

Potenciación de vacunas terapéuticas del cáncer mediante inmunosupresión

✉ Enrique Montero, Agustín Lage, Rolando Pérez, Kalet León

Centro de Inmunología Molecular, CIM
Calle 216 y 15, Playa, AP 16040, CP 11600, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: (53-7) 2720644; E-mail: enrique@ict.cim.sld.cu

RESUMEN

La Selección Clonal ha sido el paradigma de la inmunología desde 1959, postulando la eliminación de linfocitos autorreactivos para explicar cómo se tolera a los antígenos propios mientras se reacciona contra los foráneos. Un paradigma alternativo, el de la Tolerancia Dominante (TD), ha emergido recientemente, sustentado en la existencia de células T reguladoras (Treg) que controlan directamente la autorreactividad fisiológica existente. Este trabajo resume resultados experimentales y teóricos que captan precozmente las consecuencias de la TD para el tratamiento del cáncer y la autoinmunidad. Se encontró que manipulaciones de inmunosupresión, que eliminan transitoriamente las Treg, agravan la enfermedad autoinmune, contrariamente al dogma de que la inmunosupresión es beneficiosa en la autoinmunidad. Asimismo se evaluó la inducción de inmunidad antitumoral mediante inmunosupresión en animales vacunados y no vacunados, evidenciando contraintuitivamente un aumento de la respuesta a la vacunación consecuente con la supresión de linfocitos T. En el plano teórico, estos resultados proponen la primera definición operacional que estratifica los autoantígenos según su relevancia en la autoinmunidad natural, en concordancia con el concepto de Homúnculo Inmunológico definido por Cohen en 1992. Adicionalmente, por modelación matemática de la TD, se evidenció un mecanismo de escape de los tumores, donde la dinámica del crecimiento tumoral induce tolerancia y donde la estrategia de inmunosupresión resultaría beneficiosa. En el orden práctico estos resultados conducen al concepto de dependencia de esquema en las vacunas de cáncer y al diseño de protocolos combinados de vacuna+inmunosupresión/quimioterapia+vacuna, que ya han sido introducidos en ensayos clínicos en curso.

Palabras claves: tolerancia, autoinmunidad, inmunosupresión, cáncer, vacunas

Introducción

La tolerancia inmune ha estado conceptualmente basada en la falta de reconocimiento a los antígenos propios por la eliminación intratímica de los clones linfocíticos autorreactivos en etapas tempranas del desarrollo embrionario [1]. Bajo este modelo de Tolerancia Recesiva o Pasiva, trastornos en los mecanismos de purga en órganos linfoides centrales permitirían el escape a periferia de linfocitos patogénicos y la aparición de la enfermedad autoinmune, así la terapia de tales entidades se sustenta sobre la eliminación o atenuación de las células autorreactivas [2]. Recientes evidencias experimentales sustentan la persistencia de células autorreactivas inmunocompetentes y autoanticuerpos en individuos sanos [3, 4], así como la inducción de enfermedades autoinmunes órgano-específicas por linfopenia funcional transitoria de linfocitos T [5, 6]. Los mecanismos no delecionales de regulación de la tolerancia inmunológica periférica a los antígenos propios comienzan a caracterizarse [7]. Este modelo emergente de Tolerancia Dominante o activa permite asumir al sistema inmune (SI) organizado sobre el reconocimiento a lo propio y la existencia de un estado de autoinmunidad fisiológica como mecanismo de homeostasis del individuo, controlado por células con función reguladora que contribuyen al mantenimiento de la tolerancia periférica a los antígenos propios [8, 9].

En el presente trabajo se exponen y discuten integralmente potenciales implicaciones teóricas y experimentales del modelo emergente de Tolerancia Dominante o Activa en la enfermedad. Se examinó el efecto de manipulaciones de la regulación periférica durante la fase de inducción de la respuesta inmune contra antígenos propios en cuatro situaciones bio-

lógicas: la enfermedad autoinmune experimentalmente inducida, la inducción de actividad antitumoral sin manipulación antigénica, la inducción de respuesta inmune contra vacunas de cáncer basadas en antígenos propios y la inducción de actividad antitumoral con vacunas de cáncer, todas con unidad experimental común dada por la evaluación de la respuesta inmune frente a antígenos propios en el curso de procedimientos generadores de linfopenia funcional transitoria. Adicionalmente, por el método de modelación matemática se valida el fenómeno de tolerancia inducida como mecanismo de escape de los tumores a la respuesta inmune.

Materiales y métodos

Modelos animales

Se utilizó como modelo de enfermedad autoinmune la Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE) inducida por Glicoproteína de Mielina/Oligodendrocito (MOG) en ratones adultos C57BL/6 H-2^b, prototipo de la Esclerosis Múltiple humana [10]. La expresión clínica de la enfermedad se estratificó en una escala de 0-5 con las gradaciones de 0.5 para valores intermedios. Los signos clínicos puntearon según los siguientes criterios: grado 0= sin enfermedad, grado 1= debilidad o parálisis de la cola, grado 2=paraparesis de las extremidades posteriores o hemiparesis, grado 3= parálisis de las extremidades posteriores o hemiparálisis, grado 4= parálisis completa (tetraplegia), grado 5= estado moribundo, o muerte.

Se utilizaron como modelos tumorales el Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE), carcinoma de origen mamario de la cepa de ratón BALB/c H-2^d [11] y la

1. Burnet FM. The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity. Nashville (TN): Vanderbilt Univ. Press 1959.
2. Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. N. Engl. J. Med. 2001; 344:655-64.
3. Cohen IR. Regulation of autoimmune disease physiological and therapeutic. Immunol Rev. 1986; 94:5-21.
4. Avrameas S, Guilbert B, Dighiero G. Natural antibodies against tubulin, actin myoglobin, thyroglobulin, fetuin, albumin and transferrin are present in normal human sera, and monoclonal immunoglobulins from multiple myeloma and Waldenstrom's macroglobulinemia may express similar antibody specificities. Ann Immunol (Paris) 1981;132C:231-6.
5. Sakaguchi S, Sakaguchi N. Organ-specific autoimmune disease induced in mice by elimination of T cell subsets. V. Neonatal administration of cyclosporin A causes autoimmune disease. J Immunol 1989;142:471-80.
6. Gleeson PA, Toh BH, van Driel IR. Organ-specific autoimmunity induced by lymphopenia. Immunol Rev. 1996; 149:97-125.
7. Coutinho A, Hori S, Carvalho T, Caramalho I, Demengeot J. Regulatory T cells: the physiology of autoreactivity in dominant tolerance and «quality control» of immune responses. Immunol Rev. 2001; 182:89-98.
8. Cohen IR. The cognitive principle challenges clonal selection. Immunol Today 1992;13:441-4.

variante 3LL-D122 del Carcinoma Pulmonar de Lewis, tumor espontáneo poco inmunogénico y altamente metastásico en ratones C57BL/6 H-2^b [12]. El tamaño del TAE se reportó como el producto del diámetro mayor del tumor (a) y el diámetro perpendicular a este (b) en mm². La evolución del tumor 3LL-D122 se evaluó por medición de sus diámetros cada 3 días y se practicó cirugía del tumor primario (amputación) cuando alcanzó los 8-9 mm de diámetro. El desarrollo de metástasis pulmonares espontáneas se estimó por el incremento del peso pulmonar.

Modelos antigénicos

Se utilizó el péptido sintético p35-55 (secuencia de aminoácidos: MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) de la MOG, así como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) murino (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania) y humano (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba), este último sólo o conjugado a la proteína P64k de la *Neisseria meningitidis* (EGF-P64k).

Procedimientos generadores de linfopenia funcional transitoria

Se utilizaron formulaciones estériles de Anticuerpos Monoclonales (AcMs) obtenidas a partir de ascitis o de sobrenadantes de cultivo celular purificadas por precipitación por sulfato de amonio al 50%. El hibridoma YTS 191.1.1.2 produce AcMs dirigidos contra el epítipo A del antígeno murino L3T4, equivalente al CD4 en humanos. El hibridoma YTS 169.4.2.1 produce AcMs dirigidos contra el epítipo A del antígeno Lyt-2, equivalente al CD8 de cadena α en humanos. Ambos AcMs son del isotipo IgG2b [13]. El hibridoma PC 61 5.3 produce AcMs de isotipo IgG1 dirigidos contra la cadena α del receptor de IL-2 (CD25) murino [14]. Todas las formulaciones se administraron por vía intravenosa.

Adicionalmente se utilizó la Ciclosporina A (Sandoz, Basle, Suiza) a la dosis de 10mg/kg de peso de animal, disuelta en 50 μ L de aceite de oliva (Sigma, St. Louis, MO) por vía intraperitoneal [5] y la Ciclofosfamida (Lemery, México) a la dosis de 50 mg/kg por vía intravenosa.

Análisis

La eficiencia de los protocolos inductores de linfopenia se evaluó por citometría de flujo a partir de muestras de sangre periférica y células de bazo. Se utilizaron AcMs conjugados, anti-CD4 Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) o Ficoeritrina (R-PE), anti-CD8 R-PE, anti-CD25 FITC y sus combinaciones (PharMingen, San Diego, CA). El análisis se realizó con un Citómetro de Flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Los anticuerpos anti-MOG se evaluaron por ensayo de ELISA según protocolo descrito previamente [15]. La respuesta proliferativa anti-MOG se evaluó *in vitro* en células de bazo no fraccionadas [10]. La producción de IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ se evaluó en los sobrenadantes coleccionados a las 72 horas de cultivo por ELISA según juego diagnóstico comercial (PharMingen, San Diego, CA). La respuesta de anticuerpos anti-EGF se evaluó por ELISA [16]. Para el análisis histológico los fragmentos de tejido se fijaron en una solución de formalina al 10% y se incluyeron en

bloques de parafina, posteriormente fueron seccionados en fragmentos de 5 micras y teñidos con hematoxilina y eosina. El análisis histológico se realizó a 100x y 200x de visión.

Modelos matemáticos

Se aplicó formalismo matemático basado en ecuaciones diferenciales que permite la descripción de un modelo de red inmune que incluye la presencia simultánea de clones linfocitarios B y T [17, 19].

Resultados y discusión

Manipulaciones inductoras de linfopenia transitoria condicionan la transición de la autoinmunidad benigna a la inflamación inmune patogénica

La existencia de células T con capacidad reguladora (Treg) de la respuesta inmune es uno de los sustentos teóricos del modelo de Tolerancia Dominante [7]. Experimentalmente las Treg están pobremente caracterizadas tanto fenotípica como fisiológicamente, aunque linfocitos CD4+CD25+ [20, 21] y CD8+ [22, 23] se asocian con una función inmunorreguladora *in vivo*.

La EAE inducida con el péptido p35-55 MOG es un modelo prototípico de enfermedad autoinmune mediada por células Th1 [10, 24]. La forma crónica progresiva de EAE desmielinizante manifiesta en este modelo es reminiscente en muchos aspectos de la Esclerosis Múltiple humana, por lo que resulta atractivo para investigar la patogénesis e inmunorregulación de la enfermedad autoinmune [25]. La autorreactividad al MOG es parte del repertorio natural en individuos sanos, donde existen autoanticuerpos IgG sin enfermedad [15], por lo que es razonable asumir que mecanismos de regulación inmune deben existir para controlar la expresión intrínseca de la autoinmunidad a este antígeno (Ag).

Se encontró que la inmunorregulación del proceso autoinmune puede involucrar diferentes subpoblaciones celulares, con niveles variables de contribución de células T CD4+, CD8+ y particularmente de la subpoblación CD4+CD25+ [26]. La eliminación transitoria de Treg durante la fase inductora de la respuesta inmune contra antígenos propios conduce a su potenciación y al agravamiento de la enfermedad autoinmune, en un proceso que es dependiente de la dosis y el esquema de tratamiento (Tabla 1). Resultó de interés encontrar que la intensificación de la enfermedad se acompaña del incremento de la respuesta proliferativa y la producción de Interferón γ por las células T, así como de la respuesta de anticuerpos específicos contra el MOG, lo que permite inferir la repercusión de tal manipulación en la fase efectora de la respuesta inmune. Debe destacarse que la respuesta inmune contra el derivado proteico purificado del *Mycobacterium tuberculosis* contenido en el adyuvante utilizado en la inmunización no se incrementó, lo que permite sugerir que la respuesta inmune a los antígenos propios y foráneos se regula diferentemente [21, 27]. Finalmente, el análisis de estos resultados desde el punto de vista del manejo de las enfermedades autoinmunes, donde la base fundamental de su terapéutica radica en el uso de medicamentos inmunosupresores, ofrece una explicación al

9. Coutinho A, Forni L, Holmberg D, Ivars F, Vaz N. From an antigen-centered, clonal perspective of immune responses to an organism-centered, network perspective of autonomous activity in a self-referential immune system. *Immunol Rev*. 1984;79:151-68.

10. Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur. J. Immunol* 1995;25:1951-9.

11. Yamamoto N, Naraparaju VR. Immunotherapy of BALB/c mice bearing Ehrlich ascites tumor with vitamin D-binding protein-derived macrophage activating factor. *Cancer Res*. 1997;57:2187-92.

12. Eisenbach L, Hollander N, Greenfield L, Yakor H, Segal S, Feldman M. The differential expression of H-2K versus H-2D antigens, distinguishing high-metastatic from low-metastatic clones, is correlated with the immunogenic properties of the tumor cells. *Int. J. Cancer* 1984;34:567-73.

13. Benjamin RJ, Waldmann H. Induction of tolerance by monoclonal antibody therapy. *Nature* 1986;320:449-51.

14. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by *in vivo* administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1999;59:3128-33.

15. Quintana FJ, Cohen IR. Autoantibody patterns in diabetes-prone NOD mice and in standard C57BL/6 mice. *J. Autoimmun* 2001;17:191-7.

16. González G, Montero E, León K, Cohen IR, Lage A. Autoimmunization to epidermal growth factor, a component of the immunological homunculus. *Autoimmun Rev*. 2002;1:89-95.

17. León K, Carneiro J, Pérez R, Montero E, Lage A. Natural and induced tolerance in an immune network model. *J. Theor Biol*. 1998;193:519-34.

18. Carneiro J, Coutinho A, Faro J, Stewart J. A model of the immune network with B-T cell co-operation. I-Prototypical structures and dynamics. *J. Theor Biol*. 1996;182:513-29.

19. Carneiro J, Coutinho A, Stewart J. A model of the immune network with B-T cell co-operation. II-The simulation of ontogenesis. *J. Theor Biol*. 1996;182:531-47.

20. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol* 2002;169:4712-6.

21. Wing K, Lindgren S, Kollberg G, Lundgren A, Harris RA, Rudin A *et al*. CD4 T cell activation by myelin oligodendrocyte glycoprotein is suppressed by adult but not cord blood CD25+ T cells. *Eur. J. Immunol* 2003;33:579-87.

22. Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 1971;21:903-14.

23. Jiang H, Zhang SJ, Pernis B. Role of CD8+T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 1992;256:1213-5.

efecto rebote de las manifestaciones clínicas de estas enfermedades frecuentemente observado tras la interrupción del tratamiento [28], lo que sugiere la reevaluación conceptual de tal intervención médica.

La respuesta autoinmune a antígenos propios solubles se incrementa por tratamientos inductores de linfopenia transitoria

Derivado del surgimiento de la inmunología como rama de la microbiología sus bases experimentales provienen fundamentalmente de la inmunización con antígenos foráneos [29]. Sin embargo, existe una limitada documentación referente a la reactividad del SI a las moléculas propias ya que la mayoría de los experimentos de autoinmunización se restringen a un puñado de enfermedades autoinmunes experimentales en modelos animales [3]. Con el interés de extender el análisis anterior, se evaluó el impacto de los mecanismos de regulación inmune periférica al Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). El EGF resulta de interés ya que es una molécula pequeña de sólo 53 aminoácidos [30], contra la que existe respuesta natural de autoanticuerpos IgG en individuos sanos [16] y a diferencia del antígeno MOG, se encuentra en bajas concentraciones en circulación periférica, similar a hormonas que resultan blanco de respuestas autoinmunes patológicas [31].

El fenómeno de la tolerancia inducida por altas dosis de inmunosupresión terapéutica [13] se confirmó bajo nuestras condiciones experimentales. La inducción de una depleción linfoide profunda en ratones BALB/c mediante la administración consecutiva de varias dosis de AcMs depletantes anti-CD4 y anti-CD8 previo a la administración intravenosa de EGF humano (heterólogo) indujo un estado de falta de respuesta de anticuerpos específicos de larga duración. Esta aproximación experimental constituye la base racional para el uso de AcMs antilinfocitarios como inmunosupresores en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes humanas [32]. Sin embargo, debe notarse que varios factores influyen sustancialmente en el efecto observado, la dependencia de dosis de la depleción celular T, la dosis y la vía de administración del Ag. La administración de una dosis única de AcM anti-CD4 o anti-CD8 previo a la inmunización subcutánea o intramuscular con el EGF humano en adyuvante no reduce significativamente la respuesta contra este Ag. Por el contrario, similar depleción linfoide transitoria en el curso del desarrollo de la respuesta inmune incrementa los títulos así como la velocidad de aparición de la misma, sin modificar el patrón de subclases de inmunoglobulinas específicas inducidas. Este efecto se observó fundamentalmente con el uso de AcM anti-CD4 y anti-CD25, así como con el medicamento quimioterapéutico Ciclofosfamida (CY). Resulta de particular interés que el incremento de la respuesta inmune contra el EGF humano, también induce un incremento significativo de la respuesta contra el EGF autólogo. Estas moléculas portan un 70% de homología en su secuencia de aminoácidos, lo que sugiere que la especificidad de la regulación de la respuesta contra el EGF es compartida entre ambas moléculas y pudiera ser una evidencia de la conservación evolutiva de este proceso. El incremento de la respuesta inmune al EGF

Tabla 1. Comparación entre los esquemas combinados de inmunización y depleción transitoria de células T en la inducción de EAE

A)

Esquema	Tratamiento	Incidencia de la enfermedad (%)	Día del debut (Media±SEM)	Pico del índice clínico [#]	
				(Media±SEM)	Máximo
	Control	83	18.40±1.43	1.18±0.18	2.5
IVV	anti-CD4	0	-	0	0
	anti-CD8	100	17.00±1.00	2.62±0.10	3
	anti-CD25	100	17.33±0.33	2.12±0.21	3
VIV	anti-CD4	100	22.00±4.04	1.00±0.28	2.5
	anti-CD8	100	17.67±1.33	2.33±0.42	4.5
	anti-CD25	100	17.00±0.00	3.37±0.22	4

B)

Esquema	Grupo	IVV			VIV			
		Control	anti-CD4	anti-CD8	anti-CD25	anti-CD4	anti-CD8	anti-CD25
IVV	Control	-	*	p<0.0001	p=0.0033	ns	p=0.0060	p<0.0001
	anti-CD4	-	*	*	*	*	*	*
	anti-CD8	-	-	-	ns	p<0.0001	ns	p=0.0063
	anti-CD25	-	-	-	-	p=0.0044	ns	p=0.0005
VIV	anti-CD4	-	-	-	-	p=0.0156	p<0.0001	-
	anti-CD8	-	-	-	-	-	-	p=0.0405
	anti-CD25	-	-	-	-	-	-	-

A) Expresión clínica de la enfermedad, B) Análisis entre grupos individuales (se muestra el valor de significación estadística). Para la inducción de la EAE se inmunizaron los animales por vía subcutánea dos veces con 200 µg del péptido p35-55 del MOG emulsificado en Adyuvante Completo de Freund suplementado con 500 µg de *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA inactivado por calor y siguiendo el protocolo estándar, 200 ng de la toxina del bacilo *Bordetella pertussis* se inoculó inmediatamente después de la primera inmunización y 72 horas más tarde. Se administró por vía intravenosa una dosis de 1 mg de AcM depletante o IgG control basado en dos esquemas diferentes: 24 horas antes de la primera inmunización (IVV) ó 24 horas antes de la segunda inmunización (VIV). (#) La significación estadística se calculó mediante la prueba de t de Student (ns, no significativo), (*) La incidencia de la EAE igual a cero en el grupo tratado con el AcM anti-CD4 según esquema IVV.

como resultado de un protocolo combinado de inmunización e inducción de linfopenia transitoria sustenta la intervención de los mecanismos de regulación periférica en la respuesta contra Ag solubles.

Definición operacional del homúnculo inmunológico

Una de las innovaciones fundamentales que distingue al modelo de tolerancia inmune dominante o activa está dada en la visión de la autoinmunidad como natural y beneficiosa, más que una consecuencia fortuita y negativa de la inmunidad. Aquí, el SI se encuentra en continua activación referenciado en el reconocimiento de un particular conjunto de Ag propios y predice la existencia de una cohorte de clones linfocitarios contra tales especificidades con receptores preseleccionados por su alta afinidad que están involucrados en la regulación inmune y la homeostasis [33].

Homúnculo inmunológico (HI) es el término que se aplica para designar el repertorio natural autoinmune dirigido contra una fracción de los Ag propios [34, 35]. EL HI puede considerarse como una representación interna de ciertas moléculas propias, análogo al homúnculo neurológico, figura funcional del sistema nervioso del organismo individual impreso en las cortezas sensoriales y motoras. El

24. Begolka WS, Vanderlugt CL, Rahbe SM, Miller SD. Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically distinct models of multiple sclerosis. *J. Immunol* 1998; 161:4437-46.

25. Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349:139-45.

26. Montero E, Nussbaum G, Kaye JF, Pérez R, Lage A, Cohen IR. Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by CD4+, CD25+ and CD8+T cells: Analysis using depleting antibodies. En Imprenta 2004.

27. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol* 2003;3:253-7.

28. Silva VA, Seder RH, Weintraub LR. Synchronization of plasma exchange and cyclophosphamide in severe and refractory autoimmune hemolytic anemia. *J. Clin Apheresis* 1994;9:120-3.

29. Montero E, Lage A. Paradigma Cognitivo en Inmunología. *Rev. Cub. Reumatol* 2002;IV:27-36.

homínculo neurológico está compuesto por redes de neuronas conectadas y el HI por su parte, está compuesto por linfocitos T y B que reconocen los epítopes dominantes de los Ag propios. Al igual que las neuronas, estos linfocitos autorreactivos se encuentran regulados por redes celulares que incluyen interacciones idiotípicas-antidiotípicas.

El HI aunque atractivo conceptualmente, se encuentra pobremente operacionalizado, lo que limita su alcance práctico. La estratificación del conjunto de los autoantígenos en homunculares o no, sería relevante para el diseño de vacunas contra Ag propios como blancos de la inmunidad antitumoral. Los antígenos homunculares a diferencia de los no homunculares deben estar sometidos a un nivel de regulación fisiológica, el cual sería preciso romper para inducir respuesta inmune. La ruptura de esta tolerancia pudiera tener implicaciones a largo plazo en el individuo, sería el equivalente a la inducción de una autoinmunidad patológica, aunque pudiera derivar en una respuesta inmune más eficiente contra los tumores.

Los estudios sobre autoinmunidad al MOG y al EGF descritos nos permiten proponer una definición operacional de los Ag del HI [16]. Así, un antígeno propio homuncular es aquel que (Tabla 2): es reconocido por autoanticuerpos naturales y células T en individuos sanos, se expresa en el timo, activa una respuesta inmune más efectiva cuando está acompañado por señales accesorias tales como adyuvantes y moléculas transportadoras, la respuesta inmune al Ag puede incrementarse mediante supresión de la regulación inmune y el Ag puede ser molécula blanco en una enfermedad autoinmune. Tales criterios se cumplen para estos dos antígenos y aunque no se han descrito enfermedades autoinmunes contra el EGF, se describió en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico la presencia de autoanticuerpos circulantes contra una región de la trombomodulina que contiene dominios de EGF, lo que constituye un factor de riesgo para la ocurrencia de trombosis [36].

Impacto de las nociones emergentes de la Tolerancia Dominante en la inmunidad tumoral. Contraintuitivamente la linfopenia transitoria induce efecto antitumoral

La respuesta antitumoral puede ser un caso particular de respuesta autoinmune. Múltiples evidencias sus-

Tabla 2. Definición operacional del homínculo inmunológico

Criterio	MOG	EGF
Existencia de repertorio natural inmune en individuos sanos	+ [15]	+ [16]*
Expresión en células epiteliales tímicas medulares	+ [48]	? [49]
Necesidad de señales accesorias para respuesta inmune más efectiva	+ [10]*	+ [50]*
Incremento de la respuesta inmune por supresión de la regulación inmune	+ [20]*	+ [16]*
Antígeno blanco de enfermedad autoinmune	+ [10]	? [36]

Se resumen los criterios propuestos para la estratificación de los autoantígenos según su relevancia en la autoinmunidad. (+)-Existencia de datos que sustentan el criterio correspondiente, (?)-Dato incompleto o no concluyente, (*)-Dato obtenido o confirmado durante el desarrollo del presente trabajo. Se incluyen entre corchetes las referencias correspondientes.

tentan la relevancia de los Ag propios como blancos principales de la respuesta inmune contra las células tumorales [37, 38]. De ser esta afirmación correcta, ambos tipos de respuestas deben estar sujetos a similares procesos de regulación inmune y manipulaciones que desencadenan enfermedades autoinmunes, deben desencadenar a su vez respuesta antitumoral [38]. La cepa de ratones BALB/c es ordinariamente resistente al desarrollo de enfermedades autoinmunes espontáneas. Sin embargo, la administración neonatal de la Ciclosporina A (CsA), medicamento con reconocido efecto inmunosupresor, sin otro tipo de manipulación antigénica induce el desarrollo de autoinmunidad patológica [5]. Por homología se evaluó similar intervención en ratones BALB/c portadores del TAE, tumor singénico inerte a algún efecto potencial de la CsA [11]. Sorprendentemente, este proceder desencadena efecto antitumoral con reducción significativa de su crecimiento e incremento de la sobrevivencia de los animales, asociado a la inducción de lesiones histopatológicas tales como, infiltración intensa de células mononucleares y pérdida de la arquitectura tumoral característica [39]. Significativamente, un hallazgo histológico similar se reporta en las enfermedades autoinmunes inducidas por CsA. Es de notar que la administración de CsA tiene sólo un discreto impacto, y bajo condiciones de inmunosupresión más estrictas en la evolución tumoral en individuos adultos, lo que evidencia el reforzamiento ontogénico de los mecanismos de regulación inmune periférica [6]. Estos experimentos se realizaron en ausencia de manipulaciones antigénicas de tal manera que la movilización de los mecanismos efectores inmunes estuvo mediada por Ag propios expresados de forma natural. En general, la inducción de respuesta antitumoral por inmunosupresión transitoria sustenta la existencia de linfocitos autorreactivos capaces de reconocer y destruir células tumorales pero sólo cuando se elude el efecto de los mecanismos de regulación periférica. Adicionalmente, esto puede explicar la aparente falta de antigenicidad o insuficiente inmunogenicidad de los Ag tumorales.

Modelación matemática de red de linfocitos B-T para el sistema inmune de un nuevo mecanismo de escape de los tumores basado en la inducción activa de tolerancia

Para estudiar las implicaciones de una concepción teórica del SI basada en la existencia de una densa red de interacciones entre linfocitos B y T, tal como se postula anteriormente en este trabajo, se desarrolló [17] y estudió una extensión de un modelo de red inmune que propone un conjunto de ecuaciones diferenciales que describen la variación de las concentraciones de clones T y B, así como de las Inmunoglobulinas (Ig) secretadas por estos últimos [18, 19]. Los Ag se introducen con una concentración constante y tienen asociados un único clon T. Nuevos clones B se introducen periódicamente y sus afinidades de interacción se establecen por un procedimiento semialeatorio. La activación de esos clones tiene en cuenta el reconocimiento del ligando por Ig de membrana y el proceso de cooperación T-B. Respecto al modelo original se modificó el procedimiento de generación de afinidades para considerar la variación de la conectividad entre clones B durante el desarrollo ontogénico y la

30. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu Rev. Biochem.* 1979; 48:193-216.

31. Shoenfeld Y. *The Decade of Autoimmunity.* Amsterdam, Netherland: Elsevier Health Sciences 1999.

32. Montero E, Falcón L, Morera Y, Delgado J, Amador JF, Pérez R. CD6 molecule may be important in the pathological mechanisms of lymphocytes adhesion to human skin in psoriasis and for t1 MAb a possible new approach to treat this disease. *Autoimmunity* 1999;29:155-6.

33. Cohen IR. *Tending Adam's Garden: Evolving the Cognitive Immune Self.* San Diego, California: Academic Press 1999.

34. Cohen IR. The cognitive paradigm and the immunological homunculus. *Immunol Today* 1992;13:490-4.

35. Nobrega A, Haury M, Grandien A, Malanchere E, Sundblad A, Coutinho A. Global analysis of antibody repertoires. II. Evidence for specificity, self-selection and the immunological "homunculus" of antibodies in normal serum. *Eur. J. Immunol* 1993;23:2851-9.

36. Oosting JD, Preissner KT, Derksen RH, de Groot PG. Autoantibodies directed against the epidermal growth factor-like domains of thrombomodulin inhibit protein C activation in vitro. *Br J. Haematol* 1993;85:761-8.

37. Bada A, Casaco Parada A, Arteaga M, Martínez J, León A, Santana E et al. Toxicity of a GM3 cancer vaccine in Macaca fascicularis monkey: a 12-month study. *Hum. Exp. Toxicol* 2002;21:263-7.

38. Montero E, Amador JF, Pérez R, Lage A. Tumor-specific immunotherapy based on dominant models of natural tolerance. *Med Hypotheses* 2000;54:531-6.

39. Naftzger C, Takechi Y, Kohda H, Hara I, Vijayaradh S, Houghton AN. Immune response to a differentiation antigen induced by altered antigen: a study of tumor rejection and autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996;93: 14809-14.

función de activación de clones T para considerar la dependencia de este proceso de la concentración de Ag, proponiéndose una función de tipo campana.

El resultado más significativo de este trabajo teórico se obtuvo de la simulación de la respuesta del SI a un Ag externo cuya concentración varía con el tiempo (simulación de un antígeno tumor asociado); mientras más lento es el crecimiento del Ag, más tolerogénico resultó para el SI (Figura 1). Esta interesante dependencia explica el hallazgo experimental de una correlación directa entre la velocidad de crecimiento de un tumor y la inmunogenicidad del mismo [40]. Pero más aún, propone un mecanismo de escape del tumor diferente de los clásicamente considerados en la literatura [41]. En el mismo, la propia dinámica de crecimiento del tumor induce tolerancia a partir de los mismos mecanismos que garantizan la tolerancia a los antígenos propios en el SI. El estudio ulterior con este modelo, validó teóricamente la estrategia propuesta en este trabajo de combinación de inmunosupresión con vacunas para el tratamiento de aquellos tumores que utilizaran el mecanismo de escape antes descrito.

Postulado de una nueva modalidad de inmunoterapia del cáncer sustentada en la combinación de vacunas de cáncer basadas en antígenos propios con inmunosupresión

De los resultados anteriores se pueden extraer importantes nociones para la inmunología tumoral [16], tales como: vacunas de cáncer inmunogénicas pueden estar basadas en el uso de antígenos homoculares y no sólo en neoantígenos tumor específicos, conclusión razonable ya que la autoinmunidad natural está garantizada en una relativa alta frecuencia de células T y B específicas. Para superar los mecanismos de regulación que controlan la autoinmunidad natural se requieren altas dosis de antígeno, frecuentes y repetidas inmunizaciones que incluyan adyuvantes contentivos de potentes señales coestimuladoras.

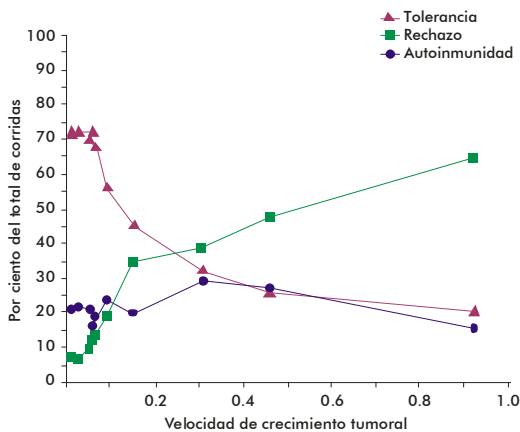


Figura 1. Simulación de la respuesta del Sistema Inmune a un antígeno tumor asociado cuya concentración varía con el tiempo. Porcentaje del total de 100 simulaciones realizadas que resultó en: Tolerancia (no aparecen anticuerpos contra el antígeno tumoral), Rechazo (aparición de anticuerpos específicos), o Autoinmunidad (aparición de anticuerpos contra el antígeno tumoral y contra algún otro antígeno propio) inducida por el crecimiento de un tumor (modelado como antígeno externo cuya concentración incrementa con el tiempo). Para un tumor que crece más rápido la frecuencia de rechazos aumenta y la de tolerancia disminuye.

Pero fundamentalmente, los protocolos de vacunación terapéutica del cáncer deben incluir el uso de tratamientos inmunosupresivos o mejor, capaces de eliminar o “relajar” la regulación inmune, entre los que pueden considerarse medicamentos quimioterapéuticos no mieloablativos como la CY, fármacos que inducen linfopenias transitorias como efecto secundario y además no afectan la rápida recuperación de los neutrófilos [42, 43].

La demostración formal de estos postulados (Figura 2) se realizó utilizando una vacuna de cáncer basada en el EGF conjugado a la proteína P64k de la *Neisseria meningitidis* (EGF-P64k) en el adyuvante Montanide ISA 51. Esta vacuna se encuentra en evaluación clínica para el tratamiento en pacientes con cáncer de origen epitelial, con la finalidad de aprovechar los autoanticuerpos producidos como vía para inactivar el EGF circulante, castrándolo de la circulación periférica con el propósito de reducir la tasa de crecimiento de los tumores dependientes de este factor de crecimiento [44]. Desde el punto de vista práctico, una mayor eficacia de este enfoque terapéutico estaría directamente ligada a la inducción y mantenimiento de mayores títulos de anticuerpos circulantes en los sujetos portadores de tumores, lo que se constató experimentalmente.

El mecanismo del fenómeno de potenciación de la respuesta antitumoral inducida por linfopenia transitoria puede sustentarse en la eliminación de linfocitos reguladores o supresores que abrogan tal efecto [14, 45], aunque complementariamente la apertura de espacio, capaz de garantizar la regeneración homeostática preferencial de linfocitos contra las especificidades vacunales, constituye una alternativa razonable [38, 46, 47].

Conclusiones

En general, el presente trabajo tributa al sustento del modelo emergente de Tolerancia Dominante y postula una aplicación práctica para la terapia del cáncer. Protocolos de investigación clínica basados en estos resultados ya se encuentran en ejecución, con resultados preliminares alentadores.

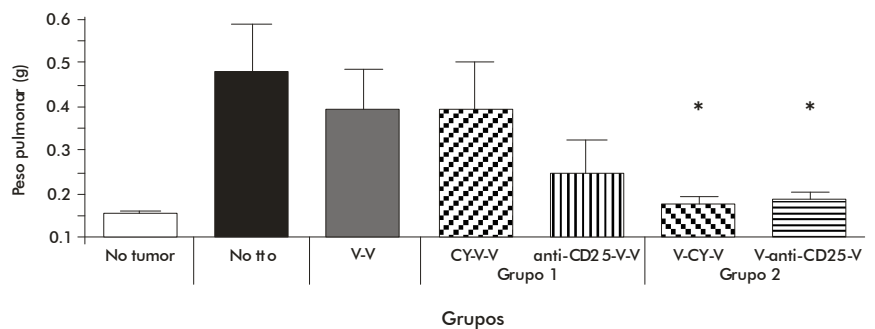


Figura 2. Efecto antimetastásico inducido con combinaciones de la vacuna de cáncer EGF-P64k e inmunosupresión en ratones C57BL/6 inoculados con el carcinoma pulmonar 3LL-D122. Tras la inoculación del tumor primario se estratificaron los animales de acuerdo al esquema terapéutico. Un grupo permaneció sin tratamiento (No tto) y a partir del segundo día, los restantes se inmunizaron dos veces con 4 µg del preparado vacunal EGF-P64k en Montanide ISA 51 por vía intramuscular (V-V). Adicionalmente, se administró por vía intravenosa una dosis de 50 mg/kg de CY o 1 mg de AcM depletante anti-CD25 basado en dos esquemas diferentes: 3 días antes de la primera inmunización (Grupo 1) ó 3 días antes de la segunda inmunización (Grupo 2). La inmunosupresión en el curso de la inmunización con la vacuna de cáncer EGF-P64k (Grupo 2) incrementa la respuesta de anticuerpos anti-EGF y reduce significativamente la aparición de metástasis espontáneas evaluada por peso pulmonar según prueba de Kruskal-Wallis (Anova No-paramétrica) y la prueba de Comparaciones Múltiples de Dunn (* p<0.05). El peso pulmonar normal se muestra en el grupo de animales naïve (No tumor).

40. Old LJ, Boyse EA, Clarke DA, Carswell EA. Antigenic properties of chemically-induced tumors. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1962;101:80-106.

41. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat. Immunol 2002;3:991-8.

42. Turk JL, Parker D. Effect of cyclophosphamide on immunological control mechanisms. Immunol Rev. 1982;65:99-113.

43. Bass KK, Mastrangelo MJ. Immunopotentiality with low-dose cyclophosphamide in the active specific immunotherapy of cancer. Cancer Immunol Immunother 1998;47:1-12.

44. Gonzalez G, Crombet T, Torres F, Catala M, Alfonso L, Osorio M et al. Epidermal growth factor-based cancer vaccine for non-small-cell lung cancer therapy. Ann. Oncol 2003;14:461-6.

45. Gallimore A, Sakaguchi S. Regulation of tumour immunity by CD25+T cells. Immunology 2002; 107:5-9.

46. Dummer W, Niethammer AG, Baccala R, Lawson BR, Wagner N, Reisfeld RA et al. T cell homeostatic proliferation elicits effective antitumor autoimmunity. J. Clin. Invest. 2002;110:185-92.

47. Barthlott T, Kassiotis G, Stockinger B. T cell regulation as a side effect of homeostasis and competition. J. Exp. Med. 2003;197: 451-60.

48. 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.

49. Freitas CS, Dalmau SR, Kovary K, Savino W. Epidermal growth factor modulates fetal thymocyte growth and differentiation. Dev. Immunol 1998; 5:169-82.

50. González G, Pardo OL, Sánchez B, García JL, Beausoleil I, Marinello P et al. Induction of Immune Recognition of Self Epidermal Growth Factor II: Characterization of the Antibody Immune Response and the Use of a Fusion Protein. Vaccine Research 1997;6:91-100.