
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.

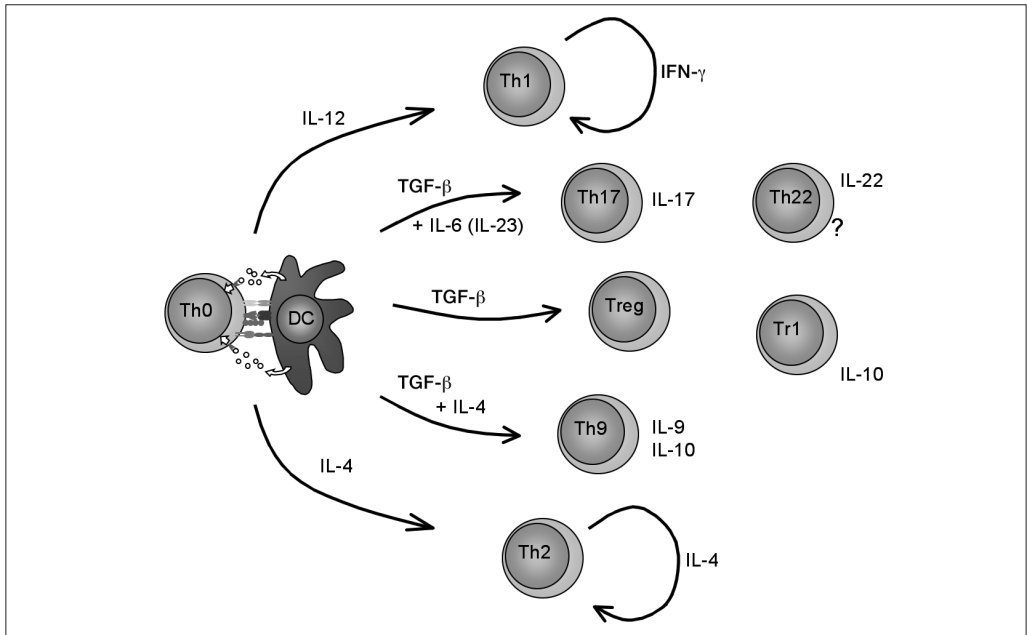


Figura 1. Diferentes subtipos de células T CD4+. La activación de las células CD4+ en presencia de citocinas diferentes afectará a la polarización de estas células en efectores de diferentes subtipos.

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-

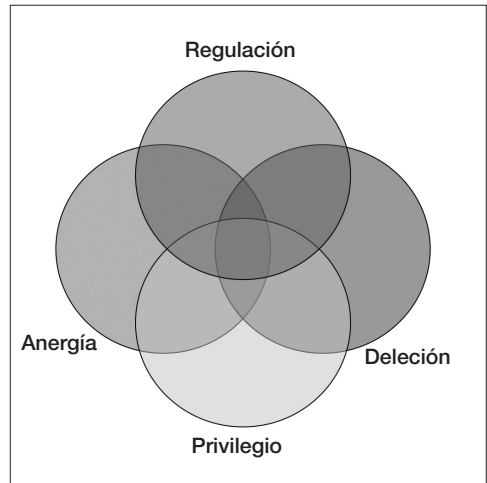


Figura 2. Los diferentes mecanismos de inducción de tolerancia inmunitaria actúan de manera complementaria. En diferentes localizaciones anatómicas (como la placenta, el intestino o la piel), algunos de estos mecanismos son más importantes. También en distintas situaciones (por ejemplo, en presencia 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.