

## Alternativas inmunoterapéuticas para el tratamiento de la aterosclerosis

Livan Delgado,<sup>1\*</sup> Ana M. Vázquez,<sup>2</sup> Eduardo Fernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, La Lisa. CP: 13 600, La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Departamento de Ingeniería de Anticuerpos, Centro de Inmunología Molecular, Playa, CP: 16040, La Habana 11600, Cuba.

**email:** livan@cieb.sld.cu, ldelgadoroche@gmail.com

La aterosclerosis representa la primera causa de muerte en el mundo occidental. Aunque existen varias hipótesis que explican su patogénesis, una de las de mayor reconocimiento es la hipótesis autoinmune. La activación del sistema inmunológico frente a diferentes estímulos aterogénicos provoca en el organismo una reacción que puede dañar el endotelio vascular y con ello inducir el desarrollo de una lesión aterogénica. El diseño de nuevas estrategias terapéuticas, entre ellas las vacunas, representan una herramienta con resultados promisorios en el tratamiento de la aterosclerosis. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente trabajo se examinó el estado del arte en el campo de la inmunomodulación de esta enfermedad crónica.

**Palabras clave:** Aterosclerosis, inmunoterapia, vacuna, antígenos, anticuerpos.

### Introducción

La aterosclerosis y las complicaciones que de ella se derivan representan la causa más frecuente de muerte en el mundo occidental (1). En Cuba constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad hace varios años, donde la tasa de fallecidos (ajustada por edad) en el año 2010 fue de 187,3 por cada 100 000 habitantes (2).

Esta es una enfermedad vascular crónica que afecta las arterias de mediano y gran calibre, comienza en la vida fetal, progresa lentamente durante la niñez y la adolescencia, y su desarrollo se acelera en la vida adulta (3). Es conocido que en la aterosclerosis, la inflamación, la activación del sistema inmunológico y el estrés oxidativo (EO) desempeñan un papel importante en cada una de sus etapas (4). El desarrollo y progreso de esta patología constituye un reflejo de la deposición de colesterol en la capa íntima de las grandes arterias, especialmente en regiones de bifurcación, debido al flujo hemodinámico turbulento al cual están sometidas (5).

En la aterosclerosis puede existir regresión espontánea de las lesiones en las etapas tempranas, o bien la placa puede permanecer estable y cursar asintomática; sin embargo, una vez que se alcanzan etapas intermedias y avanzadas la progresión suele ser continua.

Las etapas tempranas comienzan con una activación endotelial seguido de la retención de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los proteoglicanos (PG) y su oxidación por parte de las especies reactivas del oxígeno (ERO). Esto provoca reclutamiento leucocitario y la formación

de células espumosas, lo cual da origen a la formación de las estrías grasas. En las etapas avanzadas continúa la acumulación de células espumosas y tiene lugar la formación de un núcleo lipídico bien definido.

También se produce infiltración de otras células del sistema inmunológico, PG extracelulares, así como una acumulación de fibras colágenas y elásticas que forman una capa fibrosa conocida como núcleo fibrótico. Esta capa progresa y provoca remodelación de las células del músculo liso vascular (CMLV). Posteriormente ocurre la calcificación de la placa y la necrosis del tejido, siendo más susceptible a la ruptura, lo cual favorece la ocurrencia de eventos isquémicos y hemorrágicos (6).

Varias hipótesis han sido enunciadas y actualmente entre las de mayor aceptación se encuentran la hipótesis de la oxidación de las LDL (7), la de la respuesta a la retención de las LDL (8), la de respuesta al daño o hipótesis inflamatoria (9) y recientemente se ha enfocado como una enfermedad que posee un importante componente autoinmune (10). Seguidamente centraremos la atención en la hipótesis autoinmune, lo cual permitirá comprender porqué entre las nuevas tendencias en el tratamiento de esta enfermedad se encuentran las vacunas.

### Hipótesis autoinmune de la aterosclerosis

Esta hipótesis tiene sus bases en los eventos de la respuesta inmunológica que tienen lugar ante los diferentes estímulos aterogénicos (10,11). En las lesiones ateroscleróticas se ha podido observar la existencia de complejos de anticuerpos

\* Máster en Farmacología, Aspirante a Investigador.

(Ac), antígenos (Ag) y proteínas del sistema del complemento en el espacio subendotelial, mientras que se han identificado linfocitos B en los bordes de las lesiones (12). También se ha comprobado que las etapas más tempranas de la aterosclerosis se caracterizan por una reacción inmunológica probablemente causada por autoantígenos (autoAg) (13).

En esta etapa es posible identificar linfocitos T presentes en la lesión, incluso, antes que se produzca el desarrollo de la placa (14). Posteriormente se produce una infiltración al espacio subendotelial de células mononucleares, tales como linfocitos T auxiliares CD4+ (Th1), aunque también pueden estar presentes linfocitos CD8+, monocitos, macrófagos y mastocitos (15).

En la aterosclerosis existen auto-Ag primarios como la LDL oxidada (LDL-ox) y las proteínas de estrés térmico (HSP) y secundarios como la  $\beta$ 2-glicoproteína y componentes estructurales de algunos microorganismos (16).

De estos auto-Ag los más estudiados han sido la LDL-ox y las HSP. Estas últimas están presentes en todos los organismos vivos y su función biológica responde a la necesidad de autoprotección celular. Las HSP se localizan en diferentes compartimentos celulares como la mitocondria, el núcleo, el retículo endoplasmático y el citoplasma. Estas proteínas han sido conservadas a través del proceso evolutivo y participan en el recambio, reparación y aclaramiento de proteínas que han sido dañadas o inactivadas, de ahí que se sintetizan en altas concentraciones cerca de regiones donde se produzca estrés celular, como en el endotelio vascular y los procesos inflamatorios (17).

Las HSP protegen las células endoteliales del estrés hemodinámico, el cual afecta la homeostasis vascular. Sin embargo, este intento por salvar a las células puede ser revertido en un proceso totalmente contrario. La presencia en la superficie celular de HSP60/65 constituye una señal para que el sistema inmunitario las reconozca, se active y la célula sea destruida (18).

En la literatura existen evidencias que demuestran el papel antigénico de las HSP en la patogénesis de la aterosclerosis. En conejos suplementados con dietas ricas en colesterol se han podido titular elevados niveles de Ac contra HSP60, 65 y 70; este incremento ocurre probablemente en respuesta al daño endotelial que tiene lugar (19). Por otra parte, se ha comprobado que la presencia de Ac anti-HSP60 en personas jóvenes, posee un valor predictivo sobre la presencia de un desarrollo aterogénico temprano y la ocurrencia de eventos cardiovasculares adversos (20).

Durante la oxidación de las LDL se producen cambios estructurales en las proteínas que las conforman, así como aldehídos reactivos que poseen un elevado poder inmunogénico (21). Se ha observado que existe una interrelación entre las LDL-ox y las HSP, puesto que las

primeras pueden, por sí mismas, desencadenar un aumento de la expresión de HSP por parte de las células endoteliales (10). En el suero de pacientes con ECV de origen aterotrombótico se han podido identificar Ac anti-LDL-ox, así como linfocitos T reactivos contra las LDL-ox (21), los cuales pueden ser utilizados como marcadores clínicos de estas enfermedades.

Por otra parte, las LDL-ox pueden interactuar con proteínas plasmáticas como la  $\beta$ 2-glicoproteína I y favorecer la formación de complejos. La unión de autoAc a estos complejos antigénicos, a nivel vascular provoca la activación del endotelio y una respuesta inmunológica del tipo inflamatoria (22).

Finalmente, otro aspecto que debe destacarse es el hecho de que la inmunidad innata también desempeña un papel fundamental en el proceso aterosclerótico (10). Las células de la inmunidad innata tienen la capacidad de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP).

Las LDL-ox y las HSP forman parte de estos PAMP, por lo cual son capaces de activar las primeras líneas de defensa inmunológica (23). Estos PAMP pueden ser reconocidos por receptores celulares como los RB y los receptores del tipo *toll* (TLR), presentes en la superficie de células presentadoras de Ag (APC), tales como macrófagos, células dendríticas y endoteliales. Estas presentan el Ag a las células T efectoras y estimulan la producción de Ac por parte de linfocitos B (24).

Basados en estas y otras muchas evidencias, varios autores coinciden en que la aterosclerosis cumple con los criterios planteados para definir una enfermedad autoinmune, los cuales son: (i) la existencia de autoAg conocidos (LDL-ox, HSP-60), (ii) la posibilidad de inducir la enfermedad en animales vírgenes con dichos autoAg, (iii) la existencia de autoAc, (iv) el desarrollo de la enfermedad en animales vírgenes a través de una transferencia pasiva de células T provenientes de animales enfermos y (v) la disminución de los síntomas de la enfermedad mediante la inmunomodulación de animales de experimentación con aterosclerosis (25).

### **Terapias inmunomoduladoras**

Basados en el hecho que la respuesta inmunológica adaptativa desempeña un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis (26), varios autores coinciden en que la inmunoterapia podría ser eficaz en el tratamiento de esta enfermedad (10,12).

Una de las estrategias utilizadas ha sido el uso de Ac monoclonales anti-CD3, ellos pueden provocar inmunosupresión, dada la capacidad que tienen de modular la expresión del complejo CD3/receptor de célula T (TCR). Estos Ac han sido utilizados en ratones deficientes de apoproteína E (ApoE<sup>-/-</sup>) y en ratones deficientes en receptores

de LDL (LDLR<sup>-/-</sup>), en los que se ha podido observar un retardo en la progresión de la enfermedad (27).

La modulación de las señales coestimuladoras para la activación de células T, también se ha tomado en cuenta como un posible blanco terapéutico. Por ejemplo, se ha podido observar que la expresión de moléculas coestimuladoras como son CD40 y CD40L, desempeña un papel fundamental en el progreso de la aterosclerosis.

Estas moléculas son expresadas por varias células involucradas en la aterogénesis, tales como células endoteliales, macrófagos, CMLV y linfocitos T (28). El tratamiento con Ac monoclonales anti-CD40L en ratones LDLR<sup>-/-</sup>, suplementados con una dieta rica en colesterol, si bien no redujo el número de linfocitos T y macrófagos en la lesión, sí favoreció la adopción de un fenotipo más estable de la placa (29).

Por otra parte, se ha observado que la administración de Ac anti-CD40L en ratones ApoE<sup>-/-</sup>, no tuvo efectos sobre la talla de la lesión, sin embargo, redujo el contenido de lípidos y fibras colágenas en las mismas (30).

Otro ejemplo de señales coestimuladoras, implicadas en la aterosclerosis, lo constituye la expresión de las moléculas OX40/OX40L, pertenecientes a la familia del TNF y presentes en linfocitos CD4+ y CD8+ activados, células endoteliales y APC. Estudios experimentales en ratones LDLR<sup>-/-</sup> demostraron que el tratamiento con Ac anti-OX40L redujo en un 50% la aparición de lesiones ateroscleróticas (31).

La inmunotolerancia dependiente de células T reguladoras (Treg) ha sido considerada en los últimos años como una terapia promisoriosa (32). La expansión de células Treg ha sido experimentalmente ensayada y se conoce que varias sustancias son capaces de inducir su proliferación como la rapamicina, los anticuerpos monoclonales Anti-CD3 y otras. En animales tratados con estas sustancias se pudo observar una marcada reducción de lesiones ateroscleróticas (27).

Otra de las estrategias ensayadas experimentalmente es la inmunización pasiva con Ac anti-fosforilcolina. En este sentido, se ha demostrado que la administración de la fracción IgM purificada en ratones ApoE<sup>-/-</sup> induce una reducción significativa de la formación de lesiones ateroscleróticas, lo cual demuestra el efecto protector de Ac anti-LDL-ox en este tipo de modelo animal (33).

En tanto, la inmunización pasiva con IgG1 humana recombinante anti-LDL-ox mostró efectos muy positivos en un modelo de aterosclerosis en ratones ApoE<sup>-/-</sup>, donde se pudo constatar que este Ac produjo la regresión de las lesiones, aunque no pudo ser dilucidado el mecanismo responsable de este efecto (34).

La utilización de Acs contra el epitopo oxidado de la LDL, la fosforilcolina, han sido ampliamente utilizados y varios ensayos a nivel preclínico han demostrado su capacidad de evitar la progresión de lesiones ateroscleróticas (33).

La inmunización activa también ha sido ensayada experimentalmente con resultados promisorios a nivel preclínico. Estudios realizados en conejos Nueva Zelanda Blancos, donde se administraron análogos sintéticos de la LDL-ox durante 16 semanas, demostraron que los Ac que se generan son responsables del efecto antiaterogénico observado. Igualmente, ratones ApoE<sup>-/-</sup> inmunizados con MDA/LDL solubilizados en adyuvante completo e incompleto de Freund mostraron una menor aparición de lesiones ateroscleróticas en comparación con los no tratados (35).

Por otra parte, algunos blancos terapéuticos han sido asociados a la expresión de moléculas que se sobreexpresan en condiciones proaterogénicas. En este sentido se han desarrollado estrategias de vacunación contra TIE2, un tipo de receptor celular que, fundamentalmente, se expresa en células endoteliales y está relacionado con procesos de angiogénesis y proaterogénicos.

La inmunización con un plásmido, en el cual se encuentra el gen de esta proteína, redujo significativamente la talla de las lesiones ateroscleróticas en ratones LDLR<sup>-/-</sup> (36).

La modulación de la función de componentes de la respuesta inflamatoria como los neutrófilos también ha sido tomada en cuenta durante los últimos años en la búsqueda de terapias antiateroscleróticas. Varios estudios han ensayado terapias dirigidas a inhibir la unión entre las moléculas de adhesión y los neutrófilos en zonas donde tienen lugar reacciones inflamatorias, como el arco aórtico (37). En este sentido se han utilizado las estatinas y la terapia con lipoproteínas de alta densidad, las cuales han mostrado capacidad de impedir el reclutamiento leucocitario y con ello el desarrollo de lesiones ateroscleróticas (38).

## Conclusiones

Cabe destacar que aunque se han desarrollado diversas estrategias inmunoterapéuticas, muchas de ellas solo han sido ensayadas a nivel preclínico, estudios en humanos serán necesarios para comprobar su eficacia. Además, es muy importante tener en cuenta que la modulación de la respuesta inmunológica deberá ser muy cuidadosa, pues ello puede tener efectos no deseados; sobre todo en el caso de terapias inmunosupresoras, donde existe la probabilidad que aparezcan infecciones oportunistas u otras enfermedades.

## Referencias

1. Paim BA, Velho JA, Castillo RF, Oliveira H, Vercesi AE. Oxidative stress in hypercholesterolemic LDL (low density lipoprotein) receptor knockout mice is associated with low

- content of mitochondrial NADP-linked substrates and is partially reversed by citrate replacement. *Free Radic Biol Med* 2008;44: 444-51.
2. Anuario Estadístico de Cuba. La Habana: Dirección Nacional de Estadística de Cuba; 2010. Disponible en: <http://files.sld.cu/dne/tiles/2011/04/anuario-2010-e-sin-graficos1.pdf>.
  3. Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med* 2002;8:1218-26.
  4. Tavori H, Aviram M, Khatib S, Musa R, Nitecki S, Hoffman A, et al. Human carotid atherosclerotic plaque increases oxidative state of macrophages and low density lipoproteins, whereas paraoxonase (PON1) decreases such atherogenic effects. *Free Radic Biol Med* 2009; 46:607-15.
  5. Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* 2002; 8:1211-27.
  6. Bourlon R A, López M. Aterosclerosis y lesión endotelial: ¿proceso irreversible? *Med Int Mex* 2010;26:590-6.
  7. Steinberg D, Parthasarathy S, Crew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320:915-24.
  8. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:551-61.
  9. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.
  10. Blasi C. The autoimmune origin of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2008;201: 17-32.
  11. Delgado L. Role of the immunological system in the initiation and progression of atherosclerosis. *Pharmacologyonline* 2010; 2: 282-97.
  12. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002; 91:281-91.
  13. Mackay IR, Leskovsek N, Rose NR. Cell damage and autoimmunity: a critical appraisal. *J Autoimm* 2008;30:5-11.
  14. Doherty TM, Fisher EA, Arditi M. TLR signaling and trapped vascular dendritic cells in the development of atherosclerosis. *Trends Immunol* 2006;27:222-7.
  15. Xiao Q, Mandal K, Schett G. Association of serum-soluble heat shock protein 60 with carotid atherosclerosis. *Stroke* 2005; 36:2571-6.
  16. Goncalves I, Nitulescu M, Ares MPS, Nordin G, Jansson B, Li ZC, et al. Identification of the target for therapeutic recombinant anti-apoB-100 peptide antibodies in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 2009;205:96-100.
  17. Van Eden W. Immunoregulation of autoimmune diseases. *Hum Immunol* 2006; 67:446-57.
  18. Kohl J. The role of complement in danger sensing and transmission. *Immunol Res* 2006;34: 157-76.
  19. Knoflach M, Kiechl S, Mayrl B, Kind M, Gaston JSH, van der Zee R, et al. T-cell reactivity against HSP60 relates to early but not advanced atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2007;195:333-8.
  20. Chou MY, Hartvigsen K, Hansen LF, Fogelstrand L, Shaw PX, Boullier SA, et al. Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity. *J Int Med* 2008;263:479-88.
  21. Matsuura E, Kobayashi K, Tabuchi M, López LR. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. *Progr Lipid Res* 2006;45:466-86.
  22. Conrad K, Bachmann MP, Matsuura E, Shoenfeld Y. From animal model to human genetics: research on the induction and pathogenicity of autoantibodies. *Autoimm Rev* 2005; 4:178-87.
  23. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002; 91:281-91.
  24. Den Dekker WK, Chreng C, Pasterkamp G, Duckers HJ. Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization. *Atherosclerosis* 2010; 209:314-20.
  25. Schoenfeld Y. Atherosclerosis as autoimmune condition. *Harefuah* 2001;140:720-2.
  26. Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol* 2010;134(1):33-46.
  27. Steffens S, Burger F, Pelli G, Dean Y, Elson G, Kosco-Vilbois M, et al. Short-term treatment with anti-CD3 antibody reduces the development and progression of atherosclerosis in mice. *Circulation* 2006; 114:1977-84.
  28. Lopes-Virella MF, Virella G. Clinical significance of the humoral immune response to modified LDL. *Clin Immunol* 2010; 134:55-65.
  29. Schonbek U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:7458-63.
  30. Lutgens E, Clentjens KB, Heeneman S, Koteliensky VE, Burkly MJ, Daemen MJ. Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:7464-9.
  31. Wanrooij EJ, Puijvelde GH, Vos P, Yageta H, Berkeld TJ, Kuiper J. Interruption of the Tnfrsf4/Tnfsf4 (OX40/OX40L) pathway attenuates atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:204-10.
  32. Steppich BA, Moog P, Matissek C. Cytokine profiles and T cell function in acute coronary syndromes. *Atherosclerosis* 2007;190:443-51.
  33. Faria-Neto JR, Chyu KY, Li X, Dimayuga PC, Ferreira C, Yano J, et al. Passive immunization with monoclonal IgM antibodies against phosphorylcholine reduces accelerated vein graft atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Atherosclerosis* 2006; 189: 83-90.
  34. Schiopu A, Frendeus B, Jansson B, Soderberg I, Ljungcrantz I, Araya Z, et al. Recombinant antibodies to an oxidized low-density lipoprotein epitope induce rapid regression of atherosclerosis in apobec-1<sup>-/-</sup>/low density lipoprotein receptor mice. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:2313-8.
  35. Chyu KY, Zhao X, Reyes O, Stephanie BM, Dimayuga PC, Yano J, et al. Immunization using an Apo B-100 related epitope

- reduces atherosclerosis and plaque inflammation in hypercholesterolemic apo E (-/-) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:1982-9.
36. Hauer AD, Habets KLL, van Wanrooij EJA, de Vos P, Krueger J, Reisfeld RA, et al. Vaccination against TIE2 reduces atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009; 204:365-71.
37. White CR, Data G, Zhang Z, Gupta H, Garber DW, Mishra VK, et al. HDL Therapy for Cardiovascular Diseases: the Road to HDL Mimetics. *Curr Atheroscler Rep* 2008;10:405-12.
38. Chapman MJ. Therapeutic elevation of HDL-cholesterol to prevent atherosclerosis and coronary heart disease. *Pharmacol Therap* 2006;111:893-908.

---

## **Immunotherapeutical alternatives for the atherosclerosis treatment**

### **Abstract**

Atherosclerosis represents the first cause of death in the western world. Although there are several hypothesis which explain its pathogenesis, one of the most recognized is the autoimmune hypothesis. The activation of the immunological system against different atherogenic stimulus induces a reaction which may affect the vascular endothelium with the consequent atherogenic lesion development. The design of new therapeutic strategies, among them vaccines, represents a tool with promissory result in atherosclerosis treatment. Taking into account these antecedents, in the present work it was examined the state of the art on the immunomodulation of this chronic disease.

**Keywords:** Atherosclerosis, immunotherapy, vaccine, antigens, antibodies.

---

*Recibido: Septiembre de 2011*

*Aceptado: Noviembre de 2011*