

# Inmunidad antitumoral en neoplasias intraoculares

Cristhian A. Urzúa S.<sup>(1)</sup>, Mercedes López N.<sup>(2)</sup>, Andrea Pardo Q.<sup>(2)</sup>, Ana Adélia Ribeiro D.<sup>(2)</sup>, Fabián Tempio S.<sup>(2)</sup>, Sergio Abuaud A.<sup>(3)</sup>, Darío H. Vásquez Z.<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>*Servicio de Oftalmología, HCUCH.*

<sup>(2)</sup>*Programa de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.*

<sup>(3)</sup>*Estudiante de Medicina, Universidad de Chile.*

## SUMMARY

A physiological function of the immune system is to recognize and destroy cells transformed clones before they become tumors and eliminate tumors after they are formed. This is accomplished by innate and adaptive immune responses, however is a complex task considering the mechanisms of evasion by tumors. Particularly, intraocular neoplasms (ION) would have an advantage against the immune system because the eye is considered a site of immune privilege that through anatomical, physiological and immunoregulatory mechanisms restrict the immune response. Regulatory T lymphocytes (Treg) subtype CD4 + CD25 + Foxp3 + and IL-10 producers, would be crucial in induction of self-tolerance. The loss of balance between proinflammatory profile given by LTh1 and LTh17 and its production of IFN- $\gamma$  and IL-17 versus the modulating function of Treg secreting IL-10 and TGF- $\beta$  determines a faster tumor growth or not. There is still no conclusive evidence determining the specific mechanisms of immune imbalance in the ION. In this review we updated an overview of antitumor immunity, its particularities to intraocular level and current evidence about mechanisms of immune evasion in most common primary malignant ION in adults: uveal melanoma and primary intraocular lymphoma.

## INTRODUCCIÓN

La idea de que el sistema inmune participa en la respuesta antitumoral surgió hace más de cien años como una teoría del microbiólogo Paul Ehrlich<sup>(1)</sup>. Este concepto fue refinado y expandido cincuenta años más tarde por Burnet y Thomas, los que introdujeron el concepto de inmunovigilancia, el cual plantea que las células neoplásicas surgen espontáneamente y expresan antígenos que son reconocidos por el sistema inmune, limitando

de esta forma su crecimiento, además de permitir su eliminación<sup>(2)</sup>.

Actualmente se sabe que la vigilancia inmunológica cumple un rol fundamental en la eliminación de células potencialmente neoplásicas, además de estar involucrada directamente en el rechazo de tumores ya establecidos. Las células neoplásicas presentan diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune antitumoral. Uno de ellos es la secreción de citoquinas inmunoregulatoras, las

que establecen un microambiente tolerogénico al crecimiento tumoral<sup>(2)</sup>.

Es importante estudiar lo que ocurre en regiones anatómicas específicas de nuestro organismo, ya que el sistema inmune no se comporta de la misma forma en cada una de ellas. Este es el caso de lo que sucede en el globo ocular, en donde se habla de inmunoprivilegio ocular. El conocimiento del inmunoprivilegio ocular ha evolucionado significativamente en los últimos cincuenta años. Originalmente se planteaba como un fenómeno basado en características anatómicas que establecían un estado de ignorancia inmunológica. Actualmente se reconoce que es un fenómeno sistémico complejo y dinámico que limita tanto la respuesta inmune innata como adaptativa, el cual se ha desarrollado como un mecanismo de adaptación para proteger al ojo, en especial a sus estructuras que tienen limitada capacidad de regeneración<sup>(3)</sup>. En el contexto antitumoral, las neoplasias primarias intraoculares pudiesen presentar un patrón de evasión distinto al de los otros diversos tipos de cáncer, ya que los mecanismos utilizados para mantener el inmunoprivilegio ocular serían utilizados por las células tumorales para escapar a la inmunovigilancia. Si bien se ha demostrado una respuesta inmune específica a antígenos tumorales, la resolución espontánea de melanomas oculares y retinoblastoma son casos excepcionales<sup>(3)</sup>.

En el presente artículo se revisan los conceptos actualizados que sustentan el inmunoprivilegio ocular y los mecanismos utilizados por las neoplasias intraoculares más frecuentes para evadir la inmunovigilancia, en especial del melanoma ocular.

### **INMUNOPRIVILEGIO OCULAR**

La observación de que el ojo es un sitio de privilegio inmune se puede remontar hasta hace dos siglos, cuando el oftalmólogo danés van Dooremaal reportó que los trasplantes de piel de gato

en la cámara ocular anterior (CA) de ojos de perro, tenían una sobrevivencia notablemente prolongada<sup>(3)</sup>. Medawar, 75 años más tarde, tras replicar los hallazgos de van Dooremaal, acuñó para este fenómeno el término de privilegio inmune, el que atribuyó a la aparente falta de drenaje linfático de la cámara anterior. Esto resulta en un “secuestro” de antígenos en el ojo<sup>(4)</sup>, lo que posteriormente se denominaría “inmunoignorancia”<sup>(5)</sup>. El cambio de paradigma del privilegio inmune ocular ocurre en la década de los setenta gracias a los estudios realizados por Streilein *et al*, los que observaron que la inoculación de antígenos en la cámara anterior del globo ocular induce una respuesta inmunológica antígeno-específica caracterizada por la disminución sistémica de la respuesta inmune celular efectora, conservando la respuesta humoral. A este fenómeno de inmunoregulación lo denominaron “desviación inmune asociada a la cámara anterior” (ACAID por sus siglas de *AC-associated immune deviation*)<sup>(6)</sup>: la exposición de antígenos a los macrófagos residentes en la CA induce su migración vía sanguínea hacia el timo y bazo<sup>(7)</sup>. A partir de este momento, las numerosas investigaciones han permitido plantear que el inmunoprivilegio ocular no es un fenómeno local, sino un fenómeno sistémico que implica la estrecha interacción el globo ocular, el timo, el bazo y el sistema nervioso simpático<sup>(7)</sup>.

### **INMUNOPRIVILEGIO OCULAR: CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS Y ESTRUCTURALES**

El concepto del inmunoprivilegio ocular se atribuye a Peter Medawar quien no sólo reconoció el rol del sistema inmune en el rechazo a trasplantes, sino que también destacó el rol del sistema inmune en la prolongada sobrevivencia en los trasplantes realizados en el ojo. Medawar planteaba que la aparente ausencia de drenaje linfático permitía secuestrar antígenos extraños, impidiendo su contacto con el sistema inmune<sup>(8)</sup>. Estudios posteriores permitieron demostrar que antígenos introducidos en el

globo ocular llegan rápidamente a los linfonodos de cabeza y cuello<sup>(9)</sup>.

La idea de que la CA carecía de drenaje linfático fue basada en estudios anatómicos que consistentemente no podían demostrar la presencia de vasos linfáticos. Posteriormente se demostró la expresión de marcadores específicos de superficie endotelial en los vasos linfáticos putativos. Además en modelos murinos se ha observado que antígenos introducidos en la CA se acumulan en linfonodos ipsilaterales de cabeza y cuello, induciendo la activación de linfocitos T (LT) con especificidad clonal. La vía uveo-escleral puede drenar de manera directa antígenos a los linfonodos de cabeza y cuello, dando cuenta de un 25-35% del flujo de salida de la CA en primates<sup>(8)</sup>.

Por otra parte, el sistema vascular del ojo forma la barrera hematoocular que restringe los movimientos de macromoléculas y leucocitos. Las células endoteliales de la retina e iris poseen uniones estrechas de membrana y no son fenestradas. Esta estructura reduciría la migración de linfocitos al globo ocular<sup>(10)</sup>.

Las moléculas MHC clase I se expresan virtualmente en todas las células nucleadas, pero su expresión está reducida o ausente en las células del ojo, especialmente en aquellas que tienen capacidad limitada de regeneración; es importante destacar que las células endoteliales de la córnea que rodean la CA junto a varias capas celulares de la retina expresan bajos niveles de moléculas de MHC clase Ia. Las moléculas MHC clase Ia son necesarias para la lisis mediada por linfocitos T citotóxicos (LT CD8+). De esta manera, la ausencia de moléculas MHC clase Ia implica un mecanismo de adaptación para limitar la citólisis de células retinales y corneales, las que no se regeneran<sup>(11)</sup>.

Las células NK están programadas para lisar células con expresión reducida o ausencia de expre-

sión de moléculas MHC. Esto hace a las células endoteliales de la retina y de la córnea susceptibles a la citólisis mediada por células NK. Sin embargo, estas células expresan moléculas MHC clase Ib como HLA-G y HLA-E. Estas moléculas MHC clase Ib no clásicas se unen al receptor inhibitorio de las células NK CD94-NKG2, permitiendo que dichas células no sean destruidas por las células NK<sup>(12)</sup>.

### **INMUNOPRIVILEGIO OCULAR Y MOLÉCULAS DE MEMBRANA**

Las células que rodean la cámara anterior y posterior del ojo expresan moléculas de membrana que inhiben la respuesta de las células de la inmunidad adaptativa e innata.

Las células que revisten el globo ocular expresan ligandos de membrana que inducen la apoptosis o inhiben la proliferación de linfocitos T (LT CD4+ y LT CD8+)<sup>(5)</sup>. FasL se expresa en células que revisten el globo ocular, eliminando a neutrófilos y linfocitos T (LT) activados que hayan ingresado en respuesta a una infección o trasplante y que expresen receptores Fas<sup>(13,14)</sup>. PD-L1 es un miembro de la familia de proteínas de membrana B7 que induce regulación negativa de la proliferación de linfocitos T y secreción de citoquinas y además promueve la apoptosis en células de la cascada de la inflamación. PD-L1 se expresa en células del globo ocular y se ha demostrado su rol en la supervivencia de injertos de córnea<sup>(15)</sup>. El ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL) es un miembro de la familia TNF, que se expresa en las células que revisten el interior del globo ocular, contribuyendo al inmunoprivilegio ocular con un mecanismo similar a PD-L1<sup>(16)</sup>.

En un ojo normal el sistema del complemento está continuamente activándose, pero en niveles bajos gracias a la presencia de proteínas intraoculares reguladoras del complemento, lo que protege al

globo ocular de la citólisis e inflamación granulocítica<sup>(17)</sup>. En modelos murinos la administración de anticuerpos neutralizantes de proteínas reguladoras intraoculares induce el desarrollo de uveítis anterior aguda<sup>(18)</sup>.

### **FACTORES SOLUBLES QUE CONTRIBUYEN A MANTENER EL INMUNOPRIVILEGIO OCULAR**

El humor acuoso (HA) que ocupa la CA contiene factores inmunosupresores y antiinflamatorios que afectan tanto la inmunidad innata como adaptativa<sup>(19)</sup>. Contiene al menos seis moléculas que suprimen la reacción de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH), dentro de ellas encontramos a:

- a) Hormona estimulante de melanocitos ( $\alpha$ -MSH)
- b) Factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ )
- c) Péptido intestinal vasoactivo (VIP)
- d) Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)
- e) Factor inhibidor de la migración macrófaga
- f) Somatostatina<sup>(20,21)</sup>

El neuropéptido somatostatina suprime la producción de IFN- $\gamma$  y por los linfocitos activados y además induce la producción de  $\alpha$ -MSH, que está involucrado en la generación de LTreg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup><sup>(21)</sup>. Conjuntamente, y como se nombró previamente, el HA contiene una variedad de proteínas reguladoras del complemento (CRP) que inhiben la cascada del complemento<sup>(22)</sup>.

Otra factor que contribuye a mantener el inmunoprivilegio ocular es la marcada expresión de la enzima indolamina dioxigenasa (IDO) en células corneales (células epiteliales, fibroblastos y células endoteliales). La expresión de IDO determina que la CA sea un ambiente bajo en triptófano, limitando la proliferación clonal aloespecífica de linfocitos T en el estroma corneal<sup>(23)</sup>.

Como se mencionó anteriormente, las células NK eliminan a las células con una expresión deficiente de moléculas MCH clase Ia; sin embargo, el HA contiene factores que inhiben la actividad citolítica de las células NK: MIF y TGF- $\beta$ . Además las células del endotelio corneal producen IDO, el que inhibe la proliferación y la citotoxicidad de las células NK<sup>(24)</sup>.

### **DESVIACIÓN INMUNE ASOCIADA A LA CÁMARA ANTERIOR: EL INMUNOPRIVILEGIO OCULAR SOBREPASA LOS LÍMITES DEL OJO**

La ACAID tiene como principales características la inhibición de la respuesta DTH y de los linfocitos T citotóxicos (LTC o LT CD8<sup>+</sup>) no afectando la respuesta inmune humoral. ACAID es un proceso inmunoregulador complejo que involucra al menos cuatro órganos: el ojo, el timo, el bazo y el sistema nervioso simpático<sup>(25)</sup>.

La inoculación de antígenos en la cámara anterior del globo ocular induce una respuesta inmunológica antígeno-específica, caracterizada por la disminución sistémica de la respuesta inmune celular efectora, conservando la respuesta humoral<sup>(26)</sup>.

La inducción de ACAID comienza cuando un antígeno ingresa al globo ocular y es fagocitado por macrófagos residentes F4/80<sup>+</sup>. Bajo la influencia de TGF- $\beta$  presente constitutivamente en el HA, los macrófagos oculares están programados para inducir simultáneamente la regulación positiva de IL-10 y la regulación negativa de IL-12<sup>(27)</sup>. A las 48 horas del ingreso de antígenos, los macrófagos F4/80<sup>+</sup> migran al timo y bazo vía sanguínea<sup>(28)</sup>. En el timo, la célula presentadora de antígenos (APC) ocular (macrófagos F4/80<sup>+</sup>), promueve la generación de células CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>, NK1.1<sup>+</sup>T (células NKT), las que subsecuentemente migran desde el timo al bazo vía sanguínea<sup>(29)</sup>. La población de células APC oculares migra hacia el bazo, donde secreta MIP-2, un quimioattractante

de células CD4+NKT, las que interactúan con las células APC oculares y secreta RANTES. RANTES recluta otras células a la zona marginal del bazo: APCs F4/80+, células NKT, células B y LT CD4+. Además, se promueve el desarrollo de linfocitos T reguladores CD8+ (Tregs) antígeno específicos<sup>(30,31)</sup>, los que inhiben tanto al perfil linfocitario TH1 como TH2.

Los tres órganos involucrados en la inducción de ACAID, ojo, bazo y timo, poseen inervación simpática. El sistema nervioso simpático es importante en la mantención del inmunoprivilegio ocular y la simpatectomía ocular impide la inducción de ACAID; sin embargo, aún se desconoce el mecanismo<sup>(32)</sup>.

### **INDUCCIÓN DE LINFOCITOS T REGULADORES OCULARES**

El sistema inmune del ojo mantiene una homeostasis estricta de la inflamación, limitando la actividad de los linfocitos T efectores. Hasta la fecha se sabe que las células oculares parenquimatosas de la cara interna de la barrera hémato-ocular, células endoteliales (CE) de la córnea, las células epiteliales pigmentadas (EP) del iris, las células EP del cuerpo ciliar y las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) contribuyen a mantener el sistema inmune regional<sup>(33)</sup>.

Las células CE y PE del iris, localizadas en la CA del ojo y en contacto con el humor acuoso, suprimen la activación de LT por un mecanismo contacto célula-célula; por otro lado, las células EPR suprimen la activación de LT vía factores solubles. Estudios *in vitro* muestran que linfocitos T en cocultivos con células del iris y cuerpo ciliar, adquieren funcionalidad característica de Tregs, inhibiendo la proliferación de linfocitos T y la reacción DTH antígeno específica a través de la secreción de TGF- $\beta$ . Los vasos sanguíneos del globo ocular están exclusivamente ubicados en iris

y el cuerpo ciliar. En este contexto anatómico, las células ingresan vía iris y cuerpo ciliar, contactando de forma directa con las células pigmentadas e induciendo su actividad reguladora<sup>(29)</sup>.

Además de la inmunosupresión directa, las células oculares residentes pueden inducir el desarrollo de LTregs CD25+ Foxp3+. Las células PE del iris convierten las células LT CD8+ a células LTregs, mientras que las células EPR convierten las células LT CD4+ y las células LT CD8+ en LTregs. Además las células CE convierten a los LT CD4+ y a los LT CD8+ en LTregs<sup>(33)</sup>.

La inmunomodulación de las células residentes del ojo está mediada por factores solubles y de membrana, de los cuales destacan: TGF- $\beta$ , TSP-1, B7-2(CD86), CTLA-2 $\alpha$ , PD-L1 (B7-H1), galactina-1, factor derivado del epitelio pigmentado (PEDF), hormona estimulante de melanocitos  $\alpha$  (MSH- $\alpha$ ), GIRTL, y ácido retinoico<sup>(33)</sup>. El MSH- $\alpha$ , un factor soluble del humor acuoso, puede convertir LT CD4+ en CD+CD25+, las que pueden limitar la actividad inflamatoria en la uveítis autoinmune experimental<sup>(5)</sup>.

### **INMUNIDAD ANTITUMORAL Y TUMORES INTRAOCULARES**

A pesar de los mecanismos antiinflamatorios redundantes que soportan el inmunoprivilegio ocular, existen evidencias claras de que en el globo ocular ocurren procesos inflamatorios. La inflamación intraocular (uveítis) y el rechazo a los trasplantes de córnea son dos ejemplos de la acción del sistema inmune adaptativo y del daño que produce su activación. En modelos murinos de tumores intraoculares se ha demostrado que antígenos tumorales inducen una respuesta inmune específica dependiente de LT<sup>(34)</sup>. Por otro lado, se han reportado la resolución espontánea en melanomas oculares y retinoblastoma; sin embargo, son datos excepcionales<sup>(35)</sup>.

Los tumores oculares se pueden clasificar de acuerdo a su origen en primarios, y secundarios (metástasis oculares)<sup>(10)</sup>.

En los adultos el tumor intraocular primario maligno más frecuente es el melanoma uveal, seguido por el linfoma intraocular o linfoma vitreoretinal. En los niños el tumor intraocular maligno más frecuente es el retinoblastoma.

### MELANOMA OCULAR

El melanoma uveal es un tumor maligno que surge de los melanocitos de la coroides, cuerpo ciliar o iris. Si bien su incidencia es baja (5-8 casos por 1 millón de habitantes), el melanoma ocular es la neoplasia ocular más frecuente en adultos. Su ubicación permite un diagnóstico precoz y tratamiento efectivo de la lesión primaria por enucleación, con radioterapia, resección local y termoterapia transpupilar; sin embargo, estos tratamientos no evitan el desarrollo de metástasis<sup>(36)</sup>. Una de las características del melanoma uveal es su diseminación hematológica al hígado, lo que está asociado a una letalidad de un 50% en pacientes adultos<sup>(37)</sup>. Además, la cirugía resecativa de las metástasis hepáticas está indicada en la minoría de los pacientes y las metástasis de melanoma son altamente resistentes a la quimioterapia tradicional<sup>(38)</sup>.

Respecto al tratamiento, hay muchas opciones disponibles. Las principales son la enucleación, placas de braquiterapia, la radioterapia de haz de protones y la termoterapia transpupilar<sup>(36)</sup>. Una vez que se han desarrollado metástasis, el pronóstico es pobre siendo los sitios más comunes: hígado (90%), pulmones (24%) y hueso (6%)<sup>(39)</sup>. Los principales factores predictores de metástasis son el tamaño tumoral y los marcadores moleculares: niveles séricos de RNA mensajero de trosinasa, VEGF (*vascular endothelial growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*) y su receptor c-MET e

IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*)<sup>(40)</sup>. Estudios en genética y citogenética han permitido conocer más acerca de los tumores con alto potencial metastásico y sobre los mecanismos moleculares que permiten su desarrollo. Acorde a esto, la biopsia por aguja fina de aspiración o la biopsia convencional pueden ser importantes para el pronóstico y permitirían nuevas investigaciones sobre mutaciones genéticas y potenciales nuevos blancos terapéuticos<sup>(41)</sup>.

### LINFOMA OCULAR

El linfoma ocular se clasifica, basándose en el tejido que afecta, como: intraocular, orbitario y anexial. El linfoma intraocular a su vez puede subdividirse en tres condiciones distintas conocidas como linfoma intraocular primario (PIOL, también llamado linfoma vitreoretinal primario), uveal primario y linfoma intraocular secundario metastásico. El PIOL, un subtipo del linfoma primario del sistema nervioso central (PCNSL de sus siglas en inglés), es el linfoma intraocular más común e inicialmente afecta el vítreo, retina, subretina y nervio óptico y corresponde a un linfoma no Hodgkin extranodal de células B gigantes<sup>(42,43)</sup>.

A pesar de que el PIOL es una enfermedad poco frecuente, su incidencia en los últimos 15 años ha aumentado, muy probablemente debido al aumento concomitante de PCNSL. El PIOL suele presentarse en pacientes de edad avanzada como una uveítis posterior crónica bilateral que no responde a la terapia con corticoesteroides, configurando el llamado síndrome de enmascaramiento. Los pacientes a menudo se quejan de visión borrosa y entopsias. Quejas menos comunes incluyen ojo rojo, fotofobia y dolor ocular. El hallazgo más común al examen ocular es vitreítis. Los pacientes con afectación del sistema nervioso central (SNC) también pueden presentar signos y síntomas neurológicos generales y/o focales<sup>(42)</sup>.

Dentro del largo proceso diagnóstico del PIOL habitualmente se incluye un estudio angiográfico cuyos hallazgos más comunes son: granularidad, tinción tardía y bloqueo a nivel del EPR. El ultrasonido también puede ser de utilidad para acotar el diagnóstico. Sin embargo, ninguno de estos exámenes presenta hallazgos patognomónicos, por lo que la vitrectomía diagnóstica con toma de muestra para estudio histológico es el procedimiento quirúrgico más común usado para confirmar la impresión clínica de un PIOL. La aspiración vítrea con aguja también puede ser ocupada con esos fines. Otros estudios realizados para precisar el diagnóstico de PIOL son la inmunofenotipificación y la citometría de flujo, encontrándose que la mayoría de los PIOL corresponden a poblaciones monoclonales de linfocitos B por los hallazgos de marcadores de células B (CD19, CD20, CD22), además de presentar una expresión restringida de cadenas kappa o lambda<sup>(42)</sup>.

Estos pacientes debieran someterse también a un estudio con neuroimágenes y análisis de líquido cefalorraquídeo mediante punción lumbar con el objetivo de evaluar compromiso del sistema nervioso central.

Como estudio complementario se ha descrito la cuantificación de citoquinas específicas a nivel intraocular, constituyendo una razón IL10/IL6 incrementada como un hallazgo muy sugerente de esta patología. Por otro lado, se ha descrito las mediciones de IL10 intraocular como variable para el seguimiento terapéutico de los pacientes con PIOL<sup>(6,7)</sup>.

El tratamiento del PCNSL y el PIOL se diferencia del tratamiento de linfoma sistémico. Las terapias que han demostrado ser eficaces para el linfoma sistémico no han tenido éxito en estas entidades. El tratamiento *gold standar* del PIOL aún no se ha determinado. La radioterapia, quimioterapia con metrotrexato o el uso conjunto de estos, se encuentran en estudio, requiriéndose la colabo-

ración entre el oftalmólogo y neurooncólogo para un adecuado análisis caso a caso<sup>(12,13)</sup>.

El diagnóstico se realiza principalmente mediante observación cuidadosa por biomicroscopía, complementándose habitualmente con ultrasonografía que demuestra una reflectividad mediana-baja, prefiriéndose en su evaluación el modo B que muestra la presencia de vacío ecogénico y excavación coroidal. El ultrasonido no sólo es útil para el examen de una lesión en presencia de catarata densa o hemorragia vítrea, sino que también puede ser útil en la medición de la elevación del tumor. En caso de sospecha de melanoma del iris, si no hay evidencia de crecimiento sostenido de la lesión, la biopsia con aguja fina de aspiración o biopsia convencional del iris a veces es necesaria para diferenciar un melanoma de iris de un nevus<sup>(44)</sup>.

#### **MELANOMA OCULAR: MECANISMOS DE ESCAPE A LA INMUNOVIGILANCIA**

Los tumores intraoculares en general y el melanoma uveal en particular, expresan antígenos tumorales específicos que son capaces de inducir tanto una respuesta inmune innata como adaptativa. Sin embargo, las células tumorales del melanoma uveal son capaces de emplear mecanismos para evadir ambas respuestas, los que curiosamente se asemejan a los mecanismo empleados para mantener el privilegio inmune<sup>(2)</sup>.

#### **INDOLAMINA 2,3 DIOXIGENASA (IDO)**

Los linfocitos T requieren del aminoácido triptófano para la sobrevivencia, expansión clonal y proliferación; en ausencia de éste mueren por apoptosis. La catálisis del triptófano por la enzima indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) es un paso limitante en su catabolismo. La depleción enzimática del triptófano limita la respuesta y activación de los linfocitos T<sup>(45)</sup>. La activación de LT CD4+ por IFN- $\gamma$  induce una regulación positiva de la expresión de IDO en

macrófagos y células presentadoras de antígeno<sup>(46)</sup>. Si bien IDO no afecta la sobrevivencia de las células NK, sí afecta su proliferación y actividad citolítica. Por lo tanto, IDO es capaz de afectar tanto la respuesta inmune innata como adaptativa<sup>(47)</sup>.

IDO se expresa en varios tejidos oculares: la retina, el iris y cuerpo ciliar, el cristalino y la córnea. Se plantea que la expresión de IDO en los tejidos oculares es uno de los mecanismos para mantener el inmunoprivilegio ocular; en la córnea se ha demostrado su rol en la sobrevivencia de los trasplantes de córnea<sup>(48)</sup>.

Se plantea que IDO induce inmunosupresión local a nivel ocular, el cual sería utilizado por los tumores intraoculares como un mecanismo de escape a la inmunovigilancia<sup>(49)</sup>. Estudios *in vitro* con líneas celulares de melanoma uveal determinaron que la exposición a IFN- $\gamma$  induce una regulación positiva de mRNA de IDO. El aumento en la expresión de IDO en células de melanoma uveal provoca un microambiente deficiente en triptófano, inhibiendo la proliferación de linfocitos T<sup>(50)</sup>.

### LIGANDO DE MUERTE PROGRAMADA 1 (PD-L1)

El receptor programado de muerte celular 1 (PD-1) pertenece a la familia CD28/CTLA-4. Se expresa en un conjunto de timocitos, linfocitos B y T activados y células mieloides<sup>(51)</sup>. PD-1 tiene dos ligandos: PD-L1 y PD-L2. Ambos ligandos son moléculas de membrana miembros de la familia B7<sup>(52)</sup>. PD-L1 se expresa en múltiples tejidos y es regulado positivamente por la citokina IFN- $\gamma$ . Además PD-L1 se expresa de forma constitutiva en células corneales.

La expresión de PD-L2 se limita a macrófagos y células presentadoras de antígeno profesionales. La unión de PD-1 a sus ligandos, PD-L1 o PD-L2, provoca la apoptosis de linfocitos T. La expresión de PD-L1 es crucial para la sobrevivencia de los trasplantes.

Estudios en líneas celulares de melanoma uveal reportaron la expresión constitutiva de PD-L1 en cinco de nueve líneas, observándose una inducción frente a la exposición a IFN- $\gamma$  en las nueve líneas. Por otro lado, la producción de IL-2 por linfocitos T activados se redujo al estar en cocultivo con células de melanoma uveal expuestas a IFN- $\gamma$ , recuperándose los niveles normales de IL-2 al adicionar bloqueadores de PD-L1 y PD-L2<sup>(53)</sup>. Tomando en conjunto estas evidencias, se puede afirmar que la alteración de los linfocitos T producida por las células de melanoma uveal es dependiente del mecanismo PD-1/PD-L1<sup>(2)</sup>.

### PROTEÍNAS REGULADORAS DEL COMPLEMENTO (CRP)

El sistema del complemento es controlado por las proteínas reguladoras del complemento, las cuales inactivan varias etapas de la cascada del complemento. Las CRP pueden ser de membrana o solubles. El factor acelerador del decaimiento (DAF: *decay accelerating factor*; CD55) junto a la proteína cofactor de membrana (MCP: *membrane cofactor protein*; CD46) son proteínas CRP expresadas en el ojo y que limitan el daño causado por la activación del complemento. Crry es el homólogo funcional de DAF y MCP en murinos; la administración *in utero* de anticuerpos antiCrry produce una inflamación intraocular severa y daños extensos en los tejidos oculares. Las CRP se expresan en la membrana celular de varios tejidos oculares y se encuentran en forma soluble en humor acuoso, protegiendo de la citólisis mediada por complemento a las células endoteliales de la córnea que carecen de CRP<sup>(54)</sup>.

Las células de melanoma uveal humano expresan tres CRP (CD46, CD55 y CD59), las que protegen *in vitro* de la citólisis mediada por complemento. La remoción enzimática *in vivo* de estas tres CRP vuelve susceptible a las células de melanoma uveal a la citólisis mediada por complemento. Por

otro lado, la citoquina TNF- $\alpha$  induce regulación positiva de CRP en algunas líneas celulares de melanoma uveal<sup>(55)</sup>.

### **RESISTENCIA A LA CITÓLISIS MEDIADA POR PERFORINAS**

Los linfocitos de pacientes con melanoma uveal en estadios avanzados producen mayor cantidad de IFN- $\gamma$ . Los niveles aumentados de IFN- $\gamma$  están asociados con el desarrollo de metástasis. Además el IFN- $\gamma$  es detectado con alta frecuencia en biopsias de melanoma uveal.

La citoquina IFN- $\gamma$  induce regulación positiva de moléculas MHC (clase I y II) y una mayor susceptibilidad de las células de melanoma uveal a la citólisis mediada por LT CD8+. Por otro lado, los pacientes con melanoma uveal primario que tienen una alta expresión de moléculas MHC clase I se correlacionan con un mal pronóstico.

Se han planteado diversas hipótesis para explicar este efecto paradójico del IFN- en la fisiopatología del melanoma uveal. El IFN- $\gamma$  induce la regulación positiva de dos moléculas inmunoinhibitorias en las células de melanoma uveal: IDO y PD-L1, las que pueden inhibir a los LTC.

En células de melanoma uveal *in vitro*, el IFN- $\gamma$  aumenta en cinco veces la expresión de moléculas MHC clase I, pero disminuye la susceptibilidad a los LTC CD8+ restringida por MHC clase I. IFN- $\gamma$  no afecta la capacidad de activación de los LT CD8+ como tampoco su capacidad de liberar gránulos de granzimas. Esto permite inferir que el efecto inhibitorio del IFN- $\gamma$  está focalizado en las células de melanoma uveal.

El paradigma actual para la citólisis mediada por LTC propone que las perforinas liberadas por los LTC se unen a la membrana de la célula *target*, perforan la membrana y facilitan el acceso de

granzima B (grB), la que induce apoptosis a través de la vía de las caspasas. El mecanismo protector de la citólisis de IFN- $\gamma$  en células de melanoma uveal es a través de una disminución de la habilidad de unión de la grB al receptor de la célula *target*. La citólisis mediada por células NK también es inhibida, tanto por el aumento de expresión de moléculas MHC clase I como por el aumento de IDO<sup>(56)</sup>.

### **BLOQUEO DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR FAS-L**

Los LTC y las células NK pueden eliminar células tumorales liberando perforinas, como se mencionó anteriormente, pero también mediante la unión a los receptores de muerte celular programada en las células *target*. Interesantemente, las células de melanoma uveal expresan ambos, Fas y FasL, pero son resistentes a la apoptosis inducida por LTC o células NK vía Fas/FasL. Las células de melanoma uveal expuestas a proteasas liberan una forma soluble de FasL, el que se une a sus receptores de forma autocrina; FasL soluble se une a su receptor de manera mil veces más eficiente que la forma unida a membrana. Esta secreción autocrina y unión de FasL soluble a Fas de las células de melanoma bloquea la unión de FasL expresado en membranas de LTC y células NK.

### **DESACTIVACIÓN DE LA INMUNOVIGILANCIA MEDIADA POR CÉLULAS NATURAL KILLER (NK)**

Los estudios *in vitro* en diferentes poblaciones de células de melanoma uveal han mostrado que éstas difieren en su sensibilidad a la citólisis mediada por células NK. Además las células de melanoma uveal presentan una morfología celular fusiforme menos maligna y expresan pocas o no expresan moléculas MHC clase I. Por inferencia se podría predecir la ausencia o baja expresión de moléculas MHC clase I en las células de melanoma uveal con morfología fusiforme, lo que coincide con el fenotipo tumoral de baja malignidad. Por el contrario, las células de

melanoma uveal epiteloide, un fenotipo asociado a alta malignidad, están típicamente asociadas con una alta expresión de moléculas MCH clase I<sup>(57)</sup>.

En síntesis, el ambiente intraocular contiene al menos tres moléculas que inhiben la actividad

de las células NK: a) MIF, b) TGF-B y e) IDO. Como se ha destacado, las células de melanoma uveal pueden elaborar al menos estas tres moléculas, lo que les permite escapar de la inmunovigilancia tumoral.

## REFERENCIAS

1. Teng MW, Swann JB, Koebel CM, Schreiber RD, Smyth MJ. Immune mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol* 2008;84:988-93
2. Jerry Y. Niederkorn. Immune escape mechanism of intraocular tumors. *Prog Retin Eye Res* 2009;28:329-47.
3. Albrecht von Graefes. Die Entwicklung der in fremden Grund versetzten lebenden Gewebe. *Archiv für Ophthalmologie* 1873;19:359-73.
4. Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 1948;29:58-69.
5. Ocular immune privilege and ocular melanoma: parallel universes or immunological plagiarism? Niederkorn JY. *Front Immunol* 2012;3:148.
6. Induction of anterior chamber-associated immune deviation requires an intact, functional spleen. Streilein JW, Niederkorn JYJ. *Exp Med*;153:1058-67.
7. Niederkorn JY. See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nat Immunol* 2006;7:354-9.
8. Camelo S, Kezic J, Shanley A, Rigby P, McMenamin PG. Antigen from the anterior chamber of the eye travels in a soluble form to secondary lymphoid organs via lymphatic and vascular routes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:1039-46.
9. Sherman SH, Green K, Laties AM. The fate of anterior chamber fluorescein in the monkey eye: the anterior chamber outflow pathways. *Exp Eye Res* 1978;27:159-73.
10. Bill, A. Ocular circulation. *Racv. Moses. Adler's physiology of the eye.* Mosby co, 1970:278-96.
11. Abi-Hanna D, Wakefield D, Watkins S. HLA antigens in ocular tissues. I. In vivo expression in human eyes. *Transplantation* 1988;45:610-3.
12. Le Discorde M, Moreau P, Sabatier P, Legeais JM, Carosella ED. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Hum Immunol* 2003;64:1039-44.
13. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995;270:1189-92.
14. Yamagami S, Kawashina H, Tsuru T. Role of Fas-Fas ligand interactions in the immunorejection of allogeneic mouse corneal transplants. *J. Transplantation* 1997;64:1107-11.
15. Saunders PA, Hendrycks VR, Lidinsky WA, Woods ML. PD-L2:PD-1 involvement in T cell proliferation, cytokine production, and integrin-mediated adhesion. *Eur J Immunol* 2005;35:3561-9.
16. Lee HO, Herndon JM, Barreiro R, Griffith TS, Ferguson TA. TRAIL: a mechanism of tumor surveillance in an immune privileged site. *J Immunol* 2002;169:4739-44.
17. Sohn JH, Kaplan HJ, Suk HJ, Bora PS, Bora NS. Chronic low level complement activation within the eye is controlled by intraocular complement regulatory proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*;41:3492-502.
18. Purushottam Jha, Jeong-Hyeon Sohn, Qin Xu, Yali Wang, Henry J. Kaplan, Puran S. Bora *et al.* Suppression of complement regulatory proteins (CRPS) exacerbates experimental autoimmune anterior uveitis (EAAU). *The Journal of Immunology* 2006;176:7221-31.
19. Taylor A, Namba K. In vitro induction of CD25+ CD4+ regulatory T cells by the neuropeptide alpha-melanocyte stimulating

- hormone (alpha-MSH). *Immunol Cell Biol* 2001;79:358-67.
20. Bora NS, Gobleman CL, Atkinson JP, Pepose JS, Kaplan HJ. Differential expression of the complement regulatory proteins in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:3579-84.
  21. Taylor AW, Yee DG. Somatostatin is an immunosuppressive factor in aqueous humor. *Invest ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2644-9.
  22. Sohn JH, Kaplan HJ, Suk HJ, Bora PS, Bora NS. Complement regulatory activity of normal human intraocular fluid is mediated by MCP, DAF, and CD59. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:4195-202.
  23. Yang-Hwan Ryu, Jae-Chan Kim. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human corneal cells as a local immunosuppressive factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4148-52.
  24. Beutelspacher SC, Pillai R, Watson MP, Tan PH, Tsang J, McClure MO *et al.* Function of indoleamine 2,3-dioxygenase in corneal allograft rejection and prolongation of allograft survival by over-expression. *Eur J Immunol* 2006;36:690-700.
  25. Niederkorn, JY. Anterior chamber-associated immune deviation and its impact on corneal allograft survival. *Curr Opin Organ Transplant* 11:360-5.
  26. Kaplan HJ, Streilein JW. Immune response to immunization via the anterior chamber of the eye. i. f. lymphocyte-induced immune deviation. *J Immunol* 1978;120:689-93.
  27. Wilbanks GA, Streilein JW. Fluids from immune privileged sites endow macrophages with the capacity to induce antigen-specific immune deviation via a mechanism involving transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol* 1992;22:1031-6.
  28. Wang Y, Goldschneider I, O'Rourke J, Cone RE. Blood mononuclear cells induce regulatory nk t thymocytes in anterior chamber-associated immune deviation. *J Leukoc Biol* 2001;69:741-6.
  29. Cone RE, Chattopadhyay S, O'Rourke J. Control of delayed-type hypersensitivity by ocular- induced CD8+ regulatory t cells. *Chem Immunol Allergy* 2008;94:138-49.
  30. Ashour HM, Niederkorn JY. Expansion of B cells is necessary for the induction of T-cell tolerance elicited through the anterior chamber of the eye. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;144:343-6.
  31. Li X, Taylor S, Zegarelli B, Shen S, O'Rourke J, Cone RE. The induction of splenic suppressor T cells through an immune-privileged site requires an intact sympathetic nervous system. *J Neuroimmunol* 2004;153:40-9.
  32. Mochizuki M, Sugita S, Kamoi K. Immunological homeostasis of the eye. *Prog Retin Eye Res* 2013 Mar;33:10-27.
  33. Niederkorn JY. Immune escape mechanisms of intraocular tumors. *Prog Retin Eye Res* 2009;28:329-47.
  35. De Buen S, Olivares ML, Charlín C. Leiomyoma of the iris. Report of a case. *Br J Ophthalmol* 1971;55:353-6.
  36. Singh AD, Topham A. Survival rates with uveal melanoma in the United States: 1973-1997. *Ophthalmology* 2003;110:962-5.
  37. Singh AD, Bergman L, Seregard S. Uveal melanoma: epidemiologic aspects. *Ophthalmol Clin North Am* 2005;18:75-84.
  38. Aoyama T, Mastrangelo MJ, Berd D, Nathan FE, Shields CL, Shields JA *et al.* Protracted survival after resection of metastatic uveal melanoma. *Cancer* 2000;89:1561-8.

39. Singh AD, Turell ME, Topham AK. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology* 2011;118:1881-5.
40. Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA. Dormancy of metastatic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010;23:41-56.
41. Blanco PL, Lim LA, Miyamoto C, Burnier MN. Uveal melanoma dormancy: an acceptable clinical endpoint? *Melanoma Res* 2012;22:334-40.
42. Coupland SE, Damato B. Understanding intraocular lymphomas. *Clin Experiment Ophthalmol* 2008;36:564-78.
43. Chi-Chao Chan, Dana J, Wallace BS. Intraocular lymphoma: update on diagnosis and management. *Cancer Control* 2004;11:285-95.
44. Faia LJ, Chi-Chao Chan. Primary intraocular lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:1228-32.
45. Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Battista GF. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med* 2002;196:459-68.
46. Takikawa O, Littlejohn T, Jamie JF, Walker MJ, Truscott RJ. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase, the first enzyme in UV filter biosynthesis in the human lens. Relevance for senile nuclear cataract. *Adv Exp Med Biol* 1999;467:241-5.
47. Della Chiesa M, Carlomagno S, Frumento G, Balsamo M, Cantoni C, Conte R *et al.* The tryptophan catabolite l-kynurenine inhibits the surface expression of nkp46- and nkg2d-activating receptors and regulates nk-cell function. *Blood* 2006;108:4118-25.
48. Beutelspacher SC, Pillai R, Watson MP, Tan PH, Tsang J, McClure MO *et al.* Function of indoleamine 2,3-dioxygenase in corneal allograft rejection and prolongation of allograft survival by over-expression. *Eur J Immunol* 2006;36:690-700.
49. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N *et al.* Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003;9:1269-74.
50. Chen PW, Ksander BR. Influence of immune surveillance and immune privilege on formation of intraocular tumors. *Chem Immunol Allergy* 2007;92:276-89.
51. Nishimura H, Honjo T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol* 2001;22:265-8.
52. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001;2:261-8.
53. Yang W, Chen PW, Li H, Alizadeh H, Niederkorn JY. PD-L1: PD-1 interaction contributes to the functional suppression of T-cell responses to human uveal melanoma cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2518-25.
54. Hargrave SL, Mayhew E, Hegde S, Niederkorn J. Are corneal cells susceptible to antibody-mediated killing in corneal allograft rejection? *Transpl Immunol* 2003;11:79-89.
55. Goslings WR, Prodeus AP, Streilein JW, Carroll MC, Jager MJ, Taylor AW. A small molecular weight factor in aqueous humor acts on C1q to prevent antibody-dependent complement activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:989-95.

56. Raja SM, Metkar SS, Froelich CJ. Cytotoxic granule-mediated apoptosis: unraveling the complex mechanism. *Curr Opin Immunol* 2003;15:528-32.
57. Vetter CS, Groh V, Thor SP, Spies T, Brocker EB, Becker JC. Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma. *J Invest Dermatol* 2002;118:600-5.
58. Cassoux N, Giron A, Bodaghi B, Tran TH, Baudet S, Davy F *et al.* IL-10 measurement in aqueous humor for screening patients with suspicion of primary intraocular lymphoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3253-9.
59. Saleh M, Nikolitch K, Bourcier T, Speeg C, Gaucher D. Repeated IL-10 measurement in aqueous humor and OCT imaging are valuable tools to monitor intraocular lymphoma treated with intravitreal injections of methotrexate. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012;250:761-4.
60. Apte RS, Niederkorn JY. Isolation and characterization of a unique natural killer cell inhibitory factor present in the anterior chamber of the eye. *J Immunol* 1996;156:2667-73.
61. Hallermalm K, De Geer A, Kiessling R, Levitsky V, Levitskaya J. Autocrine secretion of fas ligand shields tumor cells from fas-mediated killing by cytotoxic lymphocytes. *Cancer Research* 2004;64:6775-82.

#### **CORRESPONDENCIA**

Cristhian A. Urzúa Salinas  
Servicio de Oftalmología  
Hospital Clínico Universidad de Chile  
Santos Dumont 999, Independencia, Santiago  
Fonos: 2978 8866 / 8 310 9686  
E-mail: cristhianurzua@gmail.com

