4 y Bw6 y HLA-C para subclassificar estos alelos en C1 y C2. El tipaje HLA-A se realizó a aquellos pacientes que eran Bw6 homocigotos para descartar que tuvieran algún alelo HLA-A que presente Bw4.

Estos kits están basados en la técnica de PCR-SSO que permite la amplificación de la región génica HLA y su hibridación posterior con oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO).

Los cebadores aparean con regiones conservadas del HLA dando lugar a amplicones biotinilados que posteriormente hibridan con sus respectivas sondas y que permiten su visualización acoplada a una reacción colorimétrica.

El tipaje se realizó con los siguientes volúmenes por cada muestra: 10 µl de solución primer (específicos para HLA-A, B y C dependiendo de lo que se quería amplificar), 10 µl de tampón de amplificación, 1.4 µl de Taq polimerasa (LiPa-Taq), 27 µl de agua y 2 µl de ADN. El procedimiento se llevó a cabo pipeteando en un eppendorf los volúmenes totales de agua, tampón de amplificación, solución primer y Taq polimerasa, en este orden, para todos los pacientes más uno, para asegurarse así tener un volumen suficiente. A continuación se añadió 48 µl de esta mezcla en tubos de PCR, a los que posteriormente se pipetearon 2 µl de ADN, y se lleva a cabo la reacción de amplificación con los siguientes parámetros:

<b>Pasos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Duración (segundos)</b>	<b>Acción</b>
Desnaturalización inicial	96	300	Desnaturalización
5 ciclos	96	30	Desnaturalización
	64	50	Alineamiento
	72	50	Extensión
5 ciclos	96	30	Desnaturalización
	62	50	Alineamiento
	72	50	Extensión
10 ciclos	96	30	Desnaturalización
	60	50	Alineamiento

	72	50	Extensión
15 ciclos	96	30	Desnaturalización
	55	50	Alineamiento
	72	50	Extensión
Extensión final	72	600	Extensión

#### 2.4. Hibridación y detección

La hibridación y revelado de los productos de la PCR se llevó a cabo utilizando los kits INNO-LiPA HLA-A Update, INNO-LiPA HLA-B Update Plus y INNO-LiPA HLA-C, junto con la ayuda del equipo AutoRELI® 48 Instrument.

El proceso de hibridación se produce entre el ADN biotinilado amplificado, que es desnaturalizado químicamente, y las sondas de nucleótidos específicas fijadas en tiras de nailon. Tras un proceso de lavado se añade estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina y se incuba en presencia de los sustratos 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato (BCIP) y 4-nitroazul de tetrazolio (NBT), dando lugar a un precipitado de color púrpura en aquellas zonas donde se ha producido la hibridación.

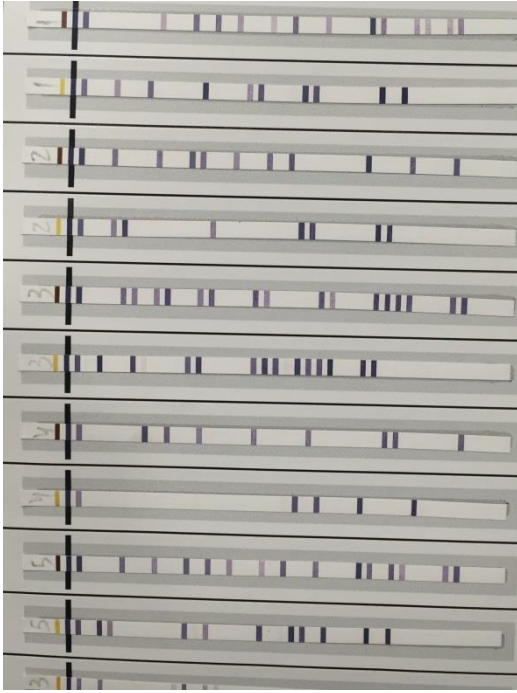
En el inicio del proceso de hibridación y detección, se añade en cada tubo de PCR 35 µl de solución de desnaturalización y se deja actuar durante 5 minutos a temperatura ambiente para que se complete la desnaturalización. A continuación se colocan las tiras de nailon en la bandeja del equipo AutoRELI® 48 y se añaden 20 µl de ADN amplificado desnaturalizado por muestra en cada tira. Posteriormente se preparan los reactivos de conjugado mezclando 2 ml de diluyente específico por muestra más 8 ml en exceso con un volumen cien veces

diluido de reactivo específico concentrado 100x. Para un total de 25 tiras se calcularon los siguientes volúmenes: 58 ml de diluyente de conjugado, 580 µl de conjugado 100x. De igual manera se prepara el sustrato, es decir, 58 ml de tampón de sustrato y 580 µl de sustrato BCIP/NBT 100x. Una vez preparados los reactivos se colocan en sus respectivos canales del equipo y se escoge el programa de hibridación de HLA.

Tube No.		Amplified KIR Gene Types	Size of PCR Product [bp]	Size of IC [bp]	5' primer(s) <sup>1</sup>	3' primer(s) <sup>1</sup>
1	1H	Negative Control	430	-		
2	1G	2DL1	105	430	554 GAC	613 CAC
3	1F	2DL2	200	430	391 TCG	547 TGG
4	1E	2DL3	130	430	1011 CAC	1091 TGC
5	1D	2DL4 norm	140	430	17 AGT	17 CTT
6	1C	2DL4 deleted	135	430	17 AGT	17 CTT
7	1B	2DL5 all	130	430	938 TTC	1011 GAT
8	1A	2DL5 (group 1)	190	430	681 TCA	823 ATT
9	2H	2DL5 (group 2)	190	430	681 TCA	823 ATC
10 <sup>2</sup>	2G	2DL5 expressed	315	800	-105 CCG	11 TCC
11 <sup>3</sup>	2F	2DL5 null	315	430	-98 GTA	11 TCC
12	2E	2DS1	105	430	554 GAA	613 CAA
13	2D	2DS2	195	430	478 GTA	618 AGC
14	2C	2DS3	85	430	512 CAT	554 GCC
15	2B	2DS4 norm	175	430	766 CCA	895 AGC
16	2A	2DS4 (del-22bp)	175	430	766 CCA	895 AGC
17	3H	2DS5	90	430	512 CAT	545 GTG
18 <sup>4</sup>	3G	3DL1	200	430	123 CGA	281 ATG
19	3F	3DL2	120	800	812 CAA	896 GGG
20	3E	3DL3	140	430	563 TGC	652 TAC
21	3D	3DS1	215	430	1146 AGT	1217 TGA
22	3C	2DP1	130	430	556 TGG	644 ATG
23 <sup>5</sup>	3B	(3DP1 variant) 3DP1 norm	(1740) 280	430	30 TGT	223 TAC
24 <sup>6</sup>	3A	3DP1 variant	975	430	56 GGC	223 TAC

Genes KIR tipados con los primers y el tamaño del fragmento específico y el de control interno.





Tipaje HLA de baja resolución (ejemplo de tipaje HLA-B)

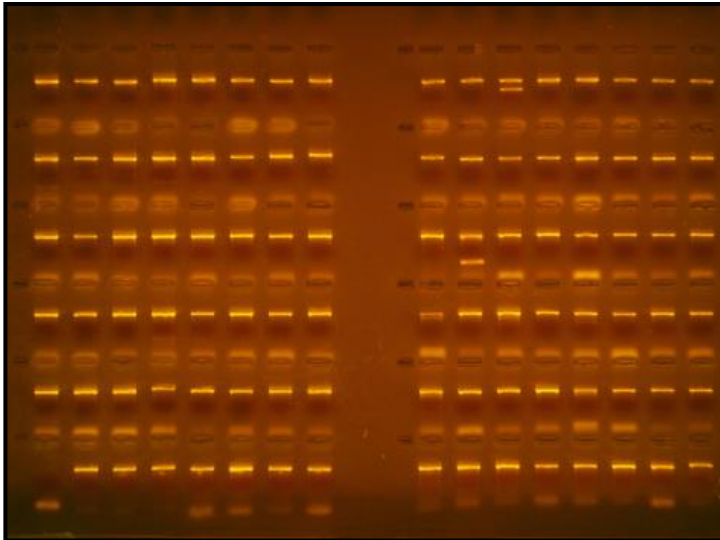
Aquellos casos en los que el tipaje HLA de baja resolución no puede discriminar los 2 alelos, se procederá al tipaje de alta resolución de los mismos.

### 2.5.2. Tipaje HLA clase I de alta resolución:

El método SSP es una técnica basada en PCR que utiliza cebadores específicos de secuencia (Sequence Specific Primers, SSP) para la tipificación de tejidos basada en ADN. La asignación de los alelos se realiza determinando si la amplificación se ha producido o no, es decir, mediante la visualización y la detección de la amplificación por medio de electroforesis en gel de agarosa. En la técnica PCR-SSP, cada par de cebadores identifica dos loci polimórficos cis y enlazados.



a) HLA-A:



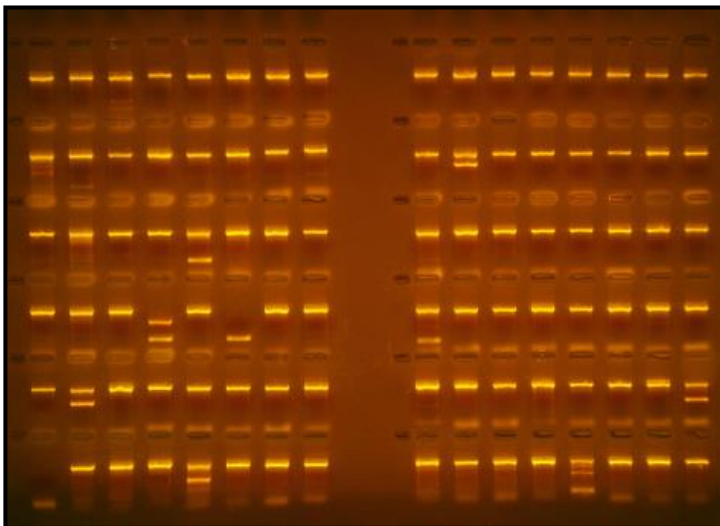
Alelos A\*02:01, A\*11:01

A\*02:01 calle 6 banda de 490 bp

A\*11:01 calle 23 banda de 230 bp;  
A\*11 es el ligando de KIR3DL2

Control interno calles 1-95 banda de 1200 bp. Calle 96 control negativo

b) HLA-B:



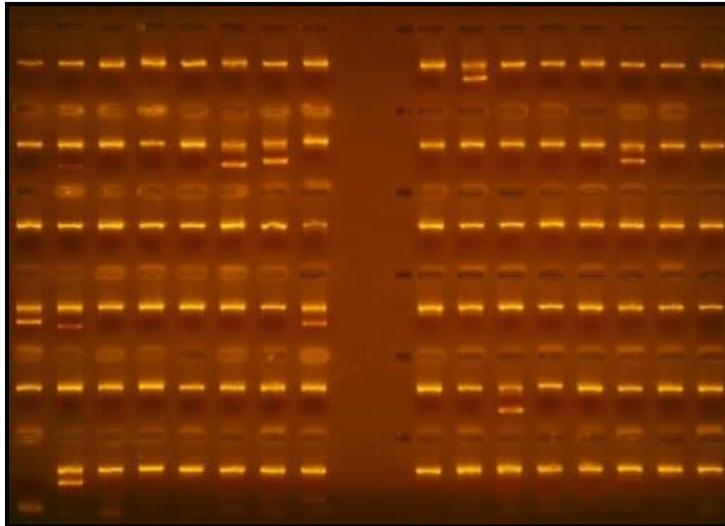
Alelos B\*07:06, B\*15:16

B\*07:06 calle 15 banda de 670 bp,  
calle 32 banda de 125 bp, calle 44  
bandas de 100 y 535 bp, calle 68  
banda de 215 bp, calle 77 banda de  
705 bp y calle 87 banda de 525 bp

B\*15:16 calle 33 banda de 435 bp,  
calle 44 bandas de 100 y 535 bp y  
calle 92 banda de 480 bp; B\*15:16  
(corresponde a la denominación de  
la proteína B63 (15) que presenta la  
especificidad Bw4 que es ligando  
de KIR3DL1

Control interno calles 1-74, 76 y 78-95 banda de 1200 bp y calles 75 y 77 banda de 200 bp. Calle 96 control negativo

c) HLA-C:



Alelos C\*07:02, C\*15:02

C\*07:02 calle 38 banda de 305 bp, calle 73 banda de 490 bp, calle 79 banda de 405 bp; pertenece al grupo C1 que es ligando de KIR2DL2 y KIR2DL3

C\*15:02 calle 7 banda de 605 bp, calle 11 banda de 510 bp, calle 58 banda de 430 bp calle 59 banda de 395 bp, calle 80 banda de 535 bp y calle 95 banda de 595 bp; pertenece al grupo C2 que es ligando de KIR2DL1 y KIR2DS1

Control interno calles 1-95 banda de 1200 bp. Calle 96 control negativo

### 3. Análisis estadístico

El número de pacientes a incluir en el análisis para encontrar diferencias de al menos 30% entre los grupos  $TTF \leq 6m$  y  $TTF \geq 10m$ , considerando una frecuencia mínima de 30% para los polimorfismos KIR fue de 33 pacientes con un nivel de confianza del 95% y un poder estadístico del 80%.

Se utilizaron exámenes de Chi-cuadrado y Fisher para examinar la asociación entre dos variables categóricas (es decir, los pares de KIRs / HLA versus la duración del tratamiento anti-EGFR ( $\leq 6$  o  $\geq 10$  meses)). Para las variables de tiempo (duración del tratamiento) se utilizaron las pruebas de Kaplan Meier y log-rang, y se consideró que la significación estadística era un valor de p de dos colas  $< 0,05$  y un valor de p de 0,05 a 0,1 como marginalmente estadísticamente significativo. Debido al carácter exploratorio de este estudio, no se realizó ajuste de multiplicidad para las pruebas de significación, utilizando el programa SPSS.

Definición de las variables utilizadas en el análisis estadístico:

VARIABLES	CARACTERÍSTICAS
Género	Cualitativa dicotómica (mujer/hombre)
Edad diagnóstico del 1º	Cuantitativa continua (años)
Edad diagnóstico de M1	Cuantitativa continua (años)
Edad inicio de AcMo	Cuantitativa continua (años)
Peso	Cuantitativa continua (kg)
Talla	Cuantitativa continua (cm)
Tumor primario	Cualitativa (mama/colon/CyC)
Grado	Cualitativa (G1/G2/G3/Gx)
RE	Cualitativa (+/-/desconocido)
K67	Cuantitativa continua
Her2	Cualitativa (+/-/desconocido)
KRAS	Cualitativa (WT/mutado/desconocido)
RP	Cualitativa (+/-/desconocido)
Fecha dx 1º	dd-mmm-aaaa
Fecha dx M1	dd-mmm-aaaa
Localización de las M1	Cualitativa
Trastuzumab	Cualitativa dicotómica (si/no)
Cetuximab	Cualitativa dicotómica (si/no)
Esquema de tratamiento	Cualitativa
Fecha inicio de esquema	dd-mmm-aaaa
Fecha fin de esquema	dd-mmm-aaaa
Suspensión de esquema	Cualitativa dicotómica (si/no)
Progresión del esquema	Cualitativa dicotómica (si/no)
Motivo suspensión del esquema	Cualitativa (toxicidad/progresión/éxitus/NV)
Respuesta a esquema	Cualitativa (RC/RP/EE/PR/Progresión/NV)
Localización de respuesta	Cualitativa
Toxicidad a AcMo	Cualitativa dicotómica (si/no)
Trastuzumab monoterapia	Cualitativa dicotómica (si/no)

Cetuximab monoterapia	Cualitativa dicotómica (si/no)
Inicio AcMo monoterapia	dd-mmm-aaaa
Fin AcMo monoterapia	dd-mmm-aaaa
Suspensión AcMo monoterapia	Cualitativa dicotómica (si/no)
Progresión AcMo monoterapia	Cualitativa dicotómica (si/no)
Ptogresión a AcMo	Cualitativa dicotómica (si/no)
Motivo de suspensión AcMo monoterapia	Cualitativa (toxicidad/progresión/éxito/NV)
FUV	dd-mmm-aaaa
Éxito	Cualitativa dicotómica (si/no)
Fecha de éxito	dd-mmm-aaaa
Supervivencia global (SG)	Cuantitativa continua
TTF AcMo	Cuantitativa continua
TTF global	Cuantitativa continua
TTF_6_10	Cualitativa (<6m/6-10m/>10m)
KIR	Cualitativa dicotómica (si/no)
HLA	Cualitativa dicotómica (si/no)

CyC: cabeza y cuello

#### 4. Material Bibliográfico

Para la revisión bibliográfica se usó la web (<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) conocida como PUBMED y el motor de búsqueda MEDLINE ofrecido por la Biblioteca nacional de los Estados Unidos; utilizándose varias entradas, palabras clave o encabezamientos MeSH del Index Medicus. Se empleó a su vez el proveedor de información Ovid Technologies al que se accede a través del Ovid Web Gateway y la biblioteca virtual Scielo formada por una colección de revistas científicas españolas de ciencias de la salud seleccionadas de acuerdo a unos criterios de

calidad preestablecidos. Todas estas plataformas utilizadas junto con la consulta directa de determinadas revistas científicas se realizó a través de la Biblioteca Virtual del Servicio de Salud Público de Andalucía (SSPA) (<http://www.bvsspa.es/profesionales/>).

Las referencias aparecen presentadas con el estilo o normas de Vancouver para la publicación de manuscritos en el ámbito de las Ciencias de la Salud.

El protocolo y todas las enmiendas de este estudio fueron presentadas y aprobadas por el Comité de Ética e Investigación del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba (25 de marzo de 2013).



## **VI. RESULTADOS**

### Características de la población

Se reclutaron 116 pacientes, todos ellos debían haber sido tratados con tratamiento anti-EGFR (trastuzumab para cáncer de mama avanzado, por lo que todas presentaban Her2 sobrepresado y cetuximab para cáncer de cabeza y cuello o colorrectal avanzado, que en el caso del cáncer de colon, todos los pacientes debían ser KRAS wild-type); y de éstos, se seleccionaron aquellos que habían progresado antes de seis meses de tratamiento con AcMo anti-EGFR (TTF corto, TTF  $\leq$  6m, n = 19) o después de diez meses (TTF largo, TTF  $\geq$  10m, n = 20), estableciendo dos fenotipos extremos de respuesta TTF  $\leq$  6m y TTF  $\geq$  10m). Estos dos grupos de análisis se establecen teniendo en cuenta el tiempo mediano hasta la progresión publicado en brazos de control y tratamiento en los estudios pivotaes.

A continuación mostramos la frecuencia de presentación de los diferentes KIR y HLA en la muestra seleccionada contrastada con las frecuencias de la población global, que al igual que en el caso anterior, la muestra seleccionada vuelve a ser representativa de la población global.

**Tabla 2. Presentación de KIR en la población general y en nuestra muestra seleccionada.**

KIR		n=116	n=39
3DL3	Mama	39 (100%)	15 (100%)
	Colon	55 (100%)	16 (100%)
	CyC	22 (100%)	8 (100%)
2DL2	Mama	30 (76´9%)	13 (86´7%)
	Colon	31 (56´4%)	7 (43´8%)



	CyC	15 (68'2%)	5 (62'5%)
2DL3	Mama	34 (87'2%)	12 (80%)
	Colon	53 (96'4%)	15 (93'8%)
	CyC	20 (90'9%)	8 (100%)
2DL5	Mama	29 (74'4%)	10 /66'7%)
	Colon	35 (63'6%)	10 (62'5%)
	CyC	12 (54'5%)	3 (37'5%)
2DL1	Mama	35 (89'7%)	13 (86'7%)
	Colon	54 (98'2%)	15 (93'8%)
	CyC	22 (100%)	8 (100%)
3DL1	Mama	33 (84'6%)	12 (80%)
	Colon	50 (90'9%)	15 (93.8%)
	CyC	22 (100%)	8 (100%)
3DL2	Mama	39 (100%)	15 (100%)
	Colon	55 (2100%)	16 (100%)
	CyC	22 (100%)	8 (100%)
2DS2	Mama	30 (76'9%)	13 (86'7%)
	Colon	32 (58'2%)	7 (43'8%)
	CyC	15 (68'2%)	5 (62'5%)
2DS4	Mama	34 (87'2%)	13 (86'7%)
	Colon	50 (90'9%)	15 (93'8%)
	CyC	22 (100%)	8 (100%)
2DS1	Mama	22 (56'4%)	10 (66'7%)
	Colon	25 (45'5%)	9 (56'3%)
	CyC	5 (22'7%)	2 (25%)
2DS5	Mama	16 (41%)	8 (53'3%)
	Colon	19 (34'5%)	9 (56'3%)
	CyC	4 (18'2%)	2 (25%)
3DS1	Mama	22 (56'4%)	10 (66'7%)
	Colon	25 (45'5%)	9 (56'3%)

	CyC	4 (18'2%)	1 (12'5%)
2DS3	Mama	20 (51'3%)	5 (33'3%)
	Colon	19 (34'5%)	4 (25%)
	CyC	9 (40'9%)	2 (25%)
2DL4	Mama	39 (100%)	15 (100%)
	Colon	55 (100%)	16 (100%)
	CyC	22 (100%)	8 (100%)
2DP1	Mama	35 (89'7%)	13 (86'7%)
	Colon	54 (98'2%)	15 (93'8%)
	CyC	21 (95'5%)	7 (87'5%)
3DP1	Mama	39 (100%)	15 (100%)
	Colon	55 (100%)	16 (100%)
	CyC	22 (100%)	8 (100%)

CyC: cabeza y cuello

**Tabla 3. Presentación de HLA en la población general y en nuestra muestra seleccionada.**

HLA	n=116	n=39
HLA-B Mama	w4w4	4 (26'7%)
	w4w6	10 (66'7%)
	w6w6	1 (6'7%)
HLA-B Colon	w4w4	3 (18'8%)
	w4w6	11 (68'8%)
	w6w6	2 (12'5%)
HLA-B CyC	w4w4	2 (25%)
	w4w6	4 (50%)
	w6w6	2 (25%)
HLA-C Mama	C1C1	3 (20%)
	C1C2	8 (53'3%)

	C2C2		7 (17'9%)	4 (26'7%)
HLA-C Colon	C1C1		18 (32'7%)	4 (25%)
	C1C2		27 (49'1%)	9 (56'3%)
	C2C2		10 (18'2%)	3 (18'8%)
HLA-C CyC	C1C1		7 (31'8%)	2 (25%)
	C1C2		10 (45'5%)	4 (50%)
	C2C2		5 (22'7%)	2 (25%)
HLA-C04	Mama		10 (25'6%)	6 (40%)
	Colon		10 (18'2%)	6 (37'5%)
	CyC		31 (13'6%)	2 (25%)

CyC: cabeza y cuello

Las características de los pacientes seleccionados para el análisis de datos con los grupos extremos a tiempo al fallo de tratamiento se encuentran en la Tabla 4. En concreto, se analizaron los datos de 15 pacientes con cáncer de mama, 16 con cáncer colorrectal y 8 con cáncer de cabeza y cuello.

**Tabla 4. Características de los pacientes de acuerdo con el tiempo hasta el fracaso del tratamiento (TTF ≤ 6 meses o ≥ 10 meses)**

		TTF	
		≤ 6 meses	≥ 10 meses
<b>Género</b>	Mujeres	10 (43.48%)	13 (56.52%)
	Hombre	10 (62.5%)	6 (37.5%)
<b>Tumor primario</b>	Mama	5 (33.33%)	10 (66.67%)
	Colon	10 (62.5%)	6 (37.5%)
	Cabeza y Cuello	5 (62.5%)	3 (37.5%)
<b>Mediana de edad al diagnóstico del Tumor Primario</b>		59	59
<b>Mediana de edad al diagnóstico de la enfermedad metastásica</b>		59	59

<b>Grado</b>	2	13 (61.9%)	8 (38.1%)	
	3	5 (50%)	5 (50%)	
	Desconocido	2 (25%)	6 (75%)	
<b>Cáncer de mama</b>	<b>*ER</b>	+	5 (55.56%)	4 (44.44%)
		-	0 (0%)	6 (100%)
	<b>**PR</b>	+	5 (55.56%)	4 (44.44%)
		-	0 (0%)	6 (100%)
	<b>HER2</b>	Sobreexpresado	5 (33.33%)	10 (66.67%)
		No sobreexpresado	0 (0%)	0(0%)
<b>Cáncer de colon</b>	<b>***RAS</b>	Wild-type	10 (62.5%)	6 (37.5%)
		Mutado	0(0%)	0(0%)

## 2. Genotipos KIR y polimorfismos de ligandos HLA

Tabla 5 (A, B y C) enumera todos los genes KIR inhibidores y activadores además de pseudogenes evaluados en este estudio, categorizados de igual forma según el TTF (<6 meses vs > 6 meses); después de analizar las frecuencias en los dos grupos, no se observaron diferencias significativas en los genes inhibidores, activadores y pseudogenes KIR.

**Tabla 5A. Listas de todos los genes KIR inhibidores (a), activadores (b) y pseudogenes (c) KIR de acuerdo con el tiempo hasta el fallo del tratamiento (TTF≤6 meses o ≥ 10 meses)**

a) Genes KIR inhibidores:

Presencia de genes KIR inhibidores		TTF < 6 meses	TTF > 10 meses
2DL1	si	18 (50%)	18 (50%)
	No	2 (66.7%)	1 (33.3%)
2DL2	si	12 (48%)	13 (52%)
	No	8 (57.1%)	6 (42.9%)
2DL3	si	18 (51.4%)	17 (48.6%)
	No	2 (50%)	2 (50%)
2DL5	si	10 (43.5%)	13 (56.5%)
	No	10 (62.5%)	6 (37.5%)
3DL1	si	19 (54.3%)	16 (45.7%)
	No	1 (25%)	3 (75%)
3DL2*	si	20 (51.3%)	19 (48.7%)
	No	0	0
3DL3*	si	20 (51.3%)	19 (48.7%)
	no	0	0
2DL4*	si	20 (51.3%)	19 (48.7%)
	No	0	0

\*Presencia en el 100% de la población

b) Genes KIR activadores:

Presencia de genes KIR activadores		TTF ≤ 6 meses	TTF ≥ 10 meses
2DS1	si	9 (42.9%)	12 (57.1%)
	No	11 (61.1%)	7 (38.9%)
2DS2	si	12 (48%)	13 (52%)
	No	8 (57.1%)	6 (42.9%)
2DS3	si	3 (27.3%)	8 (72.7%)
	No	17 (60.7%)	11 (39.3%)
2DS4	si	19 (52.8%)	17 (47.2%)
	No	1 (33.3%)	2 (66.7%)
2DS5	si	9 (47.4%)	10 (52.6%)
	No	11 (55%)	9 (45%)

3DS1	si	9 (45%)	11 (55%)
	No	11 (57.9%)	8 (42.1%)
2DL4*	si	20 (51.3%)	19 (48.7%)
	No	0	0

\*Presencia en el 100% de la población

c) Pseudogenes KIR

Presencia de Pseudogenes KIR		TTF $\leq 6$ meses	TTF $\geq 10$ meses
2DP1	si	18 (51.4%)	17 (48.6%)
	no	2 (50%)	2 (50%)
3DP1*	si	20 (51.3%)	19 (48.7%)
	No	0	0

\*Presencia en el 100% de la población

Según se espera, los genes KIR, KIR2DL4, KIR3DL2, KIR3DL3 y KIR3DP1 estaban presentes en todos los pacientes entre los grupos tal y como ocurre en la población general, lo que sugiere un correcto control interno. Table 2B muestra los ligandos HLA (HLA-C1, HLA-C2, HLABw4 o HLABw6) y la correspondiente distribuciones de frecuencia de tomar en cuenta el tiempo hasta el fracaso del tratamiento (TFT  $\leq 6$  o  $\geq 10$  meses).

**Tabla 5B. HLA de acuerdo con el tiempo hasta el fracaso del tratamiento (TTF ≤6 meses o ≥ 10 meses)**

HLA	TTF ≤6 meses	TTF ≥10 meses
HLA-B		
w4w	3 (33.3%)	6 (66.7%)
w4w6	13 (52%)	12 (48%)
w6w6	4 (80%)	1 (20%)
HLA-C		
C1C1	7 (77.8%)	2 (22.2%)
C1C2	8 (38%)	13 (62%)
C2C2	5 (55.5%)	4 (44.5%)

Se analizaron las frecuencias de los ligandos de HLA de clase I de los KIR (Bw4, C1 y C2, en la homocigosidad y heterocigosidad). Como ya se ha descrito, los diferentes grupos (Bw4 / Bw4, Bw4 BW6 / o Bw6 / Bw6 para HLA-B y C1 / C1, C1 / C2 y C2C2 para HLA-C) se definieron en base al estado homocigoto o heterocigoto. Se observaron diferencias no significativas en la frecuencia entre los dos grupos (TTF ≤6m o ≥10m).

### 3. Combinaciones de KIR-ligando HLA

Las combinaciones activadoras e inhibitoras de los diferentes genotipos KIR y sus ligandos HLA se muestra en la Tabla 3. Se exploró el TTF según estas combinaciones KIR-HLA-ligando.

**Tabla 6. Combinaciones activadoras e inhibitoras de los diferentes genotipos KIR y sus ligandos HLA de acuerdo con el tiempo hasta el fracaso del tratamiento (TTF ≤ 6 meses o ≥ 10 meses)**

<b>Presencia de combinaciones activadoras KIR/HLA</b>	<b>TTF ≤ 6 months</b>	<b>TTF ≥ 10 months</b>	<b>P</b>
KIR 2DS1-HLA C2C2 o C1C2			
si	6 (28.6%)	15 (71.4%)	p=0.002
no	14 (77.8%)	4 (22.2%)	
KIR 2DS2-HLA C1C1 o C1C2			
si	9 (45%)	11 (55%)	p=0.42
no	11 (57.9%)	8 (42.1%)	
KIR 3DS1-HLAB w4w4 o Bw4w6			
si	6 (35.3%)	11 (64.7%)	p=0.079
no	14 (63.6%)	8 (36.4%)	



Presencia de combinaciones inhibitorias KIR/HLA	TTF ≤ 6 months	TTF ≥ 10 months	P
2DL1-HLA C2C2 o C1C2			
si	14 (48.3%)	15 (51.7%)	p=0.52
no	6 (60%)	4 (40%)	
2DL2-HLA C1C1 o C1C2			
si	9 (45%)	11 (55%)	p=0.42
no	11 (57.9%)	8 (42.1%)	
2DL3-HLA C1C1 o C1C2			
si	14 (50%)	14 (50%)	p=0.79
no	6 (54.5%)	5 (45.5%)	
3DL1-HLA Bw4w4 o Bw4w6			
si	16 (51.6%)	15 (48.4%)	p=0.93
no	4 (50%)	4 (50%)	

#### 4. Asociaciones de dos genotipos activadores KIR con sus ligandos con impacto en tiempo a fallo de tratamiento (TTF)

Se encontró una asociación significativa entre las combinaciones de activadores KIR2DS1 / HLAC2C2-C1C2 con las TTF > 10 meses ( $p = 0,002$ ) y una tendencia estadística dentro KIR3DS1 / HLABw4w4-w4w6 con las TTF > 10 meses ( $p = 0,079$ ). Curiosamente, los sujetos que llevan estas dos combinaciones de activadores mostraron TTF ya que los no portadores; KIR2DS1 / HLAC2C2-C1C2, TTF: 14,76 vs 3,73 meses ( $p < 0,001$ ) (Figura 1) y

KIR3DS1 / HLABw4w4-w4w6, TTF: 14,93 vs 4,6 meses ( $p = 0,005$ ) (Figura 2)  
.Con 2DS1, la diferencia sólo se observó cuando el ligando era C1C2; Del mismo modo, lo mismo ocurre con 3DS1 con sus ligandos (sólo se diferencian de heterocigotos).

**Fig 1. Tiempo al fracaso del tratamiento (TTF) de acuerdo con el genotipo 2DS1 y sus ligandos**

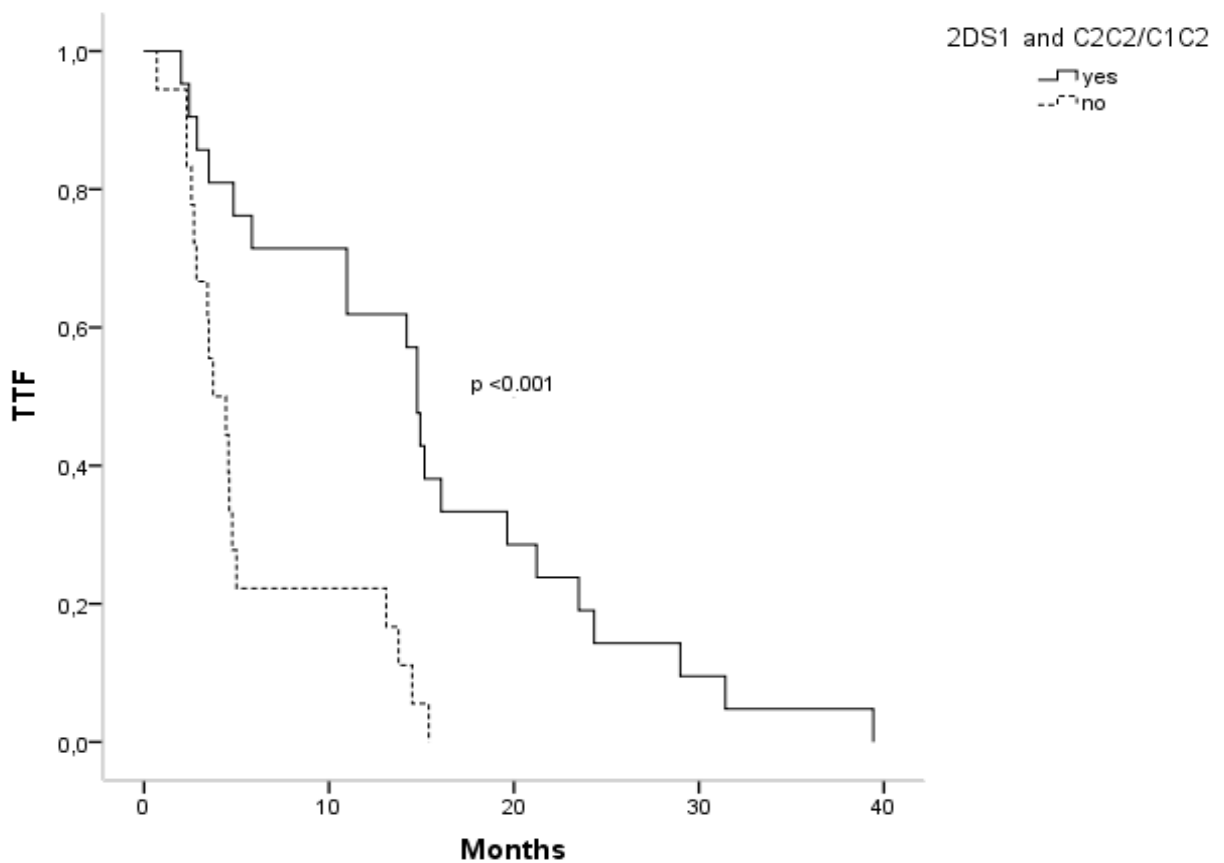
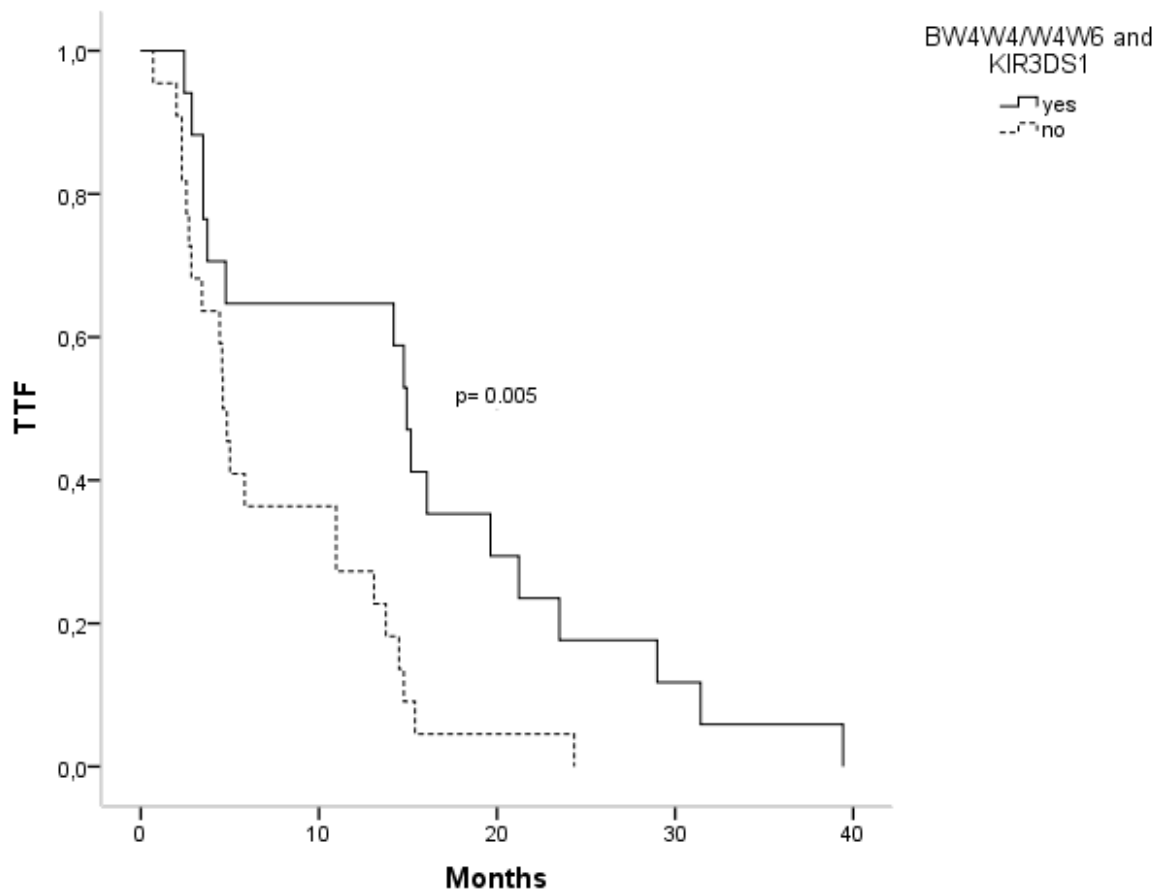


Fig 2. Tiempo al fracaso del tratamiento (TTF) de acuerdo con los genotipos 3DS1 y sus ligandos





## **VII. DISCUSIÓN**

Nuestros resultados demuestran que la activación de dos combinaciones de KIR y sus ligandos HLA predicen un TTF mayor en los pacientes tratados con anticuerpos monoclonales del tipo anti-EGFR. En concreto, los sujetos portadores de la combinación KIR2DS1 / HLAC2C2-C1C2 y KIR3DS1 / HLABw4w4-w4w6 mostraron un mayor TTF que los no portadores. Estos resultados aumentan el conocimiento sobre el papel de ciertas variantes específicas de KIR y su relación con la capacidad de respuesta al tratamiento anti-EGFR en tumores sólidos.

La mayoría de la mortalidad relacionada con el cáncer es a causa de la metástasis de las células tumorales originales hacia sitios distantes del tumor inicial o primario, siendo el cáncer metastásico una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Por ello, la investigación dirigida a esta patología en estadios avanzados de la enfermedad, sigue siendo de gran interés científico, ya que además, la incidencia de esta enfermedad sigue aumentando.

Como ya sabemos, uno de los grandes avances en el tratamiento del cáncer en enfermedad avanzada, es la llegada de las terapias diana, entre las que se encuentran los anticuerpos monoclonales, siendo los anti-EGFR unos de los más ampliamente conocidos (como el trastuzumab y cetuximab).

Como ya se sabe, el trastuzumab destruye a las células tumorales mediante varios mecanismos, incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)[86]. En este contexto, existen varias estrategias que mejoran la actividad de la ADCC, incluyendo las mediadas por las células NK, que pueden mejorar la eficacia de trastuzumab. Kohrt y cols. demostraron en un interesante estudio que al interaccionar trastuzumab con la célula de cáncer de

mama con sobreexpresión de HER2, se activan las células NK humanas que expresaban el receptor CD137, molécula cuya función es coestimuladora. A su vez, la activación de CD137 era dependiente de la expresión de FcγRIII en la células NK, producido tanto “in vitro” como en muestra de sangre periférica de mujeres con cáncer de mama con sobreexpresión de HER2 después del tratamiento con trastuzumab. La estimulación de trastuzumab con otro AcMo específico para CD137 (“activador de las células NK”) destruyó a las células del cáncer de mama, incluyendo una línea celular intrínsecamente resistente al trastuzumab, de manera más eficiente, tanto “in vitro” como “in vivo” en xenotransplantes de modelos de cáncer de mama humano. Además, la mejoría de la citotoxicidad se restringió a células tumorales recubiertas de anticuerpo[87]. Esta estrategia de combinación de anticuerpo con un segundo anticuerpo que activa el sistema inmune innato, puede mejorar el efecto terapéutico de los anticuerpos contra el cáncer de mama y otros tumores con sobreexpresión de HER2[88]. En nuestro estudio nos hemos centrado en el análisis de la actividad de las células NK y sus receptores KIR en su acción contra células tumorales en pacientes tratados con AcMo, precisamente por mecanismos, sólo en parte, dependientes de la ADCC. Y como veremos más adelante, combinaciones de estos AcMo con terapias anti-KIR podrían ser estrategias terapéuticas muy interesantes de investigar.

De igual forma se ha intentado estudiar el por qué una gran fracción de los pacientes con cáncer de mama HER2 positivos son o se vuelven resistentes a este tipo de tratamiento anti-HER2. A día de hoy, no hay otros marcadores a utilizar para determinar la sensibilidad al trastuzumab que no sea el propio estado de expresión de HER2. Kute y cols. compararon la capacidad de las células

mononucleares (CMN) normales a las de pacientes con cáncer de mama para destruir a diferentes líneas celulares de cáncer de mama (es decir ADCC, en la presencia o ausencia de trastuzumab). Dicho ensayo demostró que la actividad ADCC es dependiente de la presencia de trastuzumab, el nivel de expresión HER2 en las células y la proporción entre las CMN y las células tumorales. Por lo tanto, debe existir una amplia variedad de actividad ADCC entre individuos normales y pacientes con cáncer de mama con altos y bajos niveles de expresión de HER2. Un interesante mecanismo que podría explicar dichos hallazgos, sería el de la inserción de la granzima B y el enzima caspasa a través de los anticuerpos unidos a polimorfonucleares neutrófilos, destruyendo las células tumorales[89]. Nuestro estudio sugiere que la presencia de un determinado genotipo KIR con su correspondiente molécula HLA, y que esto podría utilizarse como marcador predictivo de respuesta a lo AcMo.

Además de esto, otro mecanismo por el que las células NK pueden activarse es por el aumento de ligandos de receptores activadores, como se observa bajo condiciones de estrés, al igual que si disminuyen los ligandos de receptores inhibidores, observado en las células tumorales o infectadas; pero no será suficiente con conocer los ligandos, sino que es imprescindible conocer los receptores KIR de las NK de cada individuo, tal y como hemos determinado en nuestro estudio, ya que hay que recordar que los genes KIR y HLA se heredan de forma independiente[90]. Se cree que la mayoría de las células inmunes en el microambiente tumoral tiene la capacidad de suprimir las reacciones inmunitarias. La presencia de células inmunes en el entorno del tumor también puede influir en el estado de activación de las células NK, por lo que parece probable que los cambios que se producen en las células NK hayan sido



inducidos principalmente por su encuentro con las células tumorales. La IL-15 ha sido bien descrita como un factor que es necesario para la supervivencia y proliferación de células NK maduras. Esta activación, parece ser un requisito previo para la diferenciación de células NK en células con función reguladora que sugiere un papel de la IL-15 en la maduración de las células NK lo que llevará a la capacidad de producir citoquinas[91].

Como ya hemos dicho con anterioridad, las células NK son linfocitos capaces de reconocer y destruir células tumorales para las cuales la expresión de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC ó HLA) de clase I está alterado[78]. Este reconocimiento se conoce con el nombre de "missing self " o "falta de lo propio" que establece que las células NK preferentemente atacan a las células que no expresan, o tienen baja expresión de estas moléculas[91]. En un principio, por la falta de expresión de CMH las células tumorales escapan del reconocimiento por parte de los linfocitos, pasando a ser reconocidas por las células NK; pero además, precisamente algunos tumores escapan también a la vigilancia inmune de las células NK mediante el aumento de la expresión de moléculas CMH clase I en su superficie.

Por lo tanto, es bien conocido que las células NK exhiben una capacidad para discriminar las células diana (tumorales o infectadas por virus) de las células normales; a este proceso se le conoce como "auto-tolerancia"[92]. Se han descrito diferentes modelos para explicar los mecanismos subyacentes de la auto-tolerancia de las células NK. Uno de ellos podría ser que las células NK son mucho más sensibles a los receptores inhibidores, o lo que es lo mismo, la potencia de los receptores KIR inhibidores es superior a la de los activadores[93]. Y el haber encontrado en nuestro estudio resultados favorables para dos

combinaciones con receptores KIR activadores, apoyan el interés de estos resultados.

Se conocen dos modelos propuestos para explicar la tolerancia adaptativa de las células NK[94]: uno es el modelo de “armado”, el cual propondría que, en ausencia de señales de tales receptores, estas células NK persistan en un estado defectuoso, de baja respuesta, mientras que el modelo de “desarme” sugiere, en cambio, que se impide que las células NK adquieran (o mantengan) plena capacidad de respuesta cuando las interacciones con las células propias son excesivamente estimuladoras, lo cual puede ocurrir cuando las células propias no logran proporcionar suficientes ligandos inhibidores para contrarrestar las señales estimuladoras, conduciéndolas también a un estado funcional anérgico o hiporreactivo; por lo tanto los dos modelos predicen el mismo resultado dando lugar a un estado de hiporreactividad, aunque por mecanismos diferentes [95].

En relación al papel de los receptores KIR inhibidores tenemos mucho más conocimiento que de los KIR activadores[96]; por ello, nuestros resultados, como ya hemos mencionado, al ser con combinaciones de KIR activadores, son de interés. Sabemos que los KIR inhibidores necesitan una “licencia” para poder actuar, lo que depende del HLA y del KIR inhibitorio que presente la célula NK; en este caso, debe presentar un determinado KIR inhibitorio con su correspondiente ligando CMH clase I. De este modo se pueden dar dos situaciones[95]:

- Que la célula NK presente ambas moléculas (un KIR inhibitorio con su ligando de CMH clase I), en cuyo caso la células pasa a estar “licenciada” o funcionante[95].
- Y si no presenta a ambas moléculas (KIR-su ligando), la célula no podrá funcionar (considerando en ambos casos la funcionalidad del receptor de forma aislada, es decir, sin tener en cuenta el resto de receptores KIR que presenta la célula).

Teniendo en cuenta estos supuestos, en el primer caso, considerando que está “licenciada”, la célula actuará o no, dependiendo de la expresión de CMH en la molécula diana (en nuestro caso la célula tumoral):

- Si tiene su correspondiente molécula del CMH, la célula NK no está capacitada para matar al estar el receptor KIR inhibitorio unido a su ligando.
- Si no tiene la molécula del CMH, la NK podrá matar por falta de inhibición (no podrá estar inhibida por faltarle al KIR su ligando).

Los receptores KIR activadores son mucho menos conocidos tanto en su función como en sus ligandos, pero se cree que no requieren “licencia”. Para poder entender bien el funcionamiento de estos receptores activadores nos basaremos en un ejemplo con un receptor KIR activador (2DS1 con su ligando C2): para que la NK sea activa no podrá tener un KIR activador y su ligando en homocigosis (C2C2), ya que en esta situación C2 de alguna manera bloquearía potentemente a la célula NK (mecanismo protector contra la autodestrucción); y en el caso de ser C1C2, podría matar y si es C1C1 no tendría la capacidad de matar (al no tener su ligando). Y si NK es activa, es decir, C1C2, la actividad final dependerá de la molécula CMH que presente la célula tumoral[97]:

- Si tiene C2, es decir, es C1C2, será funcionante y matará (y como ya hemos mencionado, en el caso de ser C2C2 la célula NK queda totalmente inhibida).

Si es C1C1 no matará puesto que el ligando de 2DS1 es C2, y al no estar su ligando no puede actuar.

Por lo tanto, en nuestro caso, en el que todas las células presentan el mismo CMH, la única posibilidad de que el KIR activador 2DS1 actúe sería cuando el CMH tipo I sea C1C2[98].

Otra cosa muy diferente es analizarlo en el modelo alorreactivo, en el que la mejor de las situaciones sería que la NK presentara C1C1 (situación en la que la célula NK es más potente) y la célula diana presentara C1C2 ó C2C2.

En nuestro estudio, al haber analizado dos combinaciones de receptores activadores, los cuales no requieren “licencia” para poder actuar, este dato de si las células están o no licenciadas, no lo hemos analizado. Tenemos en curso el análisis de ver que ocurre con combinaciones de KIR inhibidores “licenciados” y “no licenciados”.

En este contexto, Caroline Sola y cols. analizaron que el bloqueo de las interacciones entre KIR y moléculas HLA constituye una estrategia terapéutica interesante[99]; para ello partían de que anticuerpos monoclonales específicos anti-KIR2DL1/2/3, lirilumab / BMS-986015 / IPH2102, es una IgG4 humana que están siendo desarrollada para el tratamiento de ambas enfermedades hematológicas malignas y tumores sólidos; y el objetivo de este estudio fue desarrollar un modelo preclínico para evaluar la eficacia del lirilumab; este estudio demostró eficacia de lirilumab como agente único en modelos de tumor

con presencia de HLA-Cw3- lo que le haría una excelente herramienta para investigar beneficiosos tratamientos de combinación.

Un proyecto que tenemos pendiente poner en marcha es analizar combinaciones de trastuzumab y lirilumab en líneas celulares de cáncer de mama con diferentes niveles de expresión de Her2.

Si bien poco a poco aumenta la comprensión de la diversidad de interacciones KIR / ligandos HLA, nuestros hallazgos junto el de estudios previos, también sugieren un gran nivel de complejidad. La interacción KIR / HLA de clase I representa un ejemplo de epístasis genética en la que es necesaria para la inducción de la actividad funcional de la presencia de pares de receptor / ligando, mientras que la presencia de uno, pero la ausencia de la otra no es suficiente para influir en la función de células NK. Se está aclarando, sin embargo, que las interacciones entre las extensas combinaciones de polimorfismos KIR y / o sus ligandos HLA pueden alterar la función inmune y así influir en la susceptibilidad a varias enfermedades, incluyendo tumores sólidos y hematológicos[100]. En la mayoría de estos estudios sólo se exploró la asociación entre la presencia de frecuencias KIR / HLA en pacientes con cáncer, con el fin de probar el impacto del estado KIR / HLA en la susceptibilidad del individuo[81]. Sin embargo, a día de hoy, no disponemos de datos de que estas combinaciones puedan servir de marcadores de respuesta a tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-EGFR, tal y como hemos analizado en nuestro estudio.

Un estudio reciente realizado en pacientes con cáncer de colon metastásico demostró que genotipos KIR / HLA ayudan a predecir la supervivencia global al tratamiento con FOLFIRI [82]. En el mismo contexto, es bien conocido el papel

crucial que juegan las células de NK en la facilitación de respuesta a imatinib en pacientes con leucemia crónica fase-mieloide crónica (CML-CP) que no puede ser superado por la posterior intensificación de la terapia; el genotipo KIR puede agregar información pronóstica valiosa para futuros sistemas de puntuación de predicción de referencia en pacientes con CML-CP y facilitar la óptima selección del tratamiento de primera línea [101]. Los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, positivo para los genes KIR2DL2 y KIR2DS2 y homocigotos para el ligando C1 son seis veces más propensos a responder al tratamiento que aquellos con otros genotipos. De acuerdo con esto, los pacientes con el KIR2DL2 + / KIR2DS2 +, C1C1 genotipo sobrevivieron más tiempo que otros [102].

Además sabemos que la actividad de las células NK es controlada por un balance de señales generadas a partir de los receptores inhibidores y activadores de la superficie celular. Por otra parte, algunos de los anticuerpos monoclonales terapéuticos clínicamente aprobados para tratar el cáncer, son considerados para funcionar parcialmente a través de la activación de la ADCC mediada por células NK[103]. Un estudio reciente sugiere que la transferencia de las células NK alogénicas en combinación con un anticuerpo diana contra el cáncer tales como trastuzumab puede representar un enfoque eficaz a la inmunoterapia adoptiva [104]. En este sentido, se encontró que la ADCC mediada por las células NK alogénicas se produjo a pesar de las combinaciones de las células NK y las células dianas de cáncer de mama enfocadas para desencadenar la señalización de KIR inhibitorio. En general, a pesar de la función central de las células NK en las respuestas inmunes del huésped y el hecho de que el sistema de gen HLA / KIR es el principal sistema capaz de modular la función de células NK, se desconoce si estas combinaciones de KIR

/ ligandos HLA pudiera influir en la respuesta a terapias anti-EGFR. Por lo tanto, las células NK que tienen receptores KIR inhibitorios con una avidéz inferior para su ligando HLA (por lo tanto, tienen una disminución de la función inhibidora respecto a otros KIR) y que tiene muchos receptores KIR de activación puede mostrar una citólisis de las células diana mediada por NK. Por lo tanto, nuestros resultados son consistentes con la hipótesis de que la presencia de los KIR de activación (KIR2DS1 / C2 y KIR3DS1 / HLA-Bw4) favorece más TTF después del tratamiento anti-EGFR.

Sin embargo, en este trabajo no se han evidenciado las relaciones entre la presencia / ausencia de KIR inhibidores y TTF, siéndolos KIR inhibidores los mejores conocidos hasta la fecha.

A nivel celular, estos efectos podrían estar mediados por un aumento en la activación de KIR en células NK y ligandos específicos HLA en las células tumorales, lo que puede mejorar la inmunidad mediada por NK tumoral. Otro mecanismo propuesto está relacionado con la presencia de HLA "de novo"; así los tratamientos con AcMo podría favorecer la formación de péptidos dando lugar a complejos péptido / HLA, modificando la función de las células NK en el microambiente tumoral debido al aumento creciente de los activadores de la función de KIR. De la misma manera, es posible que algunos péptidos nuevos o más abundantes de los ya existentes pueden ser presentados por HLA y KIR en el curso del crecimiento del tumor, o incluso formarse debido precisamente al tratamiento con AcMo. En nuestro caso, podría deberse a un predominio de KIR /ligando activadores (2DS1 / C2) en su correspondiente combinación inhibidora KIR / HLA (2DL1 / C2). Estos KIR de activación activan las células NK sensibles o por la aparición de los ya mencionados nuevos péptidos, la posibilidad de que

además de HLA, los KIR activadores tienen otros ligandos ausentes en las células sanas y estaría presente en estas circunstancias, o porque la activación por AcMo, de una respuesta de células NK potente; es bien conocido que cuando NK es muy activo, sus activadores KIR son funcionales[59].

Otro mecanismo de este microambiente hiperactivado es la secreción local de las citocinas IL12 y IL15. Cuando las células NK se activan a través de IL-12 e IL-15, este mecanismo de protección se libera y lisa las células tumorales por 2DS1 [105]. La activación puede iniciarse debido al tratamiento con AcMo (trastuzumab o cetuximab) por vía de NK CD16 y ésta activa otras citocinas como el IFN gamma que pueden activar los macrófagos, que liberan varios mediadores aumentando la actividad NK[105].

Otra cuestión, que es compatible con los resultados observados en nuestro estudio, es el hecho de que 2DS1 se asocia con la homocigosis o heterocigosis C2. Los estudios "in vitro" mostraban que las células NK de donantes con 2DS1/C2C2 no fueron capaces de lisar las células presentadoras cuyo objetivo era C2[106]. Así, los sujetos C2C2 no serían capaz de activar a través del receptor 2DS1, y su activación, como ya mencionamos con anterioridad, se producirá sólo en sujetos C1C2. Además, nuestro estudio encontró que los sujetos 2DS1 / C1C2 tenían un TTF más prolongado (datos no mostrados). En condiciones normales, esta activación de los receptores se inhibe en las células NK para evitar respuesta autoinmune. Sin embargo, existe controversia sobre este mecanismo en la activación bajo condiciones patológicas, incluyendo la progresión tumoral.



Además del posible valor predictivo de los receptores KIR para la respuesta al tratamiento con AcMo, nuestros resultados apoyan el potencial valor terapéutico de la modulación farmacológica de la actividad de KIR, así como la combinación de terapias, por ejemplo, un modulador de KIR podría permitir que Trastuzumab fuera efectivo prácticamente en todos los pacientes y no solo en aquellos con las combinaciones que hemos encontrado, ya que como sabemos por la práctica clínica, el Trastuzumab no es igual de efectivo en todos los pacientes.

En nuestro estudio, se analizaron los datos de 15 pacientes con cáncer de mama, 16 con cáncer colorrectal y 8 con cáncer de cabeza y cuello; a pesar de ser una muestra heterogénea, todos ellos habían recibido o estaban recibiendo tratamiento con anticuerpo monoclonal (trastuzumab/cetuximab) asociado o no a esquemas de quimioterapia para tratar la enfermedad en estadio avanzado. Los pacientes fueron agrupados en dos categorías de acuerdo a el tiempo a fallo de tratamiento con terapia anti-EGFR (TTF): TTF corta ( $\leq 6$  meses,  $n = 20$ ) que supondrían el grupo de peor pronóstico o largo TTF ( $\geq 10$  meses,  $n = 19$ ), constituyendo el grupo de mejor pronóstico; de esta manera hemos podido identificar perfiles de pacientes con mejor respuesta a estos tratamientos con anticuerpos monoclonales.

Por lo tanto, por primera vez, hemos aportado información del papel de dos combinaciones de receptores KIR activadores con sus correspondientes ligandos, prediciendo un mejor pronóstico en los pacientes que presentan dichas combinaciones frente a los que no la presentan.

En resumen nuestros resultados muestran que la activación de dos combinaciones de ligando KIR / HLA predicen mejor respuesta de los pacientes

a la terapia anti-EGFR, lo que puede suponer, disponer de un marcador predictivo de respuesta a tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-EGFR en estos pacientes. Los estudios futuros, en curso, deben confirmar estos resultados y apoyar el posible valor predictivo y terapéutico de diferentes genotipos KIR y su modulación farmacológica, en combinación con AcMo en el tratamiento de tumores sólidos.



## **VIII. CONCLUSIONES**

Los sujetos portadores del ligando KIR / HLA KIR2DS1 / HLAC2C2-C1C2 y KIR3DS1 / HLABw4w4-w4w6 mostraron una TTF más prolongado que aquellos pacientes no portadores (14,7 meses frente a 3.7 meses, y 14.9 meses frente a 4.6 meses, respectivamente). Por lo tanto, las dos combinaciones de ligando KIR / HLA activadoras predicen una mejor respuesta de los pacientes con tumores sólidos (mama, colon y cabeza y cuello) al tratamiento con anti-EGFR (trastuzumab para el cáncer de mama y cetuximab para el cáncer de colon y el de cabeza y cuello). No se observaron diferencias en el resto de combinaciones KIR / HLA analizadas.

## **IX. ABREVIATURAS**

## ABREVIATURAS

- Ac: anticuerpo
- ACD: ácido citrato dextrosa
- AcMo: anticuerpo monoclonal
- ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- Ags: antígenos
- ATP: trifosfato de adenosina
- BCIP: 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato
- bp: pares de bases
- CCR: cáncer colon-recto
- CD: cluster of differentiation
- CDR: región determinante de la complementariedad
- CECC: carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
- CH: cadena pesada constante
- CISH: hibridación in situ por colorimetría
- CL: cadena ligera constante
- CMN: células mononucleares
- CN: citotoxicidad natural
- CPM: medicina de precisión del cáncer
- CyC: cabeza y cuello
- EGFR/ErbB/HER: "epidermal growth factor receptor", factor de crecimiento epidérmico
- Fab: fragmento de unión a antígenos

- Fc: fragmento cristalizable
- FcγR: receptor Fc-gamma
- FDA: Administración de Alimentos y Fármacos de EE.UU.
- FISH: hibridación in situ por fluorescencia
- FUV: fecha última visita
- HLA: "human leukocyte antigen", antígeno humano leucocitario
- HPV: virus del papiloma humano
- IC: intervalo de confianza
- Ig: inmunoglobulina
- IHC: inmunohistoquímica
- IL: interleukina
- ILTs: immunoglobulin like transcripts
- ITAMs: moléculas inmunoreceptivas basadas en la activación tirosina
- ITIMs: moléculas de inhibición inmunorreceptoras basadas en tirosina
- KIR: killer cell Ig-like receptors
- LLC: leucemia linfocítica crónica
- M1: metástasis
- MCH: "major histocompatibility complex", complejo mayor de histocompatibilidad
- NBT: 4-nitroazul de tetrazolio
- NCRs: receptores de citotoxicidad natural
- NK: natural killer
- NKR: receptores NK
- NPC: carcinoma nasofaríngeo
- OR: odds ratio



- PCR: “polymerase chain reaction”, reacción en cadena de la polimerasa
- RE: receptor de estrógenos
- RP: receptor de progesterona
- SG: supervivencia global
- SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida
- SLE: supervivencia libre de enfermedad
- SPSS: Statistical Package for the Social Sciences
- SSO: “sequence specific oligonucleotide”, oligonucleótidos específicos de secuencia
- SSP: sequence specific primers
- SSPA: Servicio de Salud Público de Andalucía
- TGF- $\alpha$ : Transforming growth factor alpha
- TKIs: moléculas inhibidoras de la actividad enzimática tirosina quinasa
- TTF: “time to failure treatment”, tiempo a fallo de tratamiento
- UGC: unidad de gestión clínica
- VEB: virus Epstein-Barr
- VEGF: “vascular endothelial growth factor”, factor de crecimiento del endotelio vascular
- VH: cadena pesada variable
- VIH: virus de inmunodeficiencia humana
- VL: cadena ligera variable



# **X. BIBLIOGRAFÍA**

1. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang XS, Bannon F, Ahn JV, Johnson CJ, Bonaventure A *et al*: **Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2)**. *Lancet* 2015, **385**(9972):977-1010.
2. Rodriguez CA, Martin M: **SEOM Guidelines 2015: a new era in the collaboration with the Spanish Cancer Research Cooperative Groups**. *Clin Transl Oncol* 2015, **17**(12):937-938.
3. Ruiz P, Langrod J, Lowinson J, Marcus NJ: **Social rehabilitation of addicts: a two-year evaluation**. *Int J Addict* 1977, **12**(1):173-181.
4. Garcia-Saenz JA, Bermejo B, Estevez LG, Palomo AG, Gonzalez-Farre X, Margeli M, Pernas S, Servitja S, Rodriguez CA, Ciruelos E: **SEOM clinical guidelines in early-stage breast cancer 2015**. *Clin Transl Oncol* 2015, **17**(12):939-945.
5. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F: **Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012**. *Eur J Cancer* 2013, **49**(6):1374-1403.
6. Ly D, Forman D, Ferlay J, Brinton LA, Cook MB: **An international comparison of male and female breast cancer incidence rates**. *Int J Cancer* 2013, **132**(8):1918-1926.
7. **Guía GEICAM de Práctica Clínica para el Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Mama Metastásico**. Fundación GEICAM (Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama). 2015; ISBN: 978-84-938762-6-5.
8. **GLOBOCAN 2008. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008: CCR in Spain**. <http://globocan.iarc.fr>.
9. Gonzalez-Flores E, Losa F, Pericay C, Polo E, Rosello S, Safont MJ, Vera R, Aparicio J, Cano MT, Fernandez-Martos C: **SEOM Clinical Guideline of localized rectal cancer (2016)**. *Clin Transl Oncol* 2016, **18**(12):1163-1171.
10. Adam R, Haller DG, Poston G, Raoul JL, Spano JP, Tabernero J, Van Cutsem E: **Toward optimized front-line therapeutic strategies in patients with metastatic colorectal cancer--an expert review from the International Congress on Anti-Cancer Treatment (ICACT) 2009**. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2010, **21**(8):1579-1584.
11. Cartwright TH: **Treatment decisions after diagnosis of metastatic colorectal cancer**. *Clinical colorectal cancer* 2012, **11**(3):155-166.
12. **Cruz Hernández, J.J. (2011). Cáncer de cabeza y cuello**. Madrid: Arán Ediciones.
13. Mesia R, Pastor M, Grau JJ, del Barco E, Seom: **SEOM clinical guidelines for the treatment of head and neck cancer (HNC) 2013**. *Clin Transl Oncol* 2013, **15**(12):1018-1024.
14. Yogi V, Singh OP: **Induction followed with concurrent chemo radiotherapy in advanced head & neck cancer**. *Journal of cancer research and therapeutics* 2005, **1**(4):198-203.
15. Specenier PM, Vermorken JB: **Recurrent head and neck cancer: current treatment and future prospects**. *Expert review of anticancer therapy* 2008, **8**(3):375-391.
16. Gialeli C, Kletsas D, Mavroudis D, Kalofonos HP, Tzanakakis GN, Karamanos NK: **Targeting epidermal growth factor receptor in solid tumors: critical evaluation of the biological importance of therapeutic monoclonal antibodies**. *Curr Med Chem* 2009, **16**(29):3797-3804.
17. Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R: **EGFR targeting of solid tumors**. *Cancer Control* 2007, **14**(3):295-304.
18. Asami K, Atagi S: **Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for non-small cell lung cancer**. *World journal of clinical oncology* 2014, **5**(4):646-659.
19. Harari PM: **Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology**. *Endocr Relat Cancer* 2004, **11**(4):689-708.

20. Ciardiello F, Tortora G: **A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor.** *Clin Cancer Res* 2001, **7**(10):2958-2970.
21. Woodburn JR: **The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy.** *Pharmacol Ther* 1999, **82**(2-3):241-250.
22. Lehmann A, Wixted JH, Shapovalov MV, Roder H, Dunbrack RL, Jr., Robinson MK: **Stability engineering of anti-EGFR scFv antibodies by rational design of a lambda-to-kappa swap of the VL framework using a structure-guided approach.** *MABs* 2015, **7**(6):1058-1071.
23. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M *et al*: **Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains.** *Cell* 2002, **110**(6):775-787.
24. Baselga J, Albanell J: **Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies.** *Ann Oncol* 2001, **12 Suppl 1**:S35-41.
25. Yarden Y: **The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities.** *Eur J Cancer* 2001, **37 Suppl 4**:S3-8.
26. Mendelsohn J, Baselga J: **The EGF receptor family as targets for cancer therapy.** *Oncogene* 2000, **19**(56):6550-6565.
27. Hudis CA: **Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice.** *N Engl J Med* 2007, **357**(1):39-51.
28. Cook-Bruns N: **Retrospective analysis of the safety of Herceptin immunotherapy in metastatic breast cancer.** *Oncology* 2001, **61 Suppl 2**:58-66.
29. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H: **Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.** *Int J Cancer* 1983, **31**(1):13-20.
30. Cobbold SP, Jayasuriya A, Nash A, Prospero TD, Waldmann H: **Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo.** *Nature* 1984, **312**(5994):548-551.
31. Baselga J: **The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab.** *European journal of cancer* 2001, **37 Suppl 4**:S16-22.
32. Chen S, Li X, Chen R, Yin M, Zheng Q: **Cetuximab intensifies the ADCC activity of adoptive NK cells in a nude mouse colorectal cancer xenograft model.** *Oncol Lett* 2016, **12**(3):1868-1876.
33. Seeber A, Gastl G: **Targeted Therapy of Colorectal Cancer.** *Oncol Res Treat* 2016, **39**(12):796-802.
34. Beksac K, Beksac M, Dalva K, Karaagaoglu E, Tirnaksiz MB: **Impact of "Killer Immunoglobulin-Like Receptor /Ligand" Genotypes on Outcome following Surgery among Patients with Colorectal Cancer: Activating KIRs Are Associated with Long-Term Disease Free Survival.** *PLoS One* 2015, **10**(7):e0132526.
35. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, Siena S, Bardelli A: **Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies.** *Cancer Res* 2007, **67**(6):2643-2648.
36. Maubec E, Petrow P, Scheer-Senyarich I, Duvillard P, Lacroix L, Gelly J, Certain A, Duval X, Crickx B, Buffard V *et al*: **Phase II study of cetuximab as first-line single-drug therapy in patients with unresectable squamous cell carcinoma of the skin.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011, **29**(25):3419-3426.
37. Diessner J, Bruttel V, Becker K, Pawlik M, Stein R, Hausler S, Dietl J, Wischhusen J, Honig A: **Targeting breast cancer stem cells with HER2-specific antibodies and natural killer cells.** *Am J Cancer Res* 2013, **3**(2):211-220.

38. Collins DM, O'Donovan N, McGowan PM, O'Sullivan F, Duffy MJ, Crown J: **Trastuzumab induces antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in HER-2-non-amplified breast cancer cell lines.** *Ann Oncol* 2012, **23**(7):1788-1795.
39. Beano A, Signorino E, Evangelista A, Brusa D, Mistrangelo M, Polimeni MA, Spadi R, Donadio M, Ciuffreda L, Matera L: **Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients.** *J Transl Med* 2008, **6**:25.
40. Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M: **Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer.** *Ann Oncol* 2007, **18**(6):977-984.
41. Ingthorsson S, Andersen K, Hilmarsdottir B, Maelandsmo GM, Magnusson MK, Gudjonsson T: **HER2 induced EMT and tumorigenicity in breast epithelial progenitor cells is inhibited by coexpression of EGFR.** *Oncogene* 2016, **35**(32):4244-4255.
42. Conte P, Guarneri V: **The next generation of biologic agents: therapeutic role in relation to existing therapies in metastatic breast cancer.** *Clin Breast Cancer* 2012, **12**(3):157-166.
43. Nuciforo P, Radosevic-Robin N, Ng T, Scaltriti M: **Quantification of HER family receptors in breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2015, **17**:53.
44. Singer CF, Kostler WJ, Hudelist G: **Predicting the efficacy of trastuzumab-based therapy in breast cancer: current standards and future strategies.** *Biochim Biophys Acta* 2008, **1786**(2):105-113.
45. Houghton AN, Guevara-Patino JA: **Immune recognition of self in immunity against cancer.** *J Clin Invest* 2004, **114**(4):468-471.
46. Modjtahedi H, Ali S, Essapen S: **Therapeutic application of monoclonal antibodies in cancer: advances and challenges.** *Br Med Bull* 2012, **104**:41-59.
47. Tomita M, Tsumoto K: **Hybridoma technologies for antibody production.** *Immunotherapy* 2011, **3**(3):371-380.
48. Chiarella P: **Production, novel assay development and clinical applications of monoclonal antibodies.** *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2011, **6**(2):258-267.
49. Stephens DM, Byrd JC: **Improving the treatment outcome of patients with chronic lymphocytic leukemia through targeted antibody therapy.** *Hematol Oncol Clin North Am* 2013, **27**(2):303-327.
50. Letendre P, Monga V, Milhem M, Zakharia Y: **Ipilimumab: from preclinical development to future clinical perspectives in melanoma.** *Future Oncol* 2017, **13**(7):625-636.
51. Ohhara Y, Fukuda N, Takeuchi S, Honma R, Shimizu Y, Kinoshita I, Dosaka-Akita H: **Role of targeted therapy in metastatic colorectal cancer.** *World J Gastrointest Oncol* 2016, **8**(9):642-655.
52. Yazdi MH, Faramarzi MA, Nikfar S, Abdollahi M: **A Comprehensive Review of Clinical Trials on EGFR Inhibitors Such as Cetuximab and Panitumumab as Monotherapy and in Combination for Treatment of Metastatic Colorectal Cancer.** *Avicenna J Med Biotechnol* 2015, **7**(4):134-144.
53. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV: **Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets.** *Nat Med* 2000, **6**(4):443-446.
54. Caligiuri MA: **Human natural killer cells.** *Blood* 2008, **112**(3):461-469.
55. Rodriguez J, Zarate R, Bandres E, Boni V, Hernandez A, Sola JJ, Honorato B, Bitarte N, Garcia-Foncillas J: **Fc gamma receptor polymorphisms as predictive markers of Cetuximab efficacy in epidermal growth factor receptor downstream-mutated metastatic colorectal cancer.** *Eur J Cancer* 2012, **48**(12):1774-1780.
56. Stein MN, Shin J, Gudzowaty O, Bernstein AM, Liu JM: **Antibody-dependent cell cytotoxicity to breast cancer targets despite inhibitory KIR signaling.** *Anticancer Res* 2006, **26**(3A):1759-1763.

57. Abi-Rached L, Kuhl H, Roos C, ten Hallers B, Zhu B, Carbone L, de Jong PJ, Mootnick AR, Knaust F, Reinhardt R *et al*: **A small, variable, and irregular killer cell Ig-like receptor locus accompanies the absence of MHC-C and MHC-G in gibbons.** *J Immunol* 2010, **184**(3):1379-1391.
58. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA: **Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect.** *Blood* 2002, **100**(6):1935-1947.
59. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S: **Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition.** *Annu Rev Immunol* 2013, **31**:227-258.
60. Muller JR, Waldmann TA, Dubois S: **Loss of cytotoxicity and gain of cytokine production in murine tumor-activated NK cells.** *PLoS One* 2014, **9**(8):e102793.
61. Carrillo-Bustamante P, Kesmir C, de Boer RJ: **The evolution of natural killer cell receptors.** *Immunogenetics* 2016, **68**(1):3-18.
62. Campbell KS, Purdy AK: **Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations.** *Immunology* 2011, **132**(3):315-325.
63. Marsh SG, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, Vilches C, Carrington M, Witt C, Guethlein LA *et al*: **Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002.** *Eur J Immunogenet* 2003, **30**(3):229-234.
64. Yawata M, Yawata N, Abi-Rached L, Parham P: **Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family.** *Crit Rev Immunol* 2002, **22**(5-6):463-482.
65. Middleton D, Gonzelez F: **The extensive polymorphism of KIR genes.** *Immunology* 2010, **129**(1):8-19.
66. Kulkarni S, Martin MP, Carrington M: **The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease.** *Semin Immunol* 2008, **20**(6):343-352.
67. Falco M, Moretta L, Moretta A, Bottino C: **KIR and KIR ligand polymorphism: a new area for clinical applications?** *Tissue Antigens* 2013, **82**(6):363-373.
68. Nutt SL, Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ: **Interleukin 21: a key player in lymphocyte maturation.** *Crit Rev Immunol* 2004, **24**(4):239-250.
69. Rivero-Juarez A, Gonzalez R, Camacho A, Manzanares-Martin B, Caruz A, Martinez-Peinado A, Torre-Cisneros J, Pineda JA, Pena J, Rivero A: **Natural killer KIR3DS1 is closely associated with HCV viral clearance and sustained virological response in HIV/HCV patients.** *PLoS One* 2013, **8**(4):e61992.
70. Bakker AB, Wu J, Phillips JH, Lanier LL: **NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals.** *Human immunology* 2000, **61**(1):18-27.
71. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, Phillips JH, Lanier LL, Parham P: **Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors.** *Immunity* 1997, **7**(6):739-751.
72. Vilches C, Parham P: **KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity.** *Annual review of immunology* 2002, **20**:217-251.
73. Faure M, Long EO: **KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential.** *Journal of immunology* 2002, **168**(12):6208-6214.
74. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P: **Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function.** *J Exp Med* 2006, **203**(3):633-645.
75. O'Connor GM, Hart OM, Gardiner CM: **Putting the natural killer cell in its place.** *Immunology* 2006, **117**(1):1-10.
76. Meyer D, Thomson G: **How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review.** *Ann Hum Genet* 2001, **65**(Pt 1):1-26.

77. Moretta A, Pende D, Locatelli F, Moretta L: **Activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIR) in haploidentical haemopoietic stem cell transplantation to cure high-risk leukaemias.** *Clinical and experimental immunology* 2009, **157**(3):325-331.
78. Ivarsson MA, Michaelsson J, Fauriat C: **Activating killer cell Ig-like receptors in health and disease.** *Front Immunol* 2014, **5**:184.
79. Ozturk OG, Gun FD, Polat G: **Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in patients with breast cancer.** *Medical oncology* 2012, **29**(2):511-515.
80. Watson NF, Ramage JM, Madjd Z, Spendlove I, Ellis IO, Scholefield JH, Durrant LG: **Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis.** *Int J Cancer* 2006, **118**(1):6-10.
81. Jobim MR, Jobim M, Salim PH, Portela P, Jobim LF, Leistner-Segal S, Bittelbrunn AC, Menke CH, Biazus JV, Roesler R *et al*: **Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in breast cancer and control group.** *Hum Immunol* 2013, **74**(9):1130-1133.
82. De Re V, Caggiari L, De Zorzi M, Talamini R, Racanelli V, M DA, Buonadonna A, Zagonel V, Cecchin E, Innocenti F *et al*: **Genetic diversity of the KIR/HLA system and outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy.** *PLoS One* 2014, **9**(1):e84940.
83. Deng X, Nakamura Y: **Cancer Precision Medicine: From Cancer Screening to Drug Selection and Personalized Immunotherapy.** *Trends in pharmacological sciences* 2016.
84. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M *et al*: **Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.** *N Engl J Med* 2001, **344**(11):783-792.
85. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pinter T, Lim R, Bodoky G *et al*: **Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer.** *N Engl J Med* 2009, **360**(14):1408-1417.
86. Boero S, Morabito A, Banelli B, Cardinali B, Dozin B, Lunardi G, Piccioli P, Lastraioli S, Carosio R, Salvi S *et al*: **Analysis of in vitro ADCC and clinical response to trastuzumab: possible relevance of Fcγ3R/Fcγ2R gene polymorphisms and HER-2 expression levels on breast cancer cell lines.** *J Transl Med* 2015, **13**:324.
87. Kohrt HE, Colevas AD, Houot R, Weiskopf K, Goldstein MJ, Lund P, Mueller A, Sagiv-Barfi I, Marabelle A, Lira R *et al*: **Targeting CD137 enhances the efficacy of cetuximab.** *J Clin Invest* 2014, **124**(6):2668-2682.
88. Kohrt HE, Houot R, Weiskopf K, Goldstein MJ, Scheeren F, Czerwinski D, Colevas AD, Weng WK, Clarke MF, Carlson RW *et al*: **Stimulation of natural killer cells with a CD137-specific antibody enhances trastuzumab efficacy in xenotransplant models of breast cancer.** *The Journal of clinical investigation* 2012, **122**(3):1066-1075.
89. Kute T, Stehle Jr JR, Ornelles D, Walker N, Delbono O, Vaughn JP: **Understanding key assay parameters that affect measurements of trastuzumab-mediated ADCC against Her2 positive breast cancer cells.** *Oncoimmunology* 2012, **1**(6):810-821.
90. van der Ploeg K, Chang C, Ivarsson MA, Moffett A, Wills MR, Trowsdale J: **Modulation of Human Leukocyte Antigen-C by Human Cytomegalovirus Stimulates KIR2DS1 Recognition by Natural Killer Cells.** *Front Immunol* 2017, **8**:298.
91. Shifrin N, Raulet DH, Ardolino M: **NK cell self tolerance, responsiveness and missing self recognition.** *Semin Immunol* 2014, **26**(2):138-144.
92. Fine JH, Chen P, Mesci A, Allan DS, Gasser S, Raulet DH, Carlyle JR: **Chemotherapy-induced genotoxic stress promotes sensitivity to natural killer cell cytotoxicity by enabling missing-self recognition.** *Cancer Res* 2010, **70**(18):7102-7113.



93. Sim MJ, Stowell J, Sergeant R, Altmann DM, Long EO, Boyton RJ: **KIR2DL3 and KIR2DL1 show similar impact on licensing of human NK cells.** *Eur J Immunol* 2016, **46**(1):185-191.
94. Raulet DH, Vance RE: **Self-tolerance of natural killer cells.** *Nat Rev Immunol* 2006, **6**(7):520-531.
95. Joncker NT, Raulet DH: **Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells.** *Immunol Rev* 2008, **224**:85-97.
96. Wang W, Erbe AK, Alderson KA, Phillips E, Gallenberger M, Gan J, Campana D, Hank JA, Sondel PM: **Human NK cells maintain licensing status and are subject to killer immunoglobulin-like receptor (KIR) and KIR-ligand inhibition following ex vivo expansion.** *Cancer Immunol Immunother* 2016, **65**(9):1047-1059.
97. Marcenaro E, Carlomagno S, Pesce S, Della Chiesa M, Moretta A, Sivori S: **Role of alloreactive KIR2DS1(+) NK cells in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation.** *J Leukoc Biol* 2011, **90**(4):661-667.
98. Oliveira LM, Portela P, Merzoni J, Lindenau JD, Dias FS, Beppler J, Graebin P, Alho CS, Schwartzmann G, Dal-Pizzol F *et al*: **Reduced frequency of two activating KIR genes in patients with sepsis.** *Hum Immunol* 2017, **78**(4):363-369.
99. Kohrt HE, Thielens A, Marabelle A, Sagiv-Barfi I, Sola C, Chanuc F, Fuseri N, Bonnafous C, Czerwinski D, Rajapaksa A *et al*: **Anti-KIR antibody enhancement of anti-lymphoma activity of natural killer cells as monotherapy and in combination with anti-CD20 antibodies.** *Blood* 2014, **123**(5):678-686.
100. Kandilarova SM, Paschen A, Mihaylova A, Ivanova M, Schadendorf D, Naumova E: **The Influence of HLA and KIR Genes on Malignant Melanoma Development and Progression.** *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2016, **64**(Suppl 1):73-81.
101. Yeung DT, Tang C, Vidovic L, White DL, Branford S, Hughes TP, Yong AS: **KIR2DL5B genotype predicts outcomes in CML patients treated with response-directed sequential imatinib/nilotinib strategy.** *Blood* 2015, **126**(25):2720-2723.
102. Wisniewski A, Jankowska R, Passowicz-Muszynska E, Wisniewska E, Majorczyk E, Nowak I, Frydecka I, Kusnierczyk P: **KIR2DL2/S2 and HLA-C C1C1 genotype is associated with better response to treatment and prolonged survival of patients with non-small cell lung cancer in a Polish Caucasian population.** *Human immunology* 2012, **73**(9):927-931.
103. Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM: **NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy.** *Frontiers in immunology* 2015, **6**:368.
104. Dahlberg CI, Sarhan D, Chrobok M, Duru AD, Alici E: **Natural Killer Cell-Based Therapies Targeting Cancer: Possible Strategies to Gain and Sustain Anti-Tumor Activity.** *Frontiers in immunology* 2015, **6**:605.
105. Foley B, Felices M, Cichocki F, Cooley S, Verneris MR, Miller JS: **The biology of NK cells and their receptors affects clinical outcomes after hematopoietic cell transplantation (HCT).** *Immunol Rev* 2014, **258**(1):45-63.
106. Pittari G, Liu XR, Selvakumar A, Zhao Z, Merino E, Huse M, Chewning JH, Hsu KC, Dupont B: **NK cell tolerance of self-specific activating receptor KIR2DS1 in individuals with cognate HLA-C2 ligand.** *J Immunol* 2013, **190**(9):4650-4660.





# **XI. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA TESIS**



# KIR Genes and Their Ligands Predict the Response to Anti-EGFR Monoclonal Antibodies in Solid Tumors

Cristina Morales-Estevez<sup>1†</sup>, Juan De la Haba-Rodriguez<sup>1,2\*</sup>, Barbara Manzanares-Martin<sup>3</sup>, Ignacio Porras-Quintela<sup>1</sup>, Antonio Rodriguez-Ariza<sup>1,2</sup>, Alberto Moreno-Vega<sup>1</sup>, Maria J. Ortiz-Morales<sup>1</sup>, Maria A. Gomez-España<sup>1</sup>, Maria T. Cano-Osuna<sup>1</sup>, Javier Lopez-Gonzalez<sup>1</sup>, Beatriz Chia-Delgado<sup>1</sup>, Rafael Gonzalez-Fernandez<sup>3†</sup> and Enrique Aranda-Aguilar<sup>1,2†</sup>

## OPEN ACCESS

**Edited by:** Anahid Jewett, University of California Los Angeles, USA

**Reviewed by:** Alessandro Poggi, Azienda ospedaliera universitaria San Martino – IST, Italy  
Antonio Curti, University of Bologna, Italy

\*Correspondence: Juan De la Haba-Rodriguez  
[juahaba@gmail.com](mailto:juahaba@gmail.com)

†These authors have contributed equally to this study.

**Specialty section:** This article was submitted to Cancer Immunity and Immunotherapy, a section of the journal *Frontiers in Immunology*

**Received:** 29 September 2016

**Accepted:** 21 November 2016

**Published:** 05 December 2016

**Citation:** Morales-Estevez C, De la Haba-Rodriguez J, Manzanares-Martin B, Porras-Quintela I, Rodriguez-Ariza A, Moreno-Vega A, Ortiz-Morales MJ, Gomez-España MA, Cano-Osuna MT, Lopez-Gonzalez J, Chia-Delgado B, Gonzalez-Fernandez R and Aranda-Aguilar E (2016) KIR Genes and Their Ligands Predict the Response to Anti-EGFR Monoclonal Antibodies in Solid Tumors. *Front. Immunol.* 7:561. doi: 10.3389/fimmu.2016.00561

<sup>1</sup> Medical Oncology Department, IMIBIC, Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, Cordoba, Spain, <sup>2</sup> Spanish Cancer Network (RTICC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, <sup>3</sup> Immunology Department, IMIBIC, Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, Cordoba, Spain

Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) regulate the killing function of natural killer cells, which play an important role in the antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity response exerted by therapeutic monoclonal antibodies (mAbs). However, it is unknown whether the extensive genetic variability of KIR genes and/or their human leukocyte antigen (HLA) ligands might influence the response to these treatments. This study aimed to explore whether the variability in KIR/HLA genes may be associated with the variable response observed to mAbs based anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) therapies. Thirty-nine patients treated with anti-EGFR mAbs (trastuzumab for advanced breast cancer, or cetuximab for advanced colorectal or advanced head and neck cancer) were included in the study. All the patients had progressed to mAbs therapy and were grouped into two categories taking into account time to treatment failure (TTF  $\leq 6$  and  $\geq 10$  months). KIR genotyping (16 genetic variability) was performed in genomic DNA from peripheral blood by PCR sequence-specific primer technique, and HLA ligand typing was performed for HLA-B and -C loci by reverse polymerase chain reaction sequence-specific oligonucleotide methodology. Subjects carrying the KIR/HLA ligand combinations KIR2DS1/HLAC2C2-C1C2 and KIR3DS1/HLABw4w4-w4w6 showed longer TTF than non-carriers counterparts (14.76 vs. 3.73 months,  $p < 0.001$  and 14.93 vs. 4.6 months,  $p = 0.005$ , respectively). No other significant differences were observed. Two activating KIR/HLA ligand combinations predict better response of patients to anti-EGFR therapy. These findings increase the overall knowledge on the role of specific gene variants related to responsiveness to anti-EGFR treatment in solid tumors and highlight the importance of assessing gene polymorphisms related to cancer medications.

**Keywords:** KIR receptor, anti-EGFR, advanced cancer, solid tumor, natural killer cells, KIR/HLA ligands

**Abbreviations:** ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGFR, epidermal growth factor receptor; KIRs, killer-cell immunoglobulin-like receptors; mAbs, monoclonal antibodies; NK, natural killer; PCR-SSO, polymerase chain reaction sequence-specific oligonucleotide; TTF, time to treatment failure.



