



**University of
Zurich**^{UZH}

**Zurich Open Repository and
Archive**

University of Zurich
University Library
Strickhofstrasse 39
CH-8057 Zurich
www.zora.uzh.ch

Year: 2013

**Dendritic cell pattern recognition receptor activation by microbial
components. Immunoregulatory mechanisms within the intestinal mucosa**

O'Mahony, L

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich

ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-140953>

Book Section

Published Version

Originally published at:

O'Mahony, L (2013). Dendritic cell pattern recognition receptor activation by microbial components. Immunoregulatory mechanisms within the intestinal mucosa. In: Fernandez-Cruz, Eduardo. *Progresos en terapias inmunomoduladoras con inmunoglobulinas y con vacunas de mucosas en patologías infecciosas*. Madrid: SICAM, 71.

Progresos en terapias inmunomoduladoras con inmunoglobulinas y con vacunas de mucosas en patologías infecciosas

Actualizaciones en las guías para el diagnóstico
y el tratamiento de las gammapatías monoclonales

Editor: Prof. Eduardo Fernández-Cruz



SICAM

Sociedad Inmunología Comunidad de Madrid



Progresos en terapias inmunomoduladoras con inmunoglobulinas y con vacunas de mucosas en patologías infecciosas

Actualizaciones en las guías para el diagnóstico y el tratamiento de las gammapatías monoclonales

Editor: Prof. Eduardo Fernández-Cruz

*Jefe del Servicio de Inmunología Clínica,
Director de la Unidad de Inmunología Clínica,
Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM), Madrid.
Profesor del Departamento de Microbiología I e Inmunología,
Universidad Complutense de Madrid.
Presidente de la Sociedad de Inmunología
de la Comunidad de Madrid (SICAM)*

Equipo editorial

Eduardo Fernández-Cruz

*Jefe del Servicio de Inmunología Clínica,
Director de la Unidad de Inmunología Clínica,
Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM), Madrid.
Profesor del Departamento de Microbiología I e Inmunología,
Universidad Complutense de Madrid.
Presidente de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid (SICAM)*
Dirección electrónica: efernandezc.hgugm@salud.madrid.org

Juan José Rodríguez Molina

*Coordinador de Calidad,
Laboratorio de Diagnóstico Clínico,
Servicio de Inmunología Clínica, HGUGM, Madrid.
Vocal de la SICAM*

Julia Sequí Navarro

*Jefe de Sección, Servicio de Inmunología,
Hospital Carlos III, Madrid.
Vicepresidente de la SICAM*

Carmen Rodríguez-Sainz

*Titulado Superior Especialista Responsable del
Laboratorio de Diagnóstico de Inmunogenética Molecular Clínica,
Servicio de Inmunología Clínica, HGUGM, Madrid.
Miembro de la SICAM*

Producción editorial

Letramédica SCP

Pau Claris, 105
08009 Barcelona
E-mail: 19515psh@comb.cat

Coordinación editorial

Dr. Pablo Stajnsznajder
Dr. Adolfo Cassan

ISBN: 978-84-695-5916-1

Depósito Legal: B. 1.188-2013

Sumario

Prólogo	5
Avances en la terapia inmunomoduladora con inmunoglobulinas de última generación	7
Progresos en la terapia con inmunoglobulinas <i>Eduardo Fernández-Cruz, Silvia Sánchez Ramón, Juana Gil Herrera y Javier Carbone Campoverde</i>	9
Avances en el conocimiento y caracterización de las inmunoglobulinas intravenosas <i>Juan I. Jorquera</i>	13
Ensayos clínicos con inmunoglobulinas intravenosas de última generación: experiencia con Flebogamma® 10% DIF en inmunodeficiencias primarias <i>Paul J. Pinciaro</i>	27
Progresos en terapias inmunomoduladoras con vacunas de mucosas en patologías infecciosas	39
Nuevas bases científicas para la utilización de vacunas de mucosas en la clínica <i>Eduardo Fernández-Cruz, Diana Alecsandru, Carmen Rodríguez-Sainz y José Luis Subiza</i>	41
Mecanismos inmunológicos básicos para el desarrollo de vacunas de mucosas contra infecciones, enfermedades autoinmunes y alergias <i>Cecil Czerkinsky</i>	59
Activación de células dendríticas por componentes bacterianos a través de receptores para patrones moleculares. Papel inmunorregulador a nivel de la mucosa intestinal <i>Liam O'Mahony</i>	71

Profilaxis de infecciones pulmonares con inmunomoduladores de origen bacteriano <i>Lucy Cárdenas-Freytag</i>	89
Inmunización sublingual terapéutica con un preparado bacteriano polivalente (Bactek®) en pacientes con infecciones recurrentes respiratorias: efecto inmunomodulador en linfocitos T antígeno-específicos CD4+ y su impacto clínico <i>Diana Alecsandru, Lara Valor, Silvia Sánchez-Ramón, Juana Gil, Javier Carbone, Juan José Rodríguez, Joaquín Navarro, Carmen Rodríguez-Sainz y Eduardo Fernández-Cruz</i>	103
Actualizaciones en las guías para el diagnóstico y el tratamiento de las gammopatías monoclonales	113
Avances en el diagnóstico y la monitorización del mieloma múltiple y otras gammopatías monoclonales <i>Juan José Rodríguez Molina, Joaquín Navarro Capistegui y Eduardo Fernández-Cruz</i>	115
Nuevas aportaciones de Freelite® y Hevylite® al diagnóstico, a la monitorización y al pronóstico de las gammopatías monoclonales <i>Arthur R. Bradwell</i>	125
Determinación de cadenas ligeras libres en suero (Freelite®) en el diagnóstico, el pronóstico y la monitorización de las gammopatías monoclonales. Aplicaciones emergentes de Freelite® en pacientes con esclerosis múltiple <i>Luisa María Villar Guimerans</i>	141
Protocolos de interacción consensuados en gammopatías monoclonales <i>Joaquín Martínez López</i>	151

Prólogo

Eduardo Fernández-Cruz

Jefe del Servicio de Inmunología Clínica y Director de la Unidad de Inmunología Clínica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid. Presidente de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid

Esta obra ofrece una puesta al día de los avances que se han producido últimamente en el diagnóstico y el tratamiento de diversas patologías con componente inmunológico y que fueron debatidos en la 3ª Reunión Anual de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid (SICAM), un evento celebrado en octubre de 2011 en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM) de Madrid y en el cual participaron especialistas de reconocido prestigio tanto del ámbito nacional como del internacional.

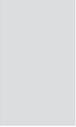
La obra está estructurada en tres módulos: *Avances en la terapia inmunomoduladora con inmunoglobulinas de última generación*, *Progresos en terapias inmunomoduladoras con vacunas de mucosas en patologías infecciosas* y *Actualizaciones en las guías para el diagnóstico y el tratamiento de las gammapatías monoclonales*. Cada módulo consta de una introducción y de una serie de capítulos en los que los respectivos autores exponen sus más recientes trabajos de investigación, así como sus revisiones y reflexiones sobre los temas tratados.

Dada la relevancia de los temas y la forma en que se abordan, no me cabe la menor duda de que esta obra resultará de interés no sólo para los inmunólogos clínicos, sino también para todos los especialistas que diagnostican y tratan patologías con componente inmunológico, muy particularmente, en este caso, para internistas, pediatras, neumólogos, infectólogos, hematólogos y nefrólogos.

Me gustaría resaltar aquí la importancia que tienen propuestas como las que suponen las Reuniones Anuales de la SICAM, en las que se promueve el debate científico entre expertos españoles y extranjeros en el ámbito de la inmunología clínica, una especialidad emergente cuyo peso está creciendo de forma exponencial. Por ello, quiero expre-

sar mi reconocimiento a la SICAM –en especial a su Junta Directiva y al Comité Organizador–, al HGUGM y al Servicio de Inmunología Clínica.

Igualmente, deseo expresar nuestro más sentido agradecimiento a Grifols, por su indispensable colaboración en esta obra, y a Letramédica, por la excelencia de la tarea editorial realizada.



Avances en la terapia inmunomoduladora con inmunoglobulinas de última generación

Progresos en la terapia con inmunoglobulinas

Eduardo Fernández-Cruz, Silvia Sánchez Ramón, Juana Gil Herrera y Javier Carbone Campoverde

*Unidad de Inmunología Clínica,
Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid*

Los anticuerpos producidos por el sistema inmunológico son de importancia crítica para la terapia sustitutiva con inmunoglobulinas (Ig) administradas por vía intravenosa (IGIV) o subcutánea (IGSC) en los trastornos en los que existe una deficiencia de la respuesta humoral frente a un amplio espectro de microorganismos, como ocurre en las inmunodeficiencias primarias (IDP). La mayoría de las preparaciones de Ig contienen moléculas intactas de IgG que poseen importantes actividades funcionales, como la bactericida mediada por el complemento, la opsonizante y la de neutralización viral¹.

El fragmento Fc de la molécula de IgG es una pieza clave, ya que permite la interacción de las Ig con dos tipos de elementos. Por un lado, la interacción con los receptores Fcγ que se encuentran en la superficie de los linfocitos B, los linfocitos *natural killer* (NK), las células del sistema fagocítico (macrófagos), las células plasmáticas, los eosinófilos, los neutrófilos y las plaquetas. Por otro lado, el fragmento Fc es una pieza clave en la interacción de las IgG con las proteínas plasmáticas a las que se une y cuya presencia es necesaria para la activación del complemento y la eliminación de los microorganismos²⁻⁵. Gracias a estas interacciones, las IGIV pueden desencadenar efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios con un impacto clínico beneficioso, tal como se ha descrito en la terapia con Ig en diversas patologías crónicas inflamatorias y autoinmunes⁶⁻¹⁵.

Los recientes avances en biotecnología han permitido una innovación completa del método de producción de los nuevos productos que se utilizan en la terapia con Ig y que están revolucionando la forma de tratamiento de las enfermedades infecciosas y patologías sistémicas crónicas en las que la alteración de la regulación del sistema inmunológico representa el principal mecanismo patogénico implicado. Como resultado de

la aplicación en la clínica de estos nuevos conocimientos y procedimientos biotecnológicos, recientemente se han introducido en el arsenal de la terapia biológica dos productos avanzados que representan una nueva generación de Ig: uno de administración intravenosa (Flebogamma 5% y 10%® DIF [*dual inactivation and nanofiltration*]) y otro de aplicación subcutánea (Hizentra®)¹⁶⁻¹⁸.

En 2006 se introdujo en Estados Unidos la primera IGSC, Vivaglobin®, de CSL Behring, y en el año 2010 apareció en el mercado otra IGSC del mismo fabricante, Hizentra®, que es el primer preparado con Ig líquida al 20% formulado específicamente para su administración por vía subcutánea. El tratamiento con IGSC administrado semanalmente se tolera bien y posee un buen perfil de seguridad, además de mantener los niveles óptimos de concentración sérica de IgG en estado de equilibrio y las concentraciones de anticuerpos específicos en un nivel estable¹⁹.

En cuanto a la terapia con IGIV, Flebogamma® DIF es una IGIV líquida de alta pureza, disponible en concentraciones del 5% (50 mg/ml) y del 10% (100 mg/ml), que contiene sólo trazas de IgA (< 0,003 mg/ml y < 0,006 mg/ml, respectivamente), de muy bajo contenido en sodio (< 3,2 mmol/l), niveles mínimos de polímeros, una osmolalidad dentro del intervalo fisiológico y que está estabilizada con sorbitol (sin sacarosa ni maltosa), lo cual la sitúa como una Ig de gran tolerabilidad y fácil dosificación. Flebogamma® DIF presenta una alta seguridad frente a patógenos (gracias al doble procesamiento DIF) y no contiene factores de la coagulación residuales, lo cual evitaría un eventual efecto protrombogénico. La integridad del fragmento Fc está conservada y todas las subclases de IgG están contenidas en su respectivo intervalo fisiológico (en Flebogamma® 10% DIF: IgG₁: 66,6%; IgG₂: 27,9%; IgG₃: 3,0% e IgG₄: 2,5%), por lo que este producto es idóneo para las terapias de reposición e inmunomodulación.

Por otra parte, los logros en pureza y en la preservación de las propiedades inmunológicas naturales, así como el hecho de requerir la infusión de un menor volumen y un menor tiempo de infusión, sitúan a Flebogamma® DIF como una de las IGIV que más se deben considerar a la hora de evaluar los factores de riesgo y ciertos aspectos clínicos del paciente, como el riesgo de sobrecarga de líquido, el fallo cardíaco o la disfunción renal²⁰.

La eficacia clínica de Flebogamma® DIF ha sido probada en las patologías que requieren reposición de Ig, entre ellas las IDP, las inmunodeficiencias secundarias (IDS) y las hipogammaglobulinemias (Ig < 4g/l) en pacientes postrasplante de células madre hematopoyéticas o postrasplante cardíaco^{2,3,9,10}. Asimismo, se ha demostrado en estudios clínicos su eficacia como terapia de inmunomodulación en la púrpura trombocitopénica idiopática y en otras patologías de base autoinmune, como el síndrome de Guillain-Barré u otras patologías neuromusculares, las dermatopolimiositis y la enfermedad de Kawasaki^{9-11,15,21}.

En los capítulos siguientes se ofrece una información más detallada sobre las características de Flebogamma® DIF.

..... REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fernández-Cruz E, Alecsandru D, Sanchez Ramón S. Mechanisms of action of immune globulin. *Clin Exp Immunol* 2010;157:1-2.
2. Daeon M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 1997;15:203-34.
3. Samuelsson A, Towers TL, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science* 2001;291:484-6.
4. Basta M. Ambivalent effect of immunoglobulins on the complement system. *Mol Immunol* 2008; 45:4073-9.
5. Hartung HP. Advances in the understanding of the mechanisms of action of IVIG. *J Neurol* 2008; 255:3-6.
6. Godeau B, Bierling P. Treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults. *Presse Med* 2008;37:1292-8.
7. Dalakas M. IVIG in other immunological disorders: current status and future prospects. *J Neurol* 2008;255:12-16.
8. Kieseier BC, Meyer Zu Hörste G, et al. *Curr Opin Neurol* 2008;21:555-62.
9. Carbone J, Sarmiento E, Fernández-Cruz E. Inmunomodulación postrasplante cardíaco. Importancia en la prevención y tratamiento de complicaciones infecciosas. En: Avances en inmunomodulación de las patologías inmunológicas. Fernández-Cruz E (Ed). Letramédica 2011, pp 45-51.
10. Carbone J, Sarmiento E, Del Pozo N, et al. Restoration of humoral immunity after intravenous immunoglobulin replacement therapy in heart recipients with post-transplant antibody deficiency and severe infections. *Clin Transplant* 2012;26:277-83.
11. López-Longo FJ. Inmunomodulación en la dermatopolimiositis. En: Avances en inmunomodulación de las patologías inmunológicas. Fernández-Cruz E (Ed). Letramédica 2011, pp 53-58.
12. Sánchez-Ramón S, García-Segovia A, Moraru M, et al. Inmunomodulación en los fallos de implantación tras fertilización *in vitro* asociada a expansión de linfocitos NK. En: Avances en inmunomodulación de las patologías inmunológicas. Fernández-Cruz E (Ed). Letramédica 2011, pp 59-63.
13. Moraru M, Carbone J, Alecsandru D, et al. Intravenous immunoglobulin treatment increased live birth rate in a Spanish cohort of women with recurrent reproductive failure and expanded CD56(+) cells. *Am J Reprod Immunol* 2012; 68:75-84.
14. García Ruiz de Morales JM. Inmunomodulación en las uveítis recurrentes mediadas inmunológicamente. En: Avances en inmunomodulación de las patologías inmunológicas. Fernández-Cruz E (Ed). Letramédica 2011, pp 65-70.
15. Inmunomodulación con inmunoglobulinas al 10% en enfermedades neuromusculares. En: Avances en inmunomodulación de las patologías inmunológicas. Fernández-Cruz E (Ed). Letramédica 2011, pp 71-77.
16. Berger M; Flebogamma 5% DIF Investigators. A multicenter, prospective, open label, historically controlled clinical trial to evaluate efficacy and safety in primary immunodeficiency diseases (PID) patients of Flebogamma 5% DIF, the next generation of Flebogamma. *J Clin Immunol* 2007;27:628-33.
17. Berger M, Pinciario PJ, Althaus A, et al. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of Flebogamma® 10% DIF, a high-purity human intravenous immunoglobulin in primary immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2010;30:321-9.
18. Berger M. L-prolina-stabilized human IgG: Privigen® 10% for intravenous use and Hizentra 20% for subcutaneous use. *Immunotherapy* 2011;3: 163-76.
19. Helbert M, Farragher A. Subcutaneous immunoglobulin for patients with antibody deficiency. *Br J Hosp Med (Lond)* 2007;68:206-10.
20. Gelfand EW. Differences between IVIG products: impact on clinical outcome. *Int Immunopharmacol* 2006;6:592-9.
21. Julia A, Kovaleva L, Loria S, Alberca I. Clinical efficacy and safety of Flebogamma DIF, a new high-purity human intravenous immunoglobulin, in adult patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Transfus Med* 2009;19:260-8.

Avances en el conocimiento y caracterización de las inmunoglobulinas intravenosas

Juan I. Jorquera

*Director, Área de Investigación y Desarrollo,
Instituto Grifols, Barcelona*

Los avances en el ámbito de la biotecnología son continuos, por lo que hay ocasiones en que, a partir de un hallazgo inesperado, un conocimiento que se creía consolidado, de repente comienza a plantear nuevos interrogantes. Esto ha sucedido recientemente en el ámbito de la caracterización de las inmunoglobulinas intravenosas (IGIV), un terreno en el que se creía que quedaba poco por aprender. Así, hasta hace tan sólo un año, se consideraba que la Farmacopea Europea había conseguido una estandarización de las IGIV prácticamente completa. Sin embargo, en octubre de 2010, el Comité para Productos Medicinales de Uso Humano (Committee for Medicinal Products for Human Use [CHMP]), dependiente de la Agencia Europea del Medicamento (EMA), tomó la decisión de suspender la licencia de comercialización de un producto de IGIV –al cual en este artículo se hará referencia como «Producto A»–, tras confirmarse, según los registros de farmacovigilancia, que su uso se había comenzado a asociar a un alarmante incremento de eventos tromboembólicos (ETE)¹.

Los referidos datos de farmacovigilancia revelaban que, hasta el año 2007, la tasa de ETE en pacientes tratados con Producto A se había mantenido en sus valores basales habituales, es decir, alrededor de un caso por millón y medio de gramos de IGIV infundidas (1/1.500.000 g). No obstante, en 2008 dicha tasa escaló a 1/510.000 g, en 2009 pasó a 1/460.000 g y en el primer semestre de 2010 ascendió a 1/180.000 g; es decir, en sólo tres años se había multiplicado casi por 10¹. Además, el informe del CHMP refería que algunos de los ETE más graves habían sobrevenido en pacientes que no presentaban ningún trastorno concomitante que contribuyera a su aparición. En la Tabla 1 se comparan las tasas de ETE tras la infusión de Producto A, de Flebogamma® y de Flebogamma® DIF (Dual Inactivation and Filtration) durante los últimos años, según los respectivos registros de farmacovigilancia¹.

TABLA 1

Incidencia de eventos tromboembólicos tras la administración de IGIV¹

Producto	Período	Tasa de ETE (millón de gramos infundidos/caso)
Producto A	2005-2007	1,49-1,60
Producto A	2008-2009	0,51-0,46
Producto A	Enero-julio 2010	0,18
Flebogamma®	Febrero 1993/septiembre 2010	6,1
Flebogamma® DIF	Mayo 2007/septiembre 2010	6,0

ETE: eventos tromboembólicos; IGIV: inmunoglobulinas de administración intravenosa.

Con objeto de identificar la causa del incremento de la tasa de ETE tras la infusión de Producto A, se llevaron a cabo dos investigaciones, una en el Paul Ehrlich Institut, el organismo que autoriza la comercialización de los derivados plasmáticos en Alemania, y otra a cargo de la Food and Drug Administration (FDA), la agencia reguladora estadounidense. En condiciones normales, gracias a los procedimientos utilizados en los procesos de fabricación, los productos de IGIV no contienen factores de la coagulación, a excepción de trazas de factor XI (FXI) o FXI activado (FXIa)². Este hecho hizo que, en un primer momento, se sospechara que el referido incremento de la tasa de ETE podría haberse debido a una presencia anormalmente elevada de FXI o de FXIa en el Producto A. Con esta hipótesis en el horizonte, los investigadores del Paul Ehrlich Institut analizaron diversos lotes de éste y otros productos de IGIV mediante el test de generación de trombina (TGT), un prueba de por sí muy sensible para constatar la presencia de FXI y FXIa, pero que modificaron ligeramente con el fin de que permitiera detectar incluso concentraciones ínfimas de estos factores. Los resultados de este estudio demostraron que las muestras de Producto A analizadas contenían, en efecto, concentraciones de FXIa anormalmente elevadas y potencialmente capaces de desencadenar ETE³. Por su parte, los investigadores de la FDA llevaron a cabo un trabajo similar, ya que también analizaron mediante TGT diversos lotes de Producto A presuntamente relacionados con el incremento de las tasas de ETE y obtuvieron resultados consistentes con los del Paul Ehrlich Institut⁴.

Los referidos documentos emitidos por el CHMP incluían también una declaración del propietario de la licencia (Marketing Authorization Holder [MAH]) en la que se explicaba indirectamente por qué a partir del año 2008 el Producto A comenzó a tener una concentración anormalmente elevada de FXIa, tal como demostraban las investigacio-

nes llevadas a cabo por el Paul Ehrlich Institute y la FDA. Hasta ese año, el Producto A se había fabricado exclusivamente en tres plantas de producción: una radicada en Estocolmo (Suecia), otra en Viena (Austria) y otra en Lingolsheim (Francia). Sin embargo, a partir de esa fecha se concedió la autorización para la producción de Producto A en otra planta, esta última localizada en Springe (Alemania), donde se comenzó a emplear un método de fraccionamiento del plasma distinto al utilizado en las otras plantas y que tomaba como punto de partida la fracción I+II+III¹. El método más comúnmente empleado para el proceso de fraccionamiento que utilizan los fabricantes de IGIV es el de Cohn-Onceley. Sin embargo, en la planta de producción de Springe se sustituyó este método por el de Kistler-Nitschmann (KN), que es el utilizado por algunos fabricantes para la producción de inmunoglobulina intramuscular, aunque en este caso lo «armonizaron» (Kistler-Nitschmann Harmonized [KNH]). Además, en los meses siguientes, dado que el nuevo procedimiento lograba un mayor rendimiento de producto final, la sustitución del método de Cohn-Onceley por el de KNH se extendió a las otras tres plantas de producción de Producto A (siendo significativo el hecho de que, paralelamente, la tasa de ETE con el uso de este producto fuera aumentando)¹.

El proceso de fraccionamiento para la producción de inmunoglobulinas es sumamente complejo, aunque, con objeto de simplificar y resaltar las diferencias más importantes entre los métodos referidos, basta con señalar que el método de Cohn-Onceley utiliza como material de partida la fracción II+III y obtiene como producto final un precipitado de fracción II que tiene un rendimiento de alrededor del 60%. En cambio, en el método de KNH utilizado por los fabricantes de Producto A entre 2008 y 2010, el material de partida era un equivalente a la fracción II+III que incluía otra fracción adicional (precipitado A + fracción I), y se obtenía como producto final un precipitado de inmunoglobulinas que tenía un rendimiento de alrededor del 80%⁵.

El tipo de material de partida que se utiliza en el proceso de fraccionamiento de la producción de inmunoglobulinas es relevante, puesto que la fracción I contiene componentes de complemento y cantidades significativas de factores de la coagulación, pero también porque tanto la fracción I como la fracción II+III incluyen proenzimas que, al activarse, promueven procesos de inflamación y coagulación⁵. Además, las serina proteasas que intervienen en los sistemas de complemento y de coagulación tienen la capacidad de activarse mutuamente⁶. Precisamente, con el objeto de eliminar moléculas de factores de la coagulación y otras impurezas, los fabricantes de IGIV suelen añadir etanol al 17% durante el propio proceso de fraccionamiento. Sin embargo, en el caso en cuestión, y según las propias declaraciones de los fabricantes, durante el proceso de producción de Producto A se añadía etanol a sólo el 12%.

Como es obvio, los precipitados de fracción II y de inmunoglobulinas deben ser sometidos a procesos posteriores para obtener IGIV. No obstante, en base a lo que se ha mencionado previamente, puede deducirse que el método utilizado en el proceso de obtención de Producto A permitía a los fabricantes obtener un mayor rendimiento de producto final, aunque con más impurezas. Sin embargo, es un hecho aceptado que, cuando se utilizan los métodos clásicos de producción de inmunoglobulinas intramusculares, el

producto obtenido no debe administrarse por vía intravenosa, ya que puede generar efectos adversos muy graves.

ESTRATEGIAS UTILIZADAS PARA CONSEGUIR QUE LAS INMUNOGLOBULINAS PUEDAN ADMINISTRARSE POR VÍA INTRAVENOSA

Los fabricantes de IGIV utilizan diversas estrategias con el objeto de conseguir que las inmunoglobulinas obtenidas a partir del plasma humano adquieran el perfil de pureza y tolerabilidad requerido para poder administrarse por vía intravenosa. A continuación se mencionan algunas de tales estrategias.

Tratamiento con pH ácido. Este método, que se conoce desde hace unos 50 años, consiste en someter las inmunoglobulinas a un medio ácido, con un pH de 3,8-4, y a una temperatura de 37 °C durante 24 horas⁷. También se han descrito métodos basados en formulaciones con pH ácido (5% de IgG en 10% de maltosa)⁸. El tratamiento con pH ácido es el único método de purificación que se utiliza en la producción de Producto A, mientras que en los demás productos de IGIV disponibles en el mercado se emplean dos o incluso tres métodos con la misma finalidad, lo cual redundaría en una reducción del rendimiento pero permite conseguir un producto final de mayor pureza y reduce el riesgo de efectos adversos como los ETE.

Cromatografía de intercambio iónico. Este método utiliza resinas cargadas positivamente, por lo que filtra las impurezas con carga negativa, como la precalicreína (PKA), el factor II (FII), el factor IX (FIX), el factor X (FX), la inmunoglobulina A (IgA), la inmunoglobulina M (IgM), la albúmina y la transferrina, todas las cuales quedan retenidas en la resina utilizada. Sin embargo, como es lógico, no permite filtrar las impurezas con carga positiva, como el FXI/FXIa, el factor VII activado (FVIIa) y quizás otras, como el factor VII (FVII), el factor XII (FXII) o la calicreína, las cuales estarán presentes en el paso siguiente o incluso, aunque en cantidades muy pequeñas, junto con las inmunoglobulinas –que también están cargadas positivamente–, en la formulación final⁵.

Pasteurización. Esta estrategia, que en el ámbito de las IGIV es utilizada casi de forma exclusiva en la elaboración de los productos de Grifols, es particularmente útil para eliminar microorganismos, pero también es eficaz para inactivar enzimas y eliminar otras impurezas, por lo que permite conseguir un producto final de alta pureza, tal como se detalla más adelante (Figura 1).

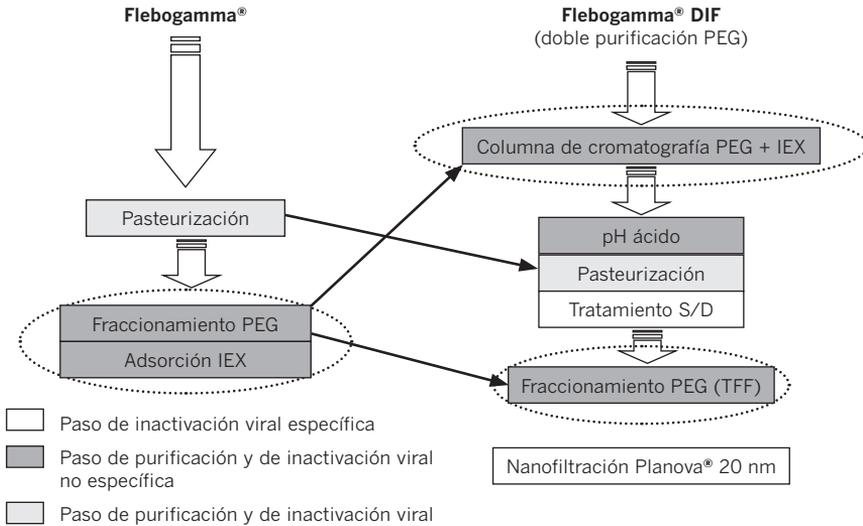
En la Tabla 2 se relacionan los procesos de purificación que se utilizan para la obtención de los principales productos de IGIV disponibles en el mercado, mientras que en la Tabla 3 se detalla el contenido de IgM, de IgA y de albúmina, así como el nivel de pureza de algunos productos de IGIV, según datos de archivo de Grifols.

INVESTIGACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD PROCOAGULANTE DE LOS PROCESOS INTERMEDIOS Y LOS PRODUCTOS FINALES DE IGIV

En Instituto Grifols se ha llevado a cabo una extensa investigación con el objeto de evaluar la actividad procoagulante de los procesos intermedios y los productos finales de

FIGURA 1

Estrategias utilizadas durante la producción de Flebogamma® y Flebogamma® DIF para conseguir que el producto pueda administrarse por vía intravenosa



La pasteurización requiere la eliminación de los agregados (PEG) y permite la obtención de productos de muy alta pureza

IEX: intercambio iónico; PEG: polietilenglicol; S/D: solvente/detergente; TFF: filtración de flujo tangencial.

IGIV. Algunos de los resultados obtenidos, que se describen a continuación, ilustran con claridad los hechos previamente señalados, en particular la presencia y concentración de FXI/FXIa durante las distintas etapas del proceso de producción y en los productos finales de IGIV.

Actividad procoagulante de la fracción II+III

Tal como consta en la bibliografía disponible sobre el tema, en la investigación realizada en Instituto Grifols se ha demostrado, nuevamente, que la fracción II+III del plasma humano es rica en factores de la coagulación (Tabla 4). Algunos de estos factores son proenzimas que no están activadas en el plasma fresco, pero que sí pueden activarse a partir del inicio del proceso de producción de IGIV, lo que explica el motivo por el cual la concentración de FVII puede ser superior en la fracción II+III que en el propio pool de plasma original⁹. De hecho, mediante diversas pruebas para marcadores de activación de la coagulación –algunas de ellas recomendadas por Farmacopea Europea– se ha demostrado que en la fracción II+III están presentes algunos factores de la coagulación activados, como la trombina, la PKA, la calicreína, el antígeno del FXI (FXI:Ag) y, probablemente, el FXIa⁹.

TABLA 2

Procesos de purificación utilizados durante la producción de los principales productos de IGIV disponibles en el mercado

Producto	Primer paso de purificación (eliminación de impurezas gruesas)				Principales pasos de purificación (eliminación de impurezas finas)		
	Etanol				Intercambio aniónico	Intercambio catiónico	Pasteurización + PEG
	Cohn-Oncley	Kistler-Nitschmann	Caprilato	PEG			
Producto A	X	→ X					
Carimune®		X			X		
Privigen®			X		X		
Gamunex®			X		X + X		
Kiovig®	X				X	X	
Gammaplex®	X				X	X	
Claryg®			X		X	X	
Intratec®			X		X	X	
Flebogamma®					X		X
Flebogamma® DIF				X	X		X

PEG: filtrado de polietilenglicol.

Evolución del contenido de factores de la coagulación en proceso de producción y el producto final

En Instituto Grifols se ha analizado el contenido de los factores de la coagulación en las etapas intermedias del proceso de producción y en el producto final de IGIV de Flebogamma® 5% DIF y Flebogamma® 10% DIF. De forma sintética, puede afirmarse que la presencia de estos factores es prácticamente indetectable ya en las primeras etapas de purificación. No obstante, el FXI se comporta de forma un tanto peculiar, ya que no sólo se detecta en el concentrado de ultrafiltración, sino también tras el tratamiento con

TABLA 3

Contenido de albúmina, IgA e IgM, y nivel de pureza de algunos productos de IGIV según datos de archivo de Grifols

Producto	Albúmina (mg/ml)	IgA (mg/ml)	IgM (mg/ml)	Pureza (%)
Flebogamma®	< 0,012	0,01	< 0,002	> 97 ^a
Flebogamma® DIF	< 0,002-0,007	< 0,003-0,01	< 0,002	> 97 ^a
Producto A	0,032	0,07	0,072	> 96
Gamunex®	0,002	0,04	0,003	> 98
Privigen®	< 0,002	0,01	0,049	> 98
Kiovig® y Gammagard® liquid	< 0,011-0,018	0,05	< 0,002	> 98
Gammagard® SD	-	-	-	> 90

^a > 99% de los resultados de caracterización.

TABLA 4

Concentraciones de factores de la coagulación en la fracción II+III en relación con las respectivas concentraciones de éstos en el pool de plasma original⁹

Factor de la coagulación	Concentración en el pool de plasma original	Concentración en la fracción II+III (% en relación con la respectiva concentración en el pool de plasma original)
FII	100	61-68
FVII	100	121-201
FIX	100	67-70
FX	100	15-33
FXI	100	76-92
FXII	100	35-40

pH ácido, para volver a hacerse indetectable más adelante, tras el proceso de pasteurización⁹ (Tabla 5). Estos datos confirman, una vez más, que el tratamiento con pH ácido por sí solo no es capaz de hacer indetectable la presencia de FXI/FXIa, lo que podría

TABLA 5

Concentración de factor XI a lo largo del proceso de producción de Flebogamma® DIF⁹

Intermedio del proceso de producción de Flebogamma® DIF	Concentración de FXI (UI/g proteína total)
Suspensión de fracción II+III	71-88
Filtrado de polietilenglicol (PEG) al 4%	< 0,0025
Efluente dietilaminoetil (DEAE)	< 0,003
Concentrado de ultrafiltración (UFI)	0,4-1,6
Después de tratamiento con pH ácido	< 0,0004-0,8
Después de pasteurización	< 0,0006
Lote de Flebogamma® DIF 10%	< 0,00015
Lote de Flebogamma® DIF 5%	< 0,0003

UI: unidades internacionales.

explicar el motivo por el cual el Producto A, en cuya obtención se utiliza el tratamiento con pH ácido como único método de purificación, puede contener concentraciones de este factor más elevadas que otros productos de IGIV.

Eficacia de la pasteurización como método de purificación

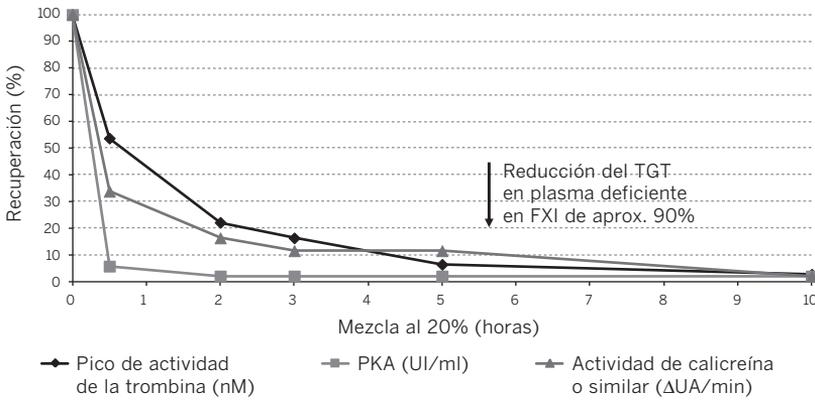
En el año 1999, cuando se comenzó a desarrollar Flebogamma® DIF, ya se había demostrado que la pasteurización, gracias a su capacidad de neutralizar enzimas, constituía una herramienta eficaz para inactivar componentes del complemento, proenzimas coagulantes y otras serina proteasas. Las concentraciones de estos factores son muy reducidas cuando se inicia la pasteurización, en fases ya avanzadas de la producción de Flebogamma® DIF. Por esta razón, para poder evaluar la capacidad de esta estrategia para inactivar factores de la coagulación, fue necesario diseñar y llevar a cabo un experimento consistente en la inoculación de la fracción II+III, rica en factores de la coagulación, justo antes de someter el producto a la fase de pasteurización⁹. El resultado de la cinética de pasteurización fue muy categórico: al cabo de cinco horas de iniciada la pasteurización, es decir, en la mitad de este proceso, la concentración de trombina, PKA y calicreína se reducía en alrededor del 90%, mientras que, al final del mismo, estas proteínas resultaban prácticamente indetectables (Figura 2).

Presencia de factores de la coagulación y otras enzimas procoagulantes en los productos finales

En Instituto Grifols también se llevaron a cabo diversos ensayos para valorar y comparar las concentraciones de factores de la coagulación y otras enzimas procoagulantes en

FIGURA 2

Cinética de la inactivación de los factores de la coagulación durante la pasteurización



En la gráfica se puede apreciar el efecto de la pasteurización en la reducción de la concentración de la trombina, la precaliceína (PKA) y la proteína tipo caliceína. Se utilizaron muestras activadas de laboratorio procedentes de la fracción II+III que se inocularon en el material industrial (20% V/V) antes de la pasteurización.

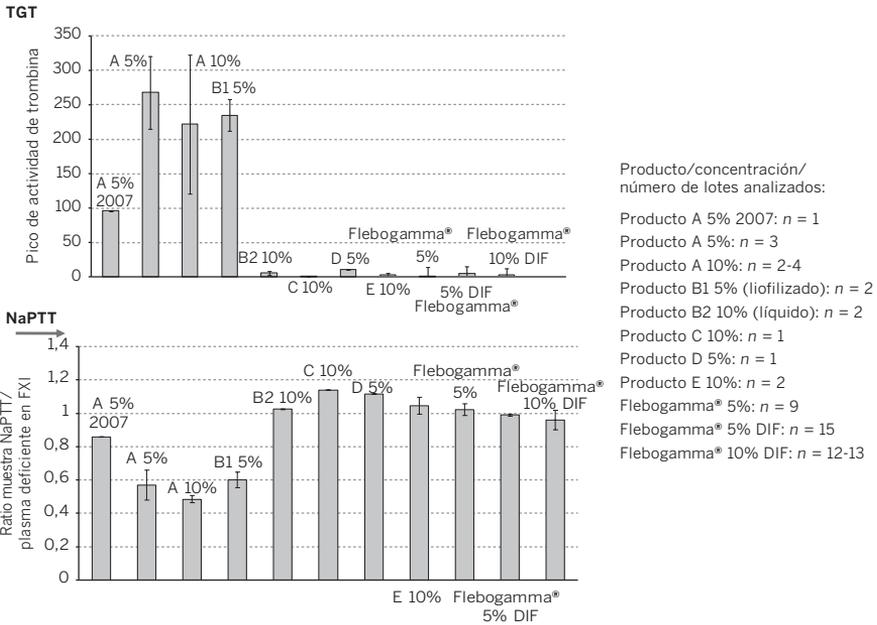
FXI: factor XI; PKA: precaliceína; TGT: test de generación de trombina; UA: unidades amilolíticas; UI: unidades internacionales.

los productos finales de IGIV. En una de ellas, se realizó un TGT en plasma deficiente en FXI en diversos productos de IGIV al 5 y al 10% con el objeto de evaluar el efecto procoagulante que podría tener la presencia de pequeñas concentraciones de FXI/FXIa en los productos comparados. Los resultados de este ensayo pusieron de manifiesto que el pico de actividad de trombina era significativamente elevado en todos los lotes de Producto A evaluados⁹. Además, en un ensayo complementario, se midieron los valores del tiempo de tromboplastina parcial no activada (NaPTT) en plasma deficiente en FXI en los mismos productos finales, obteniéndose en este caso los resultados inversos, aunque de igual significado⁹. Por último, se analizó el contenido de FXI en los mismos lotes de productos de IGIV utilizados en estos ensayos mediante la medición de la actividad coagulante (FXI:C) y de la cantidad de FXI:Ag con el método ELISA, observándose que estos parámetros sólo estaban anormalmente elevados en los lotes de Producto A al 5% fabricados en el año 2010¹⁰ (Figura 3). Cabe remarcar que ninguno de los lotes de Producto A analizados en estos tres ensayos referidos estaba incluido en la lista publicada de lotes relacionados con ETE.

De los resultados de estas pruebas se puede concluir que, aunque los lotes de Producto A analizados no estaban incluidos en la lista de lotes relacionados con ETE, todos ellos tenían marcadores de actividad coagulante e incluso algunos contenían cantida-

FIGURA 3

Test de generación de trombina con plasma deficiente en factor XI en diversos productos finales de IGIV⁹



La gráfica superior representa los resultados obtenidos en el test de generación de trombina (TGT) utilizando plasma deficiente en FXI de diversos productos finales de IGIV. Los valores de pico de actividad de trombina, que en este caso se relacionan con mayores concentraciones de FXI en los productos finales de IGIV evaluados, fueron superiores en el Producto A, sobre todo en los lotes de producto al 5% y al 10% fabricados en el año 2010, aunque también en el lote de Producto A al 5% fabricado en el año 2007 y, curiosamente, también en los lotes de Producto B al 5% liofilizado. Por el contrario, en los demás productos de IGIV evaluados, el pico de actividad de trombina resultó mínimo. La gráfica inferior representa los resultados obtenidos del tiempo de tromboplastina parcial no activada (NaPTT) utilizando plasma deficiente en FXI de los mismos productos de IGIV. En este caso, los resultados fueron inversos a los que enseña la gráfica superior, pero tienen el mismo significado. Es importante señalar que ninguno de los lotes de Producto A evaluados estaba incluido en la lista publicada de lotes de Producto A presuntamente relacionados con eventos tromboembólicos.

des anormalmente elevadas de FXI. Hasta tal punto, que si un adulto fuera tratado con una dosis de 2 g/kg de los lotes de Producto A al 5% del año 2010 analizados, recibiría una infusión de un total de 250 UI; este dato es relevante, puesto que en experimentaciones en modelo chimpancé se ha demostrado que una dosis superior a 40-50 UI puede desencadenar ETE¹¹.

Es importante señalar que los resultados obtenidos en estos ensayos sobre los productos finales de IGIV motivaron una reacción por parte del «Group 6B», un grupo de trabajo

TABLA 6

Parámetros de pureza y caracterización de los productos finales de Flebogamma⁴ 5% DIF y Flebogamma⁴ 10% DIF

Parámetro	Flebogamma [®] 5% DIF (n = 19)	Flebogamma [®] 10% DIF (n = 6)
Pureza (%)	99,6 ± 0,2	99,3 ± 0,2
Monómeros + dímeros (%)	99,8-100	99,9-100
Polímeros (%)	≤ 0,2	0,1 ± 0,02
Formas fragmentadas (%)	< 0,3	< 0,3
Otras proteínas		
IgA (mg/ml)	< 0,003-0,013	< 0,006
IgM (mg/ml)	< 0,002	< 0,002
Transferrina (mg/ml)	< 0,002-0,009	< 0,004-0,007
Albúmina (mg/ml)	< 0,002-0,007	< 0,005

que pertenece a la European Pharmacopoeia Commission y cuya misión es controlar la calidad de los derivados plasmáticos –entre ellos, las inmunoglobulinas–, y en el que está integrado el autor de este artículo. En concreto, en la reunión de abril de 2011, el Group 6B propuso una modificación urgente de la monografía de la Farmacopea Europea, que unos meses después fue aprobada por la European Pharmacopoeia Commission, estimándose que entraría en vigor a mediados de 2012.

CARACTERIZACIÓN DE FLEBOGAMMA[®] DIF

Flebogamma[®] 5% DIF y Flebogamma[®] 10% DIF son productos de IGIV líquidos –no liofilizados–, cuyos niveles de pureza son cercanos al 100%; mediante inmunoelectroforesis, en los productos finales sólo se detecta la banda correspondiente a la inmunoglobulina. En la Tabla 6 se detallan los valores de los principales parámetros de pureza de Flebogamma[®] 5% DIF y Flebogamma[®] 10% DIF. Ambos productos finales están compuestos casi íntegramente por monómeros y dímeros (> 99%), mientras que poseen niveles muy bajos o indetectables de polímeros y formas fragmentadas. En relación con las proteínas acompañantes, los niveles de IgA, IgM, transferrina y albúmina son indetectables o prácticamente indetectables, y el contenido en sodio se encuentra por debajo del límite de cuantificación (< 3,2 mM). Los niveles de activador de preclicreína son indetectables, y la actividad anticomplementaria cumple los requisitos de Farmacopea Europea y son comparables entre ambos productos. La integridad de la región Fc de la inmunoglobulina cumple con los requisitos de Farmacopea Europea tras utilizar como patrón el preparado biológico de referencia estándar (BRP), al que se

TABLA 7

Flebogamma DIF®: PKA, actividad anticomplementaria e integridad de la región Fc

Parámetro	Flebogamma® 5% DIF (n = 19)	Flebogamma® 10% DIF (n = 6)
Precalicrofina (UI/ml)	< 2	< 2
Actividad anticomplementaria (CH ₅₀ /mg Ig)	0,40 ± 0,11	0,58 ± 0,17
Integridad de la región Fc (% en relación con el preparado biológico de referencia estándar)	109 ± 5	104 ± 11

CH₅₀: actividad hemolítica del complemento; UI: Unidades internacionales.

TABLA 8

Subclases de IgG contenidas en Flebogamma® 5% DIF y Flebogamma® 10% DIF

Subclase de IgG	Flebogamma® 5% DIF	Flebogamma® 10% DIF
IgG ₁ (%)	66,7 ± 0,6	66,9 ± 0,6
IgG ₂ (%)	28,2 ± 0,7	27,9 ± 0,7
IgG ₃ (%)	2,6 ± 0,4	2,7 ± 0,4
IgG ₄ (%)	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1

le otorga un valor de integridad del 100%, lo que avala la integridad de la molécula de IgG (Tabla 7). Estas características confieren a Flebogamma® 5% DIF y Flebogamma® 10% DIF una gran estabilidad, gracias a la cual el producto puede mantener sus cualidades hasta 24 meses a temperaturas de entre 2 y 30 °C. En cuanto a los perfiles de subclases de IgG, los de Flebogamma® 5% DIF y Flebogamma® 10% DIF son equivalentes a los fisiológicos (Tabla 8).

Por otra parte, mediante pruebas de neutralización y ELISA se han evaluado los títulos de anticuerpos específicos que contienen Flebogamma® 5% DIF y Flebogamma® 10% DIF (Tabla 9). Con respecto a estos parámetros, cabe señalar que no hay datos uniformes en las comparaciones entre los productos de IGIV de diversos fabricantes y que no se ha llegado a una estandarización internacional completa. De todos modos, la eficacia de los anticuerpos específicos presentes en Flebogamma®

TABLA 9

Títulos de anticuerpos específicos contenidos en Flebogamma® 5% DIF y Flebogamma® 10% DIF

Patógeno/enfermedad	Flebogamma® 5% DIF (n = 19)	Flebogamma® 10% DIF (n = 3-6)
Virus hepatitis B (UI/g)	37 ± 24	70 ± 20
Citomegalovirus (UPEI/ml)	26 ± 5	62 ± 15
Tétanos (UI/ml)	16 ± 3	34 ± 6
Virus de la poliomielitis tipo 1 ^a	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,2
Virus del sarampión ^a	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (UI/ml)	6 ± 1	12 ± 2
Virus de la rubéola (UI/ml)	347 ± 54	709 ± 82
Virus de la varicela (UI/ml)	8 ± 0,9	17 ± 1
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (mg/l)	285 ± 22	1.054 ± 40
<i>Haemophilus influenzae</i> tipo B (mg/l)	15 ± 1	35 ± 7
Virus vaccinia (UI/ml)	20,7 ± 7,16	-

^a Ratio frente a preparado de referencia CBER (Center for Biologics Evaluation and Research).

Para medir las concentraciones de estos anticuerpos específicos se utilizaron pruebas de ELISA, excepto para los anticuerpos contra los virus de la poliomielitis tipo 1, sarampión, difteria y vaccinia, para los cuales se utilizaron ensayos de neutralización.

UI: unidades internacionales; UPEI: unidad Paul Erlich Institut.

5% DIF y Flebogamma® 10% DIF ha sido demostrada ampliamente en ensayos clínicos^{12,13}.

Por último, es destacable el hecho de que las inmunoglobulinas contenidas en Flebogamma® 5% DIF y Flebogamma® 10% DIF no se alteran tras ser transferidas a bolsas de polipropileno en condiciones adecuadas de esterilidad, ni muestran modificaciones tras permanecer almacenadas durante 15 días a temperaturas de entre 2 y 30 °C, lo que permite preparar y conservar las dosis exactas que requiere cada paciente antes de recibir la medicación.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece su valiosa colaboración a Maite López, Pere Ristol, Marta José, Nuria Marzo, Marta Carretero y Mariona Bono.

..... REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. <http://www.ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/ho17601.htm>.
2. Alving BM, Tankersley DL, Mason BL, et al. Contact-activated factors: contaminants of immunoglobulins preparations with coagulant and vasoactive properties. *J Lab Clin Med* 198;96:334-46.
3. Grundmann C, Kusch M, Keitel S, et al. Modified thrombin generation assay: application to the analysis of immunoglobulin concentrates. *WebMedCentral IMMUNOTHERAPY* 2010; 1(11):WMC001116.
4. Ovanesov M. FDA – PPTA Workshop: Risk Mitigation Strategies to Address Procoagulant Activity in Immune Globulin Products, May 17, 2011, Bethesda, MD. <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/NewsEvents/WorkshopsMeetingsConferences/ucm259254.htm>
5. Curling J (Ed.) *Methods of Plasma Protein Fractionation*. London: Academic Press, 1980.
6. Amara U, Flierl MA, Rittirsch D, et al. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J Immunol* 2010;185:5628-36.
7. Barandun S, Kistler P, Jeunet F, et al. Intravenous administration of human gammaglobulin. *Vox Sang* 1962;7:157.
8. Tenold RA. US Patent 4396608, 1983.
9. José M, Marzo N, Bono M, et al. Pasteurization inactivates clotting enzymes during Flebogamma® and Flebogamma® DIF production *WebMedCentral IMMUNOTHERAPY* 2011;2(5):WMC001917.
10. Marzo N, José M, Lopez L, et al. Quantitative determination of relevant amounts of blood coagulation factor XI activity in a specific brand of intravenous immunoglobulin. *WebMedCentral IMMUNOTHERAPY* 2011;2(5):WMC001922.
11. ten Cate H, Biemond BJ, Levi M, Wuillemin WA, Bauer KA, Barzegar S, et al. Factor XIa induced activation of the intrinsic cascade in vivo. *Thromb Haemost* 1996;75:445-9.
12. Ballow et al. Clinical experience with Flebogamma® 5% DIF: a new generation of intravenous immunoglobulins in patients with primary immunodeficiency disease. *Clin Exper Immunol* 2009;157:22-5.
13. Berger M, Pinciario PJ, Althaus A, et al. Efficacy, pharmacokinetics, safety, and tolerability of Flebogamma 10% DIF, a high-purity human intravenous immunoglobulin, in primary immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2010;30:321-9.

Ensayos clínicos con inmunoglobulinas intravenosas de última generación: experiencia con Flebogamma® 10% DIF en inmunodeficiencias primarias

Paul J. Pinciario

*Director of Clinical Development & Pharmacovigilance
Grifols Biologicals Inc., Baltimore, Maryland, EEUU*

ANTECEDENTES

Durante los años 1998-1999 se produjo en EEUU un drástico desabastecimiento de inmunoglobulinas intravenosas (IGIV). Su causa radicaba en que los médicos habían comenzado a generar una cantidad muy elevada de prescripciones para indicaciones no aprobadas (*off-label*), por lo que los fabricantes locales no llegaban a cubrir la demanda. Como resultado de ello, emergió un auténtico «mercado negro» de IGIV y, lo que es peor, muchos pacientes con inmunodeficiencias primarias (IDP) se quedaron sin acceso a su medicación. Con el objeto de diseñar estrategias que permitieran incrementar el suministro de IGIV, la Fundación de Inmunodeficiencias (Immune Deficiency Foundation [IDF]), una organización estadounidense que agrupa a pacientes con IDP, patrocinó, juntamente con la Food and Drug Administration (FDA), una serie de reuniones de trabajo a las que también fueron invitados numerosos inmunólogos, algunos de ellos de amplio reconocimiento en su país. El planteamiento inicial de la IDF era solicitar ayuda a los fabricantes de otros países que ya tuvieran productos aprobados, con el objeto de que los exportaran a EEUU.

Tras algunos meses de debate, la FDA propuso que el tratamiento con un producto de IGIV importado del exterior debía proporcionar el beneficio de una tasa máxima de 1 infección bacteriana grave/paciente/año. Con este objetivo, se consultó al panel de expertos si era posible recabar alguna información que aportara evidencia sobre la tasa de infecciones bacterianas graves en pacientes con inmunodeficiencia variable común (IDVC) –una de las IDP más frecuentes– antes y después del diagnóstico y del tratamiento con IGIV. Y en respuesta a ello, la Prof. Charlotte Cunningham-Rundles, de la Mount Sinai School of Medicine de Nueva York, una de las especialistas con mayor experiencia en estos temas en el ámbito internacional, investigó y aportó datos basados en unos 40 pacientes con IDVC que demostraban que, en efecto, mediante el diagnóstico

y el tratamiento con IGIV se conseguía reducir claramente la tasa de infecciones bacterianas graves en pacientes con este trastorno.

En marzo de 2000, el comité asesor de derivados plasmáticos (Blood Product Advisory Committee) de la FDA dio a conocer el nuevo diseño de estudio clínico mínimo (salvo que se propusiera y aceptara otro) que los fabricantes del extranjero estaban obligados a llevar a cabo si deseaban obtener la aprobación de un producto de IGIV suyo en EEUU. Este diseño consistía en un estudio central de fase II/III en el que debían participar un mínimo de 50 pacientes con IDP, en el que bastaba incluir una sola rama de tratamiento y en el que se evaluaran tres componentes: la seguridad, la eficacia y la farmacocinética del producto de IGIV utilizado.

Esta nueva propuesta de la FDA hizo posible que a partir de entonces se pusieran en marcha, sucesivamente, tres estudios centrales para evaluar la eficacia, la seguridad y las características farmacocinéticas de tres productos de IGIV de Grifols en pacientes con IDP en EEUU. Estos estudios concluyeron con éxito y permitieron, respectiva y sucesivamente, la aprobación de Flebogamma® 5%¹, Flebogamma® 5% DIF (que incorpora el proceso dual de inactivación y nanofiltración [*Dual Inactivated plus nanoFiltration*: DIF])² y Flebogamma® 10% DIF³. A continuación se describen los aspectos más relevantes del estudio en el que se evaluó este último producto.

ESTUDIO CENTRAL CON FLEBOGAMMA® 10% DIF REALIZADO EN EEUU

Diseño y criterios de valoración

El ensayo de referencia, conocido entre los investigadores como «Study IG-304», fue un estudio central de fase II/III que se llevó a cabo en seis centros de tratamiento de EEUU, incluyó un solo grupo de tratamiento y tuvo como objetivo evaluar la seguridad, la eficacia y la farmacocinética de Flebogamma® 10% DIF. Aunque se esperaba reclutar 50 pacientes, al final sólo pudieron participar 46. La pauta de dosificación fue de 300-600 mg/kg/mes, que se administraban mediante infusiones cada tres o cuatro semanas. En total, se administraron 13-17 infusiones por paciente, por lo que en algunos casos el tratamiento excedió el año de duración inicialmente previsto para el estudio.

El criterio de valoración primario de eficacia fue un máximo de una infección bacteriana grave por paciente al año, de acuerdo con los criterios de la FDA⁴. Se consideraban como infecciones bacterianas graves la neumonía, la sepsis/bacteriemia, la artritis séptica/osteomielitis, los abscesos viscerales y la meningitis bacteriana. La FDA impuso parámetros muy rigurosos para validar el diagnóstico de estas patologías. Por ejemplo, para validar el diagnóstico de neumonía era necesario detectar y aportar hallazgos físicos y/o radiográficos compatibles con esta enfermedad, un recuento leucocitario elevado correspondiente al doble de lo normal o bien uno de neutrófilos equivalente a más de 5.000 células por encima del valor de cribado.

El criterio de valoración primario de seguridad fue una tasa de efectos adversos (EA) por infusión de IGIV inferior al 40% (límite superior del intervalo de confianza [IC] del

95%). Con tal objetivo, se diseñó un algoritmo especial para clasificar estos EA como leves, moderados o graves (ver apartado «Resultados de seguridad»). De forma sistemática, se llevaban a cabo análisis de sangre para obtener los valores de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), lactato deshidrogenasa (LDH), bilirrubina, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, hemograma completo y antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (VHB)(HBsAg). También se realizaban pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para virus de la hepatitis C (VHC) y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Los parámetros farmacocinéticos se evaluaron en un subgrupo de 19 pacientes tras las infusiones séptima o novena, con el doble objetivo de garantizar la existencia de un período de reposo farmacológico adecuado con respecto al producto anterior y un período de captación suficiente para el nuevo producto. En estas evaluaciones se valoraban la concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$), el tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$), la vida media y el área bajo la curva en un intervalo de tiempo ($AUC_{d\acute{i}as\ 0-28}$) de la inmunoglobulina (Ig) total, las subclases de Ig y los anticuerpos contra el citomegalovirus (CMV), el tétanos, el VHB (HBsAb) y el *Streptococcus pneumoniae*.

Los criterios de valoración secundarios correspondían a la pérdida de días laborales, escolaridad o actividades habituales; los días de hospitalización; el número de episodios de otras infecciones validadas; las visitas a servicios de urgencias y/o las visitas no programadas a médicos, así como los días de tratamiento o profilaxis con antibióticos orales o parenterales.

Criterios de inclusión y de exclusión

Los criterios de inclusión fueron muy rigurosos. Los pacientes debían tener una edad de tres o más años y un peso corporal superior a 27,5 kg, o bien superior a 37 kg si se preveía su reclutamiento en el subgrupo de evaluaciones farmacocinéticas. Estos requisitos procedían mayoritariamente de las juntas de revisión institucional o de los comités de ética de los hospitales locales, los cuales deseaban asegurarse de que los pacientes tuvieran el peso corporal mínimo necesario para reponerse de las numerosas extracciones de sangre a las que serían sometidos.

En cuanto a las patologías, los pacientes debían tener el diagnóstico de los siguientes trastornos que integran las IDP: IDVC, agammaglobulinemia ligada a X (ALX) o autosómica, síndrome de hiper-IgM o inmunodeficiencia combinada grave, descartándose las deficiencias aisladas de una sola subclase de Ig. También debían haber recibido IGIV al menos durante los últimos tres meses, así como mantener un nivel sérico valle o mínimo de Ig no menor de 300 mg/dl por encima de sus niveles basales históricos. Por último, era necesario que se pudieran documentar sus mínimos de IgG en dos tratamientos consecutivos previos al estudio, simplemente para poder compararlos con los de las evaluaciones posteriores. En la Tabla 1 se detallan las características demográficas de los participantes en el estudio.

Entre los criterios de exclusión, se requirió que los pacientes no tuvieran antecedentes de reacciones adversas graves tras la infusión de sangre o hemoderivados, ni intoleran-

TABLA 1

Características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio

Parámetro demográfico	n
Población total	46
Sexo	
Varones	30
Mujeres	16
Raza	
Caucásica	44
Hispanos	2
Tipo de IDP	
IDVC	37
ALX	8
Otras ^a	1
Intervalo de dosis	
3 semanas	16
4 semanas	30
Media de edad (años)	36,8 (rango: 6,0-65,0)
Media de peso basal (kg)	76,3 (rango: 31,3-132,7)

^a Ataxia-teleangiectasia.

ALX: agammaglobulinemia ligada a X; IDP: inmunodeficiencia primaria; IDVC: inmunodeficiencia variable común.

cia a la fructosa o al sorbitol, ya que en la formulación de Flebogamma® 10% DIF se utiliza sorbitol como estabilizador. Tampoco podían tener un déficit selectivo de IgA o anticuerpos anti-IgA detectables. Y en los tres meses previos a su incorporación no debían haber recibido ningún otro fármaco en investigación ni haberse expuesto a ningún otro hemoderivado, a excepción de la globulina sérica inmune. Las mujeres no podían estar embarazadas ni en fase de lactancia. Se realizaron pruebas iniciales de infección por VHC, VHB y VIH para descartar a todos los candidatos que dieran positivo en alguna de ellas. Durante el estudio se analizaban los valores de ALT, AST y LDH, y si alguno de éstos era > 2,5 veces el basal, el paciente quedaba excluido. También se excluyó a los pacientes que padecían insuficiencia renal, a los que tenían trastornos agudos o crónicos que pudieran interferir en el estudio (trastornos renales o que predisponen a éstos, enfermedad coronaria y trastornos asociados a pérdida de proteínas) o

TABLA 2

Dosis y velocidad de infusión de Flebogamma® 10% DIF empleadas a lo largo del estudio²

Fase de infusión	Velocidad de infusión (ml/kg/min) ^a	Dosis (mg/kg/h)
Inicio	0,01	60
Incremento a:	0,02	120
	0,04 ^b	240
	0,06	360
	0,08	480

^a Los incrementos de velocidad se realizaban cada 30 minutos.

^b A partir de 0,004 ml/kg/min debía incrementarse la velocidad, a intervalos de 30 minutos, hasta llegar a la velocidad máxima de 0,08 ml/kg/min o hasta que se detectara y registrara la presentación de un efecto adverso.

antecedentes de trombosis venosa profunda o de complicaciones tromboticas del tratamiento con IGIV, así como a los que recibían tratamiento sistemático con ácido acetilsalicílico, paracetamol, otros antiinflamatorios no esteroideos, antihistamínicos o, en fin, cualquier medicación que pudiera enmascarar la aparición de EA tras la infusión de IGIV. En la práctica, este último requisito, muy importante para la FDA, restringió el reclutamiento a pacientes que no recibían ningún otro tipo de tratamiento (aunque, si tras iniciar el estudio, un paciente presentaba un mismo EA en dos o tres oportunidades, a partir de entonces podría recibir premedicación sistemática para prevenirlo). Por último, no podían participar en el estudio los sujetos que padecieran leucemia linfocítica crónica, linfoma, mieloma múltiple, neutropenia crónica o sida, ni aquellos que estuvieran recibiendo tratamiento con corticosteroides (a largo plazo, con dosis de prednisona ≥ 1 mg/kg/día o equivalente), inmunosupresores o inmunomoduladores.

Precisiones sobre la velocidad de infusión

La FDA tenía un interés particular en determinar hasta qué punto era posible incrementar la velocidad de infusión sin que aparecieran EA, es decir, establecer lo que se denomina «ajuste de la velocidad de infusión» (*forced upward titration*). Por esta razón, se solicitó que, en todas las infusiones practicadas a lo largo del estudio, cada vez que, conforme se iba incrementando la velocidad de infusión, ésta llegaba a 0,04 ml/kg/min, se continuara aumentándola en 0,02 ml/kg/min cada 30 minutos hasta alcanzarse la velocidad máxima prevista, es decir, 0,08 ml/kg/min, o bien hasta que apareciera algún EA. En la Tabla 2 se detalla la velocidad de infusión y las dosis de IGIV utilizadas en el estudio.

Resultados de eficacia

Por lo que respecta al criterio de valoración primario de eficacia, sólo se produjo un episodio de neumonía en un paciente, lo que situó la tasa de infecciones bacterianas graves en 0,021 paciente/año. Este dato fue muy positivo, porque el umbral de beneficio fijado por la FDA era, como ya se ha mencionado, de 1 infección/paciente/año.

En cuanto a los criterios de valoración secundarios, los resultados también fueron positivos. La media de incidencia de otras infecciones (distintas de las bacterianas graves) documentadas por fiebre y/o radiografía fue de 0,2 episodios por sujeto/año. El 43% de los pacientes informaron haber perdido al menos un día de actividades laborales o escolares al año, y la media de días perdidos de actividad laboral/escolar/habitual fue de 3,2 días/sujeto/año. A este respecto, es interesante señalar que los trabajadores de EEUU pierden una media de 8,5 días de trabajo/año, es decir, varios días más que los que pierden los pacientes con IDP adecuadamente tratados con IGIV. Por otra parte, el 54,3% de los pacientes que participaron en el estudio tuvieron que realizar al menos una visita a urgencias o no programada a un médico, y la media de este tipo de consultas fue de 2,1 por paciente/año. Este dato también es de sumo interés, ya que la media de visitas no programadas al médico en la población general de EEUU es de 3/año, es decir, superior a la de los pacientes con IDP adecuadamente tratados con IGIV.

Resultados de seguridad

La FDA también había manifestado un especial interés en evaluar los EA que se presentaran durante las infusiones y en los 60 minutos siguientes a la administración. Estos EA fueron clasificados como «leves» cuando no requerían tratamiento más allá de la administración de fármacos sin prescripción; como «moderados» cuando se debía disminuir la velocidad o interrumpir temporalmente la infusión, requerían un tratamiento breve y no generaban secuelas, y como «graves» cuando requerían la interrupción de la infusión, un tratamiento con fármacos con prescripción y/o generaban secuelas. Para evaluar estos EA se elaboró un algoritmo específico (Tabla 3).

Los EA que se presentaban después de 60 minutos tras finalizada la infusión también se clasificaban, aunque en este caso se consideraban «leves» cuando se resolvían de forma espontánea o no requerían tratamiento más allá de medicación sin prescripción; como «moderados» cuando requerían el uso de fármacos con prescripción pero no generaban secuelas, y como «graves» cuando requerían consulta con un profesional sanitario o generaban secuelas.

A lo largo del estudio se realizaron un total de 601 infusiones en 46 sujetos. De éstas, 208 (34%) se asociaron a uno o más EA –con independencia de su causa–, mientras que 166 (27,6%) se asociaron a uno o más EA relacionados con el tratamiento. Cuarenta y cinco sujetos (aproximadamente el 98%) tuvieron un total de 723 EA –con independencia de su causa–, y de éstos, 291 ocurrieron durante las infusiones o en las 72 horas siguientes, lo que situó la tasa global de EA con asociación temporal a la infusión en 0,48 (291/601).

TABLA 3

Algoritmo elaborado para evaluar la gravedad de los efectos adversos que se generaban durante las infusiones y en los 60 minutos posteriores

Signo/síntoma	Leve	Moderado	Grave
Cardiovasculares			
Taquicardia	FC 1,2-1,4 veces > basal	FC 1,4-1,6 veces > basal	FC > 1,6 veces > basal
Arritmia	Ocasional, asintomática (no presente antes de la infusión)	Continua, < 1/min y asintomática	Continua, > 1/min o sintomática
Hipotensión (caída en PA sistólica o diastólica)	10-15% ^a	16-25%	> 25%
Hipertensión (aumento en PA sistólica o diastólica)	20-25%	26-30%	> 30%
Alérgicos			
	Prurito sin erupciones	Erupciones con prurito, taquipnea con FR 1,3-2 veces basal, presión torácica sugestiva de broncoespasmo	Urticaria, taquipnea con FR > 2 veces basal, broncoespasmo, laringoespasmo, angioedema, shock circulatorio (hipotensión grave)
Sistémicos			
Fiebre	37,7-38,4 °C	38,5-40,0 °C	> 40,0 °C
Escalofríos	Leves, sensación de frío	Sacudidas intermitentes	Sacudidas continuas, piel húmeda y fría
Dolor de cabeza	Molesto, pero no requiere medicación	Responde a tratamiento sin opiáceos	Requiere analgesia con opiáceos o persiste a pesar del tratamiento
Otro tipo de dolor	Molesto, pero no requiere medicación	Tratamiento con medicación que no requiere prescripción	Tratamiento con fármacos que requieren prescripción y/u opiáceos
Náuseas	Molestas, pero no requieren medicación	El paciente puede ingerir líquidos sin medicación antiemética	El paciente no puede ingerir líquidos y/o requiere medicación antiemética
Vómitos	Un episodio	Dos episodios	Tres episodios o más

^a Si no se acompaña de un incremento de la frecuencia cardíaca y el sujeto se encuentra bien o durmiendo no se clasifica como efecto adverso.

FC: frecuencia cardíaca; FR: frecuencia respiratoria; PA: presión arterial.

TABLA 4

Porcentaje de infusiones durante las cuales se produjeron efectos adversos relacionados con el tratamiento (excluyendo las infecciones)^a

Causa de los EA	Período ventana	Número de infusiones con EA	Porcentaje
Con independencia de su causalidad	Durante la infusión	162	27,0
	En el término de 72 h	208	34,6
Relacionados con el tratamiento	Durante la infusión	120	20,0
	En el término de 72 h	166	27,6

^a Sobre un total de 601 infusiones.

EA: efectos adversos.

En conjunto, se registraron 309/723 (51,4%) EA relacionados con el tratamiento en todos los puntos temporales. Resulta interesante señalar que el número de EA relacionados con el tratamiento por sujeto se redujo progresivamente entre la primera infusión y la última, lo que sugiere que, cuando se cambia de IGIV al 5% a IGIV al 10%, podría ser aconsejable reducir la velocidad de administración durante las primeras dos infusiones, es decir, hasta que el paciente comience a tolerarlas.

La mayor parte de los EA no se relacionaron con el fármaco en estudio y fueron leves o moderados, ya que se resolvieron durante la infusión y no produjeron secuelas. Tres sujetos tuvieron que abandonar el estudio debido a EA, aunque ninguno de ellos presentó valores consistentes, clínicamente significativos, en ninguno de los parámetros de laboratorio analizados, incluida la creatinina sérica. Tampoco se observaron conversiones séricas en las pruebas para detectar infección por VHB, VHC o VIH. Además, tanto en las pruebas de laboratorio como en los signos vitales, en los niveles valle de IgG y en el resto de las pruebas inmunológicas practicadas durante el estudio no se detectaron señales preocupantes con respecto a la seguridad de los pacientes que recibían infusiones de Flebogamma® 10% DIF en dosis de 300-600 mg/kg.

Resulta ilustrativo analizar la incidencia de EA desde perspectivas diferentes. Así, el porcentaje de infusiones durante las cuales se produjeron EA relacionados con el producto (excluyendo las infecciones) fue del 20%, un valor que ascendía al 27% si a estos EA se sumaban los acaecidos en las 72 horas posteriores a cada infusión (Tabla 4). Así también, es interesante resaltar que la tasa de EA por sujeto fue más elevada cuanto mayor era la velocidad de infusión del producto, situándose en el 23,9% cuando ésta era < 0,02 ml/kg/min y alcanzando el 44% cuando la velocidad de infusión superaba los 0,06 ml/kg/min (Tabla 5).

TABLA 5

Relación entre efectos adversos y velocidad de infusión

Velocidad de infusión (ml/kg/min) (n = 34-46)	< 0,02	0,02-0,04	0,04-0,06	0,06-0,08 ^a
Sujetos con al menos un EA (%)	23,9	27,9	40,9	44

^a En algunas infusiones se superó el límite de velocidad de 0,08 ml/kg/min.

EA: efecto adverso.

TABLA 6

Efectos adversos graves registrados durante el estudio

Edad (años)/sexo	Diagnóstico	Efecto adverso grave
18/varón	ALX	Dos hospitalizaciones por depresión y consumo excesivo de drogas
38/mujer	IDVC	Una hospitalización por dolor abdominal agudo intenso y reparación quirúrgica de una hernia previa
58/mujer	IDVC	Una hospitalización para intervención quirúrgica por sinusitis grave con antecedentes de este trastorno
48/varón	IDVC	Un episodio de neumonía que requirió una hospitalización, dos episodios de celulitis por <i>S. aureus</i> y un absceso subcutáneo

Nota: Del total de ocho EA graves registrados a lo largo del estudio, sólo un episodio de neumonía se consideró como posiblemente relacionado con el tratamiento.

ALX: agammaglobulinemia ligada a X; EA: efectos adversos; IDVC: inmunodeficiencia variable común.

Los EA relacionados con el tratamiento fueron los característicos de las IGIV. Los más frecuentes fueron cefalea, escalofríos intensos de comienzo brusco y pirexia, que se presentaron, respectivamente, en el 11, el 6 y el 5% de las infusiones. Durante el estudio se registraron ocho EA graves sobre un total de cuatro pacientes, aunque sólo uno de ellos, el episodio de neumonía referido anteriormente, se consideró como posiblemente relacionado con el tratamiento (Tabla 6).

Resultados farmacocinéticos

El subgrupo en el que se evaluaron las características farmacocinéticas correspondientes a Flebogamma® 10% DIF estaba compuesto por 19 pacientes. Las concentraciones de Ig total, subclases de IgG e IgG contra antígenos específicos siguieron patrones similares y no aportaron ninguna evidencia de acumulación excesiva o metabolismo inducido. Los niveles mínimos de IgG presentaron pequeñas variaciones con el cambio del tratamiento previo a Flebogamma® 10% DIF. La media de los niveles de IgG fue superior en los sujetos infundidos cada cuatro semanas que en aquellos infundidos cada tres semanas. Según nuestra experiencia, estos últimos sujetos metabolizarían el producto con mayor velocidad, y por ello deben ser infundidos a intervalos menores. Además, en estos pacientes, la media de la vida media de la mayoría de los anticuerpos específicos resultó claramente inferior que la de la IgG total, mientras que en los pacientes infundidos cada cuatro semanas esta diferencia no fue tan evidente.

Resumen de los resultados

Eficacia

- La tasa de infecciones bacterias graves fue globalmente de 0,021 por paciente/año, muy inferior al máximo de 1 por paciente/año requerida por la FDA.
- El número de días laborales/escolaridad/actividades habituales perdidos, el de hospitalizaciones, el de visitas a urgencias y visitas no programadas a médicos, así como el de otras infecciones, fueron muy bajos.
- La mayoría de los episodios para los que se requirió la administración de antibióticos se caracterizaron por síntomas de tipo gripal y/o afectaban a las vías respiratorias superiores.

Seguridad

- Los EA asociados a Flebogamma® 10% DIF sugieren que este producto tiene un perfil de seguridad similar al que se observa normalmente en otros preparados de IGIV aprobados.
- La tasa de EA asociados a la primera infusión (1,2 EA/sujeto) fue superior a las asociadas a todas las infusiones subsiguientes.
- La tasa de EA asociados a las infusiones se redujo progresivamente a partir de la primera infusión, en ningún caso se situó por encima de 0,7 EA/sujeto y descendió a su mínimo valor en la última infusión (0,275 EA/sujeto).
- La doble inactivación viral y el proceso de nanofiltración a los que se somete Flebogamma® 10% DIF durante su elaboración sugieren que este producto tiene un bajo riesgo de transmisión de VHB, VHC y VIH.

Características farmacocinéticas

- Las concentraciones de IgG total, subclases de IgG y anticuerpos contra antígenos específicos demuestran que Flebogamma® 10% DIF tiene un comportamiento farmacocinético normal.
- Las mediciones de $C_{\text{máx}}$, $T_{\text{máx}}$, AUC y semividas resultan similares a los de otros productos de IGIV disponibles en el mercado.

Conclusiones del estudio

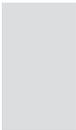
- Este estudio, realizado según las normas de buena práctica clínica, demuestra la seguridad y la eficacia de Flebogamma® 10% DIF.
- Flebogamma® 10% DIF puede sustituir de forma segura a otros productos de IGIV ya aprobados en el tratamiento de las IDP.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece su valiosa colaboración a Melvin Berger, Arthur Althaus, Mark Ballow, Akhil Chouksey, James Moy, Hans Ochs y Mark Stein.

..... REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berger M, Pinciaro P. Safety, efficacy, and pharmacokinetics of Flebogamma 5% [immune globulin intravenous (human)] for replacement therapy in primary immunodeficiency diseases. *J Clin Immunol* 2004;24:389-96.
2. Berger M A multicenter, prospective, open label, historically controlled clinical trial to evaluate efficacy and safety in primary immunodeficiency diseases (PID) patients of Flebogamma® 5% DIF, the next generation of Flebogamma®. *J Clin Immunol* 2007;27:628-33.
3. Berger M, Pinciaro P, Althaus A, et al. Efficacy, pharmacokinetics, safety, and tolerability of Flebogamma 10% DIF, a high-purity human intravenous immunoglobulin, in primary immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2010;30:321-9.
4. US FDA. Guidance for industry: safety, efficacy and pharmacokinetics studies to support marketing of immune globulin intravenous (human) as replacement therapy for primary immune deficiency, www.fda.gov/cber/gdlms/givimmuno.htm.



**Progresos en terapias
inmunomoduladoras con vacunas
de mucosas en patologías infecciosas**

Nuevas bases científicas para la utilización de vacunas de mucosas en la clínica

**Eduardo Fernández-Cruz¹, Diana Alecsandru¹,
Carmen Rodríguez-Sainz¹ y José Luis Subiza²**

¹Servicio de Inmunología Clínica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid

²Servicio de Inmunología, Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid

En la última década, el tratamiento de inmunoterapia con nuevos inmunógenos bacterianos está emergiendo como una alternativa terapéutica capaz de estimular la inmunidad innata y la adaptativa específica de sujetos con diversas patologías. Recientemente, se ha propuesto la inmunización vía mucosa sublingual como la modalidad alternativa de vacunación por la vía de las mucosas que ofrece mayores ventajas para la inmunización frente a antígenos y alérgenos en el tratamiento de alergias e infecciones respiratorias¹⁻⁵.

La atención sanitaria de las enfermedades infecciosas respiratorias recurrentes (IRR) de las mucosas de las vías altas y bajas supone un elevado consumo del tiempo de los profesionales y del presupuesto que dedica el Sistema Nacional de Salud (SNS). Entre estas patologías, se encuentran de forma prevalente la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la cual, según la estimación de recientes estudios epidemiológicos, afecta a más del 10% de la población adulta de entre 40 y 80 años de edad^{9,10}. Además, debido a la persistencia del tabaquismo en los jóvenes, la Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que la EPOC pasará de ser la cuarta causa de muerte, a nivel mundial, a ser la tercera en el año 2020, después de la enfermedad cerebrovascular y la cardiopatía isquémica¹¹.

Las infecciones bacterianas del tracto respiratorio son un factor de riesgo bien establecido para el desarrollo de las IRR y de las exacerbaciones de la EPOC. La infección es causa del 75% de las agudizaciones de la EPOC, siendo las bacterias las responsables de la mitad de las agudizaciones de causa infecciosa, principalmente *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* y *Chlamydia pneumoniae*. Sin embargo, en el paciente con EPOC grave y con una agudización que requiere ventilación asistida, la infección puede estar causada por *Pseudomonas aeruginosa*. El resto de las

agudizaciones infecciosas están causadas por virus, en ocasiones asociados a bacterias, o excepcionalmente por otros microorganismos¹².

Las modalidades de tratamiento actuales de las neumonías de repetición y exacerbaciones de la EPOC consisten en un abordaje preventivo en la fase precoz con medidas socioambientales (prevención primaria destinada a promover el abandono del tabaco y la realización de ejercicio físico) e intervenciones de cribado «oportunistas» (prevención secundaria destinada a reducir el infradiagnóstico mediante la detección precoz de la enfermedad). En la fase en la que ya se ha iniciado el proceso, se emplean medidas de tratamiento farmacológico (antibioticoterapia, broncodilatadores y corticoterapia) y vacunaciones antígeno-específicas (vacuna con polisacárido capsular del neumococo y vacuna antigripal). Sin embargo, la enfermedad crónica inflamatoria pulmonar eventualmente progresa a la fase avanzada o de secuelas, lo cual conduce a una involución del tejido pulmonar con deterioro severo de la función pulmonar y enfisema grave con una limitación importante de la actividad física, generalmente acompañada de incapacidad y depresión, y además se caracteriza por una respuesta al tratamiento parcial o incompleta.

Por todo ello, la prevención y el tratamiento adecuado de estas infecciones podrían constituir una modalidad terapéutica prioritaria para prevenir el desarrollo de estas patologías. Cualquier intervención que reduzca la incidencia de infecciones puede tener un gran impacto en la morbilidad y en la calidad de vida de los afectados, además de incidir directamente en el consumo de recursos sociosanitarios. Por consiguiente, el planteamiento de la identificación y el desarrollo de alternativas terapéuticas preventivas para evitar el desarrollo de las IRR está muy justificado. Sin embargo, en la actualidad se cuenta con escasas evidencias de la existencia de modalidades de tratamiento que puedan evitar la incidencia de las IRR en estos pacientes.

A continuación se describe la justificación científica de una nueva modalidad de tratamiento que consiste en la utilización de vacunas bacterianas de mucosas para la prevención de las IRR y se resumen los resultados de un número limitado de ensayos clínicos abiertos, no controlados y aleatorizados doble ciego sobre este tema. En conjunto, los resultados de estos estudios sugieren que este tipo de inmunomodulación terapéutica con vacunas bacterianas de mucosas puede representar una nueva alternativa en la clínica para reducir el riesgo de IRR en estos pacientes.

HALLAZGOS PROCEDENTES DE ESTUDIOS NO CLÍNICOS

El tejido linfóide asociado a mucosas (MALT) contribuye de forma muy importante tanto al sistema inmunológico innato como al adaptativo^{5,13,14}. Estudios recientes en modelos animales sugieren que la modalidad de inmunoterapia que utiliza la vía de las mucosas (p. ej., vacunas de mucosas oral, sublingual, rectal, vaginal, intranasal) para la administración del antígeno es un abordaje generalmente seguro y eficiente para la inducción de respuestas inmunológicas con potencial para la prevención de enfermedades infecciosas causadas por patógenos bacterianos y virales que penetran en el organismo a través de la superficie de las mucosas^{4,5,15}.

Las respuestas inmunológicas inducidas en las mucosas constituyen una línea de defensa precoz e importante frente a los diversos patógenos: bacterias, virus y parásitos. La vacunación sublingual induce respuestas inmunológicas antígeno-específicas de ambos tipos: de linfocitos B activados, con producción de anticuerpos secretores IgA (IgA-S) y anticuerpos tipo IgM e IgG, así como de respuestas mediadas por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, con producción de interleucinas tipo Th2 (IL-4, IL-10) y Th1 (factor de crecimiento transformante beta [TGF-β], IL-12, interferón gamma [IFN-γ]), no sólo a nivel de la mucosa local, sino también en los compartimentos sistémicos y en las mucosas distantes del sitio de la administración^{13,16,17}. La presencia de un número alto de células presentadoras de antígenos (CPA), tipo células dendríticas (CD), en la mucosa sublingual facilita la captación, el procesamiento y la posterior presentación del antígeno a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en los ganglios linfáticos de drenaje próximos al sitio de la administración. Las CPA (CD y macrófagos) de ganglios linfáticos, intestino y pulmón controlan la activación, la expansión y la supervivencia de las células reguladoras de distintos fenotipos y funciones, como son los linfocitos T *helper* o colaboradores CD4⁺ tipo Th1 efectores, los linfocitos T CD4⁺ tipo Th2 que antagonizan los Th1 mediante la producción de IL-4 e IL-10, los linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ tipo Th3 productores de TGF-β y los linfocitos T reguladores (Treg) CD4⁺CD25⁺ que inhiben la proliferación de los linfocitos T CD4⁺¹⁸⁻²⁴.

En modelos entéricos y respiratorios, y en relación con la inmunización por la vía de las mucosas, no sólo se ha descrito la inducción de IgA-S en la superficie de las mucosas (que constituye uno de los principales mecanismos de defensa humoral), sino también la generación de respuestas mediadas por linfocitos T CD4⁺ (Th1) productoras de IFN-γ y de respuestas citotóxicas por linfocitos T CD8⁺ (linfocitos citotóxicos), claves para la inmunidad protectora y el aclaramiento de patógenos bacterianos y virales²⁵⁻³¹.

El sistema inmune innato está formado por diversos efectores que incluyen fundamentalmente macrófagos, células dendríticas y células *natural killer* (NK). Las células NKT (CD3⁺CD16⁺/CD56⁺) son un subgrupo importante de linfocitos con características de ambas células (T y NK) que forman parte de los sistemas innato y adaptativo (linfocitos B y T antígeno-específicos y sus respuestas clonales de memoria) y que ejercen de puente entre ambos tipos de inmunidad. A las células NKT se les ha adscrito un papel protector en las infecciones, el cáncer y la sarcoidosis, pero últimamente se le ha asignado también un papel importante en la inmunopatogénesis de las enfermedades pulmonares crónicas, como el asma, la EPOC y la neumonitis por hipersensibilidad³²⁻³⁶.

Las células NKT tienen las capacidades de promover y suprimir las respuestas inmunológicas mediante diferentes subtipos con diversas funciones. Las células NKT CD4⁺ activadas producen citocinas Th1 (IFN-γ y factor de necrosis tumoral alfa [TNF-α]) y Th2 (IL-4, IL-10 e IL-13), mientras que las NKT CD4⁻CD8⁻ (doble negativas) y las CD4⁻CD8⁺ producen citocinas Th1 y pueden mostrar actividad citotóxica antígeno-específica y actividad tipo NK^{34,37,38}.

Se ha postulado que el sistema inmune innato media las respuestas agudas frente a los agentes infecciosos, mientras que una respuesta adaptativa atípica puede causar una res-

puesta inflamatoria crónica. Así pues, se ha sugerido que las infecciones por bacterias y/o virus (tipo virus sincitial respiratorio [VSR]) pueden estimular el desencadenamiento de una respuesta aguda persistente de la inmunidad innata y eventualmente conducir a una respuesta atípica de la inmunidad adaptativa, provocando una alteración crónica inflamatoria, como ocurre en el asma y la EPOC³⁹⁻⁴¹.

La EPOC, que se caracteriza por bronquiolitis respiratoria, bronquitis crónica y enfisema, está en gran parte mediada por un tipo de respuestas Th1 inmunológicas en las que participan fundamentalmente células NKT CD4⁻CD8⁺ que se reclutarían selectivamente en el pulmón (incremento de células tipo NKT CD3⁺CD56⁺ dependientes de CD1d, con una proporción de células tipo NKT CD4⁺ disminuida). Tales células, tras interactuar con los macrófagos y activarlos, producirían IL-13 e IL-17, lo cual llevaría a la respuesta proinflamatoria crónica existente en el pulmón característica de esta enfermedad.

En la mucosa local de las vías respiratorias, las CD presentadoras que expresan CD1d pueden captar niveles bajos de antígeno viral y estimular la activación de células NKT. En un modelo experimental de enfermedad crónica que simula la EPOC en humanos, se ha observado que, tras una infección viral respiratoria, las células NKT (dependientes de CD1d) migran al pulmón y presentan una activación crónica con una producción selectiva incrementada de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de IL-13. Esto conduce al reclutamiento y la activación crónica del macrófago pulmonar (que expresa CD1d) y contribuye, junto a los linfocitos T CD3⁺CD4⁺, a la producción predominante de IL-13 en el pulmón, una interleucina que actúa como mediador principal de la respuesta inflamatoria crónica. En el modelo, la presencia de IL-13 es un requisito para la inducción de la metaplasia de las células mucosas y de la hiperreactividad de las vías respiratorias que, después de la infección viral, conduce a la EPOC. Se ha observado un fenómeno similar en muestras de pulmón de receptores de trasplante pulmonar con EPOC. Se describe así, por primera vez, un eje inmunológico formado por células NKT/macrófagos/IL-13. La regulación de la función de la célula NK es un requisito para el óptimo desarrollo de las respuestas antibacterianas y antivirales inmunes innatas y adaptativas^{22,40,42-44}.

Un objetivo crucial en el desarrollo de vacunas es la inducción de memoria inmunológica, gracias a la cual se origina un reservorio de células efectoras con capacidad de expansión y de reacción rápida y efectiva y durante períodos prolongados con respuestas inmunológicas específicas ante la detección del patógeno específico. La inducción de este tipo de respuestas de memoria está condicionada por la naturaleza del antígeno, del adyuvante y de la vía de administración. Así pues, la inmunización sublingual supondría una ventaja para modular la generación de las células de memoria del tipo T CD4⁺ colaboradoras (Th1) frente a patógenos inhalados específicos, lo que regularía las defensas antimicrobianas innatas y adaptativas mediante la inducción de respuestas efectoras humoral y celular y el mantenimiento de una vigilancia inmunológica duradera después de la vacunación de forma más eficaz, en comparación con otras vías de inmunización^{1-8,45-49}.

HALLAZGOS PROCEDENTES DE ESTUDIOS CLÍNICOS

La importancia de considerar la posibilidad de inducción de respuestas inmunológicas de memoria a nivel de las mucosas se debe a que, en humanos, la mayoría de las infecciones comienzan en o afectan a la superficie de las mucosas (p. ej., infecciones gastrointestinales inducidas por *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Shigella*, rotavirus, etc.; infecciones respiratorias inducidas por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, virus influenza, VSR, etc.; infecciones genitales inducidas por virus de la inmunodeficiencia humana [VIH], virus del herpes simple, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, etc.). En la EPOC, aproximadamente la mitad de las exacerbaciones se asocian a la presencia de infecciones en el tracto respiratorio inferior, principalmente por bacterias comunes patogénicas del tipo *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, lo cual acelera el deterioro de la función pulmonar. En estos sujetos con EPOC se ha descrito un defecto funcional de las respuestas de la inmunidad innata del macrófago, que presenta una capacidad fagocítica reducida para eliminar los mencionados patógenos y una producción alterada de citocinas que favorece la colonización bacteriana, la activación crónica y el incremento de la frecuencia de las exacerbaciones, con el subsecuente deterioro funcional pulmonar. Como residentes de los fagocitos mononucleares del pulmón, los macrófagos alveolares desempeñan un papel fundamental en las defensas frente a los patógenos inhalados⁵⁰⁻⁵⁴.

Los agentes inmunomoduladores de diverso origen, incluidos los bacterianos, pueden desempeñar un papel importante en la inmunomodulación de los mecanismos funcionales de la inmunidad innata de tipo NK, de tipo macrófago y de los receptores tipo Toll 2 (TLR2) en la superficie del macrófago alveolar, cuya expresión y activación están implicadas en el reconocimiento y la fagocitosis de las bacterias. Ciertos defectos funcionales inmunológicos específicos frente a las bacterias patogénicas inhaladas están implicados en la reducción del aclaramiento bacteriano, lo cual conduce a la cronicidad de las infecciones que desencadenan las agudizaciones⁵²⁻⁵⁵.

Los inmunomoduladores de origen bacteriano pueden prevenir las infecciones que desencadenan las agudizaciones⁵⁶⁻⁵⁹. Se cuenta con estudios que demuestran la eficacia de este tipo de productos en la prevención de las agudizaciones de la EPOC⁶⁰⁻⁶³, alguno de ellos con una muestra relativamente significativa⁶⁴.

En un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo (estudio PARI-IS) se evaluó el efecto de un agente bacteriano inmunomodulador en la prevención de exacerbaciones respiratorias en sujetos con EPOC. Los resultados demostraron que el agente inmunomodulador producía un beneficio clínico en los sujetos enfermos al reducir el número de episodios respiratorios graves que precisan hospitalización^{56,57,59,64-69}.

En una revisión sistemática se analizaron los resultados de 13 ensayos clínicos aleatorizados y controlados con placebo⁶⁵ que incluían, en total, a 1.971 sujetos. Los autores de la revisión reconocen que dos ensayos^{64,70} (que incluían a 731 sujetos) aplicaban la metodología apropiada y comunicaban una acción sobre las exacerbaciones, aunque el res-

to de los ensayos eran de baja calidad metodológica y no demostraban de forma concluyente un efecto en la prevención de agudizaciones.

En todos estos ensayos, los inmunomoduladores empleados eran lisados bacterianos que se administraban en cápsulas por vía oral deglutidas. Esta vía oral con estimulación de la mucosa a distancia, es decir, a nivel de intestino, no produce un efecto sistémico tan eficaz como la estimulación por la vía mucosa sublingual o nasal^{1,5}.

Hay una serie de estudios que sugieren que el beneficio clínico puede ser mayor cuando la inmunomodulación se realiza por estimulación directa de elementos del sistema inmune presentes en la mucosa sublingual^{71,72}. En los sujetos con EPOC, la respuesta innata funcional del macrófago residente del compartimento alveolar del pulmón frente a las bacterias patógenas inhaladas puede ser crucial para el mantenimiento de un ambiente estéril en el pulmón; tal respuesta incluye la actividad fagocítica, el denominado *killing* o muerte intracelular, la producción de citocinas proinflamatorias y de óxido nítrico y la activación y expresión de genes TLR en el macrófago^{50,53,54,73,74}.

En el líquido del lavado broncoalveolar (LBA), los macrófagos alveolares representan el 90-95% de las células existentes y no sólo ejercen una alta actividad fagocítica, sino que también producen citocinas proinflamatorias. Se dispone de estudios en sujetos con EPOC que demuestran la existencia de una alteración específica en la respuesta fagocítica y bactericida frente a las bacterias, así como una producción anormal de citocinas por activación aberrante del macrófago alveolar, lo cual conlleva el desarrollo de un microambiente proinflamatorio anómalo en el tracto respiratorio inferior que afecta de forma notoria al aclaramiento o la eliminación de los patógenos bacterianos^{50,53,54,75,76}. La colonización bacteriana de las vías respiratorias inferiores induce la inflamación crónica, y ésta, por mecanismos no bien definidos, contribuye a la progresiva obstrucción de los tejidos afectados⁷⁷⁻⁷⁹.

Las alteraciones observadas en los macrófagos alveolares no se aprecian en los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica, lo que sugiere que el mismo antígeno bacteriano puede estimular diferentes vías de señalización intracelular en los macrófagos de diferentes compartimentos. Se ha observado que también la edad y la acumulación de años de tabaquismo tienen efectos marginales en el macrófago alveolar. Por todo ello, el macrófago alveolar representa una célula diana de gran relevancia clínica para los patógenos respiratorios^{54,80}.

Los mecanismos de reconocimiento específico de bacterias por parte del macrófago que incluyen los receptores TLR2 y TLR4, CD14, CD36, CD163 y el receptor de manosa difieren de los mecanismos de reconocimiento de partículas inertes o de células apoptóticas epiteliales^{52,76}.

En estudios que utilizaban la proteína de la membrana externa y lipooligosacáridos de *Haemophilus influenzae* como inmunoestimulantes con propiedades proinflamatorias del macrófago humano, se demostró que la producción de TNF- α , IL-8, IL-1 β , IL-10

e IL-12 está significativamente disminuida en el macrófago alveolar de los sujetos con EPOC. Estos datos sugieren la existencia de un defecto fundamental de la respuesta inmunológica del macrófago frente a los patógenos bacterianos respiratorios. Por consiguiente, en la EPOC, un fallo en la respuesta inmunológica innata, asociado a una alteración funcional intrínseca del macrófago alveolar, conlleva la persistencia de una carga bacteriana en el microambiente del tracto respiratorio inferior y representa un estímulo antigénico crónico que provoca el incremento, en el área pulmonar, de otros mediadores inflamatorios inmunológicos (aparte del macrófago), tales como linfocitos T, B y NKT, con una producción alterada de citocinas proinflamatorias. Este incremento proporcionaría una fuente adicional (hipótesis del «círculo vicioso») para la persistencia del daño inflamatorio crónico y progresivo del pulmón de la EPOC^{50,53,54,81}. Otros estudios han sugerido que en la EPOC también existen alteraciones funcionales de la inmunidad celular T CD4⁺ antígeno-específica⁸².

En conjunto, los estudios mencionados sugieren que la inmunomodulación a través de la inmunización por la vía de las mucosas con antígenos bacterianos podría considerarse una alternativa de administración inmunoterapéutica segura y eficaz para estimular de manera robusta y duradera el sistema inmune innato, con la potenciación simultánea de una inmunidad adaptativa específica local y sistémica. La potenciación de estas respuestas inmunológicas ha mostrado una asociación con la capacidad para inducir resistencia frente a las infecciones y para modular fisiológicamente la respuesta inflamatoria crónica.

Por todo ello, estos datos apoyan sólidamente que la inmunización por vía sublingual puede ser una opción óptima en términos de eficiencia para la prevención de la infección por bacterias respiratorias inhaladas. Por otra parte, no se ha demostrado que los agentes farmacológicos actualmente disponibles para el tratamiento de la EPOC (glucocorticoides, broncodilatadores, azitromicina, etc.) puedan ejercer un efecto modulador de las respuestas innata y adaptativa específica con un impacto de relevancia clínica en la respuesta inflamatoria crónica aberrante asociada a la evolución de la EPOC.

ESTUDIOS CLÍNICOS Y METAANÁLISIS REALIZADOS HASTA LA FECHA

Una serie de estudios clínicos no controlados sobre IRR en adultos y niños han mostrado que la administración oral de lisados bacterianos polivalentes mejora la respuesta clínica reduciendo el número, la duración y la gravedad de los episodios infecciosos^{59,62,64,65,83-86}. Además, un número pequeño de estudios clínicos no controlados realizados en sujetos con EPOC y que han utilizado la administración oral de preparaciones bacterianas polivalentes (lisados) sugieren un efecto beneficioso en la prevención de las exacerbaciones de la enfermedad, también con una disminución del número, la duración y la gravedad de los episodios infecciosos pero, además, con una reducción del uso de antibióticos y de los recursos sanitarios (reflejado en tasas menores de ingresos hospitalarios). A su vez, estos ensayos clínicos han demostrado un impacto positivo sobre las funciones inmunitarias deterioradas en estos pacientes, tales como la actividad de los macrófagos alveolares y la producción de IFN- γ . La utilidad de esta modalidad terapéutica (inmunomoduladores con lisados bacterianos) en la práctica clínica ha sido una cuestión de-

batida debido a los resultados contradictorios observados en los ensayos con los diversos tipos de preparaciones bacterianas utilizadas en diferentes contextos clínicos.

A continuación se mencionan los metaanálisis y estudios clínicos más relevantes sobre el uso de diversos inmunoestimulantes en las infecciones respiratorias:

- Bergemann y colaboradores⁶⁷ realizaron el primer metaanálisis que analizó la eficacia de un lisado bacteriano frente a placebo para reducir el número de exacerbaciones agudas en sujetos con bronquitis crónica. También realizaron un análisis de la relación coste/efectividad.
- El metaanálisis realizado por Del-Rio-Navarro y colaboradores⁶⁷ mostró que los inmunomoduladores reducen la incidencia de infecciones respiratorias agudas en los niños en un promedio del 40%. Analizaron un total de 34 ensayos controlados con placebo que incluían a un total de 3.877 participantes.
- Schaad⁶⁸ realizó una revisión sistemática del uso de un lisado bacteriano como inmunoestimulante en sujetos pediátricos con IRR. En el metaanálisis se incluyeron ocho estudios controlados y aleatorizados. Este metaanálisis muestra que la población tratada con dicho lisado presentaba de forma significativa y consistente menos casos de IRR (26,2%) en un período de seis meses. Los datos sugieren que el efecto es mayor en los sujetos con mayor riesgo de IRR.
- En una revisión sistemática realizada por Steurer-Stey y colaboradores⁶⁵, se analizaron los resultados de 13 ensayos clínicos aleatorizados y controlados con placebo que incluían a un total 1.971 sujetos. Los autores de la revisión reconocen que sólo dos ensayos (que incluían a 731 sujetos) tenían la metodología apropiada y comunicaban una acción sobre las exacerbaciones^{64,70}.
- Collet y colaboradores⁶⁴ realizaron un ensayo aleatorizado y doble ciego controlado con placebo para estudiar el efecto de un agente inmunoestimulante (un liofilizado del lisado de los ocho patógenos más comunes aislados en infecciones del tracto respiratorio) que se administraba por vía oral para prevenir la exacerbación aguda de las vías respiratorias en sujetos con EPOC. En el mismo número de la revista, Anthonisen⁵⁷ publicó un editorial en el que elogiaba la calidad del ensayo y apuntaba que el tratamiento con este lisado bacteriano tal vez fuera capaz de modificar el curso de la EPOC. También señalaba que, al reducirse a la mitad el número de días de hospitalización, los costes debidos a la enfermedad se reducían considerablemente. Además, hacía referencia a la facilidad de la administración del preparado evaluado.
- En el ensayo de Orcel y colaboradores⁷⁰ se evaluaron los efectos preventivos de la vacunación oral con un lisado bacteriano en sujetos de edad avanzada con bronquitis aguda. Los resultados sugerían que el lisado bacteriano mostraba un efecto protector contra la bronquitis aguda en sujetos de edad avanzada.
- En una revisión de la Colaboración Cochrane de 2006⁶⁹ se analizaron seis ensayos clínicos que comparaban los efectos de una vacuna de *H. influenzae* en sujetos con exacerbaciones agudas recurrentes de bronquitis crónica y que incluían a un total de 440 sujetos. Los revisores concluyeron que la vacunación de los sujetos con exacerbaciones agudas recurrentes de bronquitis crónica en otoño podía reducir el número y la gravedad de las exacerbaciones durante el invierno siguiente.

- Existen resultados recientes muy determinantes relacionados con la efectividad de los inmunomoduladores inmunológicos de origen bacteriano administrados por la mucosa sublingual para la reducción de las infecciones respiratorias en una población de sujetos susceptibles. En un ensayo clínico doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo (estudio PARI-IS) que evaluó el efecto adyuvante de un inmunógeno bacteriano en la prevención de exacerbaciones en sujetos con EPOC, se observó una reducción del número de episodios respiratorios graves que terminan en hospitalización⁶⁴. Se ha demostrado que la inmunoestimulación a través de la mucosa sublingual produce respuestas inmunológicas muy intensas de tipos tanto innato como adaptativo específico a nivel local y a nivel sistémico a distancia, en la mucosa del tracto respiratorio y del pulmón^{1,5}. Más aun, existen estudios que demuestran que las bacterias enteras inactivadas producen una estimulación de los macrófagos mucho más robusta que la inducida por los lisados bacterianos^{90,91}. No obstante, existe todavía incertidumbre acerca de cuál es el tipo de respuestas inmunológicas innata y adaptativa inducidas por estas preparaciones bacterianas que tienen la capacidad de impactar eficazmente en la respuesta clínica de los sujetos con IRR⁵⁸.
- Recientemente se han realizado varios estudios con vacunas bacterianas en sujetos con IRR^{59,62,84,86,92-99} y en sujetos con EPOC^{56,60,64-66,69,100,101} que sugieren que estas terapias son eficaces en la disminución de los episodios infecciosos en estos pacientes.

ENSAYO CLÍNICO PILOTO REALIZADO EN EL HGUGM UTILIZANDO LA VACUNA BACTEK®

Uno de los estudios clínicos más recientes sobre la eficacia de las vacunas de mucosas en la prevención de las IRR se ha llevado a cabo en la Unidad de Inmunología Clínica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM) y ha utilizado como inmunomodulador bacteriano un preparado Bactek^{®102}. Si bien este estudio constituye el tema central del último capítulo de este libro, a continuación se ofrece un resumen y una reflexión sobre sus resultados.

Bactek[®] es el nombre genérico de la vacuna bacteriana fabricada hace más de 10 años por la compañía española Inmunotek, S. L. La última generación de este producto se caracteriza fundamentalmente por tres nuevos aspectos: 1) utiliza glicerol como solución adyuvante, 2) posee una concentración más elevada de las bacterias que con mayor frecuencia están presentes en el tracto respiratorio de los sujetos con IRR y 3) se administra en spray por la vía de la mucosa sublingual. Este preparado contiene una alta concentración (10^9 bacterias/ml) de las siguientes bacterias inactivadas: *Staphylococcus aureus* (15%), *Staphylococcus epidermidis* (15%), *Streptococcus pneumoniae* (60%), *Klebsiella pneumoniae* (4%), *Branhamella catarrhalis* (3%) y *Haemophilus influenzae* (3%). Los excipientes que contiene son: glicerol (50%), esencia de piña (cantidad suficiente para [c.s.p.] 1 ml), cloruro sódico (9 mg/ml) y agua para inyección (c.s.p. 1 ml). Esta composición es la que se emplea con mayor frecuencia en sujetos con IRR.

En este ensayo se evaluó el efecto de la administración de Bactek[®] por vía sublingual diaria, durante seis meses, para la prevención de las infecciones respiratorias en una cohorte de 17 sujetos adultos con IRR. Al inicio del estudio y al final de la inmunización

se llevaron a cabo determinaciones inmunológicas en las que se valoró la proliferación de linfocitos T antígeno-específicos CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ frente a antígenos de Bactek®, los niveles séricos de inmunoglobulinas (Ig), los anticuerpos específicos frente al polisacárido capsular de neumococo y frente al toxoide tetánico y las subpoblaciones de linfocitos B, T y NK.

Desde el inicio de la inmunización terapéutica y durante un período de 12 meses se observó un impacto en el control clínico, con una notable reducción en la frecuencia de las IRR superiores e inferiores, en comparación con el número de IRR que estos mismos sujetos habían tenido durante los 12 meses anteriores al tratamiento. Estos datos clínicos son consistentes con las observaciones de otro estudio con vacuna bacteriana controlado con placebo realizado en niños en el que se demostró que la respuesta clínica era más eficaz en los sujetos seleccionados que habían presentado un mayor número de IRR durante el año anterior a la terapia⁸⁶.

Los resultados evidenciaron una asociación de la respuesta clínica positiva con una respuesta inmunológica antígeno-específica mediada por linfocitos T CD4⁺ colaboradores¹⁰². Se demostró también un incremento significativo de la capacidad proliferativa de los linfocitos T CD3⁺CD4⁺ frente a los antígenos de Bactek® a los seis meses, en comparación con el inicio del tratamiento ($p < 0,0001$), como asimismo de los linfocitos T CD3⁺ ($p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas entre el inicio y el mes 6 en los niveles séricos de Ig, anticuerpos específicos o las subpoblaciones de linfocitos B, T y NK en sangre periférica. Se apreció una reducción significativa en la tasa de infecciones respiratorias, en comparación con la del año previo a la iniciación de la inmunización ($p < 0,0001$).

Estos resultados demuestran que la administración a largo plazo de un preparado bacteriano polivalente por vía sublingual en sujetos con IRR ejerce un efecto estimulador de la respuesta inmune de los linfocitos T CD4⁺ frente a los antígenos bacterianos que podría asociarse con beneficios clínicos significativos.

El aumento significativo de la capacidad proliferativa de los linfocitos T CD3⁺CD4⁺ antígeno-específicos podría ser uno de los principales mecanismos inmunomoduladores a nivel sistémico inducidos por la vacunación sublingual con la preparación polivalente bacteriana (Bactek®). Sin embargo, la respuesta linfoproliferativa específica no es el único mecanismo inmunológico que puede haberse modificado en los sujetos por la inmunización con los antígenos bacterianos. Es posible que, a nivel local, en los distintos compartimentos de las mucosas de los tractos respiratorios superior e inferior se haya estimulado también la respuesta inmunológica innata mediante la inmunomodulación del defecto fundamental, es decir, la respuesta inmunológica del macrófago frente a los patógenos bacterianos respiratorios, así como a otros efectores T, B y TNK, normalizándose así la producción de citocinas proinflamatorias en el microambiente⁵⁴. La estimulación de la respuesta innata también puede haber contribuido a la inducción de la potente y mantenida respuesta de la inmunidad celular antígeno-específica observada en los sujetos inmunizados³⁹. Sin embargo, la activación y la interacción de los mecanis-

mos inmunológicos efectores del sistema innato y del adaptativo específico deben ser aclarados, sobre todo en el contexto de su posiblemente importante papel en la inmunomodulación terapéutica y la mejoría clínica observada⁸⁶.

En este ensayo, después de seis meses de tratamiento con Bactek[®] también se observó un aumento en la capacidad proliferativa de los linfocitos T CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ específicos frente a los antígenos del virus de la gripe⁸². El hecho de que los sujetos hubieran recibido la vacuna de la gripe o hubieran sufrido una infección por el virus de la gripe al menos durante los dos años anteriores al tratamiento con Bactek[®] plantea la posibilidad de que la inmunización bacteriana podría haber inducido un efecto innoestimulante que, a su vez, ejerciese una inmunomodulación de la respuesta inmune celular en curso frente a los antígenos virales¹⁰³⁻¹⁰⁷. Este hecho podría estar relacionado con la existencia de una dependencia de la actividad colaboradora de los linfocitos T CD4⁺ para la expansión de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ antígeno-específicos¹⁰⁸, así como con la generación y la inducción de respuestas específicas de los linfocitos T CD4⁺ colaboradores asociadas a las repuestas inmunes eficaces en terapias de inmunización a largo plazo^{59,83,86}.

Este estudio clínico piloto sugiere un efecto beneficioso en la respuesta clínica de las IRR de una vacuna bacteriana polivalente administrada por vía sublingual, y este efecto beneficioso se asocia a una activación de la respuesta T CD4⁺ linfoproliferativa específica frente a los antígenos bacterianos⁸². En conjunto, estos datos son consistentes con los de otros estudios que demuestran una asociación entre la inmunización con inmunomoduladores bacterianos polivalentes y la mejoría clínica de las enfermedades respiratorias^{64,65,84,101,109,110}.

Recientemente (noviembre de 2012), la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) ha aprobado la realización de un ensayo clínico doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo en 200 pacientes con EPOC de la Comunidad de Madrid. En España, esta patología afecta al 9% de las personas mayores de 40 años de edad y al 20% de las mayores de 65 años y constituye una de las causas más frecuentes de consulta en los Centros de Atención Primaria y los servicios hospitalarios del SNS^{82,111-119}. En una publicación del año 2001¹¹⁵, se estimaba que en España la EPOC originaba aproximadamente el 10-12% de las consultas de Atención Primaria y el 35-40% de las de Neumología, y que asimismo ocasionaba un 35% de las incapacidades laborales definitivas. Además, la EPOC era responsable del 7% de los ingresos hospitalarios y figuraba en cuarto lugar entre las causas de muerte (33 muertes/100.000 habitantes/año). Los gastos generados por esta enfermedad ascendían al 2% del presupuesto anual del Ministerio de Sanidad y Consumo y al 0,25% del producto interior bruto. Se estimaba que los costes sociales, laborales y sanitarios anuales atribuibles a la EPOC ascendían a 2.400 millones de euros, con un gasto de 1.652-2.344 € por enfermo/año. Estos costes no han cesado de aumentar, sobre todo como consecuencia del envejecimiento de la población, del incremento de la prevalencia de la enfermedad y del precio de los nuevos fármacos y la incorporación de las modalidades terapéuticas recientes.

El control efectivo de las agudizaciones de la EPOC mediante la administración de una vacuna bacteriana de mucosas supondría ingentes ahorros de costes para los sujetos afectados, para la sociedad y para el SNS; por consiguiente, el planteamiento del desarrollo clínico de una vacuna terapéutica de mucosas, administrada por vía sublingual como alternativa terapéutica preventiva para evitar el desarrollo de las IRR y exacerbaciones de la EPOC está justificado desde una óptica tanto científica como sanitaria.

..... REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Çuburu N, Kweon MN, Song JH, et al. Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. *Vaccine* 2007;25:8598-610.
2. Song JH, Nguyen HH, Çuburu N, et al. Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:1644-9.
3. Song JH, Kim JI, Kwon HJ, et al. CCR7-CCL19/CCL21-regulated dendritic cells are responsible for effectiveness of sublingual vaccination. *J Immunol* 2009;182:6851-60.
4. Negri DR, Riccomi A, Pinto D, et al. Persistence of mucosal and systemic immune responses following sublingual immunization. *Vaccine* 2010; 28:4175-80.
5. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 2005;11:S45-53.
6. Durham SR. Sublingual immunotherapy: what have we learnt from the 'big trials'? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8:577-84.
7. Huang CF, Wu TC, Chu YH, et al. Effect of neonatal sublingual vaccination with native or denatured ovalbumin and adjuvant CpG or cholera toxin on systemic and mucosal immunity in mice. *Scand J Immunol* 2008;68:502-10.
8. Passalacqua G, Canonica GW. Sublingual immunotherapy: update 2006. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006;6:449-54.
9. Miravittles M, Soriano JB, Garcia-Rio F, et al. Prevalence of COPD in Spain: impact of undiagnosed COPD on quality of life and daily life activities. *Thorax* 2009;64:863-8.
10. Lindberg A, Eriksson B, Larsson LG, et al. Seven-year cumulative incidence of COPD in an age-stratified general population sample. *Chest* 2006; 129:879-85.
11. Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M. Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002. *JAMA* 2005;294:1255-9.
12. Miravittles M, Monso E, Mensa J, et al. Antimicrobial treatment of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease: 2007 consensus statement. *Arch Bronconeumol* 2008;44:100-8.
13. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003;3:331-41.
14. Kiyono H, Fukuyama S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4(9):699-710.
15. De Magistris MT. Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:52-67.
16. Yuan Q, Walker WA. Inmate immunity of the gut: mucosal defense in health and disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38:463-73.
17. Goodrich ME, McGee DW. Regulation of mucosal B cell immunoglobulin secretion by intestinal epithelial cell-derived cytokines. *Cytokine* 1998;10:948-55.
18. Quiding M, Nordstrom I, Kilander A, et al. Intestinal immune responses in humans. Oral cholera vaccination induces strong intestinal antibody responses and interferon-gamma production and evokes local immunological memory. *J Clin Invest* 1991;88:143-8.

19. Polanski M, Melican NS, Zhang J, Weiner HL. Oral administration of the immunodominant B-chain of insulin reduces diabetes in a co-transfer model of diabetes in the NOD mouse and is associated with a switch from Th1 to Th2 cytokines. *J Autoimmun* 1997;10:339-46.
20. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-42.
21. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, et al. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994;265:1237-40.
22. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188:287-96.
23. Stassen M, Fondel S, Bopp T, et al. Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur J Immunol* 2004;34:1303-11.
24. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001;2:725-31.
25. Belyakov IM, Hammond SA, Ahlers JD, et al. Transcutaneous immunization induces mucosal CTLs and protective immunity by migration of primed skin dendritic cells. *J Clin Invest* 2004;113:998-1007.
26. Bender BS, Croghan T, Zhang L, Small PA, Jr. Transgenic mice lacking class I major histocompatibility complex-restricted T cells have delayed viral clearance and increased mortality after influenza virus challenge. *J Exp Med* 1992;175:1143-5.
27. Buzoni-Gatel D, Lepage AC, Dimier-Poisson IH, et al. Adoptive transfer of gut intraepithelial lymphocytes protects against murine infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1997;158:5883-9.
28. Simmons CP, Hussell T, Sparer T, et al. Mucosal delivery of a respiratory syncytial virus CTL peptide with enterotoxin-based adjuvants elicits protective, immunopathogenic, and immunoregulatory antiviral CD8+ T cell responses. *J Immunol* 2001;166:1106-13.
29. Johansson M, Schon K, Ward M, Lycke N. Genital tract infection with *Chlamydia trachomatis* fails to induce protective immunity in gamma interferon receptor-deficient mice despite a strong local immunoglobulin A response. *Infect Immun* 1997;65:1032-44.
30. Ermak TH, Giannasca PJ, Nichols R, et al. Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J Exp Med* 1998;188:2277-88.
31. Harandi AM, Svennerholm B, Holmgren J, Eriksson K. Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 are important in innate defense against genital herpes simplex virus type 2 infection in mice but are not required for the development of acquired gamma interferon-mediated protective immunity. *J Virol* 2001;75:6705-9.
32. Rijavec M, Volarevic S, Osolnik P, et al. Natural killer T cells in pulmonary disorders. *Respir Med* 2011;105:S20-5.
33. Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol* 2011;11:131-42.
34. Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol* 2010;11:197-206.
35. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, et al. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 2004;4:231-7.
36. Van Kaer L, Parekh VV, Wu L. Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity. *Cell Tissue Res* 2011;343:43-55.
37. Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2:557-68.
38. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25:297-336.
39. Mattner J, Debord KL, Ismail N, et al. Exogenous and endogenous glycolipid antigens acti-

- vate NKT cells during microbial infections. *Nature* 2005;434:525-9.
40. Kim EY, Battaile JT, Patel AC, et al. Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. *Nat Med* 2008;14:633-40.
 41. Hamelin ME, Prince GA, Gomez AM, et al. Human metapneumovirus infection induces long-term pulmonary inflammation associated with airway obstruction and hyperresponsiveness in mice. *J Infect Dis* 2006;19:1634-42.
 42. Molfino NA, Jeffery PK. Chronic obstructive pulmonary disease: histopathology, inflammation and potential therapies. *Pulm Pharmacol Ther* 2007; 20:462-72.
 43. Joyce S, Van Kaer L. Lung NKT cell commotion takes your breath away. *Nat Med* 2008;14:609-10.
 44. Urbanowicz RA, Lamb JR, Todd I, et al. Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients. *Respir Res* 2010;11:76-84.
 45. BenMohamed L, Belkaid Y, Loing E, et al. Systemic immune responses induced by mucosal administration of lipopeptides without adjuvant. *Eur J Immunol* 2002;32:2274-81.
 46. Razi CH, Harmanci K, Abaci A, et al. The immunostimulant OM-85 BV prevents wheezing attacks in preschool children. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:763-9.
 47. Girard J, Fleury S. Analyse comparative du lévamisole et d'un lysat bactérien sur la réponse lymphocytaire in vitro [Lymphocytic response in vitro after levamisole and bacterial lysate: comparative study]. *Med Hyg* 1979;37:2519-26.
 48. Maestroni GJ, Losa GA. Clinical and immunobiological effects of an orally administered bacterial extract. *Int J Immunopharmacol* 1984;6:111-7.
 49. Puigdollers JM, Serna GR, Hernandez del Rey I, et al. Immunoglobulin production in man stimulated by an orally administered bacterial lysate. *Respiration* 1980;40:142-9.
 50. Taylor AE, Finney-Hayward TK, Quint JK, et al. Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *Eur Respir J* 2010;35:1039-47.
 51. Marti-Llitas P, Regueiro V, Morey P, et al. Non-typeable *Haemophilus influenzae* clearance by alveolar macrophages is impaired by exposure to cigarette smoke. *Infect Immun* 2009;77:4232-42.
 52. Tricker E, Cheng G. With a little help from my friends: modulation of phagocytosis through TLR activation. *Cell Res* 2008;18:711-2.
 53. Berenson CS, Garlipp MA, Grove LJ, et al. Impaired phagocytosis of nontypeable *Haemophilus influenzae* by human alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis* 2006;194:1375-84.
 54. Berenson CS, Wrona CT, Grove LJ, et al. Impaired alveolar macrophage response to *Haemophilus* antigens in chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:31-40.
 55. Prieto A, Reyes E, Bernstein ED, et al. Defective natural killer and phagocytic activities in chronic obstructive pulmonary disease are restored by glycoposphopeptical (Immunoféron). *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1578-83.
 56. Jindal SK. Immunostimulation: does it work in COPD? *Chest* 2004;126:1406-8.
 57. Anthonisen NR. OM-8BV for COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1713-4.
 58. Cazzola M, Rogliani P, Curradi G. Bacterial extracts for the prevention of acute exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease: a point of view. *Respir Med* 2008;102:321-7.
 59. Lusuardi M. Challenging mucosal immunity with bacterial extracts to prevent respiratory infections: an old therapy revisited. *Monaldi Arch Chest Dis* 2004;61:4-5.
 60. Lusuardi M, Capelli A, Carli S, et al. Local airways immune modifications induced by oral bacterial extracts in chronic bronchitis. *Chest* 1993; 10:1783-91.
 61. Braido F, Tarantini F, Ghiglione V, et al. Bacterial lysate in the prevention of acute exacerbation of COPD and in respiratory recurrent infections. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007;2:335-45.
 62. Pozzi E, Serra C. Efficacy of Lantigen B in the prevention of bacterial respiratory infections. *Monaldi Arch Chest Dis* 2004;61:19-27.

63. Soler M, Mutterlein R, Cozma G. Double-blind study of OM-85 in patients with chronic bronchitis or mild chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 2007;74:26-32.
64. Collet JP, Shapiro P, Ernst P, et al. Effects of an immunostimulating agent on acute exacerbations and hospitalizations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1719-24.
65. Steurer-Stey C, Bachmann LM, Steurer J, Tramer MR. Oral purified bacterial extracts in chronic bronchitis and COPD: systematic review. *Chest* 2004;126:1645-55.
66. Bourbeau J, Julien M, Maltais F, et al. Reduction of hospital utilization in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a disease-specific self-management intervention. *Arch Intern Med* 2003;163:585-91.
67. Bergemann R, Brandt A, Zoellner U, Dommer CF. Preventive treatment of chronic bronchitis: a meta-analysis of clinical trials with a bacterial extract (OM-85 BV) and a cost-effectiveness analysis. *Monaldi Arch Chest Dis* 1994;49:302-7.
68. Ekberg-Jansson A, Larsson S, Lofdahl CG. Preventing exacerbations of chronic bronchitis and COPD. *BMJ* 2001;322:1259-61.
69. Strassels SA, Smith DH, Sullivan SD, Mahajan PS. The costs of treating COPD in the United States. *Chest* 2001;119:344-52.
70. Orcel B, Delclaux B, Baud M, Derenne JP. Preventive effect of an immunomodulator, OM-85 BV, on acute exacerbations of chronic bronchitis in elderly patients. Preliminary results at six months in 291 patients. *Rev Mal Respir* 1993;10(1):23-8.
71. Allam JP, Stojanovski G, Friedrichs N, et al. Distribution of Langerhans cells and mast cells within the human oral mucosa: new application sites of allergens in sublingual immunotherapy? *Allergy* 2008;63:720-7.
72. Novak N, Haberstok J, Bieber T, Allam JP. The immune privilege of the oral mucosa. *Trends Mol Med* 2008;14:191-8.
73. Di Stefano A, Caramori G, Ricciardolo FL, et al. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1156-67.
74. Oshikawa K, Sugiyama Y. Regulation of toll-like receptor 2 and 4 gene expression in murine alveolar macrophages. *Exp Lung Res* 2003;29:401-12.
75. Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, et al. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:24-31.
76. Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, et al. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol* 2003;81:289-96.
77. Bresser P, Out TA, van Alphen L, et al. Airway inflammation in nonobstructive and obstructive chronic bronchitis with chronic Haemophilus influenzae airway infection. Comparison with noninfected patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:947-52.
78. Patel IS, Seemungal TA, Wilks M, et al. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax* 2002;57:759-64.
79. Wilkinson TM, Patel IS, Wilks M, et al. Airway bacterial load and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1090-5.
80. Tetley TD. Macrophages and the pathogenesis of COPD. *Chest* 2002;121:156S-9S.
81. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350:2645-53.
82. Wedzicha JA, Wilkinson T. Impact of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations on patients and payers. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:218-21.
83. Rozy A, Chorostowska-Wynimko J. Bacterial immunostimulants-mechanism of action and clinical

- cal application in respiratory diseases. *Pneumonol Alergol Pol* 2008;76:353-9.
84. Bellanti JA, Settipane RA. Bacterial vaccines and the innate immune system: a journey of rediscovery for the allergist-immunologist and all health care providers. *Allergy Asthma Proc* 2009;30:S3-4.
 85. Gutiérrez-Tarango MD, Berber A. Safety and efficacy of two courses of OM-85 BV in the prevention of respiratory tract infections in children during 12 months. *Chest* 2001;119:1742-8.
 86. Schaad UB, Mutterlein R, Goffin H. Immunostimulation with OM-85 in children with recurrent infections of the upper respiratory tract: a double-blind, placebo-controlled multicenter study. *Chest* 2002;122:2042-9.
 87. Del-Rio-Navarro BE, Espinosa Rosales F, Flendy, et al. Immunostimulants for preventing respiratory tract infection in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2006:CD004974.
 88. Schaad UB. OM-85 BV, an immunostimulant in pediatric recurrent respiratory tract infections: a systematic review. *World J Pediatr* 2010;6:5-12.
 89. Foxwell AR, Cripps AW, Dear KB. Haemophilus influenzae oral whole cell vaccination for preventing acute exacerbations of chronic bronchitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2006:CD001958.
 90. Nau GJ, Richmond JF, Schlesinger A, et al. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:1503-8.
 91. Nau GJ, Schlesinger A, Richmond JF, Young RA. Cumulative Toll-like receptor activation in human macrophages treated with whole bacteria. *J Immunol* 2003;170:5203-9.
 92. Horn ME, Reed SE, Taylor P. Role of viruses and bacteria in acute wheezy bronchitis in childhood: a study of sputum. *Arch Dis Child* 1979;54:587-92.
 93. Welliver RC. Upper respiratory infections in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1983;72:341-6.
 94. Gutierrez-Tarango MD, Berber A. Safety and efficacy of two courses of OM-85 BV in the prevention of respiratory tract infections in children during 12 months. *Chest* 2001;119:1742-8.
 95. Clementsen P, Norn S, Kristensen KS, et al. Bacteria and endotoxin enhance basophil histamine release and potentiation is abolished by carbohydrates. *Allergy* 1990;45:402-8.
 96. Davies RJ, Holford-Strevens VC, Wells ID, Pepys J. Bacterial precipitins and their immunoglobulin class in atopic asthma, non-atopic asthma, and chronic bronchitis. *Thorax* 1976;31:419-24.
 97. Woodfolk JA. Microbes and man: an evolving story in asthma. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1112-4.
 98. Rozy A, Chorostowska-Wynimko J. Bacterial immunostimulants--mechanism of action and clinical application in respiratory diseases. *Pneumonol Alergol Pol* 2008;76:353-9.
 99. Mora R, Barbieri M, Passali GC, et al. A preventive measure for otitis media in children with upper respiratory tract infections. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002;63:111-8.
 100. Bergemann R, Brandt A, Zoellner U, Donner CF. Preventive treatment of chronic bronchitis: a meta-analysis of clinical trials with a bacterial extract (OM-85 BV) and a cost-effectiveness analysis. *Monaldi Arch Chest Dis* 1994;49:302-7.
 101. Ekberg-Jansson A, Larsson S, Lofdahl CG. Preventing exacerbations of chronic bronchitis and COPD. *BMJ* 2001;322:1259-61.
 102. Alecsandru D, Valor L, Sanchez-Ramon S, et al. Sublingual therapeutic immunization with a polyvalent bacterial preparation in patients with recurrent respiratory infections: immunomodulatory effect on antigen-specific memory CD4+ T cells and impact on clinical outcome. *Clin Exp Immunol* 2011;164:100-7.
 103. van Daal GJ, Beusenberg FD, So KL, et al. Protection against influenza A virus infection in mice by oral immunization with a polyvalent bacterial lysate. *Int J Immunopharmacol* 1991;13:831-40.
 104. Profeta ML, Guidi G, Meroni PL, et al. Influenza vaccination with adjuvant RU41740 in the elderly. *Lancet* 1987;1:973.
 105. Centanni S, Pregliasco F, Bonfatti C, et al. Clinical efficacy of a vaccine-immunostimulant com-

- ination in the prevention of influenza in patients with chronic obstructive pulmonary disease and chronic asthma. *J Chemother* 1997;9:273-8.
106. Guebre-Xabier M, Hammond SA, Ellingsworth LR, Glenn GM. Immunostimulant patch enhances immune responses to influenza virus vaccine in aged mice. *J Virol* 2004;78:7610-8.
 107. Fernández-Cruz E, Moreno S, Navarro J, et al. Therapeutic immunization with an inactivated HIV-1 immunogen plus antiretrovirals versus antiretroviral therapy alone in asymptomatic HIV-infected subjects. *Vaccine* 2004;22:2966-73.
 108. Valor L, Navarro J, Carbone J, et al. Immunization with an HIV-1 immunogen induces CD4+ and CD8+ HIV-1-specific polyfunctional responses in patients with chronic HIV-1 infection receiving antiretroviral therapy. *Vaccine* 2008;26:2738-45.
 109. Del-Rio-Navarro BE, Blandon-Vigil V. Commentary on «Oral purified bacterial extracts in acute respiratory tract infections in childhood: a systematic review». *Eur J Pediatr* 2008;167:121-2.
 110. Carmona-Ramirez MA, Alvarez-Gomez V, Berber A. Use of OM-85 BV for the prevention of acute respiratory tract infections in occupational medicine. *J Int Med Res* 2002;30:325-9.
 111. Kierszenbaum F, Muthukkumar S, Beltz LA, Szein MB. Suppression by *Trypanosoma brucei rhodesiense* of the capacities of human T lymphocytes to express interleukin-2 receptors and proliferate after mitogenic stimulation. *Infect Immun* 1991;59:3518-22.
 112. World Health Organization. The world health report 2008: Primary health care, now more than ever. Geneva, World Health Organization, 2008.
 113. Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, et al. Chronic obstructive pulmonary disease surveillance--United States, 1971-2000. *MMWR Surveill Summ* 2002;51:1-16.
 114. Sobradillo Peña V, Miravittles M, Gabriel R, et al. Geographic variations in prevalence and underdiagnosis of COPD: results of the IBERPOC multicentre epidemiological study. *Chest* 2000;118:981-9.
 115. Álvarez-Sala J, Cimas E, Masa J, et al. Recommendations for the care of the patient with chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Bronconeumol* 2001;37:269-78.
 116. Siafakas NM. Preventing exacerbations of COPD--advice from Hippocrates. *N Engl J Med* 2011;365:753-4.
 117. Felmingham D, Feldman C, Hryniewicz W, et al. Surveillance of resistance in bacteria causing community-acquired respiratory tract infections. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:12-42.
 118. World Health Organization. Acute respiratory infections: the forgotten pandemic. *Bull World Health Org* 1998;76(1):101-3, 5-7.
 119. Llor C, Molina J, Naberan K, et al. Exacerbations worsen the quality of life of chronic obstructive pulmonary disease patients in primary healthcare. *Int J Clin Pract* 2008;62:585-92.

Mecanismos inmunológicos básicos para el desarrollo de vacunas de mucosas contra infecciones, enfermedades autoinmunes y alergias

Cecil Czerkinsky

*Ex Deputy Director-General for Laboratory Sciences, International Vaccine Institute
Adjunct Professor, Seoul National University
Clinical Professor of Immunology, College of Medicine, Korea University
Seúl, Corea del Sur*

El objetivo de este capítulo es revisar de forma sintética algunos de los principios básicos de la inmunología de las mucosas relacionados con el desarrollo, el diseño y la administración de las vacunas que se aplican en las mucosas del organismo, es decir, las denominadas *vacunas de mucosas*.

Los científicos que investigan nuevas vacunas a veces afirman, de forma coloquial, que «las vacunas no salvan vidas, pero las vacunaciones sí», una frase que alude al hecho de que las vacunas sólo alcanzan su verdadero potencial cuando se superan las sucesivas fases de su desarrollo y se consigue que su aplicación quede debidamente protocolarizada. Lamentablemente, la mayoría de las vacunas que empiezan a investigarse no suelen alcanzar este estatus, sino que, por una u otra causa, no superan las primeras barreras, deviniendo en meras «curiosidades de laboratorio», como se las apoda en la jerga científica. Huelga decir que esta realidad está perfectamente asumida entre los investigadores del International Vaccine Institute (IVI), un organismo oficial de la Organización Mundial de Salud –el único, en el ámbito internacional– que se encarga específicamente de diseñar vacunas para los países menos favorecidos desde un punto de vista económico, en particular para la población pediátrica.

EL SISTEMA INMUNITARIO DE LAS MUCOSAS Y LAS VACUNAS DE MUCOSAS

En los últimos años, cada vez ha ido cobrando más firmeza el concepto de *sistema inmunitario de las mucosas*, el cual hace referencia a la función inmunitaria que comparten, entre otras, las mucosas de las vías respiratorias, del tracto digestivo, del aparato genitourinario, del ojo y las glándulas lagrimales, del oído y de la mama. Este sistema acapara varios récords. Por un lado, involucra al más numeroso conjunto de órganos y aparatos que tienen una función en común y cuenta con más de 400 m² de superficie,

lo que lo convierte también en el sistema más extenso del organismo. Por otro lado, y ya dentro de sus funciones inmunitarias específicas, alberga a más del 80% de las células inmunitarias y produce más de 5 g de inmunoglobulinas (Ig) al día. A pesar de su espectacularidad, estas cifras resultan lógicas si se tiene en cuenta que las mucosas constituyen la puerta de entrada de los alérgenos contenidos en el aire y en los alimentos y de numerosos antígenos de microorganismos patógenos y saprófitos, los cuales también pueden instalarse en este tejido formando colonias de billones de elementos.

Aunque el sistema inmunitario de las mucosas se rige por mecanismos sumamente complejos –y en buena medida no conocidos–, sus funciones principales son proteger y prevenir contra la invasión y colonización del organismo por microorganismos patógenos, reconocer y captar alérgenos y antígenos extraños y modular el desarrollo de las respuestas inmunológicas e inflamatorias cuando agentes extraños penetran en el organismo. Esta última función es muy importante –la más importante en condiciones fisiológicas–, porque conlleva la consecución de la adecuada inmunidad frente a alérgenos inocuos, como los ingeridos con los alimentos.

Para cumplir con las funciones referidas, el sistema inmunitario de las mucosas se vale, fundamentalmente, de dos mecanismos. El primero de ellos consiste en la inducción de *inmunidad local de mucosas* mediante la producción de anticuerpos de mucosas, sobre todo *inmunoglobulina A secretora (IgA-S)*, una proteína que tiene unas características estructurales únicas y es la más abundante en las secreciones del organismo. Este mecanismo conduce a la denominada *inmunidad productiva de las mucosas*. El otro mecanismo que utiliza este sistema, pero que sólo se activa en ciertas circunstancias, es la ausencia o supresión de respuestas locales y sistémicas frente a los antígenos inocuos que ya han atravesado el epitelio mucoso. Este mecanismo conduce a la *tolerancia mucosa* –antiguamente conocida como «tolerancia oral»–, y conlleva una inmunosupresión selectiva que evita respuestas inflamatorias no deseadas.

Las vacunas de mucosas también se valen de uno de estos dos mecanismos, según su propósito sea conseguir una inmunidad productiva o bien una tolerancia mucosa frente a un determinado antígeno. El hecho de que el sistema inmunitario de las mucosas responda de una u otra manera frente a un mismo antígeno depende de numerosas variables, en particular de las *características de los micronutrientes* y de la *composición del microbioma*. Por ello, lógicamente, cuando se diseña una nueva vacuna de mucosas, es esencial conocer y estudiar el comportamiento de estas variables. Sin embargo, al emprender esta tarea se cuenta con un recurso adicional muy valioso: la posibilidad de seleccionar un determinado *tipo de coadyuvante* que incline la respuesta del sistema inmunitario de las mucosas hacia la inmunidad productiva o bien hacia la tolerancia mucosa.

Es interesante recordar que los mecanismos referidos se desarrollan y maduran a ritmos diferentes. En concreto, la inmunidad productiva se adquiere en los primeros dos años de vida, antes que la inmunidad humoral, lo que permite que las vacunas de mucosas tengan un gran potencial en los neonatos, mientras que la tolerancia mucosa se completa más adelante, después que la tolerancia sistémica, hecho relevante a la hora

TABLA 1

**Vacunas de mucosas antiinflamatorias en fase de desarrollo
y aprobadas hacia finales de 2011**

En fases iniciales de desarrollo	En fase de evaluación	Introducidas en el mercado
Artritis reumatoide	Asma alérgica	Alergia al polen de abedul
Esclerosis múltiple	Dermatitis atópica	Alergia a proteínas de gato
Psoriasis	Esclerosis múltiple (oral)	Fiebre del heno
Diabetes mellitus tipo 1		
Enfermedad de Crohn		
Enfermedad celíaca		
Tiroiditis		
Lupus eritematoso sistémico		

de comprender por qué los trastornos alérgicos son más comunes en los niños que en los adultos.

VACUNAS DE MUCOSAS ANTIINFLAMATORIAS Y ANTIALÉRGICAS

Tradicionalmente, las vacunas de mucosas que inducen inmunidad productiva se han utilizado para proteger al organismo frente a enfermedades infecciosas, mientras que las que inducen tolerancia mucosa centran su interés en la prevención y el tratamiento de enfermedades autoinmunes e, incluso, de enfermedades inflamatorias crónicas. No obstante, ambos mecanismos, que coexisten de forma natural, también pueden utilizarse o manipularse para desarrollar vacunas contra las alergias, ya sea bloqueando la penetración del alérgeno a través de las mucosas y/o bien suprimiendo la respuesta inflamatoria de la última parte del proceso mediante el bloqueo específico de las células dendríticas (CD) y los linfocitos B de las mucosas.

Lamentablemente, cuando se contempla el panorama actual de vacunas de mucosas antiinflamatorias, se constata una palmaria escasez de productos. De hecho, hacia finales de 2011 sólo se habían aprobado tres productos de vacunas de este tipo –todos ellos fabricados en Europa por empresas danesas o francesas–, unos pocos estaban en fase de desarrollo o evaluación clínica y –en consonancia con lo expuesto anteriormente– muchos más se encontraban en sus fases iniciales de desarrollo (Tabla 1).

VACUNAS DE MUCOSAS ANTIINFECCIOSAS

Las vacunas antiinfecciosas utilizan los mecanismos del sistema inmunitario de las mucosas que conducen a la inmunidad productiva. La eficacia de estas vacunas se rige por tres «principios básicos»: 1) la inyección de antígenos por vía parenteral no es eficaz

para conseguir la expresión del sistema inmunitario de las mucosas; 2) la aplicación de los antígenos en las mucosas (bucal, sublingual, nasal, bronquial, rectal o genital) es más eficaz para inducir las respuestas inmunes en las mucosas, y 3) la inmunización parenteral puede reforzar una respuesta inmune preexistente. Este último principio ha tenido una gran influencia en el diseño de estrategias de vacunación; por ejemplo, en Uttar Pradesh y Bihar, en la India, se está llevando a cabo un estudio muy extenso en el que se evalúa la eficacia de las vacunas inyectables con poliovirus inactivados aplicadas a niños que previamente habían recibido inmunizaciones repetidas con la vacuna antipoliomielítica oral de virus vivos, y, al parecer, los resultados preliminares están siendo satisfactorios.

Lo primero que se debe considerar en el *diseño de una vacuna de mucosas antiinfecciosa* es establecer cuál es el *agente infeccioso* y cuáles son las *mucosas diana afectadas*, ya que la formulación de la vacuna diferirá notablemente en función de estos aspectos. Si se trata de un patógeno no invasivo y no inflamatorio, como el bacilo del cólera o la *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET), será preciso inducir inmunidad en un solo órgano, en este caso, la mucosa del intestino delgado. En cambio, cuando el agente infeccioso no es invasivo pero forma colonias y provoca inflamación, como ocurre con el género *Shigella* y los rotavirus, lo más pertinente será utilizar una inmunización combinada por vía sistémica y vía mucosa. Por último, frente a las enfermedades infecciosas invasivas e inflamatorias, como la poliomielitis y –especialmente– la fiebre tifoidea, lo más importante será prevenir la invasión, de manera que, en estos casos, la vacunación parenteral será más eficaz, aunque también podrán utilizarse estrategias combinadas.

Es oportuno señalar que lo que ha renovado el interés por las vacunas de mucosas es la referida *unidad funcional inmunitaria de las mucosas*. No obstante, como se verá con mayor detalle más adelante, tal unidad funcional es parcial y no garantiza la uniformidad de respuestas por parte de las distintas mucosas. Sin embargo, pese a esta falta de unidad, las *células*, *quimiocinas* e *integrinas* implicadas en las respuestas del sistema inmunitario de las mucosas convergen obligadamente en la sangre, por lo que este tejido resulta clave tanto para la acción como para la validación de las vacunas de mucosas.

Hoy en día se acepta que una *vacuna ideal* debe reunir las siguientes propiedades: 1) ser segura; 2) ser rentable desde el punto de vista de la relación coste-eficacia y del aprovechamiento del antígeno (tener la formulación más simple posible, economizar dosis, no requerir dispositivos de aplicación especiales o complejos y obtenerse a partir de un proceso de producción robusto y consistente [garantía de calidad y control de calidad]); 3) inducir una inmunidad de amplio espectro y duración prolongada (tanto en las mucosas como sistémica, ya sea mediada por anticuerpos y/o por linfocitos T); 4) poder administrarse por una vía accesible, y 5) disponer de una prueba o indicador que permita determinar su eficacia.

En este contexto, hacia finales de 2011, es decir, después de más de 50 años de la aparición de la vacuna oral contra la polio, numerosas vacunas de mucosas antiinfecciosas se encontraban en fases iniciales de desarrollo, pero sólo unas pocas se habían aproba-

TABLA 2

**Vacunas de mucosas antiinfecciosas en fase de desarrollo
y aprobadas hacia finales de 2011**

Descubrimiento/fase preclínica	En desarrollo	Introducida en el mercado
VIH	ECET (oral)	Poliomielitis (oral)
Calcivirus	ECET (transcutánea)	Rotavirus (oral)
<i>Chlamydia</i>	Cólera (oral, patógenos vivos)	Cólera (oral, patógenos muertos)
<i>H. pylori</i>	<i>Shigella</i> (oral, patógenos vivos)	Fiebre tifoidea (oral, patógenos vivos)
<i>C. difficile</i>	Fiebre tifoidea (oral)	Gripe (nasal, patógenos vivos)
<i>C. jejuni</i>	VIH	BCG (oral)
Herpes simple tipo 2	Herpes simple tipo 2	
<i>Giardia lamblia</i>	Virus sincitial respiratorio	
<i>E. histolytica</i>	Gripe (nasal)	
Norovirus (VLP)	Gripe (transcutánea)	
<i>S. pneumoniae</i>		
Virus sincitial respiratorio		
Virus parainfluenza tipo 3		

ECET: *Echerichia coli enterotoxigénica*; VIH: *virus de la inmunodeficiencia humana*; VLP: subunidades de virus (virus-like particles).

do para uso humano (Tabla 2). Además, mientras que la mayoría de las vacunas parenterales antiinfecciosas actuales utilizan subunidades, las vacunas de mucosas antiinfecciosas están compuestas por material ya usado desde antiguo (p. ej., virus atenuados o preparaciones de bacterias muertas).

Esta llamativa escasez de vacunas de mucosas antiinfecciosas se puede explicar por varias razones: por la mera tradición de la industria (que, en general, ha preferido desarrollar vacunas parenterales); por la falta de conocimientos sobre la inmunidad de las mucosas (inmunidad innata y adaptativa en los neonatos); por diversos aspectos relacionados con la seguridad; por cuestiones inherentes a la producción (como la necesidad de producir grandes cantidades); por problemas asociados a la eficacia (p. ej., la constatación de que las vacunas orales no se aplican tan correctamente en los países en vías de desarrollo como en los desarrollados); por trabas regulatorias (p. ej., la falta de una prueba rápida para predecir la eficacia de las vacunas de mucosas), y, por último –aunque muy importante–, porque todavía no se ha aprobado ningún adyuvante para vacunas de mucosas. En definitiva, lo que está detrás de esta carencia es una débil actividad

investigadora que ha redundado en una acusada falta de conocimientos. No obstante, como se comentará más adelante, hay señales que auguran que esta situación cambiará significativamente en los próximos años.

VÍAS DE APLICACIÓN DE LAS VACUNAS DE MUCOSAS

El objetivo de la vacunación con vacunas de mucosas es conseguir la forma deseada de inmunidad en el tejido donde es probable que se localice el patógeno y en el momento biológico oportuno, siendo el sitio de aplicación una de las variables más importantes en relación con la eficacia de estas vacunas.

El hecho de que las mucosas que integran el sistema inmunitario de las mucosas compartan una función inmunitaria podría inducir a creer, erróneamente, que la efectividad de las vacunas de mucosas no depende en gran medida de la vía de aplicación del antígeno. Sin embargo, la realidad es muy distinta, pues, como ya se ha señalado, este sistema no es tan homogéneo, de modo que la unidad funcional de las mucosas que lo integran tiene considerables diversificaciones y limitaciones.

Como es obvio, el sistema inmunitario de las mucosas no constituye una unidad anatómica, sino que está compuesto por una *serie de compartimentos* a los que se puede acceder por las correspondientes vías específicas. Desde el punto de vista de las vacunaciones, los más destacables son el *tracto respiratorio*, al que se accede por vía nasal; el *tracto digestivo superior*, al que se accede por vía oral; el *tracto digestivo inferior*, al que se accede por vía rectal, y el *tracto reproductor*, al que se accede –en las mujeres– por vía vaginal. Esta compartimentación podría sugerir que una vacuna de mucosas que se aplicara por una determinada vía, por ejemplo, la nasal, sólo generaría sus efectos en las mucosas correspondientes, en este caso, en las de las vías respiratorias. Sin embargo, esta suposición también sería equivocada. Lo que ocurre es que, si bien el sistema inmunitario de las mucosas no tiene una unidad funcional tan marcada, los compartimentos referidos tampoco se comportan siempre de forma necesariamente aislada. En este sentido, se ha visto que la extensión de los efectos de una vacuna suele seguir unos *patrones de respuesta* lógicos, que se relacionan con la vía de aplicación, aunque, en algún caso, siguen patrones atípicos. Así, como se ha evidenciado en diversas experimentaciones, si se administra una vacuna por vía oral, es probable que sus efectos sean más pronunciados en el intestino delgado y más escasos o nulos en el intestino grueso, mientras que si la vacuna se aplica por vía rectal ocurrirá lo contrario. De la misma manera, si se aplica una vacuna por vía nasal, sus efectos se apreciarán en el tracto respiratorio superior, y tal vez también en el inferior, aunque no en las mucosas del tubo digestivo, y sí en cambio, llamativamente, en las del aparato reproductor. Por último, cuando una vacuna se aplica en la mucosa vaginal, sólo se induce una respuesta regional. Además, hay que tener en cuenta que estos patrones de extensión de los efectos de la vacunación también varían según se trate de una vacuna de mucosas antiinflamatoria, antialérgica o antiinfecciosa.

A este respecto, y en relación con la eficacia de las vacunas de mucosas antiinfecciosas, es interesante apuntar que últimamente se han generado grandes expectativas en las que

se aplican por la vía de la mucosa sublingual, las cuales parecen inducir una respuesta más extensa (p. ej., localmente en las mucosas de las vías respiratorias y a nivel sistémico) que las que se aplican por otras vías, aunque es necesario confirmar estos hallazgos obteniendo una mayor experiencia en ensayos clínicos controlados.

Compartimentación y migración celular en el sistema inmunitario de las mucosas

La compartimentación de las respuestas del sistema inmunitario de las mucosas se explica por la especificidad de los sitios hacia los que se dirigen las células migratorias de la respuesta inflamatoria. Este *patrón migratorio* está definido por los denominados receptores de asentamiento, por los receptores de quimiocinas de los linfocitos B y T que se encuentran en los *sitios de inducción de las respuestas* y por las moléculas de asentamiento que actúan en los sitios efectoras. De esta manera, tal como se ha avanzado, el único tejido obligatoriamente común en todas las respuestas del sistema inmunitario de las mucosas es la sangre (Figura 1).

En los últimos años se han dado notables pasos en el conocimiento de las bases moleculares que programan la *migración de las células hacia una o varias mucosas efectoras*, con la consiguiente definición de diversos patrones migratorios. El *patrón migratorio de la integrina $\alpha_4\beta_7$* es uno de los mejor caracterizados; ésta es una molécula de asentamiento que interactúa con células y otras moléculas específicas en las distintas mucosas efectoras. En concreto, la integrina $\alpha_4\beta_7$ actúa en las placas de Peyer y los folículos linfoides aislados de la mucosa intestinal, donde interactúa con la *molécula de citoadhesión aderesina mucosal 1 (MAdCAM1)*; en la mucosa del intestino delgado, la quimiocina CCL25 (*thymus expressed chemokine [TECK]*) lo hace con su receptor CCR9, y en las mucosas del intestino delgado y del intestino grueso, la quimiocina CCL28 (*mucosae associated epithelial chemokine [MEC]*) interactúa con su receptor CCR10.

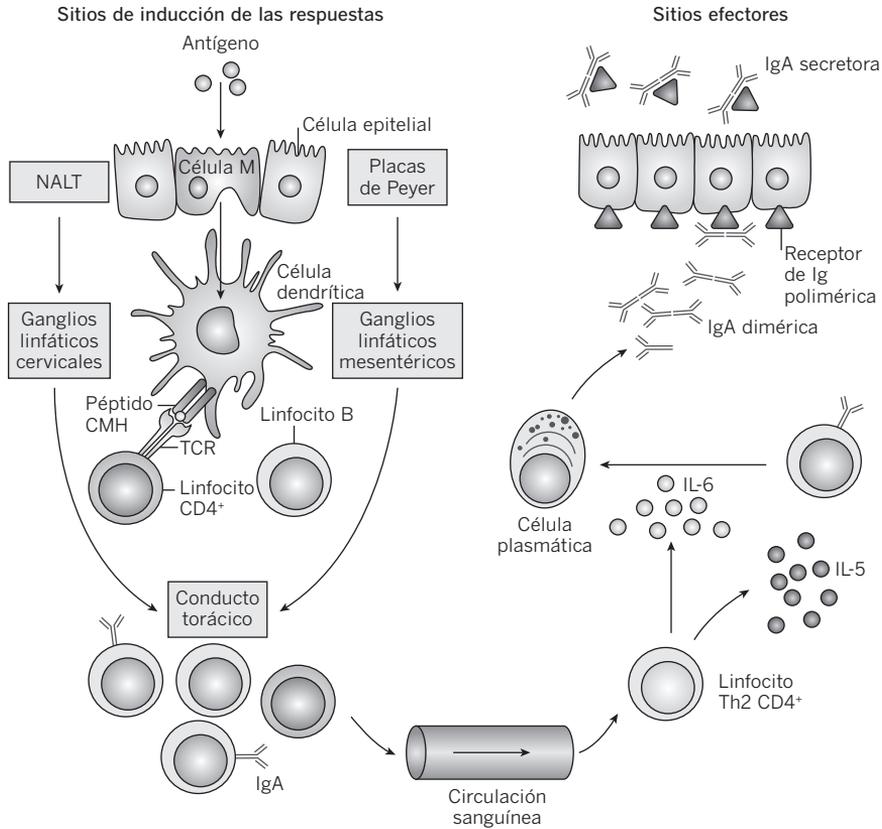
Como concepto fundamental en relación con el desarrollo de vacunas, cabe destacar que en la compartimentación del sistema inmunitario de las mucosas existe una *base molecular específica de cada mucosa inductiva* que programa las células migratorias para que se dirijan a los distintos tejidos potencialmente infectados por virus utilizando vías y mecanismos plasmáticos y tisulares igualmente específicos (Figura 2).

Vacunas por vía sublingual

La vía de administración sublingual se ha venido utilizando, básicamente, para la aplicación de vacunas de mucosas antialérgicas. Sin embargo, en los últimos años se ha comenzado a investigar la utilidad de esta vía para las *vacunas que inducen inmunidad productiva*. Este interés ha surgido a raíz de los problemas que generan las vacunas de aplicación oral y nasal, que hoy en día constituyen las vías de aplicación más comunes de las vacunas de mucosas. En concreto, se ha visto que las vacunas de aplicación oral requieren dosis elevadas, consiguen una inmunidad de corta duración y deben seguirse de revacunaciones frecuentes. En cuanto a las vacunas de aplicación nasal, no sólo se ha observado que no gozan de una buena aceptación entre los sujetos de más edad y

FIGURA 1

Papel clave de la circulación sanguínea en la respuesta inmunitaria de las mucosas



CMH: complejo mayor de histocompatibilidad; Ig: inmunoglobulina; IL: interleucina; NALT: tejido linfoide asociado nasal; TCR: receptor de linfocito T.

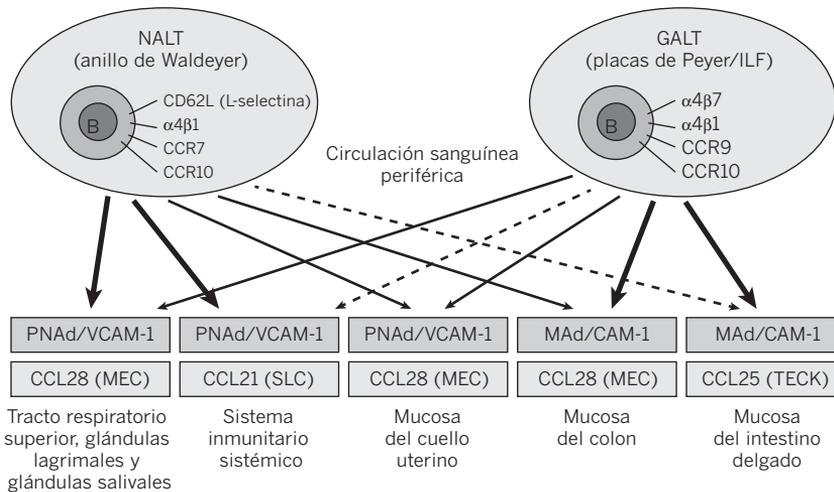
Adaptado de Nature Reviews/Immunology

los niños pequeños, sino que también pueden generar –aunque raras veces– efectos adversos graves que requieren dispositivos de aplicación especiales y que –esto es muy importante en relación con su eficacia antiinfecciosa– son poco útiles para la inducción de respuestas inmunitarias intestinales.

En relación con las vacunas por vía sublingual, se han llevado a cabo diversas experimentaciones en modelos animales. Çuburu y colaboradores¹ han demostrado que mediante la inmunización con distintos tipos de antígenos por vía sublingual –y con la ayu-

FIGURA 2

Compartimentación de los linfocitos B de las mucosas



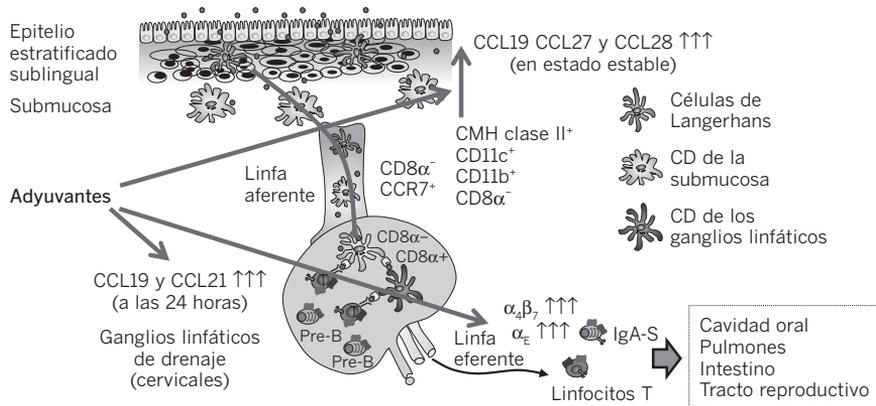
CAM: molécula de adhesión celular 1; CC: quimiocina; CD: célula dendrítica; GALT: tejido linfoide asociado al intestino; ILF: folículos linfoides solitarios (de la pared intestinal); MAAd: adreína de mucosa; MEC: quimiocina epitelial asociada a la mucosa; NALT: tejido linfoide asociado a la mucosa nasal; PNAd: adreína de ganglio linfático periférico; SLC: tejido linfático secundario; TECK: quimiocina expresada por el timo; VCAM-1: molécula de adhesión a la célula endotelial vascular.

da del adyuvante apropiado–, no sólo se consigue la proliferación de múltiples células secretoras de anticuerpos en diversas mucosas, sino que también se induce una mejor respuesta efectora y citolítica de linfocitos T ($CD8^+$) –tanto a nivel sistémico como en las mucosas– que con la inmunización por vía parenteral. Además, en otros trabajos experimentales²⁻⁴ en modelos animales de infección respiratoria se ha observado que mediante la aplicación de antígenos del virus de la gripe, del virus del herpes genital o del *Helicobacter pylori* –y utilizando como adyuvante la toxina colérica, que es muy potente– se inducen respuestas de inmunidad productiva en las mucosas respiratorias, en las genitales e incluso en las del intestino delgado.

En el IVI se llevó a cabo una investigación en ratones *knock-out* con el propósito de descifrar el mecanismo gracias al cual la inmunización sublingual induce inmunidad en una amplia variedad de órganos. El proceso involucrado en esta respuesta inmunitaria es muy complejo, aunque, básicamente, consta de tres pasos. El primero de ellos es el reconocimiento del antígeno, un fenómeno que está potenciado en el tejido sublingual debido a la amplia variedad de células inmunitarias que residen en el mismo (con antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad [CMH] de clase II [DR⁺] y ciertas células dendríticas [CD11c⁺, CD11b⁺, CD8⁻]) y también gracias a la notable expresión constitucional de quimiocinas con que cuenta el epitelio sublingual (CCL19, CCL27 y

FIGURA 3

Respuesta inmunitaria subsecuente a la vacunación por vía sublingual



CC: quimiocina; CD: célula dendrítica; CMH: complejo mayor de histocompatibilidad; IgA-S: inmunoglobulina A secretora.

CCL28). El segundo paso consiste en la *migración de las células dendríticas CD8α* hacia los ganglios linfáticos y el drenaje de éstos hacia los vasos eferentes, proceso en el que se expresan *receptores de quimiocinas*, como CCR7+, y *quimiocinas*, como CCL19 y CCL21. El último paso corresponde a la *programación y la migración de linfocitos T y B* hacia diferentes tejidos efectores, en concreto, las *mucosas oral, bronquial, intestinal y genital*, un paso en el que interviene la estimulación de las *integrinas α4β7 y αE*. Estos mecanismos son de por sí muy interesantes, pero también lo es el hecho de que en estas experimentaciones se probaran distintos coadyuvantes y que sólo la toxina del cólera tuviera capacidad de inducir reacciones en los tres pasos mencionados (Figura 3).

ADYUVANTES, FORMULACIÓN Y PRUEBAS DE VALIDACIÓN DE LAS VACUNAS DE MUCOSAS

A pesar de los grandes avances habidos en el conocimiento de los mecanismos que intervienen en las respuestas que genera el sistema inmunitario de las mucosas, todavía quedan por resolver algunos obstáculos importantes que dificultan de forma singular el desarrollo de nuevas vacunas. Entre éstos, destacan la falta de adyuvantes aprobados, la necesidad de una adecuación eficiente de las formulaciones de los productos y la ausencia de una única prueba que permita valorar la respuesta inmunitaria y validar la eficacia de las vacunas de mucosas.

Adyuvantes de vacunas de mucosas. Pese a la evidente necesidad de disponer de adyuvantes, hasta finales de 2011 no se había conseguido que las autoridades reguladoras aprobasen ninguno para las vacunas de mucosas. Entre los numerosos candidatos a

adyuvantes vacunales de este tipo que se están evaluando en la actualidad, merecen una mención especial el *chitosán*, los *detergentes* y los *polímeros*, tanto por su eficaz sistema de liberación como por su idoneidad para las vacunas de aplicación intranasal. Sin embargo, los candidatos más prometedores son la *toxina colérica*, la toxina termolábil de *E. coli* y algunos derivados no tóxicos de ésta, todos los cuales tienen un claro efecto inmunomodulador⁵. Y entre éstos, la *enterotoxina termolábil de E. coli con doble mutación* es el candidato con el que se han obtenido mejores resultados, tanto en los ensayos preclínicos como, de forma muy significativa, en los estudios clínicos de seguridad de vacunas orales realizados por el grupo de John Clements (Tulane University, Nueva Orleans, EEUU). Así pues, no sería de extrañar que, en uno o dos años, esta enterotoxina se convirtiera en el primer coadyuvante de vacunas de mucosas aprobado.

Formulación de los productos. En lo que respecta al constructo de los productos, no sólo debe tenerse en cuenta la vía de aplicación, sino también los coadyuvantes que resulten más apropiados para conseguir una mayor expresión en los sitios diana efectivos. Hoy por hoy, el mayor reto es lograr el desarrollo de vacunas de subunidades que tengan tanta o más eficacia que las vacunas enteras o incluso que los propios patógenos contra los que actúan.

Pruebas para la evaluación de la respuesta y la validación. Las autoridades reguladoras tampoco han podido aprobar hasta la fecha una única prueba que sirva para medir el tipo de respuesta inmunitaria adecuado en los tejidos linfoides apropiados y en el momento oportuno. La mayor dificultad para obtener una prueba que reúna estas características radica en la ya referida compartimentación del sistema inmunitario de las mucosas, hecho que hace extremadamente complicado establecer qué parámetros y qué tejido local o sistémicos son los relevantes en la respuesta biológica del organismo. Por esta razón, actualmente *se considera que la mejor opción es desarrollar una prueba que valore la presencia y actividad de las células inmunitarias específicas de las respuestas generadas en las mucosas en su paso obligado por la sangre*. Por ejemplo, una prueba que se aplique a las células inmunitarias capturadas en la sangre periférica y mida la actividad de elementos como la integrina $\alpha_4\beta_7$ o los receptores de las quimiocinas CCR10 y CCR7, de manera que permita predecir el destino de dichas células y, por lo tanto, la eficacia de una determinada vacuna de mucosa. En este sentido, es interesante referir una prueba que ha diseñado el grupo de Saletti (Saletti y cols., *Nature Prot.*, en prensa) y que utiliza una técnica de ELISPOT (*enzyme-linked immunosorbent spot*) que fue desarrollada por el autor de este capítulo en el año 1983⁶. Esta prueba evalúa, mediante ELISPOT, las células productoras de IgA específicas en sangre completa al cabo de siete días de la aplicación de la vacuna de la polio por vía oral y presenta las ventajas de requerir muestras inferiores a 1 ml de sangre, realizarse de forma sencilla y completamente automatizada y ofrecer los resultados en sólo cuatro horas y de forma digitalizada.

CONCLUSIONES

- Las vacunas de mucosas pueden utilizarse:
 - 1) Para inducir respuestas inmunitarias productivas en las mucosas, en particular las mediadas por IgA (p. ej., con las vacunas orales de patógenos vivos resulta más fácil).

- 2) Para suprimir las respuestas locales y sistémicas dirigidas contra los linfocitos Th1 (y Th17).
 - 3) Para inmunomodular ambas acciones, es decir, las respuestas inmunitarias productivas en las mucosas y las respuestas locales y sistémicas en las que participan células inmunitarias y citocinas.
- Resulta difícil lograr estos objetivos con antígenos inactivados, en particular si no se utilizan coadyuvantes, y actualmente no se dispone de ningún coadyuvante apropiado (aunque hay candidatos prometedores).
 - Además, hay otros aspectos que conviene resaltar:
 - 1) La formulación del producto será un aspecto fundamental que variará en función de la vía de administración.
 - 2) Las vacunas de mucosas requieren mayores cantidades de antígenos que las vacunas parenterales.
 - 3) Las respuestas de las mucosas son compartimentadas, lo que debe tenerse en cuenta a la hora de elegir la vía de administración y también para saber cómo y dónde evaluar dichas respuestas.

..... REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Çuburu N, Kweon MN, Song JH, et al. Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. *Vaccine* 2007;25:8598-610.
2. Song JH, Nguyen HH, Çuburu N, et al. Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:1644-9.
3. Çuburu N, Kweon MN, Hervouet C, et al. Sublingual immunization with nonreplicating antigens induces antibody-forming cells and cytotoxic T cells in the female genital tract mucosa and protects against genital papillomavirus infection. *J Immunol* 2009;183:7851-9.
4. Raghavan S, Ostberg AK, Flach CF, et al. Sublingual immunization protects against *Helicobacter pylori* infection and induces T and B cell responses in the stomach. *Infect Immun* 2010;78:4251-60.
5. Norton EB, Lawson LB, Freytag LC, Clements JD. Characterization of a mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin, LT(R192G/L211A), as a safe and effective oral adjuvant. *Clin Vaccine Immunol* 2011;18:546-51.
6. Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, et al. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983;65:109-21.

Activación de células dendríticas por componentes bacterianos a través de receptores para patrones moleculares. Papel inmunorregulador a nivel de la mucosa intestinal

Liam O'Mahony

Swiss Institute of Allergy and Asthma Research, University of Zurich,
Davos, Suiza

MICROBIOTA Y DISBIOSIS

El tracto gastrointestinal es el compartimento donde se produce la mayor acumulación de leucocitos del organismo y también donde éstos se encuentran expuestos, permanentemente, a un amplio abanico de antígenos procedentes del exterior. Una compleja red de señales que interactúa entre diferentes tipos celulares asegura el mantenimiento de un equilibrio apropiado entre la defensa frente a la infección por bacterias patógenas y la tolerancia frente a bacterias no patógenas o antígenos inocuos, como los que componen la *microbiota* o flora saprófita intestinal. Cualquier alteración de este equilibrio se traduce en una activación anómala de la respuesta inmunológica, como la que se observa en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal.

La microbiota es necesaria para un desarrollo óptimo de los organismos superiores y la homeostasis del sistema inmunológico¹⁻⁴. Esta flora simbiótica ayuda a la digestión de los alimentos, compete con los patógenos, degrada la mucina y favorece la diferenciación de las células epiteliales de la mucosa intestinal y del tejido linfoide asociado a esta mucosa. La composición y la actividad metabólica de la microbiota tienen efectos importantes sobre la inducción de inflamación y sobre la tolerancia inmunitaria. Hay evidencias que sugieren que ciertos tipos de bacterias producen señales que actúan induciendo una respuesta inmunológica dañina para el organismo, mientras que otras protegerían contra una respuesta excesiva. Por lo tanto, la actividad del sistema inmunológico de los mamíferos parece estar gobernada por un equilibrio entre los factores patogénicos y no patogénicos derivados de la flora microbiana endógena⁵⁻⁷. Un desequilibrio de esta balanza, o *disbiosis*, podría causar respuestas inflamatorias anómalas y contribuir, de esta manera, al incremento de ciertas enfermedades de causa inmune que se ha registrado en las últimas décadas (entre otras, las alergias y la enfermedad inflamatoria in-

testinal). No se sabe, sin embargo, si la disbiosis puede ser la causa, la consecuencia o un mero epifenómeno asociado al desarrollo de estas enfermedades.

ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO ASOCIADO A MUCOSAS

El sistema inmunológico intestinal está continuamente sometido al estímulo que supone el contenido de su luz y las bacterias allí presentes, aunque en condiciones normales se mantiene en un estado de «inflamación fisiológica controlada».

Mientras que su función primaria es proteger la superficie epitelial y los tejidos adyacentes de potenciales agentes y microorganismos dañinos, el sistema inmunológico de las mucosas también debe tolerar los agentes no dañinos (antígenos de la dieta) y los microorganismos comensales. La capacidad de tolerar un amplio rango de antígenos exógenos es una característica única del sistema inmunológico de las mucosas que no se observa en la inmunidad sistémica⁸. La tolerancia inmunitaria se define como la falta específica de reactividad frente a un antígeno como resultado de su exposición previa al mismo. Este proceso está mediado por células específicas presentes en la mucosa intestinal, como los linfocitos T reguladores (Treg), tal como se abordará más adelante.

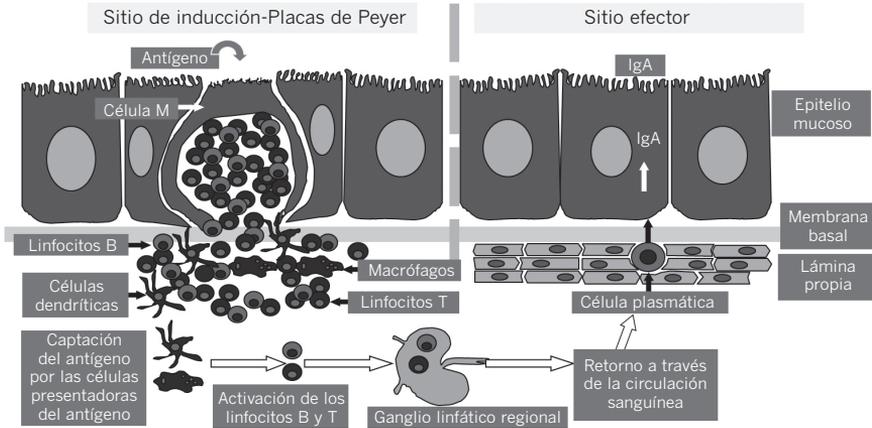
Tejido linfoide asociado al intestino

El sistema inmunológico de la mucosa intestinal está compuesto por un tejido linfoide organizado y otro difuso, conocido como *tejido linfoide asociado al intestino* (*gut-associated lymphoid tissue* [GALT]). Las estructuras organizadas del GALT incluyen las placas de Peyer, los ganglios mesentéricos y los folículos linfoides solitarios de la pared intestinal, donde se facilita la captación, el procesamiento y la presentación de los antígenos (Figura 1). En contraste, la estructura difusa del GALT constituye un sistema no organizado en el que las células individuales, como los linfocitos intraepiteliales (LIE), están dispersas a lo largo del tejido no linfoide. Por último, las propias células epiteliales suponen una barrera frente a la translocación de antígenos y participan activamente como sensores del contenido luminal a través de receptores tipo Toll (TLR) expresados en su superficie.

Las *placas de Peyer* son agregados de tejido linfoide que se encuentran predominantemente en la mucosa del íleo terminal y contienen numerosos folículos linfoides. Un individuo adulto tiene, de promedio, unas 200 placas de Peyer. Estas placas tienen la apariencia de un órgano linfoide secundario, con zonas bien definidas de linfocitos T y B. La placa de Peyer comprende cinco compartimentos diferentes: los folículos asociados al epitelio (FAE), la cúpula o domo subepitelial, el folículo linfoide, la corona y la región interfolicular. Los antígenos y microbios son transportados a través de las células M (células epiteliales diferenciadas para esta función) y seguidamente son captados por las *células dendríticas* (CD) que residen bajo el domo subepitelial. La captación de antígenos por las CD en las placas de Peyer se considera un paso crítico en la inducción de la inmunidad adaptativa⁹. Se han identificado tres poblaciones de CD diferentes en las placas de Peyer murinas: 1) las CD11b⁺, que están presentes dentro la región del domo subepitelial y tras su estimulación *in vitro* secretan principalmente interleucina (IL)-10¹⁰; 2) las CD8αα⁺, que residen dentro de la región interfolicular rica en linfocitos T, y 3) las CD doble negativas (CD11b⁻ y CD8 αα⁻), que se encuentran dispersas por toda

FIGURA 1

Respuesta inmunológica ante la presencia de un antígeno en las placas de Peyer



Los antígenos son captados activamente por las células M que se sitúan en la parte superior de las placas de Peyer. Las células presentadoras de antígeno dentro de la placa de Peyer activan los linfocitos T y B, que migran a los ganglios linfáticos de drenaje. Las células efectoras, como las células plasmáticas, retornan a la mucosa intestinal, donde ejercen su función protectora.

IgA: inmunoglobulina A.

la placa de Peyer. Las $CD8\alpha^+$ y las CD doble negativas comparten características funcionales, ya que ambas secretan IL-12 e inducen predominantemente respuestas Th1. El reclutamiento de CD en la placa de Peyer está condicionado por la secreción de quimiocinas (CCL19 y CCL21) que interaccionan con el receptor CCR7 en la CD. Solamente las $CD11b^+$ expresan el receptor CCR6, que permitiría la migración de estas células mediada por su ligando, el CCL20, el cual es secretado dentro de los FAE¹¹. Los mecanismos precisos por los que las CD coordinan la iniciación de una respuesta inmunológica polarizada para antígenos orales concretos *in vivo* no se han aclarado aún, por lo que éste es un campo de intensa investigación.

Los antígenos captados por las CD dentro de la placa de Peyer son transportados por estas mismas células a los *ganglios linfáticos mesentéricos (GLM)*. Dentro de éstos, las interacciones entre las CD y los linfocitos T y B tienen como resultado la inducción de una respuesta de inmunidad de mucosas defensiva o tolerante. En los GLM se han detectado CD restringidas de mucosas que contienen microorganismos comensales vivos¹². La función barrera de los GLM permite una respuesta inmune restringida a la mucosa exenta de la necesidad de inducir una inmunidad sistémica a estos microorganismos. Además, las CD de los GLM secretan de forma preferente IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) en respuesta a microorganismos comensales del intestino¹³.

Si la función de los GLM es normal, la estimulación repetida de los microorganismos comensales redundará en la inducción y secreción local de inmunoglobulina A (IgA) específica frente a aquéllos. La IgA, cuando está presente en la capa de moco que protege la superficie apical de las células epiteliales, es uno de los factores que limitan la penetración bacteriana.

El *GALT difuso* comprende los LIE y las células mononucleares de la lámina propia. Los *LIE* son una subpoblación especializada de linfocitos T en la que predominan las células CD8⁺ y las células con receptor $\gamma\delta$. Estas últimas tienen un receptor de linfocitos T (TCR) con un repertorio limitado, en comparación con los linfocitos T con TCR convencional ($\alpha\beta$), y son en parte conducidas por la IL-15¹⁴. Como su nombre lo indica, los LIE se encuentran preferentemente entre las células epiteliales, a lo largo de todo el tracto intestinal. Su papel exacto en la inmunidad intestinal no está claro, pero los estudios sugieren que, debido a su interacción con las células epiteliales, contribuyen a la generación de linfocitos T supresores, necesarios para el mantenimiento de la homeostasis intestinal, así como a la cicatrización epitelial, en caso de lesión¹⁵.

Una anomalía en la actividad de los LIE puede producir patología, como la que se observa en la *enfermedad celíaca*¹⁶. En este trastorno, la exposición al gluten produce un incremento de la secreción de IL-15, que, a su vez, aumenta la expresión del receptor para NKG2D en los LIE, como asimismo la del receptor de la proteína A relacionada con las moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MICA). La interacción entre estos dos receptores produce la muerte de los enterocitos y la inmunopatología asociada a esta enfermedad.

Además de los LIE, también existen las *CD intraepiteliales*¹⁷. Las CD penetran entre las células epiteliales rompiendo las uniones estrechas y envían sus prolongaciones (dendritas) fuera del borde epitelial para tomar muestras de bacterias directamente en la luz. Gracias a la capacidad de las CD para expresar proteínas implicadas en las uniones estrechas interepiteliales, como la ocludina, la claudina 1 y la *zonula occludens* 1, su presencia no reduce la integridad de la barrera epitelial y, en cambio, permite disponer de un sistema de cribado adicional para las bacterias adheridas al polo apical de las células epiteliales.

Dentro de la *lámina propia* se observa una mezcla celular heterogénea compuesta por macrófagos, CD, mastocitos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos T y B. Estos últimos son fundamentalmente células efectoras que han sido activadas en los folículos linfoides y reclutadas hacia la mucosa desde el sistema circulatorio. Los linfocitos B diferenciados en células terminales producen cantidades ingentes de IgA, la cual se transporta hacia la luz intestinal a través de las células epiteliales. La *IgA secretora (IgA-S)* es la inmunoglobulina más importante del intestino y el mayor contribuidor a la inmunidad adaptativa de la mucosa frente a microorganismos de la luz. Cada día se secretan aproximadamente 3 g de IgA-S en la luz del intestino humano¹⁸. Se considera que la IgA-S inhibe la adherencia de las bacterias a las células epiteliales mediante su unión a los patógenos potenciales, impidiendo así que éstos penetren en el organismo¹⁹. Los anticuerpos IgA

no unen complemento, por lo que no tienen capacidad de inducir una reacción inflamatoria. Además, la IgA-S, al atrapar a los antígenos dentro de la capa de moco que recubre la superficie epitelial, facilita su eliminación. La respuesta inmunológica generada frente a bacterias comensales y patógenas estimula la producción de IgA-S específica contra tales microorganismos.

Las *células epiteliales* intervienen en la absorción de nutrientes, pero también tienen una función esencial desde el punto de vista inmunológico. Las uniones estrechas entre las células epiteliales aseguran la exclusión de sustancias proinflamatorias y microbios, que, por lo tanto, quedan fuera de los tejidos subepiteliales. Además, como se verá más adelante, expresan una serie de receptores cuya activación por sus ligandos provoca la producción de quimiocinas. Por ejemplo, cuando la flagelina bacteriana se une al TLR-5, se produce la secreción de IL-8 y CCL20, lo que asegura una rápida llegada de células mononucleares al sitio de activación/infección. La respuesta proinflamatoria de las células epiteliales frente a los patógenos puede ser modulada por la flora comensal. *In vitro*, las líneas de células epiteliales secretan rápidamente quimiocinas, gracias a un mecanismo dependiente de la activación del factor nuclear kappaB (NF- κ B) en respuesta a su cocultivo con patógenos, pero no con bacterias comensales tales como *Bifidobacteria* o *Lactobacilli*²⁰. Más aun, la exposición simultánea a ambos tipos de microorganismos, patógenos y comensales, genera una respuesta proinflamatoria atenuada^{21,22}.

Las *células de Paneth* son células epiteliales especializadas que se encuentran en la base de las criptas de Lieberkuhn. Estas células producen una batería de moléculas con propiedades antimicrobianas, entre ellas las α -defensinas. Estas últimas son péptidos catiónicos que contienen tres enlaces disulfuro y alteran la integridad de la membrana de los microbios a los que se unen. Las moléculas antimicrobianas producidas por las células de Paneth protegen las células intestinales de los microbios patógenos que se han ingerido, limitando así su número y su capacidad de colonización en las criptas y la luz. Es interesante señalar que los niveles de α -defensinas procedentes de las células de Paneth están disminuidos en pacientes con *enfermedad de Crohn con afectación ileal*, pero no en aquellos cuya enfermedad se limita al colon²³, lo que significa que la disminución de la producción de α -defensinas podría ser un factor de riesgo de la enfermedad de Crohn ileal.

RECONOCIMIENTO DE MICROORGANISMOS POR LA INMUNIDAD INNATA

Una respuesta inmune apropiada frente a microorganismos nuevos requiere formas selectivas de inmunidad específica mediadas por subpoblaciones de linfocitos Th efectoras funcionalmente polarizadas, como linfocitos Th1 productores de interferón gamma (IFN- γ) o linfocitos Th2 productores de IL-4 que se diferencian y desarrollan a partir de un *pool* de precursores de linfocitos T vírgenes (*naïve*). Hay suficiente evidencia de que los microorganismos dirigen el desarrollo de la polarización de las células efectoras mediante su interacción con las células de la inmunidad innata, como las CD^{13,24-28}. Éstas son *células presentadoras de antígeno CD profesionales* que se distribuyen en los sitios potenciales de entrada de patógenos en forma de células inmaduras y criban eficazmente su microambiente en busca de antígenos extraños. Tras su activación por se-

ñales liberadas por los microorganismos o señales de alarma de los tejidos infectados, las CD centinelas entran en un proceso de maduración hacia CD con una potente capacidad de activación de linfocitos T y migran hacia las áreas T de los órganos linfoides hacia los que drenan. Una vez allí, las CD efectoras activarán los linfocitos Th vírgenes mediante la presentación de antígenos específicos del patógeno (complejos péptidos-CMH, señal 1) y de señales de coestimulación (moléculas de la familia B7, señal 2)²⁹. Además de las señales 1 y 2, las CD producen la *señal 3*, que determina la polarización de los linfocitos Th vírgenes hacia linfocitos Th1, Th2, Th9, Th17 o Treg³⁰. Al igual que la señal 2, la señal 3 es heterogénea y puede estar mediada por interacciones entre moléculas de membrana o factores solubles, entre ellos IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TGF- β , IFN- α , ligando OX40 (OX40L) y ácido retinoico³¹⁻³⁸. Es importante destacar que estudios *in vitro* indican que los niveles de expresión de estas moléculas polarizantes de los linfocitos Th y procedentes de las CD maduras dependen fuertemente de las condiciones en las que se produjo la activación inicial de las células centinelas inmaduras. Estos hallazgos implican que los gérmenes patógenos y comensales pueden condicionar el desarrollo de distintos fenotipos de CD y provocar la liberación de los mediadores tisulares implicados en la polarización.

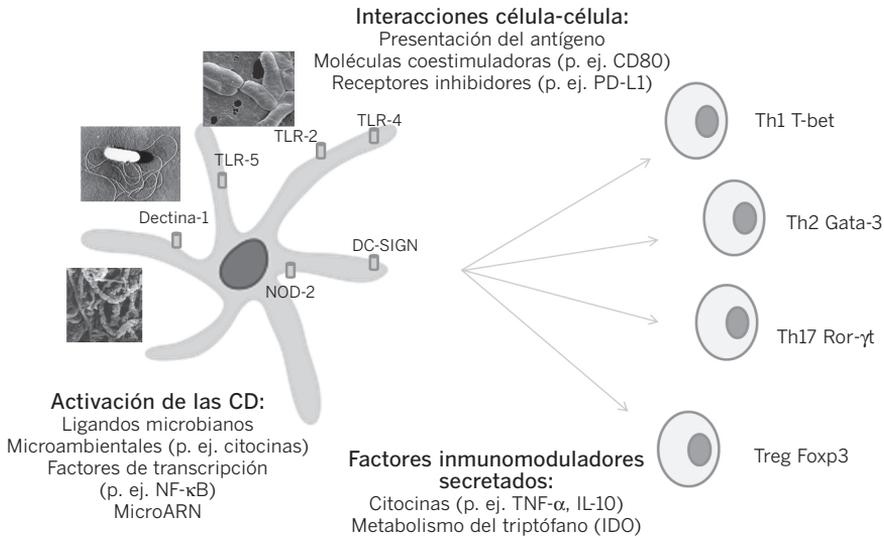
La selección de una señal apropiada de secreción de citocinas por las CD depende de una variedad de factores, pero está significativamente influenciada por la *unión de unos ligandos de origen microbiano (patrones moleculares asociados a patógenos [PAMP]) a sus receptores* en las CD (*receptores de reconocimiento de patrones [PRR]*), entre ellos los TLR y los *receptores de lectina tipo C (CLR)*. Los PAMP son carbohidratos bacterianos (p. ej. lipopolisacárido [LPS] de bacterias gramnegativas, LPS o manosa); ácidos nucleicos de origen bacteriano o viral (ácido desoxirribonucleico [ADN] y ácido ribonucleico [ARN]), péptidos bacterianos (flagelina), peptidoglucanos y ácidos lipoteicoicos (bacterias grampositivas), lipoproteínas y glucanos de origen fúngico. La unión diferencial de los ligandos a sus PRR activa una cascada de señales intracelulares que da como resultado la secreción de citocinas y/o la maduración celular (Figura 2). Ciertas vías intracelulares de señalización están bien descritas (p. ej., la vía TLR-4), mientras que otras aún se están investigando. Sin embargo, en investigaciones *in vivo* se ha demostrado que en las CD se activan simultáneamente múltiples PRR, lo que impide comprender cuál es la consecuencia de una posible cooperación o competición entre las señales resultantes de las diferentes cascadas. La especificidad de estas respuestas se consigue a través del particular mosaico de activación de los PRR que resulten implicados o, lo que es lo mismo, de los PAMP disponibles en función del patógeno y de las células de la inmunidad innata implicadas.

Papel de los TLR

Los TLR son receptores filogenéticamente conservados que reconocen PAMP. Se conocen al menos 11 miembros de la familia de TLR que reconocen diferentes componentes de bacterias y virus (Tabla 1). Las CD expresan TLR, y sus señales inducen la maduración de aquéllas, lo que permite el aumento de expresión de moléculas del CMH y de moléculas de coestimulación, así como la producción de citocinas proinflamatorias. Es a través de este proceso de maduración que las CD adquieren su capacidad única de

FIGURA 2

Especificidad de la respuesta inmunológica tras la estimulación de las células dendríticas por productos microbianos



La activación de las CD por determinados productos microbianos (PAMP) permite la inducción de una respuesta inmune apropiada. La especificidad de estas respuestas se consigue mediante la activación de un particular mosaico de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y está determinada por la disponibilidad de diferentes PAMP y las células de la inmunidad innata implicadas.

ARN: ácido ribonucleico; CD: célula dendrítica; DC-SIGN: dendritic cell specific ICAM-3-grabbing non-integrin; IDO: indolamina 2,3-oxigenasa; IL: interleucina; NF-κB: factor nuclear kappaB; NOD: receptor tipo NOD; PD-L1: inhibidor de señalización PD-L1; Th1 T-bet: linfocito T colaborador inducido por el factor de transcripción T-bet; Th2 Gata-3: linfocito T colaborador 2 inducido por el factor de transcripción GATA-3; Th17 Ror-γt: linfocito T colaborador 17 Ror-γt; TLR: receptores tipo Toll; TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa; Treg Foxp3: linfocitos T reguladores Foxp3.

actuar sobre los linfocitos T vírgenes. Además, la activación de TLR específicos puede permitir la polarización de respuestas Th. Así, por ejemplo, la unión del polisacárido A (secretado por *Bacteroides fragilis*) a TLR-2 induce la polarización hacia células Th1 productoras de IFN-γ³⁹. Por otra parte, los distintos tipos de CD (p. ej., mieloides o plasmocitoides) expresan diferentes grupos de TLR, lo que apoya el concepto de que estos elementos se desarrollan a través de diferentes vías para reconocer diferentes tipos de antígenos microbianos²⁵. Las CD plasmocitoides expresan preferentemente TLR-7 y TLR-9, mientras que las CD mieloides expresan TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 y TLR-8. Las células de Langerhans tienen una expresión reducida de TLR-1, TLR-4 y TLR-5, lo que les confiere una menor reactividad para ligandos bacterianos⁴⁰. Esta reacción atenuada de las células de Langerhans frente a las bacterias podría ser un mecanismo que contribuyera a la tolerancia frente a las bacterias de la flora cutánea.

TABLA 1

Ligandos conocidos para los receptores tipo Toll

Receptor	Ligando
TLR-1	Lipoproteína bacteriana triacilada
TLR-2	Peptidoglucano (bacterias grampositivas), ácido lipoteicoico
TLR-3	ARN de cadena doble
TLR-4	Lipopolisacárido (bacterias gramnegativas)
TLR-5	Flagelina bacteriana
TLR-6	Lipoproteína bacteriana diacilada
TLR-7	ARN de cadena simple
TLR-8	ARN de cadena simple
TLR-9	CpG, ADN bacteriano (no metilado)
TLR-10	Desconocido
TLR-11	Bacterias uropatógenas

ADN: ácido desoxirribonucleico; ARN: ácido ribonucleico; CpG: oligodesoxinucleótidos con secuencias citosina-fosfodiesterasa-guanina TLR: receptores tipo Toll.

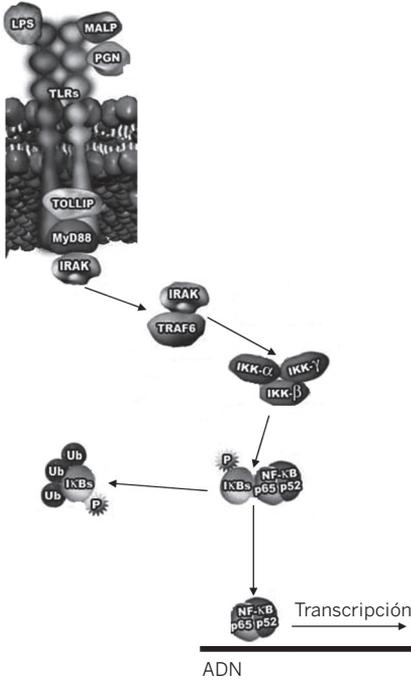
Las señales de activación intracelular generadas por los TLR unidos a sus ligandos siguen siendo objeto de investigación, aunque a continuación se resumen los datos publicados hasta la fecha (Figura 3). Numerosos TLR tienen un dominio extracelular con segmentos repetidos ricos en leucina y una cola intracitoplasmática que alberga un dominio Toll/IL-1 receptor (TIR).

Las vías de señalización de los TLR se originan en el dominio TIR como resultado del reclutamiento de sus adaptadores, como son *MyD88* (*myeloid differentiation primary-response protein 88*), *TIRAP* (*TIR-domain-containing adaptor protein*), *TRIF* (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon*) y *TRAM* (*TRIF-related adaptor molecule*).

El reclutamiento de estos adaptadores para los dominios TIR inicia una cascada a través de cinasas asociadas al receptor de IL-1 (IRAK) y del adaptador de TRAF-6 que, a su vez, activa la cascada de cinasas que culmina en la activación del NF- κ B, de las cinasas p38 asociadas a la proteína activada por mitógenos (MAP), JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) y ERK1/2 (*extracellular regulated kinase 1/2*). La señalización a través de cada TLR requiere MyD88 para la producción de citocinas inflamatorias. Sin embargo, hay

FIGURA 3

Señales de activación intracelular generadas por los receptores tipo Toll unidos a sus ligandos



La señalización de los TLR activa el NF-κB después de múltiples eventos intracelulares. El reclutamiento de los adaptadores MyD88, IRAK y TRAF-6 da como resultado la activación de la cinasa IKK. El complejo IKK fosforila el inhibidor de NF-κB (IκB), produciendo la liberación de NF-κB y el etiquetado para su degradación en el proteosoma. El NF-κB libre se transloca al núcleo de la célula, donde inicia la transcripción de los genes diana.

ADN: ácido desoxirribonucleico; IKK: cinasa IKK; IκB: cinasa IκB; IRAK: cinasas asociadas al receptor de interleucina-1; LPS: lipopolisacáridos; MALP: lipopéptidos activadores de macrófagos; MyD88: myeloid differentiation primary-response protein 88; NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de los linfocitos B activados; P: fósforo; p52: citocromo p52; p65: citocromo p65; PGN: peptidoglucanos; TLR: receptores tipo Toll; TOLLIP: proteína del complejo IRAK; TRAF-6: factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral; Ub: ubiquitina.

una vía independiente de MyD88, y la señalización a través de TLR-3 o TLR-4 permite la producción de interferón tipo 1. El TRIF es esencial para la señalización de TLR-3 y TLR-4 por la vía independiente de MyD88, así como para la producción de citocinas mediada por la activación de TLR-4. La TRAM está implicada de forma específica en la vía de activación de TLR-4 independiente de MyD88, mientras que la TIRAP media la vía independiente de MyD88 para TLR-2 y TLR-4. Las vías de señalización a través de TLR están reguladas negativamente por moléculas inducibles por TLR, como son IRAK-M (*IL-1-receptor [IL-1R]-associated kinase M*), SOCS1 (*suppressor of cytokine signalling 1*), MyD88s (*MyD88 short*), SIGIRR (*single immunoglobulin IL-1R-related molecule*), TAG (*TRAM adaptor with GOLD domain*) y ST2 (*suppression of tumorigenicity 2*)^{41,42}.

Estos reguladores negativos operan a través de múltiples mecanismos. El MyD88s impide el reclutamiento de IRAK-4, mientras que el IRAK-M también interfiere con la función de IRAK impidiendo la disociación del complejo de señalización. El ST2 regula negativamente la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de los linfocitos B activados (NF-κB) a través de TLR-2, TLR-4 y TLR-9 (pero no a través

de TLR-3) mediante el secuestro de moléculas adaptadoras MyD88 y Mal (*MyD88 adaptor-like*). La SIGIRR también parece operar mediante el secuestro de moléculas implicadas en la cascada de señalización, en este caso impidiendo la propagación de la señal. El TAG es una variante de TRAM que puede desplazar el TRIF de la TRAM, con lo que inhibe específicamente la vía independiente de MyD88. Estos mecanismos reguladores de la activación de los TLR son importantes para dar una respuesta apropiada a los patógenos y evitan una respuesta excesiva que resulte dañina.

Papel de los NLR

Los *receptores tipo NOD* (*nucleotide oligomerization domain* [NLR]) son proteínas citoplasmáticas que tienen funciones diversas en la regulación de respuestas inflamatorias y apoptosis. En el genoma de los mamíferos se han identificado aproximadamente 20 de estas proteínas, las cuales pertenecen principalmente a dos familias: NOD y NALP (receptor tipo NOD). La familia NOD incluye los receptores NOD1 y NOD2, también conocidos como CARD (*caspase activation and recruit domain*) 4 y CARD15, respectivamente, los cuales se encuentran en el citosol de las CD. El receptor NOD1/CARD4 reconoce un mucopéptido asociado a peptidoglucanos que proceden principalmente de bacterias gramnegativas, mientras que el receptor NOD2/CARD15 detecta un muramil dipéptido común a una amplia variedad de bacterias. La identificación de *NOD2* como un gen de susceptibilidad para la enfermedad de Crohn resalta el papel potencial de los PPR y sus ligandos en la enfermedad inflamatoria intestinal⁴³. Al igual que los NOD, los receptores NALP contienen una región rica en leucinas repetidas en posición C-terminal que pueden estar implicadas en el reconocimiento de patógenos microbianos. Hay 14 miembros de esta subfamilia en humanos (NALP1-NALP14). Las mutaciones en *NALP3* son responsables del síndrome autoinflamatorio familiar inducido por frío, del síndrome de Muckle-Wells y de la enfermedad inflamatoria multisistémica de comienzo neonatal. Los activadores (ligandos) de *NALP3* son el muramil dipéptido, el ADN bacteriano, el ATP, las toxinas, el ARN de doble cadena y los cristales de ácido úrico.

Papel de las helicasas ARN

En las células infectadas por virus, el reconocimiento viral y la subsecuente inducción de interferón se asocian a la activación de dos genes: *RNA helicases melanoma differentiation-associated gene 5* (*MDA5*) y *retinoic acid-inducible gene I* (*RIG-I*)^{44,45}. La *MDA5* reconoce el ARN de doble cadena larga producido en células infectadas por picornavirus y reovirus, mientras que el *RIG-I* detecta el ARN de cadena simple y el ARN de doble cadena corta producidos por células infectadas por diversos virus ARN. Por ello, es probable que el *RIG-I* desempeñe un importante papel en el reconocimiento de muchos virus ARN, mientras que la *MDA5* sólo actuaría como sensor para un limitado número de virus de este tipo.

Papel de los receptores CLR

Las células presentadoras de antígeno, como las CD, expresan CLR (los ya referidos receptores lectina tipo C), que unen estructuras de carbohidrato presentes en diversos patógenos y células del propio organismo. En función de su estructura molecular, es-

tos receptores se clasifican en dos tipos: el CLR-I, que es una proteína transmembrana tipo I, con varios dominios de reconocimiento para carbohidratos (CRD), y el CLR-II, que también es una proteína transmembrana tipo I pero con un solo CRD. Ambos tipos de CLR se implican principalmente en la captura de antígenos, aunque también participan en las interacciones entre las CD y otras células. Aunque las CD pueden expresar múltiples CLR, uno de los mejor estudiados es el DC-SIGN (*dendritic cell specific ICAM-3-grabbing non-integrin*) o CD209. El DC-SIGN es un CLR-II que reconoce virus como el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y el Ébola, así como diferentes bacterias, como *Mycobacterium tuberculosis* y *Lactobacillus casei*⁴⁶.

El DC-SIGN reconoce la manosa asociada al lipoarabinomanano (ManLam) del género *Mycobacteria*. La activación de las CD a través de este receptor induce la generación de linfocitos TregF_{oxp3}⁺ por un mecanismo dependiente de la producción de prostaglandina E2 (PGE2)⁴⁷. Al parecer, un nuevo receptor CLR, denominado Mincle, reconocería de forma selectiva residuos α -manosilados de *Malassezia*, diferenciándola de otros hongos⁴⁸. De hecho, la producción de citocinas/quimiocinas inducida por *Malassezia* en macrófagos de ratones Mincle^{-/-} es muy pobre. Por otro lado, la respuesta inflamatoria *in vivo* a *Malassezia* está muy disminuida en ratones Mincle^{-/-}, lo que indica que el Mincle es un receptor para el reconocimiento innato de *Malassezia* que tiene un importante papel en la respuesta inmune a esta levadura. Otro CLR es el Dectin-1, que reconoce β -1,3-glucanos y media la captación de ligandos para su fagocitosis. Llamativamente, la señalización a través de Dectin-1 es capaz de desencadenar la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias⁴⁹. Las señales de Dectin-1 a través de la cinasa Syk y el adaptador CARD9 inducen una activación de las CD que favorece la inducción de linfocitos Th-17⁵⁰. La expresión de CLR no es uniforme en todas las CD. Las CD plasmocitoides humanas expresan el receptor DCIR (*DC immunoreceptor*) pero no el Dectin-1, el receptor de manosa ni el DC-SIGN⁵¹. En cambio, las CD mieloides expresan una amplia variedad de CLR, mientras que las células de Langerhans expresan de forma selectiva langerina (CD207) y DEC-205 (CD205)⁵².

Según lo que se ha referido, hay pocas dudas en el sentido de que la señalización diferencial de los PRR a través de su interacción con ligandos específicos (que dependen de la naturaleza de los microorganismos) no sólo permite la activación de la inmunidad innata, sino que también genera importantes instrucciones para la inmunidad adaptativa mediante la actividad funcional de las CD. Además, la expresión selectiva de PRR por subpoblaciones de CD permite la expansión funcional de una reactividad inmune apropiada frente a amenazas microbianas concretas. Por ejemplo, el reconocimiento del cimosano por parte de los receptores TLR-2 produce la secreción de ácido retinoico e IL-10 y estimula los linfocitos TregF_{oxp3}⁺, mientras que la activación de los receptores Dectin-1 por parte del cimosano produce la secreción de IL-23 y la inducción de linfocitos Th17⁵³. Los recientes hallazgos en relación con el papel que desempeñan los PRR en la homeostasis de la mucosa han puesto de relieve el delicado equilibrio que existe entre las diferentes funciones de los PRR y han revelado que las señales PRR deficientes pueden generar procesos inflamatorios y sensibilización atópica^{54,55}. Los ratones que carecen de TLR-2 (*knock-out*) son más sensibles a la colitis inducida por sulfato só-

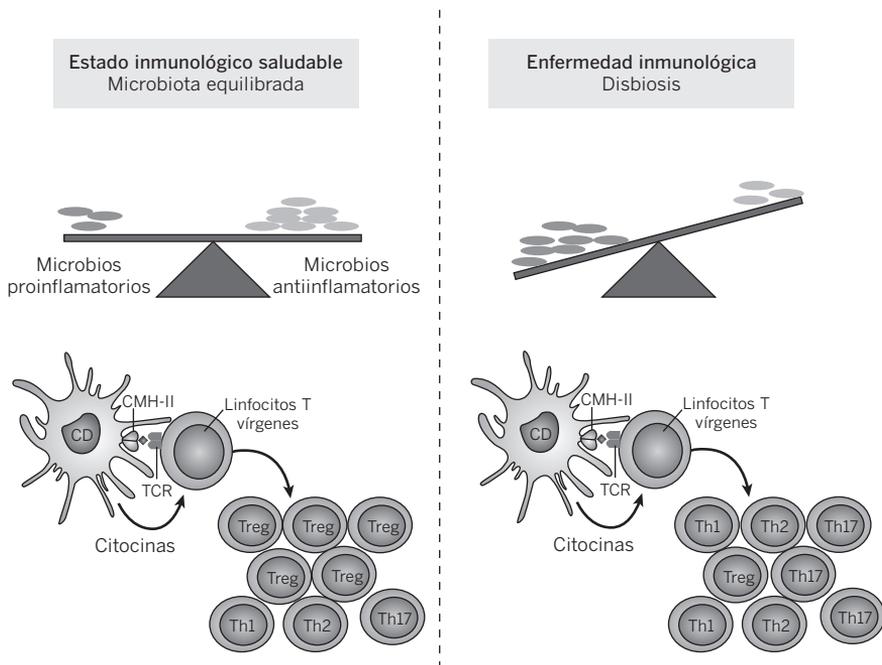
dico de dextrano, mientras que ciertas variantes del gen *TLR-2* se han asociado fenotípicamente a pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. En modelos animales, se ha demostrado que el receptor TLR-2 es capaz de incrementar la expresión de Foxp3 en respuesta a bacterias intestinales^{56,57}. Es más, recientemente se ha demostrado que la interacción funcional entre la activación de TLR-2/6, DC-SIGN y TLR-9 en respuesta al comensal *Bifidobacterium infantis* es responsable, en parte, de la inducción de altos niveles de secreción de IL-10 y de la expresión linfocitaria de Foxp3⁵⁸. En esta investigación, el bloqueo de TLR-2 también producía un incremento de la secreción de IL-12 y TNF- α en respuesta a *Bifidobacterium infantis*, lo que sugiere que la señalización vía TLR-2 genera una señal intracelular inhibitoria (todavía sin determinar) de la expresión del gen de la IL-12. Sin embargo, todavía se está lejos de poder aclarar de qué forma la utilización combinada de las múltiples vías de los PRR modula la defensa innata y condiciona la respuesta inicial frente a los microorganismos. Es posible que la activación diferencial de los PRR por parte de miembros específicos de la microbiota permita una activación alternativa de la respuesta inmune adaptativa, de manera que es necesario llevar a cabo más estudios para aclarar la importancia de la señalización a través de PRR en la mucosa de pacientes con enfermedad alérgica o inflamatoria.

LINFOCITOS Treg

Cada vez se admite con más firmeza que una de las características de los microorganismos con propiedades inmunorreguladoras es su capacidad para inducir *linfocitos Treg*. Estas células son necesarias para mantener la tolerancia a antígenos propios, pues su eliminación selectiva conlleva la aparición de enfermedades autoinmunes. Los linfocitos Treg proceden del timo, pero también pueden ser inducidos en otros tejidos, como la mucosa intestinal, donde desempeñan un importante papel en el mantenimiento de la tolerancia a la microbiota intestinal y a los antígenos contenidos en los alimentos^{59,60}. Las *CD103+* presentes en la mucosa intestinal son las más importantes en la inducción de los linfocitos Treg, un fenómeno que se produce a través de procesos dependientes del TGF- β y el ácido retinoico^{38,61}. La generación de linfocitos Treg está dirigida, probablemente, por factores ambientales específicos de la mucosa gastrointestinal, en la que los microorganismos comensales representan una parte muy relevante. Se ha descrito que las enzimas que regulan el metabolismo del ácido retinoico se encuentran sobreexpresadas en las CD mieloides, pero no así en las plasmocitoides cultivadas conjuntamente con microorganismos comensales, como *Bifidobacterium infantis*⁵⁸. Las CD humanas estimuladas *in vitro* con este microorganismo promueven de forma selectiva la expresión de Foxp3 en linfocitos vírgenes. En modelos murinos, la administración de *Bifidobacterium infantis* provoca un incremento de linfocitos CD25⁺Foxp3⁺ funcionalmente activos frente al efecto del LPS o de la activación del NF- κ B inducida por patógenos⁶². Además, la administración oral de *Bifidobacterium infantis* a voluntarios sanos también genera un incremento del número de linfocitos Foxp3⁺ en sangre periférica⁵⁸. Por lo tanto, la inducción de linfocitos TregFoxp3⁺ por este microorganismo parece un fenómeno robusto y reproducible y que potencialmente estaría mediado por su interacción con las CD. Sin embargo, es poco probable que *in vivo* todos los microorganismos comensales sean igual de eficaces en esta inducción. Una comparación de tres microorganismos comensales (*Bifidobacterium longum* AH1206, *Bifidobacterium breve* AH1205

FIGURA 4

Papel de la microbiota en las respuestas inmunológicas



Las alteraciones en la composición de la microbiota pueden contribuir a generar una mayor incidencia de enfermedades inflamatorias, al desplazar el equilibrio homeostático desde una respuesta inmune fisiológica a una reactividad inmune proinflamatoria.

CD: célula dendrítica; CMH-II: complejo mayor de histocompatibilidad clase II; TCR: receptor de linfocitos T; Th: linfocitos T colaboradores; Treg: linfocitos T reguladores.

y *Lactobacillus salivarius* AH102) ha demostrado que *Bifidobacterium longum* AH1206 inducía linfocitos Treg y también era capaz de proteger frente a la inflamación alérgica a nivel de la mucosa respiratoria⁶³. Sin embargo, las otras bacterias no inducían linfocitos Treg ni protegían frente a la inflamación alérgica. Por ello, la inducción de linfocitos Treg podría constituir una característica de la microbiota presente en una determinada situación fisiológica y potenciaría las respuestas antiinflamatorias que previenen el desarrollo de una reactividad inmune aberrante o no deseada (Figura 4).

CONCLUSIONES

La microbiota influye de forma determinante en la maduración y la actividad de la respuesta inmunitaria, aunque el conocimiento de las bases moleculares de los mecanismos inmunomoduladores que la sustentan es incipiente. La presencia de ciertas

bacterias, como *Bifidobacterium infantis*, influye en los mecanismos inmunorreguladores debido tanto a su interacción directa con el huésped (p. ej., mediante activación de PRR sobre CD) como a su actividad metabólica *in vivo*. *Es probable que el conocimiento de la microbiota, de sus metabolitos y de sus ligandos con capacidad para la modulación de la respuesta inmunológica permita identificar una nueva clase de agentes inmunoterapéuticos frente a procesos inflamatorios.* La identificación continua de nuevos microorganismos y compuestos microbianos que modulan la actividad de las CD y linfocitos Treg vaticina el hallazgo de nuevos candidatos de *moléculas terapéuticas inmunomoduladoras*.

..... REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006;7:688-93.
2. Shanahan F. Gut microbes: from bugs to drugs. *Am J Gastroenterol* 2010;105:275-9.
3. Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* 2010;330:1768-73.
4. Frei R, Lauener RP, Cramer R, O'Mahony L. Microbiota and dietary interactions: an update to the hygiene hypothesis? *Allergy* 2012;67:451-61.
5. Grainger JR, Hall JA, Bouladoux N, et al. Microbe-dendritic cell dialog controls regulatory T-cell fate. *Immunol Rev* 2010;234:305-16.
6. Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 2010;140:845-58.
7. Feng T, Elson CO. Adaptive immunity in the host-microbiota dialog. *Mucosal Immunol* 2011;4:15-21.
8. Brandtzaeg P, Pabst R. Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends Immunol* 2004;25:570-7.
9. Brandtzaeg P, Baekkevold ES, Farstad IN, et al. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the micro-compartments? *Immunol Today* 1999;20:141-51.
10. Iwasaki A, Kelsall BL. Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J Immunol* 2001;166:4884-90.
11. Iwasaki A, Kelsall BL. Localisation of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 2000;191:1381-94.
12. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004;303:1662-5.
13. O'Mahony L, O'Callaghan L, McCarthy J, et al. Differential cytokine response from dendritic cells to commensal and pathogenic bacteria in different lymphoid compartments in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G839-45.
14. Zhao H, Nguyen H, Kang J. Interleukin 15 controls the generation of the restricted T cell receptor repertoire of gamma delta intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Immunol* 2005;6:1263-71.
15. Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol* 2001;2:997-1003.
16. Koning F. Celiac disease: caught between a rock and a hard place. *Gastroenterology* 2005;129:1294-301.
17. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and

- penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001;2:361-7.
18. Conley ME, Delacroix DL. Intravascular and mucosal immunoglobulin A two separate but related systems of immune defense? *Ann Intern Med* 1987;106:892-9.
 19. Macpherson AJ, Hunziker L, McCoy K, Lamarre A. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect* 2001;3:1021-35.
 20. O'Hara AM, O'Regan P, Fanning A, et al. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology* 2006;118:202-15.
 21. Sibartie S, O'Hara AM, Ryan J, et al. Modulation of pathogen-induced CCL20 secretion from HT-29 human intestinal epithelial cells by commensal bacteria. *BMC Immunol* 2009;10:54.
 22. Otte JM, Podolsky DK. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G613-26.
 23. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004;53:1658-64.
 24. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003;3:984-93.
 25. de Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, et al. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse Th cell-polarizing signals. *J Immunol* 2002;168:1704-9.
 26. Smits HH, van Beelen AJ, Hesse C, et al. Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced Th1 development. *Eur J Immunol* 2004;34:1371-80.
 27. Mazmanian SK, Kasper DL. The love-hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system. *Nat Rev Immunol* 2006;6:849-58.
 28. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001;194:863-9.
 29. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767.
 30. Kalinski P, Hilkens CMU, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999;20:561.
 31. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-8.
 32. Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, et al. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 2005;105:1162-9.
 33. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995;13:251.
 34. Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, et al. Interferon- γ -inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon- γ production. *Eur J Immunol* 1996;26:1647.
 35. Sareneva T, Matikainen S, Kurimoto M, Julkunen I. Influenza A virus-induced IFN and IL-18 synergistically enhance IFN gene expression in human T cells. *J Immunol* 1998;160:6031.
 36. Flynn S, Toellner KM, Raykundalia C, et al. CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1. *J Exp Med* 1998;88:297.
 37. Yamazaki S, Bonito AJ, Spisek R, et al. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- β for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. *Blood* 2007;110:4293-302.

38. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007;204:1757-64.
39. Wang Q, McLoughlin RM, Cobb BA, et al. A bacterial carbohydrate links innate and adaptive responses through Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 2006;203:2853-63.
40. van der Aar AM, Sylva-Steenland RM, Bos JD, et al. Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition. *J Immunol* 2007;178:1986-90.
41. Palsson-McDermott EM, Doyle SL, McGettrick AF, et al. TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway. *Nat Immunol* 2009;10:579-86.
42. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005;5:446-58.
43. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2: implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003;278:5509-12.
44. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 2005;175:2851-8.
45. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004;5:730-7.
46. Koppel EA, van Gisbergen K, Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y. Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation. *Cell Microbiol* 2005;7:157-65.
47. Garg A, Barnes PF, Roy S, et al. Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2-dependent expansion of regulatory T cells in human *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur J Immunol* 2008; 38:459-69.
48. Yamasaki S, Matsumoto M, Takeuchi O, et al. C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:1897-902.
49. Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:33-43.
50. Leibundgut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, et al. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 2007;8:630-8.
51. Meyer-Wentrup F, Benitez-Ribas D, Tacken PJ, et al. Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN- α production. *Blood* 2008;111: 4245-53.
52. Erbacher A, Gieseke F, Handgretinger R, Müller I. Dendritic cells: Functional aspects of glycosylation and lectins. *Hum Immunol* 2009;70: 308-12.
53. Manicassamy S, Ravindran R, Deng J, et al. Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity. *Nat Med* 2009;15:401-9.
54. Fukata M, Abreu MT. Pathogen recognition receptors, cancer and inflammation in the gut. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:680-7.
55. Tesse R, Pandey RC, Kabesch M. Genetic variations in Toll-like receptor pathway genes influence asthma and atopy. *Allergy* 2011;66: 307-16.
56. Round JL, Lee SM, Li J, et al. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science* 2011;332:974-7.
57. Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:12204-9.
58. Konieczna P, Groeger D, Ziegler, et al. Bifidobacterium infantis 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral

- blood: potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Gut* 2012;61:354-66.
59. Karim M, Kingsley CI, Bushell AR, et al. Alloantigen-induced CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells can develop in vivo from CD25⁻CD4⁺ precursors in a thymus-independent process. *J Immunol* 2004;172:923-8.
60. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198:1875-86.
61. Sun CM, Hall JA, Blank RB, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3⁺ T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007;204:1775-85.
62. O'Mahony C, Scully P, O'Mahony D, et al. Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF- κ B activation. *PLoS Pathog.* 2008;4:e1000112.
63. Lyons A, O'Mahony D, O'Brien, et al. Bacterial strain-specific induction of Foxp3⁺ T regulatory cells is protective in murine allergy models. *Clin Exp Allergy* 2010;40:811-9.

Profilaxis de infecciones pulmonares con inmunomoduladores de origen bacteriano

Lucy Cárdenas-Freytag

Department of Microbiology and Immunology, Tulane University, School of Medicine, Nueva Orleans, Luisiana, EEUU

ANTECEDENTES

El trabajo de experimentación para el diseño y desarrollo de adyuvantes de mucosas que se aborda en este capítulo se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Tulane, uno de los centros de investigación más importantes en este campo en el ámbito internacional.

Como es bien sabido, el principal factor que condiciona la respuesta del huésped frente a un patógeno es el *ambiente inmunológico* (*immunological enviroment*) con el que éste se encuentra. De manera natural, tal ambiente puede ser estable o bien estar alterado debido a la concomitancia de procesos infecciosos o no infecciosos, así como a consecuencia de la intervención con tratamientos inmunomoduladores. Uno de estos tratamientos es la *vacunación*, sin dudas la mejor estrategia para luchar contra las infecciones. Otro es la *inmunomodulación profiláctica*, que se define como una estrategia independiente del antígeno que utiliza agentes cuyo objetivo es activar o suprimir una determinada respuesta inmunitaria de forma fisiológica.

La inmunomodulación profiláctica se utiliza desde hace tiempo para la prevención y el tratamiento de un amplio abanico de patologías no infecciosas, como es el caso de los fármacos antihistamínicos en las alergias o el de los antiinflamatorios en el asma. Sin embargo, la estrategia terapéutica que estamos desarrollando no es convencional, ya que utiliza unos agentes inmunomoduladores que actúan como adyuvantes de las respuestas inmunológicas en las mucosas sin requerir la presencia del antígeno. En este sentido, hay publicaciones sobre la utilización de esta modalidad terapéutica para conseguir la protección del organismo contra infecciones provocadas por virus, como el de la gripe o el sincitial respiratorio (VSR); bacterias, como *Burkholderia mallei*, *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*;

hongos, como *Candida albicans* o *Cryptococcus neoformans*, y parásitos, como algunos tripanosomas que tienen su hábitat natural en África¹⁻⁴.

Entre los inmunomoduladores más frecuentemente utilizados en inmunomodulación profiláctica contra infecciones se incluyen citocinas, quimiocinas, receptores de reconocimiento de patrones (PRR), péptidos antimicrobianos, agentes derivados de patógenos como las enterotoxinas y agonistas de los receptores tipo Toll (TLR) u otros tipos de moléculas.

A la hora de plantearse el diseño de nuevas estrategias de inmunomodulación profiláctica, hay que valorar una serie de cuestiones. En primer lugar, se conoce que las infecciones por el virus de la gripe predisponen al huésped al desarrollo de infecciones bacterianas, siendo ésta una de las principales razones por las cuales un porcentaje no desdeñable de pacientes con gripe contraen una sobreinfección bacteriana pulmonar e incluso fallecen por esta causa, lo que denota que la infección gripal deteriora el ambiente inmunológico del huésped. Por el contrario, muchas otras infecciones, como la causada por el VSR, protegen –inmunizan– al huésped contra ulteriores infecciones por el mismo virus. Así pues, al diseñar nuevas estrategias de inmunización profiláctica, en primer lugar, hay que considerar qué tipo de intervenciones pueden proteger al huésped contra ulteriores infecciones y cuáles otras, por el contrario, pueden predisponer a una sobreinfección. En segundo lugar, y de forma preferente, hay que establecer cuáles son los requisitos para conseguir que la respuesta inducida sea realmente protectora. Y en tercer lugar, también hay que considerar cómo se puede comparar el efecto que tienen los distintos inmunomoduladores en el contexto de diferentes patologías infecciosas, tales como las producidas por bacterias, virus u hongos.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL EN INMUNOMODULACIÓN PROFILÁCTICA

El objetivo global de esta investigación experimental en modelos animales fue comparar los efectos inmunomoduladores y profilácticos de tres tipos bien caracterizados de adyuvantes de mucosas de origen bacteriano: 1) la *toxina colérica (TC)*, 2) la *toxina termolábil de Escherichia coli mutante LT-R192G (mLT* o, simplemente, *LT)* y 3) los *oligodesoxinucleótidos con secuencias citosina-fosfodiesterasa-guanina (cytosine-phosphodiesterase-guanine [CpG])*.

Hemos evaluado tres efectos diferentes de estos tres agentes: 1) sus efectos sobre la homeostasis (*steady state*) del sistema inmunitario pulmonar cuando se utilizan dichos agentes, 2) sus efectos inmunomoduladores sobre la infección pulmonar producida por el virus de la gripe y 3) sus efectos inmunomoduladores sobre la infección pulmonar producida por *Cryptococcus neoformans*. La selección de estos coadyuvantes para el estudio se fundamentó en que todos ellos están bien caracterizados, son potentes, se utilizan comúnmente en la investigación de vacunas de mucosas e inducen efectos diferentes y diferenciables en el sistema inmunitario (Tabla 1).

La decisión de analizar los efectos de estos coadyuvantes sobre la infección por el virus de la gripe se basó en varias circunstancias. En primer lugar, en la importancia epidemiológica de esta enfermedad, que afecta de forma estacional aproximadamente al 15%

TABLA 1

Adyuvantes con función inmunomoduladora evaluados en las experimentaciones en modelos animales realizadas en la Universidad de Tulane

Adyuvante	Respuesta inmunitaria que suele promover	Enfermedades en las que puede tener un papel inmunomodulador
CpG (oligodesoxinucleótido con secuencias citosina-fosfodiesterasa-guanina)	Th1	Alergias, tratamiento del cáncer, enfermedades infecciosas (virus de la gripe, <i>B. mallei</i> , <i>Y. pestis</i> , <i>C. neoformans</i>)
mLT (toxina de <i>E. coli</i> termolábil con mutación R192G)	Th1/Th2	Infecciones por virus de la gripe, VSR y <i>C. neoformans</i>)
TC (toxina de <i>Vibrio cholerae</i>)	Th2	Enfermedades autoinmunes (vía nasal) e infecciones por virus de la gripe

VSR: virus sincitial respiratorio.

de la población mundial, con 2,5 millones de casos graves y cerca de 500.000 muertes por año, sobre todo niños, ancianos e inmunodeprimidos. En segundo lugar, se tuvo en cuenta que hasta la fecha no se cuenta con una terapia antiviral eficaz, de manera que el tratamiento disponible actualmente es básicamente sintomático. Además, como es sabido, la vacuna antigripal, debido al reordenamiento genético y a los cambios y desplazamientos antigénicos que experimenta el virus, se reelabora cada año y no funciona correctamente en todos los casos, en particular frente a algunas nuevas cepas de virus especialmente virulentas. Por último, en la elección de esta enfermedad fueron determinantes otros aspectos, como que el contagio se produce por vía aérea, que se dispone de modelos murinos bien caracterizados (ratones BALB/c) y que los parámetros inmunológicos a evaluar son bien conocidos.

Por su parte, la elección para este estudio de la infección pulmonar micótica por *Cryptococcus neoformans* se basó en la disponibilidad de un modelo murino bien desarrollado y caracterizado (ratones CBA/J), así como también, aunque en menor medida, en el hecho de que este patógeno es oportunista, por lo que suele causar morbilidad en sujetos inmunodeprimidos.

Los adyuvantes TC y mLT

Los adyuvantes TC y mLT son toxinas bacterianas ribosiladoras de ADP (BARE) que ejercen su efecto cuando se aplican por vía mucosa. Ambas moléculas constituyen potentes enterotoxinas, inmunógenos, adyuvantes e inmunomoduladores. Se asemejan en-

tre sí en lo que respecta a su mecanismo de acción y en la necesidad de ser administradas conjuntamente con el antígeno, mientras que se diferencian en su estructura, biogénesis y características de unión con los receptores.

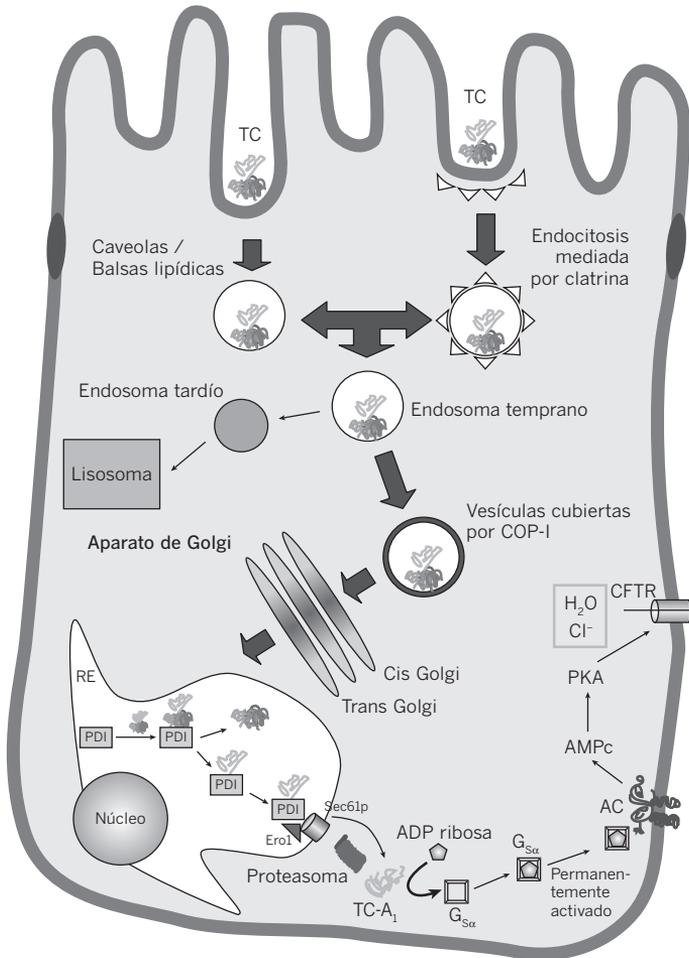
El diseño de moléculas mutantes a partir de la enterotoxina termolábil de *E. coli* fue iniciado de forma independiente por los equipos de Clements –de la Universidad de Tulane– y Rappuoli, quienes desarrollaron holotoxinas LT mutantes con una actividad enzimática escasa o nula. Con el propósito de identificar y separar la actividad enterotóxica de la actividad adyuvante, ambos equipos investigaron los efectos de diversas mutaciones en los sitios activos y en los sitios de proteólisis de esta enterotoxina y consiguieron resultados prometedores, no sólo en experimentaciones preclínicas, sino también en algunos estudios clínicos tempranos. Las mutaciones de un solo aminoácido con las que se tiene más experiencia son LT-R192G, LT-A72R, LT-S63K y CT-E112K. Las últimas tres albergan la mutación en la subunidad A1 y tienen una toxicidad muy inferior a la de la natural pero mantienen una actividad adyuvante significativa, mientras que la LT-R192G –que fue ideada por Dickinson y Clements– lleva su única sustitución en un sitio de proteólisis localizado en la región de encuentro de las subunidades A1 y A2 (concretamente, la sustitución de arginina por glicina en la posición 192)⁵. Interesa señalar que la enterotoxina termolábil de *E. coli* con doble mutación a la que se refiere el Prof. Czerkinsky en un capítulo precedente es una de las más utilizadas en las últimas experimentaciones realizadas en la Universidad de Tulane y se caracteriza por tener sus dos mutaciones en sitios de proteólisis: una de ellas es la ya referida R192G, mientras que la otra corresponde a L211A y se localiza en la subunidad A2.

En el año 2007, van den Broeck⁶ propuso un modelo TC cuyo mecanismo de acción se expone de forma esquematizada en la Figura 1. La TC es captada por los receptores GM1 de alta afinidad de la célula epitelial y, tras atravesar la membrana, es conducida sucesivamente al aparato de Golgi y al retículo endoplasmático, donde se disocia en dos partes, una integrada por las subunidades B/A2 y otra por la subunidad A1, que es la activa desde un punto de vista tóxico. A continuación, esta subunidad es transportada hacia el citoplasma por la vía retrógrada del complejo traslocador Sec61p –sorteando así la degradación proteosómica–, donde se asocia a la adenilciclasa (AC) basolateral. La transferencia de mono-ADP-ribosa desde la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) hacia la subunidad Gs- α (de la proteína G) activa la AC, lo que, finalmente, da lugar a un incremento de la concentración de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y de la actividad de fosforilación mediada por proteincinasas del principal canal de cloruro de las células epiteliales intestinales (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* [CFTR]). El incremento neto de la secreción de cloruro se acompaña del ingreso de ingentes cantidades de agua en la luz intestinal, lo que provoca diarrea. La mLT (R912G) se comporta de forma similar, a excepción de que sus efectos tóxicos están muy disminuidos, habiéndose demostrado que tras su administración no se detecta actividad de la ADP ribosil transferasa y que la inducción de AMPC es reducida.

Lo que no se conoce tan bien es de qué manera estos procesos determinan la *actividad coadyuvante* de la TC y la mLT, de modo que existen varias teorías al respecto. Sin em-

FIGURA 1

Modelo de mecanismo de acción de la intoxicación por toxina colérica del enterocito propuesto por van den Broeck en 2007

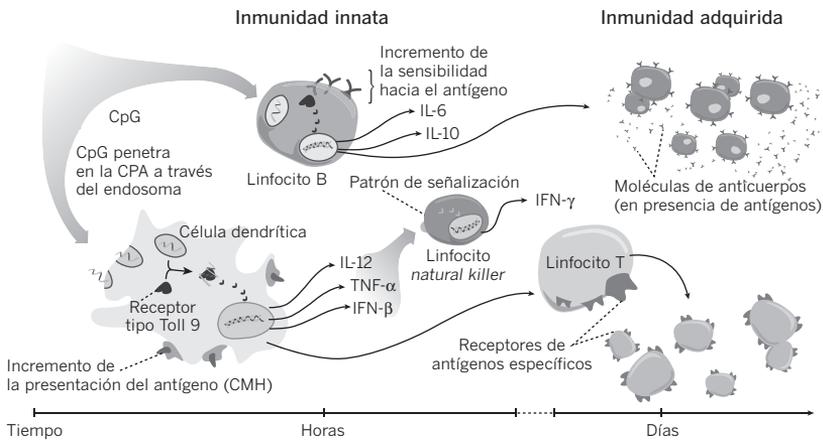


AC: adenilciclasa; ADP: ácido desoxirribonucleico; AMP: adenosín monofosfato cíclico; COP: coatamer protein; CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; ERO: especies reactivas del oxígeno; Gs- α : subunidad Gs- α de la proteína G; PDI: proteína disulfuro-isomerasa; PKA: proteína cinasa A; RE: retículo endoplásmico; Sec61p: proteína Sec61p; TC: toxina colérica; TC-A1: subunidad A1 de la TC.

bargo, como ya se ha señalado, sí se ha demostrado que la TC actúa preponderantemente sobre las respuestas Th2, que en estas respuestas están involucradas la interleucina (IL) 4, la IL-5 y la IL-10, los propios linfocitos Th2 y los linfocitos T reguladores (Treg), y que el perfil de anticuerpos corresponde a IgG1, IgE e IgA; mientras que la mLT

FIGURA 2

Mecanismos inmunomoduladores de los CpG



CMH: complejo mayor de histocompatibilidad; CPA: célula presentadora de antígeno; CpG: oligodesoxinucleótidos con secuencias citosina-fosfodiesterasa-guanina; IL: interleucina; IFN: interferón; TNF: factor de necrosis tumoral.

induce preferentemente respuestas mixtas Th1/Th2 en las que participan el interferón gamma (IFN- γ) y la IL-5, correspondiendo el perfil de anticuerpos preponderantes a las IgG1, IgG2 e IgA.

Los adyuvantes CpG

Los oligodesoxinucleótidos CpG corresponden a secuencias de ADN no metiladas o hipometiladas, reconocidas por el huésped como material extraño, que actúan como inmunoestimuladores y que, como se describe en numerosas referencias bibliográficas, también han sido utilizados como adyuvantes (Figura 2). Los mecanismos de acción de los CpG son sumamente complejos, pero sus propiedades en tanto que coadyuvantes se fundamentan en los siguientes fenómenos: 1) son reconocidos por los TLR-9 de las células dendríticas (CD); 2) inducen preponderantemente respuestas inmunitarias Th1; 3) activan una cascada de señalización específica que depende de la proteína MyD88; 4) son eficaces tanto por vía sistémica como por la vía de las mucosas, y 5) activan las células inmunitarias tanto por la vía directa como por la vía indirecta, haciendo las veces de *punte* entre la inmunidad innata y la inmunidad adquirida.

El sistema inmunitario del aparato respiratorio

En esta investigación se decidió usar como diana las vías respiratorias inferiores porque su mucosa está expuesta a una constante entrada de patógenos y también porque se dispone de modelos murinos muy bien caracterizados que permiten una correcta evaluación de la actividad de los adyuvantes referidos. Como es obvio, la función principal del

aparato respiratorio es llevar a cabo el intercambio de gases entre la sangre y el aire atmosférico. No obstante, esta misma función hace que permanentemente se inhalen ingentes cantidades de microorganismos y partículas que están suspendidas en el aire y acaban por llegar a las mucosas.

El aparato respiratorio cuenta con unos mecanismos defensivos específicos. Por un lado, dispone de *mecanismos defensivos mecánicos*, como el aclaramiento mucociliar y la tos, los cuales eliminan tanto partículas como microorganismos atrapados en el moco. Por otro, alberga un vasto e intrincado tejido defensivo que desempeña un papel clave en la protección de las mucosas de las vías respiratorias inferiores y del que forma parte el denominado *tejido linfoide asociado a los bronquios* (*bronchus associated lymphoid tissues* [BALT]).

Las células epiteliales e inflamatorias de las mucosas respiratorias secretan numerosos elementos con actividad proinflamatoria, antiinflamatoria y antimicrobiana que funcionan como sustancias efectoras del sistema inmunitario innato. El componente celular de este sistema está integrado por los *linfocitos natural killer* (NK), las CD, los *macrófagos* y los *neutrófilos*. Por su parte, las *células epiteliales* del propio tejido (ciliadas, caliciformes, basales y glandulares mucosas y serosas) no son meros espectadores pasivos de los procesos inflamatorios, sino que secretan moléculas efectoras, como los péptidos antimicrobianos. En las mucosas, al igual que en otros tejidos, la respuesta inmunitaria adaptativa, que está mediatizada por los correspondientes linfocitos T y B (estos últimos, productores de la IgA secretora [IgA-S]), se desencadena por mecanismos de la respuesta innata.

Las células inmunitarias, macrófagos y linfocitos NK, y las citocinas, protagonizan la respuesta de la inmunidad innata pulmonar contra las bacterias. Las citocinas de respuesta temprana, entre las cuales se encuentran el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), los factores estimuladores de colonias y diversas quimiocinas, son expresadas básicamente por los macrófagos alveolares residentes. No obstante, también pueden contribuir a la expresión local de citocinas otras células que se desplazan al sitio de la inflamación, como los linfocitos NK, los polimorfonucleares y monocitos e incluso, en algunos casos, las células del estroma. La producción de IFN- γ por parte de los linfocitos pulmonares constituye un potente activador tanto de los leucocitos locales como de los que migran hasta este tejido. La IL-12 generada por los macrófagos y los linfocitos NK pone en marcha la respuesta inflamatoria mediante la inducción de TNF- α , mientras que la IL-10 dificulta la defensa del huésped mediante la inhibición local de la actividad microbicida de los leucocitos y la inhibición de la expresión de las mencionadas citocinas proinflamatorias locales. De esta manera, los resultados de la defensa del huésped en el pulmón dependen del equilibrio entre las citocinas proinflamatorias y las antiinflamatorias.

En realidad, la defensa de las mucosas respiratorias se basa en un equilibrio u homeostasis entre la activación y la supresión de las respuestas inmunitarias, puesto que, por un lado, una excesiva activación de tales respuestas puede conducir a inflamación, daño

tisular y desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas e, incluso, cáncer, mientras que, por otro lado, una excesiva supresión de las respuestas inmunitarias favorece el desarrollo de infecciones y también de cáncer.

En general, en condiciones fisiológicas normales, la estabilidad inmunitaria de la mucosa respiratoria conlleva un nivel bajo de activación que se inclina hacia las respuestas tipo Th2, lo que permite que los tejidos se mantengan en una relativa calma a pesar del impacto que supone la exposición constante a los antígenos y alérgenos suspendidos en el aire. Sin embargo, cuando este equilibrio se rompe, ya sea por el ingreso de patógenos virulentos, por la presencia de un trastorno pulmonar subyacente (p. ej., enfermedad pulmonar obstructiva crónica) o bien debido a un estado de inmunodeficiencia o inmunosupresión, puede sobrevenir una enfermedad de las vías respiratorias. Es en estos casos cuando las estrategias inmunomoduladoras preventivas o terapéuticas pueden resultar de utilidad para restablecer la homeostasis inmunitaria de las mucosas respiratorias.

DISEÑO DE LA EXPERIMENTACIÓN EN MODELOS MURINOS DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS

Para llevar a cabo la experimentación se utilizaron modelos murinos BALB/c y CBA/J que se asignaron a dos grupos: uno recibió tratamiento con uno de los tres coadyuvantes evaluados y el otro fue tratado con solución salina (placebo) o no recibió tratamiento. Los inmunomoduladores (TC, mLT o CpG) se aplicaron por vía intranasal mediante una o dos instilaciones en los días 0 y/u 8, en dosis de 5 µg diluidos en 30 µl de solución salina. Al cabo de 24 horas de la aplicación del inmunomodulador, los ratones BALB/c fueron infectados con virus de la gripe A/PR/8/34 (PR8), mientras que los ratones CBA/J fueron infectados con *C. neoformans*. Los ratones fueron evaluados o sacrificados en los días 1, 3, 7, 24 o 100 después de la instilación de los inmunomoduladores con el objeto de determinar su estado inmunológico y analizar sus tejidos pulmonares. A partir del material obtenido por lavado broncoalveolar (LBA), se efectuaron análisis de quimiocinas y citocinas, así como recuentos celulares. El estudio histológico se llevó a cabo mediante citometría de flujo y la carga microbiana se determinó en el homogenizado tisular.

RESULTADOS DE LA EXPERIMENTACIÓN CON LOS ADYUVANTES

Efectos del tratamiento sobre el sistema inmunitario pulmonar

Los efectos del tratamiento sobre el sistema inmunitario pulmonar sólo fueron significativos en los ratones tratados con TC, aunque también se apreciaron en los que recibieron mLT; alcanzaron su máxima expresión al cabo de 24 horas de aplicada la segunda instilación y, en la mayoría de los casos, desaparecieron al cabo de tres semanas. Tales efectos consistieron básicamente en la presencia de exudado inflamatorio, un incremento de la concentración celular –en particular, polimorfonucleares– y el desarrollo de daño tisular. En los ratones que fueron tratados con CpG, los cambios fueron mínimos, similares a los que se apreciaron en los animales tratados con solución salina o que no recibieron tratamiento.

Por otra parte, se analizó la concentración de células y citocinas en el líquido del LBA. En lo que respecta al componente celular, en el LBA se observaron incrementos de células totales y de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos. Tales incrementos tuvieron significación estadística en los ratones tratados con los tres adyuvantes, particularmente en los que recibieron TC y mLT, aunque, curiosamente, algunos de estos cambios también se apreciaron en los ratones a los que se les instiló solución salina.

Al analizar las concentraciones de citocinas, se observó que los ratones tratados con TC, mLT y CpG mostraban un incremento significativo de la concentración de IL-6 (de efectos pleiotrópicos), así como de las citocinas procedentes de queratinocitos (KC) y de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MPC-1), ambas con efectos quimiotácticos sobre neutrófilos y macrófagos. Asimismo, se apreció un incremento de la concentración de IL-1 α y de la citocina regulada por la activación secretada y expresada por los linfocitos T normales (RANTES), con poder quimiotáctico sobre los linfocitos T. También se observaron cambios en algunas citocinas relacionadas con las respuestas Th1 o Th2, como un incremento de la IL-12 en los ratones tratados con CpG o un aumento de la concentración de la IL-17 en los que recibieron TC o mLT; sin embargo, no se detectaron cambios significativos en las concentraciones de otras citocinas relacionadas con las respuestas Th1 y Th2, como la IL-10 o la IL-4.

Efectos del tratamiento con adyuvantes sobre la infección pulmonar por el virus de la gripe

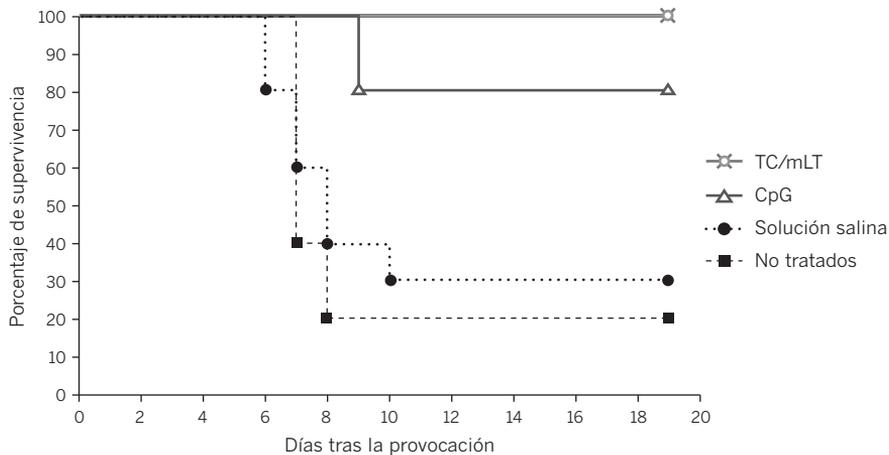
Tras demostrarse que la aplicación de los adyuvantes modificaba el ambiente inmunológico en el tejido pulmonar, se procedió a evaluar el efecto del tratamiento sobre la infección pulmonar por el virus de la gripe. En los ratones tratados con dos instilaciones de TC, mLT o CpG, la tasa de supervivencia al cabo de 20 días de la provocación se situó en el 80-100%, mientras que en los ratones tratados con solución salina, esta tasa descendió al 30%, y en los no tratados, al 20% (Figura 3).

Las diferencias en las tasas de supervivencia no fueron tan espectaculares tras una sola instilación de TC, mLT o CpG, aunque sí lo bastante significativas como para afirmar que, al cabo de sólo 24 horas de un único tratamiento con inmunomoduladores independientes del antígeno, el sistema inmunitario ya está equipado y preparado para la exposición al patógeno, lo que brinda una semana de margen para aplicar el segundo tratamiento.

Los resultados fueron similares en lo que respecta a la pérdida de peso corporal, una manifestación muy característica en los ratones con gripe. Todos los ratones infectados perdieron peso rápidamente, pero los que fueron tratados con TC, mLT o CpG comenzaron a recuperarlo al cabo de 10 días de la provocación, mientras que los controles y los tratados con placebo siguieron perdiéndolo, y muchos de ellos murieron o tuvieron que ser sacrificados de forma anticipada.

Por su parte, los datos de carga viral indicaban que, en el día 4 tras la provocación, la carga viral era inferior en los ratones pretratados con TC, mLT o CpG que en los pre-

FIGURA 3
Efecto del tratamiento con los coadyuvantes TC, mLT y CpG sobre la infección pulmonar por el virus de la gripe



CpG: oligodesoxinucleótidos con secuencias citosina-fosfodiesterasa-guanina; mLT: toxina termolábil de *Escherichia coli* mutante LT-R192G; TC: toxina colérica.

tratados con solución salina o en los que no recibieron pretratamiento. Estos datos indican que en los ratones que recibieron los inmunomoduladores la infección persistía y la replicación viral no estaba inhibida, aunque sí disminuida, pues en sus pulmones se contabilizaron menos unidades formadoras de placa (UFP). Con todo, dicho efecto fue sólo temporal, pues en el día 6 las diferencias prácticamente ya habían desaparecido, y en el día 21 todos los ratones que habían sobrevivido mostraban una carga viral nula.

De forma consistente con lo mencionado, en el examen histológico de los ratones que fueron pretratados con TC, mLT o CpG y luego infectados con el virus de la gripe se observó la presencia de una gran cantidad de exudado inflamatorio en forma de agregados de células linfoides peribronquiales y perivasculares. Es interesante señalar que estos agregados celulares, tras la tinción correspondiente, adoptaban un aspecto similar a lo que algunos investigadores denominan «tejido linfoide inducido asociado a los bronquios» (iBALT). Este hallazgo no es novedoso, pero sí lo es el hecho de que el iBALT ya apareciera en el día 4 tras la infección, puesto que en los ratones con gripe contraída de forma natural esta reacción suele hacerse evidente hacia el día 10. Esto podría significar que los inmunomoduladores modulan la respuesta inmunitaria acelerando su generación.

También se apreciaron cambios en el componente celular obtenido del LBA: en el día 4 tras la provocación con el patógeno, las concentraciones de linfocitos, neutrófilos y cé-

lulas totales en el líquido del LBA de los ratones tratados con TC estaban significativamente más elevadas que en el resto de los animales. Además, el análisis inmunohistoquímico de los macrófagos y linfocitos evidenció que las concentraciones de T CD4⁺ y de linfocitos B, así como la proporción CD4:CD8, eran más elevadas en los ratones tratados con TC, mLT o CpG, muy especialmente en los tratados con TC. La proporción de macrófagos entre las células presentadoras de antígeno (CPA), la concentración de macrófagos alveolares y la de diferentes poblaciones de CD también eran significativamente superiores en los ratones tratados con TC y, en menor medida, en los tratados con mLT o CpG. En consonancia con los datos sobre la carga viral y el tejido linfoide mencionados anteriormente, las concentraciones y proporciones celulares que en el día 4 estaban elevadas ya habían empezado a normalizarse en el día 6.

También se analizó si había cambios en los marcadores de coestimulación, los cuales son importantes para iniciar la respuesta inmunitaria adaptativa cuando se forman las sinapsis inmunológicas. A este respecto, se apreció que el tratamiento con TC, mLT o CpG incrementó de forma significativa la expresión de CD80 en el conjunto de las células analizadas, aunque, sorprendentemente, la de CD86 no estaba aumentada, salvo en algunos estudios celulares. Este dato es relevante, puesto que, según se desprende de algunas investigaciones, el incremento selectivo de la expresión del coestimulador CD80 sería indicativo de una respuesta inmunitaria Th1, que es la respuesta deseada en la infección por el virus de la gripe.

Por último, al analizar las concentraciones de citocinas en el líquido del LBA, se observó que la citocina KC, la proteína inflamatoria del macrófago 1 alfa (MIP-1 α), la citocina RANTES y la MCP-1 (todas ellas con una elevada potencia quimiotáctica para los neutrófilos y monocitos) estaban aumentadas. Asimismo, se apreció que las concentraciones de IL-17 e IL-4, que se relacionan, respectivamente, con las respuestas inmunitarias Th1 y Th2, sólo estaban aumentadas en los ratones tratados con TC, lo cual también resultó sorprendente, ya que esta toxina se asocia tradicionalmente a una respuesta inmunitaria Th2.

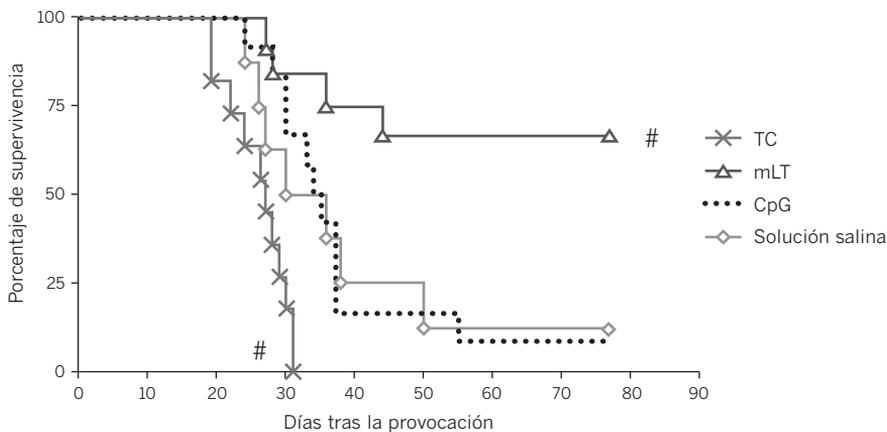
Efectos del tratamiento con adyuvantes sobre la infección pulmonar por *Cryptococcus neoformans*

Las experimentaciones para analizar los efectos de la infección por *C. neoformans* se llevaron a cabo en una segunda etapa y generaron dificultades considerables, por lo que los resultados que se comentan a continuación deben considerarse como preliminares.

Con el objeto de revalidar el modelo de ratón CBA/J, en una primera fase del trabajo se compararon los efectos de la provocación con *C. neoformans* sobre los dos modelos de ratón referidos (BALB/c y CBA/J) con y sin pretratamiento con los coadyuvantes inmunomoduladores. Se observó que ambos modelos se comportaban de forma similar cuando no recibían pretratamiento o eran pretratados con solución salina, puesto que, en ambos casos, tras la provocación con *C. neoformans* se producía un gran aflujo de macrófagos hacia las mucosas respiratorias inferiores. De igual manera, en los ratones que fueron pretratados con inmunomoduladores la respuesta inicial también fue simi-

FIGURA 4

Tasa de supervivencia en el modelo ratón tras la provocación con dosis medias de *C. neoformans*^a



#: Significación estadística ($p < 0,05$)

^a: Dosis media de *C. neoformans* = $2,6 \times 10^4$ UFC

CpG: oligodesoxinucleótidos con secuencias citosina-fosfodiesterasa-guanina; mLT: toxina termolábil de *Escherichia coli* mutante LT-R192G; TC: toxina colérica; UFC: unidades formadoras de colonias.

lar en ambos modelos. En concreto, en los ratones pretratados con TC o mLT se observó un aflujo masivo de neutrófilos, mientras que en los pretratados con CpG se apreció un aflujo más o menos similar de neutrófilos, linfocitos y macrófagos (aunque al cabo de tres semanas eran estos últimos los que predominaban). Las diferencias más relevantes entre ambos modelos estribaron en que, mientras que en los ratones BALB/c los cambios no fueron muy importantes y el tejido recuperaba la normalidad al cabo de unas tres semanas, en los ratones CBA/J los cambios fueron más manifiestos y se mantuvieron durante más tiempo. Así pues, estos resultados no sólo permitieron revalidar el modelo CBA/J para la infección pulmonar por *C. neoformans*, sino que también anticiparon la existencia de una diferencia entre las respuestas inducidas por los inmunomoduladores Tc o mLT y la que es inducida por CpG.

Estas diferencias no se plasmaron en la carga micótica, que se redujo tras el pretratamiento con los tres adyuvantes, pero sí resultaron notables en la tasa de mortalidad. Así, la media de supervivencia tras la provocación con *C. neoformans* fue superior a 60 días en los ratones pretratados con CpG, mientras que se situó en torno a 40 días en los pretratados con mLT, en los que recibieron solución salina y en los no tratados, y fue significativamente inferior (< 30 días) en los pretratados con TC. Asimismo, se constataron diferencias cuando se probaron distintas dosis de *C. neoformans*, sobre todo cuando se evaluaron las consideradas dosis medias ($2,6 \times 10^4$ unidades formadoras de colonias [UFC]) (Figura 4).

De los resultados preliminares de esta experimentación puede deducirse que, al contrario de lo que ocurriría en relación con la infección por el virus de la gripe, en la infección por *C. neoformans* sólo la respuesta polarizada hacia Th1 inducida por el pretratamiento con CpG mejoraría la tasa de supervivencia y proporcionaría protección frente a la enfermedad. La respuesta inmunitaria inducida por CpG se asociaría a la inducción de niveles más elevados de IL-17 que las respuestas inducidas por TC y mLT, por lo que es probable que esta citocina desempeñe un papel profiláctico destacable en la infección por este hongo; por esta misma razón, la adición de IL-17 exógena potencialmente podría mejorar el efecto inmunomodulador del pretratamiento con TC y mLT antes de la provocación con *C. neoformans*.

Es interesante señalar que durante esta experimentación se detectó el desarrollo de algunas reacciones antifagocíticas por parte de los patógenos, las cuales podrían explicar el fracaso de las respuestas inflamatorias/innatas activadas por los inmunomoduladores. Sin duda, la reacción antifagocítica más llamativa fue la presencia de formas de *C. neoformans* literalmente «infladas», que adquirieron un tamaño de hasta 100 μm de diámetro, cuando su diámetro habitual es de 4-10 μm . Este fenómeno fue descrito recientemente por Nielsen y colaboradores, quienes apodaron a estos elementos como «células titán»⁷. Tales reacciones antifagocíticas evidencian que estas levaduras cuentan con un verdadero arsenal de mecanismos para resistir las defensas del huésped, lo que hace necesario el desarrollo de estrategias de inmunomodulación profiláctica mucho más sofisticadas que la referida en esta experimentación.

Resumen de los resultados

- El tratamiento con los adyuvantes TC, mLT o CpG, cuando no es seguido de provocación inmunitaria (sin infección), induce una inflamación transitoria cuya intensidad, duración y desviación de la respuesta (hacia tipo Th1 o tipo Th2) varían según el modelo de ratón y el tratamiento inmunomodulador utilizado.
- En la infección por el virus de la gripe, el pretratamiento con los adyuvantes TC, mLT o CpG redujo la carga viral pulmonar, moduló la concentración de citocinas a partir del día 4 y mejoró la tasa de supervivencia. Además, el pretratamiento con TC o mLT aceleró la recuperación del peso corporal.
- En la infección por *C. neoformans*, el pretratamiento con TC, mLT o CpG redujo la carga micótica, pero sólo este último tuvo un efecto positivo –y dependiente de las dosis– sobre la tasa de supervivencia, mientras que la mLT no afectó a este parámetro y la TC tuvo un efecto negativo sobre la misma.

CONCLUSIONES Y CUESTIONES PENDIENTES

- Los resultados de esta investigación indican que el tratamiento de inmunomodulación profiláctica puede generar efectos beneficiosos en el huésped y mejorar los resultados en caso de infecciones por diferentes patógenos, siempre y cuando se utilice el agente inmunomodulador adecuado. En este sentido, conviene aclarar que desde el centro de la Universidad de Tulane no se está promoviendo el uso de la TC o el de la mLT inhalables, lo cual constituiría una estrategia equivocada, sino que con este fin se está evaluando la eficacia de la enterotoxina con doble mutación R192G/L211A referida anteriormente.

- La respuesta inicial frente a una infección es mayoritariamente de tipo inflamatorio y tiene un coste inherente para el huésped (p. ej., en la infección por el virus de la gripe se observa una pérdida de peso corporal).
- Para llevarse a cabo con éxito, la inmunomodulación profiláctica debe adecuarse específicamente a las características del patógeno contra el cual está dirigida.
- La inmunomodulación profiláctica representa en la actualidad una opción terapéutica factible en las infecciones pulmonares emergentes para las cuales no se dispone de vacunas.
- Todavía no se conocen suficientemente los parámetros que deben tenerse en cuenta para evaluar los efectos protectores inducidos por los adyuvantes en las poblaciones celulares inmunitarias y en las citocinas.
- Es posible que mediante la modificación del tiempo que transcurre entre el pretratamiento con inmunomoduladores y el advenimiento de la infección se consiga una profilaxis a largo plazo.
- Se deberían desarrollar nuevos modelos animales (p. ej., hurones con gripe) que permitan conocer mejor enfermedades o infecciones secundarias.
- Es importante profundizar en el papel que desempeñan las distintas respuestas inmunitarias, sobre todo aquellas en las que participan la IL-17 y el iBALT.

AGRADECIMIENTOS

La autora agradece su valiosa colaboración a Betzi Norton, John Clements, Kerstin Honer zu Bentrup, Thomas Voss, Bryan Kaplan, Joanna DeSalvo, Ping Wang, Gillian Olson y Deborah Fox.

..... REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Durbin JE, Durbin RK. Respiratory syncytial virus-induced immunoprotection and immunopathology. *Viral Immunol* 2004;17:370-80.
2. Waag DM, McCluskie MJ, Zhang N, Krieg AM. A CpG oligonucleotide can protect mice from a low aerosol challenge dose of *Burkholderia mallei*. *Infect Immun* 2006;74:1944-8.
3. Easton A, Haque A, Chu K, et al. Combining vaccination and postexposure CpG therapy provides optimal protection against lethal sepsis in a bio-defense model of human melioidosis. *J Infect Dis* 2011;204:636-44.
4. Harris TH, Mansfield JM, Paulnock DM. CpG oligodeoxynucleotide treatment enhances innate resistance and acquired immunity to African trypanosomes. *Infect Immun* 2007;75:2366-73.
5. Norton EB, Lawson LB, Freytag LC, Clements JD. Characterization of a mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin, LT(R192G/L211A), as a safe and effective oral adjuvant. *Clin Vaccine Immunol* 2011;18:546-51.
6. Van den Broeck D, Horvath C, De Wolf MJ. *Vibrio cholerae*: cholera toxin. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:1771-5.
7. Okagaki LH, Strain AK, Nielsen JN, et al. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000953.

Inmunización sublingual terapéutica con un preparado bacteriano polivalente (Bactek®) en pacientes con infecciones recurrentes respiratorias: efecto inmunomodulador en linfocitos T antígeno-específicos CD4⁺ y su impacto clínico

Diana Alecsandru, Lara Valor, Silvia Sánchez-Ramón, Juana Gil, Javier Carbone, Juan José Rodríguez, Joaquín Navarro, Carmen Rodríguez-Sainz y Eduardo Fernández-Cruz

Unidad de Inmunología Clínica, División de Inmunología Clínica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Departamento de Microbiología I, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias recurrentes (IRR) representan un problema de salud importante asociado a una tasa de morbilidad y mortalidad significativa en pacientes con patologías con disfunción de la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, humoral y celular, tales como las inmunodeficiencias primarias y secundarias y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)^{1,2}.

Los agentes inmunomoduladores de origen bacteriano se han utilizado en estas patologías como tratamiento adyuvante por sus propiedades inmunoestimulantes de las respuestas inmunológicas innata y adaptativa³. Las vacunas bacterianas polivalentes que se han utilizado para tratar las IRR contienen las diferentes cepas bacterianas que se encuentran con mayor frecuencia en el tracto respiratorio superior e inferior y que son las responsables de la aparición y el mantenimiento de las infecciones y de las respuestas crónicas inflamatorias. Estas preparaciones pueden estar constituidas por microorganismos enteros inactivados o bien por lisados bacterianos o distintos componentes celulares de las bacterias⁴.

En diversos estudios se ha demostrado que la administración oral de inmunomoduladores bacterianos puede mejorar clínicamente las IRR en adultos y niños reduciendo el número, la duración y la gravedad de los episodios clínicos infecciosos³⁻¹⁰. Actualmente, el potencial uso terapéutico y preventivo de inmunomoduladores en pacientes susceptibles a las IRR es un tema del máximo interés clínico, aunque los resultados obtenidos sobre su eficacia clínica no son concluyentes, debido a la diversidad de los diseños de

los ensayos (abiertos no controlados o doble ciego y comparados con placebo), de las poblaciones estudiadas (adultos o niños) y de las patologías evaluadas. Por todo ello, el conocimiento exacto de los mecanismos de protección inmunológica de las vacunas que utilizan inmunomoduladores de origen bacteriano representa uno de los principales retos en la investigación clínica actual¹¹.

Una estrategia que está desarrollándose a nivel clínico en los últimos años es la administración de vacunas bacterianas por la *vía de mucosas*, especialmente la *sublingual*, la cual hace posible una inmunoterapia más segura, rápida y eficaz a la hora de estimular de forma potente y duradera tanto la inmunidad de mucosas antígeno-específica como la inmunidad sistémica humoral y celular. Se ha postulado que la generación de linfocitos T CD4⁺ antígeno-específicos por la vía de la inmunización sublingual podría regular la inducción y el mantenimiento de las respuestas de memoria específica de los linfocitos T colaboradores (Th1) frente a patógenos comunes de las vías respiratorias (bacterias inhalantes y virus), dando lugar así a una potenciación más eficaz de las defensas antimicrobianas innata y adaptativa, en comparación con otras vías de inmunización¹²⁻³³.

Para investigar esta hipótesis, recientemente hemos realizado un estudio clínico piloto en un grupo de pacientes con IRR en los que hemos evaluado el posible efecto inmunomodulador sobre la respuesta antígeno-específica frente a bacterias inhalantes respiratorias y su impacto clínico sobre la prevención de infecciones mediante la inmunización sublingual diaria con un preparado polivalente bacteriano (Bactek®)³⁴. En su formulación de última generación, Bactek® contiene glicerol como excipiente, lo cual permite preservar las bacterias enteras en una concentración alta y conlleva una mayor potencia inmunogénica. Las bacterias que contiene este preparado son las que con más frecuencia infectan las mucosas de las vías respiratorias: *Streptococcus pneumoniae* (60%), *Staphylococcus aureus* (15%), *Staphylococcus epidermidis* (15%), *Klebsiella pneumoniae* (4%), *Branhamella catarrhalis* (3%) y *Haemophilus influenzae* (3%).

DISEÑO DEL ESTUDIO

En el estudio clínico mencionado se reclutaron pacientes con IRR de las vías respiratorias altas y bajas ($n = 17$) a quienes se administró el preparado bacteriano polivalente Bactek® diariamente por vía sublingual durante un período de seis meses. Se realizó una monitorización inmunológica al inicio y al final de la inmunización, evaluándose los siguientes parámetros: la respuesta proliferativa de los linfocitos T antígeno-específicos CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ frente a las bacterias contenidas en Bactek®, los niveles séricos de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IGM), la IgA secretora, los niveles séricos de anticuerpos específicos frente al polisacárido capsular del neumococo (anti-PCP) y frente al toxoide tetánico, y el estudio fenotípico de las subpoblaciones de linfocitos B, T y NK (*natural killer*). Adicionalmente, se llevó a cabo una evaluación inmunológica a los 12 meses del inicio del tratamiento.

RESULTADOS

En la evaluación de la respuesta a los 6 y 12 meses del inicio del estudio se observó una reducción significativa de la tasa de infecciones respiratorias de los pacientes inmuni-

zados, en comparación con la tasa de infecciones respiratorias que habían presentado estos mismos pacientes durante el año previo a la iniciación de la inmunización ($p < 0,0001$) (Tabla 1). También se apreció un incremento significativo del porcentaje de proliferación de los linfocitos T CD3⁺CD4⁺ ($p < 0,0001$) y de los linfocitos T CD3⁺ ($p < 0,05$) frente a los antígenos bacterianos a los seis meses de tratamiento (Tabla 2). No se observaron diferencias significativas en los niveles séricos de Ig, de anticuerpos específicos ni de las subpoblaciones de linfocitos B, T y NK entre el inicio de la inmunización y en el mes 6 de tratamiento. En los pacientes que habían sido vacunados previamente a la iniciación del estudio con la vacuna antineumococo, los anticuerpos anti-PCP se mantuvieron en niveles elevados desde el inicio hasta la finalización del tratamiento.

DISCUSIÓN

En este estudio piloto, en el que se evaluó el tratamiento durante seis meses con un preparado bacteriano polivalente (Bactek®) en una cohorte de pacientes con IRR, se observó una respuesta clínica positiva con reducción de la frecuencia de los episodios infecciosos de las vías respiratorias superiores e inferiores en los pacientes vacunados en comparación con el número de IRR que tenían antes del tratamiento. Esta respuesta se mantuvo durante un período de 12 meses desde el inicio de la inmunización terapéutica. Estos resultados son concordantes con los de otros ensayos con diferentes preparados derivados de bacterias que mostraron una asociación entre la inmunización y la disminución de los procesos infecciosos respiratorios, aunque la intensidad y la duración de las respuestas clínicas fueron muy diversas^{3,5,9,12,14,15,21,23-31,33,35-41}.

La buena respuesta clínica obtenida en el estudio piloto con Bactek®, frente a la obtenida en otros ensayos, puede deberse a que nuestra cohorte de pacientes había presentado una mayor frecuencia de IRR en el año previo al inicio del tratamiento con la vacuna. Este hecho está en consonancia con los resultados obtenidos en otros ensayos en niños con preparados bacterianos en los que la respuesta clínica más eficaz se observó en aquellos pacientes que habían presentado un número elevado de IRR en el año previo a la inmunoterapia con vacunas¹⁰.

En este estudio se ha identificado por primera vez la potenciación de la respuesta proliferativa de las células de memoria antígeno-específicas T CD3⁺CD4⁺ como uno de los principales mecanismos de la inmunidad adaptativa específica asociado a la capacidad inmunomoduladora de la inmunización sublingual con una vacuna polivalente de bacterias enteras inactivadas. Sin embargo, éste no es el único mecanismo inmunológico que puede verse afectado por la vacunación sublingual. En este sentido, en otros estudios con antígenos bacterianos y en otros modelos se ha observado que la respuesta de la inmunidad innata es otro de los mecanismos importantes que pueden ser estimulados y activados por las propiedades inmunomoduladoras de los productos derivados de bacterias. Estos mecanismos también podrían haber contribuido en la activación de la inmunidad T CD4⁺ antígeno-específica y en la respuesta clínica observada en nuestro estudio con Bactek®. Sin embargo, la inmunomodulación de los mecanismos inmunológicos no específicos mediante antígenos bacterianos puede tener un impacto más específico en la respuesta inmune adaptativa, de manera que este aspecto debería analizarse en el

TABLA 1

Diagnóstico, manifestaciones clínicas y número de episodios de las infecciones del tracto respiratorio superior e inferior de nuestra cohorte de pacientes con infecciones recurrentes del tracto respiratorio antes y después de iniciar el tratamiento con Bactek®

Pacientes	Diagnóstico	Manifestaciones clínicas	Episodios pre-Bactek®	Episodios post-Bactek®
1	IRR	Neumonía	3	0
2	IRR Hipogammaglobulinemia leve	Faringitis, amigdalitis y bronquitis	2	0
3	IRR	Faringoamigdalitis graves	8	0
4	IRR	Neumonía	3	0
5	IRR	Bronquitis	5	0
6	IRR Inmunodeficiencia IgA	Faringitis	8	1
7	IRR	Otitis y sinusitis	5	0
8	IRR Inmunodeficiencia IgG4	Neumonía	2	0
9	IRR	Faringoamigdalitis graves	5	1
10	EPOC Hipogammaglobulinemia leve	Faringitis y exacerbaciones de EPOC Neumonía	8 2	1 0
11	IRR Hipogammaglobulinemia leve	Faringitis	4	0
12	IRR Bronquiectasias	Faringoamigdalitis Neumonía	5 2	0 0
13	IRR	Sinusitis, otitis y bronquitis	5	0
14	IRR Tiroiditis autoinmune	Faringoamigdalitis	6	0
15	IRR Inmunodeficiencia IgG4	Faringoamigdalitis y otitis	5	0
16	IRR Hipogammaglobulinemia leve	Bronquitis	5	0
17	IRR	Faringoamigdalitis VHS labial y nasal	10 12	0 3

Pre-Bactek®: número de episodios de la infecciones del tracto respiratorio superior e inferior registradas un año antes a la inmunización con Bactek®; post-Bactek®: número de episodios de la infecciones del tracto respiratorio superior e inferior registradas a lo largo de los 12 meses después de la iniciación de la terapia con Bactek®.

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; Ig: inmunoglobulina; IRR: infecciones respiratorias recurrentes; VHS: virus del herpes simple.

TABLA 2

Análisis descriptivo de la respuesta proliferativa específica de los linfocitos T frente a los antígenos bacterianos incluidos en la vacuna Bactek®

	Basal		6 meses postratamiento		H-L	p (Wilcoxon)
	Mediana	Rango intercuartílico	Mediana	Rango intercuartílico		
% T CFSE^{low} CD3⁺						
Control	1,83	0,67-4,32	1,98	1,23-2,98	-0,22 (-1,2, 1,64)	0,831
PHA	82,80	67,52-91,09	73,72	58,96-80,98	9,87 (-1,00, 21,60)	0,113
Bactek®	0,98	0,69-1,34	8,00	6,22-11,30	-7,02 (-9,30, -5,50)	< 0,001
%T CFSE^{low} CD3⁺CD4⁺						
Control	1,04	0,40-2,92	1,24	1,05-2,34	-0,22 (-0,90, 0,86)	0,981
PHA	47,72	40,76-58,90	42,14	33,92-54,20	4,52 (-6,80, 15,00)	0,332
Bactek®	0,76	0,40-1,20	7,59	4,87-8,48	-6,72 (-7,70, -4,20)	< 0,001
%T CFSE^{low} CD3⁺CD8⁺						
Control	0,31	0,10-1,44	0,52	0,32-1,22	-0,12 (-0,60, 0,43)	0,981
PHA	32,80	21,43-49,56	21,39	18,99-32,10	8,07 (-3,40, 19,20)	0,062
Bactek®	0,2	0,00-0,47	0,91	0,00-1,12	-0,37 (-1,00, 0,05)	0,100

T CD3⁺CFSE⁺ (5,6 T-carboxifluoresceína diacetato, succinimidil éster); T CD4⁺CFSE⁺ y T CD8⁺CFSE⁺ antes (basal) del tratamiento con Bactek® y seis meses postratamiento. Se han utilizado el estimador de Hodges-Lehmann (H-L) y el test de Wilcoxon para comparar los pares de variables.

contexto de los nuevos ensayos clínicos que se realizarán con tal fin. Entre dichos mecanismos no específicos, cabe destacar la activación de células inmunes mediante los receptores tipo Toll, el reconocimiento de los patrones moleculares de origen bacteriano, la estimulación de la actividad fagocítica de los macrófagos, la regulación de los linfocitos NK y otras respuestas, por ejemplo la producción de citocinas^{4,12,20,21,25,30-32,43,44}.

Los ensayos clínicos prospectivos aleatorizados, doble ciego y controlados con placebo ayudarán a esclarecer si los inmunomoduladores de origen bacteriano son efectivos para la reducción de las IRR en poblaciones de pacientes susceptibles^{7,25,45-47}. Estos estudios son muy necesarios, ya que las preparaciones bacterianas disponibles en el mercado son muy diferentes. Nuestra preparación bacteriana Bactek® se distingue de las otras en su formulación, concentración y vía de administración (sublingual), y también en que uti-

liza bacterias enteras inactivadas en lugar de lisados bacterianos. Teniendo en cuenta la alta prevalencia y el alto coste acumulado de las IRR que no pueden ser controladas eficazmente con las terapias convencionales, la inmunomodulación con preparados bacterianos administrados por vía mucosa sublingual podría erigirse en una estrategia de tratamiento eficaz para reducir tanto los costes como la gravedad y la duración de estos episodios en adultos y niños que padecen IRR.

Otras aplicaciones clínicas de la inmunización sublingual terapéutica con preparados bacterianos polivalentes: Uromune® en el tratamiento de las infecciones recurrentes del tracto urinario

La administración de preparados bacterianos por la vía de las mucosas también ha sido utilizada para prevenir las infecciones urinarias recurrentes (IUR). Uno de los estudios destacables en los que se investigó esta cuestión es el que llevaron a cabo Lettgen y colaboradores, quienes comunicaron la administración oral de un lisado bacteriano de 10^9 de *Escherichia coli* al que compararon con el uso de nitrofurantoina como profilaxis de las IUR en mujeres jóvenes⁴⁸.

Más recientemente, se ha llevado a cabo un estudio piloto observacional retrospectivo multicéntrico en España en el que participaron el Hospital Universitario de Salamanca, el Hospital Virgen del Castañar de Béjar, el Hospital Virgen de la Vega de Salamanca y el Centro de Especialidades de Ciudad Rodrigo. En este estudio se utilizó la vacuna bacteriana Uromune®, que contiene bacterias completas inactivadas de *E. coli* (25%), *Klebsiella pneumoniae* (25%), *Proteus mirabilis* (25%) y *Enterococcus faecalis* (25%), y que se administra por vía sublingual. Este preparado se aplicó como tratamiento profiláctico en una muestra de mujeres diagnosticadas de IUR con el objeto de evaluar si el uso de una vacuna bacteriana podría ser más eficaz que el tratamiento antibiótico convencional⁴⁹.

En este estudio retrospectivo, en el que se analizaron 319 casos clínicos de mujeres afectadas de IUR (> 2 infecciones en los últimos seis meses o > 3 infecciones al año que precisan consulta médica y tratamiento antibiótico), se comparó la respuesta clínica a la inmunización profiláctica con Uromune® frente a la pauta convencional con antibióticos (trimetoprima/sulfametoxazol). Para el análisis retrospectivo, las pacientes incluidas en el estudio se distribuyeron en dos grupos: se asignaron al grupo A ($n = 159$) las pacientes tratadas durante tres meses con la vacuna bacteriana Uromune® y al grupo B ($n = 160$) las que habían sido tratadas con trimetoprima/sulfametoxazol (40-200 mg/día) durante seis meses. Las pacientes del grupo A tuvieron una tasa de IUR significativamente menor que las del grupo B. En los tres primeros meses, la media del número de IUR/mes fue de 0,4 y 1,6 para el grupo A y el grupo B, respectivamente ($p < 0.0001$). También se encontró una diferencia significativa en la reducción del número de IUR a favor del grupo A, a los 9 y 15 meses de tratamiento ($p < 0,0001$).

En el grupo A, tras el tratamiento con Uromune® durante tres meses, no se registró ningún efecto adverso y se apreció una mejoría global del 75% en el número de IUR, en comparación con el número de IUR registrados en el grupo B durante el mismo perio-

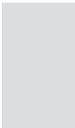
do de seguimiento, a pesar de que las pacientes de este grupo recibían tratamiento profiláctico antibiótico. El beneficio clínico de Uromune® se mantuvo durante los períodos de observación de 9 y 15 meses (86 y 77% de mejoría, respectivamente). Otra observación destacable es que el número de IUR aumentaba si se interrumpía el tratamiento con Uromune® a los tres meses, incrementándose de forma significativa a partir del mes 9. Estos datos sugieren la necesidad de prolongar durante más tiempo el tratamiento preventivo con Uromune®. Por otra parte, este estudio retrospectivo apoya la evidencia de que una vacuna bacteriana polivalente frente a las bacterias que más comúnmente infectan el tracto urinario, y que se administra por vía sublingual, puede inducir una respuesta inmunomoduladora protectora con reducción significativa de las IUR. De forma similar a otros preparados bacterianos polivalentes administrados por vía sublingual, como Bactek®, es posible que el mecanismo de acción se ejerza potenciando las respuestas inmunológicas innata y adaptativa específica frente a los antígenos bacterianos. Así pues, la immunoestimulación bacteriana en las IUR también podría constituir una estrategia efectiva para reducir la frecuencia, la duración y la gravedad de las infecciones. En cualquier caso, para confirmar la eficacia de los inmunomoduladores bacterianos en las patologías infecciosas recurrentes del tracto urinario es necesario llevar a cabo estudios doble ciego, aleatorizados y controlados con placebo.

..... REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Felmingham D, Feldman C, Hryniewicz W, et al. Surveillance of resistance in bacteria causing community-acquired respiratory tract infections. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:12-42.
2. World Health Organization. Acute respiratory infections: the forgotten pandemic. *Bull World Health Org* 1998;76(1):101-3, 5-7.
3. Collet JP, Shapiro P, Ernst P, et al. Effects of an immunostimulating agent on acute exacerbations and hospitalizations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. The PARI-IS Study Steering Committee and Research Group. Prevention of acute respiratory infection by an immunostimulant. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1719-24.
4. Rozy A, Chorostowska-Wynimko J. Bacterial immunostimulants-mechanism of action and clinical application in respiratory diseases. *Pneumonol Alergol Pol* 2008;76:353-9.
5. Bellanti JA, Settignano RA. Bacterial vaccines and the innate immune system: a journey of rediscovery for the allergist-immunologist and all health care providers. *Allergy Asthma Proc* 2009;30:S3-4.
6. Pozzi E, Serra C. Efficacy of Lantigen B in the prevention of bacterial respiratory infections. *Monaldi Arch Chest Dis* 2004;61:19-27.
7. Lusuardi M. Challenging mucosal immunity with bacterial extracts to prevent respiratory infections: an old therapy revisited. *Monaldi Arch Chest Dis* 2004;61:4-5.
8. Gutiérrez-Tarango MD, Berber A. Safety and efficacy of two courses of OM-85 BV in the prevention of respiratory tract infections in children during 12 months. *Chest* 2001;119:1742-8.
9. Steurer-Stey C, Bachmann LM, Steurer J, Tramer MR. Oral purified bacterial extracts in chronic bronchitis and COPD: systematic review. *Chest* 2004;126:1645-55.
10. Schaad UB, Mutterlein R, Goffin H. Immunostimulation with OM-85 in children with recurrent infections of the upper respiratory tract: a double-blind, placebo-controlled multicenter study. *Chest* 2002;122:2042-9.
11. Cazzola M, Rogliani P, Curradi G. Bacterial extracts for the prevention of acute exacerbations

- in chronic obstructive pulmonary disease: a point of view. *Respir Med* 2008;102:321-7.
12. Negri DR, Riccomi A, Pinto D, et al. Persistence of mucosal and systemic immune responses following sublingual immunization. *Vaccine* 2010; 28:4175-80.
 13. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 2005;11:S45-53.
 14. Passalacqua G, Canonica GW. Sublingual immunotherapy: update 2006 *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006;6:449-54.
 15. Durham SR. Sublingual immunotherapy: what have we learnt from the 'big trials'? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8:577-84.
 16. BenMohamed L, Belkaid Y, Loing E, et al. Systemic immune responses induced by mucosal administration of lipopeptides without adjuvant. *Eur J Immunol* 2002;32:2274-81.
 17. Çuburu N, Kweon MN, Song JH, et al. Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. *Vaccine* 2007;25:8598-610.
 18. Song JH, Nguyen HH, Çuburu N, et al. Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:1644-9.
 19. Huang CF, Wu TC, Chu YH, et al. Effect of neonatal sublingual vaccination with native or denatured ovalbumin and adjuvant CpG or cholera toxin on systemic and mucosal immunity in mice. *Scand J Immunol* 2008;68:502-10.
 20. Song JH, Kim JI, Kwon HJ, et al. CCR7-CCL19/CCL21-regulated dendritic cells are responsible for effectiveness of sublingual vaccination. *J Immunol* 2009;182:6851-60.
 21. Razi CH, Harmanci K, Abaci A, et al. The immunostimulant OM-85 BV prevents wheezing attacks in preschool children. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:763-9.
 22. Girard J, Fleury S. Analyse comparative du lévamisole et d'un lysat bactérien sur la réponse lymphocytaire in vitro [Lymphocytic response in vitro after levamisole and bacterial lysate: comparative study]. *Med Hyg* 1979;37:2519-26.
 23. Maestroni GJ, Losa GA. Clinical and immunobiological effects of an orally administered bacterial extract. *Int J Immunopharmacol* 1984;6:111-7.
 24. Puigdollers JM, Serna GR, Hernandez del Rey I, et al. Immunoglobulin production in man stimulated by an orally administered bacterial lysate. *Respiration* 1980;40:142-9.
 25. Emmerich B, Emslander HP, Pachmann K, et al. Local immunity in patients with chronic bronchitis and the effects of a bacterial extract, Broncho-Vaxom, on T lymphocytes, macrophages, gamma-interferon and secretory immunoglobulin A in bronchoalveolar lavage fluid and other variables. *Respiration* 1990;57:90-9.
 26. Lusuardi M, Capelli A, Carli S, et al. Local airways immune modifications induced by oral bacterial extracts in chronic bronchitis. *Chest* 1993; 103:1783-91.
 27. Cvoriscec B, Ustar M, Pardon R, et al. Oral immunotherapy of chronic bronchitis: a double-blind placebo-controlled multicentre study. *Respiration* 1989;55:129-35.
 28. Djuric O, Mihailovic-Vucinic V, Stojcic V. Effect of bronchovaxom on clinical and immunological parameters in patients with chronic obstructive bronchitis: a double-blind, placebo controlled study. *Int J Immunother* 1989;5:139-43.
 29. Roth M, Block LH. Distinct effects of Broncho-Vaxom (OM-85 BV) on gp130 binding cytokines. *Thorax* 2000;55:678-84.
 30. Byl B, Libin M, Gerard M, et al. Bacterial extract OM85-BV induces interleukin-12-dependent IFN-gamma production by human CD4+ T cells. *J Interferon Cytokine Res* 1998;18:817-21.
 31. Huber M, Mossmann H, Bessler WG. Th1-orientated immunological properties of the bacterial extract OM-85-BV. *Eur J Med Res* 2005;10: 209-17.
 32. van Rossum AM, Lysenko ES, Weiser JN. Host and bacterial factors contributing to the clearance of colonization by *Streptococcus pneumoniae* in a murine model. *Infect Immun* 2005;73:7718-26.

33. von Mutius E. Of attraction and rejection--asthma and the microbial world. *N Engl J Med* 2007; 357:1545-7.
34. Alecsandru D, Valor L, Sanchez-Ramon S, et al. Sublingual therapeutic immunization with a polyvalent bacterial preparation in patients with recurrent respiratory infections: immunomodulatory effect on antigen-specific memory CD4⁺ T cells and impact on clinical outcome. *Clin Exp Immunol* 2011;164:100-7.
35. Jeffrey Modell Foundation. <http://www.info4pi.org/>.
36. Lichterfeld M, Kaufmann DE, Yu XG, et al. Loss of HIV-1-specific CD8⁺ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 2004;200:701-12.
37. Zimmerli SC, Harari A, Cellerai C, et al. HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:7239-44.
38. Angulo R, Fulcher DA. Measurement of *Candida*-specific blastogenesis: comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labelling of T cells, thymidine incorporation, and CD69 expression. *Cytometry* 1998;34:143-51.
39. Fulcher D, Wong S. Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory. *Immunol Cell Biol* 1999;77:559-64.
40. Del-Rio-Navarro BE, Blandon-Vigil V. Commentary on «Oral purified bacterial extracts in acute respiratory tract infections in childhood: a systematic review». *Eur J Pediatr* 2008;167:121-2.
41. Bergemann R, Brandt A, Zoellner U, Donner CF. Preventive treatment of chronic bronchitis: a meta-analysis of clinical trials with a bacterial extract (OM-85 BV) and a cost-effectiveness analysis. *Monaldi Arch Chest Dis* 1994;49:302-7.
42. Carmona-Ramirez MA, Alvarez-Gomez V, Berber A. Use of OM-85 BV for the prevention of acute respiratory tract infections in occupational medicine. *J Int Med Res* 2002;30:325-9.
43. Vance RE, Isberg RR, Portnoy DA. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe* 2009;6:10-21.
44. Duncan RL Jr, Hoffman J, Tesh VL, Morrison DC. Immunologic activity of lipopolysaccharides released from macrophages after the uptake of intact *E. coli* in vitro. *J Immunol* 1986; 136:2924-9.
45. Lusuardi M, Capelli A, Carli S, et al. Local airways immune modifications induced by oral bacterial extracts in chronic bronchitis. *Chest* 1993; 103:1783-91.
46. Mauel J, Van Pham T, Kreis B, et al. Stimulation by a bacterial extract (Broncho-Vaxom) of the metabolic and functional activities of murine macrophages. *Int J Immunopharmacol* 1989;11:637-45.
47. Emmerich B, Emslander HP, Milatovic D, et al. Effects of a bacterial extract on local immunity of the lung in patients with chronic bronchitis. *Lung* 1990;168:726-31.
48. Lettgen B, Troster K. Prophylaxis of recurrent urinary tract infections in children. Results of an open, controlled and randomized study about the efficacy and tolerance of cefixime compared to nitrofurantoin. *Klin Padiatr* 2002;214:353.
49. Lorenzo-Gómez MF, Padilla-Fernández B, García-Criado FJ, et al. Evaluation of a therapeutic vaccine for the prevention of recurrent urinary tract infections versus prophylactic treatment with antibiotics. *Int Urogynecol J* 2013;24:127-134.



Actualizaciones en las guías para el diagnóstico y el tratamiento de las gammopatías monoclonales

Avances en el diagnóstico y la monitorización del mieloma múltiple y otras gammopatías monoclonales

Juan José Rodríguez Molina, Joaquín Navarro Capistegui y Eduardo Fernández-Cruz

Laboratorio Diagnóstico del Servicio de Inmunología Clínica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid

Las gammopatías monoclonales (GM) representan un amplio abanico de patologías asociadas a la proliferación monoclonal de células plasmáticas cuya manifestación común es la presencia de moléculas de inmunoglobulinas (Ig) de aspecto monoclonal en plasma y/u orina (proteína monoclonal [PM] o paraproteína). Estas Ig monoclonales son producidas en la médula ósea por clones de células plasmáticas anormalmente expandidas y en cantidades que permiten su visualización en el laboratorio mediante técnicas de inmunofijación en suero y/u orina. El abordaje de estas patologías presenta dos aspectos diferenciados: 1) aspectos relativos a las pruebas analíticas para el diagnóstico y la monitorización de las patologías, y 2) aspectos relativos al seguimiento clínico directo del paciente. En este capítulo haremos un repaso de los procedimientos utilizados en el laboratorio de diagnóstico clínico para la evaluación de pacientes con sospecha de GM y de la incidencia de las nuevas tecnologías para la detección y la tipificación de las paraproteínas.

CLASIFICACIÓN DE LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

En relación con el diagnóstico diferencial del mieloma múltiple (MM) y de la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), el International Myeloma Working Group (IMWG) estableció en 2003¹ una nueva clasificación de las GM según los niveles de PM, el porcentaje de células plasmáticas en médula ósea y la presencia o ausencia de afectación orgánica o tisular relacionada con el mieloma (*myeloma-related organ or tissue impairment* [ROTI]).

De acuerdo con estos criterios, se establecían tres categorías de GM:

- GMSI: concentración de paraproteína en suero < 30 g/l, porcentaje de células plasmáticas en médula ósea < 10% y ausencia de evidencia de mieloma-ROTI.

- MM asintomático: concentración de paraproteína en suero > 30 g/l, porcentaje de células plasmáticas en médula ósea > 10% y ausencia de evidencia de mieloma-ROTI.
- MM sintomático: concentración de paraproteína en suero > 30 g/l, porcentaje de células plasmáticas en médula ósea > 10% y evidencia de mieloma-ROTI.

La clasificación de las GM de 2003 incluía otras patologías adicionales:

- Mieloma no secretor (MNS).
- Plasmacitoma solitario del hueso.
- Plasmacitoma extramedular.
- Plasmacitoma solitario múltiple.
- Leucemia de células plasmáticas.

Cabe considerar que las características de estas patologías presentan un importante solapamiento y que la historia natural de la enfermedad puede evolucionar en un mismo paciente desde la GMSI hasta el MM activo. El diagnóstico diferencial adecuado del paciente permite clasificar su patología en alguna de estas entidades clínicas y brinda la posibilidad de evaluar el riesgo de progresión y de monitorizar de forma adecuada la evolución de la enfermedad.

GUÍAS DE CONSENSO PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DEL MIELOMA MÚLTIPLE

En los últimos años se han publicado diversas guías elaboradas por grupos de trabajo internacionales que constituyen importantes documentos de consenso referentes a la evaluación de las GM. A modo de ejemplo, puede destacarse la guía publicada en 2009 conjuntamente por el UK Myeloma Forum (UKMF) y el Nordic Myeloma Study Group (NMSG) en el *British Journal of Haematology*². Otra guía de iniciativa europea es la de la European Society for Medical Oncology (ESMO), publicada en 2010 en *Annals of Oncology*³. En 2009 tuvo lugar el 12th International Myeloma Workshop, en el que se constituyeron distintos paneles de expertos, y en 2011 se publicaron en *Blood* las recomendaciones del Consensus Panel 3 relativas, entre otros aspectos, a las (mínimas) pruebas (imprescindibles) para el diagnóstico y la valoración del pronóstico de pacientes con sospecha de MM⁴. Ese mismo año se presentaron dos nuevas guías clínicas: la guía para el diagnóstico y manejo del MM elaborada por el Haemato-oncology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology (BCSH) and UK Myeloma Forum, publicada en el *British Journal of Haematology*⁵, y la guía *Multiple Myeloma NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*, elaborada por el National Comprehensive Cancer Network (NCCN) de EEUU, que se publicó en el *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*⁶.

Las guías mencionadas han ido incorporando avances en distintos ámbitos del diagnóstico de las GM: en el diagnóstico por imagen, como es el caso de los estudios de resonancia magnética o la tomografía por emisión de positrones; en el análisis de la célula tumoral mediante citometría de flujo; en los estudios genéticos, como es el caso de la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), o en el laboratorio de diagnósti-

co, como ha ocurrido con la cuantificación de las cadenas ligeras libres (CLL) de Ig en suero.

Desde el punto de vista del laboratorio de diagnóstico, el interés del diagnóstico de estas patologías se centra en: 1) la detección y la evaluación inicial de las paraproteínas; 2) su estratificación y evaluación del riesgo de progresión, y 3) la monitorización de los tratamientos.

NUEVAS METODOLOGÍAS DIAGNÓSTICAS PARA LA EVALUACIÓN DE LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

En los últimos años se han realizado importantes avances en las metodologías utilizadas en el laboratorio para el diagnóstico de las GM, que describimos a continuación:

- Desarrollo de anticuerpos frente a las CLL de las Ig dirigidos contra determinantes antigénicos situados en regiones de la cadena ligera habitualmente ocultos en la estructura cuaternaria de las Ig intactas. Distintas modalidades de estos anticuerpos permiten cuantificar las CLL en suero⁷ y en orina⁸ mediante técnicas de inmunoensayo en fase líquida, como la nefelometría y la turbidimetría.
- Desarrollo de anticuerpos que reconocen conjuntos pareados (cadena pesada/cadena ligera) y permiten diferenciar, por ejemplo, la IgG- κ de la IgG- λ . Este método de medición también se basa en técnicas de inmunoensayo en fase líquida⁹.
- Desarrollo de procedimientos de electroforesis basados en electroforesis capilar de zona, cuya sensibilidad es muy superior a la de los procedimientos electroforéticos habituales basados en electroforesis zonal sobre geles de agarosa^{10,11}. También se han desarrollado procedimientos similares a la inmunofijación basados en electroforesis capilar y con una alta sensibilidad y especificidad.
- Mejora significativa de los procedimientos electroforéticos aplicados a muestras urinarias que permiten su evaluación sin requerir la concentración previa de la orina. Estas nuevas aproximaciones presentan una alta sensibilidad y especificidad para la evaluación de las paraproteínas en orina¹².

La implantación de todas estas herramientas diagnósticas es desigual en los distintos laboratorios de diagnóstico clínico en los servicios donde se estudian estas patologías (Inmunología, Análisis Clínicos y Bioquímica Clínica), ya sea debido a la variabilidad en la disponibilidad de las tecnologías o bien a la carencia de desarrollo de protocolos analíticos específicos, a razones históricas (de hábitos y costumbres) o a combinaciones de todas estas razones. No obstante, el objetivo común que debería guiar al Laboratorio de Diagnóstico Clínico es la garantía de que las pruebas analíticas que se realicen puedan permitir en todos los casos el diagnóstico correcto y una adecuada monitorización del paciente con GM.

CRITERIOS DE EVALUACIÓN EN EL INICIO DE UN ESTUDIO DE PARAPROTEÍNAS

En términos de directrices generales, se realizará el espectro electroforético de una muestra sérica cuando haya sospecha clínica de patologías relacionadas con la presencia de una paraproteína o bien cuando los resultados de otras pruebas indiquen un in-

cremento de la probabilidad de la presencia de una PM². Estos parámetros anormales de sospecha incluyen:

- Velocidad de sedimentación globular o viscosidad plasmática incrementadas.
- Anemia, hipercalcemia o fallo renal de causa desconocida.
- Incremento de las proteínas/globulinas totales.
- Incremento de la Ig, particularmente si se asocia a la disminución de una o más clases de Ig (IgG, IgA o IgM).
- Reducción de los niveles de una o más clases de Ig (IgG, IgA o IgM).

Frecuentemente, las paraproteínas se detectan como un hallazgo casual en relación con el estudio de otros síntomas clínicos o signos no asociados directamente a las GM o bien en el contexto de revisiones médicas rutinarias.

PRUEBAS DE LABORATORIO UTILIZADAS PARA LA EVALUACIÓN DE LAS PARAPROTEÍNAS

La evaluación estándar inicial de pacientes con sospecha de MM incluye una serie de pruebas diagnósticas en distintos campos⁴:

- Información clínica: historia clínica y exploración.
- Pruebas hematológicas:
 - Hemograma y recuento diferencial.
 - Evaluación del frotis de sangre periférica.
- Pruebas bioquímicas:
 - Cribado bioquímico general.
 - Calcio y creatinina.
- Pruebas inmunológicas:
 - Espectro electroforético e inmunofijación en suero.
 - Cuantificación nefelométrica de las Ig séricas.
 - Electroforesis e inmunofijación de orina de 24 horas.
 - Cuantificación de CLL en suero.
- Estudios en médula ósea:
 - Aspirado o biopsia de médula ósea.
- Citogenética:
 - Cariotipo.
 - FISH.
- Pruebas radiológicas:
 - Radiología de columna, pelvis, cráneo, húmero y fémur.
 - Resonancia magnética (en determinadas circunstancias).
- Otras pruebas:
 - β -2 microglobulina en suero.
 - Lactato deshidrogenasa en suero.

Existe una importante coincidencia entre las distintas guías²⁻⁶ en relación con la utilidad de estas pruebas diagnósticas para el diagnóstico diferencial de las GM. No obstante, es

posible encontrar diferencias en las aproximaciones del laboratorio diagnóstico referentes a la inclusión de pruebas analíticas correspondientes a pruebas analíticas de inmunoquímica, a los algoritmos de pruebas de cribado y a las pruebas de confirmación. Desde este punto de vista, las guías del BCSH y del NCCN antes referidas^{5,6} difieren también en algunos aspectos. En concreto, esta última no diferencia entre pruebas de cribado y pruebas de confirmación en el diagnóstico diferencial inicial de las GM. Por otra parte, la diferencia entre la aproximación recomendada en la guía británica y en la guía del IMWG radica en que, según esta última, la cuantificación de las CLL en suero debería realizarse en el cribado para todos los pacientes, mientras que en la guía del BCSH podría llevarse a cabo sólo en aquellos casos en los que no se demuestre la presencia de PM en suero pero exista una fuerte sospecha de MNS, mieloma oligosecretor o mieloma de cadenas ligeras.

En línea con las recomendaciones del IMWG se encuentran el algoritmo diagnóstico publicado por Katzmann y colaboradores¹³, las recomendaciones recién publicadas por la Sociedad Española de Química Clínica y Patología Molecular (SEQC; http://www.seqc.es/es/Publicaciones/3/43/Comision_de_Proteinas_-_Documentos_nuevos/) y el algoritmo presentado por Joaquín Martínez López, miembro del Grupo Español del Mieloma, en su intervención en la 3ª Reunión Anual de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid (SICAM) de Octubre de 2011 y que se recoge en esta monografía, en el capítulo titulado *Protocolos de interacción consensuados en gammopatías monoclonales*. Estos algoritmos de diagnóstico diferencial recomiendan la medición de las CLL en suero en combinación con la electroforesis de proteínas en suero (SPE) y la electroforesis de inmunofijación (IFE) en todos los pacientes con sospecha de GM, suprimiendo inicialmente la necesidad de los estudios en orina (excepto ante la sospecha de amiloidosis). En todo caso, la cuantificación de las CLL en suero es una prueba muy importante para la evaluación del riesgo de progresión de la GM y para la determinación de la «remisión completa estricta» (RCe) tras el tratamiento del MM, uno de cuyos requisitos es, precisamente, la normalidad de la ratio de CLL- κ /CLL- λ .

ALGORITMO DIAGNÓSTICO DE PRUEBAS INMUNOQUÍMICAS PARA EL ESTUDIO DE PACIENTES CON SOSPECHA DE MIELOMA MÚLTIPLE

En el laboratorio de diagnóstico clínico, las pruebas inmunoquímicas que se utilizan para evaluar la detección de paraproteínas se pueden estructurar mediante un algoritmo básico de pruebas analíticas asociadas en cadena de detección/cribado y de tipificación/confirmación:

Pruebas de detección/cribado de paraproteínas

Pruebas de detección. El método de elección es la SPE, bien en geles de agarosa o bien mediante electroforesis capilar de mayor sensibilidad^{10,11}. En ambos casos, la SPE permite la detección de la mayor parte de las paraproteínas asociadas a las GM. No obstante, en determinados casos hay pacientes con sospecha clínica de GM sin presencia

de PM demostrable en el espectro electroforético del suero, como ocurre en el MNS, el mieloma oligosecretor y el mieloma de cadenas ligeras. En estos casos, se deben realizar pruebas de detección complementarias, como la IFE o la determinación de CLL de Ig en suero²⁻⁵.

Detección por inmunofijación en suero. La técnica de IFE en suero es más sensible que la SPE, por lo que deberá realizarse cuando esta última sea negativa y haya sospecha clínica fundada de posible presencia de GM¹⁻⁶.

Detección basada en la cuantificación de CLL en suero. En 2003, Bradwell y colaboradores⁷ desarrollaron métodos muy sensibles que permiten la cuantificación de las CLL en suero. Se ha demostrado que las células plasmáticas de médula ósea, tanto las normales como las neoplásicas, producen y secretan CLL de forma similar a las Ig completas. Además, se ha demostrado que una ratio de CLL κ/λ anormal puede utilizarse como marcador adicional (subrogado) de GM, incluso en situaciones en que la tasa de reabsorción de las CLL no haya sido superada y, por lo tanto, las CLL monoclonales no se puedan detectar mediante inmunofijación en orina.

La cuantificación de CLL en suero está indicada en los casos de sospecha de MNS, mieloma oligosecretor, mieloma de cadenas libres y amiloidosis (AL). Sin embargo, algunas guías recomiendan incluir, con carácter general, la cuantificación de CLL en suero en el cribado de las GM^{8,14}. En la valoración de los resultados de la detección de CLL en suero ha de tenerse en cuenta que se pueden observar ratios alteradas en otros procesos patológicos asociados a disregulación de la síntesis de Ig, como el lupus eritematoso sistémico o la infección por virus de la inmunodeficiencia humana.

Pruebas de tipificación/confirmación de paraproteínas

Inmunofijación en suero. El procedimiento de referencia para la tipificación es la IFE en suero, en sus distintas variantes: geles de agarosa o electroforesis capilar. Este procedimiento permite identificar la cadena pesada y la cadena ligera implicadas en la estructura de la paraproteína¹⁻⁶. En situaciones especiales, no sólo se deberá valorar la necesidad de detectar las cadenas pesadas γ , α y μ , y las cadenas ligeras κ y λ totales, sino también las cadenas pesadas δ y ϵ , así como las CLL- κ y CLL- λ .

Cuantificación de PM. Esta herramienta es básica en el diagnóstico y el seguimiento de las GM. El método de elección es la densitometría sobre la SPE. Las guías internacionales recomiendan que, para un mismo paciente, siempre se utilice el mismo procedimiento de cuantificación de PM. Cabe señalar que esta recomendación puede entrañar una especial dificultad en los pacientes en remisión, porque en estos casos la PM puede solaparse con el fondo policlonal del suero²⁻⁶.

Ratio de CLL en suero. La evaluación de la ratio de CLL κ/λ en suero puede ser de gran relevancia en la estimación del pronóstico y la monitorización de las GM. En fun-

ción de cada patología concreta, se deberá establecer un plan de reevaluación de este parámetro¹⁴.

Inmunofijación en orina. En la mayor parte de las GM, la inmunofijación en orina no estaría indicada como técnica general de cribado. No obstante, cuando se detecta una paraproteína en suero se debe evaluar su presencia en orina, ya que el balance de paraproteína entre suero y orina puede alterarse por distintos procesos fisiopatológicos, como pueden ser las tasas de producción de PM, la integridad de la función renal o la respuesta al tratamiento²⁻⁶.

Otras determinaciones para la tipificación de paraproteínas. Algunos laboratorios cuantifican las cadenas ligeras κ y λ totales. El análisis de estos resultados tiene escaso valor en el cribado cuando se realiza de forma aislada, pero puede dar una información relevante cuando se evalúa el desequilibrio entre cadenas pesadas y cadenas ligeras. Estos parámetros, en el contexto de los estudios asociados al «perfil proteico» del paciente¹⁵, pueden aportar información relevante sobre el equilibrio de cadenas ligeras entre sí y en relación con las cadenas pesadas, proporcionando así una orientación para las fases adicionales del diagnóstico de identificación de paraproteínas de isotipos IgD o IgE, mielomas de cadenas ligeras o mielomas de cadenas pesadas.

Recientemente, se han desarrollado nuevas herramientas diagnósticas que permiten cuantificar por inmunoensayo en fase líquida los distintos dímeros de cadena pesada/cadena ligera (Hevylite®)⁹. Este método permite diferenciar la Ig implicada en la PM de la Ig no implicada. La evaluación de estos parámetros puede ser de gran utilidad en el pronóstico y la monitorización de las GM. En los capítulos siguientes se ofrece una información más detallada sobre las nuevas aplicaciones de esta prueba.

GAMMAPATÍA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCIERTO: EVALUACIÓN DEL RIESGO DE PROGRESIÓN

El concepto de GMSI, que fue introducido en 1978 por R. A. Kyle, de la Clínica Mayo¹⁶, se define como la presencia de PM en suero u orina en un individuo en el que no hay evidencia de MM, AL, macroglobulinemia de Waldenström ni otras patologías asociadas.

Es de crucial importancia determinar criterios objetivos que permitan predecir la probabilidad de progresión de la enfermedad desde GMSI hasta MM sintomático. En este sentido, se han identificado algunos factores de riesgo¹⁷:

- *Isotipo de paraproteína.* Se ha demostrado que las GMSI con paraproteína de las clases IgA o IgM tienen mayor probabilidad de progresión.
- *Concentración de paraproteína.* Varios estudios demuestran que a mayor nivel de paraproteína en el momento del diagnóstico, mayor es la probabilidad de progresión.
- *Otros factores.* Se han descrito asociaciones de la progresión maligna con otros factores, como la gravedad de la plasmacitosis o la presencia de células plasmáticas en sangre periférica.

- *Resultados anormales de la ratio de CLL κ/λ en suero.* Se ha demostrado la asociación entre ratios de CLL κ/λ en suero alteradas y la progresión de GMSI a MM.

CONCLUSIONES

El diagnóstico diferencial de las GM es un proceso multifactorial y multidisciplinar que incluye la valoración de distintos tipos de evidencias clínicas y de diagnóstico de laboratorio. Desde el punto de vista del diagnóstico inmunoquímico, es necesario implantar en el laboratorio las nuevas tecnologías y mejorar la eficacia de metodologías con una mayor trayectoria. Las nuevas guías para el diagnóstico y la monitorización de GM ofrecen una oportunidad para intensificar la colaboración entre los hematólogos clínicos responsables del seguimiento clínico de los pacientes y los profesionales de los laboratorios de diagnóstico. El objetivo principal es establecer protocolos consensuados que incluyan algoritmos diagnósticos para la evaluación inicial y el seguimiento de los pacientes con alteraciones asociadas con la presencia de GM.

..... REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. The International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J of Haematol* 2003;121: 749-57.
2. Bird J, Behrens J, Westin J, et al. UK Myeloma Forum (UKMF) and Nordic Myeloma Study Group (NMSG): guidelines for the investigation of newly detected M-proteins and the management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Br J of Haematol* 2009;147:22-42.
3. Harousseau JL, Dreyling M, on behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2012;21:155-7.
4. Dimopoulos M, Kyle R, Fermandet JP, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Consensus Panel 3. *Blood* 2011;117:4701-5.
5. Bird JM, Owen RG, D'Sa S, et al, on behalf of the Haemato-oncology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology (BCSH) and UK Myeloma Forum. Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma 2011. *Br J of Haematol* 2011;154:32-75.
6. Anderson KC, Alsina M, Bensinger W, et al. Multiple Myeloma NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2011; 9:1146-83.
7. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, et al. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet* 2003;361:489-91.
8. Abate L, Martelli M, Zannini R. Proteinuria di Bence Jones: sperimentazione di un nuovo metodo immunoturbidimetrico per la determinazione delle catene leggere libere nelle urine non concentrate. *Biochimica Clinica* 1988;12: 1451-7.
9. Bradwell AR, Harding SJ, Fourrier NJ, et al. Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurement of individual immunoglobulin kappa/lambda ratios. *Clin Chem* 2009; 55:1646-55.
10. Bergón E, Miranda I, Miravalles E. Linearity and detection limit in the measurement of serum M-protein with the capillary zone electrophoresis system Capillarys. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:721-3.
11. Tejera-Alhambra M, Navarro J, Ravell JC, et al. Quantification of the serum monoclonal component by capillary electrophoresis and nephelometric determination of serum albumin levels.

- In: 2nd European Congress of Immunology 2009. Berlin (Germany), p. 373-7.
12. Rodríguez Molina J, Navarro Caspistegui J, Fernández-Cruz E. Procedimiento de cribado para la detección de paraproteínas en orina. Aspectos técnicos y estandarización. P-144. XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Inmunología. *Inmunología* 2011;30:84.
 13. Katzmann JA, Kyle RA, Benson J, et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009;55:1517-22.
 14. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215-24.
 15. Cacoub P, Camproux AC, Thiolières JM, et al. A new approach for rapid detection and typing of serum monoclonal components. *Clin Chim Acta* 2000;302:105-24.
 16. Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: natural history in 241 cases. *Am J Med* 1978;64:814-26.
 17. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002;346:564-9.

Nuevas aportaciones de Freelite® y Hevylite® al diagnóstico, a la monitorización y al pronóstico de las gammopatías monoclonales

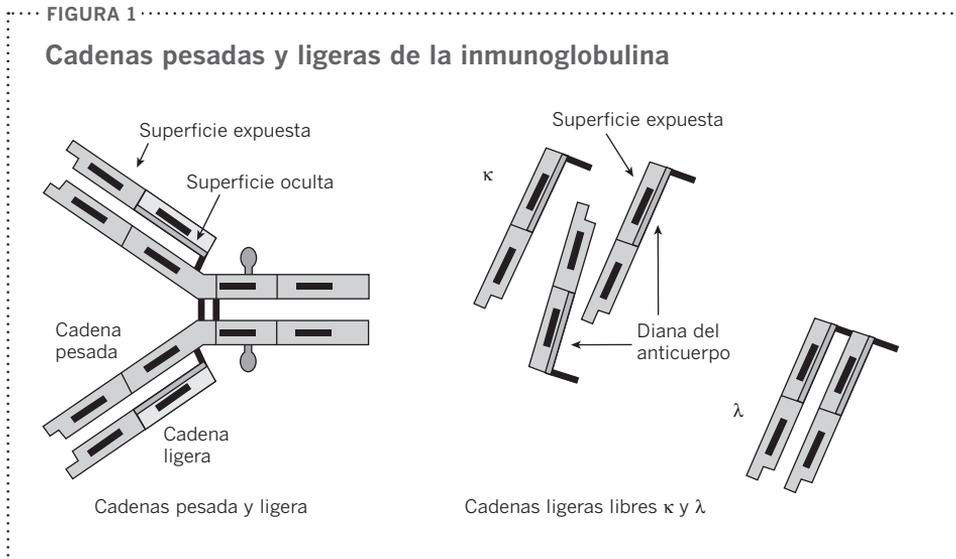
Arthur R. Bradwell

University of Birmingham, Reino Unido

Hace 10 años desarrollamos un inmunoensayo basado en anticuerpos policlonales producidos en oveja para la determinación sérica de las cadenas ligeras libres (CLL) κ y λ de las inmunoglobulinas (Ig)¹. Este gran avance técnico, logrado a partir del modelo *knock-out sheep*, ha permitido determinar todos los diferentes tipos de cadenas ligeras κ y λ . Cabe señalar que 30 años antes ya habíamos intentado producir anticuerpos monoclonales, una diana lógica para medir proteínas monoclonales, pero no pudimos obtener un inmunoensayo seguro debido a la variabilidad existente en las regiones ocultas de las cadenas ligeras de las Ig (Figura 1).

La gran heterogeneidad de las CLL en suero (su elevado polimorfismo) se debe a causas como la recombinación genética, las hipermutaciones somáticas de las regiones variables tras la exposición a antígenos o la variabilidad genética de las regiones constantes². Por ello, el principal desafío en el desarrollo de anticuerpos para ensayos de CLL en suero era conseguir un reconocimiento amplio de las diferentes cadenas ligeras producidas por pacientes con tumores de células plasmáticas.

La cadena ligera κ está codificada por un solo gen responsable para la región constante, pero en la codificación de la región variable y de la región hipervariable están involucrados alrededor de 40 genes. La estructura macromolecular de la región oculta de la cadena ligera κ depende tanto de la región constante como de los 40 genes responsables de la región variable, razón por la cual las cadenas ligeras κ monoclonales son muy variables. La cadena ligera λ es aun más variable, ya que hay cuatro genes que codifican las regiones constantes y cerca de 30 que codifican las regiones variables, lo que origina aproximadamente 120 posibles estructuras diferentes. Por lo tanto, resulta imposible disponer de uno, dos o varios anticuerpos monoclonales capaces de reconocer correctamente las cadenas κ y, en especial, las λ . Además, ambos tipos de cadenas pueden



estar dimerizadas, en particular las cadenas λ , que circulan de esta forma en el 80% de los pacientes.

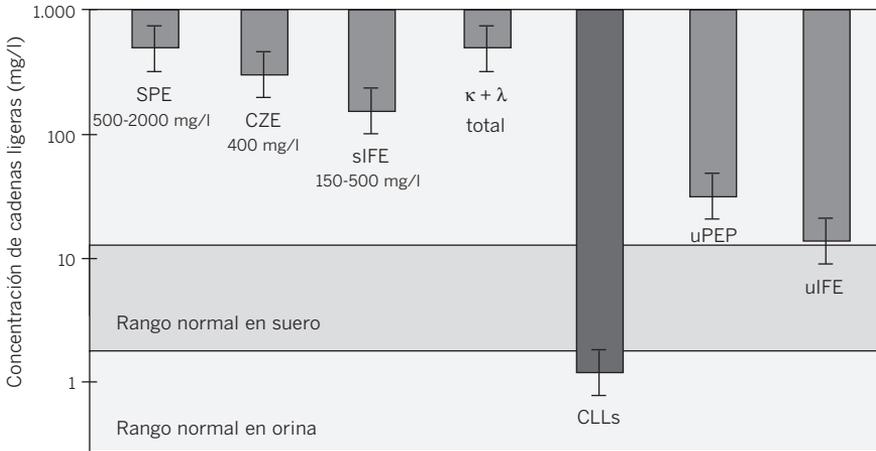
DETERMINACIÓN DE CADENAS LIGERAS LIBRES EN SUERO FREELITE® Y SU APLICABILIDAD SEGÚN LAS RECOMENDACIONES INTERNACIONALES

Mediante la inmunización de ovejas con más de 100 antígenos diferentes, hemos podido obtener una mezcla de anticuerpos policlonales que permite la identificación de la enorme variedad de cadenas ligeras presentes en el suero humano. El inmunoensayo en fase líquida (nefelometría/turbidimetría) para la «cuantificación de CLL en suero» (Freelite®) es mucho más sensible que las otras pruebas séricas que se han utilizado con tal fin³. Además, también es más sensible que las pruebas para CLL en orina, las cuales tienen un valor limitado debido a que, en condiciones funcionales normales, las CLL se reabsorben en el glomérulo renal y, por lo tanto, no pasan a la orina (Figura 2)⁴.

Los pacientes con concentraciones de CLL de entre 100 y 200 mg/l sólo pueden ser evaluados con el ensayo para CLL en suero Freelite®, siendo esencial que se utilicen pruebas diagnósticas que permitan la medición en todos los pacientes que se encuentran en el rango de la normalidad. Dado que el marcador de monoclonalidad es la «ratio κ/λ », además de cuantificar la cadena ligera monoclonal implicada, también hay que medir la supresión de la cadena ligera no tumoral, un parámetro que sólo puede obtenerse utilizando el ensayo para CLL en suero Freelite®. Los beneficios que aporta la cuantificación de las CLL se han referido en más de 1.000 publicaciones en los últimos 10 años, y una de las conclusiones más comunes de éstas es que «la determinación de CLL séricas debería reemplazar a las pruebas en orina en el cribado de Ig monoclonales»⁵⁻⁷.

FIGURA 2

Sensibilidad de las pruebas para la detección de cadenas ligeras libres en suero y orina



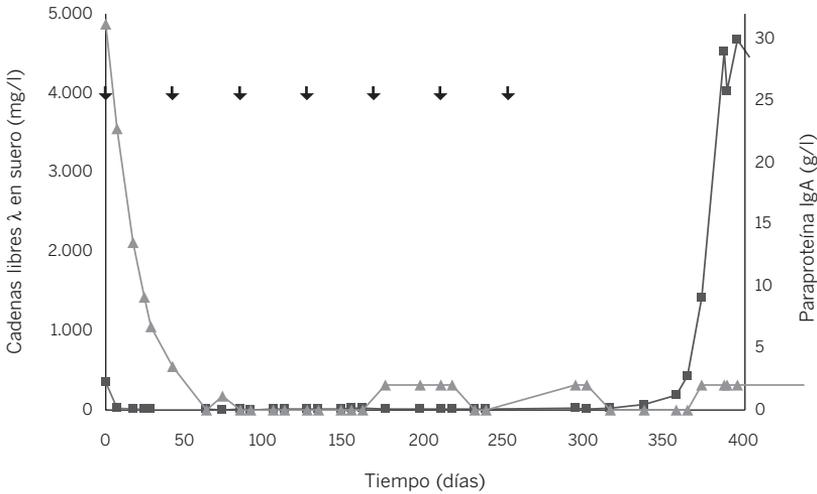
κ + λ total: cadenas libres en suero κ + λ totales; CLLs: cadenas ligeras libres en suero; CZE: electroforesis capilar de zona; SPE: electroforesis de proteínas en suero; sIFE: electroforesis de inmunofijación en suero; uIFE: electroforesis de inmunofijación en orina; uPEP: electroforesis de proteínas en orina.

En cuanto a la monitorización de la respuesta al tratamiento, la medición de las CLL en suero es de gran valor y está recomendada en el seguimiento de los pacientes con amiloidosis (AL) o con mieloma múltiple no secretor (MMNS), así como en todos los pacientes con mieloma múltiple (MM), en este caso para la determinación de la «remisión completa estricta» (RCe)⁸. Aunque es probable que el MM comience en la médula ósea con un único clon de células plasmáticas, en el curso de la enfermedad se produce una diferenciación genética con expansión clonal, por lo que es posible que en las fases avanzadas existan centenares de clones distintos⁹. Algunos de estos clones de células plasmáticas producen mezclas de Ig intactas y CLL, mientras que otros generan únicamente CLL. Por lo tanto, se debería llevar a cabo una monitorización de todos los pacientes con MM mediante la medición tanto de las Ig intactas como de las CLL (Figura 3).

Por otra parte, en el contexto de pacientes con sospecha de MM que tienen insuficiencia renal y presentan en el momento del diagnóstico una nefropatía por cilindros («riñón de mieloma»), actualmente, en la mayoría de los centros se incluye en la evaluación una prueba para detectar CLL o Ig intactas en orina. Cabe destacar, sin embargo, que la nefropatía por cilindros es causada por el exceso de cadenas ligeras que son filtradas a través del glomérulo y deficientemente metabolizadas, mientras que las Ig intactas, debido a su gran tamaño, no son filtradas por el riñón y no causan esta com-

FIGURA 3

Paciente con mieloma múltiple IgA λ y recaída únicamente de cadenas ligeras libres (escape de CLL en suero)



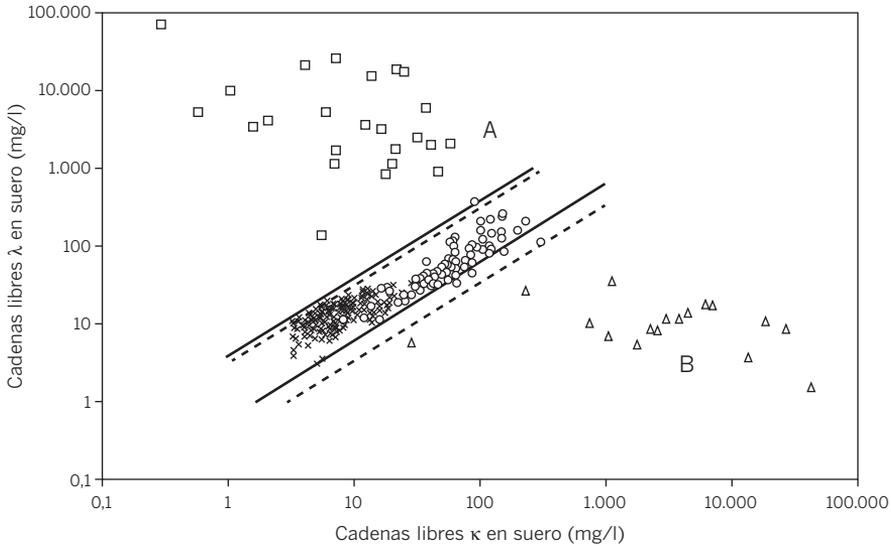
plicación. Además, en la mayoría de los pacientes con insuficiencia renal aguda (IRA), dado que no existe función renal, la prueba de CLL en orina puede ser negativa, lo cual hace que la única prueba relevante sea el ensayo de CLL en suero. En un estudio realizado en Birmingham en 142 pacientes con IRA¹⁰, se observó nefropatía por cilindros en todos los pacientes con niveles de CLL- κ o CLL- λ en suero > 500 mg/l, pudiendo considerarse este punto de corte casi como un criterio diagnóstico (Figura 4)¹¹. Sin embargo, en tres pacientes del estudio que tenían una gammopatía monoclonal de significado incierto (GMSI) y presentaron IRA no se encontró nefropatía por cilindros¹⁰. Dado que muchos de los pacientes evaluados en este estudio fueron negativos para la prueba de CLL en orina –ya que no fue posible recoger orina durante varios días–, la determinación de las CLL en suero constituyó una prueba diagnóstica crucial.

En resumen, de acuerdo con las directrices internacionales, el ensayo de CLL en suero en el diagnóstico y el manejo del MM y trastornos relacionados está indicado fundamentalmente en cinco situaciones:

- 1) En el cribado y el diagnóstico de todas las gammopatías monoclonales (GM) distintas de la AL, conjuntamente con la electroforesis de proteínas en suero (SPE) y la electroforesis de inmunofijación (IFE) en suero⁸.
- 2) En el pronóstico de todas las GM, incluidas las GMSI^{8,12,13}.
- 3) En la monitorización de la respuesta al tratamiento en pacientes con AL y MMNS^{8,14-17}.

FIGURA 4

Valoración de la ratio κ/λ en pacientes con insuficiencia renal que requieren diálisis



La ratio κ/λ permite distinguir con facilidad a los pacientes con mieloma múltiple (MM) tipo κ (triángulos en área B) y tipo λ (cuadrados en área A) de aquellos sin evidencia de gammapatía monoclonal (círculos entre las líneas paralelas). Las cruces representan el rango de normalidad.

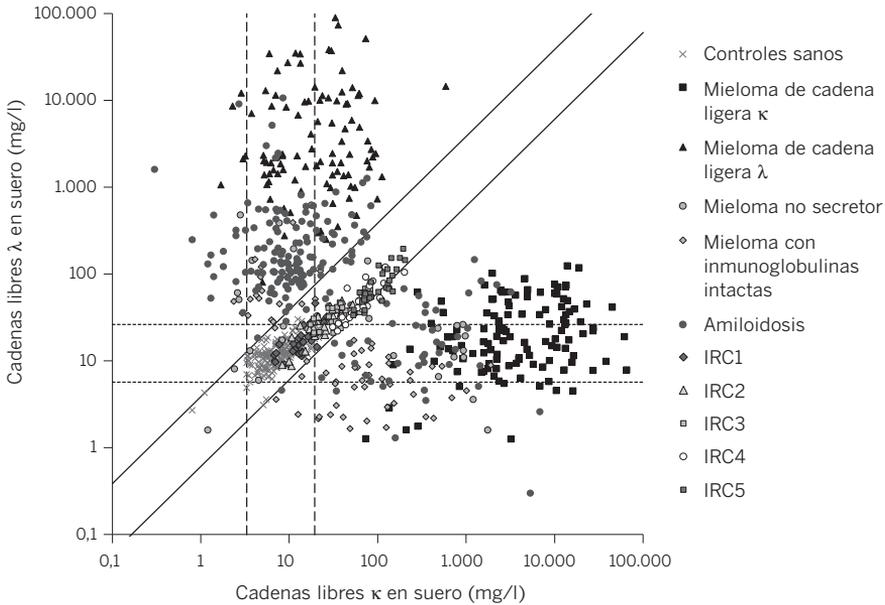
- 4) En todos los pacientes con MM que hayan alcanzado una respuesta completa al tratamiento, con el objeto de definir la RCe¹⁴.
- 5) En los pacientes con MM que presentan fallo renal^{10,18}.

Importancia de la ratio de CLL- κ /CLL- λ

La potencia de la determinación de CLL en suero es dependiente de la ratio κ/λ . En el gráfico de puntos expuesto en la Figura 5 se representan los valores de la ratio κ/λ de 1.000 pacientes, algunos de los cuales presentan valores de concentraciones de cadenas κ o λ anormales pero una ratio κ/λ normal. Estos pacientes tienen enfermedad renal crónica y, como consecuencia, una disminución de la capacidad renal para eliminar las CLL, cuya concentración en suero resulta incrementada hasta 10 veces por encima de los niveles que se observan en individuos con una función renal normal. En cambio, los pacientes con producción de κ monoclonal o de λ monoclonal suelen presentar una ratio κ/λ fuera del rango de la normalidad, parámetro que resulta esencial a la hora de diferenciar las patologías que cursan con producción de proteínas monoclonales de aquellas otras que, como la insuficiencia renal, provocan incrementos combinados de CLL κ y λ . De este modo, si únicamente se dispusiera de la medición de las CLL totales (y no se pudiera evaluar la ratio κ/λ), se dejaría sin diagnosticar a prácticamente todos los pa-

FIGURA 5

Determinación de la ratio κ/λ (Freelite®) en 1.000 pacientes con diversos tipos de mieloma, amiloidosis, insuficiencia renal crónica y sanos



Las concentraciones de cadenas κ y λ se representan en escala logarítmica. A lo largo del eje diagonal, la ratio κ/λ es de aproximadamente 1, y en el área donde se cruzan las líneas paralelas verticales, horizontales y diagonales se encuentra las cruces que representan las ratio κ/λ de los sujetos sanos.

IRC: insuficiencia renal crónica.

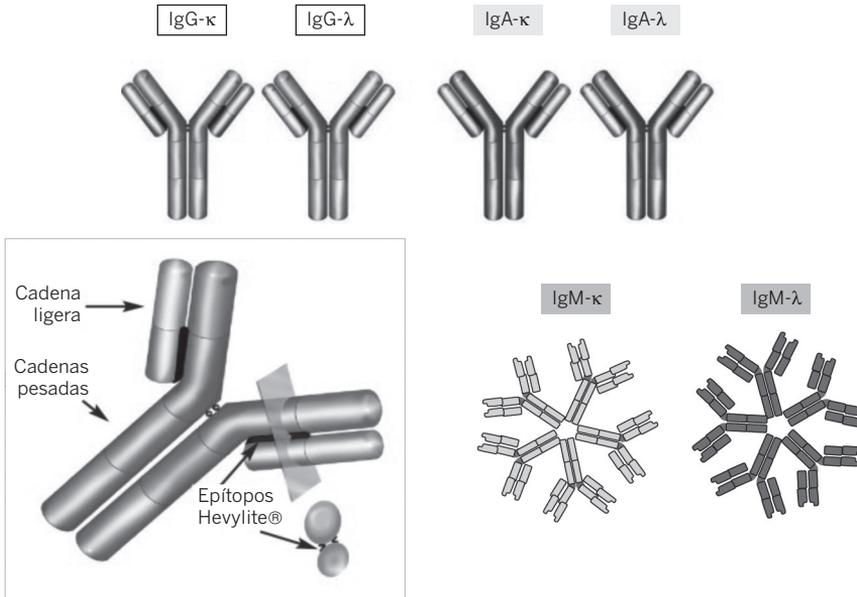
cientes con MMNS o con AL. La causa de ello radicaría en que, por ejemplo, un valor de 200 mg/l de CLL- κ , más 200 mg/l de CLL- λ , correspondería a un total de CLL inferior al límite superior del rango de normalidad para la suma de CLL en suero, que se sitúa en alrededor de 500 mg/l.

NUEVOS AVANCES Y APLICABILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE PARES ESPECÍFICOS DE CADENAS PESADAS/CADENAS LIGERAS (HEVYLITE®) EN LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

Cuando se mide la concentración de Ig intactas no se establece una ratio, sino que se mediría, por ejemplo, la IgG total, que es igual a la suma de IgG- κ más IgG- λ , y lo mismo ocurriría con los demás tipos de Ig. Pero, ¿qué ocurriría si se dispusiera de una ratio IgG- κ /IgG- λ ? Ésta es, precisamente, la información que proporciona el ensayo Hevylite®: la ratio de los pares específicos de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulinas

FIGURA 6

Representación de los pares específicos de cadena pesada/cadena ligera de las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM y de los epítomos Hevylite® diana de los anticuerpos específicos Hevylite®

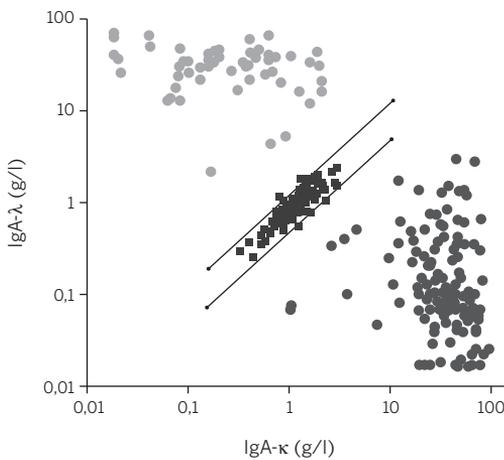


(IgX-κ/IgX-λ)¹⁹. Conceptualmente, Hevylite® es un ensayo basado en criterios justificados y que, al igual que la determinación de CLL en suero, aportará nueva información y valor a la clínica, como se describe a continuación.

Dado que la medición de los pares específicos de cadenas pesadas/cadenas ligeras de las Ig no puede ser obtenida mediante electroforesis, se ha desarrollado un inmunoensayo en fase líquida (nefelometría/turbidimetría) para su determinación¹⁹. En las Ig intactas —con sus dos pares de cadena pesada y cadena ligera—, en cada par de cadenas hay una región única, con un patrón conformacional específico que corresponde a un epítopo de unión entre la cadena pesada y la cadena ligera. Estos epítomos de unión constituyen las dianas de los anticuerpos Hevylite®. Para las IgG, son necesarios dos anticuerpos Hevylite® distintos: uno que reconoce la IgG unida a una cadena ligera λ y otro que reconoce la IgG unida a una cadena ligera κ. Actualmente, se dispone también de anticuerpos Hevylite® para la IgA (unida a la cadena ligera κ o la λ) y para la IgM (Figura 6)^{20,21}. Un anticuerpo Hevylite® reconoce tres aminoácidos de la cadena pesada y otros tres de la cadena ligera. Si el anticuerpo se une únicamente a tres residuos, se considera no reactivo, lo cual significa que los anticuerpos Hevylite® reconocen las moléculas de Ig en su conformación completa y no reconocen las CLL¹⁹.

FIGURA 7

Gráfico de puntos Hevylite®



Las concentraciones de IgA-κ e IgA-λ se representan en escala logarítmica. Entre los ejes centrales diagonales se encuentra el rango de normalidad. Los puntos que quedan por fuera corresponden a pacientes con MM IgA-κ o con MM IgA-λ. Cuanto más extrema es la ratio IgA-κ/IgA-λ, mayores son los niveles de Ig y la supresión de la IgA policlonal no tumoral.

IgA: inmunoglobulina A;
MM: mieloma múltiple.

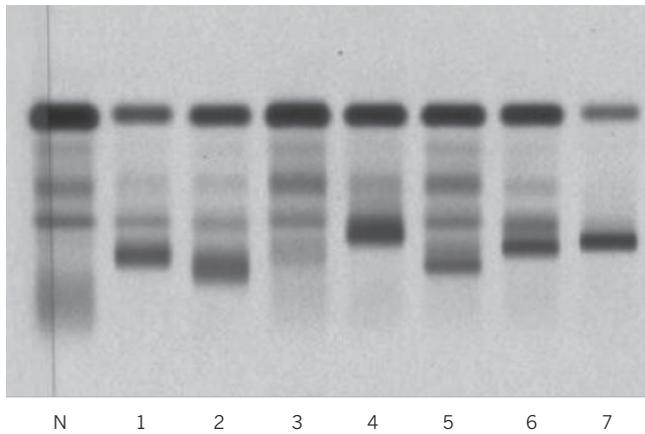
Los resultados de la cuantificación Hevylite® en pacientes con diferentes enfermedades monoclonales se pueden representar del mismo modo que los valores de CLL en suero. En la Figura 7 se representan los valores de Hevylite® obtenidos en 100 pacientes con MM tipo IgA²². Se puede observar que los pacientes con MM tienen una ratio IgA-κ/IgA-λ alterada. En realidad, cuanto más extrema es esta ratio, mayores son los niveles de Ig y la supresión de la IgA policlonal no tumoral, ya que existe una correlación entre la concentración de la IgA producida por el tumor y la supresión de la IgA policlonal. En la gráfica se ilustra esta correlación, observándose que algunos pacientes con MM y menos de 1 g/l de proteína monoclonal presentan una supresión de fondo (*background*) policlonal no tumoral de aproximadamente 10 veces. Además, en algunos pacientes puede ser imposible el diagnóstico por electroforesis, como ocurre en los que presentan MM tipo IgA, en quienes a veces la proteína monoclonal es fácil de reconocer pero difícil de cuantificar debido a la transferrina subyacente (Figura 8)^{22,23}. Por lo tanto, muchos pacientes producen proteínas monoclonales IgA que no se detectan por electroforesis pero que sí pueden identificarse mediante el ensayo Hevylite®.

VENTAJAS DEL ENSAYO HEVYLITE® EN LA MONITORIZACIÓN DEL MIELOMA MÚLTIPLE

La aportación del ensayo Hevylite® al diagnóstico del MM consiste en que permite la identificación de un mayor número de pacientes que las técnicas de electroforesis de inmunofijación²⁴. Cabe destacar que, pese a ello, este ensayo es particularmente de interés en el seguimiento de estos pacientes, en el que entran en juego varias características de la medición de las Ig que normalmente no se toman en consideración.

FIGURA 8

Electroforesis en pacientes con mieloma múltiple tipo IgA

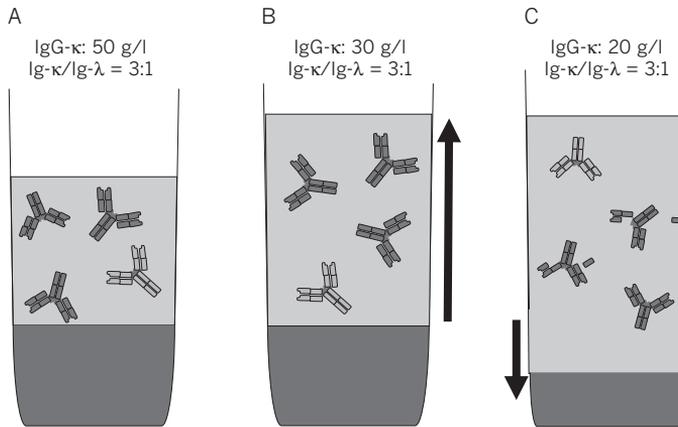


La medición de las Ig se establece por su concentración por litro, pero hay que tener en cuenta que el tumor produce una masa absoluta de la Ig monoclonal. Además, algunos posibles cambios independientes de los que se pueden producir en el propio tumor, como son las alteraciones del volumen sanguíneo o del hematocrito, o también la existencia de un metabolismo variable de la IgG, suponen dificultades añadidas a la hora de reconocer si el tumor realmente está creciendo o bien está disminuyendo de tamaño debido a la quimioterapia (Figura 9). En este sentido, en el año 1977, Alexanian y colaboradores comunicaron que los cambios de volumen de plasma o del hematocrito durante el tratamiento de quimioterapia del MM pueden suponer cambios en la concentración de las Ig de hasta el 50%, lo cual implica que las mediciones de las Ig totales en suero no reflejan la cantidad real de Ig que produce la masa tumoral²⁵.

Como es sabido, las proteínas séricas son eliminadas por pinocitosis y se caracterizan por tener una vida media de alrededor de tres días (Figura 10). Sin embargo, las IgG, gracias a un proceso de reciclaje, tienen una vida media de 21 días²⁶⁻²⁸. Ello se debe a su propiedad de unirse al receptor neonatal o de Brambell (FcRn), que es el responsable del transporte de IgG desde la madre hasta el feto a través de la placenta durante los últimos tres meses del embarazo y permanece activo en todas las células que se mantienen nucleadas a lo largo de su vida. Este receptor, que fija tanto la IgG como la albúmina en residuos separados de la molécula, se une a la IgG en la superficie celular, la protege de la digestión ácida en el lisosoma y la recicla, permitiendo que vuelva a la superficie celular y liberándola en el suero. Este proceso se repite alrededor de siete veces, lo que incrementa la vida media de la IgG de 3 a 21 días. No obstante, dado que cuando existen concentraciones normales de IgG los receptores FcRn se saturan, la IgG que supera dicho umbral será digerida en los lisosomas. Así, si un paciente tiene

FIGURA 9

Efecto de los cambios de volumen sanguíneo en las mediciones de las inmunoglobulinas



Ejemplo A: en concentraciones de IgG-κ de 50 g/l, la ratio entre proteína monoclonal y proteína policlonal es 3:1. Ejemplo B: cuando se incrementa el volumen de plasma y no hay cambios en la producción tumoral, la IgG-κ se diluye, pero la ratio Ig-κ/Ig-λ se mantiene en 3:1. Ejemplo C: muchos pacientes con mieloma presentan anemia, por lo que su volumen plasmático se incrementa y la concentración de IgG-κ se diluye aun más, pero la ratio Ig-κ/Ig-λ sigue manteniéndose en 3:1.

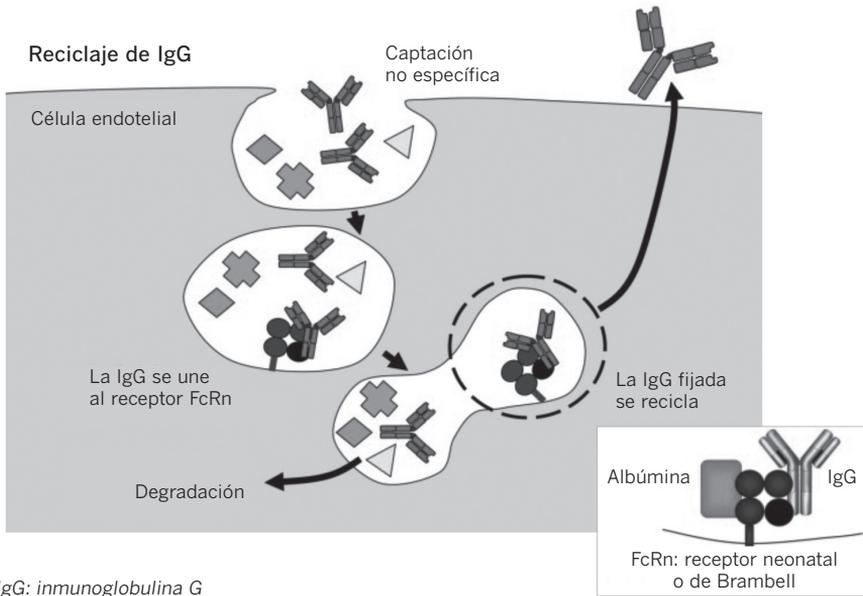
Ig: inmunoglobulina.

100 g/l de IgG, la vida media de 10 g de esta IgG será de 21 días, pero la de los 90 g restantes será de aproximadamente sólo cuatro días. En el MM tipo IgG, el metabolismo de la IgG monoclonal es igual al de la IgG policlonal, por lo que se observa una correlación entre la concentración de IgG y su vida media. En una concentración de 120 g/l, la vida media de la IgG será de aproximadamente cuatro días, pero en una concentración de sólo 5 g/l, la vida media de la IgG será de 80 días. Ello significa que la vida media de la IgG de un paciente en el momento del diagnóstico será mucho más corta que después de la quimioterapia o durante la remisión, cuando la concentración de IgG puede descender a unos 5 g/l y, por lo tanto, permanecer en la sangre durante muchos meses. Incluso, puede ocurrir la eventualidad de que el paciente esté curado y que, sin embargo, se despierte la falsa sospecha de la existencia de un tumor residual. A diferencia de la IgG, las IgA e IgM no tienen receptores de reciclaje, por lo que su vida media no se modifica en función de su concentración sérica.

Atendiendo a lo dicho, los cambios porcentuales en las mediciones de IgG dependerán de las concentraciones iniciales. Así, si en un paciente «X», con una concentración de IgG de 100 g/l se logra, mediante la quimioterapia, la eliminación del 100% de la masa tumoral, en 15 días dicho valor se reducirá en un 80%, es decir, descenderá de 100 a

FIGURA 10

Metabolismo y reciclaje de las inmunoglobulinas G a través de la unión específica con los receptores FcRn



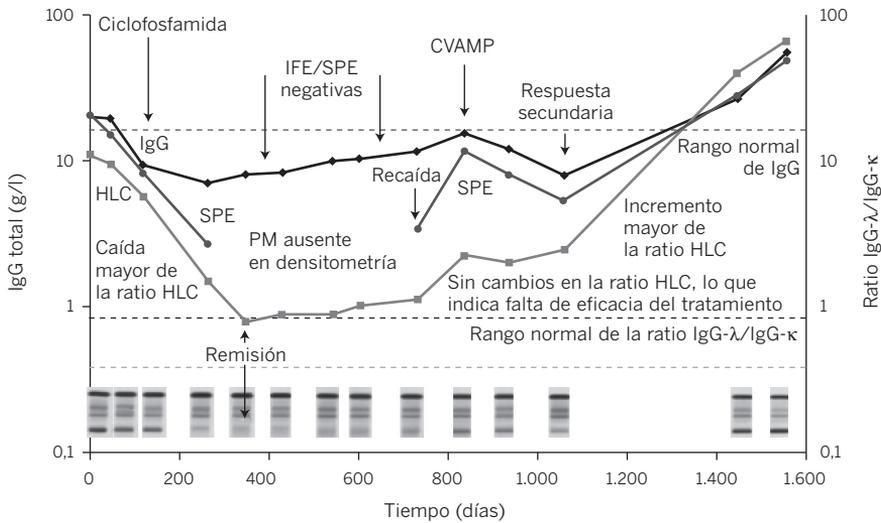
IgG: inmunoglobulina G

20 g/l, puesto que en las concentraciones referidas la vida media de la IgG es, como ya se ha mencionado, de unos cuatro días. En cambio, en un paciente «Y», con una concentración de IgG de 10 g/l, en el que igualmente con la quimioterapia se ha logrado la eliminación del 100% de las células tumorales, en 15 días los niveles de IgG sólo se reducirán en un 20%, o sea, de 10 a 8 g/l, puesto que, en estas concentraciones, la vida media de la IgG es mucho más prolongada. Por lo tanto, la comparación de las reducciones de las concentraciones de IgG en los pacientes con MM no constituye un parámetro fiable. Esta observación podría incluso cuestionar el significado de remisión parcial, dado que, según la definición de tal concepto, el paciente «X» estaría teniendo una muy buena respuesta parcial, mientras que el paciente «Y» mostraría una respuesta parcial pobre, cuando en realidad en ambos pacientes se habría conseguido la eliminación total de la masa tumoral.

En la Figura 11 se representa el seguimiento de un paciente con MM tipo IgG- λ con Hevylite®²⁹. Después de un ciclo de tratamiento con ciclofosfamida, el paciente entra en remisión; luego presenta una recaída, con una respuesta parcial al tratamiento con ciclofosfamida, vincristina, adriamicina, melfalán y prednisolona (CVAMP), y por último, sufre una recaída final. Mediante densitometría sobre SPE se aprecia que la proteína monoclonal está ausente en el momento de respuesta completa al trata-

FIGURA 11

Monitorización del tratamiento de un paciente con mieloma múltiple tipo IgG-λ mediante Hevylite®



CVAMP: tratamiento con ciclofosfamida, vincristina, adriamicina, melfalán y prednisolona;
 HLC: cadenas pesadas/cadenas ligeras; IFE: electroforesis de inmunofijación; IgG: inmunoglobulina G;
 SPE: electroforesis de proteínas en suero.

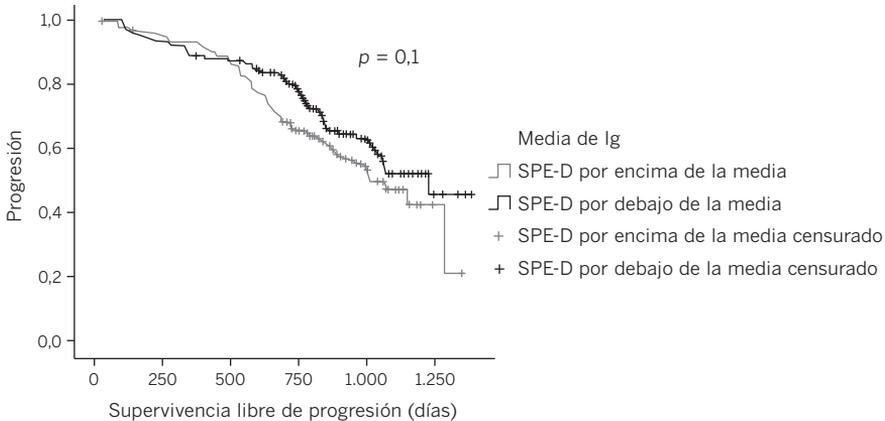
miento, para luego reaparecer en la recaída, en la respuesta parcial al tratamiento con CVAMP y en la recaída final. Se puede observar que durante todo ese período los valores de IgG son normales, inferiores a 15 g/l, y también que la IFE es negativa cuando el proteinograma es negativo. Durante la primera remisión, la ratio IgG-κ/IgG-λ (Hevylite®) es normal, pero recae de forma lenta y progresiva aunque la electroforesis se mantenga negativa hasta aproximadamente el día 700 del seguimiento. Por otro lado, durante la segunda quimioterapia no se observan cambios en la ratio Hevylite®, lo que indica que la tasa de eliminación de las células tumorales era la misma que la de las células plasmáticas de fondo (*background*) y que, por lo tanto, no se logró una eliminación selectiva del tumor. Sin embargo, tanto los valores de la densitometría como los de IgG sugerirían que sí había una buena respuesta cuando, en realidad, no se produjo tal respuesta a nivel de la médula ósea, hecho que se demostró por la continua recaída del paciente. Estos datos confirman que la ratio Hevylite® aporta información adicional acerca de la supresión de la médula ósea por el tratamiento quimioterápico.

Hevylite®, nuevo factor pronóstico para el mieloma múltiple

Las Ig intactas no tienen valor pronóstico en pacientes con MM, por lo que su medición no está recomendada en las directrices internacionales. En este sentido, el Inter-

FIGURA 12

Concentración de inmunoglobulinas monoclonales y supervivencia en 338 pacientes con mieloma múltiple³⁰



Ig: inmunoglobulina; SPE: electroforesis de proteínas en suero.

groupe Francophone du Myélome (IFM) ha demostrado que no se aprecian diferencias en la progresión libre de enfermedad según la concentración de Ig³⁰ (Figura 12). En cambio, según el mismo estudio, los pacientes con una ratio Hevylite® muy alterada tienen una peor progresión que los que presentan una ratio Hevylite® menos alterada, próxima a la normalidad, siendo ésta una diferencia significativa³⁰ (Figura 13). Asimismo, en la Figura 14 se aprecia que existe una correlación de la progresión libre de enfermedad sólo con las concentraciones de cadena pesada/cadena ligera (Hevylite®) no tumoral suprimidas. Este fenómeno evidencia que la diferencia en la progresión libre de enfermedad es independiente de la concentración de Ig intacta, pero, en cambio, sí es dependiente de la supresión de la Ig policlonal no tumoral. De hecho, los pacientes tienen un peor pronóstico si presentan una mayor supresión. Lo que determina el resultado es la Ig de fondo, la supresión en el nicho de la médula ósea. El valor pronóstico es específico del isotipo: se aplica a la IgG en pacientes con MM tipo IgG y a la IgA en pacientes con MM tipo IgA. En cambio, no se aplica a la Ig no isotipo (la supresión de IgA en los pacientes con MM tipo IgG no tiene valor pronóstico, ni tampoco lo tiene la supresión de IgG en los pacientes con MM tipo IgA). Por último, en el mismo estudio se evaluó el valor pronóstico de Hevylite® en comparación con otros marcadores pronóstico para el mieloma, como algunas alteraciones genéticas (Del_13, T4_14, Del_17p), la β -2 microglobulina, la albúmina y las CLL en suero. En un análisis univariable se encontraron varios factores pronósticos significativos, particularmente la β -2 microglobulina, pero en un análisis multivariable sólo dos factores mantuvieron la significación: la β -2 microglobulina ($> 3,5$ mg/l) y, muy en particular, los terciles de la ratio Hevylite®³⁰.

FIGURA 13

Evolución de la ratio Hevylite® en 338 pacientes con mieloma múltiple³⁰

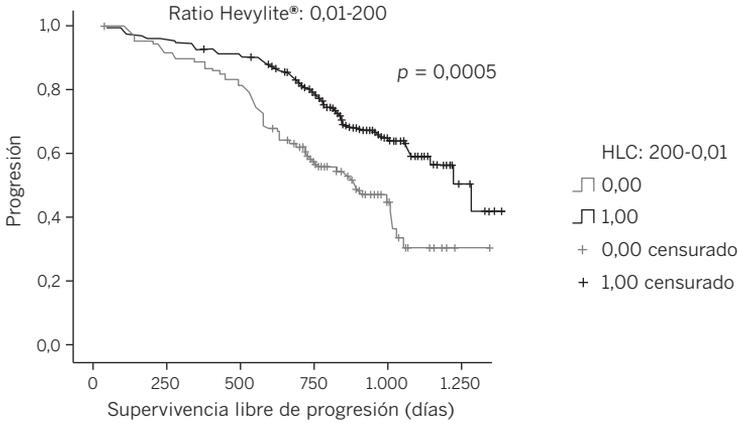
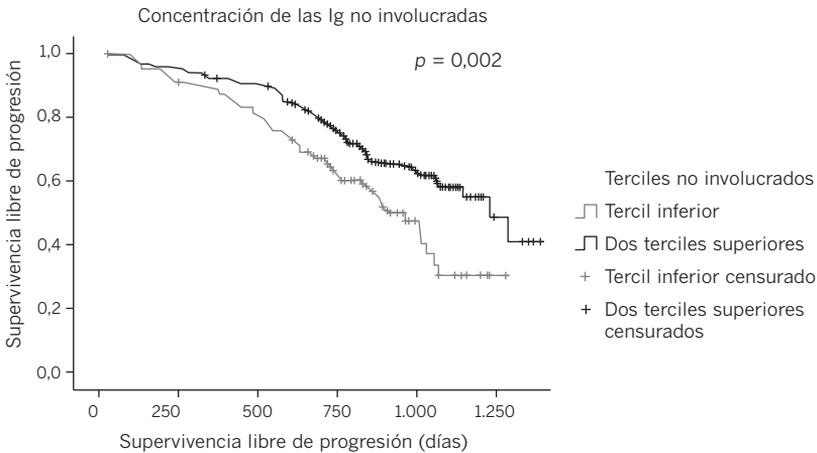


FIGURA 14

Correlación entre la progresión libre de enfermedad y la ratio Hevylite®³⁰



En conclusión, el ensayo de Hevylite® proporciona una cuantificación más precisa que la SPE y la IFE durante la monitorización del MM –en especial, en los casos y situaciones en los que hay concentraciones de la Ig monoclonal bajas– y tiene el potencial de ser un factor pronóstico de mayor potencia que los marcadores actuales.

..... REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Graham PM, et al. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem* 2001;47:673-80.
2. Drayson M, Carr-Smith H. Letter to the Editor: Clinical comparison of new monoclonal antibody-based nephelometric assays for free light chain κ and λ to polyclonal antibody-based assays and immunofixation electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50:587-8.
3. Barbosa-de-Carvalho N, Campos M. Identificación de cadenas ligeras libres en suero y su aplicación en las gammopatías monoclonales. *Hematología* 2010;11(4):199-207.
4. Bradwell AR. Serum Free Light Chain Analysis (plus Hevylite). 6th edition. Birmingham, UK: The Binding Site Ltd; 2010.
5. Katzmann JA. Screening panels for monoclonal gammopathies: time to change. *Clin Biochem Rev* 2009;30:105-11.
6. Katzmann JA, Kyle RA, Benson J, et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009;55:1517-22.
7. Fulton RB, Fernando SL. Serum free light chain assay reduces the need for serum and urine immunofixation electrophoresis in the evaluation of monoclonal gammopathy. *Ann Clin Biochem* 2009;46:407-12.
8. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215-24.
9. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood* 2012.doi:10.1182/blood-2012-01-405985.
10. Hutchison CA, Plant T, Drayson M, et al. Serum free light chain measurement aids the diagnosis of myeloma in patients with severe renal failure. *BMC Nephrol* 2008;9:11.
11. Hutchison CA, Batuman V, Behrens J, et al. The pathogenesis and diagnosis of acute kidney injury in multiple myeloma. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8:43-51.
12. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 2010;24:1121-7.
13. López-Corral L, García-Sanz R, San Miguel JF. Value of serum free light chains assay in plasma cell disorders. *Med Clin* 2010;135:368-74.
14. Durie BGM, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467-73.
15. British Society for Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of AL amyloidosis. *Br J Haematol* 2004;125:681-700.
16. Gertz MA, Comenzo R, Falk RH, et al. Definition of organ involvement and treatment response in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL): a consensus opinion from the 10th International Symposium on Amyloid and Amyloidosis, Tours, France, 18-22 April 2004. *Am J Hematol* 2005;79:319-28.
17. Comenzo RL, Reece D, Palladini G, et al. Consensus guidelines for the conduct and reporting of clinical trials in systemic light-chain (AL) amyloidosis. *Leukemia* 2012 Apr 5. doi: 10.1038/leu.2012.100. [Epub ahead of print]
18. Hutchison CA, Blade J, Cockwell P, et al. Novel approaches for reducing free light chains in patients with myeloma kidney. *Nat Rev Nephrol* 2012;8:234-43.
19. Bradwell AR, Harding SJ, Fourrier NJ, et al. Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurement of individual immunoglobulin κ/λ ratios. *Clin Chem* 2009;55:1646-55.
20. Bradwell AR, Mead G, Drayson MT, et al. Separate nephelometric immunoassays for IgA κ and IgA λ for the assessment of patients with multiple myeloma (MM). *Clin Chem* 2008;54:C116a.
21. Fourrier NJ, Sharp K, Walsh P, et al. Nephelometric immunoassay measurements of IgM κ and

- IgM λ for the assessment of patients with IgM monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2010;56:C120a.
22. Mirbahai L, Fourrier NJ, Harper J, et al. Monoclonal IgA proteins migrating into the β region of serum protein electrophoresis gels can be easily identified and quantified using IgAk and IgA λ measurements. *Clin Chem* 2011;57:C-64a.
 23. Donato LJ, Zeldenrust SR, Murray DL, Katzmann JA. A 71-year-old woman with multiple myeloma status after stem cell transplantation. *Clin Chem* 2011;57:164-58.
 24. Seetharam A, Lovatt T, Macwhannel A, et al. Immunoglobulin ratios are a rapid, sensitive alternative to immunofixation for the identification of monoclonal proteins. *Clin Chem* 2011;57:A64a.
 25. Alexanian R. Blood volume in monoclonal gammopathy. *Blood* 1977;49:301-7.
 26. Kim J, Hayton WL, Robinson JM, Anderson CL. Kinetics of FcRn-mediated recycling of IgG and albumin in human: pathophysiology and therapeutic implications using a simplified mechanism-based model. *Clin Immunol* 2007;122:146-55.
 27. Akilesh S, Christianson GJ, Roopenian DC, Shaw AS. Neonatal FcR expression in bone marrow-derived cells functions to protect serum IgG from catabolism. *J Immunol* 2007;179:4580-8.
 28. Anderson CL, Chaudhury C, Kim J, et al. Perspective-- FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. *Trends Immunol* 2006;27:343-8.
 29. Harding SJ, Drayson M, Lachmann H, et al. Analysis of the involved IgG κ /IgG λ ratios may give a more sensitive measure of response to treatment in multiple myeloma. *Haematologica* 2008;93:662a.
 30. Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Moreau P, et al. Heavy/light chain specific immunoglobulin ratios at presentation are prognostic for progression free survival in the IFM 2005-01 Myeloma Trial. *Blood* 2009;114:1818a.

Determinación de cadenas ligeras libres en suero (Freelite®) en el diagnóstico, el pronóstico y la monitorización de las gammapatías monoclonales. Aplicaciones emergentes de Freelite® en pacientes con esclerosis múltiple

Luisa María Villar Guimerans

*Facultativa Especialista, Área del Servicio de Inmunología,
Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid*

DETERMINACIÓN DE CADENAS LIGERAS LIBRES EN SUERO (FREELITE®) EN EL DIAGNÓSTICO, EL PRONÓSTICO Y LA MONITORIZACIÓN DE LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

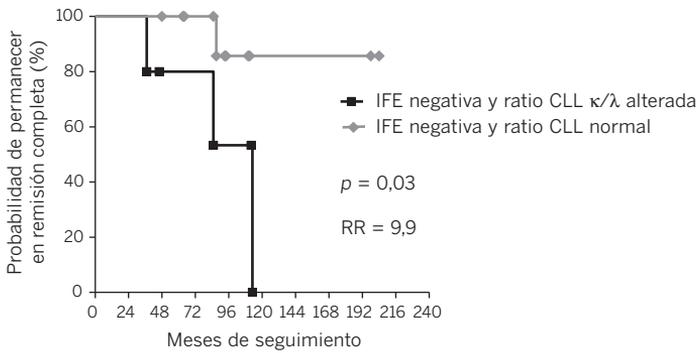
A pesar de que a día de hoy existen evidencias suficientes para recomendar el ensayo Freelite® en el cribado, el pronóstico y la monitorización de las gammapatías monoclonales (GM)¹⁻³, en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Ramón y Cajal se han evaluado dos de las recomendaciones vigentes al respecto con el objeto de validar su utilidad en el seguimiento de nuestros pacientes. Por un lado, hemos evaluado el concepto de «remisión completa estricta», dado a conocer en 2006 por el International Myeloma Working Group [IMWG]³ y todavía no validado. Por otro, hemos evaluado la utilidad del ensayo de cadenas ligeras libres (CLL) en suero para la estratificación de pacientes con GM de significado incierto (GMSI), una recomendación que estaba basada en un único estudio realizado en la Clínica Mayo en 2005⁴.

Validación del concepto de remisión completa estricta

En el año 2006, el IMWG incorporó una nueva categoría de respuesta al tratamiento que se calificó como «remisión completa estricta» (RCE). Esta respuesta exige, además de la negativización de la electroforesis de inmunofijación (IFE), la ausencia de células plasmáticas clonales en medula ósea y la normalización de la ratio CLL κ/λ ³. Por lo tanto, según la nueva propuesta, dicha ratio debería medirse en todos los pacientes con mieloma múltiple (MM) que alcanzan una remisión completa con IFE negativa, a fin de definir si se ha alcanzado una mayor calidad de la respuesta. Cabe señalar, no obstante, que estos criterios no estaban formalmente validados y que en algunos estudios se ponía en duda la validez de esta nueva categoría de respuesta al tratamiento. Para estudiar este tema, nuestro Servicio de Inmunología del Hospital Ramón y Cajal, junto con el Servicio de Hematología, evaluó a un grupo de 16 pacien-

FIGURA 1

Papel de la ratio de cadenas ligeras libres κ/λ como predictor de recaídas en pacientes con mieloma múltiple en remisión completa



CLL: cadenas ligeras libres; IFE: electroforesis de inmunofijación; RR: riesgo relativo.

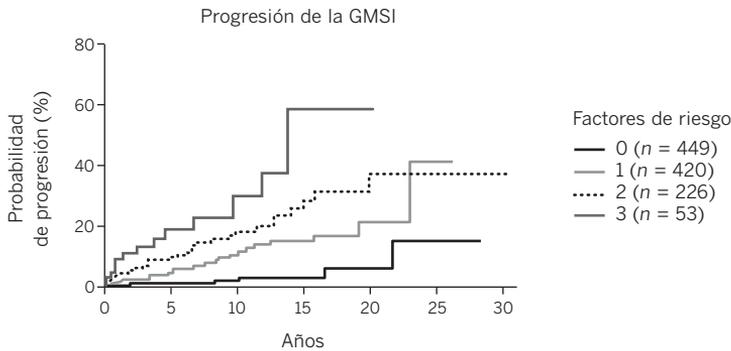
tes con MM (11 con MM tipo IgG y 5 con MM tipo IgA) que habían alcanzado una remisión completa con IFE negativa. El seguimiento de estos pacientes se efectuó durante 86 ± 44 meses (rango: 57-204). El 69% de ellos presentaron, al alcanzar la remisión completa, una ratio κ/λ normalizada, cumpliendo los requisitos de la RCe, mientras que en el 31% restante esta ratio estaba alterada. Más del 80% de los pacientes que habían alcanzado una RCe se mantuvieron libres de recaídas casi 18 años después de haber alcanzado la remisión completa, mientras que todos los pacientes que presentaban una ratio κ/λ alterada tuvieron recaídas en un período de aproximadamente 10 años (Figura 1). De estos datos, deducimos que el criterio de RCe es muy útil para discriminar el riesgo de recaída en pacientes con MM que han alcanzado una remisión completa con IFE negativa.

Validación del valor pronóstico de la determinación de cadenas ligeras libres en suero en pacientes con gammopatía monoclonal de significado incierto

El valor predictivo de la determinación de CLL en suero se extiende a la mayoría de las GM. Aunque la relación entre este parámetro y la patogenicidad todavía no esté clara, hay indicios de que los niveles elevados de CLL en suero podrían estar relacionados con translocaciones del *locus* IgH⁵ y con una carga tumoral elevada^{6,7}. La GMSI es la GM más común, con una prevalencia del 3,2% en los individuos mayores de 50 años de edad. Alrededor del 1% de estos pacientes progresan cada año a alguna patología grave, como la amiloidosis (AL) o el MM⁸. Entre el 33 y el 44% de los pacientes con GMSI tienen valores de CLL en suero alterados en el momento del diagnóstico, habiéndose demostrado que presentan un mayor riesgo de progresión a MM sintomático⁴. El modelo clásico de estratificación de riesgo para los pacientes con GMSI utilizaba como

FIGURA 2

Modelo de estratificación de riesgo en pacientes con gammopatía monoclonal de significado incierto



Los tres factores de riesgo incluidos son: 1) ratio CLL κ/λ alterada ($< 0,26$ o $> 1,65$), 2) proteína monoclonal > 15 g/l y 3) GMSI no-IgG.

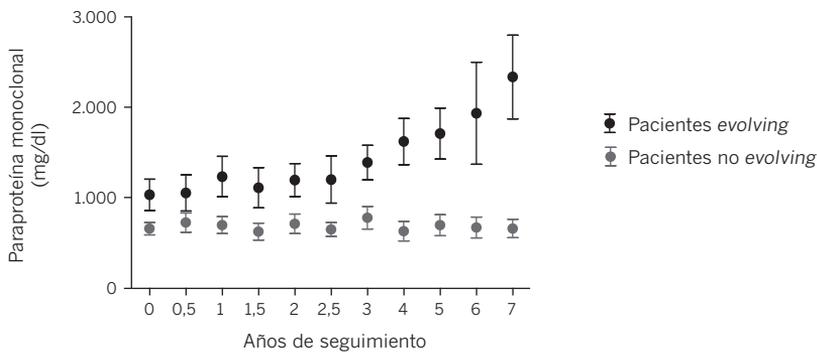
CLL: cadenas ligeras libres; GMSI: gammopatía monoclonal de significado incierto.

parámetros la cantidad de proteína monoclonal (PM) en suero (hay mayor riesgo si la PM es $> 1,5$ g/dl) y el isotipo de la inmunoglobulina monoclonal (hay mayor riesgo si el isotipo es distinto de IgG)⁹. Cuando se incorporó a este algoritmo la ratio CLL κ/λ , se observó que el riesgo de progresión a MM a 20 años era del 5, el 21, el 37 y el 58%, respectivamente, según el paciente tuviera 0, 1, 2 o 3 factores de riesgo¹⁰ (Figura 2). Por otra parte, se ha establecido que la variación de la PM a lo largo del tiempo también es un factor predictivo en las GMSI. Así, si bien en la mayoría de los casos los niveles de PM se mantienen estables (no *evolving*), hay algunos pacientes que presentan un aumento progresivo de los mismos a lo largo del tiempo (*evolving*)^{11,12} y en los que existe un mayor riesgo de progresión a MM.

En el Hospital Ramón y Cajal nos propusimos validar el modelo de estratificación de riesgo en 67 pacientes que recibieron el diagnóstico de GMSI entre 1997 y 2005. El tiempo medio de seguimiento fue de $5,87 \pm 2,06$ años. En el momento del diagnóstico, 58 pacientes presentaban una Ig monoclonal tipo IgG, 48 tenían una PM $< 1,5$ g/dl y 42 mostraban valores normales de la ratio κ/λ (0,26-1,65). Durante el seguimiento, los pacientes fueron clasificados según los cambios en la PM en no *evolving* ($n = 53$) y *evolving* ($n = 14$); en estos últimos se constató un aumento progresivo de la PM, sobre todo a partir de los dos años posteriores a la fecha de su diagnóstico (Figura 3). Dentro de este grupo se encontraban los dos pacientes que progresaron a MM durante el seguimiento. Esto confirmó los hallazgos previos que asociaban el fenotipo *evolving* a un riesgo aumentado de conversión a MM¹¹. Con el objeto de poder diferenciar a los pacientes *evolving* de los no *evolving* ya en el momento del diagnóstico, estudiamos en

FIGURA 3

Pacientes con GMSI con fenotipo *evolving* y no *evolving*



Dos pacientes progresaron a mieloma durante el seguimiento (5,65 y 6,5 años). Ambos mostraron aumento progresivo de la paraproteína en los años anteriores a la progresión.

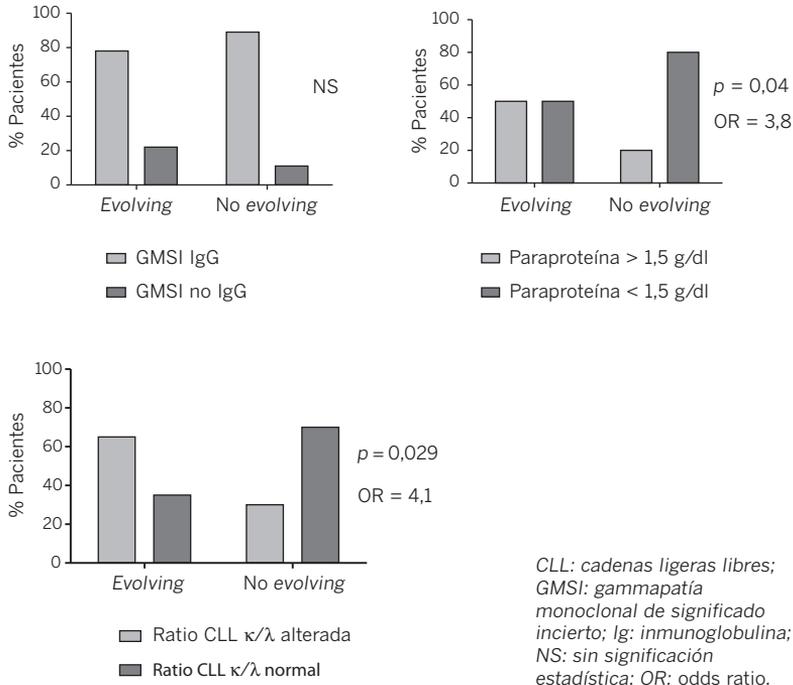
ambos grupos los factores de riesgo recomendados en el consenso del IMWG para el manejo de pacientes con GM asintomáticas^{2,4}. En relación con el isotipo de la Ig monoclonal (IgG frente a no IgG), se observó que, en el grupo de los pacientes *evolving*, el doble de los sujetos presentaban una Ig monoclonal diferente de la IgG, aunque el resultado no tuvo la suficiente potencia estadística para considerarlo significativo. Sin embargo, en relación con los otros factores de riesgo, se constató que en el grupo *evolving* había una mayor proporción, estadísticamente significativa, tanto de pacientes con PM > 1,5 g/dl como de pacientes con una ratio CLL κ/λ alterada (Figura 4). Estos resultados corroboran que, en los pacientes con GMSI, los niveles elevados de PM (> 1,5 g/dl) y la ratio CLL κ/λ alterada (rango normal: 0,26-1,65) se asocian a una mayor probabilidad de conversión a MM y son marcadores independientes de mal pronóstico.

APLICACIONES EMERGENTES DEL ENSAYO DE CLL EN SUERO FREELITE® EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE: VALOR DEL «ÍNDICE κ » EN LA PREDICCIÓN DE CONVERSIÓN DE SÍNDROMES CLÍNICAMENTE AISLADOS A ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central y constituye, después de los accidentes de tráfico, la causa más importante de discapacidad en adultos jóvenes. Se caracteriza por cursar con inflamación, desmielinización y daño axonal. En la mayoría de los casos se presenta como un síndrome neurológico clínicamente aislado, aunque conviene tener en cuenta que muchos pacientes presentan síndromes de este tipo que son autolimitados y, por consiguiente, no acaban desarrollando la enfermedad¹³. Por esta razón, es muy importante encontrar biomarcadores que puedan predecir la conversión a EM, especialmente si se tiene en cuenta que

FIGURA 4

Pacientes *evolving* y no *evolving* en nuestro estudio, según los tres criterios recomendados por el International Myeloma Working Group

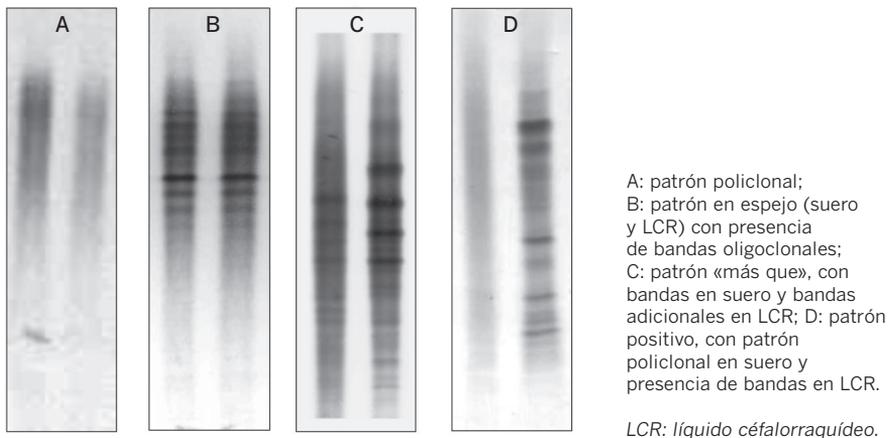


los pacientes en esta situación pueden recibir un tratamiento que no sólo retrase tal conversión, sino también que, una vez que la enfermedad está establecida, mejore su evolución. Además, se ha demostrado que el retraso en el inicio del tratamiento nunca se recupera y que estos pacientes, aunque sean tratados posteriormente, siempre evolucionarán claramente peor^{14,15}.

Actualmente, las bandas oligoclonales (BOC) constituyen el mejor biomarcador para predecir la conversión a EM. Se han definido cuatro «patrones clásicos de BOC» para las IgG: 1) patrón policlonal, 2) patrón en espejo, 3) patrón «más que» y 4) patrón positivo (Figura 5). Sin embargo, cuando no se utilizan técnicas de alta sensibilidad, puede resultar difícil identificar con certeza el patrón «más que», lo que hace que en algunos casos haya resultados dispares respecto al valor pronóstico de esta técnica. De allí que sea tan importante encontrar otros marcadores que se asocien a la síntesis intratecal de IgG y cuya detección se pueda automatizar, de modo que se facilite su hallazgo en laboratorios asistenciales que no tengan una gran experiencia con este tipo de técnicas.

FIGURA 5

Patrones de bandas oligoclonales de las inmunoglobulinas G



Dado que las cadenas ligeras se secretan en paralelo con la Ig completa, se ha valorado su utilidad como marcadores de diagnóstico temprano de la EM. Con tal objetivo, en el Hospital Ramón y Cajal se estudió de forma prospectiva a 112 pacientes con un diagnóstico de síndrome neurológico aislado. Se midieron los niveles de CLL, de albúmina y de IgG en suero y en líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante nefelometría y se calcularon los índices de IgG- κ y de IgG- λ , que se utilizan para determinar la síntesis intratecal de una determinada Ig. Estos índices se calculan en función del cociente entre la inmunoglobulina en LCR y en suero, que se corrige dividiéndolo por el cociente entre la albúmina en LCR y en suero, como se expone en la siguiente fórmula:

$$\text{Índice X} = \frac{\text{X en LCR} : \text{X en suero}}{\text{albúmina en LCR} : \text{albúmina en suero}}$$

Este cálculo permite discriminar la Ig que se produce intratecalmente de la que se debe al daño de la barrera hematoencefálica. Los valores normales de los índices de CLL se calcularon en 20 pacientes con cefaleas no específicas y se consideraron como normales aquellos que presentaban un índice de CLL- κ («índice κ ») < 9 (media + 2,6 desviaciones estándar [DE]) (Figura 6). Se estudió la presencia de BOC de IgG por nefelometría e inmunodetección. Los pacientes fueron seguidos durante un tiempo medio de $30,4 \pm 2,6$ meses. Los resultados se analizaron mediante las pruebas de Kaplan-Meier y U de Mann-Whitney (Tabla 1). Durante el seguimiento, 38 pacientes tuvieron una conversión a EM. En cuanto al resto de los pacientes, que no tuvieron conversión a EM, 38 presentaban BOC de IgG positivas y por lo menos dos lesiones en T2 en la resonancia magnética –lo cual, según se ha descrito, implica una alta probabilidad de conversión a EM¹⁶–, mientras que otros 36 tenían BOC negativas y, por

FIGURA 6

«Índice κ» en 20 pacientes con cefalea no específica

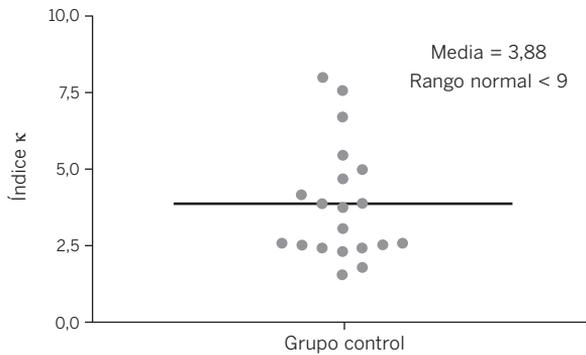


TABLA 1

Características demográficas, clínicas e inmunológicas de los pacientes con síndromes neurológicos aislados clasificados según el «índice κ»

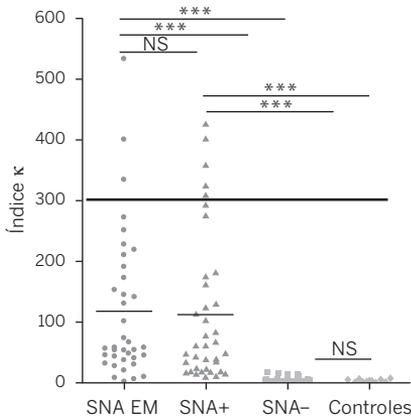
Parámetro	«Índice κ» < 9 (n = 31)	«Índice κ» > 9 (n = 79)	p
Media de edad de inicio	32,11 ± 2,22	30,57 ± 1,13	NS
Género (M/F)	10/21	21/58	NS
Bandas de IgG oligoclonales (+/-)	1/30	72/6	< 0,0001
Criterios de RM de Barkhof-Tintoré (+/-)	3/28	32/47	0, 0014
Índice de IgG	1,01 ± 0,1	0,51 ± 0,02	< 0,0001

Ig: Inmunoglobulina; NS: sin significación estadística; RM: resonancia magnética.

lo tanto, una muy baja probabilidad de progresión a EM¹⁷. Los dos primeros grupos presentaron un índice κ considerablemente más alto ($p < 0,0001$) en comparación con el grupo con BOC negativas, en el que los valores de este índice fueron similares a los del grupo control. Estos resultados demuestran que el índice κ es una herramienta útil para predecir la conversión de síndrome neurológico aislado a EM (Figuras 7 y 8). Finalmente, se estudió la concordancia entre las BOC de IgG y el índice κ, hallándose una alta concordancia (92,72%) entre presencia de BOC de IgG e índices κ elevados, mientras que la concordancia entre presencia de BOC e índices de IgG ele-

FIGURA 7

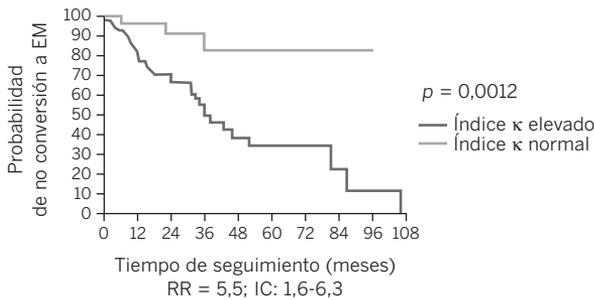
Asociación entre el «índice κ» y la evolución a esclerosis múltiple en pacientes con síndromes neurológicos aislados



EM: esclerosis múltiple; NS: sin significación estadística; SNA: síndromes neurológicos aislados; SNA EM: SNA que evolucionaron a EM; SNA+: SNA con alta probabilidad de conversión a EM; SNA-: SNA con baja probabilidad de conversión a EM.

FIGURA 8

Probabilidad de conversión a esclerosis múltiple en pacientes con síndromes neurológicos aislados clasificados según su «índice κ»



EM: esclerosis múltiple; IC: intervalo de confianza; RR: riesgo relativo.

TABLA 2

Concordancia de los índices cualitativos y cuantitativos

Parámetro	BOC positivas (n = 73)	BOC negativas (n = 37)	Concordancia (%)
«Índice κ» (+/-)	72/1	6/31	92,72
Índice IgG (+/-)	45/28	1/36	41,82

BOC: bandas oligoclonales.

vados fue mucho menor (41,82%). Estos datos muestran que el índice κ puede ser un biomarcador útil para predecir la conversión de los pacientes con síndromes neurológicos aislados a EM (Tabla 2).

..... REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23: 215-24.
2. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 2010;24:1121-7.
3. Durie BGM, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467-73.
4. Rajkumar SV, Dispenzieri A, Fonseca R, et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2005;106:812-7.
5. Kumar S, Fonseca R, Dispenzieri A, et al. High incidence of IgH translocations in monoclonal gammopathies with abnormal free light chain levels. *Blood* 2006;108:3514a.
6. Dispenzieri A, Lacy MQ, Katzmann JA, et al. Absolute values of immunoglobulin free light chains are prognostic in patients with primary systemic amyloidosis undergoing peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2006;107: 3378-83.
7. van Rhee F, Bolejack V, Hollmig K, et al. High serum-free light chain levels and their rapid reduction in response to therapy define an aggressive multiple myeloma subtype with poor prognosis. *Blood* 2007;110:827-32.
8. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006; 354:1362-9.
9. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 2006;134:573-89.
10. Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Moreau P, et al. Heavy/light chain specific immunoglobulin ratios at presentation are prognostic for progression free survival in the IFM 2005-01 Myeloma Trial. *Blood* 2009;114:1818a.
11. Bladé J. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006;355: 2765-70.
12. Rosiñol L, Cibeira MT, Montoto S. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: predictors of malignant transformation and recognition of an evolving type characterized by a progressive increase in M protein size. *Mayo Clin Proc* 2007;82:428-34.
13. Dalton CM, Brex PA, Miszkiel KA, et al. Application of the new Mc-Donald criteria to patients with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2002;52:47-53.
14. Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, et al. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343:898-904.
15. Comi G, Filippi M, Barkhof F, et al. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet* 2001;357:1576-82.
16. Villar LM, García-Barragán N, Sádaba MC, et al. Accuracy of CSF and MRI criteria for dissemination in space in the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2008;266:34-37.
17. Masjuan J, Alvarez-Cermeno JC, Garcia-Barragan N, et al. Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology* 2006;66:576-8.

Protocolos de interacción consensuados en gammapatías monoclonales

Joaquín Martínez López

Grupo Español de Mieloma.

Jefe de la Sección de Hematología,

Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

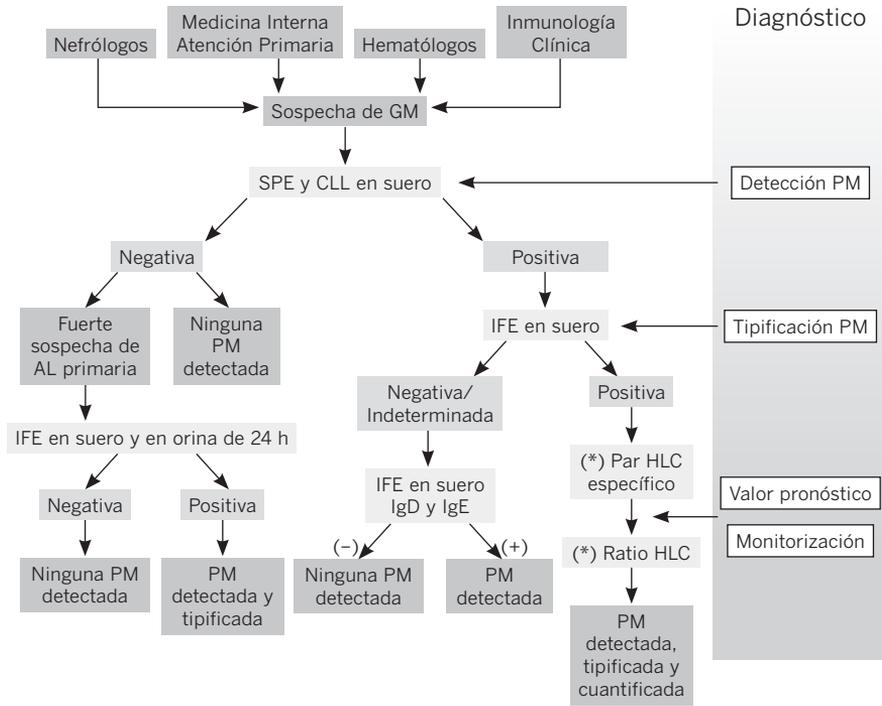
Las gammapatías monoclonales (GM) constituyen un grupo muy heterogéneo de enfermedades cuyo diagnóstico en muchos casos conlleva gran dificultad, por lo que cualquier avance en este terreno es bienvenido. En los últimos años ha aparecido un nuevo grupo de técnicas para el estudio de las inmunoglobulinas (Ig) basadas en la nefelometría/turbidimetría y que son relativamente simples. Con el apoyo de la evidencia existente, un panel de expertos del International Myeloma Working Group (IMWG) ha establecido una guía de consenso que define el papel del estudio de las cadenas ligeras libres (CLL) en suero en el diagnóstico, el pronóstico y el seguimiento de las GM¹.

Según este consenso, en el protocolo de cribado de las GM se debe incluir, junto a la electroforesis de proteínas en suero (SPE), el estudio de las CLL en suero (Figura 1). Con este cambio, el estudio de la proteinuria de Bence Jones en este primer paso del cribado se hace casi innecesario, si bien, una vez detectadas las proteínas monoclonales en suero, las guías recomiendan la realización de una electroforesis de proteínas y de una electroforesis de inmunofijación (IFE) en orina de 24 horas. En pacientes con amiloidosis (AL), si todas las pruebas séricas son negativas, se debe realizar una IFE en orina de 24 horas.

Además, el estudio de las CLL en suero aporta su valor pronóstico en las GM asintomáticas, en el mieloma múltiple (MM) y en la AL. Finalmente, sobre la base de un nivel de evidencia más bajo, se considera que la normalización del valor de las CLL en suero tras el tratamiento del MM constituye un parámetro indispensable de la recientemente definida «remisión completa estricta» (RCe)² y, por lo tanto, tiene una importancia pronóstica.

Más recientemente, se ha desarrollado una nueva prueba para el estudio de los pares específicos de cadena pesada/cadena ligera (HLC) de Ig (Hevylite[®]), que permite iden-

FIGURA 1
Protocolo recomendado por el IMWG en el cribado de las gammapatías monoclonales^{1,2}



* La inclusión del estudio de HLC y de la ratio HLC en el protocolo de cribado de las GM está pendiente de que se alcance un consenso por los grupos de trabajo internacionales, como el IMWG o el National Comprehensive Cancer Network (NCCN) de EEUU.

AL: amiloidosis; CLL: cadenas ligeras libres; GM: gammapatía monoclonal; HLC: pares específicos de cadena pesada/cadena ligera de Ig; IFE: electroforesis de inmunofijación; Ig: inmunoglobulina; IMWG: International Myeloma Working Group; PM: proteína monoclonal; SPE: electroforesis de proteínas en suero.

tificar y cuantificar el par específico de cadena pesada unido a su correspondiente cadena ligera (IgX-κ/IgX-λ). Como se refiere en los capítulos precedentes, esta nueva prueba es más específica que las tradicionales y también puede tener un valor pronóstico, ya que permite una mejor identificación de los enfermos que probablemente tendrán una buena respuesta al tratamiento. Hemos incluido el estudio de los pares específicos de HLC y la ratio HLC en el apartado de valor pronóstico y monitorización del protocolo de cribado de las GM, aunque cabe señalar que este cambio está pendiente de ser consensuado por los grupos de trabajo internacionales, como el IMWG³ y el National Comprehensive Cancer Network (NCCN)⁴ de EEUU (Figura 1).

..... REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Katzmann JA, Kyle RA, Benson J, et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009;55:1517-22.
2. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215-24.
3. Dimopoulos M, Kyle R, Fermandet JP, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Consensus Panel 3. *Blood* 2011;117:4701-5.
4. Anderson KC, Alsina M, Bensinger W, et al. Multiple Myeloma NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2011;9:1146-83.

Con la colaboración de:

GRIFOLS

5085/1
04/01/13