

monografías
dr. antonio esteve

36

NUEVAS
PERSPECTIVAS
EN INMUNOTERAPIA

Manel Juan

NUEVAS PERSPECTIVAS EN INMUNOTERAPIA

Manel Juan

©2012, Fundación Dr. Antonio Esteve
Llobet i Vall-Llosera 2. E-08032 Barcelona
Teléfono: 93 433 53 20; fax: 93 450 48 99

Dirección electrónica: fundacion@esteve.org
Dirección URL: <http://www.esteve.org>

Depósito legal: B.12833-12
ISBN: 978-84-938163-0-2

La Fundación Dr. Antonio Esteve, establecida en 1983, contempla como objetivo prioritario el estímulo del progreso de la farmacoterapéutica por medio de la comunicación y la discusión científica.

La Fundación quiere promover la cooperación internacional en la investigación farmacoterapéutica y, a tal fin, organiza reuniones internacionales multidisciplinares donde grupos reducidos de investigadores discuten los resultados de sus trabajos. Estas discusiones se recogen en diferentes formatos de publicación, como los Esteve Foundation Symposia y los Esteve Foundation Discussion Groups.

Otras actividades de la Fundación Dr. Antonio Esteve incluyen la organización de reuniones dedicadas a la discusión de problemas de alcance más local y publicadas en formato de monografías o cuadernos. La Fundación participa también en conferencias, seminarios, cursos y otras formas de apoyo a las ciencias médicas, farmacéuticas y biológicas, entre las que cabe citar el Premio de Investigación que se concede, con carácter bienal, al mejor artículo publicado por un autor español dentro del área de la farmacoterapia.

Entre la variedad de publicaciones que promueve la Fundación Dr. Antonio Esteve cabe destacar la serie Pharmacotherapy Revisited, en cuyos diferentes volúmenes se recopilan, en edición facsímil, los principales artículos que sentaron las bases de una determinada disciplina.

Tanto la introducción como los artículos y discusiones de la presente monografía recogen la opinión de los correspondientes autores, por lo que la Fundación Dr. Antonio Esteve no se hace necesariamente partícipe de su contenido. Los diferentes capítulos corresponden a las ponencias presentadas en la mesa redonda organizada por la Fundación Dr. Antonio Esteve en Barcelona (Hotel Front Marítim), el día 29 de abril de 2011, que estuvo moderada por Manel Juan.

Nuevas perspectivas en inmunoterapia

M. JUAN
Introducción IX

M. JUAN
Inmunoterapias biológicas:
realidades, ideas de futuro
y controversias 1

L. ÁLVAREZ-VALLINA
Generación de nuevas estrategias
con anticuerpos monoclonales 9

A. GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ,
M. PELETEIRO-OLMEDO, T. LOZANO-FERNÁNDEZ,
R. SIMÓN-VÁZQUEZ Y B. DÍAZ-FREITAS
Nanotecnología
y sistema inmunitario 21

D. BENÍTEZ-RIBAS
Inmunoterapia celular
para modular la
respuesta inflamatoria 35

A. RIBAS
Inmunoterapia contra
el cáncer en melanoma 45

L. GRAÇA
Inducción de tolerancia
para la alergia 51

F. LEÓN, L. CRESPO Y G. CASTILLEJO
Inmunoterapias experimentales
para la enfermedad celíaca,
un modelo de autoinmunidad
inducida por la dieta 59

M. SOSPEDRA
Inmunoterapias en
esclerosis múltiple 71

M. PLANA
Vacunas contra el VIH 81

P. ALONSO
Vacunas contra la malaria 91

A. SÁNCHEZ-FUEYO
Utilización de marcadores
transcripcionales en el diagnóstico
de la tolerancia al injerto hepático 101

Debate general 109

Relación de participantes

PEDRO ALONSO

Centro de Investigación en Salud
Internacional de Barcelona (CRESIB)
Hospital Clínic de Barcelona
Universidad de Barcelona
Rosselló, 132 – 4.ª planta
08036 Barcelona
pedro.alonso@cresib.cat

LUIS ÁLVAREZ-VALLINA

Unidad de Inmunología Molecular
Hospital Universitario Puerta de Hierro
Manuel de Falla, 1
28222 Majadahonda, Madrid
lalvarezv.hpth@salud.madrid.org

JOSE ARAMBURU

Unitat d'Immunologia
Departament de Ciències Experimentals
i de la Salut
Universitat Pompeu Fabra
Dr. Aiguader, 88
08003 Barcelona
jose.aramburu@upf.edu

DANIEL BENÍTEZ-RIBAS

CIBER de Enfermedades Hepáticas
y Digestivas (CIBERehd)
Hospital Clínic de Barcelona
Villarroel, 170
08036 Barcelona
dbenitez@clinic.ub.es

FÈLIX BOSCH

Fundació Dr. Antoni Esteve
Llobet i Vall-Llosera, 2
08032 Barcelona
fbosch@esteve.org

ANTONIO CELADA

Institut d'Investigació Biomèdica (IRB)
Parc Científic de Barcelona
Baldri Reixac, 10
08028 Barcelona
acelada@ub.edu

MARGARITA DEL VAL

Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III
Ctra. de Majadahonda a Pozuelo, km 2
28220 Majadahonda, Madrid
mdval@cbm.uam.es

**PEDRO M. FRANCO
DE SARABIA**

Biotools, B & M Labs, S.A.
Valle de Tobalina, 52 - Nave 39
28021 Madrid
pedro@biotoools.net

ÁFRICA GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ

Inmunología
Centro de Investigaciones Biomédicas
(CINBIO)
Universidad de Vigo
Campus Lagoas Marcosende
36310 Vigo, Pontevedra
africa@uvigo.es

LUIS GRAÇA

Unidade de Inmunologia Celular
Instituto de Medicina Molecular
Faculdade de Medicina
Universidade de Lisboa
Av. Professor Egas Moniz
1649-028 Lisboa
Portugal
lgraca@fm.ul.pt

DOLORES JARAQUEMADA

Unitat d'Immunologia
Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona
Edifici M, Campus de la UAB
08193 Bellaterra, Barcelona
dolores.jaraquemada@uab.es

MANEL JUAN

Servei d'Immunologia
Hospital Clínic de Barcelona
Villarroel, 170
08036 Barcelona
mjuan@clinic.ub.es

CÁNDIDO JUÁREZ

Servei d'Immunologia
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Avda. Sant Antoni Maria Claret, 167
08025 Barcelona
cjuarez@santpau.cat

FRANCISCO LEÓN

Immunology Translational Medicine
Centocor R&D - Johnson & Johnson
200 Great Valley Parkway
Malvern, PA 19355-1307
USA
fleon@its.jnj.com

AURA MUNTASELL

Unitat d'Immunologia
IMIM - Hospital del Mar
Parc de Recerca Biomèdica
de Barcelona
Dr. Aiguader, 88
08003 Barcelona
aura.muntasell@upf.edu

CECILIA MUÑOZ

Servicio de Inmunología
Hospital La Princesa
Diego de León, 62
28006 Madrid
cmunoz.hlpr@salud.madrid.org

JAUME PIULATS

Departament de Ciències Experimentals
i de la Salut
Universitat Pompeu Fabra
Dr. Aiguader, 80
08003 Barcelona
jpiulats@ub.edu

MONTSERRAT PLANA

Laboratori de Retrovirologia i
Immunopatogènia Viral - IDIBAPS
Hospital Clínic de Barcelona
Villarroel, 170
08036 Barcelona
mplana@clinic.ub.es

NEUS PRATS

Departamento de Patología y Toxicología
Almirall, S.A.
Laureà Miro, 408-410
08980 Sant Feliu de Llobregat,
Barcelona
neus.prats@almirall.com

RICARDO PUJOL

Unitat d'Immunologia
Hospital Universitari
Germans Trias i Pujol - UAB
Ctra. Canyet, s/n
08916 Badalona, Barcelona
ricardo.pujol@uab.cat

ANTONI RIBAS

Department of Medicine -
Hematology/Oncology
University of California Los Angeles and
Jonsson Comprehensive Cancer Center
11-934 Factor Building
10833 Le Conte Avenue
Los Angeles, CA 90095-1782
USA
aribas@mednet.ucla.edu

FRANCISCO RUIZ-CABELLO

Servicio de Análisis Clínicos
e Inmunología
Hospital Universitario
Virgen de las Nieves
Avda. de las Fuerzas Armadas, 2
18012 Granada
francisco.ruizcabello.sspa@
juntadeandalucia.es

ALBERTO SÁNCHEZ-FUEYO

Servei d'Hepatologia - IDIBAPS
CIBER de Enfermedades Hepáticas
y Digestivas (CIBERehd)
Hospital Clínic de Barcelona
Villarroel, 170
08036 Barcelona
afueyo@clinic.ub.es

ELISABET SERÉS

Fundació Dr. Antoni Esteve
Llobet i Vall-Llosera, 2
08032 Barcelona
eseres@esteve.org

MIREIA SOSPEDRA

Institute for Neuroimmunology
and Clinical MS-Research (INIMS)
University Clinic Eppendorf
Falkenried, 94
D-20251 Hamburg
Germany
mireia.sospedra@zmnh.uni-hamburg.de

RAMON VILELLA

Servei d'Immunologia
Hospital Clínic de Barcelona
Villarroel, 170
08036 Barcelona
rvilella@clinic.ub.es

JORDI YAGÜE

Servei d'Immunologia
Hospital Clínic de Barcelona
Villarroel, 170
08036 Barcelona
jyague@clinic.ub.es

Introducción

La recopilación del contenido de la reunión celebrada el 29 de abril de 2011, que a continuación se presenta en esta monografía, refleja claramente la diversidad de aproximaciones existentes que pretenden utilizar o modular la respuesta inmunitaria con fines terapéuticos (inmunoterapia). La participación de ponentes y asistentes en las discusiones tras cada presentación (que también se transcriben en esta monografía) complementan y contextualizan en su conjunto las magistrales exposiciones de los 11 ponentes; en todas estas discusiones, y sobre todo en la general, se expresaron de manera constructiva opiniones diversas (y en algunos casos contrapuestas) sobre las opciones de presente y futuro que brinda la inmunoterapia.

De hecho, las 11 presentaciones (y los capítulos de esta monografía) se agrupan conceptualmente en tres grandes bloques, aun sin establecer realmente ítems clasificatorios explicitados. El primer bloque incluye las conferencias más centradas en elementos metodológicos generales, la producción de anticuerpos monoclonales modificados y las opciones que aporta la nanotecnología. En el segundo grupo (el grueso de las charlas) se ofrecen ejemplos diversos de inmunoterapias en inflamación, alergia, cáncer y autoinmunidad, los principales componentes de la inmunopatología (sólo el tratamiento de las inmunodeficiencias quedó fuera del debate por limitación de tiempo y porque, en el fondo, este aspecto por sí solo merece ya una sesión en exclusiva). Así, se presentaron opciones inmunomoduladoras de la respuesta inflamatoria, inmunoterapia celular potenciadora antitumoral, trabajos para modular el exceso de respuesta de la alergia, la posibilidad de actuación sobre distintos aspectos de la fisiopatología de una enfermedad immuno-

mediada y la restauración de la tolerancia o el bloqueo efector en autoinmunidad. En el último bloque se abordó la inmunoterapia activa basada en la vacunación y el trasplante. Se comentaron los avances realizados en el proceso de obtención de vacunas terapéuticas y se expuso la situación de desarrollo de las vacunas frente a la malaria. La última ponencia planteó conceptos novedosos de farmacogenómica ante el rechazo en el trasplante de órganos (hígado).

La sesión concluyó con un interesante debate general, en el cual, al igual que en los debates entre sesiones y en la introducción de las intervenciones, se puso de manifiesto la complejidad y el carácter multidisciplinario de la inmunoterapia, y se discutieron elementos de debilidad, fortalezas, amenazas y oportunidades que se presentan en la actualidad, y lo harán en el futuro, ante el imparable desarrollo de las ya muy distintas y eficaces opciones inmunoterapéuticas.

Los participantes elogiaron este tipo de iniciativas, y aun siendo conscientes de que las 11 ponencias son insuficientes para abarcar todos los aspectos de la inmunoterapia, los comentarios tras la reunión van en la línea de haber cumplido con un nivel muy alto las expectativas puestas en el encuentro. Toca ahora a los lectores de esta monografía valorar si los datos que se presentan en ella también son útiles más allá de la reunión. En todo caso, la imparable evolución de la inmunoterapia garantiza que, en un futuro no muy lejano, será útil otra revisión del estado de las aplicaciones inmunoterapéuticas, puesto que muchas ya no serán “nuevas perspectivas” sino “realidades” en inmunoterapia.

*Manel Juan
Abril de 2011*

Inmunoterapias biológicas: realidades, ideas de futuro y controversias

M. Juan

Servei d'Immunologia, Hospital Clínic, Barcelona

Resumen: *La respuesta inmunitaria es una función fisiopatogénica determinante en infinidad de situaciones (infecciones, rechazo en el trasplante, alergias, enfermedades crónicas con base autoinmunitaria o inflamatoria, desarrollo de tumores, etc.) que determinan la salud o la enfermedad del ser humano. La inmunidad es una evidencia bien establecida, que se reafirma con fuerza por la creciente utilización de la inmunoterapia biológica. En la actualidad se dispone de muy diversas intervenciones inmunoterapéuticas: las vacunas clásicas (y no tan clásicas si tenemos en cuenta los “nuevos formatos”), los anticuerpos monoclonales o proteínas derivadas de moléculas del sistema inmunitario (conocidos bajo el término genérico de “fármacos biológicos”) y las terapias celulares. Estas últimas, mediante la modulación de la respuesta inmunitaria, constituyen un presente y un futuro, rompedor y prometedor respectivamente, en el escenario de la farmacoterapia. Sin embargo, las inmunoterapias biológicas presentan no sólo luces sino también sombras. A pesar de que sus trascendentes debilidades y amenazas deben ser afrontadas y resueltas, hay grandes fortalezas y oportunidades que plantean un futuro en el cual la inmunoterapia puede llegar a superar los ya espectaculares logros de la farmacología convencional.*

Palabras clave: Inmunoterapia – Vacunas – Celuloterapia – Citocinterapia – AcMoterapia – DAFO.

Introducción

La respuesta inmunitaria es una función fisiológica determinante de la estabilidad fisiológica (homeostasis) del individuo. La capacidad de reconocer lo que es propio, peligroso o extraño hace del sistema inmunitario un sistema fundamental para definir la identidad y el equilibrio del organismo. Como en otros organismos superiores, en el ser humano el sistema inmunitario ha desarrollado, sobre elementos de acción en cuanto a lo que es peligroso, el reconocimiento molecular específico de lo que le es extraño. Estas capacidades

de reconocimiento y actuación sobre lo peligroso o extraño son altamente eficientes para preservar no tan sólo al individuo sino sobre todo a la especie dentro del ecosistema biológico que nos rodea. Pero desgraciadamente el sistema inmunitario no es infalible, y tanto los microorganismos como las células tumorales encuentran sus “talones de Aquiles” para desarrollarse y generar muchas y diversas infecciones o tumores. A la vez, en el sistema inmunitario existen “errores”, ya sea por un fallo intrínseco de su capacidad de distinción entre lo propio y lo extraño (con lo cual lo propio es atacado como extraño, generando autoinmuni-

dad), como por el desarrollo de una respuesta excesiva no deseada (hipersensibilidad o alergia) o insuficiente (inmunodeficiencia); así, la patología humana debida al sistema inmunitario es muy prevalente. La participación de mecanismos fisiopatogénicos que involucran al sistema inmunitario es creciente, y pocas son las afecciones en que no desempeñe un papel definitorio o al menos importante. Por ello, la modulación de la respuesta inmunitaria como tratamiento (inmunoterapia) es, sin duda, una de las dianas terapéuticas más importantes de la medicina actual.

De hecho, quizás el logro más importante de la medicina moderna ha sido la erradicación de la viruela como enfermedad, mediante un tipo de inmunoterapia, la vacunación promovida por Edward Jenner a finales del siglo XVIII. Pero si bien la vacunación contra la viruela tuvo la fortuna de actuar sobre una respuesta antiinfecciosa muy robusta basándose en la observación de procesos protectores existentes, la inmunoterapia en general no ha encontrado un sitio preeminente en el tratamiento médico hasta el desarrollo científico actual; la ciencia molecular y celular ha encontrado en la inmunología una oportunidad de desarrollo global que en el campo médico ha permitido definir aproximaciones inmunoterapéuticas útiles para un sinnúmero de enfermedades (Tabla I).

Tanto el uso de moléculas del sistema inmunitario (inmunoglobulinas y derivados con función anticuerpo) como el de células (inmunoterapia celular) está revolucionando las opciones de tratamiento de enfermedades en las cuales los fármacos convencionales a veces sólo actuaban sobre los síntomas. En todo caso, aproximaciones más "clásicas", como las vacunas o el trasplante, también están en la frontera de esta revolución promovida por el conocimiento molecular y celular, y estas nuevas aproximaciones aplicadas sobre opciones de tratamiento establecidas están renovando su utilidad terapéutica.

En la reunión de donde surge esta monografía se presentaron a discusión conceptos de inmunoterapia tan distintos como diversas son las enfermedades sobre las cuales se pre-

tende actuar. Así, empezando con aspectos metodológicos para la producción de anticuerpos monoclonales o de escalado molecular (nanotecnología), se abordarán aproximaciones celulares y moleculares de inmunoterapia para frenar la respuesta inflamatoria, inducir la respuesta antitumoral, "bloquear" la alergia o la autoinmunidad, mejorar la respuesta antiinfecciosa o conocer mejor cómo hacer más efectivo el trasplante de órganos, que tiene en el sistema de reconocimiento de lo extraño (rechazo) una de las principales limitaciones de su éxito.

En todas las presentaciones se evidenciaron los avances que se han producido y que previsiblemente pueden producirse en el campo de la inmunoterapia, a menudo de una manera concreta centrándose en los campos sobre los que proponen sus aplicaciones, pero es evidente que en todos ellos hay elementos comunes, no sólo de sus bondades ("luces") sino también de sus limitaciones ("sombras"), que merecen ser abordados en esta introducción. Aquí, como autor de esta reflexión, sólo pretendo presentar un análisis personal de estas "luces y sombras" de la inmunoterapia, valorando debilidades y amenazas que deben ser afrontadas y resueltas, junto a las fortalezas y oportunidades que hacen de la inmunoterapia una de las opciones más prometedoras para el tratamiento de muchas de las enfermedades que condicionan el bienestar de la humanidad.

Aproximación metodológica

El presente análisis global de la inmunoterapia se basa en la aplicación estratégica de la herramienta analítica DAFO (en inglés SWOT), acrónimo derivado de las siglas de los conceptos "Debilidades", "Amenazas", "Fortalezas" y "Oportunidades", que se usa para analizar de manera estructurada y simple una empresa, una propuesta de negocio, una realidad conceptual o un área de actuación antes de proponer acciones concretas para optimizarla. El análisis DAFO organiza los elementos en una tabla de 2 x 2 en la cual se sitúan en

TABLA I. Grupos de aproximaciones inmunoterapéuticas y algunos ejemplos con efectos concretos.

Grupo	Ejemplos	Efecto buscado
Inmunopotenciación activa (vacunas “clásicas”)	Viruela	Erradicación
	Tétanos	Evitar la clínica
Inmunoterapia en alergias (“vacunas” de las alergias)	Alergia al veneno de avispa	Evitar la anafilaxia
Transferencia pasiva de Ig (infusión de Ig o anticuerpos)	Inmunodeficiencia primaria humoral	Protección humoral
	Púrpura trombocitopénica idiopática (y otras enfermedades autoinmunitarias)	Inmunomodulación y mejoría clínica
Trasplante de progenitores hematopoyéticos	Leucemia/linfoma	Eliminación del tumor
	Inmunodeficiencias primarias celulares	Reconstitución inmunitaria
Fármacos inmunoinhibidores (inmunosupresores)	Artritis reumatoide	Contención de la clínica
	Rechazo en el trasplante	Preservación del injerto
Celuloterapia	Melanoma	Eliminación del tumor
	Enfermedad inflamatoria intestinal	Contención de la clínica
Citocinterapia	IL-2	Tratamiento antihipernefroma
	IFN- α	Tratamiento de la hepatitis C crónica
	G-CSF	Recuperación de neutropenia
	IL-1RA	Control de la autoinflamación
Terapia con anticuerpos monoclonales (AcMoterapia)	Anti-CD3	Control del rechazo
	Anti-EGFR	Antitumoral
	Anti-TNF	Mejora sintomatológica de la artritis reumatoide y de la enfermedad inflamatoria intestinal
	Anti-IgE	Tratamiento del asma alérgica grave
Terapia génica	Inmunodeficiencia combinada grave asociada	Reconstitución inmunitaria en una inmunodeficiencia primaria no trasplantable
	Enfermedad granulomatosa crónica	

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; G-CSF: factor estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos; IFN- α : interferón alfa; Ig: inmunoglobulina; IL-2: interleucina-2; IL-1RA: receptor antagonista de la interleucina-1; TNF: factor de necrosis tumoral.

un eje los aspectos “positivos” (fortalezas y oportunidades) y “negativos” (debilidades y amenazas) y en el otro eje los elementos “internos” (debilidades y fortalezas) respecto a los “externos” (amenazas y oportunidades).¹

Aunque últimamente está denostado por muchos expertos en marketing, que son quienes lo introdujeron, es una herramienta de análisis lógico para situar cualquier aspecto antes de tomar decisiones estratégicas.

Debilidades	<ul style="list-style-type: none"> • Conocimiento reducido de la fisiopatología del sistema inmunitario • Pocos inmunólogos y centros • Compleja red de interacciones • Variabilidad interpersonal de la patología y las respuestas • “Biológicos” como fármacos no clásicos • Falta de monitorización • Costes de producción 	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de “elementos” de por sí “naturales” y versátiles • Bioseguridad general • Muchas posibilidades de inmunointervención: múltiples dianas, “multiterapia” combinada... • Personalización terapéutica intrínseca 	Fortalezas
Amenazas	<ul style="list-style-type: none"> • Normativa farmacológica aplicada a la inmunoterapia • Restricciones presupuestarias • “Interés” de la industria farmacéutica • “Miedos” ante la complejidad y el cambio de paradigma terapéutico 	<ul style="list-style-type: none"> • Necesidad de reorientar la estrategia sanitaria ante la crisis económica • Percepción general de que el sistema inmunitario es clave para la salud en el entorno 	Oportunidades

Figura 1. Análisis DAFO (Debilidades, Amenazas, Fortalezas, Oportunidades) personal y limitado.

Resultados del análisis DAFO (Fig. 1)

Conceptualmente la inmunoterapia es un amplio concepto y, como tal, de algún modo difuso, por lo que el análisis a menudo debe centrarse en las aproximaciones concretas propuestas. Así, diferenciaremos la inmunomodulación activa de las vacunas o de la terapia celular (en adelante celuloterapia) de la pasiva que en general aporta el tratamiento con moléculas con capacidad inmunoterapéutica (los llamados “fármacos biológicos”), que principalmente incluyen los tratamientos con citocinas, sus receptores y análogos de unas y otros (al cual, por simplificar, en adelante me referiré como “citocinterapia”), y sobre todo con anticuerpos monoclonales (AcMo como acrónimo, que utilizaremos para crear el término “AcMoterapia”).

Debilidades de la inmunoterapia

Son limitantes intrínsecos de la inmunoterapia la falta de conocimiento general de muchos mecanismos inmunitarios que a menudo son redundantes o pleiotrópicos, y por tanto inmersos en una red de amplias interacciones en un individuo, diverso no sólo respecto a su

genética sino también en cuanto a su experiencia en el reconocimiento del entorno. No tener en cuenta esta red funcional y pensar en un efecto fármaco-diana puede llevar a una falta de efecto o a fenómenos no deseables (por ejemplo, la aparición de inmunodeficiencias graves que conlleven infecciones que pongan en peligro la vida del individuo tratado). De hecho, incluso la utilización de modelos experimentales para esta valoración sin tener en cuenta las importantes diferencias con los pacientes (por ejemplo, son bien conocidas las diferencias entre los sistemas inmunitarios de los ratones y de los humanos)² puede llevar a conclusiones erróneas, con graves consecuencias cuando se llevan a término los ensayos clínicos pertinentes. Pero es que, además, la variación en la “experiencia antigénica” del individuo es también un elemento inherente del sistema inmunitario. Está claro que niños, adultos y viejos responden de manera diversa, y también está establecido que determinadas experiencias antigénicas determinan diferentes respuestas.

En el campo de las vacunas, la inducción de la respuesta inmunitaria es intrínsecamente un elemento muy variable, y la efectividad depende del efecto sobre la población diana.

Algunas vacunas efectivas sobre los adultos resultan poco eficientes en la contención de enfermedades que se inician a temprana edad. El caso de la primera vacuna SPf66 contra la malaria fue un paradigma en este sentido.³

En cuanto a los tratamientos celulares, la preparación in situ del elemento a introducir como terapia necesita de la formación específica en el centro promotor de la terapia, y este factor puede dar lugar a diferencias trascendentes entre los centros y condicionar la verificabilidad de la efectividad del tratamiento. Además, a menudo los tratamientos celulares tienen dos componentes, uno más o menos “homogeneizable” (el modulador, estimulante o inhibidor de la respuesta in vitro), y otro más heterogéneo obtenido del propio individuo. Así pues, la variabilidad en la celuloterapia difícilmente es evitable, y su consideración como fármaco en lugar de como una actuación médica similar a la quirúrgica, o a las de la medicina intervencionista, en el fondo convierte esta debilidad en una amenaza para la implantación de dichas técnicas.

Por su lado, los agentes “biológicos” están siendo considerados fármacos en su concepto más clásico. Se utilizan como cualquier otra sustancia química basándose en dosis de eficacia establecida, sin tener en cuenta que su función puede variar según el estado de la diana. La monitorización de las concentraciones del “fármaco”, de la cantidad de la diana e incluso de la capacidad del propio sistema inmunitario para generar anticuerpos “antifármaco” es en general menospreciada, aunque en los últimos años van apareciendo estudios que demuestran su interés. En este sentido, algunas situaciones son flagrantes: por ejemplo, el fin buscado con el uso de anti-CD20 es muy distinto cuando lo que se pretende es tratar un linfoma B que cuando se quiere inducir una inmunomodulación en una respuesta autoinmunitaria; sólo una buena monitorización del “fármaco” (por ejemplo, rituximab en suero), de la diana (cantidad de linfocitos B)⁴ y de los anticuerpos antifármaco (antirrituximab) podrá permitir un uso terapéutico eficiente.

La aparición de respuesta antifármaco en la AcMoterapia es también una debilidad de

estas aproximaciones, no tan sólo frente a los anticuerpos o moléculas quiméricas sino también incluso al emplear anticuerpos humanizados (aunque las empresas farmacéuticas productoras lo nieguen). Siempre hay regiones “extrañas” en estos “fármacos”, aunque sólo sea la región de reconocimiento (idiotipo), y frente a ella el organismo puede desarrollar una respuesta bloqueante.

En general, la monitorización de la inmunoterapia con “biológicos” y el “desarrollo” de la celuloterapia requieren personal bien formado en el tema, e incluso aunque los inmunólogos pudieran considerarse los especialistas adecuados para este fin, su formación en estos aspectos y su limitado número constituye en la actualidad una debilidad muy importante de estos enfoques terapéuticos.

Por último, cabe comentar que el coste de producción de los “biológicos” es todavía hoy extremadamente alto, aun cuando constituyen ya una de las áreas de negocio más prósperas de las compañías farmacéuticas que los producen. La producción química de fármacos con el “escalado” consigue reducciones muy importantes de los costes, pero por el momento los “inmunoterápicos” siguen teniendo unos costes de producción altos que conllevan precios de venta altos y una clara limitación de sus aplicaciones.

Amenazas de la inmunoterapia

La normativa farmacológica aplicada a la inmunoterapia es quizás una de las limitaciones externas más importantes. Específicamente en el caso de las celuloterapias, los conceptos de bioseguridad y de desarrollo de productos farmacológicos “chirrían” al intentar aplicarlos. Las agencias reguladoras de medicamentos aplican normas y controles similares a los centros que desarrollan estas terapias, como si se tratará de “fábricas productoras de fármacos convencionales”. Parece haber interés en que no se consideren “intervenciones médicas” que queden lejos del control productivo de la industria. Está bien establecido su amplio margen de bioseguridad (las celuloterapias son extraordinariamente poco tóxicas),

y por el momento la normativa lo único que hace es poner trabas a procedimientos potencialmente terapéuticos, poco o nada tóxicos, y con costes económicos en general bajos, una vez realizadas las necesarias inversiones iniciales.

El aspecto económico en general es uno de los principales limitantes actuales de la inmunoterapia. Por un lado, los “fármacos biológicos” tienen unos costes altos y, en situaciones de crisis como la actual, los esfuerzos se centran más en la disminución de sus indicaciones (restricción en las indicaciones *off-label*) que en la racionalización de su uso mediante la monitorización de sus concentraciones y su efectividad. De hecho, en este aspecto la propia industria farmacéutica previsiblemente se equivoca cuando, por proteger sus intereses inmediatos, no aboga por esta racionalización de la dosificación de los “biológicos” que a largo plazo justificaría su utilización más general. En el fondo, la industria sólo está impulsando inmunoterapias bajo el concepto clásico de “fármaco-indicación”.

Por último, debemos comentar que la complejidad en el uso de todas estas terapias se acompaña de determinados “miedos” por parte de la comunidad médica. A menudo se generan alarmas por efectos indeseados en algunos individuos tratados que bloquean opciones terapéuticas claramente eficaces: desde los grupos de presión “antivacunas” hasta el “freno” a corto o largo plazo de determinadas aproximaciones cuando algunos individuos se ven afectados por efectos no previstos; este último caso se ejemplifica con la inmunoterapia génica en los inmunodeficientes, en quienes la aparición de determinadas leucemias supuso la interrupción durante años de programas que son posibilidades curativas claras en individuos sin otra opción.

Oportunidades de la inmunoterapia

Si bien las limitaciones económicas han sido y son amenazas actuales al desarrollo de la inmunoterapia, también ofrecen una inesperada oportunidad al desarrollo de inmunoterapias

que, como las celulóterapias, tienen un coste postratamiento que puede llegar a ser bajo. El coste de éstas se centra principalmente en el desarrollo, la implantación de las instalaciones y la necesidad de mano de obra especializada, pero una vez todo ello está disponible pueden y deben permitir tratamientos personalizados seguros y de bajo coste (de manera similar al bajo coste de las vacunaciones).

“Madurez” e “innovación” se juntan en la percepción que se tiene de la inmunoterapia: por un lado está la “madurez” otorgada por los logros de las vacunaciones clásicas, y por otro la potencia “innovadora” de las nuevas aproximaciones que con éxito están mejorando la salud de infinidad de pacientes. Además, la inmunoterapia se está viendo efectiva ya en esta etapa que puede considerarse para muchas de sus aproximaciones como de “infancia”. En comparación con las opciones de posibles dianas, las dianas actuales y los enfoques propuestos son aún escasos. El sistema inmunitario tiene miles de moléculas sobre las cuales actuar y, si consideramos la especificidad, las opciones se convierten en millones⁵ (una magnitud desconocida en otras áreas biológicas). El desarrollo de nuevas metodologías y el conocimiento genómico de los pacientes abrirán sin duda opciones de tratamiento sólo intuitivas, y quizás otras que por el momento ni tan siquiera son sospechadas.

La percepción del sistema inmunitario como eje central en la salud del individuo trasciende ya a la ciencia, y la sociedad empieza a entender que sin duda es uno de los elementos sobre los que cabe actuar para potenciar la salud de la población. En el fondo, la capacidad de interacción del individuo con el ambiente encuentra en el sistema inmunitario un vehículo en el que se unen salud y entorno.

Fortalezas de la inmunoterapia

La inmunoterapia tiene como principal fortaleza que se basa en la utilización de elementos constitutivos del organismo, y por ello sus elementos básicos están presentes en la natu-

raleza. Aunque las precauciones son muchas (e incluso también los “miedos”) por su corto tiempo de uso y la complejidad de la red fisiopatogénica sobre la cual se actúa, las posibilidades de la inmunoterapia son extraordinarias. Partiendo del hecho de que a pesar de la “infancia” los resultados obtenidos son incuestionables, la baja toxicidad de prácticamente todas estas aproximaciones y la amplia implicación del sistema inmunitario en la gran mayoría de las enfermedades posicionan la inmunoterapia como una esperanza de salud para muchos pacientes.

En el fondo, sólo las mencionadas precauciones (algunas basadas en el desconocimiento) y el planteamiento meramente farmacológico de la mayoría de las propuestas explican que, por el momento, no se hayan planteado propuestas de “terapia múltiple”: mientras que la “multiterapia” está siendo aplicada con éxito con antineoplásicos o con regímenes de tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, por el momento no hay propuestas de multiinmunoterapia a pesar de que el conocimiento apunta a la efectividad de, por ejemplo, conjugar estimulaciones antigénicas (“vacunas”) con modulación con citocinterapia (por ejemplo inmunomodulación de respuesta contra alérgenos con células dendríticas tratadas en el contexto de citocinas que promuevan una respuesta Th1). En realidad, otra de las fortalezas de la inmunoterapia es la diversidad de posibilidades terapéuticas: es posible estimular, inhibir o regular la respuesta introduciendo cambios potencialmente modulables. Por ello, puede ser necesaria la combinación de estrategias inmunoterapéuticas para conseguir los efectos deseados.

Por último hay que citar también, como fortaleza de la inmunoterapia, la posibilidad de adaptarse a cada individuo a lo largo de su vida, en el fondo como ya hace el sistema inmunitario en el individuo sano. Así pues, si en alguna área la medicina personalizada tiene potencial de futuro, ésta sin duda será la inmunoterapia, puesto que es un elemento intrínseco a su función natural.

Comentarios y conclusiones

A partir de este análisis DAFO cabe plantearse qué acciones podrían llevarse a cabo para que la inmunoterapia supere sus debilidades, y sobre todo las amenazas, que la limitan, a la vez que para potenciar sus fortalezas en busca de mayores oportunidades de desarrollo.

Sin duda son acciones a corregir el bajo número de expertos inmunólogos y centros dedicados a la inmunoterapia, una limitación especialmente importante en nuestro país. Sólo el conocimiento y la racionalización que éste puede aportar permitirán un desarrollo progresivo y eficiente de la inmunoterapia. Y para ello son necesarios medios humanos y materiales que vayan más allá de proyectos de investigación y apliquen ya opciones terapéuticas bien refrendadas.

A la vez, la mejora del conocimiento abrirá nuevas opciones que permitirán mejorar la salud de la población de manera personalizada y adaptada a la fisiopatología de las diversas enfermedades.

En conclusión, con estas reflexiones personales espero aportar elementos de partida que enriquezcan las presentaciones de los expertos participantes en la jornada *Nuevas perspectivas en inmunoterapia*, ahora en forma de monografía.

Bibliografía

1. Armstrong JS. Review of corporate strategic planning. *Journal of Marketing*. 1990;54:114-9.
2. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*. 2004;172:2731-8.
3. Alonso PL, Smith T, Schellenberg JR, Masanja H, Mwankusye S, Urasa H, et al. Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet*. 1994;344:1175-81.
4. Vital EM, Rawstron AC, Dass S, Henshaw K, Madden J, Emery P, et al. Reduced-dose rituximab in rheumatoid arthritis: efficacy depends on degree of B cell depletion. *Arthritis Rheum*. 2011;63:603-8.

5. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol.* 2011;29:917-24.

Generación de nuevas estrategias con anticuerpos monoclonales

L. Álvarez-Vallina

Unidad de Inmunología Molecular, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda (Madrid)

Resumen: *La presión evolutiva ha seleccionado los anticuerpos como moléculas clave del sistema inmunitario en la defensa frente a los patógenos. Sin embargo, el desarrollo de las tecnologías para generar anticuerpos monoclonales ha permitido su uso generalizado como agentes diagnósticos y terapéuticos en numerosas enfermedades, incluyendo el cáncer. Al contrario que las neoplasias hematológicas, los tumores sólidos han demostrado ser relativamente resistentes a la acción de los anticuerpos monoclonales. En un intento de mejorar su eficacia antitumoral se han generado nuevos formatos de anticuerpos monoclonales recombinantes, que en principio imitaron la estructura de las inmunoglobulinas nativas y generaron anticuerpos fundamentalmente bivalentes y mono-específicos. En fechas más recientes se han desarrollado nuevos formatos de anticuerpos multivalentes, con mayor capacidad de penetración tumoral, mediante la optimización de parámetros farmacocinéticos y funcionales. Éstos presentan una mayor eficacia antitumoral gracias a la incorporación de nuevas funciones efectoras. En este capítulo se revisan los recientes avances en el campo de la ingeniería de anticuerpos y las nuevas estrategias terapéuticas basadas en el uso de anticuerpos monoclonales recombinantes de tercera generación.*

Palabras clave: Anticuerpo monoclonal – Ingeniería de anticuerpos – Anticuerpo recombinante – Trimerbody.

Anticuerpos monoclonales

La estructura básica de un anticuerpo (Ac) está formada por dos cadenas proteicas pesadas (H), unidas entre sí por puentes disulfuro, y dos cadenas ligeras (L), igualmente idénticas entre sí, que se unen individualmente a cada una de las cadenas H por interacciones covalentes y no covalentes (Fig. 1). Los primeros 100 residuos de cada cadena son virtualmente distintos en cada molécula de Ac (región variable o V), mientras el resto de la cadena es idéntica en cada Ac de una determinada clase (región constante o C). La zona de unión con el antígeno (Ag) está formada

por tres segmentos peptídicos no colineales pertenecientes al dominio V_H y tres al dominio V_L , que se yuxtaponen para formar una superficie o cavidad (parátipo) donde se aloja la región del Ag reconocida por el Ac (epitopo). Los segmentos que lo forman reciben el nombre de “regiones hipervariables” o “regiones determinantes de la complementariedad” (CDR, *Complementary Determining Regions*). Cada molécula de Ac presenta tres regiones unidas por un segmento polipeptídico flexible denominado “región bisagra”,¹ que tiene una forma similar a una Y (Fig. 1A).

Hasta que se desarrollaron los anticuerpos monoclonales (AcMo) en el año 1975,² el uso

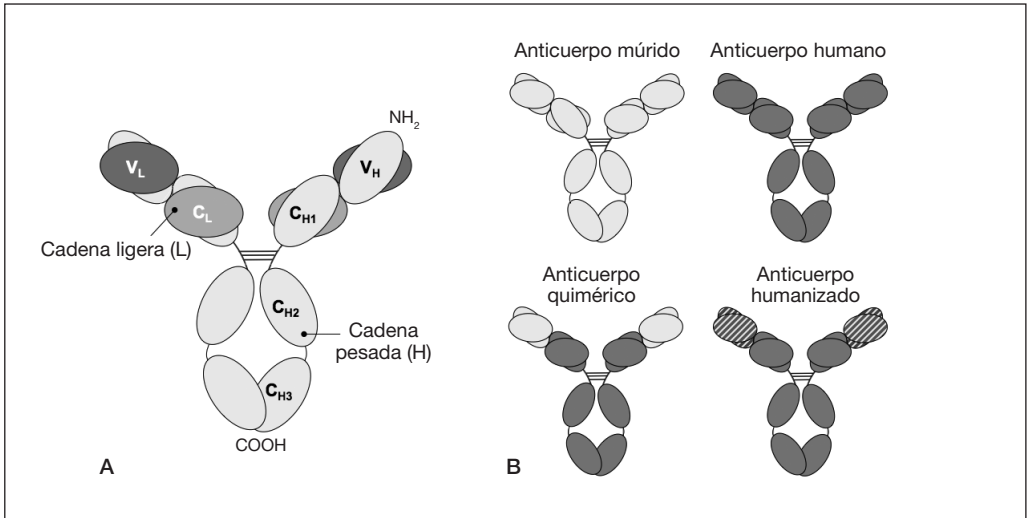


Figura 1. A) Estructura de un anticuerpo (Ac). Un Ac está formado por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), y contiene dos zonas variables (cada una compuesta por una región V_H y una V_L) que le confieren la especificidad de unión. El dominio Fc es la región efectora encargada de activar el complemento y de unirse a diferentes tipos celulares. B) Diagramas esquemáticos de diversos tipos de AcMo: múridos, humanos, quiméricos y humanizados.

clínico de Ac se centraba únicamente en la utilización de sueros policlonales, que contienen una “mezcla” de Ac procedentes de la activación de distintos clones de linfocitos B. El hibridoma es el resultado de la fusión de un linfocito B, procedente del bazo de un animal inmunizado con el Ag de interés, con una célula de mieloma que aporta la capacidad de dividirse indefinidamente. De esta forma pueden obtenerse Ac producidos por un clon celular (monoclonales) que derivan de un único linfocito B. Estos AcMo son, por tanto, homogéneos y específicos de epítomos individuales, y pueden producirse en grandes cantidades, lo que les convierte en reactivos perfectamente estandarizados.

Sin embargo, el uso clínico de los AcMo de primera generación presentaba importantes limitaciones derivadas de su origen no humano: corta vida media sérica, ineficaz reclutamiento de funciones efectoras y problemas inmunitarios. Una proporción importante de los pacientes tratados con AcMo desarrollan

una respuesta inmunitaria (HAMA, *Human Anti-Murine Antibodies*). Para solventar estos obstáculos se desarrollaron nuevas técnicas moleculares que han dado origen a los AcMo de segunda generación: quiméricos y humanizados. Un AcMo quimérico (AcMo-Q) es una molécula artificial en la cual las regiones V provienen de una inmunoglobulina (Ig) múrida y las regiones constantes de una Ig humana (Fig. 1B). Los objetivos fundamentales de la quimerización son reducir la inmunogenicidad y potenciar las funciones efectoras del AcMo múrido, manteniendo la especificidad y la afinidad del AcMo original. La técnica implica el aislamiento de los genes de las regiones V_H y V_L a partir del hibridoma que produce el AcMo, su inserción en vectores de expresión que contienen genes de una región C_H o C_L humana, y la selección de los transfectantes generados a partir de células de mamífero para la producción y posterior purificación del AcMo-Q.^{3,4} Numerosos trabajos han demostrado que los AcMo-Q interaccionan de forma específica con

la diana reconocida por el AcMo múrido original, son capaces de mediar funciones efectoras de forma eficiente y son mejor tolerados. Como consecuencia se ha desarrollado una gran variedad de AcMo-Q, algunos de los cuales han sido aprobados para uso terapéutico.

Sin embargo, en algunos casos los AcMo-Q son capaces de inducir respuestas inmunitarias (HACA, *Human Anti-Chimeric Antibodies*). Asimismo, para reducir la inmunogenicidad se desarrollaron los AcMo humanizados (AcMo-Hz). Esta tecnología consiste en el trasplante de las regiones hipervariables (CDR *grafting*) de un AcMo múrido entre las regiones de entramado de un dominio V humano (Fig. 1B).^{5,6} De este modo se genera un dominio V híbrido ratón-humano y se transfiere una especificidad de reconocimiento determinada a una molécula que es completamente humana en el resto de su secuencia.

El desarrollo de AcMo terapéuticos ha sido tan vertiginoso que en la carrera para crear moléculas más eficaces y mejor toleradas se han generado procedimientos para obtener AcMo totalmente humanos (AcMo-H): generación de cepas de ratones transgénicos para los *loci* de las Ig humanas⁷ y tecnología de genotecas de anticuerpos, mediante la “presentación o exposición” de repertorios de Ac de la superficie de fagos filamentosos (*phage display*).⁸

Actualmente hay más de 30 AcMo aprobados para su utilización como fármacos en humanos, y varias decenas se encuentran en fase de ensayo clínico. El efecto terapéutico de los AcMo “desnudos” (IgG nativas) está determinado por sus propiedades como moléculas efectoras de la respuesta inmunitaria, o por el reconocimiento de dianas específicas. Entre las primeras se incluyen su capacidad para activar células del sistema inmunitario que expresan receptores para la porción Fc (FcR) de la Ig (mecanismos Fc-dependientes), y su capacidad para desencadenar CDC (*Complement Dependent Cytotoxicity*). Los AcMo de las subclases IgG₁ e IgG₃ interaccionan con los receptores FcRγI (CD64), FcRγIIa (CD32), FcRγIIb y FcRγIII (CD16), presentes en di-

ferentes tipos celulares. La activación de los FcR produce diferentes efectos, según el tipo celular: fagocitosis, liberación de mediadores inflamatorios y ADCC (*Antibody-Dependent Cell mediated Cytotoxicity*). Entre los mecanismos Fc-independientes se incluyen la inducción de la muerte programada (apoptosis), el bloqueo de interacciones ligando/receptor, la inhibición de la angiogénesis y la activación de la respuesta inmunitaria (AcMo inmunoes-timulantes).

Nuevos formatos de anticuerpos

Algunas características de los AcMo nativos, como su tamaño y su prolongada vida media, pueden representar una limitación para ser utilizados *in vivo* como herramienta terapéutica, en algunos contextos. La vida media tan larga se debe a que su tamaño está por encima del umbral de filtración glomerular y a su capacidad para unirse al denominado FcR neonatal (FcRn), que protege a la IgG de su degradación en el endosoma. Por ello se han generado diferentes tipos de fragmentos recombinantes derivados de Ac. Los fragmentos Fv (25 kDa), formados por las regiones V_H y V_L, son ideales para algunas aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, pero la débil unión de las regiones V los hace inestables. Para mejorar su estabilidad se han desarrollado diferentes estrategias, entre las que destaca la inserción de secuencias peptídicas flexibles (*linkers*) entre las regiones V. El *linker* permite el apareamiento intramolecular de ambos dominios, para formar un sitio funcional de unión al Ag. Este formato, denominado scFv (*single chain Fragment variable*) es uno de los más utilizados para generar nuevos formatos y construir repertorios de Ac (Fig. 2).^{8,9} Sin embargo, los fragmentos recombinantes con un tamaño inferior a 60 kDa presentan limitaciones debido a su corta vida media, al ser eliminados rápidamente por la orina.

Para aumentar la vida media se han propuesto diferentes estrategias, cuyo objetivo es la obtención de Ac multivalentes, denomina-

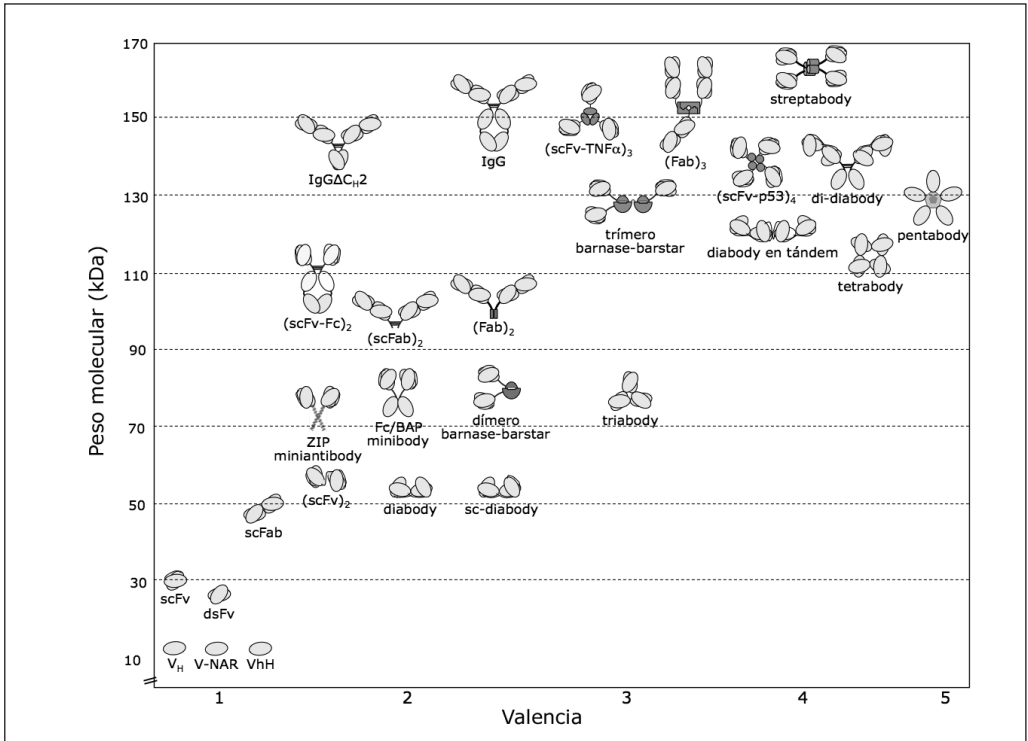


Figura 2. Clasificación, según peso molecular (kDa) y valencia, de los principales fragmentos recombinantes derivados de anticuerpos (Ac). Sólo aparecen aquellos Ac que se han utilizado en ensayos de imagen molecular o de los que se han descrito características funcionales o estructurales que demuestran su multivalencia.

dos AcMo de tercera generación, mediante la asociación de dos o más fragmentos mediante *linkers* de longitud variable, o con el uso de proteínas de fusión que incorporan dominios de oligomerización (Fig. 2).

Estrategias de multimerización basadas en la modificación de la longitud del linker

En la mayoría de los scFv, los dominios V_H y V_L están unidos por *linkers* de 15 a 20 residuos, formados por una repetición de residuos glicina y serina (G₄S)₃ que proporcionan flexibilidad y solubilidad. Utilizando *linkers* más cortos se impide el apareamiento intramolecular entre los dos dominios de la misma cadena, por lo que se produce un apareamiento de los dominios V_H y V_L de dos

cadenas distintas, creando dos sitios de unión al Ag. Estos fragmentos bivalentes (Fig. 2), denominados *diabodies* (30 kDa), presentan una mayor afinidad funcional (avidez).¹⁰ Si el *linker* es eliminado por completo, el resultado es la formación de trímeros de 80 kDa o tetrámeros de 110 kDa, denominados *tria-bodies* o *tetrabodies*.^{11,12} También es posible combinar dos scFv introduciendo un *linker* adicional entre el extremo C-terminal de un scFv y el extremo N-terminal de otro scFv, obteniendo fragmentos (scFv)₂ mono-específicos o biespecíficos¹³ (Fig. 2). Estos fragmentos biespecíficos (anti-CD19 × anti-CD3), denominados *BITE* (*B*ispecific *T*-cell *E*ngager), han demostrado un enorme potencial terapéutico e inducción de regresión tumoral en pacientes con linfomas no Hodgkin.^{14,15}

Estrategias de multimerización basadas en dominios de oligomerización

Los dominios de dimerización ricos en leucina (*zipper*), presentes en las proteínas nucleares JUN y FOS y en los reguladores de la transcripción GCN4 (en levaduras) y C/EBP (en células de mamífero), presentaban excelentes propiedades para promover la formación de complejos oligoméricos.^{16,17} Estos conocimientos fueron aprovechados para generar el *minianti-body* (64 kDa), una proteína de fusión homodimérica compuesta por el *zipper* de CGN4, la región bisagra de la IgG₃ múrida y un scFv.¹⁸ La ventaja de este formato es su capacidad de recuperar la bivalencia de las Ig, reduciendo su peso molecular. Posteriormente se desarrollaron otros diseños similares (bivalentes y homodiméricos), como el *minibody* (80 kDa), en el cual un scFv se une al dominio CH₃ de una IgG mediante un *linker* (Fig. 2). También se han desarrollado otros formatos de Ac multiméricos que intentan mantener la “fisono-

mía” del Ac nativo, por ejemplo mediante la incorporación de dominios de homodimerización de origen procariótico, como la fosfatasa alcalina.¹⁹ Cabe destacar la tecnología denominada “botón en ojal” (*knob-into-hole*), que permite generar heterodímeros biespecíficos en formato de *minibody*.²⁰ Otra estrategia de multimerización consiste en la utilización del complejo que forma la ribonucleasa bacteriana barnasa (12 kDa) con su inhibidor natural barstar (10 kDa).²¹ Mediante esta estrategia pueden obtenerse Ac diméricos y triméricos de 85 y 130 kDa, respectivamente.

La fusión de un scFv al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) permitió generar homotrímeros activos²² con un peso molecular aproximado de 140 kDa (Fig. 2). Ambos dominios de la proteína de fusión, el scFv y el TNF- α , son funcionalmente activos y su efecto terapéutico es superior al del TNF- α aislado. Mediante la fusión de un scFv con el complejo estreptavidina-biotina se ha obtenido un anticuerpo tetramérico de 170 kDa,

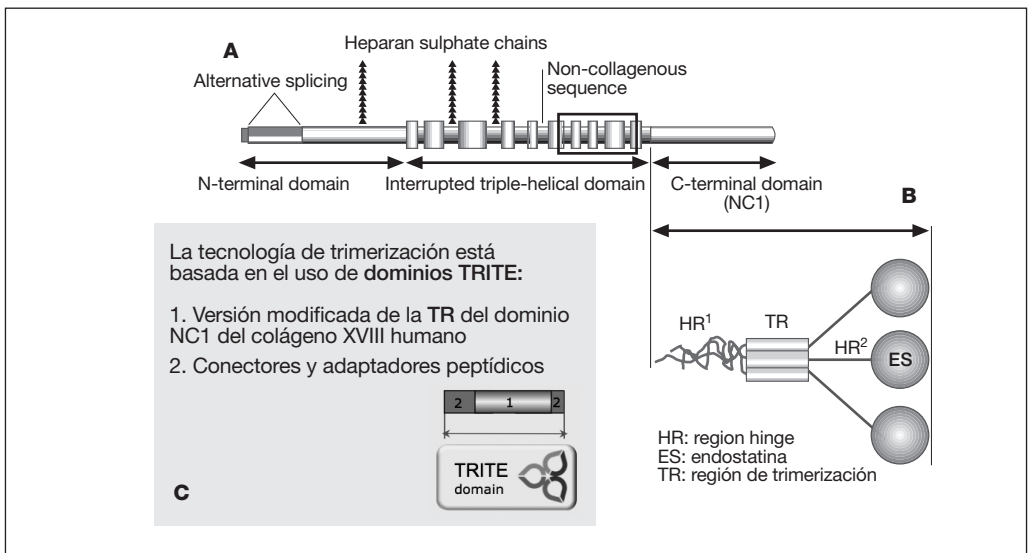


Figura 3. A) La cadena alfa (α) del colágeno presenta un dominio central de triple hélice discontinua, un largo dominio de trombospondina N-terminal y un dominio no colágeno (NC1) C-terminal. B) El dominio NC1 se compone de tres segmentos: una región de trimerización (TR) N-terminal, implicada en el ensamblaje, un linker sensible a la acción de las proteasas, y un dominio globular compacto (endostatina) situado en el extremo C-terminal. C) Diagrama esquemático de un dominio TRITE.

denominado *streptabody*. Este formato es muy estable y permite la incorporación de scFv con la misma o diferentes especificidades.²³ Un formato similar, tetramérico mono-específico,²⁴ de aproximadamente 130 kDa, surge mediante la fusión del dominio de tetramerización de p53 con un scFv (Fig. 3).

Inconvenientes de las estrategias de multimerización actuales

La mayoría de los Ac multivalentes generados mediante estrategias de multimerización basadas en la modificación de la longitud del *linker* tienen importantes impedimentos estructurales, así como problemas de estabilidad y de solubilidad. En general, los Ac multivalentes generados con estrategias de multimerización basadas en dominios de oligomerización utilizan dominios de origen no humano altamente inmunógenos, o bien dominios derivados de proteínas biológicamente activas, que añaden funciones no requeridas o indeseables, en muchos contextos.

Un nuevo concepto de anticuerpo multivalente

El empleo de dominios de oligomerización de origen humano es fundamental para generar moléculas terapéuticas plenamente efectivas. Una de las familias de proteínas con capacidad de multimerización mejor estudiada es la del colágeno (Fig. 3). Datos previos indicaban que una región de 60 residuos, situada en el dominio NC1, era la causante de la trimerización no covalente de las cadenas alfa del colágeno.²⁵ Nuestro grupo ha demostrado que la fusión de esta región de trimerización (TR) al extremo C-terminal de un scFv confiere un estado trimérico al anticuerpo generado,²⁶ que ha sido denominado *trimerbody*. Los Ac en formato *trimerbody* se aíslan en forma funcional a partir de medio condicionado de las células transfectadas, y son fácilmente purificados mediante cromatografía;²⁷ son triméricos en solución y poseen una excelente

estabilidad y capacidad de unión al Ag. Los estudios mediante resonancia del plasmón superficial (Biacore) han demostrado que un *trimerbody* tiene una afinidad funcional unas 100 veces mayor, en comparación con un scFv monovalente.²⁶

El efecto avidéz hace del *trimerbody* un formato muy competitivo respecto a los multivalentes convencionales diméricos (por ejemplo, *minibody*). El análisis del modelo tridimensional del *trimerbody* sugiere una estructura con forma de trípode con los dominios scFv orientados hacia fuera. La flexibilidad entre los dominios de unión al Ag, requeridos para el entrecruzamiento (*cross-linking*), es otro aspecto importante en el diseño de Ac multivalentes de receptores de superficie. Según nuestros cálculos, en un *trimerbody* los scFv tienen un área de influencia unas 11 veces mayor que otros formatos bivalentes, como el *minibody*, aumentando así la probabilidad de una segunda interacción efectiva.²⁸ La unión multivalente reducirá la constante de disociación (*off rates*), y aumentará el tiempo de retención del Ac unido al Ag.

El potencial del formato *trimerbody* para la localización de depósitos tumorales in vivo se ha estudiado en varios modelos experimentales de cáncer humano en ratones desnudos.²⁹ Un *trimerbody* que reconoce un antígeno asociado a un tumor localiza, de manera rápida y específica, tumores in vivo. La máxima señal se observó a las 5 horas de la inyección del *trimerbody* marcado. Es importante destacar que un *trimerbody* con especificidad frente a un Ag irrelevante no localizó tumores in vivo.²⁹

Ventajas del formato trimerbody

La simplicidad, la valencia, la estabilidad y la enorme plasticidad del formato *trimerbody* le confieren una gran ventaja frente a los AcMo convencionales y frente a los formatos de Ac multivalentes actualmente existentes (Fig. 2). El formato *trimerbody* es la base ideal para el desarrollo de la nueva generación de moléculas terapéuticas, cuyas características más representativas son (Fig. 4):

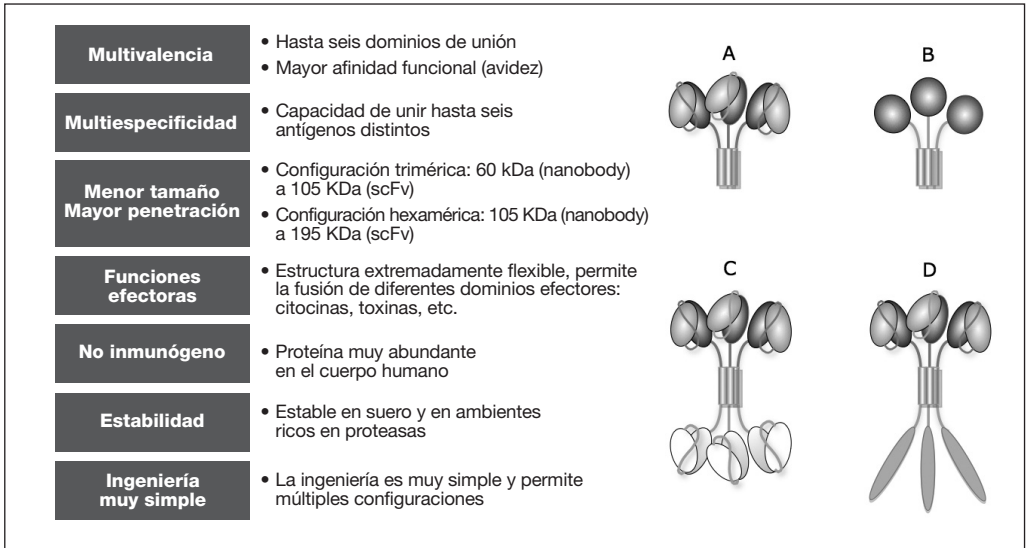


Figura 4. Principales características del formato trimerbody y ejemplos de configuraciones. Configuraciones trivalentes mono específicas (A y B): N-trimerbody basado en dominios de unión en formato scFv (A) y N-trimerbody basado en dominios de unión VHH (nanobody) (B). Configuraciones hexavalentes (C y D): single-chain N-/C-trimerbody biespecífico basado en dominios de unión en formato scFv (C) y single-chain N-trimerbody con dominio efector C-terminal (D).

- Multivalencia: hasta seis posibles valencias.
- Multiespecificidad: por su capacidad de unir varias dianas diferentes.
- Tamaño y configuración adaptables: su tamaño está por encima del límite de filtración renal, lo que aumenta su vida media, y por debajo del tamaño de los AcMo convencionales, lo que le permite aumentar la penetración tumoral.
- No inmunógeno: secuencia completamente humana.
- Estabilidad: tanto en suero como en ambientes ricos en proteasas.
- Sencillez: ingeniería molecular sencilla.
- Adición de funciones efectoras: citocinas, toxinas, etc.

El efecto avidez, aportado por la adición de un tercer scFv asociado con la “geometría única”, derivada de la estrategia de trimerización utilizada, y su tamaño ajustable, hacen que el formato *trimerbody* sea superior al patrón de referencia de los Ac multivalentes actua-

les (*minibody*) en determinadas aplicaciones clínicas, como la localización tumoral (*tumor targeting*), el *trapping* molecular y el entrecruzamiento de receptores de superficie como agonista (*cross-linking*).

Bibliografía

1. Sanz L, Blanco B, Álvarez-Vallina L. Antibodies and gene therapy: teaching old 'magic bullets' new tricks. *Trends Immunol.* 2004;25:85-91.
2. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256:495-7.
3. Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature.* 1984;312:643-6.
4. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984;81:6851-5.

5. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*. 1986;321:522-5.
6. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*. 1988;332:323-7.
7. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:433-55.
8. Hudson PJ, Souriau C. Engineered antibodies. *Nat Med*. 2003;9:129-34.
9. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:5879-83.
10. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*. 2005;23:1126-36.
11. Hudson PJ, Kortt AA. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *J Immunol Methods*. 1999;231:177-89.
12. Kipriyanov SM, Moldenhauer G, Schuhmacher J, Cochlovius B, Von der Lieth CW, Matys ER, et al. Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics. *J Mol Biol*. 1999;293:41-56.
13. Adams GP, McCartney JE, Tai MS, Oppermann H, Huston JS, Stafford WF III, et al. Highly specific in vivo tumor targeting by monovalent and divalent forms of 741F8 anti-c-erbB-2 single-chain Fv. *Cancer Res*. 1993;53:4026-34.
14. Bargou R, Leo E, Zugmaier G, Klinger M, Goebeler M, Knop S, et al. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science*. 2008;321:974-7.
15. Beckman RA, Weiner LM, Davis M. Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer*. 2007;109:170-9.
16. O'Shea EK, Rutkowski R, Kim PS. Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science*. 1989;243:538-42.
17. O'Shea EK, Rutkowski R, Stafford WF III, Kim PS. Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun. *Science*. 1989;245:646-8.
18. Pack P, Pluckthun A. Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 1992;31:1579-84.
19. Griep RA, van Twisk C, Kerschbaumer RJ, Harper K, Torrance L, Himmler G, et al. pSKAP/S: an expression vector for the production of single-chain Fv alkaline phosphatase fusion proteins. *Protein Expr Purif*. 1999;16:63-9.
20. Ridgway JB, Presta LG, Carter P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng*. 1996;9:617-21.
21. Deyev SM, Waibel R, Lebedenko EN, Schubiger AP, Pluckthun A. Design of multivalent complexes using the barnase*barstar module. *Nat Biotechnol*. 2003;21:1486-92.
22. Borsi L, Balza E, Carnemolla B, Sassi F, Castellani P, Berndt A, et al. Selective targeted delivery of TNF-alpha to tumor blood vessels. *Blood*. 2003;102:4384-92.
23. Kipriyanov SM, Little M, Kropshofer H, Breittling F, Gotter S, Dubel S. Affinity enhancement of a recombinant antibody: formation of complexes with multiple valency by a single-chain Fv fragment-core streptavidin fusion. *Protein Eng*. 1996;9:203-11.
24. Rheinhecker M, Hardt C, Ilag LL, Kufer P, Gruber R, Hoess A, et al. Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen. *J Immunol*. 1996;157:2989-97.
25. Sasaki T, Fukai N, Mann K, Gohring W, Olsen BR, Timpl R. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J*. 1998;17:4249-56.
26. Cuesta AM, Sánchez-Martín D, Sanz L, Bonet J, Compte M, Kremer L, et al. In vivo tumor targeting and imaging with engineered trivalent antibody fragments containing collagen-derived sequences. *PLoS One*. 2009;4:e5381.
27. Sánchez-Arévalo LV, Cuesta AM, Sanz L, Compte M, García P, Prieto J, et al. Enhanced antiangiogenic therapy with antibody-collagen XVIII NC1 domain fusion proteins engineered to exploit matrix remodeling events. *Int J Cancer*. 2006;119:455-62.
28. Cuesta AM, Sainz-Pastor N, Bonet J, Oliva B, Álvarez-Vallina L. Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends Biotechnol*. 2010;28:355-62.
29. Sánchez-Martín D, Cuesta AM, Fogal V, Ruoslahti E, Álvarez-Vallina L. The multi-compartmental p32/gClqR as a new target for antibody-based tumor targeting strategies. *J Biol Chem*. 2011;286:5197-203.

DISCUSIÓN

A. RIBAS: La investigación con ratones inmunodeficientes con xenoinjertos que nos has mostrado constituye el primer paso de los estudios in vivo. ¿Habéis probado un *trimerbody* múrido en un ratón inmunocompetente o un *trimerbody* humano en un primate para ver su farmacocinética y comprobar su eficacia?

L. ÁLVAREZ-VALLINA: En la actualidad estamos realizando estudios de biodistribución y localización con *trimerbodies* N-terminal y hexavalentes en modelos múridos inmunodeficientes, para tener una idea general de su comportamiento. En relación a tu pregunta, sí hemos hecho algún estudio con *trimerbodies* completamente múridos, con la secuencia del colágeno 18 y un dominio de unión múrido en ratones normales, para comprobar la posible inmunogenicidad de dichas moléculas. Hemos observado que, tras una administración repetida y sistémica de estos *trimerbodies*, no hay una respuesta inmunitaria relevante, ni sérica ni celular. Por otro lado, con nuestro control positivo, en el cual forzamos la inmunización mediante el uso de adyuvantes, sí detectamos una respuesta inmunitaria tanto frente al dominio de unión como al de trimerización. Aún no tenemos datos concluyentes, pero creemos que los *trimerbodies* no serán especialmente inmunógenos. Además, un trabajo publicado por un grupo de Seattle demuestra que en pacientes normales pueden detectarse trazas de colágeno 18 en suero, que indican que la proteína es tolerable.

A. RIBAS: ¿Se dispone de datos farmacocinéticos de estos compuestos en ratón y sobre si son similares a una inmunoglobulina de ratón?

L. ÁLVAREZ-VALLINA: Sólo tenemos datos muy preliminares, pero un *trimerbody* N-terminal sencillo, de la primera generación, sin dominios Fc, tiene una vida media de 3 a 4 ho-

ras, por lo que las propiedades de los *trimerbodies* son muy favorables para aplicaciones diagnósticas, es decir, utilizar la molécula como guía para llevar algo hasta el tumor. El *trimerbody* circula por el torrente sanguíneo varias veces y se elimina rápidamente, con lo cual su proporción sangre/tumor es muy favorable, mucho más que la de una inmunoglobulina.

J. YAGÜE: Desde el punto de vista terapéutico, ¿sabéis qué capacidad de difusión tienen estas moléculas en las distintas cavidades (articular, barrera hematoencefálica, etc.)? ¿Es similar a la de una inmunoglobulina?

L. ÁLVAREZ-VALLINA: No tenemos datos tan exhaustivos porque se salen del ámbito académico y de un laboratorio normal. Para obtenerlos es necesario disponer de la colaboración de empresas y de gente que nos pueda ayudar. No disponemos de datos directos sobre si pueden atravesar la barrera hematoencefálica o si llegan a las articulaciones mejor o peor que las inmunoglobulinas. En mi opinión, creo que su capacidad de difusión será mayor, tanto por su tamaño como por su diseño, y probablemente alcanzarán concentraciones más altas en las cavidades.

C. MUÑOZ: A partir de la charla ha quedado muy clara la aplicación diagnóstica de los *trimerbodies*, ¿pero habéis pensado en aplicaciones terapéuticas? Es decir, ¿qué modificaciones harías para que los *trimerbodies* pudieran mediar mecanismos efectores?

L. ÁLVAREZ-VALLINA: Una de las aplicaciones terapéuticas obvias es la generación de biespecíficos, gracias a la polivalencia. Aunque hay que tener cuidado con los anti-CD3, ya que no podemos generar un *trimerbody* biespecífico con tres anti-CD3, porque provocaría una activación sistémica generalizada. Actualmente estamos trabajando en un *trimerbody* que sólo tenga una copia de

anti-CD3 y tres copias de antitumor, con lo que se garantizaría la ausencia de entrecruzamiento (*cross-linking*) tumoral, no habría una activación sistémica de los linfocitos T y probablemente podrían activarse los depósitos tumorales de una forma mucho más eficiente que los anticuerpos tipo BITE, que son los anticuerpos biespecíficos que ahora están teniendo tanto éxito. En resumen, uno de los principales focos en el tratamiento del cáncer es conseguir anticuerpos biespecíficos que produzcan un entrecruzamiento de CD3 y que nos permitan redirigir el sistema inmunitario hacia el tumor.

M. DEL VAL: ¿Los *trimerbodies* son capaces de detectar las metástasis?

L. ÁLVAREZ-VALLINA: Por ahora sólo hemos trabajado con *trimerbodies* marcados con fluorocromos que emiten en el infrarrojo cercano, por lo que los datos son limitados, ya que la tecnología va por detrás del diseño molecular. Nosotros creemos que los *trimerbodies* con biomarcadores adecuados y el uso de tecnología de imagen por emisión de fotón único (PET) más avanzada (o algo equivalente) sí permitirán localizar micro-metástasis.

C. JUÁREZ: Volviendo a la relación de los *trimerbodies* con el sistema inmunitario, creo que estas moléculas presentan un potencial inmenso, pero la desconexión con el sistema inflamatorio es evidente por los sistemas de activación de complemento, por ejemplo. ¿Os habéis planteado conectar estas moléculas con los sistemas clásicos de inflamación, como ya hacen algunos anticuerpos monoclonales en terapéutica?

L. ÁLVAREZ-VALLINA: Este tipo de moléculas permite añadir, en cualquiera de los extremos, tanto dominios de anticuerpos como toxinas, citocinas, inhibidores endógenos de la angiogénesis, etc. Actualmente, en el laboratorio tenemos datos preliminares de *trimerbodies* con endostatina, un inhibidor endógeno, y también con una citocina, y hemos observa-

do que se expresa muy bien. Como dices, es una forma de poder añadir dominios y funciones efectoras adicionales, y creo que es una línea importante a desarrollar.

F. RUIZ-CABELLO: Enfocado al diseño de estructuras biespecíficas, ¿en qué medida el diseño de oligomerización con el dominio de colágeno introduce más rigidez al *trimerbody* en comparación con la rigidez que tiene una inmunoglobulina convencional?

L. ÁLVAREZ-VALLINA: Estos *trimerbodies* tienen mayor plasticidad que los anticuerpos normales debido a que su dominio de oligomerización está compuesto por sólo 50 residuos, y poseen conectores flexibles de longitudes variables en los dos dominios terminales, el amino y el carboxi-terminal. Nuestro dominio de unión es muy pequeño, sobre todo en comparación con el de otras compañías que poseen centenares de residuos, por lo que nuestros dominios de oligomerización permiten mucha flexibilidad, además de ser muy prácticos y fáciles de manipular.

N. PRATS: ¿Habéis realizado estudios comparativos de la regresión de los tumores frente a otro anticuerpo?

L. ÁLVAREZ-VALLINA: Estamos desarrollando un modelo con el que podamos comparar un anticuerpo BITE con un *trimerbody* biespecífico que reconoce CD3 y antígeno carcinoembrionario (CEA). La dificultad de trabajar con este modelo es que usamos dominios que reconocen antígenos humanos, por lo que en primer lugar debe inocularse el tumor al modelo experimental y luego realizar una inoculación repetida de células humanas (PBL). Con este modelo veremos si nuestra hipótesis inicial es cierta o no, es decir, si conseguimos inducir la regresión del tumor.

L. GRAÇA: Si el funcionamiento de los *trimerbodies* depende de su proximidad a los linfocitos T, ¿cómo funciona la penetración en las masas tumorales?

L. ÁLVAREZ-VALLINA: Las masas tumorales tienen una vasculatura muy irregular, con zonas que presentan una barrera endotelial irregular, por lo que las moléculas entran mejor. Creemos que la mayor parte de *trimerbodies* pueden entrar fácilmente por esas zonas. Pero, por otro lado, también cabe la posibilidad de que los *trimerbodies* penetren en el tumor mientras están asociados a los linfocitos T que infiltran el tumor.

D. JARAQUEMADA: ¿Qué posibilidades hay de que se genere una respuesta anticolágeno?

L. ÁLVAREZ-VALLINA: Es difícil que se produzca dicha respuesta porque el colágeno es una molécula muy ubicua, es una de las proteínas más importantes en el cuerpo humano. Además, hay datos que sugieren que pueden detectarse, en los pacientes, fragmentos circulantes que contienen el dominio NC1. Adicionalmente, también hemos hecho algún experimento animal utilizando el domi-

nio del colágeno múrido en ratones inmuno-competentes y no hemos detectado una respuesta inmunitaria apreciable, lo que indica que la aplicación de los *trimerbodies* por vía sistémica o intravenosa sería tolerable.

A. RIBAS: ¿Habéis considerado marcar radiactivamente los *trimerbodies* para poder hacer un seguimiento durante su uso en pacientes?

L. ÁLVAREZ-VALLINA: Es uno de los proyectos en los que actualmente estamos trabajando en colaboración con un centro en San Sebastián (CIC bioMAGUNE) que tiene una unidad de radiofarmacia importante, donde ahora realizamos estudios de biodistribución y pretendemos conjugar los *trimerbodies* con radionúclidos. Por otro lado, tampoco descartamos el uso de hexavalentes, que tienen una vida media de 6 a 8 horas, con los que podríamos obtener alguna aplicación diagnóstica.

Nanotecnología y sistema inmunitario

A. González-Fernández, M. Peleteiro-Olmedo, T. Lozano-Fernández,
R. Simón-Vázquez y B. Díaz-Freitas

Inmunología, Centro de Investigaciones Biomédicas (CINBIO), Universidad de Vigo, Vigo (Pontevedra).
Red de Inmunoterapia "IMMUNONET" (SUDOE-Feder)

Resumen: *En los últimos años, el desarrollo de la nanotecnología está encontrando muchas aplicaciones en diversos campos, como por ejemplo la industria textil, la automoción, la energía, la alimentación, el medio ambiente y también la medicina. Las nanoestructuras pueden ofrecer muchas ventajas en el área de la biomedicina: marcapasos más pequeños y seguros, catéteres con recubrimientos antibacterianos y nuevas estructuras para terapia regenerativa. Asimismo, han contribuido en el diagnóstico in vitro (lab-on a chip, técnicas de multidetección o necesidad de menor cantidad de muestra) y en el diagnóstico in vivo, y en tratamientos en los cuales la nanotecnología puede ofrecer fármacos de liberación controlada, de terapia dirigida y con multifunción (transporte de fármaco, imagen, hipertermia, magnético). Sin embargo, aunque las nanoestructuras en aplicaciones biomédicas pueden mostrar claros beneficios, hay algunos aspectos muy importantes a considerar, como son su toxicidad y su inmunogenicidad. Además, el tamaño nanométrico hace que puedan interactuar mejor con los sistemas biológicos, por lo que resulta necesario un completo estudio de su biocompatibilidad y biodistribución en el organismo. El potencial que tiene la gran variedad de nanoestructuras en el campo biomédico es enorme, y ofrece una gran diversidad de propiedades biológicas y físico-químicas. Sin embargo, puesto que pueden interactuar y afectar a los sistemas biológicos, es necesaria una compleja y extensa caracterización previa, y llevar a cabo estudios de biocompatibilidad e inmunogenicidad.*

Palabras clave: Nanotecnología – Inmunogenicidad – Biocompatibilidad – Nanomedicina – Nanoestructuras – Funcionalización con anticuerpos.

Nanotecnología

El prefijo "nano" deriva del griego y significa "enano". En ciencia se utiliza como unidad de medida de longitud, para determinar una milmillonésima parte de un metro, y por tanto 10^{-9} m es 1 nm, que es decenas de miles de veces más pequeño que el grosor de un cabello humano.

Los recientes avances de la comunidad científica que permiten observar, controlar y manipular a escala nanométrica, han abierto un nuevo campo de investigación: la nanotecnología. Las posibles aplicaciones de esta nueva ciencia basada en el desarrollo de ma-

teriales nanoestructurados y de nuevas herramientas que actúan a este nivel, ha generado un área con gran potencial y con un enorme impacto social y económico.

Para comprender las posibilidades que ofrece esta nueva tecnología es clave saber que las nanoestructuras son mucho más pequeñas que las células humanas (de unas 10 a 20 μ de diámetro) y que muchos de sus orgánulos. Las nanopartículas son similares, en tamaño, a las grandes macromoléculas biológicas tales como enzimas y receptores. Por ejemplo, la hemoglobina tiene un diámetro de 5 nm, la bicapa lipídica que rodea a las células es del orden de 6 nm de espesor (McNeil,

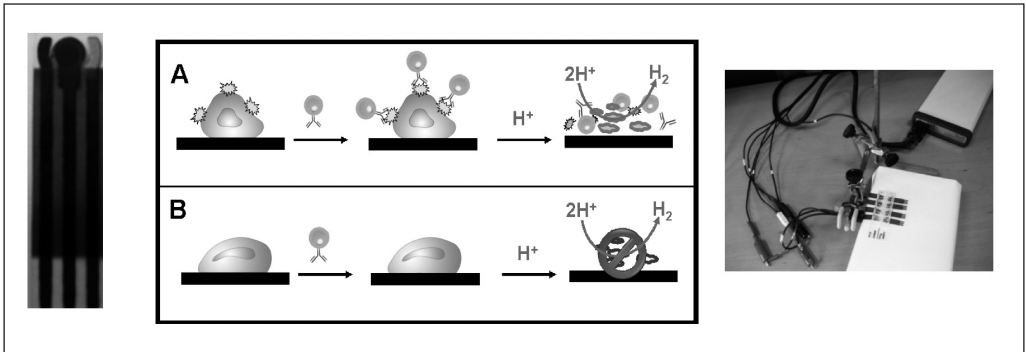


Figura 1. Fundamento de un biosensor para detectar células tumorales con nanopartículas de oro y anticuerpos. Sobre la superficie de un electrodo (imagen izquierda) se depositan células tumorales que expresan un determinado marcador de membrana (A) o células que no lo expresan (B). Posteriormente se realiza una detección electroquímica (De la Escosura-Muñiz et al., 2009). (Técnica patentada.)

2005), y un anticuerpo IgG tiene un tamaño de 12×15 nm.

Nanomedicina

Uno de los sectores más sensibles donde se espera que la nanotecnología tenga un gran potencial es en el campo biomédico, tanto en el diagnóstico in vitro como in vivo, en el desarrollo de nuevos materiales para prótesis, suturas, etc., e incluso en terapéutica. Esta nueva ciencia, denominada Nanomedicina, ofrece oportunidades únicas para el diseño de nuevos instrumentos clínicos y para mejorar los ya existentes, así como para el desarrollo de nuevos biosensores; sobre todo, las nanopartículas se han propuesto para ser utilizadas con fines biomédicos debido a su gran versatilidad como transportadores de fármacos, como adyuvantes en vacunas, para la destrucción de células tumorales mediante hipertermia y como agentes de contraste.

En el campo de la detección, la nanotecnología ofrece unas posibilidades inmensas, bien con el uso de nanopartículas solas o combinadas con anticuerpos. Como ejemplo, nuestro grupo, en colaboración con el del Dr. Arben Merçoçi del Instituto Catalán de Nanoelectrónica (De la Escosura-Muñiz et al.,

2009), ha desarrollado un biosensor capaz de detectar células tumorales sobre la superficie de electrodos de carbono utilizando nanopartículas de oro conjugadas con anticuerpos (Fig. 1).

Dentro del campo terapéutico, numerosos grupos de investigación están desarrollando nanopartículas con multitud de aplicaciones (Tabla I), como la liberación de fármacos de forma controlada, que destruyan de forma específica células tumorales, que atraviesen la barrera hematoencefálica, que actúen como adyuvantes y permitan el diseño de nuevas vacunas, que posibiliten la utilización de hipertermia o terapia fotodinámica, y un largo etcétera (Koping-Hoggard et al., 2005; Lee et al., 2007; Valdivia Uría et al., 2007). Su tamaño nanométrico les permite atravesar muchas estructuras e interactuar fácilmente con las biomoléculas en la superficie y en el interior celular. Al poder interactuar con estructuras de una célula viva, como receptores, ácidos nucleicos, factores de transcripción y otras proteínas de señalización, podrían usarse para comprender las complejas redes de señalización y los procesos de transporte que regulan el comportamiento celular y los cambios que sufren durante los procesos de enfermedad.

Las nanopartículas, en comparación con las terapias convencionales, pueden ofrecer im-

TABLA I. Resumen de las principales características y posibles aplicaciones de los diferentes tipos de nanopartículas en biomedicina.

Nanoestructuras	Características	Posibles aplicaciones biomédicas
Nanoshells	10-300 nm, formadas por un núcleo de sílice y una capa de un compuesto metálico	Agentes de contraste y liberación de fármacos
De carbono		
Nanotubos	Compuestos alargados de carbono de 1 nm de diámetro, con una o varias capas concéntricas	Agentes de contraste, terapia génica, transporte de fármacos, biosensores y vacunas
Fullerenos	Compuestos constituidos por 60 átomos de carbono formando un espacio cerrado y simétrico con forma de balón de fútbol	Transporte de fármacos, agentes de contraste, antioxidantes y bactericidas
Poliméricas	Formadas por polímeros no biodegradables y biodegradables, de origen natural o sintético, o mezcla de ambos tipos	Liberación de fármacos, vacunas
Dendrimeros	Estructuras globulares generadas por repetición de polímeros sintéticos compuestas por un núcleo y varias capas con grupos terminales activos	Liberación de fármacos
Metálicas		
De oro	Formadas por oro, recubierto o no con biomoléculas o polímeros orgánicos	Biosensores, agentes de contraste y termoablación
QD	Estructura fluorescente de 2 a 10 nm, constituida por un núcleo de algún elemento de los grupos II-VI y por una capa de ligandos o polímeros anfipáticos	Diagnóstico por la imagen y tratamiento del cáncer
Magnéticas	Compuestas por un núcleo inorgánico de óxido de hierro u otros metales, recubierto o no con biomoléculas o polímeros orgánicos	Agentes de contraste
Nanoliposomas y nanomicelas	Vesículas esféricas cerradas formadas principalmente por fosfolípidos	Transporte de agentes bioactivos, liberación de fármacos y tratamiento del cáncer

portantes ventajas, como son una disminución en los efectos secundarios de los fármacos tradicionales, una mayor versatilidad en el diseño de las formulaciones debido a que pueden unirse a diversos compuestos tales como fármacos, anticuerpos, péptidos, DNA, hidratos de carbono, etc. (Vicent y Duncan, 2006).

Además, sus propiedades ópticas, eléctricas o magnéticas pueden emplearse para matar células tumorales mediante tratamientos

de hipertermia utilizando longitudes de onda dentro del rango del infrarrojo cercano (Hirsch et al., 2003). Recientemente se ha aprobado un tratamiento local con nanopartículas ferromagnéticas para pacientes con tumores cerebrales empleando hipertermia combinada con radioterapia (Maier-Hauff et al., 2011).

Mientras que el desarrollo de nuevos nanomateriales no biodegradables está creciendo exponencialmente, aunque con lenta intro-

Tabla II. Agentes terapéuticos basados en nanopartículas aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos.

Composición	Nombre (compañía)	Indicación	Vía
Liposomas			
L. amfotericina B	<i>Abelcet</i> [®] (Enzon)	Infecciones fúngicas	i.v.
L. amfotericina B	<i>AmBisome</i> [®] (Gilead Sciences)	Hongos y protozoos	i.v.
L. citarabina	<i>DepoCyt</i> [®] (SkyePharma)	Meningitis criptocócica	i.t.
L. daunorubicina	<i>DaunoXome</i> [®] (Gilead Sciences)	Sarcoma de Kaposi	i.v.
L. doxorubicina	<i>Myocet</i> [®] (Zeneus)	Cáncer de mama	i.v.
Vacuna liposómica IRIV	<i>Epaxal</i> [®] (Berma Biotech)	Hepatitis A	i.m.
Vacuna liposómica IRIV	<i>Inflexal</i> [®] (Berma Biotech)	Gripe	i.m.
L. morfina	<i>DepoDur</i> [™] (SkyePharma, Endo)	Analgésico poscirugía	e.
L. verteporfina	<i>Visudyne</i> [®] (QLT, Novartis)	Degeneración macular	i.v.
L con PEG doxorubicina	<i>Doxil</i> [®] / <i>Caelyx</i> [®] (Ortho Biotech, Schering-Plough)	Sarcoma de Kaposi, cáncer de mama y ovárico	i.m.
Micela estradiol	Estrasorb [™] (Novavax)	Menopausia	t.
Polímeros			
Copolímero de L-Glu, L-Ala, L-Lys y L-Tir	<i>Copaxone</i> [®] (TEVA Pharmaceuticals)	Esclerosis múltiple	s.c.
Metoxi-PEG-poli (D,L-lactido) taxol	<i>Genexol-PM</i> [®] (Samyang)	Cáncer de mama	i.v.
PEG-ADA	<i>Adagen</i> [®] (Enzon)	Inmunodeficiencia grave combinada	i.m.
PEG-antiVEGF apramer	<i>Macugen</i> [®] (OSI Pharmaceuticals)	Degeneración macular	i.r.
PEG- α interferón 2a	<i>Pegasy</i> [®] (Nektar, Hoffmann-La Roche)	Hepatitis B y C	s.c.
PEG-GCSF	<i>Neulasta</i> [®] (Amgen)	Neutrocitopenia	s.c.
PEG-HGF	<i>Somavert</i> [®] (Nektar, Pfizer)	Acromegalia	s.c.
PEG-L Asn	<i>Oncaspar</i> [®] (Enzon)	Leucemia linfoblástica aguda	i.v., i.m.
Poli(clorhidrato de alilamina)	<i>Sevelamer</i> [®] (Genzyme)	Enfermedad renal	v.o.
Otros soportes			
Paclitaxel-albúmina	<i>Abraxane</i> [®] (Abraxis, Bioscience, AstraZeneca)	Cáncer de mama	i.v.
Nanocristales de aprepitant	<i>Emend</i> [®] (Elan, Merk)	Antiemético	v.o.
Nanocristales de fenofibrato	<i>Trico</i> [®] (Elan, Abbott)	Antihiperlipidémico	v.o.
Nanocristales de sirolimús	<i>Rapamune</i> [®] (Elan, Wyeth Pharmaceuticals)	Inmunosupresor	v.o.

ADA: adenosina desaminasa; e.: epidural; GCSF: factor estimulador de colonias de granulocitos; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; i.m.: intramuscular; i.r.: intravítrea; IRIV: *Immunopotentiating Reconstituted Influenza Virosomes*; i.t.: intratecal; i.v.: intravenosa; PEG: polietilenglicol; s.c.: subcutánea; t.: tópica; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; v.o.: vía oral.

ducción en clínica, numerosos agentes terapéuticos basados en nanopartículas biodegradables, como son los liposomas, los polímeros u otros compuestos, llevan ya tiempo en el mercado (Tabla II).

Toxicidad

En la actualidad, la mayoría de los trabajos publicados se centran en la obtención de nuevas nanopartículas y en su caracterización físico-química, pero es necesario también diseñar y establecer técnicas normalizadas que nos permitan evaluar de una forma fidedigna su posible toxicidad. Por ejemplo, no hay muchos datos sobre sus posibles efectos tóxicos en células humanas, y muchas de las nanoestructuras están destinadas a su uso en humanos por vía intravenosa, por lo que entrarán en contacto con las células del endotelio y de la sangre periférica (hematíes y células leucocitarias) y con otros componentes sanguíneos (plaquetas, proteínas de la cascada de la coagulación, del complemento, etc.); también podrían entrar por vía inhalada, por lo que es crucial conocer su comportamiento sobre células pulmonares, o si lo hacen por otras vías (como por ejemplo vía cutánea, ocular, etc.). Se hace imprescindible realizar estudios de

toxicidad y biocompatibilidad de estas nanopartículas en distintos tipos celulares antes de su uso in vivo (Fig. 2).

Otro de los problemas en la evaluación de la posible toxicidad es la gran diversidad de protocolos utilizados en los trabajos publicados, que dificulta la comparación entre los distintos estudios y la determinación de si la citotoxicidad observada es fisiológicamente relevante (Lewinski et al., 2008). La Comunidad Económica Europea ha puesto en marcha proyectos de investigación y redes con el fin de iniciar la estandarización de métodos y la búsqueda de patrones de nanopartículas. Nuestro grupo se encuentra integrado en un proyecto europeo denominado HINAMOX (*Health Impact of Engineered Metal and Metal Oxide Nanoparticles: Response, Bioimaging and Distribution at Cellular and Body Level*) para estudiar el efecto de nanopartículas metálicas y óxido-metálicas en la salud humana. En este sentido, es importante destacar que las características físico-químicas de las nanopartículas, el tipo celular utilizado y el método para evaluar la toxicidad son factores clave a la hora de diseñar el estudio.

La actividad biológica de las nanopartículas depende de sus características físicas y químicas, tales como el tamaño y la forma, la composición superficial (carga e hidrofobi-

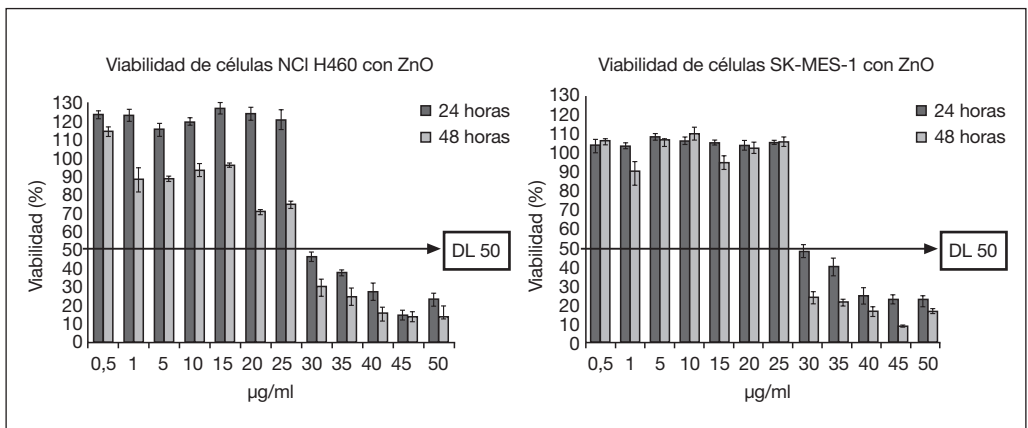


Figura 2. Estudio de muerte celular (dependiente de la dosis) inducida por nanopartículas de óxido de zinc en células NCI H460 y SK-MES-1 (Lozano et al., 2011). DL50: dosis letal 50.

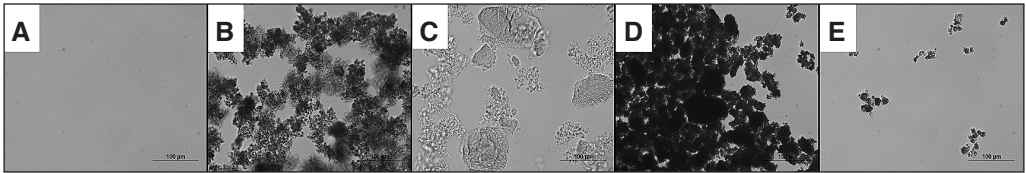


Figura 3. Microscopía óptica (objetivo 40x) de distintas nanopartículas en medio con suero bovino fetal: A: sólo medio; B: nanopartículas de FeOx; C: nanopartículas de TiOx; D: nanopartículas de CeO₂; E: nanopartículas de ZnO.

cidad), el grado de dispersión o agregación, la composición química, la solubilidad, la dosis, la pureza, etc. (Powers et al., 2006). Muchas de estas características pueden ser modificadas como resultado del contacto entre la cubierta externa de las nanopartículas y los fluidos biológicos, e influye en su posterior interacción con los componentes sanguíneos. Por ejemplo, es muy frecuente observar que nanopartículas estables en agua o etanol se agreguen en presencia de medios fisiológicos y suero (Lozano et al., 2011) (Fig. 3).

Por otra parte, las proteínas sanguíneas, como la albúmina, las apolipoproteínas, las inmunoglobulinas y las moléculas de la cascada de activación del complemento y de la coagulación, entre otras, pueden unirse inespecíficamente a la superficie de los nanomateriales y provocar su opsonización (Gessner et al., 2003; Salvador-Morales et al., 2006), fa-

voreciendo la fagocitosis de las nanopartículas por parte de los macrófagos (Fig. 4) (Díaz et al., 2008). Esto puede dar lugar a una reducción en la vida media de las nanopartículas en el sistema circulatorio y alterar su estabilidad, induciendo su precipitación y agregación.

La adsorción de las proteínas a la superficie de las nanopartículas depende de las características de la cubierta, de la composición y del método de síntesis de la nanopartícula en cuestión. Se sabe que alterando la carga de la superficie añadiendo diferentes grupos funcionales pueden modificarse las propiedades hidrófilas de la nanopartícula y su vida media, a la vez que disminuye la interacción con proteínas o receptores que estimulan la fagocitosis (Dobrovolskaia y McNeil, 2007). Por ejemplo, las nanopartículas con su superficie recubierta de polietilenglicol (PEG) unen menos proteínas que las que no poseen esta modificación en su superficie, y en algunos casos también disminuyen su toxicidad (Díaz et al., 2008) (Fig. 5).

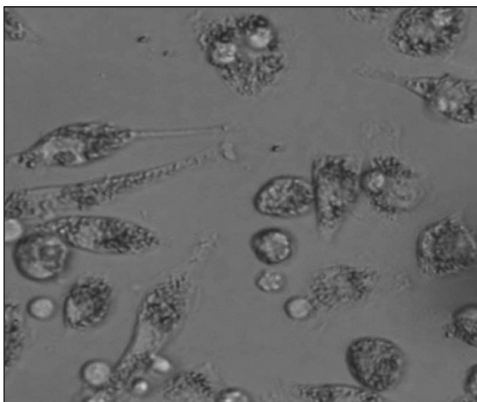


Figura 4. Macrófagos múridos que han fagocitado nanopartículas de hierro y zeolita.

Esterilidad

Otro factor muy importante es la esterilidad de las nanopartículas. Previamente a su uso in vivo hay que asegurarse de que las nanopartículas son estériles y de que no contienen endotoxinas bacterianas contaminantes. Algunos de los ensayos para determinar la presencia de endotoxinas ampliamente utilizados interfieren con las propias nanopartículas, lo que hace necesario diseñar nuevos métodos.

Con respecto a qué tipo de esterilización utilizar, depende de la composición, del tama-

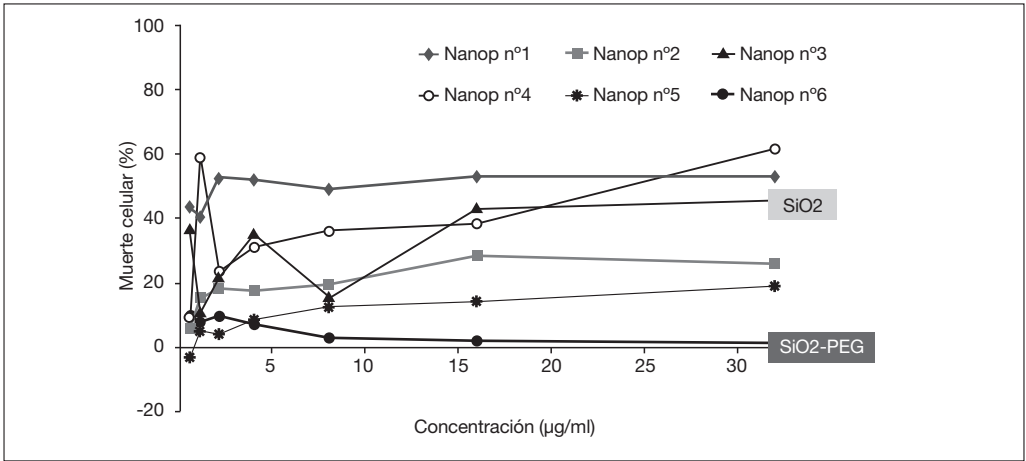


Figura 5. Porcentaje de muerte en células humanas incubadas con distintas dosis y tipos de nanopartículas. El recubrimiento con polietilenglicol (PEG) hace que la nanopartícula de sílice disminuya su toxicidad (Díaz et al., 2008).

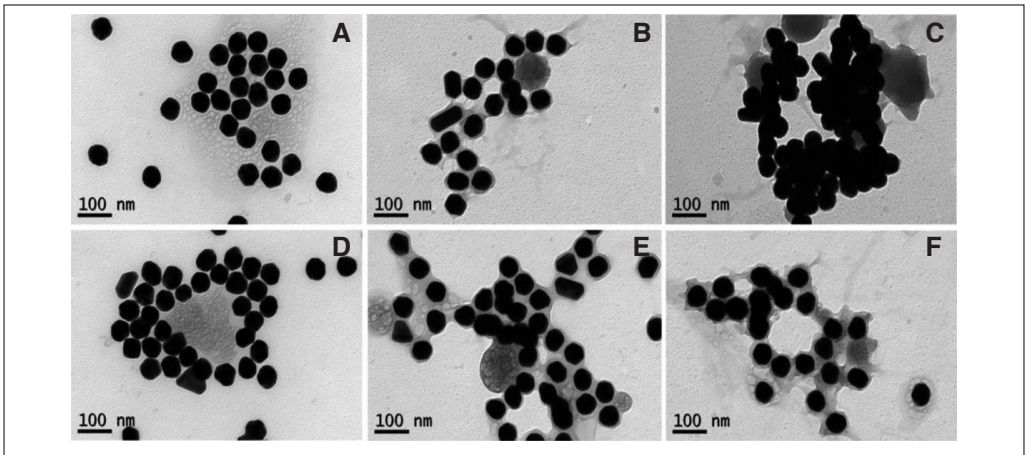


Figura 6. Nanopartículas de oro antes (A) y después de ser esterilizadas mediante radiación ultravioleta (B), gas plasma (C), óxido de etileno (D), formaldehído (E) y autoclave (F) (Franca et al., 2010).

ño y del recubrimiento de la nanopartícula, ya que cada clase de método puede afectar a un tipo u otro. En un estudio realizado por nuestro grupo, nanopartículas de oro recubiertas con PEG fueron sometidas a cinco procedimientos de esterilización diferentes (Fig. 6) y se observó que el gas plasma las afectaba de

forma importante (produciendo coalescencia y agregación), por lo que este método, muy utilizado en diversos centros hospitalarios, no podría usarse para esta nanoestructura en concreto (Franca et al., 2010). Sin embargo, otras nanopartículas de oro de menor tamaño y recubiertas de tiopronina no se afectaban

por gas plasma, pero sí por otros métodos de esterilización. Estos resultados confirman que para cada nanoestructura hay que hacer un estudio exhaustivo para conocer qué método de esterilización podría ser el más adecuado.

Inmunogenicidad

Otro de los principales aspectos que deben cumplir las nanopartículas transportadoras de fármacos es ser inmunológicamente neutras una vez administradas en el organismo, mientras que aquellas que queramos utilizar en vacunas nos interesará que potencien al sistema inmunitario. Las células inmunitarias reconocen de forma muy eficaz patógenos y partículas extrañas al organismo, y pueden generar diversas respuestas inmunitarias (fagocitosis, producción de radicales libres de oxígeno [ROS, *reactive oxygen species*] y nitrógeno, activación del complemento, producción de citocinas, anticuerpos, etc.) para llevar a cabo su destrucción. Las nanopartículas son elementos extraños al organismo (Fig. 7) y, por tanto, pueden ser reconocidas por las células del sistema inmunitario de forma semejante a como lo hacen con diversos patógenos (virus, bacterias, hongos...).

Además, muchas nanopartículas tienen un tamaño y forma semejantes a elementos tales

como los virus. Así, las nanopartículas pueden estimular o suprimir la respuesta inmunitaria, y provocar reacciones de hipersensibilidad o inmunosupresión, por lo que es imprescindible analizar su compatibilidad con los elementos del sistema inmunitario (Zolnik et al., 2010). Si bien los datos publicados sugieren claramente que las nanopartículas interactúan con el sistema inmunitario, uno de los retos es desarrollar protocolos estandarizados para evaluar sus efectos.

La mayoría de los métodos estándar de inmunotoxicidad deberían poder ser aplicables a los nanomateriales. Sin embargo, como las nanopartículas poseen características físicas y químicas diferentes, los métodos clásicos deben modificarse en función de ellas. En este sentido, muchas de las técnicas de toxicidad ampliamente utilizadas, como los ensayos colorimétricos (tipo MTT, medición de lactato deshidrogenasa, etc.), no pueden utilizarse por las interferencias que producen las nanopartículas. Esto obliga a diseñar nuevos métodos para estudiar la viabilidad, o a emplear colorantes que no interfieran con la nanoestructura concreta que vamos a estudiar. Con respecto a la interacción de las nanopartículas con macrófagos del sistema inmunitario, se analiza la fagocitosis o internalización de las partículas, así como la inducción de estrés celular debida a la liberación de ROS (Díaz et al., 2008).

Se ha descrito que la toxicidad de las nanopartículas puede deberse a la interacción directa con la célula, o de modo indirecto por la inducción de un exceso de ROS (Shen et al., 2004; Nimesh et al., 2006). Las nanopartículas pueden generar ROS (Foucaud et al., 2007) al interactuar directamente con moléculas del medio (ROS extracelular) o después de su interacción con la célula mediante adsorción a la membrana o internalización (ROS intracelular) (Fig. 8).

En este aspecto, si hay una cantidad de producción de ROS que la célula no es capaz de neutralizar, mediante un sistema antioxidante formado por un componente enzimático (dismutasas, catalasas y peroxidasas) y otro no enzimático (α -tocoferol, ascorbato y glutatión), se produce lo que se conoce como

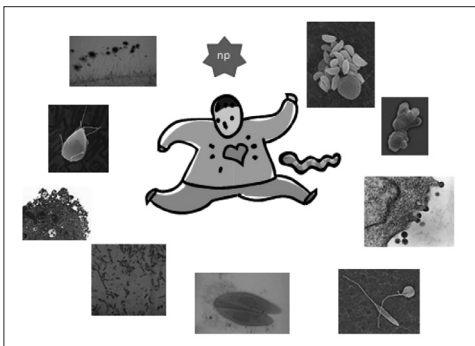


Figura 7. Las nanopartículas son elementos extraños al organismo, e igual que el sistema inmunitario reconoce y destruye patógenos, puede reconocer también a las nanopartículas.

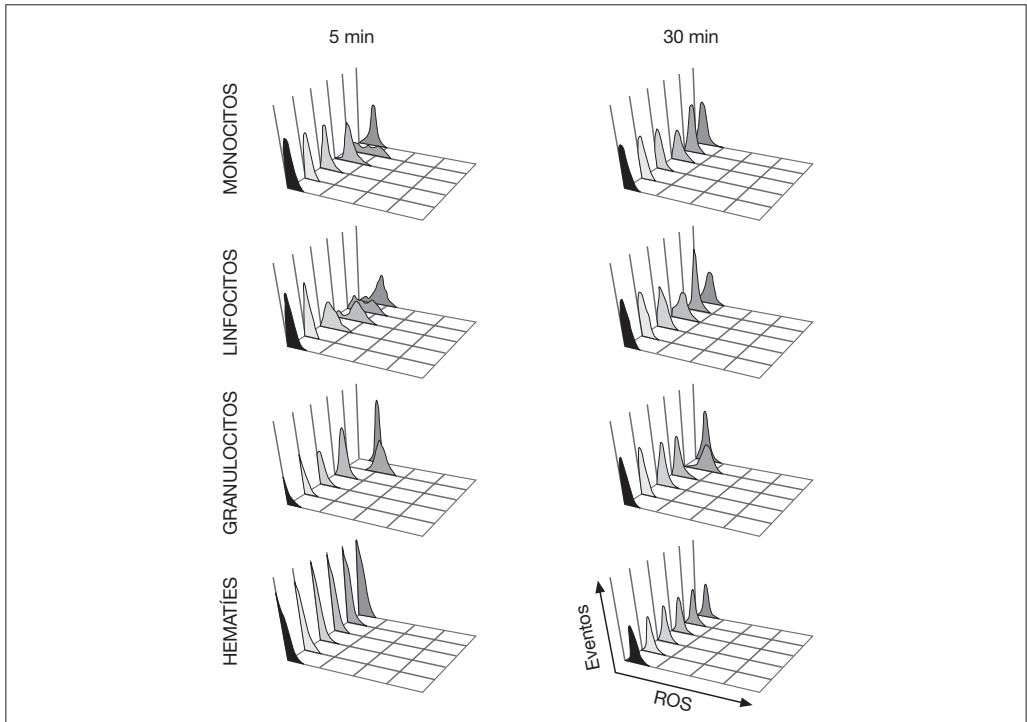


Figura 8. Producción de ROS por parte de distintas células humanas de sangre periférica en presencia de cinco nanopartículas diferentes. Como control negativo se utilizaron células solas (en negro) (Díaz, et al., 2008).

estrés oxidativo. Los excesos de ROS pueden oxidar varias moléculas (DNA, proteínas y lípidos) y conducir a la muerte celular y a daño en los tejidos, tal como ocurre en distintos procesos fisiopatológicos como la inflamación, la hipoxia, los trastornos inmunitarios, el metabolismo de drogas y alcohol, la exposición a radiaciones ultravioleta o terapéuticas, y en casos de deficiencia de vitaminas antioxidantes (Amer et al., 2003).

Activación del complemento

Se ha detectado que determinadas nanoestructuras como los liposomas, o nanopartículas recubiertas de PEG, pueden llevar a una activación de la cascada del complemento (Mosqueira et al., 2001; Bertholon et al., 2006).

Este proceso puede inducir respuestas inflamatorias, con liberación de anafilotoxinas, atracción de células inmunitarias a la zona de inoculación y posterior destrucción celular. Puesto que el complemento puede activarse por varias cascadas (clásica, alternativa y por la vía de las lectinas), puede estudiarse la degradación del factor C3 (Lozano et al., 2011), común a las tres vías, como indicativo de su activación. Esto puede detectarse mediante Western blot o ELISA (Fig. 9).

Nanoestructuras como adyuvantes en vacunas

Ya que muchas nanoestructuras pueden ser reconocidas por el sistema inmunitario como extrañas, podemos hacer de este hecho una

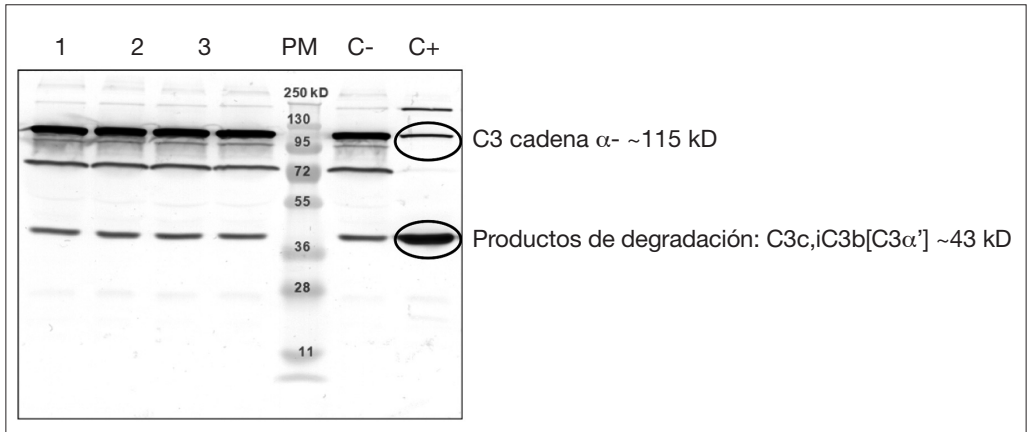


Figura 9. Detección del factor C3 y de sus productos de degradación en plasma humano mediante Western blot, en ausencia (C-) o en presencia de nanopartículas. Como control positivo (C+) se empleó veneno de serpiente (Lozano, et al., 2011).

ventaja y diseñarlas para que potencien la respuesta inmunitaria, bien para destruir un tumor (en el hígado, por ejemplo, donde gran parte de las nanopartículas son rápidamente captadas por los macrófagos hepáticos) o para el desarrollo de nanovacunas (Prego et al., 2010).

En el campo concreto de las vacunas, las nanopartículas pueden ofrecer ventajas a las ya existentes en varias características. Por una parte, pueden incrementar su eficacia, con un efecto adyuvante más potente; también podrían generarse vacunas más termoestables, que mantuvieran su eficacia sin verse afectadas por la rotura de la cadena del frío (uno de los problemas habituales con las vacunas actuales); que no necesitaran de inyección al utilizar sustancias mucoadhesivas que permitieran su inoculación por otras vías (intranasal, oral, vaginal, ocular...); y vacunas de liberación controlada que no requirieran administrar varias dosis.

Conclusión

De todo lo expuesto se concluye que el campo de la nanotecnología puede ofrecer una gran variedad de productos con un enorme poten-

cial en el ámbito biomédico, pero es necesaria una correcta y completa caracterización para asegurar su biocompatibilidad e inmunogenicidad.

Bibliografía

- Amer J, Goldfarb A, Fibach E. Flow cytometric measurement of reactive oxygen species production by normal and thalassaemic red blood cells. *Eur J Haematol.* 2003;70:84-90.
- Bertholon I, Vauthier C, Labarre D. Complement activation by core-shell poly(isobutylcyanoacrylate)-polysaccharide nanoparticles: influences of surface morphology, length, and type of polysaccharide. *Pharm Res.* 2006;23:1313-23.
- Díaz B, Sánchez-Espinel C, Arruebo M, Faro J, de Miguel E, Magadán S, et al. Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates. *Small.* 2008;4:2025-34.
- De la Escosura-Muñiz A, Sánchez-Espinel C, Díaz-Freitas B, González-Fernández A, Maltezda Costa M, Merkoçi A. Rapid identification and quantification of tumor cells using an electrocatalytic method based on gold nanoparticles. *Anal Chem.* 2009;81:10268-74.
- Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol.* 2007;2:469-78.

- Foucaud L, Wilson MR, Brown DM, Stone V. Measurement of reactive species production by nanoparticles prepared in biologically relevant media. *Toxicol Lett.* 2007;174:1-9.
- Franca A, Peláez B, Sánchez Espinel C, Hernández A, Fernández-López C, Grazú V, et al. Sterilization matters: consequences of different sterilization techniques on gold nanoparticles. *Small.* 2010;6:89-95.
- Gessner A, Lieske A, Paulke BR, Müller RH. Functional groups on polystyrene model nanoparticles: influence on protein adsorption. *J Biomed Mater Res A.* 2003;65:319-26.
- Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, Sershen SR, Rivera B, Price RE, et al. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:13549-54.
- Koping-Hoggard M, Sánchez A, Alonso MJ. Nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery. *Expert Rev Vaccines.* 2005;4:185-96.
- Lee JH, Huh YM, Jun YW, Seo JW, Jang JT, Song HT, et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat Med.* 2007;13:95-9.
- Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small.* 2008;4:26-49.
- Lozano T, Rey M, Moya S, Donath E, Gao C, Antipov A, et al. Cytotoxicity effect of metal oxide nanoparticles in human tumor cell lines. *Journal of Physics: Conference Series.* 2011;304. doi:10.1088/1742-6596/304/1/012046.
- Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, et al. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2011;103:317-24.
- McNeil SE. Nanotechnology for the biologist. *J Leukoc Biol.* 2005;78:585-94.
- Mosqueira VC, Legrand P, Gulik A, Bourdon O, Gref R, Labarre D, et al. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials.* 2001;22:2967-79.
- Nimesh S, Goyal A, Pawar V, Jayaraman S, Kumar P, Chandra R, et al. Polyethylenimine nanoparticles as efficient transfecting agents for mammalian cells. *J Control Release.* 2006;110:457-68.
- Powers KW, Brown SC, Krishna VB, Wasdo SC, Moudgil BM, Roberts SM. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicol Sci.* 2006;90:296-303.
- Prego C, Paolicelli P, Díaz B, Vicente S, Sánchez A, González-Fernández A, et al. Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection. *Vaccine.* 2010;28:2607-14.
- Salvador-Morales C, Flahaut E, Sim E, Sloan J, Green ML, Sim RB. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol Immunol.* 2006;43:193-201.
- Shen HM, Lin Y, Choksi S, Tran J, Jin T, Chang L, et al. Essential roles of receptor-interacting protein and TRAF2 in oxidative stress-induced cell death. *Mol Cell Biol.* 2004;24:5914-22.
- Valdivia Uría JG, Ibarra García MR, Fernández Pacheco R, Vilorio A, Higuera T, Laborda A, et al. Estudio experimental sobre quimioterapia focalizada en riñón mediante arpón magnético y administración intravenosa de nanopartículas ferrocarrónicas. *Arch Esp Urol.* 2007;60:5-14.
- Vicent MJ, Duncan R. Polymer conjugates: nano-sized medicines for treating cancer. *Trends Biotechnol.* 2006;24:39-47.
- Zolnik BS, González-Fernández A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology.* 2010;151:458-65.

DISCUSIÓN

A. RIBAS: ¿Qué tipo de nanopartículas usáis en vuestra empresa?

A. GONZÁLEZ: Nuestra empresa, la *spin off* Nano-Immunotech, tiene dos secciones: productos y servicios. En la primera desarrollamos pro-

ductos para funcionalizar nanopartículas, es decir, para conjugar anticuerpos, DNA, aptámeros, azúcares o péptidos sobre la superficie de las nanopartículas. Por otro lado, en la sección de servicios ofrecemos la caracterización físico-química y biológica de nanopar-

tículas. Estamos trabajando muy activamente en la toxicidad de las nanopartículas y en su inmunogenicidad.

R. PUJOL: Para crear nanopartículas se habla mucho del uso de oro, hierro, carbono, etc. ¿Puede crearse una nanopartícula completamente proteica?

A. GONZÁLEZ: Sí pueden crearse nanopartículas completamente proteicas, como el empleo de albúmina para rodear fármacos antitumorales. También existen nanopartículas biodegradables que no son por completo proteicas, pero que pueden combinar elementos. Por ejemplo, pueden usarse polisacáridos (como el quitosano) u otras estructuras oleosas (como emulsionantes) que en determinadas condiciones adoptan estructuras esféricas, pequeñas y bastantes estables, en las cuales pueden acoplarse antígenos proteicos o proteínas en el exterior. Por otro lado, las partículas de oro, que no son biodegradables, tienen unas propiedades ópticas y térmicas ideales, son muy fáciles de sintetizar y puede controlarse su tamaño durante la síntesis (nosotros hemos empleado distintas nanoestructuras de oro, desde 20 hasta 150 nm). Además, pueden ponerse cubiertas empleando otros compuestos (por ejemplo, sílice) y acoplar más elementos. El problema de estas nanopartículas, y en general de todas aquellas no biodegradables, es que no conocemos su tasa de acumulación, su biodistribución, dónde se excretan y eliminan, etc. Por ello, para poder usar nanopartículas en terapéutica son necesarios estudios de biodistribución, excreción y eliminación. El problema de estos estudios es que, aunque se marquen radiactivamente las proteínas asociadas a las nanopartículas, cuando éstas entran en el organismo pueden soltarse de la nanopartícula y entonces se observa la radiactividad de la proteína y no la de la estructura no biodegradable. Hay que resolver los problemas técnicos antes de poder generalizar el uso de este tipo de partículas no biodegradables en terapéutica.

L. ÁLVAREZ-VALLINA: En primer lugar, ¿qué características crees que deberían tener las nanopartículas para su uso en terapia antitumoral, es decir, tipos y número de moléculas de anticuerpos, tamaño, etc.? Y en segundo lugar, ¿existe alguna estrategia para fomentar el desensamblado in vivo de estas partículas?

A. GONZÁLEZ: En relación con la primera pregunta, para uso terapéutico recomendaría nanopartículas biodegradables que contengan fármaco en su interior. Las estructuras acopladas en su superficie deberían ser anticuerpos muy pequeños, ácido fólico, transferrina o albúmina (que permitiría una mejor entrada de las nanopartículas en el tumor y mejoraría su eficiencia). Además, las partículas deberían estar dirigidas y ser inertes para el sistema inmunitario (enmascararlas con PEG u otros compuestos), porque si no es así casi todas serán reconocidas y fagocitadas por los macrófagos hepáticos y esplénicos. En relación con la segunda pregunta, no hay muchos datos sobre los mecanismos de ensamblado y desensamblado de los nanomateriales in vivo. Se dispone de información sobre las interacciones in vitro (por ejemplo la interacción de nanomateriales con proteínas séricas, células y otros materiales), por lo que no podría decir qué interacciones concretas se darían entre nanopartículas y entre éstas y los sistemas biológicos in vivo. Por otro lado, sí se conocen las toxicidades de los materiales usados en las nanopartículas (por ejemplo, del cadmio o del zinc), y se están empezando a conocer de muchas nanoestructuras. Sin embargo, considerando los riesgos que implique su uso, ante una aplicación terapéutica concreta habrá que sopesar si los beneficios compensan la toxicidad propia de las nanopartículas.

A. CELADA: Hay una gran variedad de partículas de oro y no todas son fagocitadas por los macrófagos. Las partículas de oro que preparamos en mi grupo sólo son fagocitadas si las acoplamos a péptidos dirigidos de un determinado modo, en concreto hacia péptidos

presentes en el cerebro en la enfermedad de Alzheimer. De esta manera, los macrófagos pueden activarse mediante los receptores *toll-like 4* y fagocitar las nanopartículas que nosotros queramos. Actualmente estamos en los inicios del uso de las nanopartículas, a pesar de que ya hay una gran variedad de partículas de oro.

A. GONZÁLEZ: Estoy totalmente de acuerdo, no se puede simplificar y hablar simplemente de oro, titanio, etc. Se dispone de una gran variedad de partículas, tipos de síntesis, tamaños, recubrimientos, etc. Y cada una de estas variedades se comportará de manera diferente a las demás. Gracias a esta nueva tecnología podremos conocer mejor nuestra propia biología, tanto extracelular como intracelular.

J. ARAMBURU: En un futuro las nanopartículas serán fruto de aplicaciones biológicas o bien contaminantes que proceden de otros procesos, como los industriales. Es por ello que tendremos que estudiar tanto su biodistribución en los organismos vivos como las consecuencias indeseables derivadas de su uso industrial, por ejemplo la posible acumulación en el ambiente debido a que no todas las nanopartículas serán biodegradables.

A. GONZÁLEZ: Estoy de acuerdo con lo que comentas. Hay tanto para estudiar, que las

agencias reguladoras están analizando diversos aspectos (ambiental, médico, alimentación, cosmética, vertidos...), ya que van a diferir mucho unos escenarios de otros: una exposición ambiental continuada, una accidental con grandes dosis por vía inhalatoria o una aplicación in vivo con dosis controladas, así como la vía de entrada (oral, nasal, intravenosa, cutánea...) en el organismo.

A. RIBAS: Para intentar responder a una de las preguntas anteriores me gustaría comentar que hace 1 año publicamos un estudio (*Nature*. 2010;464:1067-70) en el cual por primera vez administramos nanopartículas de ciclodextranos, totalmente inertes con pegilación y transferrina, para conseguir estabilizar y vehicular siRNA en tumores. Esto permitiría administrar un fármaco mediante una plataforma que podría bloquear cualquier mRNA de cualquier proteína. La necesidad de desarrollar este tipo de partículas es muy importante, aunque aún estamos en sus inicios y el proceso es muy largo. A raíz de este primer estudio, creo que las nanopartículas de oro y de liposomas no son la mejor opción por la dificultad de vehicularlas, ya que las partículas de liposomas siempre van al hígado, independientemente de si se dirigen o no; por ello, creo que las nanopartículas preparadas con polímeros tienen unas propiedades farmacocinéticas muy superiores.

Inmunoterapia celular para modular la respuesta inflamatoria

D. Benítez-Ribas

CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona

Resumen: *El tipo de respuesta generada por determinados componentes del sistema inmunitario desempeña un papel clave en el origen o el mantenimiento de enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias crónicas. Estas afecciones se caracterizan principalmente por una pérdida de tolerancia a autoantígenos o antígenos no patógenos que conlleva una activación inadecuada del sistema inmunitario. Esta activación inapropiada ocasiona de manera frecuente daño a uno o múltiples órganos, afectando a su función. No están plenamente establecidas las causas que originan y mantienen estas respuestas inmunitarias anómalas. La aproximación terapéutica para estas enfermedades se basa, en general, en inmunomoduladores inespecíficos y agentes biológicos administrados sistémicamente. Una modulación más específica, en el tejido afectado, del tipo de respuesta inmunitaria mediante citocinas, anticuerpos monoclonales o terapia celular, representa una aproximación terapéutica altamente atractiva y con gran potencial. Las células dendríticas son las células presentadoras de antígeno más potentes descritas y tienen la propiedad de regular la generación de la respuesta, sea inmunitaria o tolerogénica, dependiendo del contexto en que se produce la interacción del antígeno y la célula, entre otros factores. Debido a la plasticidad funcional, la capacidad de generar respuestas inmunitarias altamente específicas y la posibilidad de obtener células dendríticas in vitro, en condiciones adecuadas para su aplicación clínica, estas células están siendo utilizadas para el tratamiento de tumores o infecciones, con resultados esperanzadores. La obtención de células dendríticas con actividad tolerogénica y los resultados obtenidos con su uso en modelos experimentales sugieren que el tratamiento con células dendríticas tolerogénicas podría representar una alternativa terapéutica para las enfermedades autoinmunitarias y las enfermedades inflamatorias crónicas de base inmunitaria.*

Palabras clave: Inmunoterapia – Terapia celular – Células dendríticas – Enfermedades autoinmunitarias – Tolerancia – Enfermedades inflamatorias crónicas.

Introducción

Las células dendríticas constituyen un grupo heterogéneo de células presentadoras de antígeno, que están involucradas en la regulación de los fenómenos de inmunidad y de tolerancia. La respuesta inmunitaria adaptativa puede ser inmunogénica, que confiere al individuo resistencia a las infecciones y al cáncer, o tolerogénica, en la cual se atenúan o inhiben las respuestas contra antígenos no patógenos.

Los defectos en la regulación de la inducción de tolerancia resultan en situaciones patológicas tales como el rechazo en los trasplantes, la aparición de enfermedades autoinmunitarias o mediadas por la inmunidad, y las alergias. Una vez que las células dendríticas han reconocido y fagocitado agentes patógenos, sufren una serie de transformaciones fenotípicas y funcionales en un proceso complejo, conocido como maduración. La maduración provoca la migración de las células dendríticas desde los

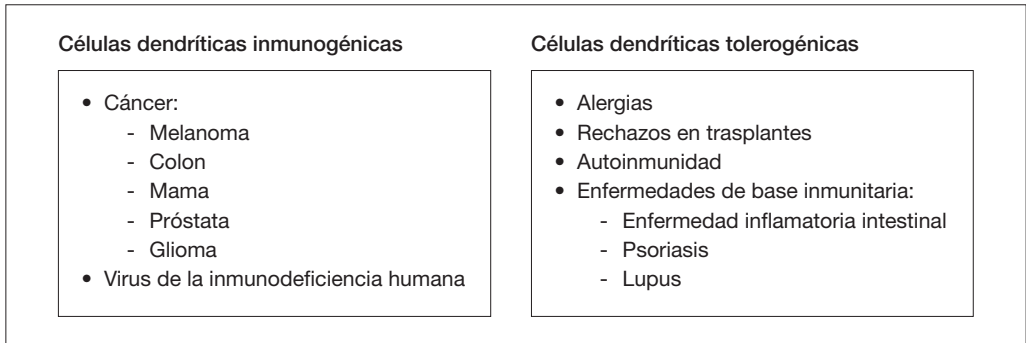


Figura 1. Uso (o posible uso) clínico de las células dendríticas en humanos.

tejidos periféricos hacia los ganglios linfáticos y la presentación de antígenos fagocitados y procesados a los linfocitos T específicos, la interacción con linfocitos B y otros tipos de células dendríticas residentes en el ganglio. Así mismo, durante el proceso de maduración, las células dendríticas expresan en su membrana moléculas implicadas en la interacción y la activación de los linfocitos T (moléculas presentadoras de antígeno y moléculas coestimuladoras), así como la secreción de citocinas proinflamatorias (interleucina [IL] 12, factor de necrosis tumoral alfa [TNF- α]). Las células dendríticas desempeñan, pues, un papel crucial en el inicio y en el tipo de respuesta inmunitaria desencadenada. Debido a las propiedades fisiológicas de las células dendríticas,

que las hacen únicas, y a la posibilidad de su generación *in vitro* utilizando reactivos manufacturados en grado clínico, se han utilizado en ensayos clínicos en humanos con el objetivo de generar respuestas inmunogénicas contra tumores e infecciones (Fig. 1).¹ A pesar de las posibilidades que ofrecen las terapias celulares con células dendríticas en los pacientes con cáncer, hasta la actualidad no se ha explorado la capacidad tolerogénica de estas células en ensayos clínicos.

En la mayor parte de los ensayos clínicos con células dendríticas se han utilizado monocitos (CD14+) como células precursoras, debido a la relativa facilidad de su obtención a partir de sangre periférica respecto a otro tipo de células dendríticas, así como al alto

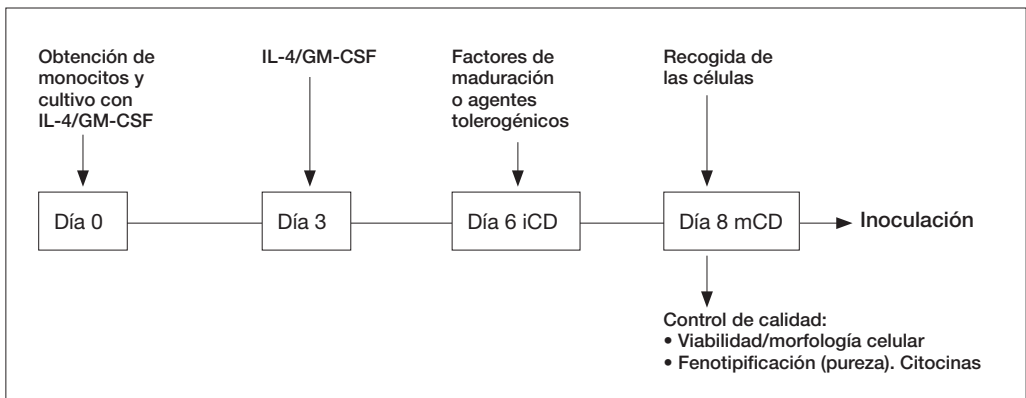


Figura 2. Esquema general para la obtención de células dendríticas a partir de monocitos.

número de células obtenidas² en comparación con la purificación directa de células dendríticas circulantes (Fig. 2). Algunos ensayos han utilizado células dendríticas circulantes para el tratamiento de tumores, lo que supone una mayor complejidad de manipulación al tener que partir de un volumen muy grande de sangre periférica, o bien se han utilizado células dendríticas generadas a partir de precursores CD34+.³ La selección de las diferentes poblaciones de células dendríticas en terapias celulares podría ser de gran relevancia dependiendo del tipo de respuesta inmunitaria que se desee obtener, y que se basa en las diferencias funcionales existentes entre las subpoblaciones.^{4,5}

La respuesta inmunitaria en la enfermedad inflamatoria intestinal

En los pacientes con enfermedad de Crohn se ha determinado que la expansión y la activación incontrolada de linfocitos T con un perfil de citocinas de tipo Th1 (secretoras de interferón gamma [IFN- γ]) está relacionada con una producción aumentada de IL-12, citocina producida a su vez por las células dendríticas activadas y localizadas en la mucosa intestinal. La IL-12 tiene un efecto positivo en la expansión de los linfocitos T de tipo Th1, con lo que se genera un bucle de retroalimentación positiva que cronifica la respuesta inflamatoria. Recientemente, el interés científico también se ha centrado en la IL-23, una citocina heterodimérica que comparte con la IL-12 la subunidad p40. La IL-23 está implicada en la expansión de una subpoblación de linfocitos T descritos como Th17, que se caracterizan principalmente por la secreción de IL-17. Parece que tanto los linfocitos Th1 como los Th17 están íntimamente relacionados con la enfermedad de Crohn, aunque aún está por clarificar el papel que desempeñan en la fisiopatología de la enfermedad.⁶ Además, otra población de linfocitos T con capacidad reguladora, las células T reguladoras (Treg), caracterizadas por la expresión del factor de transcripción FOXP3, son cruciales para el

mantenimiento de la integridad del tracto digestivo, debido a que son capaces de modular y bloquear respuestas inmunitarias no específicas.⁷ En resumen, la enfermedad de Crohn se caracteriza por un desarrollo anómalo de linfocitos T CD4 efectores en respuesta a antígenos no patógenos que se mantiene por retroalimentación positiva con las citocinas secretadas por las células dendríticas activadas. El objetivo de los futuros tratamientos para la enfermedad de Crohn debería centrarse en interrumpir esa alimentación positiva entre el linfocito T-CD que mantiene la inflamación crónica de la mucosa, sea por el incremento del número de Treg o disminuyendo el número de linfocitos CD4 efectores, o por ambos medios.

Células dendríticas tolerogénicas

El silenciamiento de las respuestas inmunitarias contra antígenos propios o no patógenos viene mediado principalmente por las células dendríticas. Cada vez hay más evidencias que apuntan hacia una plasticidad funcional de las células dendríticas dependiendo del contexto en que tenga lugar la respuesta más que de la presencia específica de una población de células dendríticas con una función tolerogénica predeterminada y única. La aplicación terapéutica de células dendríticas requiere la generación in vitro de estas células con un fenotipo tolerogénico estable, en un proceso que sea reproducible y que permita obtener células con alta pureza y viabilidad, aspectos indispensables para su aplicación clínica. Una alternativa para la generación de células dendríticas tolerogénicas es el proceso que consiste en tratarlas con agentes tolerogénicos durante su cultivo en el laboratorio y posteriormente madurarlas mediante estímulos.

Para la obtención in vitro de células dendríticas tolerogénicas se han descrito diversos agentes inmunosupresores (Tabla I), que incluyen corticosteroides (principalmente dexametasona),⁸ vitamina D3,⁹ rapamicina,¹⁰ micofenolato,¹¹ neuropéptidos (péptido intestinal vasoactivo [VIP])¹² o rIL-10;¹³ todos

TABLA I. Compuestos utilizados en la generación de células dendríticas tolerogénicas.

- Agentes inmunosupresores o antiinflamatorios:
 - Corticosteroides (dexametasona)
 - Vitamina D3
 - Ácido micofenólico
 - Rapamicina
- Compuestos químicos:
 - AMPc
 - Prostaglandinas
 - Histamina
 - Neuropeptidos
- Citocinas antiinflamatorias:
 - rhIL-10
 - TGF- β

estos agentes se han utilizado en la generación de células dendríticas resistentes a la maduración. Los protocolos de obtención de células dendríticas tolerogénicas se basan, en general, en la purificación de monocitos de sangre periférica y su posterior cultivo en presencia de citocinas de diferenciación y crecimiento, IL-4 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF),¹⁴ con la presencia de uno o varios agentes inmunosupresores.

No se ha descrito ningún marcador específico de células dendríticas tolerogénicas que permita su rápida identificación tanto in vivo como in vitro. La falta de un marcador específico hace que su caracterización se base en las propiedades funcionales de las células. Principalmente se utiliza la respuesta alogénica como indicador de su baja inmunogenicidad. Otra característica de las células dendríticas tolerogénicas es la elevada producción de IL-10 respecto a IL-12 en respuesta a estímulos activadores, como podría ser el lipopolisacárido. La identificación del fenotipo de las células, expresión moderada de moléculas asociadas a la maduración (moléculas coes-

timuladoras; CD80, CD83 y CD86), también nos proporciona información sobre su perfil tolerogénico. Un estudio exhaustivo de las propiedades tolerogénicas de las células dendríticas obtenidas constituirá una garantía de calidad para utilizarlas en pacientes.

Aplicación terapéutica de las células dendríticas tolerogénicas

Las propiedades tolerogénicas de las células dendríticas se han documentado en humanos,¹⁵ en voluntarios sanos, en un estudio que ha proporcionado la prueba de concepto de que es posible inducir tolerancia antigénica sistémica en los linfocitos T específicos. Sin embargo, un punto crítico en el diseño de terapias basadas en células dendríticas inmaduras es la estabilidad de estas células en un ambiente proinflamatorio como es el de las enfermedades inflamatorias. Por consiguiente, las células dendríticas inmaduras no serían lo bastante seguras para su uso terapéutico en las afecciones que cursan con inflamación crónica, principalmente debido a la capacidad de estas células para responder a los estímulos inflamatorios. La respuesta inmunitaria inapropiada a autoantígenos en pacientes genéticamente predispuestos puede dar lugar a enfermedades autoinmunitarias o mediadas por la inmunidad. Se acepta que uno de los aspectos fundamentales que son causa de fenómenos de autoinmunidad es la producción aumentada de una o varias citocinas específicas, en cuyo proceso intervienen las células dendríticas.¹⁶ Así, por ejemplo, el TNF- α es una citocina clave en la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn y la psoriasis, y su bloqueo con anticuerpos específicos o receptores solubles logra resultados terapéuticos significativos. En la psoriasis, las células dendríticas aisladas de piel afectada son la mayor fuente de producción de TNF- α .¹⁷ Las células dendríticas plasmacitoides y el IFN tipo I se han propuesto también como patógenos en otras enfermedades como el lupus, la psoriasis, la dermatomiositis y el síndrome de Sjögren.¹⁶ Además de in-

ducir autoinmunidad, las células dendríticas son dianas y están implicadas también en la respuesta terapéutica a distintos fármacos: 1) los corticosteroides inhiben la función y el número de células dendríticas inmunogénicas; 2) la azatioprina/mercaptipurina modula la respuesta inmunitaria derivándola hacia una respuesta tolerogénica; y 3) las terapias que activan la formación de células Treg pueden suprimir también la activación de células dendríticas inmunogénicas.¹⁸

No existen documentados, hasta la fecha, ensayos clínicos en humanos que hayan evaluado el tratamiento con células dendríticas tolerogénicas. Sin embargo, sí se han llevado a cabo estudios en modelos animales, como por ejemplo de artritis reumatoide y de colitis, en los cuales se han demostrado unos importantes efectos terapéuticos. En un modelo animal de artritis reumatoide se inyectaron por vía intravenosa tres dosis de células dendríticas tolerogénicas (obtenidas de médula ósea y generadas con dexametasona y vitamina D3), células dendríticas maduras o solución salina fisiológica. Las células dendríticas tolerogénicas obtenidas mostraron un fenotipo semimaduro, produjeron pocas citocinas proinflamatorias y mostraron una baja capacidad estimuladora de células T. Tras la inyección, los ratones tratados con células dendríticas tolerogénicas mostraron una mejoría en la gravedad y la progresión de la artritis, a diferencia de los ratones tratados con células dendríticas maduras o solución salina fisiológica. La mejoría coincidió con un descenso significativo de Th17 y una elevación de CD4+ productoras de IL-10.¹⁹

Modulación de la respuesta inflamatoria en la enfermedad de Crohn

La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria crónica incurable que puede afectar a cualquier parte del tracto digestivo y que se caracteriza por dolor abdominal, diarrea, rectorragias, pérdida de peso, náuseas y vómitos, y retraso de crecimiento en los

niños; además, tiene una repercusión social muy importante para los pacientes. El curso de la enfermedad es intermitente, con fases de actividad y de remisión. Aunque la causa es desconocida, hay evidencias de que se produce una pérdida o una alteración de la tolerancia a antígenos de la luz intestinal. Un desequilibrio de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, de células Th1 y de células T efectoras/reguladoras ocasiona un desequilibrio en la homeostasis inmunitaria y da lugar al desarrollo de respuestas inflamatorias exageradas y crónicas.

El tratamiento actual de la enfermedad de Crohn va dirigido a reducir la inflamación y tratar los signos y síntomas de la enfermedad, y se centra en el uso de corticosteroides, inmunomoduladores (azatioprina, metotrexato) y medicamentos biológicos basados en anticuerpos monoclonales anti-TNF- α . Los objetivos de estos tratamientos son inducir y mantener la remisión clínica, y conseguir una curación de la mucosa que permita restablecer la función intestinal normal. Aunque los fármacos empleados son eficaces en un grupo de pacientes, no están exentos de efectos adversos frecuentes y a veces graves. A pesar del empleo de fármacos, cada vez más generalizado, no se ha conseguido reducir la necesidad de tratamiento quirúrgico, que requieren un 40% a 50% de los pacientes a los 5 años del diagnóstico. Por otro lado, un 10% a 15% de los pacientes presentan actividad crónica a pesar de un tratamiento médico intensivo, y la localización o la extensión de su enfermedad hacen que la cirugía esté contraindicada. Este hecho obliga a buscar nuevas opciones terapéuticas para este grupo de pacientes.

La inducción de tolerancia es un proceso básico para la prevención de la autoinmunidad, y los linfocitos Treg ocupan un lugar fundamental en este proceso. Se ha demostrado que pueden prevenir e incluso curar varios modelos experimentales de colitis. Sin embargo, la aplicabilidad del tratamiento depende en gran medida del número de linfocitos Treg que puedan aislarse y transferirse. En este sentido, las células dendríticas son capaces de

inducir y activar linfocitos Treg que tienen un papel esencial en la supresión de la respuesta inmunitaria contra antígenos propios.²⁰ Resultados experimentales¹² en modelos murinos demuestran que la utilización de células dendríticas tolerogénicas incubadas en presencia de VIP previene o incluso revierte la inducción de colitis por ácido trinitrobenzeno-sulfónico (TNBS) en ratones. El efecto terapéutico se asociaba claramente a una inhibición de la respuesta inmunitaria de tipo Th1, sobre todo debido a la generación de Treg secretores de IL-10. Un aspecto importante del mismo estudio es la ruta de inoculación de las células. Los autores demuestran que la administración intraperitoneal de células dendríticas-VIP permite su migración hacia los ganglios mesentéricos, lugar clave en el control de la respuesta inflamatoria intestinal.¹²

Con estos antecedentes, la posibilidad de generar células dendríticas tolerogénicas para su aplicación en humanos constituiría una aproximación terapéutica nueva en la enfermedad de Crohn, y ofrecería un tratamiento a un grupo de enfermos con un curso grave de la enfermedad y sin otras opciones en la actualidad.

Conclusión

Las células dendríticas son las células del sistema inmunitario implicadas en la generación de inmunidad o tolerancia. Debido a sus propiedades funcionales para generar o modificar el curso de la respuesta inmunitaria, han sido aplicadas terapéuticamente en clínica. En el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal, las herramientas para el tratamiento, incluyendo los agentes biológicos más recientes, han sido ineficaces o incapaces de mejorar el pronóstico a largo plazo en una cierta proporción de los pacientes afectados. Diferentes estrategias terapéuticas prometedoras, tales como el bloqueo de los linfocitos T efectores (con anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4 o anti-CD25), la administración sistémica de rIL-10, el bloqueo de la diferenciación/activación de las células T

(anti-IL-6, anti-IFN- γ , anti-IL-12, anti-IL-23, anti CD80/86) o del reclutamiento celular (anti-ICAM1, anti- α 4-integrinas), así como la estimulación del sistema inmunitario innato (GM-CSF), se han demostrado ineficaces hasta la fecha. La necesidad de nuevos tratamientos para la enfermedad de Crohn u otras enfermedades inflamatorias crónicas de base inmunitaria abre el camino para el desarrollo de innovadoras aproximaciones. Aunque hasta la actualidad no se han realizado estudios clínicos encaminados a evaluar la seguridad y la eficacia de las células dendríticas tolerogénicas, los resultados obtenidos *in vitro* y en modelos animales nos impulsan a explorar esta novedosa vía terapéutica.

Bibliografía

- Schuler G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Eur J Immunol.* 2010;40:2123-30.
- Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med.* 2004;10:475-80.
- Palucka AK, Dhodapkar MV, Pacesny S, Burkholder S, Wittkowski KM, Steinman RM, et al. Single injection of CD34+ progenitor-derived dendritic cell vaccine can lead to induction of T-cell immunity in patients with stage IV melanoma. *J Immunother.* 2003;26:432-9.
- Jefford M, Schnurr M, Toy T, Masterman KA, Shin A, Beecroft T, et al. Functional comparison of DCs generated *in vivo* with Flt3 ligand or *in vitro* from blood monocytes: differential regulation of function by specific classes of physiologic stimuli. *Blood.* 2003;102:1753-63.
- Hochrein H, Shortman K, Vremec D, Scott B, Hertzog P, O'Keeffe M. Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol.* 2001;166:5448-55.
- Veny M, Esteller M, Ricart E, Piqué JM, Panés J, Salas A. Late Crohn's disease patients present an increase in peripheral Th17 cells and cytokine production compared with early patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;31:561-72.
- Iliev ID, Mileti E, Matteoli G, Chieppa M, Rescigno M. Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunol.* 2009;2:340-50.

8. Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone BE, et al. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol*. 1999;162:6473-81.
9. Penna G, Adorini L. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol*. 2000;164:2405-11.
10. Pothoven KL, Kheradmand T, Yang Q, Houlihan JL, Zhang H, Degutes M, et al. Rapamycin-conditioned donor dendritic cells differentiate CD4CD25Foxp3 T cells in vitro with TGF-beta1 for islet transplantation. *Am J Transplant*;10:1774-84.
11. Lagaraine C, Lemoine R, Baron C, Nivet H, Velge-Roussel F, Lebranchu Y. Induction of human CD4+ regulatory T cells by mycophenolic acid-treated dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2008;84:1057-64.
12. González-Rey E, Delgado M. Therapeutic treatment of experimental colitis with regulatory dendritic cells generated with vasoactive intestinal peptide. *Gastroenterology*. 2006;131:1799-811.
13. Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, et al. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol*. 1998;28:359-69.
14. De Vries IJ, Eggert AA, Scharenborg NM, Vissers JL, Lesterhuis WJ, Boerman OC, et al. Phenotypic and functional characterization of clinical grade dendritic cells. *J Immunother*. 2002;25:429-38.
15. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med*. 2001;193:233-8.
16. Banchereau J, Pascual V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity*. 2006;25:383-92.
17. Lowes MA, Chamian F, Abello MV, Fuentes-Duculan J, Lin SL, Nussbaum R, et al. Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:19057-62.
18. Tarbell KV, Petit L, Zuo X, Toy P, Luo X, Mqadmi A, et al. Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4+ CD25+ CD62L+ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *J Exp Med*. 2007;204:191-201.
19. Stoop JN, Harry RA, von Delwig A, Isaacs JD, Robinson JH, Hilkens CM. Therapeutic effect of tolerogenic dendritic cells in established collagen-induced arthritis is associated with a reduction in Th17 responses. *Arthritis Rheum*. 2010;62:3656-65.
20. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:685-711.

DISCUSIÓN

R. VILELLA: El objetivo de la inmunoterapia oncológica es obtener un efecto específico, por lo que se añaden antígenos específicos a las células dendríticas tratadas con dexametasona. En el estudio que has presentado, desde un punto de vista teórico, la administración de células dendríticas tratadas con dexametasona y sin antígenos específicos en pacientes podría funcionar. Pero desde el punto de vista del conocimiento actual, la opinión es que este tipo de tratamiento no tendría por qué funcionar y no sería distinto a tratar a los pacientes con dexametasona, debido a que aún no se conoce el antígeno del patógeno

causante de la enfermedad. ¿Podrías clarificar este aspecto del tratamiento?

D. BENÍTEZ-RIBAS: Éste es el punto clave de la terapia, la especificidad de los antígenos. En los estudios en modelos animales no se ha usado un antígeno porque para la enfermedad de Crohn o colitis no hay un antígeno descrito, y parece ser que no existe. La causa de este tipo de enfermedades es la permeabilización del epitelio, por destrucción o por otros motivos, que provoca la entrada de bacterias en el organismo que estimulan al sistema inmunitario de manera crónica, y

como consecuencia se destruye el epitelio. Creemos que la razón de que el tratamiento funcione (tanto en modelos múridos como en pacientes) es que las células dendríticas, que se inyectan por vía intraperitoneal, migran a la zona inflamatoria e interaccionan con las bacterias o los antígenos causantes de la inflamación, producen IL-10 y en última instancia interaccionan con los linfocitos T. En la primera fase de este estudio, las células dendríticas se inyectan por vía intraperitoneal para evaluar su seguridad, pero en la segunda fase podrían administrarse en otras localizaciones, como por ejemplo en las lesiones o en los ganglios linfáticos, favoreciendo la interacción de las células dendríticas con los antígenos de la zona y la inducción de la respuesta inmunitaria. Aunque sí es verdad que la ausencia de un antígeno específico para la enfermedad es un problema para el estudio.

J. ARAMBURU: La clave para el tratamiento es la estabilidad del fenotipo. ¿Os habéis planteado un modelo múrido en el cual inducir enfermedad inflamatoria intestinal o enfermedad de Crohn para posteriormente inyectar las células dendríticas y ver si son tolerogénicas?

D. BENÍTEZ-RIBAS: El estudio no contempla ensayos para determinar la estabilidad de las células dendríticas, pero in vitro hemos visto que el fenotipo tolerogénico se mantiene durante 2 o 3 días. Son células terminales, por lo que no se dividen, y cuando ya han producido IL-10 e interaccionado con los linfocitos T se mueren. Lo que sí estamos desarrollando son modelos animales para estudiar la biodistribución de las células dendríticas cuando se inyectan. Gracias a los estudios realizados en el área oncológica, sabemos que el 95% de las células mueren en la zona de inoculación debido a la acción de los macrófagos, y que sólo un 4% a 5% de las células migran a los ganglios linfáticos drenantes.

M. DEL VAL: En pacientes tratados con este tipo de terapias, las células tolerogénicas y las cé-

lulas normales inmunogénicas (células maduras) se mezclan. ¿Habéis hecho estudios in vitro de dicha mezcla para ver qué ocurre?

D. BENÍTEZ-RIBAS: No hemos hecho este tipo de estudios con células maduras. Lo que sí hemos hecho es, en primer lugar, inducir células con un perfil de respuesta de tipo Th1 mediante toxina toxoide. Estas células son células in vitro polarizadas, productoras de IFN- γ , con repetidas expansiones con células dendríticas maduras. En segundo lugar, las hemos estimulado con células tolerogénicas. El resultado es que la producción de IFN- γ se anula. Pero podríamos hacer dicho estudio.

L. GRAÇA: Mi pregunta va encaminada a la distinción entre células tolerogénicas y células inmunosupresoras. Si las células tolerogénicas no tienen un antígeno específico, ¿la infusión de células dendríticas tolerogénicas podría tener impacto en la respuesta inmunitaria frente a otros agentes o infecciones?

D. BENÍTEZ-RIBAS: Sí hay un riesgo de generar tolerancia. Uno de los posibles riesgos de inyectar células dendríticas tolerogénicas en una zona con una alta presencia de bacterias y que posee una gran interacción con el medio exterior es que podemos favorecer infecciones. Este riesgo también existe en los tratamientos de tumores, en los que se puede generar autoinmunidad. Pero hay que sopesar los riesgos y los beneficios, y en este caso los beneficios son mayores.

A. CELADA: El eslabón perdido en terapia celular es la localización de estas células. Este problema ya lo hemos solucionado en nuestro grupo de investigación en el modelo de ratón. Realizamos un tratamiento in vitro a los macrófagos de ratón y, cuando los inyectamos, se dirigen específicamente al sitio inflamatorio. Creo que vosotros también deberías aplicar esta técnica, debido a que las células dendríticas se expanden por todo el organismo, por lo que su acción específica es muy pequeña. En cambio, si las células es-

tuvieran dirigidas específicamente a la zona inflamatoria, el tratamiento tendría un gran efecto.

D. BENÍTEZ-RIBAS: Estoy de acuerdo en que la localización es un problema porque necesitamos saber a dónde se dirigen las células. Para poder averiguarlo, la primera fase del estudio incluye la inyección intraperitoneal de células dendríticas en los pacientes, que creemos que migran a la zona afectada por

la inflamación del intestino o a sus ganglios mesentéricos. Además, también estamos caracterizando el receptor CCR9, que es un receptor de quimiocina que dirige específicamente los linfocitos T hacia la lámina propia. Por otro lado, en la segunda fase del estudio pretendemos averiguar hacia dónde migran las células dendríticas mediante el uso de partículas paramagnéticas y de técnicas de imagen por resonancia magnética, pero la agencia reguladora aún no lo ha aprobado.

Inmunoterapia contra el cáncer en melanoma

A. Ribas

Department of Medicine - Hematology/Oncology, University of California Los Angeles
and Jonsson Comprehensive Cancer Center, Los Angeles, CA, USA

Resumen: *Distintas formas de inmunoterapia para el cáncer resultan en respuestas objetivas y muy duraderas en los pacientes con melanoma metastático. Sin embargo, la frecuencia de respuestas tumorales es muy baja cuando se usan vacunas tumorales, vacunas de células dendríticas, citocinas o anticuerpos inmunomoduladores como el bloqueante del CTLA4. La frecuencia de la respuesta tumoral puede aumentar de manera espectacular con el uso de la transferencia adoptiva de linfocitos específicos para el cáncer. Al introducir genéticamente en los linfocitos de un paciente los dos genes de un receptor de linfocitos T con alta afinidad para un antígeno de melanoma, se genera una población de linfocitos específicos para dicho melanoma. Al transferirlos a pacientes que han recibido previamente un condicionamiento con quimioterapia, estos linfocitos transgénicos proliferan rápido e inducen respuestas tumorales. Pero las respuestas no suelen ser duraderas. Para conseguir un aumento de la respuesta tumoral y de su duración puede recurrirse al empleo de combinaciones de nuevos fármacos específicos para oncogenes mutados en el melanoma sin efectos adversos en la función de los linfocitos. Esto puede lograrse con inhibidores específicos del BRAF. Esta combinación aumenta las respuestas en estudios preclínicos y será probada en clínica en un futuro inmediato.*

Palabras clave: Inmunoterapia – Melanoma – CTLA4 – Receptor de células T – Terapia celular adoptiva.

Introducción

Durante las últimas décadas se han hecho grandes avances en la inmunoterapia contra el cáncer. Los mayores avances se han producido con el mejor conocimiento de los mecanismos que permiten estimular respuestas inmunitarias antitumorales, el conocimiento de las limitaciones que el sistema inmunitario utiliza para evitar respuestas contra antígenos propios, y el desarrollo de técnicas para cultivar células inmunitarias y usarlas para terapéutica humana.¹ Una de las áreas donde el avance es más evidente es el melanoma metastático, un cáncer del cual desde hace

muchos años se sabe que en algunos casos puede responder a la inmunoterapia. Actualmente, con el desarrollo clínico de los anticuerpos bloqueantes del CTLA4 y la terapia celular adoptiva, en estos pacientes se obtienen beneficios clínicos evidentes.^{2,3}

Limitaciones a la inmunoterapia del cáncer

El sistema inmunitario humano ha desarrollado numerosos mecanismos para evitar que se produzcan respuestas autoinmunitarias. Estos

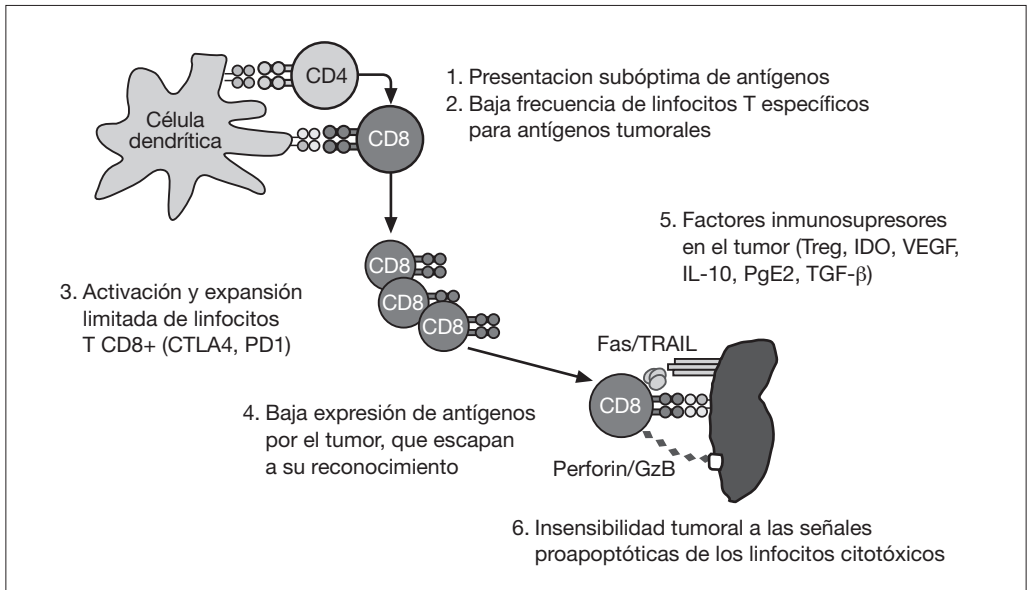


Figura 1. Limitaciones del sistema inmunitario para una inmunoterapia antitumoral efectiva.

mecanismos son explotados por los cánceres para evitar la inmunosupervisión, lo que les permite crecer progresivamente en un huésped con un sistema inmunitario intacto. Una respuesta inmunitaria adaptativa celular empieza con la presentación de antígenos por una célula dendrítica a los linfocitos CD4 (*helper*) y CD8 (citotóxicos). La mayoría de los cánceres presentan primariamente antígenos autóctonos, con lo que el sistema inmunitario no está preparado para reaccionar contra ellos. Además, el desarrollo del sistema inmunitario prioriza la formación en el timo de linfocitos específicos contra antígenos foráneos, eliminando los que tienen alta capacidad para reconocer antígenos autóctonos. Si unos linfocitos específicos para antígenos del cáncer logran escapar de estas limitaciones, tendrán que proliferar y escapar de los mecanismos intrínsecos de regulación de la respuesta inmunitaria, circular y llegar al tumor, encontrar a su antígeno presentado por una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), y ejercer su función citotóxica. Las limitaciones en este proceso son múlti-

ples, empezando por la presencia de señales coinhibidoras (como el CTLA4 o el PD-1), la producción de citocinas inmunosupresoras en el tumor (como la interleucina 10 o el factor de crecimiento tumoral beta), la atracción de células T supresoras (Treg) o simplemente la baja presentación de antígenos por el tumor o la resistencia del tumor a la muerte por apoptosis, que es el resultado final de la acción de los linfocitos citotóxicos (Fig. 1).

Progreso en el tratamiento del melanoma con inmunoterapia: anticuerpos anti-CTLA4

Un avance significativo en el tratamiento del melanoma metastático ha sido el desarrollo clínico de anticuerpos bloqueantes del CTLA4, un receptor coinhibidor que tiene un efecto dominante para inhibir respuestas contra antígenos autóctonos. El anticuerpo ipilimumab ha sido aprobado recientemente por la Food and Drug Administration de Estados Unidos basándose en los resultados de dos

estudios aleatorizados que demostraron un aumento de la supervivencia en los pacientes que recibieron este fármaco en comparación con otros tratamientos.⁴ Sin embargo, el beneficio está limitado a un pequeño grupo que tienen respuestas duraderas, alrededor del 10% al 20% de los pacientes. Estas respuestas tumorales están mediadas por una infiltración intratumoral principalmente de linfocitos CD8 citotóxicos.

Terapia celular adoptiva: generar grandes cantidades de linfocitos antitumorales para el tratamiento del melanoma

Conceptualmente, el efector del tratamiento con anticuerpos anti-CTLA4 es el linfocito CD8 citotóxico. Este linfocito tiene un receptor de superficie, el receptor de células T, que le permite reconocer de manera muy específica un antígeno (un péptido de 9 aminoácidos) presentado por el MHC de clase I. Si se generan en el laboratorio grandes cantidades de linfocitos con un receptor de células T específico para un antígeno presentado por la célula tumoral, pueden administrarse de vuelta a los pacientes como una terapia celular adoptiva.³ Es posible obtener estos linfocitos al procesar lesiones tumorales y expandir los linfocitos intratumorales en interleucina-2, o introduciendo los dos genes del receptor de células T específico (cadena alfa y beta del receptor) en linfocitos usando vectores retrovirales o lentivirales. La eficacia terapéutica de este procedimiento ha sido demostrada por investigadores del National Institute of Cancer en Bethesda, Estados Unidos.^{5,6}

Es importante entender la biología de la infusión de estos linfocitos. Al poner un gen que permita el marcado genético de estos linfocitos y detectarlos con técnicas de imagen molecular basadas en la tomografía de emisión de positrones, puede estudiarse cómo se distribuyen en el huésped y de qué manera atacan al tumor.⁷ Estudios en modelos murinos han permitido definir las distintas fases que estos linfocitos transferidos adoptivamente

siguen en el huésped.⁸ Durante el primer día se distribuyen en el pulmón, y entre los días 2 y 4 se acumulan en los órganos linfoides, donde empiezan a proliferar y a migrar a los tumores que expresan su antígeno específico. La proliferación de estas células en el huésped es notable entre los días 5 y 7, cuando consiguen la máxima actividad antitumoral, y luego se distribuyen más promiscuamente por el cuerpo del ratón.

Estos estudios pueden extrapolarse a la clínica.⁹ En estudios piloto, la transferencia adoptiva de grandes cantidades de linfocitos que expresan un receptor de células T transgénico con especificidad para el antígeno de melanoma MART-1 inducen respuestas antitumorales en la mayoría de los pacientes. Sin embargo, este efecto no está siendo duradero en casi todos los casos, principalmente porque los linfocitos pierden su funcionalidad antitumoral. En el plazo de 1 o 2 meses después de la transferencia adoptiva han perdido la capacidad de proliferar, cambian su fenotipo y muestran marcadores de agotamiento inmunitario, y modifican el repertorio de citocinas que producen al ser expuestos al antígeno para el cual son específicos.

Combinación de inmunoterapia con terapias dirigidas

Aparte de los importantes avances en la inmunoterapia para el melanoma, el desarrollo de nuevos fármacos que bloquean específicamente oncogenes conductores del cáncer, como el BRAF, está resultando en una frecuencia antes inalcanzable de respuestas objetivas en este cáncer.¹⁰ Con vemurafenib (PLX4032) se obtienen respuestas en la mayoría de los pacientes que tienen un melanoma con la mutación BRAF^{V600E}, pero suelen ser de duración restringida.¹¹ Mientras se elucidan los mecanismos de resistencia adquirida a los inhibidores específicos de BRAF,¹²⁻¹⁴ esta experiencia permite planear estudios en combinación con inmunoterapia. El concepto científico es la inmunosensibilización, según el cual un fármaco específico para un oncógeno

mutado en el cáncer que no sea importante para el funcionamiento de los linfocitos puede alterar a la célula cancerígena y hacerla más sensible a la inmunoterapia.¹⁵ El primer paso es demostrar que los linfocitos pueden funcionar adecuadamente a las concentraciones terapéuticas del inhibidor del oncogén,¹⁶ lo que permite planificar estudios en modelos animales y en clínica.

Conclusiones

La inmunoterapia para el melanoma ha hecho grandes progresos desde las descripciones de respuestas espontáneas anecdóticas en algunos pacientes, la inducción de respuestas con vacunas o citocinas también con una baja frecuencia, la más alta frecuencia de respuestas tumorales con la terapia celular adoptiva, y la posibilidad de combinar la inmunoterapia con nuevos fármacos específicos para oncogenes mutados en este cáncer.

Bibliografía

- Ribas A, Butterfield LH, Glaspy JA, Economou JS. Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *J Clin Oncol*. 2003;21:2415-32.
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363:711-23.
- Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:299-308.
- Krieg AM, Matson S, Fisher E. Oligodeoxynucleotide modifications determine the magnitude of B cell stimulation by CpG motifs. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*. 1996;6:133-9.
- Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*. 2006;314:126-9.
- Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 2002;298:850-4.
- Singh AS, Radu CG, Ribas A. PET imaging of the immune system: immune monitoring at the whole body level. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2010;54:281-90.
- Koya RC, Mok S, Comin-Anduix B, Chodon T, Radu CG, Nishimura MI, et al. Kinetic phases of distribution and tumor targeting by T cell receptor engineered lymphocytes inducing robust antitumor responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:14286-91.
- Baltimore D, Witte ON, Yang L, Economou J, Ribas A. Overcoming barriers to programming a therapeutic cellular immune response to fight melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010;23:288-9.
- Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Cho H, et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*. 2010;467:596-9.
- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363:809-19.
- Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS up-regulation. *Nature*. 2010;468:973-7.
- Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature*. 2010;468:968-72.
- Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, et al. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell*. 2010;18:683-95.
- Begley J, Ribas A. Targeted therapies to improve tumor immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2008;14:4385-91.
- Comin-Anduix B, Chodon T, Sazegar H, Matsunaga D, Mock S, Jalil J, et al. The oncogenic BRAF kinase inhibitor PLX4032/RG7204 does not affect the viability or function of human lymphocytes across a wide range of concentrations. *Clin Cancer Res*. 2010;16:6040-8.

DISCUSIÓN

R. VILELLA: A excepción de que el número de respuestas es muy alto, en el estudio que has presentado ocurre lo mismo que en el tratamiento con células dendríticas cargadas con un péptido: el tumor genera variantes que dejan de expresar el antígeno, y por lo tanto continúa su proliferación. Para solucionar este problema, se recomienda cargar las células con distintos péptidos de distintos antígenos, pero a su vez también limita sus posibilidades de actuación. ¿Os habéis planteado redireccionar con varios péptidos distintos?

A. RIBAS: Estamos iniciando un estudio con un nuevo retrovirus que expresa el antígeno carcinoembrionario NY ESO-1. Para intentar solucionar el problema, en él utilizaremos dos antígenos sin relación (un antígeno expresado en melanosomas de melanocitos y un antígeno embrionario que no se expresa en tejidos adultos a no ser que sea un cáncer). Por otro lado, discrepo de lo que has dicho sobre las células dendríticas, ya que nosotros tenemos pacientes que hace 10 años sí respondieron al tratamiento con ellas y no han tenido recaídas. Sin embargo, son muy pocos pacientes. Lo que vemos con este estudio es que al puentear todo el control aferente de sistema inmunitario y crear linfocitos que tienen una alta actividad citotóxica, las respuestas iniciales son muy altas, pero cuando estos linfocitos T pierden su función reaparece el tumor. En comparación, lo que hacemos es muy distinto a las técnicas con células dendríticas, con las cuales teníamos muy poca respuesta, aunque duradera, con CTLA4.

F. RUIZ-CABELLO: Has explicado que la pérdida de respuesta se debe exclusivamente a un problema funcional de los linfocitos T, pero está bastante bien contrastado que ante la pérdida de respuesta no sólo hay que considerar la pérdida funcional de los linfocitos T sino también el escape inmunitario por selección de variantes no inmunógenas

por pérdida del antígeno tumoral o de moléculas HLA. Por otro lado, para comprobar si el problema es sólo por pérdida funcional, podría modificarse el protocolo de vacunación; por ejemplo, se podrían reinfundir los linfocitos y observar si se vuelve a producir la misma cinética de destrucción del tumor.

A. RIBAS: La idea de reinfundir los linfocitos está limitada por todos los procesos a que sometemos a los linfocitos T, como la linfocitopenia, y el factor limitante es la toxicidad del tratamiento, ya que este procedimiento equivaldría a realizar dos trasplantes de médula ósea en un paciente en poco tiempo. Aunque el tratamiento se ha realizado con pocos pacientes, estamos seguros de que la pérdida de expresión de antígenos en células cancerígenas no es tan importante como la pérdida de funcionalidad de los linfocitos, basándonos en datos biológicos, en el desarrollo cronológico y por los resultados que vamos acumulando. Tienes razón en que la pérdida de MHC, de transportadores TAP o de antígeno conduciría a que nada de esto funcionara, pero no parece que el tumor tenga esta capacidad de una forma tan rápida. Aquí tenemos respuestas en los primeros 2 a 3 meses, y los 3 meses siguientes todos los pacientes presentaron múltiples recidivas. No es un clon que empieza a crecer, sino que crecen en diferentes sitios, lo que indica que la respuesta inicial no se ha mantenido, pero estamos abiertos a varias posibilidades.

D. JARAQUEMADA: En el caso de que este tratamiento sea estable y seguro, ¿os habéis planteado alguna estrategia para poder tratar poblaciones reales, en las que la mayoría de las personas no son idénticas en HLA? Aunque en vuestro estudio uséis A2 (a pesar de que es muy común) y en los que además el TCR es específico del MHC, además del péptido.

A. RIBAS: El objetivo del estudio no es conseguir un tratamiento para pacientes sino entender conceptos concretos. Tal y como has dicho,

obviamente, cuando usas un TCR estás limitado por un HLA. Por otro lado, ahora que este estudio está en marcha, hemos planeado hacer TIL (*tumor infiltrated lymphocytes*), que no dependen de TCR debido a que son autólogos y pueden expandirse, y conceptualmente su manipulación y su aplicación son mucho más sencillas. No obstante, esta última opción está limitada por quién paga el tratamiento. Con terapias como las que he comentado pueden controlarse mucho más las variables y aplicar más ciencia, por lo que se conseguirían más becas, tanto de los National Institutes of Health como de fundaciones privadas. Pero para poder obtenerlas hay que plantear objetivos y preguntas concretas, y no pretender encontrar un tratamiento para todo el mundo.

N. PRATS: ¿A qué atribuí la pérdida de pigmentación de la piel y del pelo? ¿También observasteis el mismo efecto en ratones de capa oscura?

A. RIBAS: Es interesante que en los ratones sólo observamos vitíligo en la zona del tumor, y en los pacientes, aunque no en todos, se da casi albinismo completo debido a que MART-1 se expresa en melanocitos normales. El sistema inmunitario ve tanto las células normales como las malignas.

L. ÁLVAREZ-VALLINA: En primer lugar, ¿crees que el apareamiento que puede ocurrir entre los TCR y los receptores endógenos puede tener algo que ver con lo que has comentado? Por otro lado, ¿crees que una aproximación con los CAR (*chimeric activation receptor*), que ahora están muy en boga y dan buenos resultados, podría ser aplicable? Y finalmente, ¿nos podrías decir o perfilar qué ideas tenéis para intentar restaurar o mantener la funcionalidad de los linfocitos T?

A. RIBAS: En relación con la primera pregunta, el apareamiento es un problema muy importante. Nosotros usamos un receptor tisular que tiene preferencia de apareamiento endógeno; el alfa y el beta se aparean muy bien. Pero hemos tenido que descartar muchos receptores porque cuando se ponen en sus linfocitos, que tienen sus receptores alfa y beta endógenos, se produce un desacoplamiento y la especificidad se reduce por debajo del 25%, porque es preferencial con el endógeno. Sin embargo, el que seleccionamos para llevar a la fase clínica era dominante. En cuanto a la segunda pregunta, tenemos interés en los CAR, pero el problema es que su margen terapéutico es muy estrecho en los humanos, y desaparecen debido a su inmunogenicidad. Dan una señalización a través de moléculas coestimuladoras y el problema es que no existe control fisiológico, ya que cuando ven al antígeno producen una señalización muy fuerte, y ha habido dos pacientes que murieron debido a toxicidad por una respuesta exagerada de efectos secundarios. Y en relación con la tercera pregunta, para mantener la funcionalidad de los linfocitos T tenemos pensado realizar varias cosas. Primero, dar oligoclonalidad al receptor tisular, ya que no se le puede dar multiclonalidad. Segundo, dar CTLA4 para mantener la funcionalidad in vivo. Tercero, basándonos en los estudios de Davis Baltimore, poner los TCR en células madre hematopoyéticas, en las cuales hay una formación endógena de linfocitos transgénicos y dominantes, que se seleccionan en el timo. Para lograrlo, hay que conseguir linfocitos maduros para que tengan un efecto antitumoral, y posteriormente, al cabo de 2 o 3 meses, estas células se expandirán, por lo que cuando los linfocitos T (que tienen una funcionalidad y una vida media limitada) dejen de funcionar habrá un tratamiento endógeno.

Inducción de tolerancia para la alergia

L. Graça

Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Resumen: *La inducción terapéutica de tolerancia inmunitaria ha sido un objetivo destacado de la investigación en los últimos años. Sin embargo, el número de enfermedades inmunitarias en las cuales la inducción de tolerancia haya demostrado ser efectiva es todavía muy limitado. Los anticuerpos monoclonales ofrecen la oportunidad de manipular la respuesta inmunitaria para inducir tolerancia. Este capítulo proporciona una visión general de la inducción de tolerancia inmunitaria terapéutica a los antígenos extraños mediante el empleo de anticuerpos monoclonales, y cómo estos mecanismos pueden ser aprovechados para inducir la tolerancia a los alérgenos. Los anticuerpos monoclonales que interfieren con las moléculas implicadas en la activación de los linfocitos T pueden utilizarse para inducir tolerancia a los antígenos presentes durante la activación de estas células. Por lo tanto, la presencia simultánea de los alérgenos y los anticuerpos terapéuticos puede permitir que el sistema inmunitario deje de responder a estos alérgenos, sin dejar de ser inmunocompetente para responder a diversos otros antígenos.*

Palabras clave: Tolerancia inmunitaria – Células T reguladoras – Anticuerpos monoclonales – CD4 – *foxp3* – Asma – Alergia.

Introducción

La inducción terapéutica de tolerancia inmunitaria ha sido considerada por muchos como el santo grial de la inmunología. Las últimas décadas han visto un crecimiento exponencial de la incidencia de enfermedades causadas por la desregulación del sistema inmunitario. Es el caso de las enfermedades alérgicas (como el asma), las enfermedades autoinmunitarias (como la artritis reumatoide, la diabetes de tipo I y la esclerosis múltiple) y las enfermedades inflamatorias intestinales. A estas enfermedades se une la creciente importancia del control de la respuesta inmunitaria que lleva al rechazo de un injerto o a la neutralización de un gen o un agente terapéutico biológico.

La hemofilia es un buen ejemplo de cómo el sistema inmunitario puede ser un obstáculo para el tratamiento eficaz de las enfermedades genéticas. En los pacientes con hemofilia A, que corresponde a una deficiencia en la producción del factor VIII (FVIII), el tratamiento más eficaz es la sustitución de la proteína que falta mediante la administración de factor VIII recombinante. Sin embargo, en aproximadamente un tercio de los pacientes con hemofilia A grave el sistema inmunitario inicia una respuesta inmunitaria contra la proteína recombinante (que en estas personas es una proteína extraña), que da lugar a la producción de anticuerpos que neutralizan al FVIII.¹ Por ello, estos anticuerpos generalmente son conocidos como «inhibidores».

Vamos a usar este ejemplo como caso ilustrativo de la pérdida de tolerancia inmunitaria y su posible inducción terapéutica.

La importancia del timo en la inducción de tolerancia

Entre los diversos componentes de la inmunidad adaptativa, las células T CD4+ desempeñan un papel clave en la regulación de la respuesta inmunitaria. De hecho, incluso las respuestas mediadas por anticuerpos, o aquellas mediadas por las células T citotóxicas, necesitan la «ayuda» de las células CD4+ (razón por la cual se conocen como *helper*). Por lo tanto, la tolerancia de las células CD4+ se ha considerado fundamental en el mantenimiento de un estado de tolerancia inmunitaria global, lo que lleva a la protección en relación con las enfermedades autoinmunitarias.

El timo, donde las células T se desarrollan, también es un órgano esencial para la imposición de la tolerancia inmunitaria. Las experiencias del grupo de Le Dourain mostraron, hace dos décadas, que el trasplante de tejidos entre dos especies diferentes realizado durante el periodo embrionario no lleva a la aceptación de estos tejidos a menos que también sea trasplantado el precursor del epitelio del timo.² Estos resultados complementan a los estudios sobre la tolerancia neonatal de Brent y Medawar, que mostraron que un trasplante de médula ósea en el periodo neonatal puede inducir tolerancia a otros tejidos del mismo donante.³

Más recientemente se ha sabido que las células epiteliales del timo pueden expresar genes característicos de los tejidos periféricos (como la insulina o la mielina), bajo el control de un factor de transcripción llamado Aire.^{4,5} Clásicamente, la contribución del timo para el establecimiento de la tolerancia inmunitaria se ha atribuido al papel de la selección negativa;⁶ esto es, la eliminación de las células T que reconocen antígenos propios con alta avidéz durante su desarrollo en el timo. Se ha

demostrado que la expresión en el timo de los genes ectópicos bajo el control de Aire ayuda a eliminar los clones de células autorreactivas.⁷

Sin embargo, también se ha demostrado recientemente que el reconocimiento de antígenos propios durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo es esencial para la formación de las células T reguladoras (Treg).⁸ Estas células Treg se caracterizan por la expresión del factor de transcripción FOXP3 y son capaces de suprimir la respuesta inmunitaria en la periferia.⁹

Subtipos de células T CD4+

La activación de células T CD4+ en la periferia no sólo está vinculada al reconocimiento de antígenos por su receptor (TCR), sino que también necesita la interacción con un conjunto de moléculas en la superficie de las células presentadoras de antígeno, lo que se conoce como coestimulación. Sin embargo, todavía hay una tercera señal que corresponde al conjunto de las citocinas presentes cerca de la célula T durante su activación. Estas citocinas determinarán la función final de las células CD4+.

Los primeros tipos funcionales de células CD4+ identificados fueron designados Th1 y Th2, y se caracterizan, respectivamente, por la producción de interferón gamma e interleucina 4. Cada una de estas dos citocinas tiene la capacidad de evitar la polarización de las células T en las células que producen la citocina contraria, favoreciendo así la especialización funcional de las células que producen citocinas de su tipo. En consecuencia, y teniendo en cuenta la observación de que varias enfermedades autoinmunitarias se asocian con un predominio de citocinas Th2 (por ejemplo, las enfermedades alérgicas como el asma) o Th1 (por ejemplo, las enfermedades autoinmunitarias), se propuso que la reinducción de tolerancia podría lograrse al favorecer una «desviación inmunitaria» hacia la producción de las citocinas deficitarias.

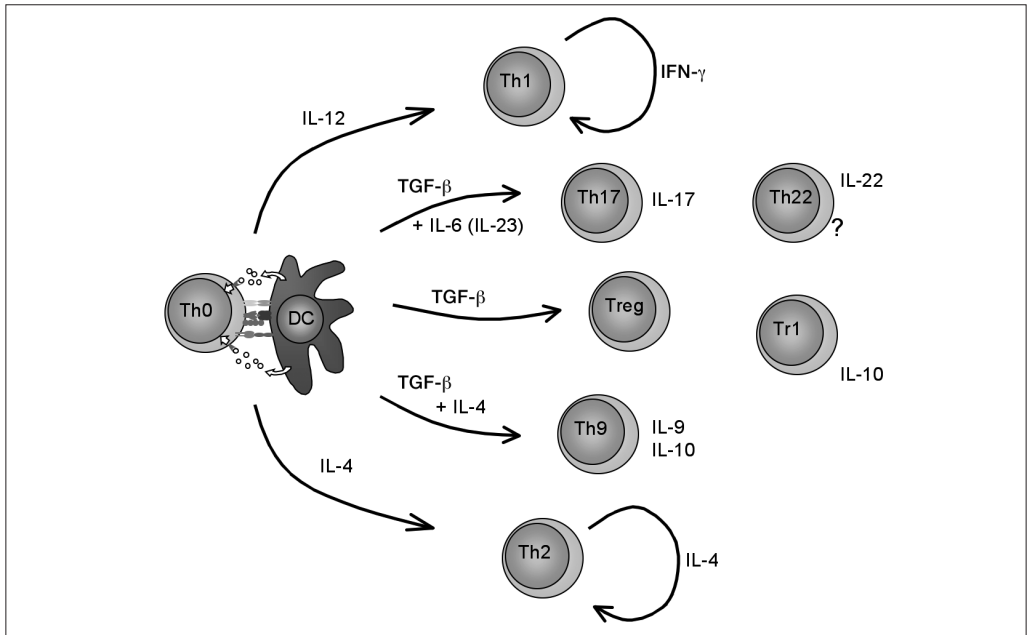


Figura 1. Diferentes subtipos de células T CD4+. La activación de las células CD4+ en presencia de citocinas diferentes afectará a la polarización de estas células en efectores de diferentes subtipos.

Hoy se sabe que la situación no es tan simple. De hecho, hay muchos más tipos de células CD4+ funcionales, es decir, Th17, Th9, Th22, y las citadas Treg (Fig. 1). Estas últimas, que pueden ser identificadas por la expresión de *foxp3*, son particularmente importantes en el mantenimiento de la tolerancia por la capacidad de suprimir a las otras células T. De hecho, una deficiencia de las células Treg, como ocurre en los individuos con mutaciones en el gen *foxp3*, produce un síndrome autoinmunitario grave, llamado IPEX (Inmunodeficiencia, Poliendocrinopatía, Enteropatía, ligado a X), desde el nacimiento.¹⁰

Lugares inmunoprivilegiados

Pero no sólo las células inmunitarias mantienen el estado de tolerancia, también los diferentes tejidos del cuerpo pueden producir sustancias que los protegen de los ataques

inmunitarios. Por ello se ha revisado la noción clásica de que el tejido (por ejemplo, un trasplante, o las vías respiratorias de un paciente asmático) es un espectador pasivo del proceso inflamatorio que le afecta. Los tejidos producen algunos factores, como indoleamina-desoxigenasa (IDO) y hemooxigenasa 1 (HO-1), que pueden protegerlos de la acción del sistema inmunitario.¹¹

Por lo tanto, los clásicos lugares inmunoprivilegiados, como la placenta o la cámara anterior del ojo, son quizá los ejemplos más extremos de la importancia de los mecanismos locales para la protección ante una agresión inmunitaria, pero no los únicos. La mayor parte de nuestros tejidos tiene algunos mecanismos que, en circunstancias normales, pueden contribuir a su protección contra la inflamación excesiva.

Por lo tanto, el estado general de la tolerancia debe entenderse como el resultado de una combinación de mecanismos de acciones

en superposición que, en conjunto, puede evitar la autoinmunidad. Esto no es sorprendente, ya que la autoinmunidad puede tener una importante influencia en la capacidad reproductora de un individuo, y como tal influye en la selección natural.

Inducción de tolerancia

En aquellas situaciones en que una persona se ve afectada por una enfermedad inflamatoria de base inmunitaria, el tratamiento habitual consiste en fármacos antiinflamatorios o inmunosupresores. Sin embargo, este tratamiento no tiene por objeto inducir tolerancia. De hecho, debido a su acción inespecífica estos fármacos son eficaces en la reducción de los síntomas de la enfermedad, pero también disminuyen la capacidad del sistema inmunitario para proteger al cuerpo frente a los microorganismos. El estado de tolerancia se define como la ausencia de una respuesta efectora inmunitaria contra un conjunto definido de antígenos, en un sistema inmunitario competente que sí genera una respuesta protectora frente a otros antígenos.

Este ejemplo queda bien ilustrado con la inducción de la tolerancia en el trasplante. Se ha demostrado que es posible prevenir el rechazo del trasplante utilizando, por ejemplo, anticuerpos monoclonales bloqueadores de las moléculas que participan en la activación de las células T.¹² En animales de experimentación puede prevenirse el rechazo indefinidamente mediante el tratamiento con estos anticuerpos en los primeros días después del trasplante. Los animales son tolerantes (no son inmunodeficientes): son competentes para rechazar trasplantes de donantes diferentes, pero no rechazan los de nuevos donantes genéticamente idénticos al original.

Se ha demostrado que este estado de tolerancia inducida por anticuerpos depende de la inducción de células Treg.¹³ También se ha observado que la tolerancia es dominante y se transmite: en animales tolerantes pueden inyectarse linfocitos T capaces de rechazar

el trasplante, que son controlados, y algunos son convertidos en células Treg.^{14,15} Algunas de estas células Treg se encuentran en el trasplante tolerado.¹⁶ Recientemente hemos demostrado que es posible activar la expresión de *foxp3* en las células asesinas naturales invariantes (iNKT), que así ejercen la misma función que las células Treg.¹⁷ Sin embargo, las células iNKT *foxp3+* tienen la capacidad de migrar hacia el hígado tras su administración intravenosa, con lo cual también pueden inducir la supresión inmunitaria localizada en el hígado.

Inducción de tolerancia a proteínas y alérgenos

Se ha estudiado en detalle cómo se puede inducir o perder la tolerancia frente a proteínas. A principios de los años 1970, Chiller y Weigle hicieron varios descubrimientos fundamentales al respecto, utilizando inmunoglobulinas humanas (como proteínas extrañas) en ratones. Descubrieron que el uso de un adyuvante (endotoxina) podía romper el estado de la tolerancia.¹⁸ Del mismo modo, en varios modelos animales de autoinmunidad se induce la enfermedad después de la administración del antígeno con adyuvante. Chiller y Weigle también descubrieron que la accesibilidad del antígeno a la célula presentadora de antígeno determina el equilibrio entre la inmunidad y la tolerancia.¹⁹ De hecho, la inyección de inmunoglobulina humana en agregados es muy inmunógena en los ratones. No obstante, las mismas moléculas de inmunoglobulina humana no son inmunógenas cuando están desagregadas y así evitan la respuesta inmunitaria frente a inyecciones posteriores con agregados.

Sin embargo, algunos de los métodos más efectivos para inducir la tolerancia al trasplante no resultaron muy eficaces para inducirla a las proteínas. Por ejemplo, en modelos animales de hemofilia, los mismos anticuerpos monoclonales que son eficaces en la inducción de tolerancia a los trasplantes (como

el anti-CD4) sólo retrasan la producción de inhibidores del factor VIII.^{20,21} Pero si en lugar de utilizar FVIII inyectado, el FVIII se expresa en los tejidos mediante terapia génica, la infusión de anticuerpos monoclonales sí puede inducir tolerancia.²²

Cabe señalar que los anticuerpos utilizados para inducir la tolerancia son anti-CD4 de un isotipo que no causa directamente la muerte de las células que reconocen.

Sin embargo, encontramos que los mismos anticuerpos terapéuticos (anti-CD4) administrados al mismo tiempo que un extracto de alérgeno (ácaros del polvo doméstico) pueden prevenir la aparición de manifestaciones de asma alérgica en ratones, en particular la infiltración de las vías respiratorias con células inflamatorias, la producción excesiva de moco y la hiperreactividad bronquial (Agua-Doce y Graça, pendiente de publicación).

El tratamiento con anti-CD4 puede impedir las manifestaciones del asma alérgica cuando el anticuerpo se administra simultáneamente con el alérgeno (pero no cuando se administra sin él) en animales previamente sensibilizados (Agua-Doce y Graça, pendiente de publicación).

Para estudiar mejor el mecanismo de inducción de la tolerancia reproducimos el sistema experimental con dos proteínas diferentes: ovoalbúmina y β -lactoglobulina. En estos casos, el estado de la tolerancia se confirma por la ausencia de producción de inmunoglobulina después de la inmunización de los ratones con la misma proteína, mientras se mantienen inmunocompetentes para producir anticuerpos cuando son inmunizados con una proteína diferente. Estos resultados demuestran que el estado de tolerancia es específico del antígeno, y que los animales permanecen inmunocompetentes.

La inducción de tolerancia es lo suficientemente robusta para imponerse en animales con un TCR transgénico, en los cuales la gran mayoría de las células T son específicas para el antígeno utilizado. Estos animales transgénicos permiten la investigación de los mecanismos que llevan al estado de tolerancia, al

permitir seguir el destino de estas células T específicas para el antígeno.

Conclusión

De acuerdo con los datos anteriores, encontramos que el estado de tolerancia puede mantenerse de varias formas. Vimos que el mantenimiento de la tolerancia natural se basa en diversos mecanismos que en conjunto cooperarán en la prevención de la autoinmunidad. Del mismo modo, en la inducción de tolerancia periférica pueden influir diferentes factores: algunos dependientes de citocinas como la interleucina-10, otros que se basan en factores locales, tales comoIDO, muchos otros que requieren la expansión de las células Treg, y finalmente otros que actúan reduciendo el número de células específicas para el anti-

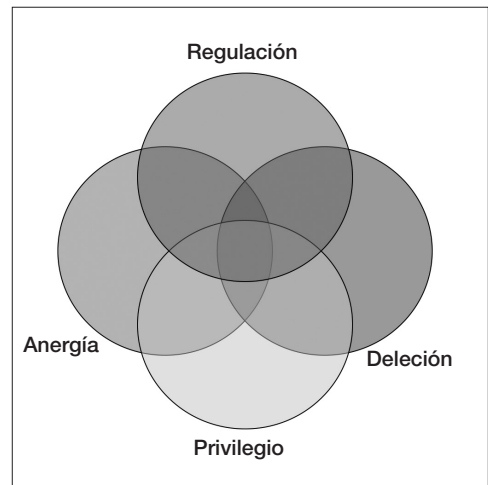


Figura 2. Los diferentes mecanismos de inducción de tolerancia inmunitaria actúan de manera complementaria. En diferentes localizaciones anatómicas (como la placenta, el intestino o la piel), algunos de estos mecanismos son más importantes. También en distintas situaciones (por ejemplo, en presencia de infección o adyuvante) pueden reclutarse preferentemente algunos de los mecanismos. Sin embargo, todos podrán ser utilizados para la inducción de tolerancia terapéutica.

geno en cuestión (Fig. 2). Es posible aprovechar la sinergia entre estos mecanismos para desarrollar estrategias más eficaces para inducir tolerancia inmunitaria. De hecho, nuestros estudios preliminares muestran que, en individuos sensibles a alérgenos, los métodos de inducción de tolerancia basada en las células T tienen una baja eficiencia, pero la promoción de la eliminación de los clones reactivos al alérgeno podrá favorecer la inducción de tolerancia.

Bibliografía

1. Kaveri SV. Anti-factor VIII antibodies (inhibitors) in hemophilia A: in dire need of basic and therapeutic research. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2009;37:55-7.
2. Ohki H, Martin C, Corbel C, Coltey M, Le Douarin NM. Tolerance induced by thymic epithelial grafts in birds. *Science.* 1987;237:1032-5.
3. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature.* 1953;172:603-6
4. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science.* 2002;298:1395-401.
5. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol.* 2001;2:1032-9.
6. Mathis D, Benoist C. Aire. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:287-312.
7. Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity.* 2005;23:227-39.
8. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol.* 2001;2:301-6.
9. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133:775-87.
10. Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest.* 2000;106:R75-81.
11. Oliveira V, Agua-Doce A, Duarte J, Soares MP, Graca L. Regulatory T cell maintenance of dominant tolerance: induction of tissue self-defense? *Transpl Immunol.* 2006;17:7-10.
12. Agua-Doce A, Graca L. Induction of dominant tolerance using monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol.* 2007;380:405-29.
13. Graca L, Le Moine A, Cobbold SP, Waldmann H. Dominant transplantation tolerance. *Opinion. Curr Opin Immunol.* 2003;15:499-506.
14. Graca L, Honey K, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. Cutting edge: anti-CD154 therapeutic antibodies induce infectious transplantation tolerance. *J Immunol.* 2000;165:4783-6.
15. Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliott J, Kioussis D, Davies J, et al. "Infectious" transplantation tolerance. *Science.* 1993;259:974-7.
16. Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med.* 2002;195:1641-6.
17. Monteiro M, Almeida CF, Caridade M, Ribot JC, Duarte J, Agua-Doce A, et al. Identification of regulatory Foxp3+ invariant NKT cells induced by TGF-beta. *J Immunol.* 2010;185:2157-63.
18. Chiller JM, Weigle WO. Termination of tolerance to human gamma globulin in mice by antigen and bacterial lipopolysaccharide (endotoxin). *J Exp Med.* 1973;137:740-50.
19. Chiller JM, Weigle WO. Cellular events during induction of immunologic unresponsiveness in adult mice. *J Immunol.* 1971;106:1647-53.
20. Reipert BM, Sasgary M, Ahmad RU, Auer W, Turecek PL, Schwarz HP. Blockade of CD40/CD40 ligand interactions prevents induction of factor VIII inhibitors in hemophilic mice but does not induce lasting immune tolerance. *Thromb Haemost.* 2001;86:1345-52.
21. Salooja N, Kembal-Cook G, Tuddenham EG, Dyson J. Use of a non-depleting anti-CD4 antibody to modulate the immune response to coagulation factors VIII and IX. *Br J Haematol.* 2002;118:839-42.
22. Peng B, Ye P, Blazar BR, Freeman GJ, Rawlings DJ, Ochs HD, et al. Transient blockade of the inducible costimulator pathway generates long-term tolerance to factor VIII after nonviral gene transfer into hemophilia A mice. *Blood.* 2008;112:1662-72.

DISCUSIÓN

C. MUÑOZ: ¿Se utilizan anticuerpos anti-CD4 en humanos para trasplante, o lo que nos has explicado sólo se aplica en modelos murinos?

L. GRAÇA: Los anticuerpos anti-CD4 fueron unos de los primeros anticuerpos monoclonales estudiados en ensayos clínicos sobre la artritis reumatoide, a finales de la década de 1990. Inicialmente, los anticuerpos monoclonales no humanizados eran muy inmunógenos. Los resultados de estos ensayos no fueron demasiado positivos, pero se mantuvo la idea de que la falta de eficacia estaba relacionada con la cantidad de anticuerpos contra los anti-CD4. Y los pacientes que respondían presentaban valores de anti-CD4 más bajos. Por otro lado, se dispone de un estudio para el tratamiento del asma en el cual el anti-CD4 (keliximab) indujo leucocitopenia. Su objetivo no era inducir tolerancia sino eliminar de manera específica las células CD4. Hay una empresa americana que ha humanizado el anti-CD4 y está considerando empezar ensayos clínicos con este anticuerpo.

A. RIBAS: ¿Nos puedes explicar un poco más cómo actúa el anticuerpo anti-CD4? ¿Interacciona sólo sobre el receptor o bien produce algún tipo de efecto en la señalización intracelular?

L. GRAÇA: La señalización intracelular no se conoce, pero sabemos que los anticuerpos anti-CD4 (que son bloqueantes) causan una reducción de la expresión de CD4 en la superficie de los linfocitos. Se observó con un anticuerpo para un epítipo diferente. En términos de señalización no se conoce bien, pero en términos de efecto, nuestro grupo y otros hemos conseguido inducir la muerte celular por apoptosis, que no elimina a los linfocitos por complemento, sino que como los linfocitos se activan debido a esta perturbación de su señalización, cuando éstos se dividen también inician el proceso de apoptosis.

A. RIBAS: Debido a que es un correceptor del receptor de células T, ¿modifica la especificidad del receptor de células T para sus antígenos?

L. GRAÇA: Es difícil de estudiar, pero sabemos que los linfocitos T reciben una señal derivada de su antígeno. De hecho, en situaciones de trasplante son claramente específicos de antígeno, y por eso no se bloquea por completo la capacidad de los linfocitos T de recibir una señal del antígeno. Pero está claro que la calidad de esta señal cambia de manera espectacular.

L. ÁLVAREZ-VALLINA: ¿Disponéis de datos respecto a si los anticuerpos monovalentes anti-CD4 con Fab tienen este mismo efecto? ¿Crees que podría utilizarse algún otro formato adicional para potenciar este efecto?

L. GRAÇA: Desconozco si hay estudios con anticuerpos monovalentes. Por otro lado, con los Fab, el mejor ejemplo es el de los anti-CD3. Los resultados con anti-CD3 son muy similares a los obtenidos con anti-CD4 en cuanto a la inducción de tolerancia, y además hay estudios clínicos con anti-CD3 para la diabetes. Pero los anti-CD3 presentan un problema, que es la liberación de citocinas. Muchos estudios se realizaron con fragmentos de Fab, a pesar de su diferente semividua, y los resultados fueron similares a los obtenidos con los anticuerpos.

L. ÁLVAREZ-VALLINA: ¿Has probado el anti-CD4 que vosotros usáis como Fab en vuestro modelo?

L. GRAÇA: No, no lo hemos estudiado.

J. ARAMBURU: ¿Podéis generar memoria? Estos linfocitos no son T reguladores porque no dependen de FOXP3, sino que en cierto sentido son de tipo hiperrespondedores. ¿Podéis establecer poblaciones de memoria,

transferirlas, y mantener esta hiperrespuesta con el tiempo? Desde un punto de vista terapéutico, podrías hacer infusiones periódicas.

L. GRAÇA: Precisamente estamos llevando a cabo estos experimentos ahora, aunque sólo disponemos de datos muy preliminares. Al transferir linfocitos que son específicos de antígeno, sabemos que después del tratamiento muchas de estas células mueren, seguramente por apoptosis, pero las que sobreviven, que no son reguladoras ni *foxp3* positivas, tienen características de células anérgicas.

M. DEL VAL: Cuando se realiza el tratamiento junto con la exposición al alérgeno se produce una inhibición de la reacción alérgica asmática. En el caso de la memoria, en el

mismo ratón y a largo plazo, si sólo se expone al alérgeno sin anti-CD4 ni anti-CD40, ¿se observa memoria? Es decir, ¿se mantiene la protección?

L. GRAÇA: Sí, hemos observado que se mantiene la protección. Con el mismo alérgeno hay protección, pero si utilizamos otro observamos tolerancia sin inmunosupresión.

M. JUAN: La inmunoglobulina específica de todos los modelos que has comentado, ¿se mantiene en la normalidad o disminuye y hay cambios de isotipo?

L. GRAÇA: En los animales sensibilizados sin tratamiento, la inmunoglobulina específica disminuye con el tiempo. En cambio, con el tratamiento no aparece.

Inmunoterapias experimentales* para la enfermedad celíaca, un modelo de autoinmunidad inducida por la dieta

F. León¹, L. Crespo² y G. Castillejo³

¹Immunology Translational Medicine Centocor R&D – Johnson & Johnson, Malvern, PA, USA

²Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid

³Hospital Universitario San Joan, Reus (Tarragona)

Resumen: *La enfermedad celíaca se inicia como una intolerancia dietética de base enzimática frente a las gliadinas o péptidos del gluten, componente fundamental de los cereales más frecuentes en el mundo occidental. Rápidamente, esta intolerancia deriva en una enfermedad autoinmunitaria sistémica. En la actualidad, los celíacos deben seguir de por vida una dieta estricta carente de gluten, algo casi imposible en la práctica. El 50% de los celíacos que siguen una dieta sin gluten continúa experimentando síntomas, producción de autoanticuerpos y atrofia de las vellosidades intestinales. Por tanto, es necesario el desarrollo de nuevos tratamientos. Hasta la fecha se han realizado ensayos clínicos con cinco opciones terapéuticas dirigidas a distintos aspectos de la cascada autoinmunitaria y que se postulan como “complementos” de la dieta sin gluten para evitar el daño inducido por contaminaciones o transgresiones dietéticas. El acetato de larazótido es el fármaco experimental más avanzado y ha demostrado una reducción de los síntomas y de los anticuerpos antitransglutaminasa. El campo de la inmunoterapia experimental para la enfermedad celíaca está en sus inicios, pero presenta ya signos esperanzadores de que algún día habrá tratamientos farmacológicos que contribuyan a un mejor control de los pacientes celíacos y una mejora de su calidad de vida.*

Palabras clave: Dieta sin gluten – Enfermedad celíaca – Glutenasas – Larazótido.

Introducción

La enfermedad celíaca es una de las afecciones genéticamente determinadas más prevalentes en la población occidental. Se caracteriza por la aparición de una reacción inmunitaria iniciada en el intestino delgado contra las proteínas del gluten de la dieta. En los individuos predispuestos, esta reacción desemboca en una respuesta autoinmunitaria

contra varios autoantígenos y en el desarrollo de patología intestinal y extraintestinal. Varios estudios epidemiológicos han estimado una prevalencia de un caso por cada 130 a 400 individuos de la población general. Normalmente se presenta en los primeros años de la vida, aunque puede pasar inadvertida y no ser diagnosticada hasta la edad adulta, con una presentación atípica o extraintestinal. Muchas veces, sin embargo, la enfermedad puede apa-

*Todos los compuestos mencionados en este artículo son experimentales y no han sido aprobados para su uso, al no estar aún demostradas su eficacia y su seguridad.

recer en la edad adulta. Se estima que la enfermedad celíaca con manifestaciones extra-intestinales es hasta 15 veces más frecuente que la que produce síntomas intestinales, y que por cada paciente diagnosticado hay entre 5 y 10 que no lo están. El descubrimiento y la introducción en la práctica clínica de tests serológicos sensibles y específicos (anticuerpos antiendomiso y antitransglutaminasa tisular) han permitido incrementar el diagnóstico de casos monosintomáticos o asintomáticos. El diagnóstico precoz de esta enfermedad resulta crucial, ya que la mortalidad asociada a ella es hasta dos a cuatro veces superior a la de la población general, relacionada principalmente con una elevada asociación de linfomas T y B, y en menor medida otros tumores digestivos.

Patogenia de la enfermedad celíaca

La enfermedad celíaca es multifactorial, pues intervienen factores genéticos, inmunitarios y ambientales (gluten). Muestra una de las asociaciones más fuertes que se hayan descrito con la región HLA. En la mayoría de las poblaciones, más del 90% de los pacientes expresan el heterodímero HLA-DQ2 codificado por los alelos DQA1*0501 y DQB1*02; los restantes expresan el heterodímero HLA-DQ8, codificado por los alelos DQA1*03 y DQB1*0302. El papel predominante del HLA DQ2 se explica porque los péptidos de gluten modificados por la transglutaminasa tisular tienen una afinidad aumentada por las moléculas DQ2 de las células presentadoras de antígeno.

El gluten es una mezcla compleja de polipéptidos presente en cereales como el trigo, la cebada, el centeno y la avena, consistente en dos fracciones: una soluble en alcohol, denominada gliadina, hordeína, secalina o avenina en función del cereal a que nos estamos refiriendo (trigo, cebada, centeno y avena, respectivamente), y otra insoluble que recibe el nombre de glutenina. Una característica común de las proteínas del gluten es su alta cantidad de prolina y glutamina, que hace que sean especialmente resistentes a la

digestión por las enzimas gastrointestinales y permite su persistencia en el lumen intestinal, con el consecuente desarrollo de una respuesta inmunotóxica en los individuos genéticamente predispuestos. Los péptidos de gluten se unen a la enzima transglutaminasa tisular, que los desamina y transforma los residuos de glutamina en ácido glutámico, resultando péptidos cargados negativamente que son presentados por las moléculas HLA de clase II DQ2 y DQ8. Este hecho provoca la activación de los linfocitos CD4 T *helper* 1 en la lámina propia, y secundariamente una inflamación intestinal que da lugar a hiperplasia de las criptas y atrofia de las vellosidades intestinales. Uno de estos péptidos, el conocido como 33-mer, posee una secuencia altamente inmunógena que es reconocida por las células T de la mucosa intestinal. Se desconoce cómo los péptidos de gluten inmunógenos alcanzan la lámina propia desde la luz intestinal. Hay evidencias que demuestran que pueden pasar por vía paracelular a través de uniones intercelulares densas defectuosas. Sin embargo, otros estudios han demostrado que el transporte ocurre por medio de transcitosis epitelial, aunque también se ha propuesto que las células dendríticas puedan lanzar proyecciones que alcancen el lumen intestinal. Una vez activadas, las células CD4 secretan citocinas Th1, fundamentalmente interferón gamma (IFN- γ). Otras citocinas relevantes en la patogenia de la enfermedad celíaca son el IFN- α y las interleucinas (IL) 15, 18 y 21. El resultado final es un daño a la mucosa manifestado como atrofia de las vellosidades e hiperplasia de las criptas, con reducción de la superficie de absorción intestinal (Fig. 1).

Las nuevas opciones terapéuticas tienen "puntos de ataque" complementarios. En un futuro este hecho posiblemente permitirá el tratamiento de la enfermedad celíaca con una combinación de dos o más fármacos, asociados a la dieta sin gluten. Hasta el momento se han desarrollado ensayos clínicos con cinco opciones diferentes. El acetato de larazótido (AT-1001) tiene como objetivo impedir el paso de péptidos de gluten a la

lámina propia mediante el cierre de las uniones intercelulares densas localizadas paracelularmente. Por otro lado, la degradación del gluten empleando endopeptidasas (ALV003 y AN-PEP) conduciría a la formación de aminoácidos no tóxicos, que no inducirían una respuesta inmunitaria patológica al alcanzar la lámina propia. También se está ensayando una vacuna desensibilizante (*Nexvax2*[®]) que utiliza tres péptidos del gluten, los cuales provocarían una reacción de inmunotolerancia en las células T en pacientes celíacos HLA DQ2 positivos. Y por último, se están

estudiando nuevas alternativas de tratamiento basadas en fármacos inmunomoduladores, como el inhibidor de los receptores CCR9 de los linfocitos T (CCX282-B, *Traficet-EN*[®]) y la infección por el parásito *Necator americanus* (Fig. 1).

Los péptidos del gluten de la dieta alcanzan la lámina propia por vía paracelular y transcelular, y allí son desaminados por la enzima transglutaminasa (TG2) para producir epítopos altamente inmunógenos. Si se impide el paso de los péptidos reordenando y cerrando las uniones intercelulares densas localizadas

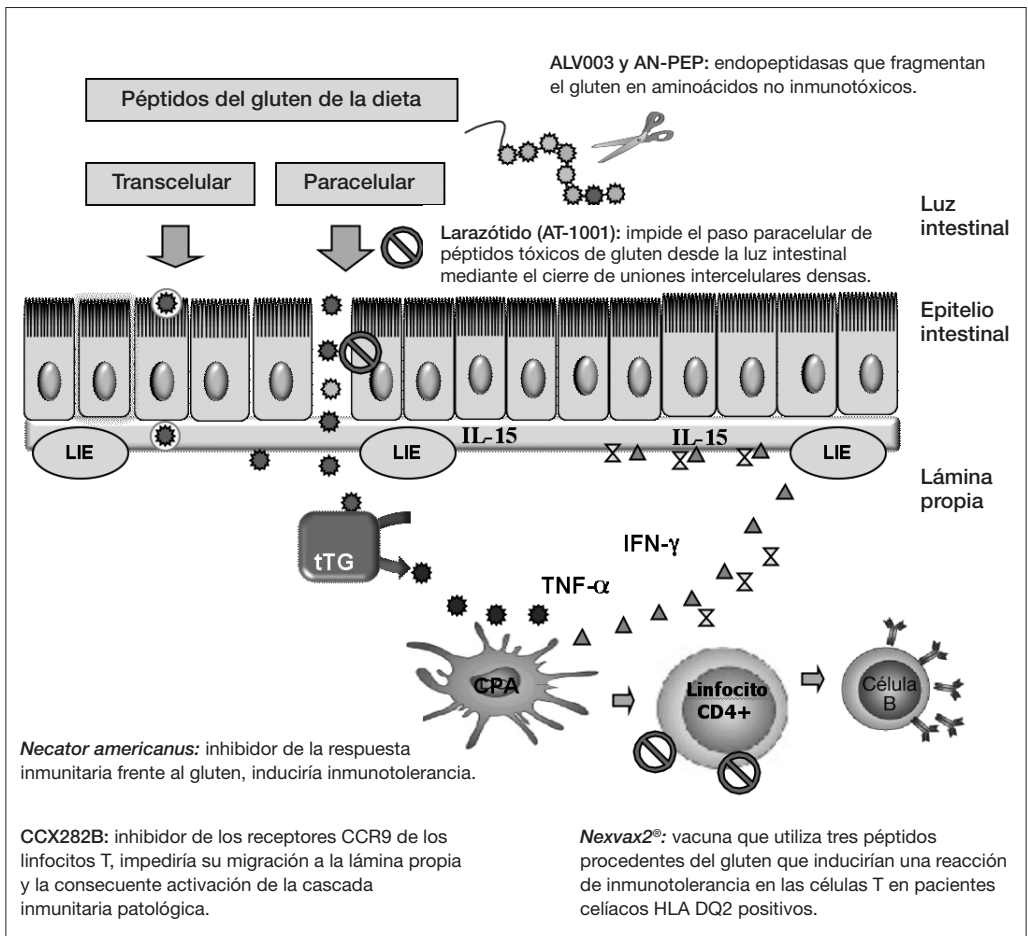


Figura 1. Mecanismos de acción y puntos de ataque de las nuevas opciones terapéuticas en la enfermedad celíaca.

paracelularmente (como hace el larazótido), éstos no alcanzarán la lámina propia y no se iniciará la cascada inmunitaria patológica. Por otro lado, las endopeptidasas ALV003 y AN-PEP tienen como objetivo degradar el gluten hasta conseguir aminoácidos no tóxicos, que al llegar a la lámina propia no inducirían reacciones inmunitarias aberrantes. Otros fármacos en estudio inhiben la activación linfocitaria, como el inhibidor de los receptores CCR9 de los linfocitos T (CCX282B o *Traficet-EN*[®]), y hacen que éstos no alcancen la lámina propia intestinal desde el torrente sanguíneo y se impida la reacción inflamatoria típica de la enfermedad celíaca. La vacuna terapéutica *Nexvax2*[®] induce una reacción de inmunotolerancia en las células T de los pacientes DQ2 positivos, y la inoculación subcutánea de *Necator americanus* también trata de inducir reacciones de inmunotolerancia.

Tratamiento actual de la enfermedad celíaca: dieta sin gluten

Una dieta difícil de cumplir

La dieta sin gluten supone la supresión de todo alimento que lo contenga, es decir, de cualquier producto que incluya harinas de trigo, cebada, centeno o avena. Actualmente no hay unanimidad en cuanto a considerar a la avena una proteína segura. Al ser su contenido en prolaminas inferior al de los tres cereales reconocidos como tóxicos, sus efectos nocivos podrían manifestarse a largo plazo, motivo por el cual la recomendación actual más extendida es desaconsejar su consumo. A priori, la eliminación del gluten de la dieta puede parecer tarea sencilla, pero hay que tener en cuenta que las harinas se utilizan ampliamente en la industria alimentaria y están presentes en multitud de alimentos. La normativa que regula el etiquetado de los productos alimentarios de la mayor parte de los países es deficiente. El colectivo celíaco está constantemente expuesto a contaminaciones incontroladas de gluten en los alimentos que consumen, por falta de tecnologías

que permitan garantizar con fiabilidad si un alimento está libre de gluten. En consecuencia, cumplir fielmente la dieta sin gluten es complejo y a menudo el enfermo celíaco ve restringidas sus actividades sociales o se ve obligado a reducir la variedad de alimentos que ingiere. Por otro lado, los alimentos exentos de gluten pueden ser difíciles de encontrar, generalmente tienen peor sabor y a menudo son más caros. Se estima que, a lo largo del tiempo, entre el 30% y el 50% de los individuos celíacos serán incapaces de mantener una dieta sin gluten estricta. Estos pacientes podrán tener síntomas recurrentes, y además, el no cumplimiento de la dieta tiene como consecuencia una elevada morbilidad que puede manifestarse en forma de osteopenia, abortos de repetición, retraso del crecimiento fetal intrauterino, infertilidad masculina y un riesgo aumentado de neoplasias del tracto digestivo, principalmente. En definitiva, son necesarios tratamientos alternativos que actúen de manera conjunta con la dieta para mejorar la calidad de vida del paciente celíaco. Estos nuevos avances terapéuticos deberán ser seguros, eficaces y con un coste razonable. Hasta la fecha, su objetivo realista es la “neutralización” de pequeñas cantidades de gluten, consecuencia de su ingestión inevitable o no intencionada por parte de los pacientes celíacos. Por el momento no se plantea su aplicación como sustitutivos de la dieta sin gluten y no hay ninguno comercializado.

La ingestión de pequeñas cantidades de gluten provoca daño en la mucosa intestinal

La dieta sin gluten representa un reto para el paciente celíaco. Su seguimiento y su aceptación no son iguales si se trata de un niño, de un adolescente o de un adulto. También dependerá de si la enfermedad es sintomática o no. Por otro lado, la contaminación con harina de trigo de los alimentos que por naturaleza no contienen gluten y de aquellos manufacturados, que en principio no deberían contenerlo, incrementa la inseguridad de los

pacientes a la hora de determinar si un producto puede o no ser consumido. Hasta hace poco no se conocía la posible toxicidad de las trazas de gluten. Este hecho tiene trascendencia no sólo médica, sino también sobre la normativa de fabricación y etiquetado de los productos. Además, determinar el contenido de gluten de los alimentos es complejo; actualmente se hace mediante técnicas de inmunoensayo enzimático (ELISA), que emplean anticuerpos monoclonales o policlonales frente a una gran variedad de componentes del trigo. No obstante, la comparación de la cantidad de gluten obtenida mediante las distintas técnicas de ELISA (en especial para bajos contenidos de gluten cercanos al umbral tóxico) revela la inconsistencia de estos métodos, que por tanto resultan poco fiables. Recientemente se han desarrollado nuevos métodos analíticos para detectar el gluten de la cebada y del centeno, que están permitiendo garantizar el contenido de gluten con mayor fiabilidad.

En los países del norte de Europa se permiten hasta 100 ppm en los productos sin gluten especiales para celíacos. Un límite más prudente, de 20 ppm, es el permitido en Norteamérica y en los países del sur de Europa. En un ensayo prospectivo, doble ciego, controlado con placebo, Catassi et al. demostraron que 50 mg diarios de gluten ingeridos durante 3 meses eran suficientes para provocar un descenso significativo en la proporción entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas. No se demostró correlación clínica ni serológica (inmunoglobulina A anti-transglutaminasa) con los cambios mucosos provocados por la ingestión de estas trazas de gluten. Debido al escaso número de pacientes estudiado, no se consiguió demostrar la posible toxicidad de dosis de 10 mg de gluten. Una revisión sistemática reciente sugiere que una ingesta de gluten diaria menor de 10 mg es poco probable que ocasione anomalías histológicas significativas. Con el umbral de menos de 20 ppm de gluten en los alimentos especiales para personas celíacas se consigue una ingesta menor de 50 mg/día, lo que aporta un margen de seguridad suficiente.

Ensayos clínicos terapéuticos en enfermedad celíaca

Inhibición de la permeabilidad intestinal: acetato de larazótido (AT-1001)

El citoesqueleto y las uniones intercelulares densas regulan la permeabilidad del epitelio intestinal, y evitan la entrada de bacterias nocivas o antígenos de la dieta. Un acontecimiento precoz en la enfermedad celíaca es la rotura de estas uniones intercelulares densas, lo que aumenta la permeabilidad paracelular y favorece el paso de péptidos nocivos a la lámina propia. El acetato de larazótido (AT-1001, desarrollado por la compañía americana Alba Therapeutics) es un octapéptido inhibidor de la descomposición de las uniones intercelulares densas del epitelio intestinal mediante reordenación del citoesqueleto. Por tanto, bloquea el paso paracelular de gluten a la lámina propia, lo que podría contribuir a evitar el desarrollo de la cascada inmunitaria patológica característica de los pacientes celíacos.

Se han realizado tres estudios de fase I: dos estudios clínicos en sujetos sanos (uno de seguridad de una sola dosis y otro de dosis múltiples) y un tercer estudio de prueba de concepto en sujetos con enfermedad celíaca.

El estudio de fase IIA fue un estudio aleatorizado, controlado con placebo y doble ciego, con 86 enfermos celíacos en remisión. Los pacientes incluidos ingirieron una dosis de provocación de 800 mg de gluten 15 minutos después de la administración de AT-1001 o placebo, tres veces al día durante 2 semanas. El AT-1001 fue bien tolerado a todas las dosis, incluida la de 8 mg, y se demostró su seguridad y tolerabilidad en la población de los pacientes reclutados. No hubo acontecimientos adversos graves. La provocación con gluten de 2 semanas no tenía potencia suficiente para surtir un efecto significativo al evaluar la eficacia y los criterios de valoración a priori, pero los análisis exploratorio y ad hoc demostraron que el AT-1001 era eficaz para prevenir el aumento de la permeabilidad intestinal y los signos y síntomas inducidos por la provocación con gluten.

Posteriormente se llevaron a cabo dos estudios de fase IIB. En el primero de ellos (aleatorizado, controlado con placebo, doble ciego) se administraron distintas dosis de larazótido (1, 4 y 8 mg en cada uno de los grupos) o placebo, e incluyó 184 pacientes celíacos en remisión a quienes se reintrodujo el gluten (dosis de 900 mg administradas tres veces al día durante 6 semanas). El AT-1001 demostró una reducción de la permeabilidad intestinal evaluada mediante el estudio del índice de lactulosa/manitol durante y después de la provocación con gluten, si bien no alcanzó significación estadística. Se objetivó un beneficio estadísticamente significativo del larazótido en la reducción de los signos y síntomas tras la provocación con gluten, así como una disminución en la positividad de los anticuerpos antitransglutaminasa. Es la primera vez que un fármaco se muestra eficaz frente al gluten en los pacientes celíacos.

El segundo estudio de fase IIB realizado por Alba Therapeutics fue aleatorizado, controlado con placebo, doble ciego, en pacientes celíacos con dieta estricta sin gluten que fueron divididos en tres grupos (larazótido 4 mg tres veces al día, larazótido 8 mg tres veces al día o placebo). Su objetivo primario era conocer el índice entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas comparando biopsias de los días 0 y 56 (antes y después del tratamiento con AT-1001). Sus objetivos secundarios eran valorar la seguridad y la tolerabilidad del fármaco. Este estudio finalizó su reclutamiento a mediados de 2009 y aún está pendiente de resultados.

Por el momento, una característica del AT-1001 es que no pasa a la circulación sistémica, lo que afianza su buen perfil de seguridad. No se comunicó ningún acontecimiento adverso grave en ninguno de los estudios.

Tratamiento enzimático: proliil-endopeptidasas (AVL003 y AN-PEP)

Puesto que la estructura peptídica del gluten es esencial para producir toxicidad, si los polipéptidos del gluten se hidrolizaran hasta sus aminoácidos constituyentes se perdería la

capacidad lesiva para el intestino. Este descubrimiento supone un avance esperanzador en la investigación de la enfermedad celíaca.

ALV003 (producto desarrollado por la empresa norteamericana Alvine Pharmaceuticals) es una mezcla de dos glutenasas diferentes con sustratos complementarios: una cisteína endoproteasa derivada de semillas germinadas de la cebada y una proliil-endopeptidasa procedente de *Sphingomonas capsulata*. Ambas son activas en medio ácido, y en una formulación 1/1 administrada por vía oral maximizan su actividad glutenasa.

En 2008 se realizó un ensayo clínico con 20 pacientes celíacos en remisión con buena adherencia a la dieta sin gluten, a quienes se aleatorizó para recibir una dieta con gluten (16 g al día durante 3 días) pretratada con AVL003 (10 pacientes) o una dieta con gluten pretratada con placebo (10 pacientes). En el grupo tratado con AVL003 se observó una disminución significativa de los marcadores séricos de actividad inmunitaria característicos de los pacientes celíacos (IFN- γ medido con técnica de ELISpot) y de la cantidad sérica de péptido 33-mer, en comparación con el grupo que recibió placebo. El siguiente objetivo de la compañía Alvine es valorar la efectividad de las proteasas, no como preprocesamiento de los alimentos sino como un suplemento real de la dieta. Se ha realizado un estudio de prueba de concepto en el cual se ha documentado que el AVL003 ingerido por sujetos sanos puede degradar eficazmente alimentos ricos en gluten. Por ahora, este fármaco sólo se plantea como un suplemento de la dieta sin gluten, para “descontaminar” las posibles trazas de gluten que pueda contener.

En agosto de 2009 comenzó en Finlandia un ensayo clínico de fase IIA para estudiar AVL003, y aún está en periodo de reclutamiento. Este ensayo ha sido diseñado con la intención de reclutar unos 110 pacientes y finalizar en octubre de 2010. Se trata de un estudio doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo, de 6 semanas de duración, en sujetos con enfermedad celíaca bien controlada a quienes se instruirá para ingerir una pequeña cantidad de gluten prefijada en la fase

activa del estudio. Los objetivos primarios son valorar la histología de la mucosa intestinal antes y después del tratamiento (días 0 y 56), y la tolerabilidad del fármaco. Como objetivos secundarios se plantea analizar los cambios en los linfocitos intraepiteliales y los valores de los anticuerpos celíacos.

Existe otra prolil-endoproteasa llamada AN-PEP, derivada de *Aspergillus niger*. Recientemente se han comunicado los resultados de un ensayo clínico aleatorizado, cruzado, doble ciego y controlado con placebo, desarrollado para valorar la seguridad y la eficacia de AN-PEP en pacientes celíacos a quienes se sometió a una provocación con gluten. Se incluyeron 14 pacientes bien controlados que fueron aleatorizados para consumir durante 2 semanas 7 g de gluten en el desayuno junto con una mermelada que contenía AN-PEP, o placebo (primera fase). Posteriormente se les sometió a un periodo de lavado de 2 semanas de duración en el cual mantenían una dieta estricta sin gluten (segunda fase), y por último (tercera fase) se les aleatorizó para recibir gluten asociado a AN-PEP (siete pacientes) o placebo (siete pacientes) durante otras 2 semanas. Antes y después de las fases primera y tercera se realizaron biopsias duodenales, se determinaron los valores séricos de anticuerpos celíacos y se recogieron los datos de un cuestionario de calidad de vida. Sólo en dos pacientes del grupo placebo y en uno del grupo tratado con AN-PEP se constató deterioro histológico, pero esta diferencia no alcanzó significación estadística. No se documentaron cambios relevantes en los valores séricos de los anticuerpos celíacos ni en los cuestionarios de calidad de vida. Los autores concluyeron que AN-PEP es seguro y bien tolerado.

Vacuna terapéutica: Nexvax2®

Se trata de una vacuna desensibilizante que utiliza tres péptidos del gluten, los cuales provocan una reacción en las células T sensibles al gluten en los pacientes con HLA DQ2 positivo. *Nexvax2®* ha convertido estos péptidos en un agente capaz de inducir inmunotolerancia en un ratón con células T sensibles al glu-

ten y restricción HLA DQ2. El primer estudio de fase I con dosis crecientes de *Nexvax2®* en 40 pacientes en Australia mostró efectos secundarios relacionados con el gluten, por lo que fue necesario reducir la dosis (de 90 a 60 µg). La administración fue por vía subcutánea en dosis semanal durante 3 semanas. Actualmente se encuentran reclutando voluntarios celíacos que sigan una dieta sin gluten para determinar la seguridad de las inyecciones semanales de *Nexvax2®* durante 3 semanas, comparando las respuestas inmunitarias con *Nexvax2®* y placebo (inyección de solución salina fisiológica). El estudio tiene previsto finalizar en junio de 2010.

Modulación de la inmunidad con Necator americanus

La investigación se basa en la teoría de que nuestro sistema inmunitario necesita exponerse a organismos exógenos para funcionar correctamente. La desaparición de los parásitos intestinales en el intestino de los humanos residentes en los países desarrollados puede ser la causa del aumento de afecciones como la enfermedad celíaca, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa o el asma. La supervivencia del parásito en el intestino se basa en su capacidad para interferir con la respuesta inmunitaria del huésped. Los mecanismos utilizados para hacerlo son similares a los que se usan para regular las enfermedades autoinmunitarias. Los investigadores sospechan que cuando los parásitos son excluidos del ambiente, algunos individuos reaccionan contra ellos mismos y desarrollan enfermedades autoinmunitarias como las mencionadas.

En un pequeño grupo de personas sanas con enfermedad celíaca en tratamiento con dieta, los investigadores se plantearon si *Necator americanus* inhibiría la respuesta inmunitaria Th1 frente al gluten al inducir una respuesta Th2. En diciembre de 2008 concluyó un estudio realizado en Australia de fase IIA, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, de provocación con gluten durante 3 a 5 días en 20 pacientes voluntarios tras la infección por el parásito *Necator americanus*

en 10 de ellos. Las larvas del parásito se inyectaron por vía subcutánea en dos tiempos (10 larvas en el momento 0 y cinco larvas más a las 12 semanas). A los pacientes del grupo placebo se les inyectó un preparado que contenía unas gotas de tabasco para que no notasen diferencia con la irritación producida por las larvas reales. Los pacientes huéspedes de parásitos vivos toleraron la provocación con gluten y puntuaron mejor en los tests de síntomas digestivos en comparación con los sujetos control sin parásitos. Además, experimentaron menos inflamación y menos daño en la mucosa intestinal, pero no se alcanzó significación estadística. La conclusión fue que parece haber un efecto inmunomodulador por parte de *Necator*, pero se necesitan estudios adicionales. Al final de las 21 semanas del ensayo se ofreció a todos los voluntarios medicación para eliminar el parásito, pero todos optaron por mantenerlos.

Bibliografía

- Akobeng AK, Thomas AG. Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;27:1044-52.
- Álvarez Cáceres R. Ensayos clínicos: diseño, análisis e interpretación. Madrid: Díaz de Santos; 2005.
- Catassi C, Fasano F. Celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008;24:687-91.
- Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, et al. A prospective, double blind, placebo controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr.* 2007;85:160-6.
- Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. *Lancet.* 2009;373:1480-93.
- Drago S, El Asmar R, DiPierro M, Grazia Clemente M, Tripathi A, Sapone A, et al. Gliadin, zonulin and gut permeability: effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol.* 2006;41:408-19.
- Farrel RF, Nelly CP. Celiac sprue. *N Engl J Med.* 2002;346:180-8.
- Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, et al. Prevalence of celiac disease in at risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med.* 2003;163:286-92.
- Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology.* 2001;120:636-51.
- Fasano A, Uzzau S, Fiore C, Margaretten K. The enterotoxic effect on zonula occludens toxin on rabbit small intestine involves the paracellular pathway. *Gastroenterology.* 1997;112:839-46.
- Feldman M, Friedsmann LS, Brandt LJ, editores. *Sleinsenger y Fordtran. Enfermedades digestivas y hepáticas.* 8ª ed. Madrid: Elsevier; 2008.
- Fernández-Bañares F, Esteve-Comas M, Rosinach M. Cribado de la enfermedad celíaca en grupos de riesgo. *Gastroenterol Hepatol.* 2005;28:561-6.
- Fleckenstein B, Molberg O, Qiao SW, Schmid DG, von der Mühlbe F, Elgstøen K, et al. Gliadin T cell epitope selection by tissue transglutaminase in celiac disease. Role of enzyme specificity and pH influence on the transamidation versus deamidation process. *J Biol Chem.* 2002;277:34109-16.
- Gibert A, Espadaler M, Canela MA, Sánchez A, Vaqué C, Rafecas M. Consumption of gluten-free products: should the threshold value for trace amounts of gluten be 20, 100 or 200 ppm? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006;18:1187-95.
- Green PH, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med.* 2007;357:1731-43.
- Green PH, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet.* 2003;362:383-91.
- Holm K, Maki M, Vuolteenaho K, Mustalahti K, Ashorn M, Ruuska T, et al. Oats in the treatment of childhood celiac disease: a 2 year controlled trial and a long term follow up study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23:1463-72.
- Kelly CP, Green PH, Murray JA, DiMarino AJ, Arsenescu RI, Colatrella AM, et al. Safety, tolerability and effects on intestinal permeability of larazotide acetate in celiac disease: results of a phase IIb – 6 week gluten-challenge clinical trial. *Gastroenterology.* 2009;136(Suppl 1):A474.
- Kupper C. Dietary guidelines and implementation for celiac disease. *Gastroenterology.* 2005;128:S124-7.
- Lanzini A, Lanzaroto F, Mora A, et al. Small intestinal recovery is often incomplete in serum-negative celiacs during gluten free-diet. *Gastroenterology.* 2007;132:A109.
- Lee SK, Lo W, Memeo L, Rotterdam H, Green PH. Duodenal histology in patients with celiac disease after treatment with a gluten-free diet. *Gastrointest Endosc.* 2003;57:187-91.
- Maki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, et al. Prevalence of

- celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med.* 2003;348:2517-24.
- Marinaro M, Fasano A, DeMagistis M. Zonula occludens toxin acts as an adjuvant through different mucosal routes and induces protective immune responses. *Infect Immun.* 2003;71:1897-902.
 - Matysiak-Budnik T, Candalh C, Dugave C, Namane A, Cellier C, Cerf-Bensussan N, et al. Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology.* 2003;125:696-707.
 - Mauri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, et al. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet.* 2003;362:30-7.
 - Molberg O, McAdam SN, Korner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med.* 1998;4:713-7.
 - Mulder C, Cellier C. Coeliac disease: changing views. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005;19:313-21.
 - O'Mahony S, Howdle PD, Losowsky MS. Management of patients with non-responsive coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 1996;10:671-80.
 - Paterson BM, Lammers KM, Arrieta MC. The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26:757-66.
 - Riches PL, McRorie E, Fraser WD. Osteoporosis associated with neutralizing autoantibodies against osteoprotegerin. *N Engl J Med.* 2009;361:1459-65.
 - Riestra S, Fernández E, Rodrigo L, García S, Ocio G. Prevalence of coeliac disease in the general population of northern Spain. Strategies of serologic screening. *Scand J Gastroenterol.* 2000;35:398-402.
 - Rodrigo L. Investigational therapies for celiac disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009;18:1865-73.
 - Rubio-Tapia A, Rahim MW, See JA, Lahr BD, Wu TT, Murray JA. Mucosal recovery and mortality in adults with celiac disease after treatment with a gluten-free diet. *Am J Gastroenterol.* 2010;105:1412-20.
 - Schuppan D, Junker Y, Barisani D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology.* 2009;137:1912-33.
 - Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac disease. *Science.* 2002;297:2275-9.
 - Sociedad Española de Enfermedad Celíaca. Libro blanco de la Enfermedad Celíaca. Madrid: Consejería de Salud de la Comunidad de Madrid; 2008.
 - Tack GJ, Van de Water J, Kooy-Winkelaar EM, et al. Can prolyl-endoprotease enzyme treatment mitigate the toxic effect of gluten in celiac patients? University of Leiden. DSM Biotechnology Center. Digestive Disease Week 2010. New Orleans, USA; abstr. 379.
 - Tye-Din JA, Anderson RP, French R, Brown GJ, Hodsman P, Siegel M, et al. The effects of ALV003 pre-digestion of gluten on immune and symptoms in celiac disease in vivo. *Clin Immunol.* 2010;134:289-95.
 - Van de Wal Y, Kooy Y, Van Veelen P, Peña S, Mearin L, Papadopoulos G, et al. Selective deamination by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol.* 1998;161:1585-8.

DISCUSIÓN

J. ARAMBURU: En primer lugar, ¿la composición de la flora intestinal tiene algún efecto sobre el desarrollo de la enfermedad? Porque en el modelo transgénico de ratón de enfermedad inflamatoria intestinal o Crohn, con HLA y CD4 humanizado, la composición de la flora intestinal es clave. Además, cuando se abre la permeabilidad del epitelio intestinal, los receptores *toll-like* apicales y basolaterales inducen diferentes tipos de señalización, y

éstas se han ligado a roturas de la barrera y a una mayor reacción inflamatoria. En segundo lugar, debido a que la enfermedad está ligada a un HLA concreto, ¿es posible averiguar la predisposición a sufrir la enfermedad durante la infancia y administrar una dieta o algún probiótico para paliar la enfermedad?

F. LEÓN: En relación a la primera pregunta, la composición de la flora intestinal de los ce-

lácicos es diferente, pero no se sabe si es la causa o la consecuencia de la enfermedad. En cuanto a la segunda pregunta, hay un ensayo realizado en Argentina para evaluar el uso de probióticos. Algunos probióticos son eficaces para normalizar la permeabilidad intestinal, inhiben la respuesta Th1 y promueven la respuesta de IL-10, y son los que se utilizarán en el futuro. Es un abordaje interesante.

L. ÁLVAREZ-VALLINA: Cuando has presentado los resultados del larazótido, no se ha visto una correlación de los anticuerpos transglutaminasa con la dosis. ¿Qué explicación sugieres?

F. LEÓN: No conseguimos ver un efecto dosis-respuesta, pero es algo muy habitual en los fármacos que actúan sobre el sistema inmunitario. Cuando trabajas en la industria farmacéutica te das cuenta de que es un fenómeno habitual. Es posible que no hayamos podido ver el efecto dosis-respuesta debido a la existencia de un efecto umbral, y que nuestro estudio se encontrase en una parte no lineal del rango de dosis-respuesta, muy alto o muy bajo. Éste fue un problema importante en nuestro ensayo, porque si no hay dosis-respuesta se cuestiona la eficacia del fármaco, incluso se cuestiona que el grupo placebo funcionó peor por casualidad y que en realidad no hubo ningún beneficio. Uno de problemas que nos encontramos durante los ensayos clínicos con enfermedades inmunitarias es que si no hay un grupo placebo, la única forma de demostrar que el fármaco funciona es mediante biomarcadores muy específicos, por lo que si no dispones de un grupo placebo o de los biomarcadores adecuados, nunca sabrás si una respuesta clínica se debe al fármaco o a la evolución natural de la enfermedad.

A. GONZÁLEZ: Dada la alta prevalencia de la enfermedad celíaca y que se asocia exclusivamente a unos determinados HLA, ¿tendría sentido realizar un cribado poblacional para

poder prevenir la enfermedad en los niños mediante una alimentación sin gluten?

F. LEÓN: Creo que algún día se hará. De hecho, hay mucha gente que lo ha propuesto. Se cumplen los requisitos de la Organización Mundial de la Salud para realizar un cribado poblacional. Además, el HLA tiene un valor predictivo negativo muy grande, es decir, si no se posee HLA DQ2 o DQ8 no se produce esta enfermedad, por lo que es un buen test. Por otro lado, esto ya se hace en todas las familias que tienen un miembro con celiaquía, pero en el futuro se hará en toda la población.

M. JUAN: Pero el problema del test es que, por sí misma, el 20% de la población posee DQ2 o DQ8 (y afortunadamente la mayoría no son celíacos), por lo que además del cribado poblacional también deberían hacerse pruebas para detectar anticuerpos antitransglutaminasa o anti gliadina.

F. LEÓN: Sí, pero el valor predictivo positivo es bajo. Tal y como ha comentado la Dra. González, si un individuo posee más predisposición a padecer la enfermedad debe tener más cuidado con el tiempo de introducción del gluten en la dieta, promover la lactancia materna, etc. La relación coste/beneficio de realizar este cribado poblacional todavía no está clara, pero a medida que el coste del test del HLA baje, puede que llegue a realizarse de manera generalizada.

N. PRATS: Por curiosidad, ¿por qué habéis descartado el uso terapéutico de la inyección subcutánea de larvas de *Necator americanus*? Y en segundo lugar, ¿sería posible inmunizar con cutícula de parásito, como se hace en el asma por vía inhalada?

F. LEÓN: Es una buena observación. Este abordaje no es conveniente porque deben inyectarse larvas de gusano, pero creo que algún día se descubrirá qué parte del parásito induce el cambio de respuesta Th1 a Th2,

para posteriormente utilizarla para desarrollar un fármaco nuevo.

M. JUAN: El desarrollo de la respuesta inmunitaria dependiente de células T durante la enfermedad celíaca depende de varios factores: la molécula del HLA, los demás elementos implicados en la presentación antigénica y la permeabilidad de la membrana. En mi opinión, creo que es muy difícil conseguir un tratamiento efectivo si sólo se tiene en cuenta uno de estos elementos. Por el contrario, el tratamiento más efectivo posiblemente será el que los combine todos, aunque uno de los problemas a los que nos enfrentaremos será demostrar la bioseguridad de todos ellos a la vez. Me parece que el hecho de buscar una sola diana terapéutica es un factor limitante a la hora de desarrollar un tratamiento efectivo. Además, creo que hay que recordar que, aunque se desarrolló un fármaco antirretroviral, para que el tratamiento contra el virus de la inmunodeficiencia humana sea efectivo debe ser multifármaco. En el caso de la celiaquía, parece un poco difícil que podamos llegar a algo efectivo si no descubrimos y actuamos sobre todos los factores que están implicados en la enfermedad.

F. LEÓN: Estoy totalmente de acuerdo. La única manera de averiguar si una enfermedad se debe a un solo factor de forma predominante, a un conjunto de factores o bien que haya un ciclo en el cual los pacientes empiecen por un factor y terminen con varios, es ha-

cer ensayos clínicos que analicen de forma muy cuidadosa los biomarcadores presentes antes, durante y después del tratamiento. Con esta metodología se ha descubierto que la psoriasis se debe casi exclusivamente (el 95% de los casos) a la interleucina 23 (IL-23). Si se bloquea la IL-23, la psoriasis desaparece. Y la enfermedad de Crohn podría intuirse que también está causada por la acción de la IL-23 (basándose en modelos animales), pero ésta sólo interviene en el 30% de los casos. Hasta que no se realiza el ensayo clínico y posteriormente se determinan la IL-23 y los marcadores de inflamación, no puede establecerse si el tratamiento depende de un elemento o de una combinación de ellos. Sin duda, para el futuro de la inmunoterapia, la combinación de elementos será el mejor tratamiento, sobre todo para las enfermedades autoinmunitarias y las alérgicas.

M. JUAN: Respecto a lo que has comentado acerca de los biomarcadores, hace unos 4 años se publicó un estudio^{1,2} en el cual se usaron tetrámeros de clase II con péptido específico para determinar las concentraciones. ¿Es reproducible?

F. LEÓN: No es reproducible porque el propio grupo no es capaz de manufacturarlos. Pero sería un diagnóstico ideal, porque por citometría de flujo puede diagnosticarse celiaquía y monitorizar la evolución de la enfermedad. El problema es que nadie ha podido reproducir los tetrámeros y este grupo sólo los obtiene cada 6 meses.

¹Ráki M, Fallang LE, Brottveit M, Bergsens E, Quarsten H, Lundin KE, et al. Tetramer visualization of gut-homing gluten-specific T cells in the peripheral blood of celiac disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:2831-6.

²Brottveit M, Ráki M, Bergsens E, Fallang LE, Simonsen B, Løvik A, et al. Assessing possible celiac disease by an HLA-DQ2-gliadin tetramer test. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:1318-24.

Inmunoterapias en esclerosis múltiple

M. Sospedra

Institute for Neuroimmunology and Clinical Multiple Sclerosis Research (INIMS),
Center for Molecular Neurobiology Hamburg (ZMNH),
University Clinic Eppendorf (UKE), Hamburg, Germany

Resumen: *Durante más de una década, los únicos fármacos disponibles para tratar pacientes con esclerosis múltiple han sido dos inmunomoduladores, el interferón beta (IFN- β) y el acetato de glatirámero, y un inmunosupresor, la mitoxantrona. En los últimos años, dos nuevos fármacos, el anticuerpo monoclonal específico de la integrina $\alpha 4$ natalizumab y el fármaco oral fingolimod, han sido aprobados por su eficacia, que es superior a la de los tratamientos de primera línea (IFN- β y acetato de glatirámero). No obstante, el optimismo inicial se ha visto ensombrecido por la aparición de efectos secundarios serios asociados a estos fármacos, como son la leucoencefalopatía multifocal progresiva en los pacientes tratados con natalizumab e infecciones graves y lesiones tumorales o pretumorales en los tratados con fingolimod. La esclerosis múltiple es una enfermedad muy heterogénea y compleja, con un componente inflamatorio y un componente neurodegenerativo. Mientras la inflamación desempeña un papel crucial al inicio de la enfermedad, la neurodegeneración parece ser la causante de la progresión. Todos los tratamientos aprobados hasta la presente tienen efecto sólo sobre el componente inflamatorio, por lo que no son eficaces en la fase progresiva de la enfermedad. El desarrollo de nuevos agentes con propiedades antiinflamatorias, neuroregeneradoras y neuroprotectoras sigue siendo una necesidad y un objetivo prioritario para clínicos e investigadores. La experiencia acumulada en los últimos años nos ha enseñado que para el éxito de un nuevo tratamiento tan importante es su eficacia como su seguridad.*

Palabras clave: Esclerosis múltiple – Inmunomoduladores – Inmunosupresores – Anticuerpos monoclonales – Terapias celulares.

Introducción

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica, desmielinizante y neurodegenerativa que afecta al sistema nervioso central (SNC). Es la mayor causa de discapacidad neurológica en adultos jóvenes y afecta a alrededor de dos millones de personas en el mundo. Su causa todavía se desconoce, pero sabemos que se desarrolla en

individuos genéticamente susceptibles y que requiere factores ambientales.¹

Desde el punto de vista clínico, es una enfermedad muy heterogénea. La mayoría de los pacientes presentan una forma remitente recurrente (EMRR) caracterizada por la aparición de déficit neurológicos agudos, llamados brotes, que remiten de forma total o parcial. Alrededor del 85% de los pacientes que presentan EMRR progresan a una forma secun-

daria progresiva (EMSP) caracterizada por una progresión del déficit neurológico, que conlleva discapacidad y que puede cursar con o sin brotes. El 10% al 15% sufre una forma primaria progresiva (EMPP) caracterizada por un deterioro neurológico desde el inicio de la enfermedad, que normalmente cursa sin brotes.

Al inicio, la EM se caracteriza por una activa infiltración que induce desmielinización y pérdida axonal.² Tradicionalmente se ha considerado una enfermedad autoinmunitaria mediada sobre todo por células T autorreactivas CD4+ con fenotipo Th1 y macrófagos. Sin embargo, este concepto ha ido cambiando en los últimos años tras obtener evidencias que sugieren que otras células del sistema inmunitario, como las células Th17, los linfocitos B, las células dendríticas, las células T *natural killer*, o la microglia, también desempeñan una importante función en la patogénesis de esta enfermedad.

Estudios sobre la evolución de la EM indican que aunque al principio el grado de inflamación de la enfermedad determina su curso inicial, la progresión parece ser independiente del grado de infiltración. La progresión es consecuencia de la neurodegeneración, es decir, de la pérdida axonal. Aunque el daño axonal es más prominente en las lesiones activas, lo cierto es que también se encuentra en la materia blanca aparentemente normal y en la materia gris. En los pacientes con formas progresivas de la enfermedad, la neurodegeneración se observa ya en etapas tempranas y parece ser independiente de la inflamación. En estos casos, los tratamientos antiinflamatorios han resultado muy poco eficaces.

La gran heterogeneidad clínica, así como la disociación entre inflamación/lesiones y progresión, dificultan notablemente el desarrollo de tratamientos. Los fármacos de que disponemos en la actualidad para tratar la EM son todos inmunomoduladores o inmunosupresores, es decir, sólo tienen efecto sobre el proceso inflamatorio. A continuación se resumen los tratamientos aprobados y una selección de los más prometedores que se encuentran en desarrollo.

Fármacos aprobados

Interferón beta

El interferón beta (IFN- β) es un fármaco de primera línea en el tratamiento de la EM. En la actualidad se dispone de cuatro formulaciones aprobadas: *Avonex*[®] (IFN- β 1a), que se administra en inyección intramuscular semanal; *Rebif*[®] (IFN- β 1a), que se administra en inyección subcutánea tres veces a la semana; y *Betaseron*[®] y *Extavia*[®] (IFN- β 1b), que se administran por inyección subcutánea a días alternos. Diversos ensayos clínicos han demostrado su eficacia para reducir la frecuencia de brotes y el número de lesiones desmielinizantes. Sin embargo, no se ha podido demostrar su efecto sobre la progresión de la discapacidad.³ Los efectos secundarios más comunes son linfocitopenia, reacción en el lugar de la inyección, dolores de cabeza y elevación temporal de las enzimas hepáticas. En raras ocasiones se observa depresión o necrosis en el lugar de la inyección.

Inicialmente, la lógica de su utilización en esta enfermedad fue su actividad antiviral. Hoy todavía se desconoce el mecanismo de acción exacto del IFN- β . Entre los muchos efectos que se le atribuyen están reducir la expresión de moléculas coestimuladoras en células presentadoras de antígeno (y por tanto la presentación de antígeno), inhibir la proliferación de células Th1, desviar un fenotipo proinflamatorio a uno antiinflamatorio, reducir la expresión de metaloproteinasas (y por tanto el daño de la barrera hematoencefálica) y probablemente también estimular las células T reguladoras (Treg).

Acetato de glatirámero

El acetato de glatirámero (*Copaxone*[®]) consiste en polímeros de aminoácidos sintéticos compuestos de secuencias aleatorias de cuatro aminoácidos (tirosina, glutamato, alanina y lisina) en cantidades molares fijas, y se emplea como fármaco de primera línea en el tratamiento de la EM. Debe inyectarse a diario

y se ha demostrado su eficacia para reducir la frecuencia de los brotes y el número de lesiones desmielinizantes. Sin embargo, no ha podido demostrarse su efecto sobre la progresión de la discapacidad.³ En comparación con otras opciones terapéuticas, el acetato de glatirámero se tolera muy bien y su efecto secundario más frecuente es una reacción local en el lugar de la inyección.

Por su composición similar a la proteína básica de la mielina, el acetato de glatirámero se diseñó inicialmente para inducir encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, el modelo animal de la EM. No obstante, los estudios en animales demostraron su eficacia para prevenir y suprimir esta enfermedad. Tal eficacia probablemente se basa en su capacidad de inducir células Treg e inhibir la respuesta de células T específicas de la mielina. Las células T específicas de acetato de glatirámero parecen producir factores neurotróficos, por lo que se cree que este fármaco puede actuar también como agente neutroprotector.⁴

Mitoxantrona

La mitoxantrona (*Novantrone*®) es un derivado sintético de la antraciclina con potente actividad inmunosupresora e inmunomoduladora, que se emplea como fármaco de segunda línea en el tratamiento de la EM, especialmente en pacientes con formas muy agresivas de la enfermedad. Varios ensayos clínicos han demostrado su eficacia tanto en la EMRR como en la EMSP.⁵ El principal problema de este fármaco son sus serios efectos secundarios. Se ha observado que la acumulación de dosis altas de mitoxantrona induce cardiotoxicidad, y otra complicación asociada a su uso es el desarrollo de leucemias secundarias hasta en el 2,8% de los pacientes.⁶

La mitoxantrona se intercala en el DNA, causa roturas e impide su reparación al inhibir la topoisomerasa II. Tiene actividad inmunosupresora al inhibir la proliferación de linfocitos B y T, así como actividad inmunomoduladora al reducir la producción de IFN- γ , factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) e interleucina 2 (IL-2).

Natalizumab

El natalizumab (*Tysabri*®) es el primer anticuerpo monoclonal aprobado como fármaco de segunda línea para el tratamiento de la EMRR. Se administra en infusiones mensuales de 300 mg. Su eficacia en el tratamiento de la EMRR se ha demostrado en dos ensayos clínicos.^{7,8} Reduce de forma muy significativa la frecuencia de los brotes, el número de lesiones y el riesgo de progresión, y es más eficaz que el IFN- β y el acetato de glatirámero. Aunque en general se tolera bien, un porcentaje reducido de pacientes (hasta el momento 105 de aproximadamente 90.000 tratados) ha desarrollado leucoencefalopatía multifocal progresiva, una enfermedad del SNC causada por la reactivación del virus JC que infecta y destruye los oligodendrocitos.⁹ Normalmente esta enfermedad se produce en pacientes inmunodeprimidos en quienes la vigilancia del SNC por el sistema inmunitario es deficiente, y suele provocar una discapacidad grave o la muerte.¹⁰

El natalizumab es un anticuerpo recombinante humanizado que reconoce la cadena $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$. La integrina $\alpha 4\beta 1$, también llamada VLA-4, se expresa en todos los leucocitos excepto los neutrófilos, y se une a la molécula VCAM expresada en el endotelio durante la inflamación. El natalizumab se une a VLA-4 y bloquea su interacción con VCAM. La lógica de su aplicación en la EM ha sido impedir la extravasación de linfocitos y células presentadoras de antígeno al órgano diana, es decir, al SNC. La ausencia de infiltrado en el SNC suprime la enfermedad, pero pone en serio riesgo la inmunovigilancia y permite la reactivación del virus JC. Todavía no está claro por qué en los pacientes tratados con natalizumab se reactiva el virus JC y no lo hacen otros virus neurotróficos. Se sabe que las células progenitoras CD34+ y las células B son las principales transportadoras sistémicas del virus JC. La interacción entre VLA-4 y su ligando es primordial para la retención de las células CD34+ en la médula ósea y de las células B en los órganos linfoides. El natalizumab, al bloquear esta interacción,

eleva el número de dichas células en sangre periférica y por tanto la carga viral.¹⁰

En los pacientes tratados con natalizumab, la inmunosupresión en el SNC se revierte al eliminar el tratamiento. En los que desarrollan leucoencefalopatía multifocal progresiva inducida por natalizumab, generalmente el anticuerpo se elimina por plasmaféresis. La eliminación del anticuerpo permite una entrada masiva de células del sistema inmunitario en el SNC atraídas por la infección viral, y se genera un nuevo cuadro clínico que se ha llamado “síndrome de inmunorreconstitución” y que tiene graves consecuencias, incluso más dañinas que la propia leucoencefalopatía.^{11,12}

Fingolimod

El fingolimod (FTY720) es un análogo sintético del antibiótico miriocina, un agonista del receptor de fosfato de esfingosina-1 (S1P), y es el primer inmunomodulador oral aprobado como fármaco de primera línea en Estados Unidos y de segunda línea en Europa para el tratamiento de la EM. Su eficacia, superior a la del IFN- β , ha sido demostrada en dos ensayos clínicos de fase III.^{13,14} No obstante, también se han observado serios efectos secundarios en los pacientes tratados con este fármaco, entre ellos infecciones por virus herpes, complicaciones cardiovasculares, edema macular, desarrollo de tumores y encefalitis hemorrágica.

La principal acción de FTY720 es secuestrar los linfocitos en los nódulos linfáticos y con ello impedir el acceso de las células T autorreactivas al SNC.¹⁵ Por su parte, la principal función de S1P es controlar la entrada y salida de los linfocitos en los nódulos linfáticos y el timo. FTY720 se une al receptor de S1P y reduce su expresión en los linfocitos, y por tanto su interacción con S1P. Al no poder interactuar con S1P, los linfocitos T no reciben la señal de abandonar los nódulos linfáticos y quedan retenidos, por lo que su presencia en la sangre se ve reducida. FTY720 también parece afectar a los linfocitos B productores de anticuerpos, y como cruza la ba-

rrera hematoencefálica también afecta a los astrocitos y los oligodendrocitos.

Fármacos en desarrollo

Fármacos orales

La ansiedad y otros efectos secundarios asociados a la inyección representan una barrera importante para la adherencia de los pacientes a los tratamientos de primera línea (IFN- β y acetato de glatirámico). Por este motivo, además de FTY720 se están desarrollando otros fármacos orales que se encuentran ya en las últimas fases de estudio o a punto de ser aprobados para el tratamiento de la EM. Uno de estos fármacos es la cladribina, un análogo del nucleósido purina que penetra en las células, donde es activada al ser fosforilada por la doxicitidina cinasa. La acumulación de cladribina impide la síntesis de DNA y su reparación, y la 5'-nucleotidasa previene su acumulación. Los linfocitos, comparados con otras células, tienen mayor cantidad de doxicitidina cinasa y menor de 5'-nucleotidasa, por lo que acumulan cladribina y son eliminados por ella. Además, la cladribina puede cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que puede eliminar linfocitos en el SNC. Un efecto secundario grave asociado a este fármaco es el desarrollo de infecciones y neoplasias.¹⁶

La teriflunomida, un inhibidor de la síntesis de pirimidina con actividad antiproliferativa, es otro fármaco oral en desarrollo. Se utiliza en la actualidad para tratar la artritis reumatoide y es bien tolerada.

El laquinimod es también un fármaco oral en desarrollo cuyos principales efectos son reducir la infiltración del SNC e inducir un cambio de respuesta proinflamatoria (Th1) a antiinflamatoria (Th2). No presenta efectos secundarios graves y por ello es un fármaco prometedor en el tratamiento de la EM.

Por último, el dimetilfumarato, un derivado del ácido fumárico, es un fármaco oral muy bien tolerado que se utiliza desde hace tiempo para el tratamiento de la psoriasis. Su

modo de acción consiste en inducir la apoptosis en las células T activadas y desviar la respuesta inmunitaria de proinflamatoria a antiinflamatoria.¹⁷

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales están entre los agentes más prometedores para el tratamiento de la EM. Inicialmente se vieron con gran escepticismo debido sobre todo a la gran reacción frente a las proteínas de ratón, y por las dificultades de su producción. No obstante, hoy día estos problemas han sido solventados y por ello se han convertido en una atractiva alternativa. El natalizumab ha sido el primer anticuerpo monoclonal aprobado para el tratamiento de la EM, pero están en desarrollo otros anticuerpos dirigidos contra otras dianas.¹⁸

El alemtuzumab (*Campath*®) es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra CD52, una molécula de superficie con función desconocida y expresada por células T y B, monocitos y eosinófilos. La unión del alemtuzumab a su diana elimina estas células por lisis mediada por complemento, toxicidad dependiente de anticuerpo e inducción de apoptosis, lo que resulta en una leucocitopenia prolongada. Después del tratamiento se requieren 2 años para recuperar los títulos de células T CD4+ previos. Originariamente este anticuerpo se generó para el tratamiento de enfermedades linfoides. En la EM se ha demostrado su eficacia para reducir los brotes y las lesiones. Sin embargo, durante la fase progresiva de la enfermedad no se ha demostrado ningún efecto sobre la discapacidad. El principal efecto secundario adverso de este tratamiento es la aparición de enfermedades autoinmunitarias secundarias. Entre un 20% y un 30% de los pacientes desarrollan enfermedades autoinmunitarias del tiroides, principalmente enfermedad de Graves, y el 2,8% trombocitopenia púrpura idiopática. Otros efectos secundarios son infecciones, incluida la leucoencefalopatía multifocal progresiva, de momento observada en un único paciente, pero cuya inciden-

cia podría aumentar con el número de pacientes tratados.

Otros anticuerpos monoclonales en desarrollo para la EM son anticuerpos anti-CD20, una molécula expresada exclusivamente por las células B. La mayoría de los estudios se han realizado con rituximab, un anticuerpo quimérico ratón-humano que elimina las células B y que está aprobado para su uso en los pacientes con linfoma de células B no Hodgkin. No obstante, lo más probable es que se sustituya por otro anticuerpo anti-CD20 llamado ocrelizumab, que es un anticuerpo monoclonal humanizado. Varios ensayos clínicos han demostrado su eficacia en el tratamiento de la EM, pero la aparición de casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva en pacientes con otras enfermedades diferentes de la EM, como lupus eritematoso sistémico, han hecho saltar la alarma. Respecto al modo de acción, ha sorprendido que el rituximab tiene efecto sobre la EM sin modificar la producción de anticuerpos. Esto sugiere que los linfocitos B probablemente participan en la patogenia de esta enfermedad por otros mecanismos, como puede ser actuando como células presentadoras de antígeno o como inmunorreguladoras.

El daclizumab es otro anticuerpo monoclonal humanizado en desarrollo para el tratamiento de la EM. Reconoce el epítipo Tac de la cadena alfa del receptor de la IL-2 (CD25). La unión del daclizumab al receptor de la IL-2 bloquea la unión de IL-2. El CD25 se expresa en bajo grado en las células T en reposo, y su expresión aumenta cuando éstas se activan. La lógica para la utilización de este anticuerpo en la EM era bloquear la proliferación de las células T autorreactivas activadas. Su eficacia en la EM se ha demostrado en varios ensayos clínicos, pero su mecanismo de acción ha sido totalmente inesperado.^{19,20} El daclizumab no reduce los linfocitos T, sino que expande las células *natural killer* (NK) que expresan en alto grado la molécula de superficie CD56. Se observó una gran correlación entre la expansión de estas células y la reducción del número de lesiones que captaban gadolinio. Las

células NK que expresan en alto grado CD56, además de tener actividad inmunorreguladora pueden lisar células T. La expansión selectiva de estas células durante el tratamiento con daclizumab se debe a que estas células, a diferencia de las células T que expresan el receptor de IL-2 de alta afinidad formado por las cadenas IL-2R α / β / γ , expresan el receptor de afinidad intermedia que no contiene la cadena IL-2R α , y por ello no es bloqueado por el anticuerpo. Curiosamente, las células T reguladoras expresan en alto grado CD25. La eficacia del daclizumab cuestiona el papel real de las Treg en la patogenia de la EM.

Terapias celulares

TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS AUTÓLOGAS

El fundamento para el uso del trasplante de células hematopoyéticas en la EM es eliminar primero completamente el sistema inmunitario autorreactivo mediante inmunosupresión, y luego trasplantar un sistema inmunitario tolerante. El estudio del sistema inmunitario de siete pacientes con EM receptores de un trasplante durante los 3 años posteriores a éste apoyan dicha hipótesis.²¹ Después del trasplante se produce una profunda renovación del sistema inmunitario y aparece un repertorio de células T mucho más amplio que el que había antes, así como un incremento del número de células T CD4+ *naive* que acaban de salir del timo.

Las primeras evidencias sobre la eficacia de este tratamiento en la autoinmunidad son casuísticas y se obtuvieron en pacientes en quienes se realizó un trasplante alogénico de células hematopoyéticas para tratar otras enfermedades malignas y se observó una regresión de la autoinmunidad. El trasplante alogénico no parece factible en el tratamiento de la autoinmunidad por la alta mortalidad asociada, pero sí el autólogo. El punto más crítico en la utilización de este tratamiento en la EM es, sin duda, la elección del paciente, ya que es una medida que puede poner en riesgo la vida para tratar una enfermedad que

generalmente no supone un riesgo mortal. La eficacia del trasplante en el tratamiento de la EM se ha demostrado en varios estudios, pero parece depender de manera muy directa de la edad y del estado del paciente. Los pacientes que más se benefician son los menores de 40 años con formas de EMRR muy agresivas y duración de la enfermedad inferior a 5 años. Respecto a los efectos secundarios, sin duda el principal riesgo es la mortalidad asociada al trasplante, que en los estudios realizados entre 1995 y 2000 era del 7,3%, pero disminuyó al 1,3% en los que se hicieron entre 2001 y 2007. Las razones de esta reducción en la mortalidad son, probablemente, la mayor experiencia de los centros, la selección de los pacientes y evitar regímenes de condicionamiento demasiado intensos.²²

TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS MESENQUIMALES

Las células progenitoras mesenquimales representan una población heterogénea de células estromales que pueden obtenerse de la mayoría de los tejidos conectivos y pueden expandirse *in vitro* manteniendo un fenotipo estable, pero conservando la capacidad de diferenciarse en tejido adiposo, cartílago y hueso. Inicialmente estas células empezaron a utilizarse por sus propiedades regenerativas. Sin embargo, la observación inesperada de que podían inhibir la proliferación de células T *in vivo* e *in vitro* proporcionó la idea de su posible aplicación en las enfermedades autoinmunitarias.²³ Las principales evidencias del beneficio del trasplante de células mesenquimales para tratar la EM se han obtenido en el modelo animal de encefalomielitis autoinmunitaria. La inyección de células progenitoras mesenquimales puede mejorar el curso clínico de la encefalomielitis autoinmunitaria, y reducir la desmielinización y la infiltración del SNC sin necesidad de inmunosupresión. Se han publicado algunos estudios realizados en un reducido número de pacientes que recibieron inyecciones intravenosas o intratecales de células mesenquimales, en los cuales se ha demostrado la seguridad del procedimiento.

to, pero no son suficientes para establecer su eficacia de forma convincente. Aunque prometedor, este tratamiento todavía tiene importantes cuestiones abiertas, como son el tipo de paciente o el protocolo para la expansión de células mesenquimales in vitro. Actualmente hay un grupo internacional, formado por neurólogos, expertos en trasplante e inmunólogos, que pretenden consensuar los protocolos para la utilización de estas células en el tratamiento de la EM.²⁴

TERAPIAS CELULARES DE TOLERIZACIÓN ESPECÍFICAS DE ANTÍGENO

La inducción de tolerancia específica de antígeno es, sin duda, una estrategia terapéutica muy prometedora. Su principal objetivo es interferir en la presentación del antígeno y en la activación de las células T. A pesar del éxito de varias terapias específicas de antígeno en modelos animales, la mayoría han fallado en los humanos, ya sea por poca eficacia, inducir brotes o producir reacciones de hipersensibilidad. Casi todas estas terapias se han centrado en inducir tolerancia a la proteína básica de la mielina (MBP) usando diferentes estrategias, como son la administración oral o intravenosa de la proteína o de péptidos inmunógenos de ella, la administración de péptidos alterados derivados del péptido MBP83-99 con el objetivo de inducir anergia o desviar la respuesta de Th1 a Th2, la vacunación con TCRs con el objetivo de eliminar las células T autorreactivas, o la inyección intramuscular de vacunas de DNA que codifican para MBP. Hasta el momento, lo más eficaz ha sido la vacunación con DNA.

Actualmente, en nuestro centro estamos probando una nueva estrategia de tolerización específica de antígeno que consiste en la administración intravenosa de linfocitos de sangre periférica autólogos a los que químicamente se les han unido siete péptidos de la mielina altamente inmunógenos. El agente químico utilizado es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC), que además de unir los péptidos induce apoptosis.²⁵ Los experimentos preclínicos en el modelo de encefalomi-

elitis autoinmunitaria han demostrado que una única inyección de esplenocitos cargados con péptidos y fijados con EDC es muy eficiente para inducir tolerancia in vivo. En los animales esta estrategia no sólo previene el desarrollo de encefalomielitis autoinmunitaria experimental, sino que retarda su inicio y reduce su gravedad. Aunque el mecanismo de acción no está totalmente dilucidado, parece que la fagocitosis de células apoptóticas cargadas de péptido por células dendríticas en el bazo, y la presentación de estos péptidos en condiciones tolerogénicas, son cruciales en la inducción de tolerancia. Una estrategia similar es la que se está desarrollando en el Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, de Badalona, donde en lugar de células cargadas de péptido y fijadas con EDC utilizan células dendríticas tolerogénicas generadas in vitro y cargadas con el mismo cocktail de péptidos.

Terapias con precursores neuronales

El trasplante de células progenitoras capaces de regenerar células neuronales sería sin duda la mejor opción para reducir la progresión de la enfermedad e incluso la discapacidad. Se sabe que el cerebro humano adulto contiene progenitores de oligodendrocitos endógenos, y que células progenitoras neuronales humanas, así como células progenitoras embrionarias trasplantadas en ratón, tanto intratecalmente como en sangre, pueden diferenciarse a oligodendrocitos con potencial remielinizante. Este tipo de trasplante en animales que sufren encefalomielitis autoinmunitaria experimental reduce la pérdida axonal, pero también tiene un efecto sobre la inflamación y atenúa la enfermedad. Las células progenitoras neuronales actúan, por tanto, no sólo sobre la neurodegeneración reparando axones, sino que también reducen la inflamación al secretar citocinas antiinflamatorias. Otras propiedades que se han atribuido a estas células son su capacidad de reducir la infiltración de linfocitos en el SNC reduciendo la expresión de la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM1), así como de inducir la expansión de células Treg. La eficacia de es-

tas células en los humanos todavía no se ha demostrado, e importantes cuestiones éticas y de seguridad, como el potencial tumorigeno de estas células, deben considerarse antes de iniciar su uso en los humanos. Aunque se han hecho avances prometedores, lo cierto es que el trasplante de progenitores neuronales para tratar la EM todavía está en fase experimental.

Conclusiones

La EM es una enfermedad muy heterogénea y compleja, con un componente inflamatorio y otro neurodegenerativo. Los tratamientos disponibles son en su mayoría antiinflamatorios, por lo que resultan poco eficaces durante la fase progresiva de la enfermedad. Lo óptimo sería disponer de tratamientos antiinflamatorios, neuroregenerativos y neuroprotectores eficaces y seguros, y aplicarlos de forma sinérgica según las necesidades individuales de cada paciente.

Bibliografía

1. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:683-747.
2. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 1998;338:278-85.
3. Freedman MS. Long-term follow-up of clinical trials of multiple sclerosis therapies. *Neurology.* 2011;76(Suppl 1):S26-34.
4. Racke MK, Lovett-Racke AE, Karandikar NJ. The mechanism of action of glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis. *Neurology.* 2010;74(Suppl 1):S25-30.
5. Hartung HP, Gonsette R, König N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey SP, et al. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet.* 2002;360:2018-25.
6. Le Page E, Leray E, Edan G, French Mitoxantrone Safety Group. Long-term safety profile of mitoxantrone in a French cohort of 802 multiple sclerosis patients: a 5-year prospective study. *Mult Scler.* 2011;17:867-75.
7. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;354:899-910.
8. Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA, Confavreux C, Galetta SL, Radue EW, et al. Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;354:911-23.
9. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet.* 1971;1:1257-60.
10. Major EO. Progressive multifocal leucoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. *Annu Rev Med.* 2010;61:35-47.
11. Koralnik IJ. Progressive multifocal leucoencephalopathy revisited: has the disease outgrown its name? *Ann Neurol.* 2006;60:162-73.
12. Tan K, Roda R, Ostrow L, McArthur J, Nath A. PML-IRIS in patients with HIV infection: clinical manifestations and treatment with steroids. *Neurology.* 2009;72:1458-64.
13. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2010;362:387-401.
14. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2010;362:402-15.
15. Hla T, Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate (S1P): physiology and the effects of S1P receptor modulation. *Neurology.* 2011;76(8 Suppl 3):S3-8.
16. Hartung HP, Aktas O, Kieseier B, Giancarlo Comi GC. Development of oral cladribine for the treatment of multiple sclerosis. *J Neurol.* 2010;257:163-70.
17. Gold R. Oral therapies for multiple sclerosis: a review of agents in phase III development or recently approved. *CNS Drugs.* 2011;25:37-52.
18. Lutterotti A, Martin R. Getting specific: monoclonal antibodies in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2008;7:538-47.
19. Bielekova B, Richert N, Howard T, Blevins G, Markovic-Plese S, McCartin J, et al. Humanized anti-CD25 (daclizumab) inhibits disease

- activity in multiple sclerosis patients failing to respond to interferon beta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:8705-8.
20. Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scriver S, Packer A, Cerna M, Waldmann TA, et al. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2R alpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:5941-6.
 21. Muraro PA, Douek DC, Packer A, Chung K, Guenaga FJ, Cassiani-Ingoni R, et al. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J Exp Med*. 2005;201:805-16.
 22. Mancardi G, Saccardi R. Autologous haematopoietic stem-cell transplantation in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2008;7:626-36.
 23. Uccelli A, Prockop DJ. Why should mesenchymal stem cells (MSCs) cure autoimmune diseases? *Curr Opin Immunol*. 2010;22:768-74.
 24. Freedman MS, Bar-Or A, Atkins HL, Karussis D, Frassoni F, Lazarus H, et al. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell transplantation as a treatment for multiple sclerosis: consensus report of the International MSCT Study Group. *Mult Scler*. 2010;16:503-10.
 25. Lutterotti A, Sospedra M, Martin R. Antigen-specific therapies in MS – current concepts and novel approaches. *J Neurol Sci*. 2008;274:18-22.

DISCUSIÓN

L. GRAÇA: Me ha sorprendido que en los ensayos con células madre hematopoyéticas los pacientes se sometan a un régimen de acondicionamiento con radiación. ¿Cómo induce este régimen la inmunosupresión profunda e inmediata? ¿Cómo compararías la reducción de linfocitos T con alemtuzumab, que no provoca una inmunosupresión tan profunda, con los resultados del trasplante de células hematopoyéticas? Me refiero a la reconstitución y a los beneficios que experimentan los pacientes.

M. SOSPEDRA: Después del tratamiento con alemtuzumab no se recuperan los valores previos de linfocitos T hasta al cabo de 2 años. Además, las células madre que se obtienen son diferentes, aunque son autólogas, en ambos casos. Y no hay que olvidar que los efectos secundarios del alemtuzumab son mucho más graves.

L. GRAÇA: Pero hay un porcentaje significativo de mortalidad en las personas que han recibido un trasplante, y hay un 1% de reactivación viral.

M. SOSPEDRA: El principal problema del alemtuzumab es que se asocia a casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva y no se sabe

por qué. En el caso del natalizumab, sí hay más evidencias debido a que el virus se encuentra en los linfocitos B y en las células madre CD34+. Ambas células utilizan VLA-4 para mantenerse retenidas en la médula ósea, en el bazo y en los nódulos linfáticos. Cuando se utiliza el anticuerpo aumenta el número de células y aparece la carga viral. Es por ello que se cree que el natalizumab induce la reactivación del virus JC. Por otro lado, también hay casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva con alemtuzumab, pero no sabemos por qué; además, también produce más efectos secundarios. Y por último, en los pacientes que se han sometido a trasplantes hematopoyéticos no hay casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva.

L. ÁLVAREZ-VALLINA: ¿Por qué vía realizáis la infusión de células mesenquimales y a qué dosis?

M. SOSPEDRA: Nosotros realizamos la infusión por vía intravenosa, pero algunos grupos de investigación sugieren que la vía intratecal es mejor.

L. ÁLVAREZ-VALLINA: Pero por vía intravenosa la mayoría de las células permanecen en el pulmón.

M. SOSPEDRA: Sí, pero cada grupo de investigación usa células mesenquimales diferentes, e incluso a partir de nuestras células otros grupos de investigación han obtenido diferentes fenotipos celulares. Por lo tanto, la obtención de células mesenquimales no está estandarizada.

M. JUAN: Por otro lado, el papel de las células mesenquimales en los procesos de regulación aún es bastante desconocido, y habrá que ver cómo averiguamos sus funciones.

Vacunas contra el VIH

M. Plana

Laboratori de Retrovirologia i Immunopatogènia Viral – IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona

Resumen: *Actualmente se cree conveniente explorar diversas estrategias de inmunoterapia o vacunación terapéutica con el ánimo de limitar el tiempo, los efectos adversos y el coste del tratamiento farmacológico, y prevenir la progresión de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) mediante la inducción o la mejora de la respuesta inmunitaria antiviral capaz de controlar la replicación del virus. Uno de los abordajes es el uso de vacunas terapéuticas basadas en células dendríticas autólogas derivadas de monocitos como adyuvantes, la cuales pueden ser pulsadas fundamentalmente con virus inactivados o péptidos del VIH-1. Los resultados obtenidos en los diversos estudios realizados hasta el momento son modestos, aunque prometedores. Sin embargo, se requiere aún un mayor conocimiento de los mecanismos inmunitarios de control de la replicación viral, así como el desarrollo de inmunógenos más potentes o de nuevas estrategias para potenciar la activación in vivo de las células dendríticas, para optimizar y mejorar la eficacia de dichas vacunas terapéuticas frente al VIH-1.*

Palabras clave: VIH – Vacunas terapéuticas – Células dendríticas – Inmunoterapia.

Bases patogénicas de la inmunoterapia en la infección por el VIH-1

Limitaciones del tratamiento antirretroviral

El uso de una combinación de fármacos antirretrovirales como tratamiento estándar ha reducido la morbilidad y la mortalidad de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) en los países desarrollados.¹ Sin embargo, y a pesar de producir un incremento de la cifra de linfocitos T CD4+ por encima de 200 células por mm³ en el 95% de los individuos, presenta ciertas limitaciones importantes. En primer lugar, los pacientes de los países en vías de desarrollo aún tienen un acceso limitado a la medicación. En segundo lugar, el tratamiento

no está exento de efectos tóxicos importantes, lo que condiciona una adherencia subóptima y conlleva en ocasiones la aparición de resistencias o la discontinuación del tratamiento.² Finalmente, el tratamiento suprime por completo la replicación del virus, pero no lo erradica de los reservorios y tampoco restaura totalmente las funciones de los linfocitos T CD4+.³ Del mismo modo, y como consecuencia de la menor disponibilidad de antígeno circulante, disminuyen las células T CD4 y CD8 específicas frente al VIH-1.⁴ Por ello se están explorando diversas estrategias terapéuticas alternativas, bien como complemento al tratamiento antirretroviral existente, a fin de erradicar al virus, o bien como sustitución de dicho tratamiento, en el sentido de permitir un control de la replicación del virus

durante periodos largos de tiempo sin necesidad de apoyo farmacológico.⁵ En realidad, las estrategias de inmunoterapia pretenden reeducar al sistema inmunitario para que pueda mantener una potente y eficaz respuesta frente al VIH-1, tanto sistémica como en las mucosas.⁶

Correlatos de protección: factores para la evaluación de la inmunoterapia en la infección por el VIH-1

Para poder desarrollar una inmunoterapia eficaz se precisa saber primero cuáles son los factores que confieren protección frente al VIH-1 e impiden la progresión de la enfermedad. Sin embargo, aún se desconocen los verdaderos correlatos de protección, aunque gracias a los resultados obtenidos en estudios en individuos patogénicamente relevantes, tales como los “controladores de élite” (individuos infectados por el VIH-1 que presentan una carga viral plasmática indetectable en ausencia de tratamiento), aquellos cuya enfermedad no progresa a largo plazo (individuos infectados por el VIH-1 que presentan una buena evolución clínica hasta después de más de 10 años de infección), o en modelos animales, se han podido conocer ciertos factores que merecen ser considerados, ya que habitualmente se asocian a un control inmunitario del virus:

- 1) Una respuesta de células T CD8+ específica frente al VIH-1 que sea polifuncional, es decir, capaz de producir espontáneamente múltiples citocinas, tales como interferón gamma (IFN- γ) e interleucina (IL) 2, y a la vez con una fuerte capacidad proliferativa frente al antígeno.^{7,8}
- 2) Unas células T CD8+ específicas frente al VIH-1 con capacidad citolítica conservada.⁹
- 3) Una buena y potente respuesta de células T CD4+ específicas frente al VIH-1, con capacidad polifuncional.¹⁰
- 4) Una buena actividad de la inmunidad innata, fundamentalmente mediada por la capacidad citolítica de las células *natural*

killer (NK), las cuales la ejercen por una menor señalización a través de ciertos receptores inhibidores, tales como KIR-DL1.¹¹

- 5) Una moderada activación del sistema inmunitario que impedirá que los linfocitos T lleguen a un estado de agotamiento y senescencia funcional, mediante un desequilibrio en la expresión de ciertos receptores inhibidores, como el receptor PD-1 (*programmed death*).¹²

- 6) La presencia en suero de anticuerpos capaces de neutralizar al virus, hecho que parece favorecer más la no infección que la progresión y el control de la enfermedad.¹³

A pesar de que ninguno de estos factores predice la progresión de la infección por el VIH-1, parece que algunas de las características antes citadas de los linfocitos T CD4+ y CD8+ podrían tener un importante papel en el control de la replicación viral. La pregunta que todavía no tiene respuesta es cuál de esos parámetros debe inducirse con una estrategia de inmunoterapia, por ser el verdadero implicado en el control inmunitario de la infección.

Estrategias de inmunoterapia en la infección por el VIH-1

Hasta el momento, son varias las estrategias de inmunoterapia que se han intentado aplicar en la infección por el VIH-1 para resolver la disfunción de las células del sistema inmunitario y conseguir un control de la replicación viral. Entre ellas se han probado terapias de transferencia pasiva, ya sea mediante infusión de células T o bien sueroterapia; administración de diversas citocinas; alternancia de tratamiento antirretroviral con periodos de descanso o “interrupciones estructuradas del tratamiento”, a modo de “autovacunación”; combinación de fármacos antirretrovirales con varios agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina A, hidroxurea o ácido micofenólico; y finalmente inmunizaciones o vacunas terapéuticas.^{6,14}

Vacunas terapéuticas frente al VIH-1

A diferencia de las vacunas preventivas, cuyo fin es inducir una inmunidad esterilizante, el principal objetivo de una vacuna terapéutica es conseguir la prevención de las complicaciones graves de la infección crónica por el VIH-1, mejorando la cantidad y la calidad de la respuesta inmunitaria del huésped, ya sea aumentando la respuesta ya existente o bien induciéndola *de novo*. Como consecuencia de la dificultad de generar suficiente cantidad de anticuerpos de amplio espectro capaces de neutralizar al VIH-1, la diana de las actuales vacunas terapéuticas se ha centrado en generar una respuesta inmunitaria celular. El marco teórico es que una vacuna terapéutica eficaz deberá mejorar la habilidad del huésped para limitar la replicación viral, modular la tasa de progresión de la enfermedad, y reducir o eliminar la dependencia del tratamiento antirretroviral.

A lo largo de los años se han descrito y ensayado varios enfoques para conseguir el control de la infección por el VIH-1 mediante una potenciación de la respuesta inmunitaria del huésped. Se ha probado la inyección de un virus VIH-1 estándar completo e inactivado, desprovisto de la proteína gp120 de la envuelta (Remune), aproximación que obtuvo unos resultados muy limitados, aunque fue eficaz para aumentar la cifra de células T CD4+. También se han utilizado varios tipos de vectores virales (canaripox, avipox, virus vaccinia modificado), solos o en combinación, tanto en modelos animales como en ensayos en pacientes infectados por el VIH-1, así como vacunas de DNA. Aunque los resultados de estos ensayos son diversos, ninguna de estas estrategias ha conseguido hasta ahora una eficacia total en términos de supresión prolongada de la replicación viral al suspender el tratamiento farmacológico habitual. En cuanto a la potenciación de la respuesta inmunitaria celular, se ha descrito el control parcial de la carga viral plasmática con incrementos transitorios de la respuesta antiviral de linfocitos T tanto CD4+ como CD8+.^{6,15} Por último, y bajo el principio de intentar generar *ex vivo* una población de

células presentadoras de antígeno específico del VIH-1, que tras ser inyectadas deberían inducir *in vivo* una respuesta de linfocitos T CD4+ y CD8+ de alta calidad y larga duración, se han ensayado también las vacunas terapéuticas basadas en células dendríticas.¹⁶

CÉLULAS DENDRÍTICAS COMO CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO EN LA INMUNOTERAPIA DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-1

Las células dendríticas de origen mieloide son las células con mayor capacidad y potencia para actuar como células presentadoras de antígeno. Están geográficamente situadas como centinelas, detectan señales de peligro y actúan como unión entre las respuestas inmunitarias innatas y adquiridas. Dada su excepcional habilidad de estimular la inmunidad de las células T en respuesta a patógenos, estas células se han venido explotando, tanto *ex vivo* como *in vivo*, para la inmunoterapia de la infección por el VIH-1 desde hace ya algunos años.¹⁷ Su uso en humanos, además, ha venido favorecido por el hecho de que se pueden generar células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica tras cultivo con IL-4 y factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.

El uso de células dendríticas para la inmunoterapia de la infección por el VIH-1 explota las vías naturales del reconocimiento y del procesamiento del antígeno en el control inmunitario por parte del huésped. El fundamento para la inmunoterapia con células dendríticas es controlar la infección por el VIH-1 más eficazmente y disminuir el dintel viral después de retirar el tratamiento.

La activación *in vivo* de las células dendríticas ocurre en tres fases: captura de antígeno, maduración y acción efectora. Las células dendríticas inmaduras captan los antígenos en la periferia por endocitosis. El proceso de maduración se induce en respuesta a señales de peligro, tales como estímulos inflamatorios, y se origina a partir de los patrones moleculares asociados a patógenos, a partir de células apoptóticas o a partir de formas solubles o unidas a la membrana de la familia del factor de necrosis tumoral. La maduración se

caracteriza por la regulación al alza de los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y de clase II, moléculas coestimuladoras (CD80/CD86) y pérdida de la capacidad de captación de antígeno. Además, las células dendríticas también regulan al alza la expresión del receptor de quimiocinas CCR7 y se vuelven sensibles a quimiocinas, lo que facilita su migración a los ganglios linfáticos. Es allí donde las células dendríticas maduras presentan su antígeno a las células T vírgenes o *naive* en el contexto de las moléculas del MHC I y II. Se producirá entonces un entrecruzamiento de la molécula de superficie CD40 en las células dendríticas y CD40L, molécula expresada en las células CD4 activadas que actúa como ligando. Además, las células dendríticas secretarán citocinas que promoverán la diferenciación de los linfocitos T hacia los linajes *helper 1*, *helper 2* o regulador. Las células dendríticas también presentarán el antígeno a los linfocitos T CD8+, los cuales se diferenciarán a células citotóxicas efectoras (CTL).¹⁸

ANTÍGENOS UTILIZADOS PARA PULSAR A LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

La naturaleza del antígeno, la cantidad de antígeno para cargar a las células dendríticas, la eficiencia del pulsado, y la persistencia y la presentación del antígeno, son criterios importantes que deben considerarse en el desarrollo de una vacuna terapéutica eficaz basada en células dendríticas (Tabla I). El antígeno puede proporcionarse a las células dendríticas de diversas formas. En primer lugar, puede ser aportado exógenamente como péptidos, proteínas enteras o células apoptóticas. También puede hacerse como material genético, transfectando las células dendríticas con vectores virales portadores de antígenos del VIH-1 DNA o bien RNAm. El uso de péptidos antigénicos es una eficiente estrategia de pulsado de las células dendríticas, aunque está restringida a un número limitado de epítopes inmunógenos del VIH-1 restringidos por el HLA de clase I. Alternativamente, las células dendríticas pueden

ser pulsadas con proteínas del VIH-1 enteras recombinantes, o bien con partículas del VIH-1 entero inactivadas. Otras aproximaciones contemplan el uso de una preparación de células T infectadas por el VIH-1 apoptóticas o necróticas, o incluso vivas. En ambos casos se ha logrado inducir respuestas específicas frente al VIH-1 de linfocitos T CD4+ y CD8+. Cabe mencionar que estos métodos son difíciles de estandarizar debido a las variables que existen: fuente del virus, tipo y estado de activación de las células infectadas, modo de apoptosis o necrosis, método de inactivación del virus y concentración de antígeno en la preparación a usar.¹⁶

El uso de antígenos codificados por ácidos nucleicos, sea DNAc o RNAm, es más fácil de estandarizar. La transfección con RNAm que codifica antígenos del VIH-1 parece ser uno de los métodos más eficaces para cargar a las células dendríticas y obtener la consiguiente estimulación de los linfocitos T específicos frente al VIH-1.^{19,20} En este sentido, se ha utilizado RNAm que codifica antígenos del VIH-1 consenso o específicos de subtipo, como por ejemplo Gag, pero los resultados obtenidos son algo controvertidos.²¹ Por otro lado, se han desarrollado también métodos para aislar RNAm codificantes de secuencias del virus autólogo obtenidos a partir del DNA proviral, o bien de secuencias virales derivadas de las células infectadas en periferia o de plasma, que representan a la vez virus del archivo latente y virus activo en replicación. Esta última estrategia parece ofrecer una mejor perspectiva para el desarrollo de una inmunoterapia específica de cada paciente dirigida hacia todas las quasiespecies del VIH-1 autólogo, eliminando el riesgo biológico del virus entero intacto en el producto final de la vacuna.

ESTRATEGIAS DE VACUNAS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS PROBADAS EN ENSAYOS CLÍNICOS

Se han realizado ensayos clínicos de vacunación terapéutica con células dendríticas en pacientes infectados por el VIH-1, tanto *naive* como tratados con antirretrovirales. Puesto

Tabla I. Factores esenciales a considerar en el diseño y el uso de las vacunas terapéuticas frente al VIH-1 basadas en células dendríticas.

Tipo de célula dendrítica	Mieloides, plasmacitoides, células de Langerhans, intersticiales
Maduración de las células dendríticas	Agonistas de los receptores <i>Toll-like</i> CD40L
Presentación antigénica y migración	Citocinas: IFN- γ , TNF- β , IFN- α , IL-1 β , prostaglandina E2 Lectinas tipo C (DEC-205, DC-SIGN)
Vía de administración	Intravenosa, subcutánea, intradérmica, intranodal
Supresión de la respuesta de los linfocitos T	Treg (TGF, IL-10), PD-1, CTLA-4
Infección por el VIH-1	Tratamiento antirretroviral Variantes de escape viral
Antígeno del VIH	Secuencias consenso frente a autólogas Virus entero inactivado Células infectadas apoptóticas Exosomas Proteínas recombinantes Péptidos RNA DNA Vectores microbianos VLP (<i>virus-like particle</i>)
Criterios de valoración inmunológicos	Incremento en el número de linfocitos T polifuncionales Incremento en la magnitud y la amplitud de la respuesta CTL a Gag, otras proteínas del VIH-1 Normalización de las cifras de linfocitos T Normalización de la activación del sistema inmunitario
Criterios de valoración virológicos	Disminución del dintel virológico

que los individuos en tratamiento presentan mayor número de linfocitos T CD4+ y una carga viral indetectable, los resultados obtenidos tras la vacunación suelen mostrar una recuperación parcial de la inmunidad celular antiviral. De hecho, parece plausible focalizar los ensayos de vacunas de células dendríticas en estos pacientes tratados, ya que tienen un sistema inmunitario mejorado en cantidad y calidad, y no hay demasiado riesgo de que la activación del sistema inmunitario que pudiera producir la vacunación incremente de manera importante la replicación viral. A pesar

de ello, algunos autores consideran que es mejor emplear las vacunas en pacientes que no reciben tratamiento antirretroviral, con el fin de maximizar la presencia del antígeno endógeno, minimizar los posibles efectos inmunosupresores del tratamiento antirretroviral y limitar las variables de confusión de las estrategias terapéuticas utilizadas.

Dejando aparte los estudios realizados en modelos animales, el primer ensayo realizado in vivo en humanos fue un estudio piloto en pacientes *naive* que demostró que la administración de células dendríticas pulsa-

das con péptidos VIH-1 o proteínas fue bien tolerada e indujo una respuesta inmunitaria frente al VIH-1, aunque no se observó ningún efecto sobre la carga viral plasmática.²² Igualmente, en otros ensayos que han utilizado combinaciones de péptidos sintéticos del VIH-1 como antígeno, aunque en pacientes en tratamiento antirretroviral, tampoco se pudo observar cambios en la carga viral ni en la cifra de linfocitos T CD4+.²³ Se ha llevado a cabo un ensayo en pacientes *naive* utilizando células dendríticas pulsadas con virus VIH-1 autólogo inactivado con aldritol-2, inhibidor de los dedos de zinc, el cual preserva la conformación del virus. En este estudio se observó la inducción de una potente respuesta antiviral de los linfocitos T junto con una supresión viral mantenida (disminución del 80% durante al menos 4 meses de seguimiento) en el 50% de los pacientes. Además, se vio que para inducir y mantener una respuesta efectora por parte de las células CD8+ específicas frente al VIH-1 era necesaria una potente respuesta de linfocitos T CD4+ específicos del VIH-1.²⁴ Por otro lado, se han descrito resultados mucho más modestos en un ensayo clínico aleatorizado en el cual se vacunaron 12 pacientes sin tratamiento antirretroviral con células dendríticas pulsadas con VIH-1 autólogo inactivado por calor, y 12 pacientes VIH+ con células dendríticas sin pulsar. En la semana 24 de seguimiento se observó una disminución de alrededor de 0,5 log en la carga viral de tres de los 12 pacientes vacunados. No pudo evidenciarse respuesta específica frente al VIH-1 por parte de los linfocitos T CD4+ en ningún caso, pero sí se describió una correlación inversa entre la respuesta CTL y los cambios en la carga viral plasmática en aquellos pacientes sometidos a la inmunización y no en los que recibieron placebo.²⁵ Igualmente modestos fueron los resultados previos descritos por el mismo grupo en un ensayo en pacientes, esta vez en tratamiento antirretroviral, a quienes se les aplicó una pauta de vacunación con células dendríticas pulsadas con virus autólogo inactivado por calor. En este estudio se ob-

servó sólo un control parcial de la carga viral tras suspender el tratamiento antirretroviral, asociado a cambios leves y transitorios en la respuesta inmunitaria celular frente al VIH-1 tanto en periferia como en tejido linfático.²⁶ Si estas diferencias pueden ser o no atribuidas al diseño experimental del estudio, a la preparación de las vacunas, al tipo de inactivación del virus o bien a la presencia o no de supresión viral debida al tratamiento antirretroviral, es algo que debería comprobarse en futuros estudios. Más recientemente se han realizado ensayos utilizando células dendríticas electroporadas con RNAm del VIH-1 autólogo (antígenos Gag, Vpr, Rev y Nef). Los pacientes recibieron inyecciones mensuales en combinación con el tratamiento antirretroviral. Se halló una buena capacidad proliferativa frente a los cuatro antígenos utilizados en la vacuna en siete de los nueve pacientes inmunizados. En este último caso, no se evaluó el efecto sobre la carga viral.²⁷

FUTURAS DIRECTRICES PARA MEJORAR LAS VACUNAS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

La mayoría de las estrategias inmunoterapéuticas implican la manipulación *ex vivo* de células dendríticas autólogas. Esto tiene serias limitaciones, como laboriosidad en la preparación, complicaciones logísticas, coste y no factibilidad en países en vías de desarrollo. Para obviarlas, podría administrarse *in vivo* el antígeno seleccionado junto con coestímulos adecuados dirigidos hacia las propias células dendríticas del huésped. Un ejemplo sería dar antígeno formando complejo con anticuerpos dirigidos contra moléculas de superficie de las propias células dendríticas, tales como DC-SIGN o DEC-205. Igualmente, podrían administrarse nanopartículas biodegradables que serían endocitadas *in vivo* por las propias células dendríticas. Aún se requieren estudios preclínicos para investigar qué formato de antígeno usar y qué coestímulos son adecuados para cargar las nanopartículas, para inducir la maduración de las células dendríticas y la presentación antigénica capaz de desencadenar una respuesta antiviral eficaz.²⁸

Por otro lado, queda por debatir si puede aceptarse o no la interrupción del tratamiento antirretroviral tras la vacunación terapéutica y qué correlatos de protección deben usarse (Tabla I). Parece plausible pensar que, si se toman ciertas precauciones, tales como evitar disminuciones acentuadas de la cifra de linfocitos T CD4+, y se previene la aparición de resistencia a los fármacos, debería poderse considerar a la dinámica del rebrote de la carga viral y al dintel viral alcanzado tras la interrupción del tratamiento como criterios de valoración de los estudios de vacunación terapéutica en la infección por el VIH-1.²⁹

Conclusiones

En las estrategias de desarrollo de vacunas terapéuticas frente al VIH-1 se han conseguido algunos logros y resultados prometedores. Sin embargo, aún se necesita un mejor conocimiento de los mecanismos de control inmunitario de la replicación viral y definir los verdaderos correlatos de protección. Respecto a las vacunas terapéuticas basadas en células dendríticas, todavía son muchos los factores que deben considerarse al plantear una nueva estrategia que sea eficaz y permita mantener bajos títulos de VIH-1 residual e impedir el rebrote del virus tras interrumpir el tratamiento antirretroviral. Por ello, son necesarios futuros estudios, tanto *ex vivo* como *in vivo*, que puedan aportar datos al respecto, a fin de poder mejorar las estrategias de vacunación.

Bibliografía

1. Pallela FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998;338:853-60.
2. Carr A, Cooper DA. Adverse effects of antiretroviral therapy. *Lancet*. 2000;356:1423-30.
3. Chun TW, Nickle DC, Justement JS, Meyers JH, Roby G, Hallahan CW, et al. Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2008;197:714-20.
4. Pitcher CJ, Quittner C, Peterson DM, Connors M, Koup RA, Maino VC, et al. HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1-infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat Med*. 1999;5:518-25.
5. Letvin NL, Walker BD. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med*. 2003;9:861-6.
6. Autran B, Kinloch-de Loes S, Katlama C. Therapeutic immunization in HIV infection. *Curr Opin in HIV and AIDS*. 2006;1:323-9.
7. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*. 2006;107:4781-9.
8. Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA, et al. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity*. 2008;29:1009-21.
9. Saez-Cirión A, Lacabaratz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F, et al. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection *ex vivo* and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:6776-81.
10. Harari A, Petitpierre S, Vellelian F, Pantaleo G. Skewed representation of functionality distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood*. 2004;103:966-72.
11. Martin MP, Qi Y, Gao X, Yamada E, Martin JN, Pereyra F, et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet*. 2007;39:733-40.
12. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med*. 2006;12:1198-202.
13. Pereyra F, Palmer S, Miura T, Block BL, Wiegand A, Rothchild AC, et al. Persistent low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *J Infect Dis*. 2009;200:984-90.
14. García F, Plana M, Arnedo M, Ortiz GM, Miró JM, Lopalco L, et al. A cytotoxic drug improves

- control of HIV-1 replication during structured treatment interruptions. *AIDS*. 2003;17:43-51.
15. García F, Ruiz L, López-Bernaldo de Quirós JC, Moreno S, Domingo P. Immunotherapy and therapeutic vaccines in HIV infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23:95-104.
 16. Rinaldo CR. Dendritic cell-based human immunodeficiency virus vaccine. *J Intern Med*. 2008;265:138-58.
 17. Connolly N, Riddler S, Stanton S, Gooding W, Rinaldo CR, Ferrone S, et al. Levels of antigen processing machinery components in dendritic cells generated for vaccination of HIV-1+ subjects. *AIDS*. 2007;21:1683-92.
 18. Van Gulck E, Van Tendeloo VF, Berneman ZN, Vanham G. Role of dendritic cells in HIV-1 immunotherapy. *Curr HIV Res*. 2010;8:310-22.
 19. Kavanagh DG, Kaufmann DE, Sunderji S, Frahm N, Le Gall S, Boczkowski D, et al. Expansion of HIV-specific CD4+ and CD8+ T cells by dendritic cells transfected with mRNA encoding cytoplasm- or lysosome-targeted Nef. *Blood*. 2006;107:1963-9.
 20. Van Gulck ER, Vanham G, Heyndrickx L, Coppens S, Vereecken K, Atkinson D, et al. Efficient in vitro expansion of human immunodeficiency virus (HIV)-specific T-cell responses by gag mRNA-electroporated dendritic cells from treated and untreated HIV type1-infected individuals. *J Virol*. 2008;82:3561-73.
 21. McMichael AJ. HIV vaccines. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:227-55.
 22. Kundu SK, Engleman E, Benike C, Shaper MH, Dupuis M, van Schooten WC, et al. A pilot clinical trial of HIV antigen-pulsed allogeneic and autologous dendritic cell therapy in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998;14:551-60.
 23. Connolly NC, Whiteside TL, Wilson C, Kondragunta V, Rinaldo CR, Riddler SA. Therapeutic immunization with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces immunogenicity in HIV-1-infected individuals. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15:284-92.
 24. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med*. 2004;10:1359-65.
 25. García F, Climent N, Assoumou L, Gil C, González N, Alcamí J, et al., for DCV2/MANON07-ORVACS Study Group. A therapeutic dendritic cell-based vaccine for HIV-1 infection: a pilot double blinded placebo-controlled study. *J Infect Dis*. 2011;203:473-8.
 26. García F, Lejeune M, Climent N, Gil C, Alcamí J, Morente V, et al. Therapeutic immunization with dendritic cells loaded with heat-inactivated autologous HIV-1 in patients with chronic HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2005;191:1680-5.
 27. Routy JP, Boulassel MR, Yassine-Diab B, Nicolette C, Healey D, Jain R, et al. Immunologic activity and safety of autologous HIV RNA-electroporated dendritic cells in HIV-1 infected patients receiving antiretroviral therapy. *Clin Immunol*. 2010;134:140-7.
 28. Ahlers JD, Belyakov IM. Strategies for recruiting and targeting dendritic cells for optimizing HIV vaccines. *Trends Mol Med*. 2009;15:263-74.
 29. Kutzler MA, Jacobson JM. Treatment interruption as a tool to measure changes in immunologic response to HIV-1. *Curr Opin HIV AIDS*. 2008;3:131-5.

DISCUSIÓN

A. GONZÁLEZ: ¿Habéis estudiado los anticuerpos en los pacientes tratados? ¿Se producen cambios?

M. PLANA: Sí, hemos analizado los anticuerpos, pero no detectamos cambios porque el virus que hemos usado para pulsar las células dendríticas está inactivado por calor, y por lo tanto tiene una conformación totalmente alterada. La Agencia Española

de Medicamentos y Productos Sanitarios no nos dejó usar productos químicos para inactivar el virus, por lo que no detectamos anticuerpos neutralizantes porque no se indujo su formación.

F. RUIZ-CABELLO: Los resultados que has presentado con células dendríticas son parecidos a lo que ocurre en el cáncer, es decir, que los modelos experimentales murinos no

reproducen fielmente la evolución de la enfermedad. Ello podría deberse a que no se consigue un estímulo crónico y persistente que provoque el deterioro y la alteración del repertorio de los linfocitos T, y ésta podría ser la razón de que las vacunas no funcionen y los resultados de la inmunoterapia en el cáncer, como en el VIH, sean muy pobres. Para reproducir los efectos que sobre el sistema inmunitario provoca un estímulo crónico se requeriría mucho tiempo, y esto es difícil de trasladar a los modelos experimentales.

M. PLANA: Estoy de acuerdo, es un problema común en muchas enfermedades, como el cáncer. Aunque los modelos experimentales son muy útiles en el laboratorio, quedan muy lejos de la realidad clínica.

A. RIBAS: Debemos ser conscientes de que los modelos experimentales son sólo eso, modelos que nos ayudan a avanzar en el conoci-

miento científico. El hecho de que los modelos animales no reproduzcan la enfermedad humana es algo normal e inherente a ellos. Los modelos reproducen aspectos científicos de la enfermedad y nos permiten redefinirlos en función de lo que ocurre en los humanos para poder obtener mejores predicciones y resultados. Como investigadores, debemos pensar en positivo y experimentar con estos modelos hasta conseguir lo que buscamos, con la ayuda de las hipótesis y el trabajo duro.

F. RUIZ-CABELLO: Estoy de acuerdo con lo que comentas, pero creo que hay que reorientar las opciones. Somos conscientes de que mediante los estímulos que aplicamos sobre las células hacemos que los linfocitos entren en la fase de senescencia, y como consecuencia los beneficios terapéuticos son muy limitados. Hoy se conoce cómo puede frenarse el proceso de envejecimiento y alargar la supervivencia in vivo de los linfocitos T.

Vacunas contra la malaria

P. Alonso

Centro de Investigación en Salud Internacional de Barcelona (CRESIB),
Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona

Resumen: *La malaria constituye uno de los principales problemas de salud pública global, con alrededor de 216 millones de episodios clínicos y cerca de 655.000 muertes anuales. En zonas de alta endemividad, entre las que destaca África subsahariana, los grupos poblacionales más vulnerables son los niños en su primera infancia y las mujeres embarazadas. Ante este escenario, una vacuna efectiva, que protegiera al menos a la población pediátrica de las zonas altamente endémicas, sería una pieza clave para facilitar el control de la malaria y avanzar hacia su futura eliminación. Sin embargo, su desarrollo es un complejo rompecabezas que impone un reto científico formidable. Desde el punto de vista inmunológico, el parásito es de una gran complejidad, de la que tenemos un conocimiento todavía parcial e insuficiente. El parásito presenta una miríada de antígenos que varían a lo largo de los diferentes estadios de su ciclo vital y contra los cuales se requieren respuestas inmunitarias secuenciales y encadenadas, y muchas proteínas parasitarias muestran un gran polimorfismo. Nuestro conocimiento sobre la inmunidad que se desarrolla contra la malaria es muy limitado e incompleto, y a diferencia de otras enfermedades todavía no se ha encontrado un buen correlato inmunológico de protección. La investigación para el desarrollo de estas vacunas tiene la dificultad añadida de que no hay modelos animales apropiados y de que la única manera de conocer su eficacia es realizando ensayos clínicos en zonas endémicas de malaria. A pesar de estas importantes dificultades, hay razones para el optimismo, puesto que la vacuna candidata más avanzada, la denominada RTS,S (basada en la fusión del antígeno de superficie del circunsporozoito con el antígeno de superficie de la hepatitis B, formulada con el potente adyuvante AS01) ha llegado ya a la última fase (III) antes de poder ser registrada, demostrando de forma consistente una eficacia moderada pero mantenida en el tiempo, que invita a pensar que el desarrollo clínico de una vacuna eficaz para la malaria está cada vez más cerca de ser una realidad de la cual las poblaciones más necesitadas en las zonas endémicas podrían beneficiarse.*

Palabras clave: *Plasmodium* spp. – Malaria – Vacuna preeritrocítica – RTS,S/AS01.

Introducción

La malaria o paludismo constituye uno de los principales problemas de salud pública global, pues cada año afecta a 216 millones de personas.^{1,2} Los datos del *Informe mundial sobre el paludismo 2011*,² publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), muestran que más de 3000 millones de personas, casi el 50% de la población mundial, vive en zonas de riesgo de sufrir esta enfermedad, que es endémica en más de 99 países. La región

de África subsahariana es la más afectada por el paludismo,² donde más del 40% de la población sufre la enfermedad, mayoritariamente (por encima del 75%) niños menores de 5 años.² Además, la gravedad de esta infección llega a producir 655.000 muertes anuales, de las cuales el 90% se producen en África y, de nuevo, los más afectados son los niños menores de 5 años.²

Durante 2010 se distribuyeron más de 145 millones de redes mosquiteras tratadas con insecticida en África subsahariana, con

el objetivo de proteger al 75% de la población en riesgo de sufrir una infección por malaria. Además, los programas de fumigación intradomiciliar se ampliaron, cubriendo casi un 10% de la población en riesgo.² Lamentablemente, se ha constatado la aparición de resistencias a los antipalúdicos comunes en las cepas de *Plasmodium* spp. y a los insecticidas en los vectores de la enfermedad (el mosquito *Anopheles* spp.).²

Todo lo dicho justifica sobradamente la necesidad de encontrar una vacuna contra la malaria, que contribuya tanto a la prevención como al control de esta enfermedad. Las vacunas constituyen los mejores métodos de control de las enfermedades infecciosas y gozan de una amplia aceptación social. Sin embargo, frente a la malaria las vacunas serán una herramienta complementaria de los demás métodos de prevención existentes, como las mosquiteras, los insecticidas y un adecuado tratamiento farmacológico.

Transmisión y tratamiento de la malaria

La malaria es una enfermedad parasitaria causada por la infección de *Plasmodium* spp. De las cinco especies que causan la malaria común, *P. falciparum* es la que desencadena los síntomas clínicos más graves y constituye la variedad de malaria endémica en África subsahariana. La complejidad de su tratamiento radica en que la malaria se transmite mediante la picadura de mosquitos, la mayoría anofelinos (*Anopheles* spp.), y en el ciclo vital del agente infeccioso (Fig. 1).³

El ciclo vital de *Plasmodium* spp. se caracteriza por tres fases de desarrollo: la exoeritrocítica, la eritrocítica y la esporogónica. La infección se inicia en la fase exoeritrocítica, cuando un mosquito hembra *Anopheles* spp. infectado con *Plasmodium* introduce durante la picadura, a través de su saliva, los esporozoitos en el huésped. Éstos migran al hígado del huésped, invaden los hepatocitos y divi-

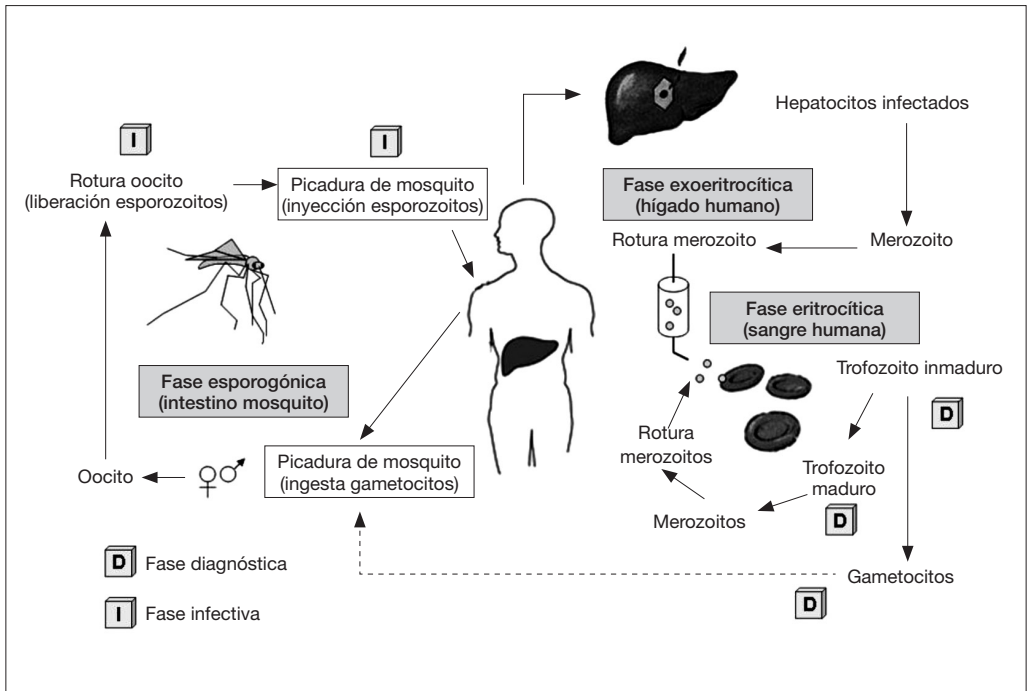


Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp.³

den su núcleo de manera asexual, periodo en el cual la célula parasitaria recibe el nombre de esquizonte o meronte. Según la especie de *Plasmodium*, esta fase puede durar entre 5 y 16 días. Cuando el esquizonte se rompe, cada nuevo núcleo de *Plasmodium* recibe una parte del citoplasma celular parasitario, y da lugar a varios merozoitos. Los nuevos merozoitos forman vesículas a partir de las membranas celulares de los hepatocitos infectados, lo cual facilita su transporte hasta el torrente sanguíneo. La fase eritrocítica se inicia cuando los merozoitos penetran en los glóbulos rojos para volverse a reproducir, tanto de manera asexual como sexualmente, produciendo trofozoitos y provocando la rotura eritrocitaria. Los trofozoitos se dividen asimismo de manera asexual, produciendo merozoitos que infectarán a más glóbulos rojos. En este momento se producen los principales síntomas de la enfermedad.¹ Por otro lado, una parte de los trofozoitos inician una fase de división sexual, produciendo gametocitos femeninos y masculinos. Una nueva picadura por parte de una hembra de mosquito *Anopheles* facilita que estos gametocitos se absorban junto con la sangre del huésped, lo que dará lugar a la tercera fase del ciclo vital de *Plasmodium*, la fase esporogónica o de mosquito. Una vez dentro del tracto intestinal del mosquito, los gametocitos se fusionan, dan lugar a un oocineto y finalmente a un oocito. El oocito migra hacia las glándulas salivares del mosquito, donde se rompe y libera multitud de esporozoitos. Tras una nueva picadura, los esporozoitos de *Plasmodium* contenidos en la saliva de *Anopheles* se transmitirán a un nuevo huésped, iniciándose un nuevo ciclo vital de *Plasmodium*.⁴

La malaria cursa clínicamente con fiebre repentina, anemia, escalofríos, cefalea y dolores articulares.^{1,3} En la actualidad, su tratamiento farmacológico, tanto preventivo como curativo, se basa en la administración de tratamientos combinados con artemisina. Sin embargo, cada vez son más frecuentes las infecciones resistentes a la cloroquina, por lo que el tratamiento antipalúdico incluye la combinación de fármacos como artemisina, quinina, quinidina, atovuona, proguanil,

artesunato, mefloquina, pirimetanina y sulfadoxina.¹

Desarrollo de vacunas contra la malaria

Actualmente están en marcha varios proyectos de investigación, en diversas fases clínicas y con dianas diferentes, que pretenden desarrollar una vacuna eficaz contra la malaria. De manera tradicional, las vacunas se han diseñado frente a microorganismos que inducen una rápida respuesta inmunitaria. Sin embargo, la malaria induce una inmunidad no esterilizante de manera lenta y progresiva. Además, el *Plasmodium* posee un ciclo vital complejo, con varios estadios y multitud de antígenos para cada uno de ellos. Esta complejidad del ciclo de vida dificulta y alarga el desarrollo de una vacuna eficaz.

A pesar de que había proyectos previos para erradicar la malaria, no fue hasta 2007 cuando se mejoró e intensificó el esfuerzo para combatirla. Tras el Global Malaria Forum organizado en octubre de 2007 por la Bill and Melinda Gates Foundation y otras organizaciones, se propuso con firmeza el objetivo de eliminar definitivamente la enfermedad. Un año más tarde, el Roll Back Malaria Partnership, que incluye a la OMS, el Fondo de Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF), el Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo (UNPD) y el Banco Mundial, crearon el Global Malaria Action Plan a fin de coordinar la lucha frente a la malaria.

Uno de los objetivos de la iniciativa es estudiar y lograr el registro de una vacuna eficaz contra la malaria antes de 2025, la cual debería proteger al 80% de la población vacunada durante un periodo superior a 4 años. Como primera aproximación, antes de 2015 se pretende obtener una vacuna de primera generación contra la malaria grave que proteja al 50% de la población durante un periodo superior a 1 año.

En la actualidad hay 26 proyectos de investigación en fase clínica y 24 en fase preclínica de desarrollo de vacunas contra la malaria (Tabla I).⁵ Estos proyectos abarcan todos los estadios del ciclo del parásito, la

combinación de varios estadios o la acción global sobre todo el parásito. A pesar de estas iniciativas, las vacunas que posiblemente tendrán más posibilidades de erradicar la malaria serán aquellas que interrumpan la transmisión de la enfermedad. Por ello, las estrategias más eficaces serán las que actúen sobre las fases del ciclo con menor carga parasitaria, es decir, la fase exoeritrocítica y la fase esporogónica.

Las vacunas que actúan sobre la primera fase del ciclo pretenden reducir la probabilidad de infección después de la picadura del mosquito, mientras que las que actúan en la tercera fase se proponen reducir el número de mosquitos infectados. Las vacunas con acción en la fase eritrocítica disminuirían los síntomas y reducirían el tiempo o el grado de infección, pero debido a la alta carga parasitaria es muy probable que no se eliminara la infección.

Actualmente, el programa clínico más avanzado para el desarrollo de una vacuna contra la malaria se fundamenta en la candi-

data RTS,S/AS01, que se encuentra en estudios de fase III.

La vacuna RTS,S/AS01

El desarrollo de RTS,S/AS01 y la realización de los ensayos clínicos han sido posibles gracias a la colaboración entre la Malaria Vaccine Initiative y GSK Biologicals (MVI-GSK), la Bill and Melinda Gates Foundation y varios centros hospitalarios, entre los que se encuentra el Hospital Clínic de Barcelona y el Centro de Investigación de Salud de Manhiça. La fase III del ensayo clínico se está realizando en 11 centros de siete países de África subsahariana.^{3,6,7}

La vacuna está diseñada para actuar en la fase preeritrocítica del ciclo de *P. falciparum*, es decir, frente a los esporozoitos libres y los hepatocitos infectados. La vacuna se dirige hacia la proteína del circumsporozoito (CS), que recubre los esporozoitos de *P. falciparum* y actúa como antígeno de la cepa NF54.⁷ La proteína CS posee varias secuencias repeti-

Tabla I. Proyectos de vacunas contra la malaria según fase de desarrollo.⁵

Especie de <i>Plasmodium</i>	Proyectos de viabilidad*		Proyectos traslacionales		Proyectos de candidatos	
	Evaluación de antígenos	Evaluación de sistemas de liberación	Preclínica	Fase I/IIA	Fase IIB	Fase III
<i>P. falciparum</i>	Seattle BioMed ^a	Inovio/UPenn ^a	Genova ^b	Crucell/GSK ^b		GSK (RTS,S/AS01) ^a
	NMRC ^a	Profectus ^a		Crucell ^b		
	NYU/Merck ^a	Emory ^a		NIAID ^c		
	WEHI/LaTrobe/WRAIR ^b	VRC/JHU Oncovit/IDRI ^a				
	WEHI/Genova ^b Tulane/Genova ^c JHU ^c					
<i>P. vivax</i>			ICGEB/MVDP ^a	WRAIR/GSK ^a		

*Sólo se detalla una selección de todos los proyectos actuales. En superíndice se muestra la fase del ciclo de *Plasmodium* spp. en que actúa la vacuna: preeritrocítica (a), eritrocítica (b) y bloqueo de la transmisión (c). Para más información sobre cada uno de los proyectos, consúltese la fuente original.

tivas que se han utilizado como diana de la vacuna.³ RTS,S/AS01 está formada por una partícula que contiene la molécula RTS,S y por el adyuvante AS01. La RTS,S es un antígeno recombinante expresado en *Saccharomyces cerevisiae*. El antígeno está formado por dos proteínas, la RTS y la S. La proteína RTS es un polipéptido híbrido formado por una parte de la proteína CS y el tándem de repeticiones central, en la cual su extremo carboxi-terminal está fusionado con la región amino-terminal del antígeno S del virus de la hepatitis B. La proteína S es el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, que GSK Biologicals usa en sus vacunas contra la hepatitis B. La proteína RTS se encuentra dentro de una partícula que también incluye una proteína S sin fusionar. Por otro lado, el adyuvante AS01 es una suspensión líquida de liposomas con dos inmunostimulantes, el 3-*O*-desacil-4-monofosforil lípido A y *Quillaja saponaria 21*. La combinación de la RTS,S y del AS01 permite que la vacuna produzca una fuerte reacción inmunitaria.^{3,8}

Durante las primeras fases del ensayo clínico se administró la vacuna RTS,S con dos sistemas adyuvantes, AS01 y AS02. A pesar de que los dos tienen un perfil de seguridad similar, se optó por usar el adyuvante AS01 debido a que producía una mayor respuesta inmunitaria frente al antígeno CS en la población infantil.⁸

Los estudios de fase I de seguridad e inmunogenicidad de la vacuna tuvieron lugar entre 2002 y 2003 en Gambia y Mozambique, con la participación de niños de 1 a 4 años de edad. Los buenos resultados de estos estudios permitieron avanzar en fases clínicas posteriores para demostrar la eficacia de la vacuna.

La fase II tuvo lugar en Mozambique, en un ensayo clínico que se realizó con dos cohortes formadas por población infantil de 1 a 4 años de edad y que duró 4 años. Con la primera cohorte, de población infantil de Manhica, se pudo evaluar la seguridad y la eficacia de la vacuna, y analizar su efecto en el ciclo de *P. falciparum*. Con la segunda cohorte, compuesta por población infantil de Ilha Josina, se pudo también evaluar la seguridad y

la eficacia de la vacuna, y analizar su efecto durante el proceso de infección. El primer año se realizaron las vacunaciones y el seguimiento sérico, y durante los 3 años siguientes se comprobó la protección de la vacuna frente a la malaria. Paralelamente también se realizaron estudios para determinar la eficacia de la vacuna en población infantil menor de 1 año.

La fase II también se completó con un estudio aleatorizado y doble ciego, un estudio aleatorizado y simple ciego, y un tercer estudio abierto. El primero de ellos se realizó durante 8 meses, entre 2003 y 2004. En él se administró la vacuna a la población infantil cada 30 días (RTS,S/AS02A o control), hasta un total de tres inyecciones por vía intramuscular. La cohorte 1 recibió la vacuna candidata o bien la vacuna control no placebo. En los niños mayores de 24 meses de la cohorte 1 se empleó como vacuna control la de la hepatitis B, mientras que en los menores de 24 meses se utilizaron como control la del neumococo y la de la gripe (*Haemophilus influenzae*). A continuación se extrajeron y analizaron muestras de sangre durante los siguientes 6 meses para evaluar la eficacia de la vacuna. La cohorte 2 recibió tratamiento antipalúdico entre la segunda y la tercera inyección con el fin de analizar si la vacuna reducía el número de nuevas infecciones por malaria.³ La nueva vacuna en desarrollo demostró ser tolerable y segura para la población infantil. Además, se mostró altamente inmunógena frente al antígeno CS y al antígeno de la hepatitis B. Por otro lado, la vacunación con la vacuna candidata disminuía en un 40% el riesgo de nuevas infecciones de *P. falciparum*, reducía un 30% el riesgo de sufrir nuevos episodios clínicos de malaria y además disminuía en un 58% el riesgo de sufrir nuevos episodios graves de malaria. Estos resultados se publicaron en *The Lancet*.⁹

En la actualidad, RTS,S/AS01 se encuentra en fase III de desarrollo clínico, y ha mostrado unos resultados preliminares muy favorables (Fig. 2) que se han publicado recientemente en *The New England Journal of Medicine*.⁷ El desarrollo de esta vacuna ha sido considerado uno de los principales hallazgos del año por la revista *Science*.¹⁰

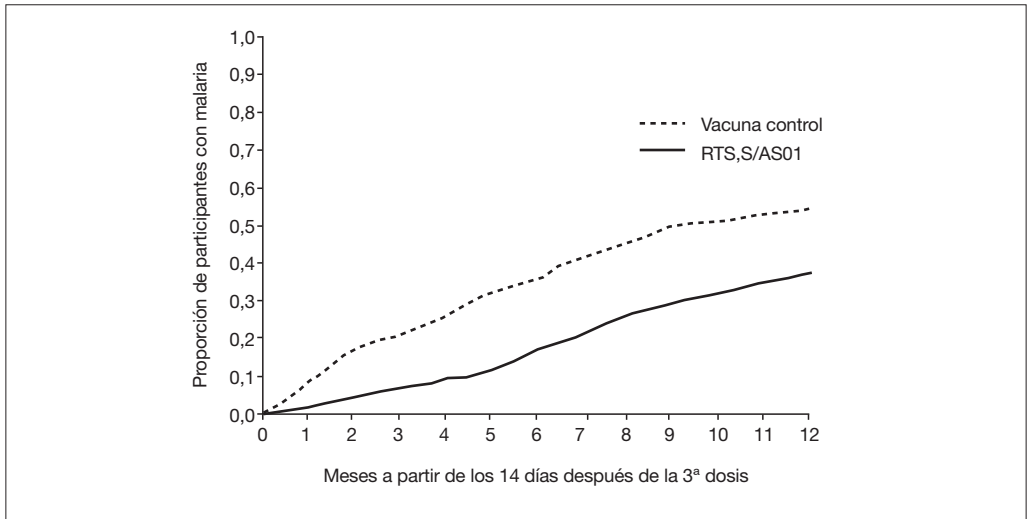


Figura 2. Incidencia acumulada del primero o único episodio de malaria en niños de 5 a 17 meses de edad durante los 12 meses siguientes a la tercera y última dosis de la vacunación.⁷

Conclusiones

El desarrollo de una vacuna eficaz contra la malaria es un proceso largo y costoso. Gracias a iniciativas y colaboraciones internacionales se ha avanzado extraordinariamente en una posible vacuna, que se encuentra en fase III de desarrollo clínico. A la eficacia y la seguridad de este compuesto en la población infantil de zonas endémicas de malaria cabe añadir sus resultados esperanzadores en las formas más graves de la enfermedad. La vacuna puede administrarse dentro del programa ampliado de vacunación establecido por la OMS.

Bibliografía

1. MedlinePlus [Internet]. Bethesda (USA): U.S. National Library of Medicine and National Institutes of Health; [actualizada 14 diciembre 2011]. Dugdale III DC, Vyas JM, Zieve D. Malaria; [actualizada 6 septiembre 2011; citada 19 diciembre 2011]. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000621.htm>
2. World Health Organization [Internet]. Geneva: WHO; [actualizada 2012]. World Malaria Report 2011; 13 diciembre 2011 [citada 4 mayo 2012]. Disponible en: http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/
3. Alonso PL. Malaria: deploying a candidate vaccine (RTS,S/AS02A) for an old scourge of humankind. *Int Microbiol.* 2006;9:83-93.
4. DPDx: Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern [Internet]. Atlanta (USA): Centers for Disease Control and Prevention (CDC); [actualizada 2010]. Parasite Image Library: Malaria; [actualizada 20 julio 2009; citada 19 diciembre 2011]. Disponible en: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Malaria_il.htm
5. MVI PATH [Internet]. Washington DC: PATH Malaria Vaccine Initiative; c1995. MVI Portfolio; [actualizada 2011; citada 19 diciembre 2011]. Disponible en: <http://www.malariavaccine.org/rd-portfolio.php>
6. MVI PATH [Internet]. Washington DC: PATH Malaria Vaccine Initiative; c1995 [actualizada 2011; citada 19 diciembre 2011]. Disponible en: <http://www.malariavaccine.org/>
7. The RTS,S Clinical Trials Partnership. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria

- vaccine in African children. *N Engl J Med.* 2011;365:1863-75.
8. GSK-MVI PATH. RTS,S/AS01 candidate malaria vaccine. Summary for the SAGE meeting [Internet]. Geneva: GSK-MVI PATH; October 2009 [citada 19 diciembre 2011]. Disponible en: http://www.who.int/immunization/sage/1_SAGE_RTSS_summary_final_Malaria.pdf
 9. Alonso PL, Sacaral J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, et al. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet.* 2004;364:1411-20.
 10. Breakthrough of the year. The runners-up. *Science.* 2011;334:1629-35.

DISCUSIÓN

A. CELADA: Me ha sorprendido que los anticuerpos sean protectores; es decir, se obtiene suero de la sangre y éste puede proteger a los niños. En tal caso, ¿por qué es tan difícil obtener los antígenos? Yo recuerdo haber realizado estudios hace 25 años en los que se demostraba la capacidad opsonica de dichos anticuerpos.

P. ALONSO: Los estudios a que te refieres se llevaron a cabo en dos periodos diferentes. El primero se realizó en los años 1960 y el segundo en los años 1980. En este último se trataba a individuos infectados y se correlacionaba con la disminución de densidades parasitarias. Pero aún no se ha logrado aislar los anticuerpos ni los antígenos del parásito. El problema de la obtención de antígenos es el gran repertorio de ellos que presenta la infección por *Plasmodium* en sangre, en la cual hay una mezcla de estadios, y a su vez dentro de cada estadio hay varios antígenos. *Plasmodium* es un organismo mucho más complejo que un virus o una bacteria, y por ello a día de hoy aún no se han identificado sus antígenos.

A. CELADA: Pero se han obtenido 400 o 500 anticuerpos CD contra constituyentes de los leucocitos humanos. ¿Por qué no pueden conseguirse CD contra los integrantes de *Plasmodium falciparum*? De hecho, había un proyecto que pretendía crear estos CD en Ginebra, pero los fondos del Banco Mundial se terminaron y el proyecto no siguió adelan-

te. ¿Sabes por qué nadie ha intentado seguir con esos experimentos?

P. ALONSO: Esos experimentos no se han vuelto a replicar. Sin embargo, gracias a los estudios que intentan describir la adquisición de la inmunidad natural, se ha intentado entender y caracterizar los anticuerpos, su relación frente a antígenos específicos y la disminución del riesgo de padecer malaria. A día de hoy, no puede afirmarse que la presencia de un antígeno determinado garantice la protección frente a la malaria.

N. PRATS: ¿Estáis probando la vacuna sólo en niños? ¿La vacuna es curativa, preventiva o ambas cosas?

P. ALONSO: La vacuna sólo se ensaya en niños porque, en primer lugar, el objetivo es prevenir la infección en el grupo de mayor riesgo y que padece las consecuencias más graves. En segundo lugar, dado que la única manera de medir la eficacia de la vacuna es a través de casos clínicos en un estudio aleatorizado, el grupo con mayor riesgo de infección y que posee más casos clínicos es el de los niños. Respondiendo a la segunda pregunta, la vacuna es preventiva, porque está dirigida a los estadios preeritrocíticos y pretende controlar la infección antes de que ésta llegue al estadio sexual. Además, tenemos algunas evidencias de que la vacuna es más eficaz frente a las formas más graves de la enfermedad, y ello puede deberse a una modifi-

cación de la patogenicidad de ese caso en concreto. Es posible que en estos casos más graves la vacuna no induzca una inmunidad esterilizante en todos los individuos. Puede que sí reduzca la dosis de esporozoitos que llegan al hígado y, por lo tanto, se reduzca la cantidad de merozoitos emergentes en el torrente sanguíneo. De esta forma, la curva de crecimiento de densidad de parásitos se entelece, tarda 2 días más en llegar al umbral y con ello se reduce la gravedad del episodio clínico.

F. LEÓN: Puede reemplazarse la serie blanca de un ratón con serie blanca humana, es decir, obtener un ratón humanizado, y también pueden trasplantarse hepatocitos humanos a un ratón. ¿Por qué no se ha obtenido un modelo humanizado de ratón para el estudio de la malaria?

P. ALONSO: Los investigadores de GlaxoSmith-Kline disponen de modelos de ratón humanizados para la evaluación de nuevos fármacos. Sin embargo, la corta vida de estos ratones limita su empleo como buen modelo para estudiar la adquisición de inmunidad.

M. JUAN: En primer lugar, cuando mencionas la inmunidad natural, ¿te refieres a la inmunidad adquirida de manera natural? Y en segundo lugar, cuando dices que pretendéis conseguir una protección del 80%, ¿creéis que este porcentaje será suficiente para alcanzar una protección poblacional?

P. ALONSO: Sí, cuando hablo de la inmunidad natural me refiero a la inmunidad adquirida de manera natural. Respecto a tu segunda pregunta, una protección del 80% produce cierta inmunidad de grupo, pero desde el punto de vista de la salud pública, una vacuna que consiga proteger al 80% de la población es el mínimo para poder complementar con éxito las demás iniciativas para prevenir la infección.

L. ÁLVAREZ-VALLINA: Teniendo en cuenta la dificultad de obtención y el desconocimiento de los epítomos y de las proteínas relevantes del parásito, ¿qué tecnología y herramientas se utilizan para ayudar a descifrar los antígenos relevantes?

P. ALONSO: Primero, es clave tratar de entender la adquisición de la inmunidad natural. En este sentido, hace unas semanas nuestro grupo publicó un estudio en *The New England Journal of Medicine*,¹ en el cual se atenuó la virulencia del parásito con cloroquina. Como los individuos habían adquirido una inmunidad eficaz, puede considerarse que ya hay un modelo en humanos. Tengo la impresión de que no se está invirtiendo mucho en desarrollar modelos animales, sino que es más prioritario tratar de entender la adquisición artificial o por exposición natural de la inmunidad en los humanos.

M. DEL VAL: ¿Qué condiciones sanitarias tienen los niños que se han seleccionado para la fase III de la vacuna? Me refiero a la cobertura de vacunación frente a otras enfermedades prevenibles con vacunas, la alimentación, la exposición a otras enfermedades que podrían afectar a la eficacia de la vacuna, pero que forman parte de su entorno natural, etc.

P. ALONSO: Hay que buscar un equilibrio entre la seguridad, la eficacia y la inmunogenicidad de la vacuna en una población real y no altamente seleccionada, y al mismo tiempo cumplir con los criterios mínimos de acceso a intervenciones sanitarias. En este caso, la población está poco seleccionada en cuanto a exclusiones, excepto si hay una malnutrición grave y alguna otra enfermedad crónica, entre las que el VIH no está incluido y no se analiza. En cuanto al grado de vacunación, es responsabilidad de los investigadores asegurar en todos los niños participantes que la vacunación sea la establecida por las

¹The RTS,S Clinical Trials Partnership. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med.* 2011;365:1863-75.

guías nacionales de cada país. Y en cuanto a la exposición a otras enfermedades, es alta, ya que la mortalidad en los menores

de 1 año es de 70 a 80 por 1000, es decir, muy alta, debido a la malaria, neumonías y diarreas.

Utilización de marcadores transcripcionales en el diagnóstico de la tolerancia al injerto hepático

A. Sánchez-Fueyo

Servei d'Hepatologia, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona
CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), España

Resumen: *La supervivencia a largo plazo de los pacientes sometidos a un aloinjerto requiere medicación inmunosupresora de por vida, con el consiguiente riesgo de sufrir infecciones, complicaciones metabólicas, neoplasias y toxicidad farmacológica. Por ello, resulta esencial minimizar el uso de fármacos inmunosupresores y desarrollar estrategias alternativas que permitan inducir y mantener la tolerancia al trasplante. En este sentido, el aloinjerto hepático constituye un órgano inmunológicamente aventajado, tal como indican su baja incidencia de rechazos agudos o crónicos y su resistencia a las agresiones inducidas por anticuerpos. En consecuencia, el trasplante hepático constituye un escenario ideal para considerar la posible reducción o retirada de la inmunosupresión en un número determinado de pacientes. Sin embargo, en la actualidad, la identificación de dichos pacientes constituye todavía un objetivo difícilmente alcanzable, debido a la insuficiente validación de posibles métodos inmunológicos que permitan evaluar la tolerancia específica frente al donante. En este contexto, el mantenimiento de por vida de los inmunosupresores representa todavía el enfoque terapéutico común para la mayoría de los pacientes receptores de un trasplante. A pesar de la inexistencia de marcadores fiables que permitan identificar los pacientes tolerantes, algunos estudios recientes han evidenciado determinados patrones transcripcionales de tejido hepático y sangre periférica específicos de pacientes tolerantes a un trasplante hepático. Estas diferencias en los patrones de expresión podrían constituir la base para una futura prueba diagnóstica de tolerancia.*

Palabras clave: Aloinjerto – Marcadores transcripcionales – Tolerancia – Trasplante hepático.

Introducción

La supervivencia del injerto a largo plazo generalmente requiere el empleo de fármacos inmunosupresores de por vida. Ello supone un aumento en el riesgo de infecciones, complicaciones metabólicas, neoplasias y toxicidad farmacológica.¹⁻⁴ Por ello es esencial minimizar el uso de estos fármacos y desarrollar estrategias alternativas para inducir y mantener la tolerancia.

El hígado es un órgano privilegiado desde el punto de vista inmunológico, y ello se ve re-

flejado en la ausencia de un efecto deletéreo a largo plazo sobre el injerto de los episodios de rechazo agudo y la baja incidencia de rechazo crónico. Por este motivo, el hígado constituye el escenario ideal para realizar estrategias de minimización o retirada de la inmunosupresión. En la actualidad no se dispone de herramientas que permitan identificar los pacientes que pueden beneficiarse de estas estrategias. Aquí se comentarán los estudios más relevantes que evalúan la utilidad de los marcadores genéticos en la identificación de este subgrupo de pacientes.

Tolerancia operacional

En aproximadamente un 20% de los receptores de un trasplante hepático, la función del injerto puede mantenerse de forma indefinida sin fármacos inmunosupresores. Este fenómeno se conoce como “tolerancia operacional” y es la prueba de que la tolerancia inmunitaria puede lograrse en los humanos (Tabla I).⁵⁻¹³ Estudios prospectivos publicados en forma de resumen sugieren que la prevalencia de tolerancia operacional podría ser más alta.^{14,15} Como ya se ha mencionado, todavía no se dispone de herramientas diagnósticas fidedignas para identificar los pacientes potencialmente tolerantes, y es por ello que la mayoría de los receptores de un trasplante hepático continúan siendo tratados con inmunosupresión de forma indefinida. Sin embargo, en los últimos años se han publicado numerosos estudios que evalúan estrategias para identificar los pacientes potencialmente tolerantes (Tabla II).¹⁶ Entre ellas, el uso de marcadores transcripcionales de expresión genética empleando chips genéticos (*microarrays*) o reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) es la más promisoría.

Biomarcadores transcripcionales de tolerancia operacional en muestras de sangre periférica

En 2007, Martínez-Llordella et al.¹⁷ publicaron el primer estudio que evaluó la utilidad de los marcadores de expresión genética en los pacientes receptores de un trasplante hepático. En este estudio se compararon 16 pacientes tolerantes con 16 no tolerantes (definidos como aquellos que desarrollaron rechazo agudo tras un intento de retirar la inmunosupresión; en el momento del estudio todos los episodios de rechazo estaban resueltos y los pacientes recibían tratamiento inmunosupresor a dosis bajas) mediante análisis de *microarrays* de oligonucleótidos (Affymetrix) en RNA obtenido de células mononucleares extraídas de sangre periférica. Se encontraron 628 genes expresados de manera diferente entre los dos grupos (462 sobreexpresados y 166 infraexpresados [*False Discovery Rate*, FDR, <1%]), 22 de los cuales fueron validados por RT-PCR. Entre ellos se encontraron genes que codifican para receptores de linfocitos T $\gamma\delta$ y *natural killer* (NK), y genes que participan en vías de señalización del receptor de interleu-

Tabla I. Tolerancia operacional en el trasplante hepático: experiencia con protocolos de retirada electiva de la inmunosupresión.

Año	Autores	n	Años desde el trasplante	Éxito	Rechazo agudo/crónico
1997	Mazariegos et al. ⁵	95	8,4 (1,7-25)	19%	26%/0
1998	Devlin et al. ⁶	18	6,5 (5-10)	16,7%	28%/5,6%
2005	Girlanda et al. ⁷	26	>2	23,8%	12%/0
2001	Takatsuki et al. ⁸	26	>0,5	5,6%	61%/0
2005	Eason et al. ⁹	18	>0,5	5,6%	61%/0
2005	Tryphonopoulos et al. ¹⁰	104	4	19%	67%/1,9%
2006	Tissone et al. ¹¹	34	5,3	23,4%	76,4%/0
2007	Assy et al. ¹²	26	4,6	8%	58%/0
2008	Pons et al. ¹³	21	5,2 (24-127)	38%	22%/0

Tabla II. Técnicas estudiadas para identificar pacientes tolerantes.

- Marcadores de expresión genética:
 - KLRF 1 y SLAMF7
 - Polimorfismos de TNF- α
 - Polimorfismos de IL-10
- Función de los linfocitos T:
 - CD4+ CD25+ Foxp3+
 - Células V δ 1+ T
 - V δ 1+ / V δ 2T
 - Células NK
 - Células CD154+
- Células dendríticas:
 - pDC/mDC
- Otras:
 - HLA-G soluble
 - Anticuerpos específicos de donante
 - IL-17
 - IL-23

cina 2, regulación de la transcripción, procesamiento de mRNA, síntesis de proteínas, reparación del DNA y control del ciclo celular. El perfil de expresión genética se vio influenciado de forma significativa por la presencia de infección por el virus de la hepatitis C, ya que estos pacientes (50% de los tolerantes y 75% de los no tolerantes) presentaron una sobreexpresión de genes proinflamatorios.

Posteriormente Kawasaki et al.¹⁸ realizaron un estudio similar comparando los perfiles de expresión genética en muestras obtenidas de células mononucleares extraídas de sangre periférica (Agilent cDNA *microarray*) de 11 pacientes tolerantes receptores de un trasplante hepático de donante vivo con 11 controles sanos. Se encontraron 717 genes expresados de manera diferente entre los dos grupos, muchos de los cuales participaban en respuestas inmunitarias. Diez genes fueron validados por PCR.

Un segundo estudio publicado por Martínez-Llordella et al.¹⁹ validó los resultados an-

tes mencionados en una cohorte más grande de pacientes. En este estudio se evaluaron 17 pacientes tolerantes y 21 no tolerantes. Tras realizar diferentes algoritmos predictivos se identificaron tres huellas genéticas con dos, seis y siete genes, respectivamente, capaces de predecir el estado de tolerancia con una alta precisión (tasa de error entre un 3% y un 6% en el grupo de estudio). Estos tres grupos de genes también permitieron clasificar correctamente a los pacientes como tolerantes o no tolerantes en una cohorte de validación independiente (tasa de error entre el 13% y el 17%). Asimismo, después de realizar análisis funcionales se encontró que algunas vías de señalización relacionadas con linfocitos T $\gamma\delta$ y células NK se asociaban de forma significativa con el estado de tolerancia. Estos genes están siendo validados en un estudio prospectivo multicéntrico europeo de retirada de inmunosupresión, en el cual las muestras de sangre se obtienen antes de iniciar la retirada.

Pons et al.¹³ evaluaron la expresión de *foxp3* (*forkhead box P3*; considerado el gen maestro de los linfocitos T reguladores) durante el proceso de retirada de la inmunosupresión en 12 receptores de trasplante hepático estables en tratamiento inmunosupresor con ciclosporina. Los autores encontraron un aumento de 3,5 veces en la expresión de mRNA de *foxp3* antes de la retirada completa del tratamiento inmunosupresor en los pacientes tolerantes. Este aumento en la expresión de *foxp3* se mantuvo después de retirar el tratamiento.

Biomarcadores transcripcionales de tolerancia operacional en muestras de tejido hepático

En un estudio realizado por Li et al.²⁰ se determinó la expresión de *foxp3* en el tejido hepático y se halló que estaba aumentada en los pacientes tolerantes cuando se compararon con pacientes estables o con rechazo crónico.

Más recientemente, Bohne et al.²¹ compararon el perfil de expresión genética (mediante Illumina, Affymetrix y TaqMan PCR) en

el tejido hepático de 28 pacientes tolerantes y 33 no tolerantes incluidos en un estudio prospectivo de retirada de inmunosupresión. Las muestras de tejido se obtuvieron antes de iniciar la retirada. Las diferencias entre tolerantes y no tolerantes fueron muy pequeñas, con sólo 21 genes expresados de diferente manera entre los dos grupos (FDR <5%). Las vías funcionales más relevantes representadas en estos genes estaban relacionadas con el metabolismo del hierro y la activación de las células T.

Conclusiones

La tolerancia operacional se ha reportado en aproximadamente un 20% de los receptores de un trasplante hepático, aunque podría ser más prevalente en periodos tardíos del trasplante. Aunque no hay marcadores fidedignos que identifiquen los pacientes tolerantes, algunos estudios han encontrado que éstos presentan un perfil de expresión genética, tanto en sangre periférica como en tejido hepático, que los diferencia de los no tolerantes. Los distintos patrones de expresión podrían constituir la base del desarrollo de un test de tolerancia.

Bibliografía

- Dantal J, Souillou JP. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med.* 2005;352:1371-3.
- Gonwa TA, Mai ML, Melton LB, Hays SR, Goldstein RM, Levy MF, et al. End-stage renal disease (ESRD) after orthotopic liver transplantation (OLT) using calcineurin-based immunotherapy: risk of development and treatment. *Transplantation.* 2001;72:1934-9.
- Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, et al. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature.* 1999;397:530-4.
- Romagnoli J, Citterio F, Violi P, Cadeddu F, Nanni G, Castagneto M. Post-transplant diabetes mellitus: a case-control analysis of the risk factors. *Transpl Int.* 2005;18:309-12.
- Mazariegos GV, Reyes J, Marino IR, Demetris AJ, Flynn B, Irish W, et al. Weaning of immunosuppression in liver transplant recipients. *Transplantation.* 1997;63:243-9.
- Devlin J, Doherty D, Thomson L, Wong T, Donaldson P, Portmann B, et al. Defining the outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Hepatology.* 1998;27:926-33.
- Girlanda R, Rela M, Williams R, O'Grady JG, Heaton ND. Long-term outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Transplant Proc.* 2005;37:1708-9.
- Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, Sakamoto S, Hayashi M, Ueda M, et al. Analysis of alloreactivity and intragraft cytokine profiles in living donor liver transplant recipients with graft acceptance. *Transpl Immunol.* 2001;8:279-86.
- Eason JD, Cohen AJ, Nair S, Alcantera T, Loss GE. Tolerance: is it worth the risk? *Transplantation.* 2005;79:1157-9.
- Tryphonopoulos P, Tzakis AG, Weppler D, Garcia-Morales R, Kato T, Madariaga JR, et al. The role of donor bone marrow infusions in withdrawal of immunosuppression in adult liver allotransplantation. *Am J Transplant.* 2005;5:608-13.
- Tisone G, Orlando G, Cardillo A, Palmieri G, Manzia TM, Baiocchi L, et al. Complete weaning off immunosuppression in HCV liver transplant recipients is feasible and favourably impacts on the progression of disease recurrence. *J Hepatol.* 2006;44:702-9.
- Assy N, Adams PC, Myers P, Simon V, Minuk GY, Wall W, et al. Randomized controlled trial of total immunosuppression withdrawal in liver transplant recipients: role of ursodeoxycholic acid. *Transplantation.* 2007;83:1571-6.
- Pons JA, Revilla-Nuin B, Baroja-Mazo A, Ramirez P, Martínez-Alarcón L, Sanchez-Bueno F, et al. FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. *Transplantation.* 2008;86:1370-8.
- Benitez C, Lozano JJ, Marínez-Llordella M. Use of transcriptional biomarkers to identify liver transplant recipients who can successfully discontinue immunosuppressive therapy. *Am J Transplant.* 2010;10(Suppl 4):abstr. 517.
- Feng S, Ekong U, Lobritto S. ITN029ST: immunosuppression withdrawal in pediatric recipients of parental living donor liver transplants:

- preliminary results of a pilot study. *Am J Transplant.* 2009;9(Suppl 2):abstr. 189.
16. Castellaneta A, Thomson AW, Nayyar N, De Vera M, Mazariegos GV. Monitoring the operationally tolerant liver allograft recipient. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15:28-34.
 17. Martínez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, et al. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant.* 2007;7:309-19.
 18. Kawasaki M, Iwasaki M, Koshiba T, Fujino M, Hara Y, Kitazawa Y, et al. Gene expression profile analysis of the peripheral blood mononuclear cells from tolerant living-donor liver transplant recipients. *Int Surg.* 2007;92:276-86.
 19. Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, Orlando G, Tisone G, Lerut J, et al. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest.* 2008;118:2845-57.
 20. Li Y, Zhao X, Cheng D, Haga H, Tsuruyama T, Wood K, et al. The presence of Foxp3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients. *Transplantation.* 2008;86:1837-43.
 21. Bohne F, Martínez-Llordella M, Lozano JJ, López M, Benítez C, Miquel R, et al. Transcriptional profiling of liver grafts in spontaneous operational tolerance. 2010. [Consultado en agosto de 2010.] Disponible en: <http://www.transplantation2010.org>.

DISCUSIÓN

A. GONZÁLEZ: Los progenitores hematopoyéticos, que se ha descrito que también se encuentran en el hígado, ¿podrían tener un papel en la tolerancia?

A. SÁNCHEZ-FUEYO: Se ha especulado mucho sobre si los leucocitos pasajeros presentes durante el trasplante de un injerto hepático tienen un papel en la tolerancia, pero no hay un consenso claro porque es muy difícil determinar si la presencia de células hematocríticas del donante es causa o efecto de la tolerancia. En este estudio hemos investigado los pacientes en quienes había disparidad entre el HLA2 y el antirreceptor, en los que podíamos cuantificar las células por citometría. Los resultados indican que hay una pequeña cantidad de células del donante en todos los pacientes, tanto tolerantes como no tolerantes. Pero no hemos profundizado en este aspecto del estudio.

L. GRAÇA: Una de las poblaciones celulares que parece asociada a este fenómeno son los linfocitos NK. ¿Habéis averiguado si los linfocitos NKT también están asociados y presentes?

A. SÁNCHEZ-FUEYO: De momento sólo hemos investigado el número de células y cómo han aumentado. Ahora estamos investigando con

más detalle el inmunofenotipo de estas células. En cuanto a los linfocitos NKT, no hemos encontrado diferencias en su número, pero tampoco hemos profundizado demasiado y los datos se basan en análisis muy básicos y cuantitativos.

J. ARAMBURU: Los pacientes son más tolerantes de manera espontánea. ¿Tienen más incidencia los fenómenos asociados con una pérdida de la función inmunitaria, que implica una mayor prevalencia a tumores? Es difícil porque han estado sometidos a una inmunodepresión. En otros casos, un sistema inmunitario muy robusto protege de la aparición de tumores, pero a su vez también se asocia a una mayor incidencia de autoinmunidad.

A. SÁNCHEZ-FUEYO: No se ha estudiado de manera estricta y es muy difícil hacerlo, porque en el estudio los pacientes se sometieron al trasplante muchos años antes. Es muy posible que el efecto sobre los tumores se mantenga durante mucho tiempo después de retirar el tratamiento. Por otro lado, sí se ha realizado un estudio con pacientes tolerantes renales a quienes se vacunó para observar el efecto de la vacunación y determinar si su respuesta era diferente a la de la población general inmunocompetente, y los resultados indican que no hay una inmu-

nosupresión general. Pero éste es el único estudio que se ha llevado a cabo.

A. CELADA: ¿En vuestro estudio se incluyeron pacientes con hemocromatosis? Estos pacientes son ideales porque no experimentan rechazo.

A. SÁNCHEZ-FUEYO: En nuestra serie de 102 pacientes no había individuos con hemocromatosis. De hecho, en España, la prevalencia de esta enfermedad es baja. En este caso, los pacientes tolerantes no tienen una sobrecarga de hierro sino que los que rechazan el trasplante padecen un déficit subclínico de hierro. El efecto de la sobrecarga de hierro tiene implicaciones muy diferentes, sobre todo en la virulencia de los microorganismos, e incluso hay evidencias discutibles de que los pacientes con hemocromatosis tienen más riesgo de padecer infecciones debido a la inmunosupresión sistémica que se produce.

F. RUIZ-CABELLO: ¿Habéis estudiado el papel de los linfocitos NK en los grupos de pacientes con incompatibilidad de HLA-C?

A. SÁNCHEZ-FUEYO: Nosotros no lo hemos analizado, pero sí lo evaluaron tres estudios sobre trasplante hepático. El objetivo de estos estudios era averiguar la incidencia del rechazo. El primero mostró un efecto sorprendentemente alto entre los genotipos HLA-C y KIR, el rechazo y la supervivencia del injerto. Pero en los dos estudios posteriores, con una muestra mayor, no se encontró ningún efecto. De todos modos, el objetivo de estos estudios es el rechazo, que difiere de nuestro objetivo, que es el éxito de la retirada del tratamiento inmunosupresor. Antes de incluir a nuestros pacientes en la estrategia de retirada y no retirada, los tolerantes y los no tolerantes son distinguibles, porque hemos excluido expresamente a aquellos con un alto riesgo de rechazo.

R. PUJOL: ¿Es cierto que los estudios que se realizaron hace algunos años en el Massa-

chusetts General Hospital sobre trasplante de hígado junto con trasplante de médula ósea no se han podido volver a reproducir, o que de vez en cuando dan muy malos resultados?

A. SÁNCHEZ-FUEYO: En realidad se da el segundo caso. Ya en el primer artículo que publicaron, uno de los cinco pacientes del estudio perdió el injerto de riñón que le trasplantaron, mientras que los otros cuatro sobrevivieron y mantuvieron la supervivencia prolongada del injerto sin inmunosupresión. La idea de los National Institutes of Health (NIH) era financiar un estudio con varios centros norteamericanos para replicar estos estudios. El Massachusetts General Hospital realizó más intervenciones de este tipo, pero con una incidencia muy alta de rechazo agudo, por lo que el programa se ha suspendido. No sabemos hasta qué punto esto obliga a modificar la estrategia o demuestra que no es válida, pero sí que ha sido un jarro de agua fría sobre la comunidad científica.

J. ARAMBURU: Hace unos cuantos años se realizaron estudios sobre el tratamiento de receptores de trasplantes con anticuerpos anti-CD28 para aquellos casos en que no existía compatibilidad de HLA y se intentaba evitar el rechazo. La idea de estos estudios era eliminar el bajo porcentaje de linfocitos aloreactivos, y los resultados iniciales fueron muy prometedores. ¿Sabes si estos estudios o esta idea se han continuado?

A. SÁNCHEZ-FUEYO: Resulta muy efectiva la coestimulación con CTLA4 en roedores, ya que una sola dosis de CTLA4-Ig 2 días después del trasplante induce tolerancia a los injertos cardíacos. El fármaco ya ha llegado a la clínica, y se usa para mantener la inmunosupresión (no para inducir tolerancia). En cuanto al trasplante renal, hay un estudio realizado por la Universidad de California en San Francisco y financiado por los NIH en el cual se combinan CTLA4-Ig y rapamicina. Esta última es muy tolerogénica en estudios preclínicos, aunque en clínica aún no está

muy claro. Los resultados del estudio fueron razonablemente buenos y se pudo reducir de manera considerable la dosis de rapamicina, pero los receptores rechazaron abandonar el fármaco por completo, y el estudio no pudo continuarse y no se demostró si había tolerancia. No está claro si el efecto en la clínica es tolerogénico o no. Además, hubo problemas de tromboembolias relacionadas con el uso de anti-CD40 ligando en monos. Todos estos hechos han dificultado que este tipo de fármacos llegue a emplearse en clínica.

L. GRAÇA: Parece muy difícil identificar un único biomarcador, y además los mejores biomarcadores son los que se usan en combinación con otros y nunca solos. La discriminación es posible gracias a la firma biológica generada por varios biomarcadores, como se ha descrito en el lupus. ¿Crees que esto es específico de este modelo o puede ser común para todas las enfermedades inmunitarias? Es decir, probablemente las tentativas

de identificar biomarcadores únicos fracasarán y se optará por identificar patrones de biomarcadores.

A. SÁNCHEZ-FUEYO: Creo que es probable que acabemos usando una combinación que incluya biomarcadores biológicos y clínicos. De hecho, si comparamos la capacidad predictiva de las variables clínicas (edad, tiempo, etc.) y de la expresión genética en sangre, son muy similares. Por lo tanto, una combinación de estos dos tipos de variables, que no son colineales sino independientes, podría ser muy útil. Además, cuando se realizan estudios con *microarrays* con muestras pequeñas, aunque se utilicen estrategias de validación cruzada interna robustas y cohortes independientes, siempre se corre el riesgo de que el algoritmo tienda a encontrar los genes que mejor describen la cohorte. Por ello, creo que es un tema interesante, pero obliga a realizar estudios de validación con muchos pacientes.

Debate general

A. CELADA: Uno de los mayores avances dentro de la inmunoterapia será conseguir un sistema que identifique el tratamiento más adecuado para cada paciente. La terapia a la carta es necesaria debido a que la genética de cada individuo es muy variada, y por lo tanto también nuestra respuesta inmunitaria frente a una misma infección.

M. JUAN: El tratamiento personalizado es el objetivo central de la investigación en inmunología. El sistema inmunitario existe, y es diverso, no porque vaya bien para un solo individuo, sino porque es beneficioso para toda la población y asegura su supervivencia.

R. PUJOL: Un buen ejemplo de cómo deben realizarse los tratamientos personalizados podría ser el abordaje del grupo de Virginia Pascual, en Texas. Encontraron los biomarcadores del lupus mediante estudios de transcriptómica y proteómica con sangre periférica y utilizando sistemas de alto rendimiento. Aunque encontraron información bastante obvia que podía haberse predicho, también identificaron un primer grupo de pacientes. Este tipo de avances son muy importantes para la terapéutica, ya que permiten el diseño de tratamientos. Con este ejemplo me gustaría ilustrar que la búsqueda de biomarcadores es compleja y difícil, pero el uso adecuado de este tipo de herramientas será muy beneficioso.

A. RIBAS: Pero tampoco podemos simplificar las cosas. No es justo considerar que una terapia celular pueda tener un único biomarcador para poder seleccionar sólo a los pacientes que responderán positivamente al tratamiento. Un ejemplo es el bloqueo de

CTLA4, al que nada más responden un 10% a 15% de los pacientes. Por otro lado, si pensamos de una forma un poco crítica, hay miles de genes implicados durante el proceso de bloqueo de CTLA4, es decir, desde que se administra el anticuerpo monoclonal que bloquea CTLA4 hasta que el linfocito elimina el tumor y se genera una respuesta duradera. El razonamiento de que un tratamiento solamente es válido si posee un biomarcador no es adecuado. En primer lugar, debemos entender la actividad antitumoral y la biología celular de la enfermedad. En segundo lugar, deberíamos intentar averiguar todas sus complejidades. Tenemos muchas más posibilidades de encontrar y validar marcadores de resistencia que marcadores de actividad. El marcador de actividad es más difícil de conseguir que el marcador de resistencia. El sistema inmunitario debe estudiarse en función de su contexto.

F. LEÓN: El problema de intentar un nuevo tratamiento sin pensar en los biomarcadores, sobre todo en autoinmunidad, es que el efecto placebo es tan grande que un beneficio en un 10% a 20% de los pacientes pasa desapercibido; no se identifican porque no se alcanza suficiente significación estadística.

A. RIBAS: Otro aspecto que nos preocupa es el coste, pero hay que tener en cuenta que un tratamiento efectivo es más barato que una serie de tratamientos inefectivos. Resulta complejo y caro producir anticuerpos monoclonales, conseguir terapias celulares, etc. Además, la mayor parte del coste del tratamiento de los pacientes con cáncer corresponde a la fase terminal. Por ello, desde

el punto de vista de la valoración del coste-eficacia, si gastamos para alargar un poco la vida de un paciente terminal, el coste del tratamiento puede resultar mayor.

J. PIULATS: Como una de las áreas relacionadas con la inmunología, se ha discutido el tratamiento de las alergias. Mi impresión es que la alergia ha sido el patito feo de la inmunología, y que no se ha profundizado lo suficiente en su conocimiento. En este sentido, ¿consideráis que no se ha abordado por tratarse de un tema muy complejo desde el punto de vista científico o bien porque no da prestigio profesional?

C. JUÁREZ: Históricamente la alergia ha sido una de las últimas enfermedades en incorporarse al ámbito de estudio de la inmunología, porque sus mecanismos de funcionamiento y respuesta se han descubierto en fechas más recientes. En los últimos 10 años se ha producido una explosión de conocimientos en el campo de la alergia, en el cual el descubrimiento de los mecanismos básicos de regulación que llevan a la producción de inmunoglobulinas, la identificación molecular de epítomos alergénicos, etc., y otros elementos de la alergia, han sido cada vez mayores. Sin embargo, actualmente se conocen la mayoría de sus mecanismos, con la excepción tal vez del asma. Y es por ello que ahora la alergia se ha convertido en un área preferencial dentro de la inmunología.

F. LEÓN: Enlazando con la alergia, me gustaría añadir que es muy difícil realizar ensayos clínicos sobre ella, y ésta es una de las causas que frena el avance en los conocimientos científicos sobre esta enfermedad. Actualmente es imposible diseñar ensayos clínicos sobre alergias alimentarias, ya que no resultaría ético administrar un fármaco a 100 niños con alergia al cacahuete con el riesgo de poder inducir casos de muerte. Además, también surgirían problemas en ensayos de alergias respiratorias, como el asma, que dependen de una exposición ambiental a múltiples alérgenos no están carac-

terizados. Un ejemplo es el ensayo con unos fármacos muy eficaces en animales, que inhibían los receptores *toll-like 9* y conseguían prevenir la sensibilización alérgica. Cuando consiguieron pasar a fase III, el grupo placebo condujo al fracaso del ensayo debido a que la temporada fue muy seca y la exposición ambiental al polen fue insuficiente. Es indudable que hay tratamientos muy interesantes desde el punto de vista científico, pero hay muchos tratamientos prometedores que acaban fracasando por aspectos logísticos y otros no relacionados con los ensayos clínicos.

M. JUAN: Estoy de acuerdo con lo que habéis dicho, pero también creo que hay factores de sectorización en el nivel de estudio de nuevos tratamientos. Creo que la obtención de fármacos que paliaban los síntomas de la alergia y que minimizaban los cuadros clínicos más graves hizo que, al menos en investigación básica, los esfuerzos se centraran en otras enfermedades y tratamientos. Pero, por otro lado, para las empresas farmacéuticas, los tratamientos contra la alergia, como los antihistamínicos, son uno de los paradigmas de productos que han obtenido mayores beneficios.

N. PRATS: Desde mi punto de vista, dado que provengo de la industria farmacéutica, comparto las opiniones anteriores. Hasta hace 10 años se confiaba en los corticosteroides y en los broncodilatadores para tratar la alergia respiratoria; hoy, debido al mayor conocimiento de la enfermedad y de la biología del sistema inmunitario, estamos muy interesados en nuevos fármacos inmunomoduladores, de modo que se están explorando nuevas dianas terapéuticas y nuevos mecanismos relacionados con la inmunomodulación.

M. JUAN: Aprovecho para introducir otro elemento en el debate, que tiene que ver con que gran parte del desarrollo de las inmunoterapias está ligado al desarrollo biotecnológico. Durante las presentaciones hemos

visto procesos y metodologías que podrían usarse en el futuro, pero que para ello necesitan el soporte estructural de las empresas biotecnológicas. Por desgracia, en España hay relativamente pocas empresas biotecnológicas, por lo que el posible desarrollo en campos como el de la inmunología está limitado. A pesar de que en los últimos años la situación ha ido cambiando, en España tenemos un hándicap porque hay pocas empresas que puedan proporcionar soporte tecnológico a los grupos de investigación. Ésta es mi opinión, y no sé si será compartida. Tampoco sé si hay algún impedimento para que las empresas biotecnológicas puedan proporcionarnos ayuda.

L. ÁLVAREZ-VALLINA: En este país hay fondos públicos suficientes, tanto en el ámbito estatal como en el autonómico, que permiten desarrollar proyectos interesantes. Pero el problema es que el sector financiero privado aún no ha dado un paso adelante, por lo que en la actualidad hay muy pocos fondos de capital de riesgo especializados que tengan suficientes recursos para financiar proyectos con cierta competitividad. Creo que nuestra plataforma tecnológica debería poder competir con plataformas extranjeras. Nuestro grupo de investigación ha podido desarrollar el proyecto gracias a recursos públicos, y ahora estamos viendo que el sector financiero no tiene confianza en las inversiones de riesgo. Además, tampoco tenemos una industria local lo bastante poderosa como para confiar en nuestros proyectos. Según mi opinión, el sector financiero debería apostar por el desarrollo científico.

F. LEÓN: Existe una vía intermedia que tampoco se explota en España, pero sí en otros países. Las industrias farmacéuticas pueden crear un fondo de inversión para invertir en biotecnología a cambio de conseguir los derechos de exclusividad para explotar el producto o la tecnología que se desarrolla. El problema es que en España no hay suficiente cultura científica como para que se invierta en ciencia, pero las empresas farmacéuticas

sí saben que la ciencia es importante, por lo que ésta podría ser una vía intermedia.

P. FRANCO DE SARABIA: Estoy de acuerdo en que, en primer lugar, hay una falta de fondos, y también en que hay una brecha entre la industria y la ciencia. Hace unos años, determinados sectores científicos se oponían de forma contundente a comercializar la ciencia para que llegara al público. Pero afortunadamente los tiempos han cambiado. La vía de financiación que ha comentado el Dr. León me resultó muy útil para iniciar mi propio proyecto empresarial. Pero el problema de las industrias españolas es que no son muy poderosas y perciben excesivos riesgos en este tipo de inversiones. Ello puede reducirse gracias a los fondos públicos, pero el problema llega cuando hay que escalar el proyecto y la inversión, es decir, cuando se necesitan de tres a cinco millones de euros para continuar con el proyecto. Lamentablemente, en este país no hay entidades que quieran realizar inversiones tan importantes. Como alternativa, nosotros alcanzamos acuerdos con inversores mejicanos, turcos y árabes dispuestos a invertir en biotecnología española. Es preciso, sin embargo, darles la suficiente confianza para hacerles ver que en España podemos generar riqueza con nuestra tecnología.

A. CELADA: El objetivo de nuestro centro de investigación en el Parc Científic de Barcelona era que los investigadores pudiéramos interaccionar con las empresas. Sin embargo, en la actualidad no podemos decir que se haya conseguido aprovechar todo su potencial.

L. ÁLVAREZ-VALLINA: La verdad es que felicito a los que habéis conseguido tantos recursos con los tiempos que corren. Quizá también se trata de un tema de experiencia. Nuestro grupo de investigación se ha puesto en contacto con varios fondos de inversiones y me sorprende que la mayoría no disponen de consultores o asesores científicos para poder ver el alcance científico del proyecto, excep-

to en fondos muy especializados. Por eso, hablar con ellos a veces es difícil porque no entienden lo que les contamos. Otro factor que también puede influir en la capacidad de obtener financiación es la trayectoria profesional del científico y su prestigio. Mi experiencia en este sentido es complicada. Creo que nuestro proyecto está bien, pero nos está costando mucho obtener suficiente financiación. Me parece que conseguirla es algo heroico, ya que el inversor local quiere candidatos definidos en fase II y III.

P. FRANCO DE SARABIA: El desconocimiento de las fuentes de inversión no es un problema, ya que nadie espera que entiendan los aspectos científicos del proyecto, pero sí entienden de números y mercados. Si les habláis de mercados y de vuestro proyecto financiero, sí os entenderán. En relación con la experiencia y la trayectoria profesional, como en otros aspectos, se trata de una ley de finos equilibrios. En nuestro nuevo proyecto empresarial hay cuatro consejeros delegados de cuatro importantes industrias farmacéuticas. Sí que es verdad que los grupos de financiación nos reciben y tratan de manera diferente a otros grupos con menos experiencia.

R. VILELLA: Uno de los principales obstáculos que nos encontramos los grupos pequeños de investigación que trabajamos en hospitales, y sobre todo con terapias celulares, es la propia Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Cualquier manipulación en terapia celular, más allá de una centrifugación, se considera un medicamento y está sujeta a todas las restricciones y obligaciones de éstos, lo cual nos perjudica muchísimo porque alarga la duración de los proyectos financiados. Un ejemplo muy claro son los proyectos que aprobó la Dirección General de Terapias Avanzadas hace un par de años, que hoy día están prorrogados y la mayoría ni se han empezado; en realidad, pocos grupos han logrado empezar. Creo que sería importante conseguir una cierta flexibilidad que permitiera agilizar la ejecu-

ción de los procedimientos, tanto en grupos pequeños como en empresas.

R. PUJOL: Desde un punto de vista general, creo que ha sido muy difícil poner en marcha empresas de biotecnología en España, pero ya hay unas cuantas que han triunfado. Se ha creado, además, la Asociación Española de Bioempresas (ASEBIO). Creo que si las empresas de biotecnología hicieran pedagogía, y los sectores públicos aprendieran de ellas, no sería tan difícil encontrar financiación para realizar todos nuestros proyectos. En relación con las terapias celulares y la dificultad para llevarlas a cabo, creo que el problema es distinto. En este caso, están empezando a surgir movimientos, sobre todo en Estados Unidos, que cuestionan la medicamentación de la terapia celular y se pretende volver a considerarla como un procedimiento médico avanzado altamente regulado, pero no un medicamento. En la actualidad hay un rechazo a esta idea, incluso por parte de la población. Me gustaría saber vuestra opinión sobre esta medicamentación de la terapia celular.

A. RIBAS: Mi experiencia con la Food and Drug Administration ha sido enriquecedora. Cada vez que nos hemos dirigido a la agencia con un nuevo proyecto, nos han prestado ayuda a la hora de guiarnos durante la investigación. Un ejemplo de que una terapia celular puede ser viable comercialmente es el de Dendrion Corp. y Provenge. También es cierto que por cada ejemplo de éxito se producen innumerables fracasos. Antes el Dr. León nos decía que, a pesar de tener un medicamento efectivo, muchas veces los ensayos clínicos no dan los resultados esperados y el medicamento no sigue adelante. Creo que culpar a los reguladores no es una estrategia adecuada; hay que ser más lógicos. Este sistema de regulación nos ha permitido crear nuevas y mejores terapias, así como tratar mejor a los pacientes.

A. GONZÁLEZ: Me gustaría saber vuestra opinión sobre el eco que tuvo la noticia publicada en los medios de comunicación respecto a

la vacuna universal del Dr. Patarroyo. Según mi parecer, la comunidad científica que está trabajando en vacunas debería haber participado más activamente en la discusión, con una actitud crítica sobre la divulgación de este tipo de información que apareció en televisión, prensa escrita y radio.

M. JUAN: Entiendo que se trata de un ejemplo más de lo que ocurre en general con la información científica y el periodismo. Es decir, no todos los artículos científicos que aparecen en los medios reflejan verazmente los temas que abordan. Si bien parece que la situación está mejorando, es un problema común en el que seguramente los científicos también tenemos parte de culpa, ya que no sabemos comunicar ni interaccionar con la prensa de una manera correcta.

J. PIULATS: Precisamente este aspecto se planteó desde la Real Academia de Farmacia de Cataluña. Para poder reducir esta brecha, se ha creado una comisión formada por

diez académicos, que pretende recuperar el papel de consultor tanto para la opinión pública como para aquellos organismos o autoridades que lo soliciten. Y en caso de que no se pida, la comisión podría dar una opinión independiente a los medios de comunicación sobre un problema sanitario o farmacológico de nuestra incumbencia.

P. ALONSO: Hay muchos ejemplos del problema de la divulgación científica a través de los medios de comunicación. Si bien los periodistas científicos tienen una gran parte de responsabilidad, también creo que los científicos deberíamos estar más involucrados con la comunidad periodística.

A. CELADA: Indudablemente, los medios de comunicación tienen parte de culpa en los problemas que se han mencionado. Sin embargo, no deberíamos olvidar tampoco la gran responsabilidad que tiene la clase política al establecer estrategias que favorezcan la investigación en nuestro país.

Monografías Dr. Antonio Esteve publicadas

1. El hospital de día y su repercusión en terapéutica (1985).
2. Problemas que se plantean en el tratamiento de infecciones graves por *S. aureus* (1986).
3. Contribución del biólogo a la farmacología en España (1987).
4. Un glosario para farmacólogos (1987).
5. Aspectos biológicos de los síndromes depresivos (1988).
6. Bases del tratamiento de las intoxicaciones agudas (1988).
7. Investigación básica y medicina clínica (1988).
8. Tratamiento de datos en farmacología (1989).
9. Perspectivas terapéuticas en la esclerosis múltiple (1989).
10. Biotecnología de aplicación farmacéutica (1991).
11. Metodología del ensayo clínico (1991).
12. Periodismo científico. Un simposio internacional (1991).
13. El ensayo clínico como tarea cooperativa (1992).
14. Terapéutica y calidad de vida (1993).
15. Investigación sobre cáncer en España: de la biología molecular a la clínica (1994).
16. El tratamiento del dolor: del laboratorio a la clínica (1994).
17. Farmacología de los canales iónicos (1995).
18. Bases de datos en farmacología y terapéutica (1996).
19. Fármacos y conducción de vehículos (1996).
20. Traducción y lenguaje en medicina (1997).
21. Medicina y medios de comunicación. Traducción al español de una serie publicada en la revista *The Lancet* (1997).
22. Problemas y controversias en torno al ensayo clínico (1998).
23. Glosario de investigación clínica y epidemiológica (1998).
24. Transducción de señales como diana farmacológica (1999).
25. Investigación médico-farmacéutica en atención primaria. Una visión a través de las publicaciones de la REAP (1999).
26. Modelos experimentales de patología infecciosa (2000).
27. Diccionario de farmacología y temas afines (2000).
28. Educación sanitaria: información al paciente sobre los medicamentos (2000).
29. Aspectos conceptuales del ensayo clínico. Una revisión a través de artículos publicados en *Medicina Clínica* (1990-1999) (2000).
30. Ensayos clínicos en intervenciones no farmacológicas (2001).
31. Aspectos básicos y clínicos sobre la neurobiología de la adicción (2003).
32. La investigación en un entorno asistencial. Algunas reflexiones y ejemplos (2005).
33. La proyección social del medicamento (2007).
34. Aportaciones de los estudios funcionales a la investigación farmacológica básica (2008).
35. Atención al paciente oncológico desde la perspectiva de enfermería (2010).

