

VACUNAS DE ADN EN EL TRATAMIENTO DE LA ALERGIA

A. Jurado, M^o.J. Herrero

Laboratorio de Inmunología. Hospital Universitario de Tenerife

Uno de los grandes triunfos de la ciencia médica del siglo XX, ha sido el desarrollo y uso de vacunas contra una gran variedad de agentes infecciosos. No obstante, a pesar de estos éxitos, todavía no se dispone de una vacuna efectiva contra numerosos patógenos, como el virus de la inmunodeficiencia humana, y los agentes de la malaria y la tuberculosis.

Unos de los impedimentos para una vacunación exitosa contra estos patógenos es que requieren la participación de la inmunidad celular. En este sentido, aunque todas las vacunas existentes en el mercado son capaces de producir una respuesta de anticuerpos, sólo las vacunas que contienen microorganismos vivos atenuados, son capaces de generar eficientemente una respuesta inmune celular (y como es lógico el uso de estas vacunas debe evitarse por razones de seguridad).

Las vacunas tradicionales se diseñaron para prevenir la infección. Tras un letargo de años, en los que parecía que todo en vacunas estaba hecho, la aparición de nuevas enfermedades (como la infección por el VIH), o el conocimiento de nuevos patógenos (como el virus de la hepatitis C), ha generado un creciente interés por la investigación en el campo de las vacunas, pero ahora como «arma terapéutica», es decir, administradas una vez que la infección se ha establecido. Estas vacunas están diseñadas para mejorar una respuesta inmune que es inadecuada, particularmente en el caso de enfermedades crónicas y recurrentes.

Este nuevo concepto de vacuna explora su utilidad más allá de las enfermedades transmisibles, y busca su aplicación en el cáncer, las enfermedades autoinmunes y en la alergia.

Vacunas de ADN

Pocas áreas de experimentación en vacunación, se han desarrollado tan explosivamente como las vacunas de ADN (también llamadas de ADN desnudo).

Este último descubrimiento en el campo de la vacunación fue una sorpresa, incluso para los científicos que desarrollaron inicialmente el método.

La historia se remonta a 1990 cuando Wolff y col. (1) demostraron que la inoculación de ADN plasmídico directamente (desnudo) en el músculo, inducía la expresión en el miocito de la proteína codificada por el ADN inoculado. Posteriormente, Ulmer y col. (2) insertaron el gen de la hemaglutinina del virus de la gripe en un plásmido, inocularon el plásmido modificado en un ratón, desarrollando este una respuesta inmune humoral y celular que le protegía de la infección por el virus de la gripe.

Tras la expectación inicial surgieron las cuestiones lógicas:

- ¿Se expresa el ADN del plásmido en las células musculares?
- ¿Tienen los miocitos capacidad para presentar fragmentos peptídicos al Sistema Inmune?
- ¿Por qué se produce una estimulación tan fuerte del Sistema Inmune?

En los últimos años, las vacunas de ADN han constituido un campo de experimentación intensiva que ha permitido responder a algunas de estas cuestiones. No obstante, antes de proseguir con esta revisión, es necesario hacer un breve recordatorio de cómo se desarrolla la respuesta inmune frente a los distintos patógenos del medio y cuáles son las principales células implicadas.

Para que los antígenos procedentes de un microorganismo patógeno desencadenen una respuesta inmune tienen que ser correctamente presentados a los linfocitos. A efectos de presentación antigénica se pueden distinguir dos compartimentos intracelulares: el citosol y el sistema vesicular (retículo endoplásmico, Golgi, endosomas, lisosomas...); el sistema vesicular se considera una extensión del medio extracelular.

¿Cómo ocurre la presentación de los antígenos del patógeno a las células del sistema inmune?:

- En el caso de antígenos procedentes de proteínas generadas en el citosol (principalmente derivadas de virus y algunas bacterias que se replican en el citosol), son fragmentados en péptidos más pequeños y transportados al retículo endoplásmico donde se unen a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de Clase I, que se están sintetizando en este momento, y junto a estas, exportados a la membrana. El complejo MHC-péptido es reconocido por el receptor (TcR) de los linfocitos T CD8 naive. Pero para que estos se activen es necesaria además una segunda señal (señal coestimuladora) que proporcionan células presentadoras de antígeno (APC) profesionales.
- Los antígenos procedentes de proteínas extracelulares (bacterias y toxinas) que son endocitadas, o de patógenos que crecen en vesículas intracelulares (como es el caso de parásitos y algunas bacterias), ya sea por una u otra vía llegan al compartimento vesicular, aquí son acidificados y degradados a péptidos más

pequeños, se unen a moléculas MHC de Clase II (que emergen a la superficie procedentes del retículo endoplásmico) y son transportados a la superficie celular. El complejo MHC-péptido es reconocido por el TcR de linfocitos CD4. Pero como en el caso anterior, para que estos se activen es necesario una segunda señal coestimuladora procedente de células presentadoras de antígeno profesionales (APC). Dependiendo entre otros factores del tipo de patógeno y del microambiente de citoquinas, los linfocitos CD4 se subdividen a su vez en los subtipos funcionales Th1 y Th2 (3).

- Una vez activado, cuando el linfocito T se ponga en contacto nuevamente con el antígeno, será capaz de realizar sus funciones efectoras. Los linfocitos T CD8 producen la lisis de la célula infectada; los linfocitos T CD4 con fenotipo Th1, sintetizan citoquinas proinflamatorias que activan la maquinaria oxidativa de células como los macrófagos, destruyendo de este modo patógenos que crecen en el compartimento intravesical; los linfocitos T CD4 de fenotipo Th2, sintetizan citoquinas que cooperan con los linfocitos B en la producción de anticuerpos contra el microorganismo patógeno (3).

Volviendo a las vacunas de ADN ¿cuáles son los mecanismos responsables de la activación de las células T tras la inmunización con ADN? ¿cómo se expresa y cómo se presenta el antígeno a las células T?

Podría haber al menos tres mecanismos teóricos por los que un antígeno codificado por un plásmido de ADN, fuese procesado y presentado a los linfocitos T.

- Presentación directa por parte de las células somáticas.
- Presentación directa por parte de células presentadoras de antígeno profesionales (APC).
- Presentación cruzada en la que el plásmido de ADN transfecta una célula somática, esta secreta la proteína que es posteriormente fagocitada, procesada y presentada por una APC.

1) Presentación directa por parte de las células somáticas: las células somáticas son las células transfectadas mayoritariamente. En este primer supuesto, aunque pueden expresar la proteína e incluso presentarla en moléculas MHC de clase I, son incapaces de dar la señal coestimuladora (puesto que, como se señaló con anterioridad, la señal coestimuladora sólo pueden darla células presentadoras de antígeno).

2) Presentación directa por parte de células presentadoras de antígeno profesionales: las células dendríticas (APC profesionales) pueden ser transfectadas directamente (aunque en pequeño porcentaje, menos del 0,4% de todas) y parece que son las responsables de la inducción de la respuesta inmune tras la vacunación con ADN. Las APC transfectadas directamente, son capaces de presentar la proteína recién sintetizada en el citosol, junto a moléculas de clase I a los linfocitos T CD8. Además la proteína sis-

tetizada es secretada, fagocitada y presentada en el contexto de moléculas MHC de clase II, primando a los linfocitos CD4.

3) Presentación cruzada (cross priming): el plásmido de ADN trasfecta una célula somática y esta secreta la proteína que es captada por una APC profesional y presentada a una célula T. Como se vió anteriormente, las proteínas exógenas que entran en el compartimento vesicular (fagocitadas), son procesadas y presentadas a linfocitos T CD4 en el contexto de moléculas MHC de Clase II. Por su parte, las proteínas endógenas, sintetizadas en el compartimento citosólico, son procesadas y presentadas a linfocitos T CD8 en el contexto de moléculas MHC de Clase I. El concepto de cross-priming reside en que proteínas exógenas son fagocitadas por las APC y presentadas por moléculas MHC de Clase II; pero algunas de estas proteínas pueden alcanzar el citosol y ser presentadas por moléculas MHC de Clase I.

En resumen, la evidencia actual sugiere que serán células presentadoras profesionales transfectadas, y no células somáticas transfectadas, las responsables de inducir una respuesta inmune tras la vacunación con ADN.

Las células somáticas (miocitos) son las que mayoritariamente se transfectan tras la inserción del plásmido; estas células podrían servir como reservorio del antígeno. Así, las células somáticas pueden ser importantes en la inducción de una respuesta inmune vía cross-priming y pueden también jugar un papel en el aumento o el mantenimiento de la respuesta inmune (4).

Papel del ADN bacteriano

La cantidad de ADN inoculada en las vacunas es del orden de pico a nanogramos; esto implica que la cantidad de proteína sintetizada es igualmente pequeña. En estas condiciones cabría preguntarse ¿cómo se produce un estímulo tan fuerte del sistema inmune?, ¿qué tiene el ADN plasmídico para producir una respuesta de esta intensidad?

Las primeras observaciones acerca de la capacidad de los extractos bacterianos para estimular el Sistema Inmune y causar la remisión de tumores se remontan a más de 100 años. Willian Coley trató a unos 900 pacientes afectados de neoplasias malignas con lisados bacterianos conocidos como toxina de Coley. Con estos lisados conseguía una tasa de remisión de hasta un 40% (5).

Actualmente, la aparición de las vacunas de ADN ha renovado el interés por los extractos bacterianos como estimuladores del Sistema Inmune. ¿qué tienen los extractos bacterianos y en concreto el ADN bacteriano para ejercer esta estimulación?

Estudios comparativos entre el ADN bacteriano y el ADN de vertebrados, muestran que este último tiene aproximadamente un cuarto de residuos CpG (dinucleótidos de citosina-guanina en cierto contexto de bases) menos de lo que cabría esperar, y que además estos residuos están metilados en un 80%. El ADN bacteriano tiene más mo-

tivos CpG y estos no están metilados (con lo cual el ADN bacteriano tiene 20 veces más residuos CpG no metilados que el ADN de vertebrados). Además, si al ADN bacteriano le quitamos los residuos CpG o los metilamos, pierde su capacidad inmunoestimulante.

En definitiva, los datos actuales permiten afirmar que el ADN bacteriano puede desencadenar e instruir una respuesta inmune, y esta capacidad reside en los residuos CpG (es decir, son el patrón molecular dentro del ADN bacteriano capaz de activar el Sistema Inmune) (6).

Inmunidad innata

Hoy día está ampliamente aceptado que los motivos CpG funcionan como ligandos de uno o más “receptores para el reconocimiento de patrones” (PRR) del sistema inmune innato. Otros ligandos de estos receptores son la endotoxina, las proteínas con alto contenido en manosa y ciertos ARN de doble cadena.

Los residuos CpG actúan sobre las APC profesionales, principalmente sobre las células dendríticas pero también sobre macrófagos y monocitos, e inducen en estos la expresión de moléculas MHC de clase II, la molécula B7 (señal coestimuladora) la síntesis de IL-12, IFN- α y TNF- α . Estas tres últimas citoquinas actúan sobre las células natural killers (NK) induciendo la expresión de IFN- γ . Además los residuos CpG actúan directamente sobre las células NK induciendo igualmente la síntesis de IFN- γ .

Respuesta inmune adquirida

Sobre los linfocitos B, los residuos CpG determinan la síntesis de IL-6 e IL-10, inducen un estado de proliferación y resistencia a la apoptosis que contribuye a la generación de una respuesta inmune mantenida y además, como APC (los linfocitos B son células presentadoras de antígeno profesionales) aumenta la expresión de moléculas MHC de Clase II y de moléculas B7.

Sobre los linfocitos T, los motivos CpG actúan de un modo indirecto:

Por un lado, su efecto sobre las células APC crea un microambiente de citoquinas Th-1 like. En este microambiente un linfocito CD4 naive se diferencia preferentemente con un fenotipo Th1 (fenotipo proinflamatorio). Los linfocitos Th1 a su vez sintetizan IFN- γ , al igual que lo hacen las células NK por el efecto de los CpG, redundando aún más en la potencia del microambiente Th1.

La generación de una respuesta inmune Th1 es una propiedad general (y la más utilizada hasta el momento) de las vacunas de ADN.

Los residuos CpG son un potente adyuvante Th1; de hecho, son más efectivos que el adyuvante completo de Freund. Un estudio comparativo entre 19 adyuvantes demostró que el más fuerte en producir una respuesta Th1 contra antígenos tumorales

fueron los residuos CpG. Además, como veremos más adelante, este efecto Th1 de los motivos CpG puede utilizarse para reconducir una respuesta Th2 preexistente.

Con respecto a los linfocitos CD8 citotóxicos, la transfección directa de células presentadoras promueve la producción de antígenos en el citosol, y por tanto su presentación en moléculas de clase I a linfocitos CD8. Pero además, los residuos CpG promueven el "cross-priming", es decir, la vehiculación de antígenos del compartimento intravesicular al citosol, y la presentación por moléculas de clase I a linfocitos CD8. La capacidad para generar una respuesta citotóxica es otra de las mayores ventajas de las vacunas de ADN (6).

Implicaciones prácticas

¿Cómo pueden ser utilizadas las vacunas de ADN en la clínica?

Las aplicaciones prácticas están en relación con las propiedades antes mencionadas.

La capacidad de generar una respuesta CD8 citotóxica es especialmente importante en el caso de infecciones por virus, ya que las vacunas proteicas convencionales no son capaces de producir una respuesta de linfocitos citotóxicos. Las únicas vacunas capaces hasta ahora de conseguirlo son las vacunas que incorporan microorganismos vivos (ya que estos sí tienen capacidad de replicarse en el citosol) con los consiguientes problemas de inocuidad que generan.

La capacidad de las vacunas de ADN de inducir una respuesta de linfocitos CD4 con fenotipo proinflamatorio (Th1) es útil para prevenir o tratar infecciones por patógenos que crecen en vesículas intracelulares. Así se han utilizado con éxito en diferentes modelos animales, en los que la respuesta Th1 confiere protección, como la tuberculosis y la leishmaniasis.

Adicionalmente, una respuesta Th1 puede prevenir o limitar una respuesta Th2 en curso, como sería el caso de la respuesta inmune no deseada que ocurre en las enfermedades alérgicas.

Alergia

Como sabemos, la respuesta inmune adaptativa es un componente crítico en la defensa frente a las infecciones, pero también tiene su contrapartida indeseable, ya que en muchos casos es capaz de provocar lesiones al huésped. Además en ciertos individuos, esta respuesta inmune inadecuada constituye el mecanismo primario de lesión, al ir dirigida contra sustancias por lo general inocuas; este sería el caso de la alergia. En individuos sanos, la respuesta primaria frente a cualquier antígeno es de tipo IgM, y en la respuesta secundaria, tras el cambio de clase, es de tipo IgG. Los individuos alérgicos sin embargo, tienen una predisposición a formar anticuerpos de tipo IgE en la respuesta secundaria y posteriores frente a algunos antígenos (alérgenos).

Las razones por las que algunos individuos desarrollan este tipo de respuesta son poco conocidas. Parece que tanto factores genéticos como ambientales interaccionan desencadenando la producción de IL-4 que resulta en el desarrollo de linfocitos CD4 de fenotipo Th2. Estos Th2 activados sintetizan citoquinas como la IL-4, IL-5 e IL-13, que a su vez determinan la síntesis de IgE por los linfocitos B. Así pues, el fenotipo de los linfocitos CD4 en la respuesta alérgica es claramente Th2.

La incidencia de las enfermedades alérgicas, en particular del asma, ha aumentado en los países desarrollados (donde puede afectar al 20-30% de la población) con respecto a los subdesarrollados.

Para explicar esta evidencia se ha recurrido a tres tipos de hipótesis.

La primera, la genética, trataría de explicar estas diferencias aludiendo a diferencias genéticas entre países desarrollados y los no desarrollados. Sin embargo esta hipótesis no explicaría las diferentes tasas de alérgicos entre países con el mismo «background» genético, como las antiguas dos Alemanias.

La segunda hipótesis, relaciona la alergia con la teórica mayor polución en los países desarrollados. Como en el caso anterior, esta explicación topa con la evidencia de que la tasa de alergia es menor en regiones con mucha polución, como Polonia y Alemania Oriental, que en regiones menos polucionadas como Suecia y Alemania Occidental.

Por último, la tercera hipótesis, se basa en la observación de que el incremento de la alergia en los países desarrollados es inversamente proporcional a la frecuencia de las enfermedades infecciosas.

¿Cómo pueden influir las enfermedades infecciosas en el desarrollo de la alergia?

Es sabido que uno de los factores que determinan el fenotipo Th1 vs. Th2, que adquieren los linfocitos CD4, son las citoquinas del medio ambiente. Enfermedades como el sarampión, la tosferina, la gripe o la tuberculosis, inducen una respuesta Th1 que favorece un microambiente rico en interferón γ ; por otra parte, las citoquinas producidas por los subtipos Th1/Th2, tienen la capacidad de retro-regular positivamente al fenotipo que las produjo y negativamente al fenotipo contrario, es decir, el interferón γ disminuye una respuesta de linfocitos Th2. Una posibilidad interesante podría ser que el microambiente Th1 favorecido por las enfermedades infecciosas, impidiera el desarrollo de las células Th2 alérgicas (7).

Una de las aplicaciones en las que más se ha investigado en el campo de las vacunas de ADN, consiste en aprovechar la capacidad de estas como inductoras de una respuesta Th1, para prevenir una respuesta Th2 en curso, tal como ocurre en las enfermedades alérgicas.

En este sentido, Raz y col. (8) desarrollaron un experimento en el que en una primera fase inmunizaban un grupo de ratones con β -galactosidasa (como antígeno) unida a un adyuvante como el «alum», generándose una respuesta contra la β -galactosidasa con anticuerpos tipo IgG1, IgE e interleuquina 4 (respuesta Th2). Otro grupo de ratones fue vacunado con un plásmido bacteriano conteniendo el gen de la β -galactosidasa

generandose en este caso anticuerpos IgG2a e Interferón γ (respuesta Th1). En una segunda fase del experimento se inmunizó el primer grupo de ratones con el plásmido conteniendo el gen de la b-galactosidasa y el segundo grupo de ratones con b-galactosidasa más «alum». En el primer grupo se observó que disminuía la producción de IgE previa y se produjo un aumento de IgG2a, mientras que el segundo no produjo IgE.

Estos datos parecen indicar que la vacunación génica (plásmido más gen de la β -galactosidasa) induce una respuesta Th1 capaz de controlar una respuesta Th2 preexistente, disminuyendo la formación de anticuerpos IgE.

En otro trabajo, el mismo grupo de autores (9) evaluó la efectividad de las vacunas de ADN en la prevención de la reacción anafiláctica en un modelo murino. En este experimento se inmunizó un grupo de ratones con un plásmido conteniendo el gen de la β -galactosidasa o con la proteína β -galactosidasa unida a ODN (secuencias de oligodesoxinucleótidos con capacidad inmuno estimulante, equivalentes a los residuos CpG que contiene el ADN bacteriano) y un segundo grupo no se trató. En la siguiente fase del experimento, todos los ratones fueron sensibilizados con β -galactosidasa más «alum» más «pertussi» (adyuvantes para aumentar la eficacia de la sensibilización). En un tercer paso les fue inyectada la β -galactosidasa intravenosa con el objeto de producir una reacción anafiláctica. Los ratones que habían sido previamente tratados, tanto con el plásmido como con los residuos ODN, disminuyeron a un 67% y 58% respectivamente el riesgo de muerte por reacción anafiláctica, frente al 100% de los no tratados. La conclusión de este trabajo es que tanto las vacunas de ADN como la coestimulación con proteína unida a residuos ODN, son efectivas para atenuar la reacción anafiláctica en ratones sensibilizados.

En conjunto, estos y otros trabajos desarrollados en los últimos años, inciden en un nuevo concepto de inmunoterapia para el asma, en el que la potente respuesta Th1 inducida por las vacunas de ADN (ADN bacteriano) es capaz de desviar la respuesta Th2 preexistente.

Bibliografía

1. Wolff JA, Malone RW, Willians P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo*. Science 1990; 247:1465-68
2. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dworki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, De Witt DM, Friedman A, Hawe LA, Leander KR, Martínez D, Perry HC, Shiver JW, Montgomery DC, Liu MA. *Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein*. Science 1993; 259:1745-49
3. Janeway CA, Travers P. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. Current Biology Ed. Ltd./ Garland Publishing Inc. 1996 (2ª ed.)
4. Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. *DNA vaccines: immunology, application and optimization*. Annu Rev Immunol 2000; 18:927-74

5. Wiemann B, Starnes CO. *Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective*. Pharmacol Ther 1994; 64:529-64
6. Krieg AM, Wagner H. *Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacterial to bacterial DNA*. Immunol Today 2000; 21:521-6
7. Erb KJ. Immunol Today 1999; 20:317-22
8. Raz E, Spiegelberg HL. Int Rev Immunol 1999; 18:271-89
9. Horner AA, Nguyen MD, Ronaghy A, Cinman N, Verbeek S, Raz E. J Allergy Clin Immunol 2000; 106:349-56.