



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
USO DE AGONISTAS DE TLRs PARA
MEJORAR LA RESPUESTA INMUNE EN
VACUNAS**

Autor: Elena Barettino Luengo

D.N.I.: 06011374W

Tutor: Víctor Jiménez Cid

Convocatoria: Primera

Índice:

1. Introducción y antecedentes.....	4
1.1. Introducción.....	4
1.1.1. Receptores TLR.....	4
1.1.2. Presentación de antígeno y células dendríticas.....	5
1.2. Antecedentes.....	6
2. Objetivos.....	6
3. Metodología.....	6
4. Resultados y discusión.....	7
4.1. Estrategias basadas en la estimulación de TLR3.....	7
4.1.1. Estimulación de TLR3 en tratamiento del cáncer.....	8
4.1.2. Estimulación de TLR3 en vacuna contra la gripe.....	9
4.2. Estrategias basadas en la estimulación de TLR5.....	10
4.2.1. Estimulación de TLR5 en vacuna contra la malaria.....	10
4.2.2. Estimulación de TLR5 en vacuna contra la gripe.....	11
4.2.3. Estimulación de TLR5 para conseguir inmunidad a nivel de mucosas.....	12
4.3. Otras estrategias.....	13
4.3.1. Otros tipos de inmunoterapia.....	14
5. Conclusiones.....	15

Resumen:

Los receptores TLR (*Toll-Like Receptor*) son proteínas transmembrana presentes en células del sistema inmune innato. Su activación desencadena una respuesta inflamatoria e inmune dirigida a destruir el patógeno y es una pieza decisiva en la maduración de las células presentadoras de antígeno, sirviendo de puente entre la inmunidad innata y la adaptativa.

Esta estimulación del sistema inmune supone que los ligandos de los TLRs puedan tener aplicación como adyuvantes en vacunas. En esta revisión se ha recurrido a fuentes bibliográficas para recopilar la información existente sobre su potencial uso en intervenciones inmunoprolácticas.

Se han examinado estrategias basadas en la estimulación de TLR3 y de TLR5, así como otras estrategias menos estudiadas. Los resultados observados indican que este es un campo prometedor para la investigación y el desarrollo de vacunas más seguras y eficaces.

Abstract:

TLR (Toll-Like Receptors) are membrane-spanning proteins expressed in cells of the innate immune system. Their activation by ligands triggers inflammation and an immune response aimed to destroy the pathogen, and is crucial to the maturation of antigen presenting cells, serving as a link between innate and adaptative immunity.

This stimulation of the immune opens the possibility of using TLR ligands as adjuvants in vaccines. In this review, bibliographic sources were consulted to compile the existing information about their potential use in immunoprophylaxis.

Strategies based on both TLR3 and TLR5 stimulation, as well as others were analyzed. The observed results point out that this is a promising field for research and development of safer and more effective vaccines.

1. Introducción y antecedentes

1.1. Introducción

1.1.1. Receptores TLR

Los receptores TLR (*Toll-Like Receptor*) son proteínas presentes en células del sistema inmune innato, inicialmente descritas en la mosca *Drosophila melanogaster*. Se trata de glicoproteínas transmembrana con la siguiente estructura: una región extracelular que contiene repeticiones ricas en leucina, una región transmembrana y una cola citoplasmática conocida como dominio TIR (*Toll/IL-1 Receptor*).^{1,2}

Los TLRs reconocen específicamente y se unen a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), grupos altamente conservados y de características químicas comunes a ciertos grupos de patógenos. En mamíferos, la familia TLR incluye once proteínas (TLR1-TLR11). Recientemente se han descubierto dos nuevos miembros, TLR12 y TLR13, en células murinas, pero no hay mucha información sobre ellos. Los diferentes TLR actúan como receptores para diversos ligandos (tabla 1). En humanos, los TLR1, 2, 4, 5 y 6 están asociados a membrana externa y responden a PAMPs asociados a la superficie bacteriana. Los TLR 3, 7, 8 y 9 se encuentran en la superficie de los endosomas y responden a PAMPs basados en ácidos nucleicos tanto de virus como de bacterias.³

Receptor	PAMP asociado	Patógeno
TLR 1, 2, 6	Pam3CSK4, PGN, zimosano	Bacterias Gram positivas
TLR 4	LPS, lípido A	Bacterias Gram negativas
TLR 5	Flagelina	Bacterias (flagelo)
TLR 3	dsRNA	Virus
TLR 7, 8	ssRNA	Virus
TLR 9	CpG DNA	Bacterias (DNA)

Tabla 1. Receptores TLR y sus ligandos asociados.

La activación de estos receptores desencadena una respuesta inflamatoria e inmune dirigida a destruir el patógeno. Su activación comienza con la unión del ligando a la región extracelular del TLR. Tras la unión, los receptores TLR activan dos principales vías de señalización: una que requiere la proteína adaptadora MyD88, y otra independiente de MyD88 (fig 1). La principal vía de señalización es la asociada a MyD88, que activa NF- κ B, induciendo la producción de citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-8, TNF-alfa, e IL-12, así como las MAPKs p38 y JNK. La segunda vía, la MyD88-independiente, opera tras la estimulación de TLR3 y 4, llevando también a la activación de NF- κ B y de otro factor, IRF3, permitiendo la inducción de una serie de genes adicionales, entre los que se incluyen genes antivirales como IFN- β .⁴

Los TLR activados aumentan la producción de moléculas co-estimuladoras que se encargan de la estimulación y maduración de células presentadoras de antígeno (APCs).

Cuando el sistema inmune es expuesto a un patógeno, los antígenos son capturados por las APCs que las procesan y presentan a los linfocitos T.²

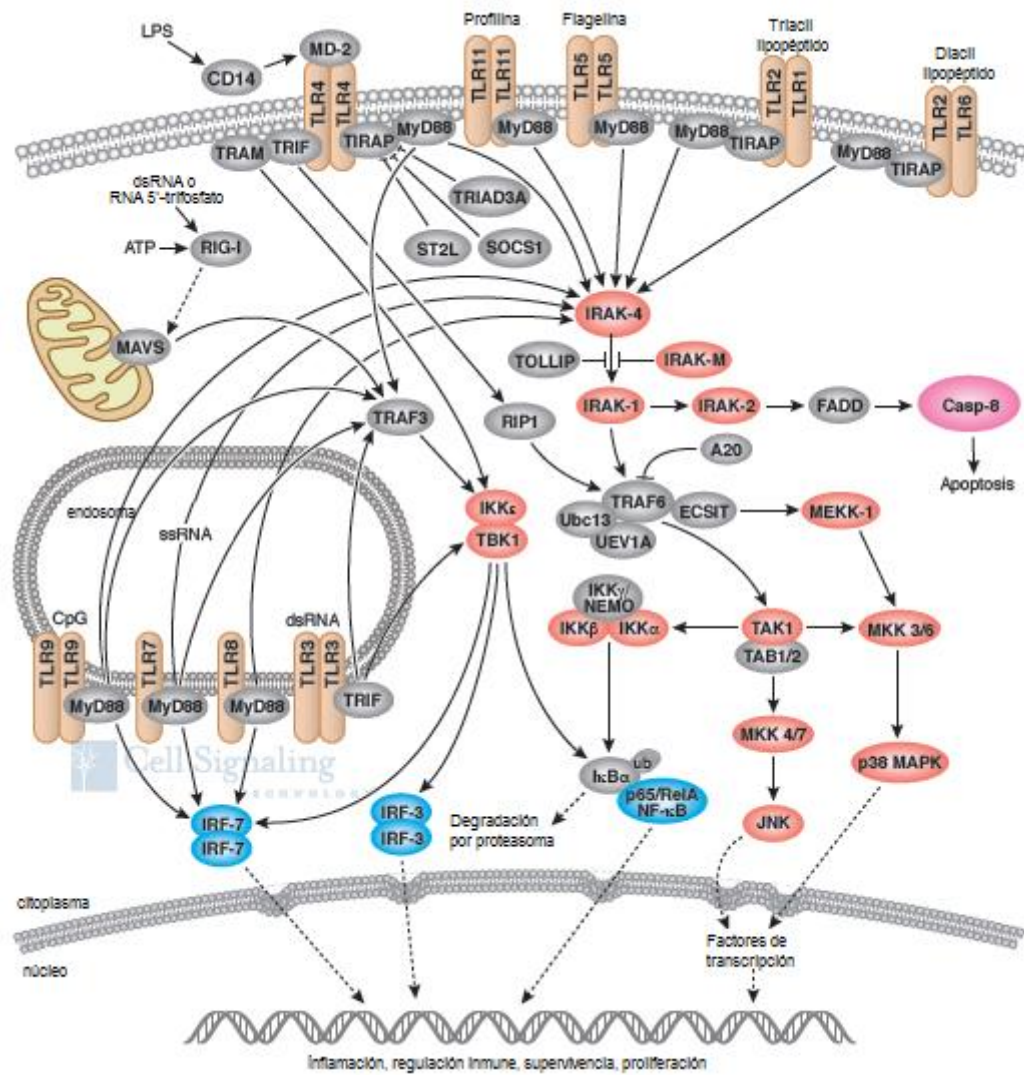


Fig 1. Principales vías de señalización asociadas a TLRs. En naranja aparecen los receptores TLR; en rojo, las quinasas; en rosa, las caspasas y en azul, los factores de transcripción.⁵

1.1.2. Presentación de antígeno y células dendríticas

La presentación de antígeno es un proceso realizado por células presentadoras de antígeno (APCs) del sistema inmune. Consiste en la captura, procesamiento y presentación de antígenos en la superficie de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad o MHC (presentes en esas células). Las células capaces de llevarlo a cabo son las células dendríticas, los linfocitos B y los macrófagos.⁶

Las células dendríticas (DCs) tienen función fagocítica y de presentador profesional de antígeno. Residen principalmente en tejidos superficiales y mucosas, y al incorporar el

antígeno, maduran en un proceso dependiente de las vías de señalización de receptores asociados a PAMPs y migran a órganos linfoides para presentar el antígeno a los linfocitos^{7, 8, 9}.

Cuando las células dendríticas entran en contacto con patógenos como bacterias, parásitos o toxinas, los fagocitan y procesan sus proteínas mediante enzimas lisosomales dando lugar a péptidos más pequeños. Estos péptidos son presentados en la superficie de la célula unidos a las moléculas del MHC. La presentación de este complejo y la secreción de factores de estimulación por parte de las células dendríticas son necesarias para la activación de los linfocitos T^{10, 11, 12}.

La evidencia existente apunta a que los agonistas de receptores TLR pueden ser efectivos como adyuvantes (ingredientes de una vacuna que ayudan a crear una respuesta inmune más potente) para mejorar la respuesta del sistema inmune a los antígenos vacunales. Se usan frecuentemente como adyuvantes en investigación y desarrollo de vacunas. Este posible uso resulta interesante, ya que hay casos en los que los antígenos usados en las vacunas no producen una respuesta inmune protectora por sí solos, ya sea por su composición (fragmentos aislados del patógeno) o por las características del sistema inmune del paciente¹³.

1.2. Antecedentes:

Existen diversas revisiones bibliográficas sobre aspectos concretos de la estimulación del sistema inmune por parte de la activación de los TLR y del uso de los agonistas de dichos receptores como adyuvante en vacunas. Y es debido precisamente a esta abundancia de información disponible sobre este tema que se hace necesario una revisión bibliográfica más general, que aporte una visión global sobre las posibilidades terapéuticas que ofrecen para el futuro.

2. Objetivos

El objetivo de esta revisión bibliográfica es ofrecer un enfoque global que analice las posibilidades que ofrece el uso de agonistas de los TLR como adyuvantes en vacunas en la intervenciones inmunoproliféricas, centrándose especialmente en los usos de la estimulación de los subtipos TLR5 y TLR3, ya que son estos los más estudiados en la literatura encontrada, pero incluyendo también algunos usos individuales encontrados para otros subtipos menos analizados.

3. Metodología

Para esta revisión bibliográfica se ha realizado una búsqueda sistemática de artículos científicos en la base de datos PubMed (NCBI). Se incluyeron artículos introduciendo los términos de búsqueda: “TLR signaling”, “TLR pathways”, “TLR vaccine”, “TLR adjuvant”, “TLR2 vaccine”, “TLR2 adjuvant”, “TLR3 vaccine”, “TLR3 adjuvant”, “TLR4 vaccine”, “TLR4 adjuvant”, “TLR5 vaccine”, “TLR5 adjuvant”, “TLR7 vaccine”, “TLR7 adjuvant”, “TLR8 vaccine”, “TLR8 adjuvant”, “TLR9 vaccine” y “TLR9 adjuvant”.

Además se incluyeron aquellos señalados como relacionados por la propia base de datos o citados en los artículos encontrados que fueran de especial interés.

Como criterio de inclusión, se ha tenido en cuenta la actualidad, usando solo artículos posteriores al año 2000.

Como criterios de exclusión se han tenido en cuenta: el idioma, descartando aquellos que no estuvieran en castellano o inglés; y la relevancia, descartando aquellos en los que la información no estaba relacionada con el tema del trabajo.

Para encontrar información sobre aquellos aspectos básicos sobre los TLR, las enfermedades mencionadas y el sistema inmune que no se trataban en los artículos, se han consultado también libros de microbiología e inmunología.

4. Resultados y discusión

4.1. Estrategias basadas en la estimulación de TLR3

El receptor TLR3 se expresa abundantemente en placenta y páncreas y está restringido a la subpoblación dendrítica de leucocitos. Reconoce RNA de doble cadena, presente en algunos virus. El principal ligando usado en inmunoterapia para este receptor es el Poly (I:C) o ácido poliinosínico-policitidílico^{14, 15, 16}.

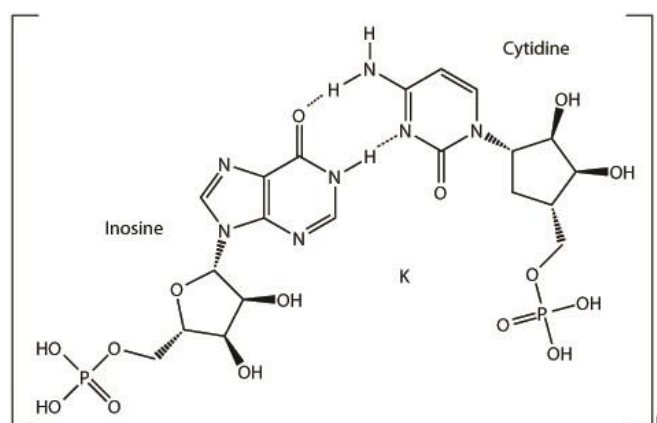


Fig 2. Estructura de Poly (I:C)¹⁷

El Poly (I:C) es un análogo sintético del DNA viral de doble cadena (dsRNA viral). Al unirse al receptor, induce la activación del factor regulador de interferón 3 (IRF3), induciendo el IFN- β y otros interferones de tipo 1 a través de la proteína adaptadora TRIF (también conocida como TICAM-1). También activa una segunda vía que desencadena la producción de citoquinas y quimioquinas inflamatorias a través de factores de transcripción como NF- κ B y AP-14 (fig 3)¹⁹.

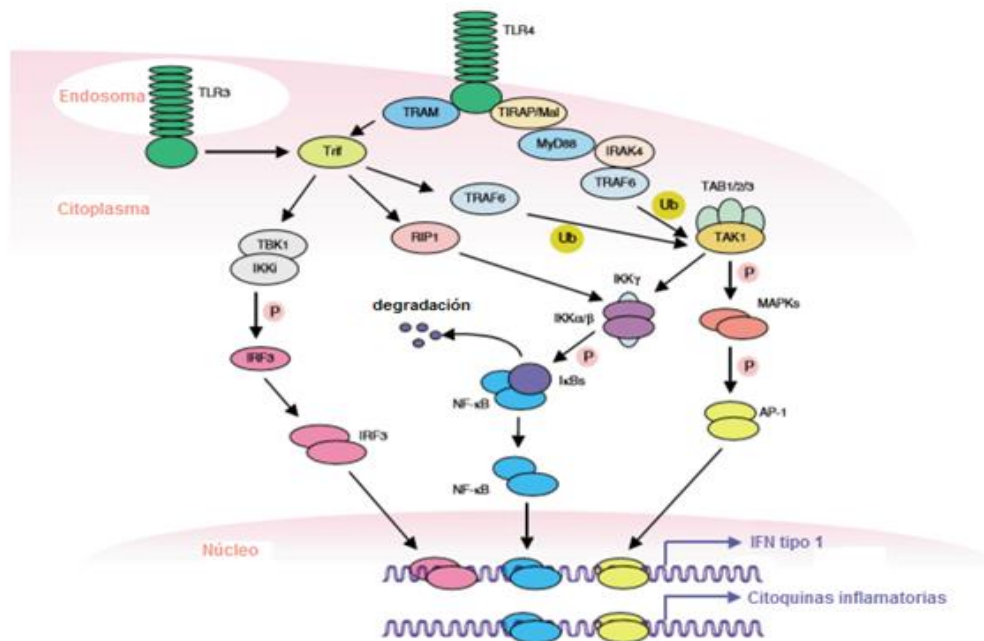


Fig 3. Vía de señalización independiente de MyD88 a partir de TLR3 y TLR4¹⁸.

4.1.1. Estimulación de TLR3 en tratamiento del cáncer

Las células tumorales expresan tanto receptores TLR2 como TLR3. Se ha observado que en muchos casos, la terapia con agonistas de TLR2 conducía a un crecimiento tumoral, pues activaba la vía de señalización dependiente de MyD88 en células tumorales y macrófagos, dando lugar a una respuesta inflamatoria sostenida que producía crecimiento de los tumores y que estos fuesen malignos. En cambio TLR3 se expresa de forma limitada en las células mieloides y epiteliales sanas y su expresión es mayor en células tumorales, por lo que su estimulación no inducía el crecimiento tumoral. Se ha observado que la estimulación de TLR3 en lugar de la vía de señalización dependiente de MyD88, activaba la vía TICAM-1, que induce la muerte celular por necrosis o apoptosis. Debido a esto, los agonistas de TLR3 son un enfoque prometedor en la inmunoterapia antitumoral^{20, 21}.

Un primer estudio²² sobre el uso de agonistas de TLR3 en inmunoterapia antitumoral se centró en el uso de exosomas. Los exosomas son vesículas membranosas originadas a partir de cuerpos intracelulares y secretadas al espacio extracelular por la mayoría de células eucariotas^{23, 24}. Los exosomas originados a partir de DCs (Dexo) contienen componentes importantes inmunológicamente, como antígenos, moléculas del MHC o moléculas co-estimuladoras, y pueden transferir proteínas o ácidos nucleicos de una célula a otra^{25, 26, 27}. El tratamiento de DCs con agonistas de receptores TLR da lugar a Dexo con mayor potencial inmunogénico. Este estudio comparó el efecto del uso de varios agonistas de receptores TLR (LPS para TLR4, Poly (I:C) para TLR3 y CpG-B para TLR9) como adyuvantes en la maduración de DCs durante la producción de exosomas. Al comparar los resultados de la estimulación de DCs con estos ligandos y ovoalbúmina como antígeno modelo, los exosomas generados a partir de la estimulación con Poly (I:C) fueron los que generaron una respuesta inmune antitumoral más robusta y específica. En modelo murino, la vacunación con estos exosomas y un antígeno de células de melanoma resultó en una mejora de la respuesta inmune antitumoral, una disminución del crecimiento tumoral y una mayor tasa de supervivencia en ese grupo²².

Paralelamente, se buscó un agonista de TLR3 que resulte más adecuado que Poly (I:C) en la inmunoterapia contra el cáncer, ya que este provoca una citoquinemia que a las dosis requeridas para eficacia terapéutica puede causar efectos secundarios como artralgia, fiebre, eritema o incluso shock. Se probaron tres análogos de Poly (I:C): Poly (I:C₁₂U), Poly (I:C)LC y cM362-140. Poly (I:C₁₂U) resultó prometedor y fue menos tóxico que otras inmunoterapias, pero existen pocos datos sobre su especificidad. Poly (I:C)LC causó toxicidad usado a dosis terapéuticas, pero fue prometedor combinado con otros adyuvantes para reducir la dosis necesaria. Por último, cM362-140 resultó ventajoso al permitir el uso de dosis más altas sin provocar toxicidad y ser específico²⁸.

También se encontró un estudio centrado en el uso de Poly (I:C₁₂U). Para ello, se usaron DCs inmaduras, linfocitos T y células tumorales de pacientes de cáncer de ovario en estadio avanzado (III-IV). Las DCs que maduraron expuestas a este adyuvante mostraron mayor expresión en superficie de moléculas MHC, moléculas co-estimuladoras y marcadores de activación. Mientras que las DCs no tratadas no produjeron interleucina con actividad antitumoral, las tratadas con el análogo de Poly (I:C₁₂U) sí produjeron una cantidad significativa y un aumento de la actividad citotóxica de los linfocitos T asociados a respuesta antitumoral²⁹.

4.1.2. Estimulación de TLR3 en vacuna contra la gripe

La gripe es un importante problema de salud pública. Se presenta en forma de epidemias estacionales, y aunque en los casos habituales el pronóstico es bueno, en caso de patología previa o estado inmunitario deficiente puede causar complicaciones o incluso la muerte. Por ello es importante la inmunización, especialmente en estas poblaciones más susceptibles a las complicaciones. Sin embargo, esta es complicada, pues existe gran variabilidad de cepas de *Influenzavirus*. Por lo tanto, una vacuna ideal contra la gripe debería generar inmunidad protectora en las poblaciones susceptibles, inmunidad a nivel de mucosas e inmunidad cruzada para varias cepas^{30, 31, 32}.

Se ha estudiado el uso como adyuvante para una vacuna contra el virus H5N1 del análogo de Poly (I:C) Poly(I:C₁₂U). Tras la administración intranasal en modelo murino, se observó un aumento de la secreción de IgG e IgA a nivel sistémico y de mucosas respectivamente, y protección al exponerse los individuos a cepas tanto homólogas como heterólogas del virus^{33, 34}.

También se han estudiado las distintas vías de administración para vacunas basadas en virus H5N1 inactivado y Poly(I:C₁₂U) como adyuvante. Al comparar la administración subcutánea y la intranasal en modelo murino, se observó que solo la vía intranasal consiguió inmunidad a nivel de mucosa, produciendo tanto IgG como IgA, eliminar la carga viral en el tracto respiratorio y generar inmunidad para cepas homólogas y heterólogas del virus. En primates se pudieron observar resultados acordes, siendo la vía intranasal la que producía tanto IgG como IgA, inmunidad a nivel de mucosa, eliminación de la carga viral e inmunidad ante cepas homólogas y heterólogas del virus³⁵.

4.2. Estrategias basadas en la estimulación de TLR5

El receptor TLR5 se expresa tanto en células del sistema inmune como en otras células. El principal agonista de este receptor es la flagelina³⁶.

La flagelina es el principal componente del flagelo bacteriano y un factor de virulencia. Se trata de una proteína globular que polimeriza formando el filamento y es responsable de su forma. Mientras que la porción intermedia es altamente variable, sus regiones terminales están altamente conservadas en las bacterias, facilitando su reconocimiento por TLR5³⁷.

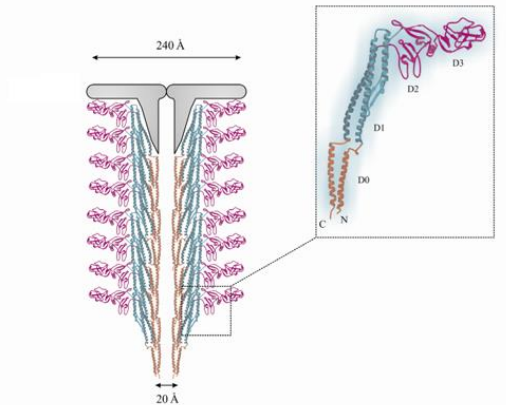


Fig 4. Flagelo de *S Typhimurium* y diagrama de un monómero de flagelina mostrando sus dominios³⁸.

La flagelina extracelular es detectada por TLR5, desencadenando una vía de señalización dependiente de MyD88 que resulta en la activación de NF-κB y la producción de citocinas y óxido nítrico. La flagelina intracelular es detectada por IPAF y activa la producción de interleucinas por la caspasa 1³⁹.

4.2.1. Estimulación de TLR5 en vacuna contra la malaria

La malaria es una enfermedad de gran incidencia y que causa una alta mortalidad, dándose una gran prevalencia en las zonas endémicas. En la actualidad, las posibles vacunas contra esta enfermedad se encuentran en desarrollo, no habiendo todavía una vacuna eficaz disponible⁴⁰.

Se ha ensayado si la estimulación de TLR5 mediante mediante flagelina puede lograr una inmunidad óptima en vacunas basadas en la proteína circumsporozoito (CS), que reviste la forma esporozoito de *P falciparum*, y que sin el uso de adyuvantes no resultan efectivas.

En un primer ensayo se buscó probar la efectividad de vacunas basadas en proteínas recombinantes que contenían flagelina y epítomos de CS. Tras aplicarla en modelo murino por vía subcutánea, se observó que producía una respuesta humoral fuerte, específica y duradera, dependiente de la activación de TLR5 e independiente de otros adyuvantes⁴¹.

En un segundo ensayo, se estudiaron los efectos de vacunas basadas en proteínas recombinantes que contenían flagelina y la proteína CS completa o epítomos de esta proteína seleccionados por su inmunogenicidad. Se encontró que ambas vacunas estimulan TLR5, al observarse in vitro que las dos producían un aumento de la producción de citocinas similar y solo en células que expresan TLR5. Las dos formulaciones provocaron la maduración de DC de forma comparable, y similar también a la que

produce la flagelina sola, de lo que se extrajo que esta es consecuencia principalmente de la estimulación de TLR5. Se comprobó también que aumentaban niveles de IgG, y esta reaccionaba con CS nativa en esporozoitos. Por último, comparando en modelo murino los efectos de la administración por vía intranasal y subcutánea, se observó que los niveles de IgG producidos son comparables y que in vitro, el suero inmune tiene mayor actividad neutralizante de los esporozoitos en el caso de la administración intranasal. Esta ruta es especialmente interesante, ya que reduce costes al eliminar la necesidad de material esterilizado, personal especializado y gestión de residuos biológicos⁴².

También se ha evaluado la efectividad de una vacuna basada en un epítipo de PfEXP-1, una proteína de *P falciparum* expresada en estadios eritrocíticos y pre-eritrocíticos, conjugado con flagelina. El conjugado resultante estimuló TLR5 con potencia significativa, aunque algo menor que la flagelina. Al comparar la respuesta a vacunas formuladas con este epítipo y adyuvante de Freund, este epítipo y flagelina de forma no conjugada y el conjugado, solo el conjugado indujo una respuesta humoral ante el péptido. Solo los anticuerpos del suero de animales inmunizados con el conjugado fueron capaces de reconocer la proteína nativa de *Plasmodium*⁴³.

Por último, también se ha buscado demostrar las propiedades de una vacuna basada en un polipéptido que contenía un epítipo de MSP1 (proteína de superficie de la forma merozoito) de *P vivax* y flagelina. La inmunización en modelo murino con esta proteína recombinante produjo una respuesta humoral fuerte y específica comparada con la producida por la inmunización con una proteína similar que no contenía flagelina. Se observó que la adición de otros adyuvantes puede mejorar la respuesta inmune. Los anticuerpos producidos reconocieron la proteína nativa en la superficie del parásito, y fueron capaces de inhibir su crecimiento in vitro⁴⁴.

4.2.2. Estimulación de TLR5 en vacuna contra la gripe

Como ya se ha mencionado anteriormente, una vacuna ideal contra la gripe debería generar inmunidad protectora en las poblaciones susceptibles, inmunidad a nivel de mucosas e inmunidad cruzada para varias cepas.

Se ha investigado una vacuna recombinante que contenía un epítipo de la hemaglutinina (proteína presente en la superficie del virus de la gripe) y flagelina como alternativa para una inmunización eficaz y de producción rápida contra el virus H5N1. Al probar vacunas formuladas de esta forma en ratones y hurones, se observó que producían altos niveles de IgG específica, reducción en la carga viral y protección tanto ante la cepa del virus usada en la vacuna como ante otras cepas heterólogas⁴⁵.

Otro ensayo siguió una estrategia similar, probando la eficacia de una vacuna recombinante a partir de epítopos de hemaglutinina del virus H7N9 y flagelina. Se comprobó que esta vacuna recombinante estimulaba TLR5. En modelo murino, los niveles de IgG fueron más altos que en los individuos vacunados solo con la porción de hemaglutinina o los control. La respuesta humoral fue también más robusta y duradera en este grupo⁴⁶.

Por otra parte, se ha investigado la eficacia de una vacuna para la gripe basada en el virus inactivado y flagelina como estrategia para lograr inmunidad en neonatos, ya que la

respuesta de su sistema inmune es insuficiente y las vacunas existentes no son efectivas en menores de seis meses. Se probó en modelo primate, comparando los resultados entre un grupo vacunado con virus inactivado y flagelina, un grupo vacunado con virus inactivado y flagelina inactivada y un grupo control. La respuesta inflamatoria fue mayor en el grupo vacunado con flagelina como adyuvante, aunque no como para resultar problemático, por lo que se consideró segura. Este grupo mostró una respuesta humoral significativamente mayor que los otros, y una respuesta más fuerte por parte de los linfocitos T de memoria. La producción de anticuerpos que reconozcan otras cepas del virus es una característica deseable en las vacunas, pero en este caso no se logró. Tras la exposición al patógeno, el grupo vacunado con flagelina como adyuvante fue el que mostró menor carga viral y menor sintomatología clínica⁴⁷.

También existen estudios sobre si el uso de flagelina como adyuvante en una vacuna basada en virus inactivado permite alcanzar una inmunogenicidad adecuada en administración intranasal. Su administración en modelo murino produjo una fuerte respuesta humoral con altos niveles de IgA específica en mucosas y suero y de IgG a nivel sistémico. Al exponer a los animales al virus vivo, la vacuna otorgó muy buena protección frente a este. Estos resultados apuntaron a que la flagelina puede ser prometedora como adyuvante en mucosas⁴⁸.

4.2.3. Estimulación de TLR5 para conseguir inmunidad a nivel de mucosas

La mayoría de las vacunas existentes en la actualidad se administran por vía parenteral. La administración de vacunas a través de las mucosas ofrece una serie de beneficios: facilidad de administración, eliminación de los riesgos asociados a la inyección e inducción de inmunidad tanto a nivel sistémico como a nivel de mucosas. Uno de los requisitos para la efectividad de este tipo de vacunas es el uso de adyuvantes efectivos y seguros que consigan una inmunidad protectora. Aunque no se han desarrollado muchas debido a la dificultad de encontrar adyuvantes adecuados, en los últimos años se ha producido un avance significativo en este campo^{49, 50}.

La principal ventaja que ofrece la inmunidad a nivel de mucosas es que mientras que la inmunidad a nivel sistémico, que es la que consiguen las vacunas administradas por vía parenteral, tendría su efecto una vez que el patógeno ha comenzado a diseminarse en el organismo, la inmunidad a nivel de mucosas tendría su efecto en la vía de entrada del patógeno, lo cual permite la prevención de la enfermedad desde su fase temprana^{49, 51}.

Se ha podido observar que, aunque la principal fuente de la acción de la estimulación de TLR5 como adyuvante se da a partir de las DCs, en las vías respiratorias juegan un importante papel las células epiteliales. Al administrarse en modelo murino vacunas de varios antígenos con flagelina como adyuvante por vía intranasal, se pudo observar una potenciación tanto de la inmunidad sistémica en forma de aumento de IgG como de la inmunidad a nivel de mucosas en forma de aumento de IgA. En los animales en los que la respuesta de TLR5 había sido suprimida no se dio este efecto, por lo que la potenciación de la inmunidad era en este caso dependiente de TLR5. Al suprimir el efecto de la estimulación de TLR5 en las células hematopoyéticas, la respuesta inmune a nivel de mucosas persistió, apoyando la idea de que la clave para esta inmunidad es la señalización a partir de las células epiteliales. También se pudo observar que en la administración por vía intranasal, la flagelina permanecía en las vías respiratorias y era rápidamente degradada. En conjunto, estos hechos apoyan la idea de que la actividad como adyuvante

de la flagelina administrada por vía intranasal potencia la inmunidad a nivel de mucosas, es dependiente de TLR y tiene lugar mediante señalización a través de las células epiteliales de las vías respiratorias⁵².

Al continuar investigando los mecanismos por los que se produce esta inmunidad a nivel de mucosas, se pudo observar que hay una activación de las DCs a nivel de pulmón. La señalización a partir de las células epiteliales de las vías respiratorias que se observó anteriormente causa el reclutamiento a pulmón de polimorfonucleares y monocitos y de DCs procedentes de ganglios linfáticos que drenan a pulmón. Se comprobó que de estos tipos de células, las que aparecían unidas a antígeno de forma más consistente y las responsables de la inmunización fueron las DCs. Se observó también que aunque la flagelina no influía en la captura de antígeno por parte de las DCs, sí que era responsable de su activación funcional. Estas DCs activadas fueron cruciales en la activación de los linfocitos T en ganglio. Por último, se corroboró que esta inmunidad era independiente de la activación de DCs a nivel sistémico⁵³.

4.3. Otras estrategias

Además de las estrategias basadas en la estimulación de TLR3 y TLR5, que se han tratado anteriormente en más extensión al ser las más desarrolladas, existen otras estrategias que hacen uso de las vías de señalización de los receptores TLR. A continuación se muestran algunos ejemplos.

Uno de ellos es la búsqueda de una vacuna contra *Brucella* que además de una respuesta sistémica, estimule una respuesta a nivel de mucosas. Para ello, se probó una vacuna basada en un vector plasmídico que contiene la secuencia de la Cu, Zn superóxido dismutasa (SOD), un antígeno de *Brucella abortus*, combinado con BPPcysMPEG, un agonista de TLR2/6. La vía de administración elegida fue la intranasal debido a que la parenteral se aleja más de la vía natural de infección. Al evaluarla en modelo murino comparando con una vacuna similar pero sin adyuvante, se observaron aumento significativo de los niveles de IgG e IgA y mayor inducción de la respuesta celular. Ante la exposición al patógeno, el grupo inmunizado con la vacuna que contenía adyuvante mostró mayor protección frente al patógeno⁵⁴.

También se ha realizado una comparación entre varios adyuvantes, tanto agonistas de TLR como agonistas de NOD, para encontrar el más efectivo como adyuvante en una vacuna basada en una proteína de membrana de *Chlamydia trachomatis*. Primero se redujo la batería de adyuvantes separándolos según el tipo de respuesta (Th1, Th2 o equilibrada) que indujesen y escogiendo dentro de cada grupo aquel que ofreciese mejor protección en la exposición al patógeno. Se seleccionaron para seguir investigando los siguientes adyuvantes: Pam₂CSK₄ (agonista de TLR2/6, induce respuesta Th2), Poli (I:C) (agonista de TLR3, induce una respuesta equilibrada) y CpG-1826 (agonista de TLR9, induce respuesta Th1). De estos grupos, el inmunizado con Pam₂CSK₄ como adyuvante fue el que mostró mejor respuesta humoral tanto a nivel de IgG como de IgA, mejor respuesta celular y mejor protección ante la exposición al patógeno medida como carga de patógeno y variación de peso del animal⁵⁵.

Un ensayo buscó probar si una vacuna basada en el antígeno de TLR7/8 CL097 conjugado con los antígenos de superficie y del core del virus de la hepatitis B (HBsAg y HBcAg)

adsorbidos sobre sales de aluminio podría inducir una respuesta inmune terapéutica en los pacientes infectados. Al comparar en modelo murino esta vacuna con una consistente solo en los antígenos de HBV adsorbidos sobre sales de aluminio, se observó que el uso de este adyuvante era necesario para una respuesta celular y humoral fuerte y específica que rompiera el estado de tolerancia a los antígenos del virus que se asocia a la persistencia de la infección⁵⁶.

Otro ensayo buscó estudiar la eficacia de CPG 7909, un agonista de TLR9, como adyuvante en una vacuna contra el virus de la hepatitis B en pacientes infectados con el virus HIV, especialmente susceptibles a la infección por el virus de la hepatitis B debido a su estado de inmunosupresión. Este adyuvante ya había mostrado otorgar seroprotección a corto plazo (48 semanas) al añadirse a una vacuna comercializada contra el virus de la hepatitis B, y en este ensayo se buscó comprobar si esa seroprotección se mantenía en un plazo de cinco años. Para ello se llevó a cabo un ensayo en pacientes adultos infectados por el virus HIV y que recibían terapia antirretroviral eficaz, comparando los efectos de la vacuna con y sin adyuvante mediante la medición de anticuerpo anti-HBs en intervalos de seis meses hasta 60 meses después de la vacunación. Se pudo observar que la proporción de pacientes que alcanzaban y mantenían seroprotección en ese plazo eran significativamente mayores en el grupo inmunizado con la vacuna que contenía el adyuvante⁵⁷.

4.3.1. Otros tipos de inmunoterapia

Además de la vacunación contra microorganismos patógenos y el tratamiento del cáncer, la estimulación de los receptores TLR puede ser útil en otros tipos de inmunoterapia

La estimulación de TLR5 se ha usado en la búsqueda de una vacuna contra la cocaína. Un ensayo estudió su eficacia como adyuvante en la vacuna de modo que esta sea capaz de generar anticuerpos que eviten su paso a través de la barrera hematoencefálica. Esta se formuló conjugando un hapteno de la molécula de cocaína a la flagelina, y también se comparó con formulaciones similares que incluían también sales de aluminio o MPLA como adyuvante adicional. Al comparar el efecto de estas vacunas en modelo murino, se observó que el uso de flagelina producía un aumento de los anticuerpos generados. Respecto al uso de adyuvantes adicionales, mientras que el uso de sales de aluminio aumentaba este efecto, el uso de MPLA lo disminuía, al ser un agonista de TLR4 que tiene un efecto antagónico sobre la respuesta inmune⁵⁸.

La estimulación de TLR también es una estrategia potencial en la inmunoterapia contra la alergia. En la actualidad existen dos vacunas antialérgicas que contienen agonistas de TLR en fase de ensayo clínico: Pollinex Quattro, que contiene MPLA (agonista de TLR4), y AIC, que contiene CpG (agonista de TLR9). Estas han mostrado seguridad y eficacia en el tratamiento de los síntomas de pacientes con rinitis alérgica. Además de estas, hay una serie de vacunas antialérgicas que contienen agonistas de TLR en fase de desarrollo⁵⁹.

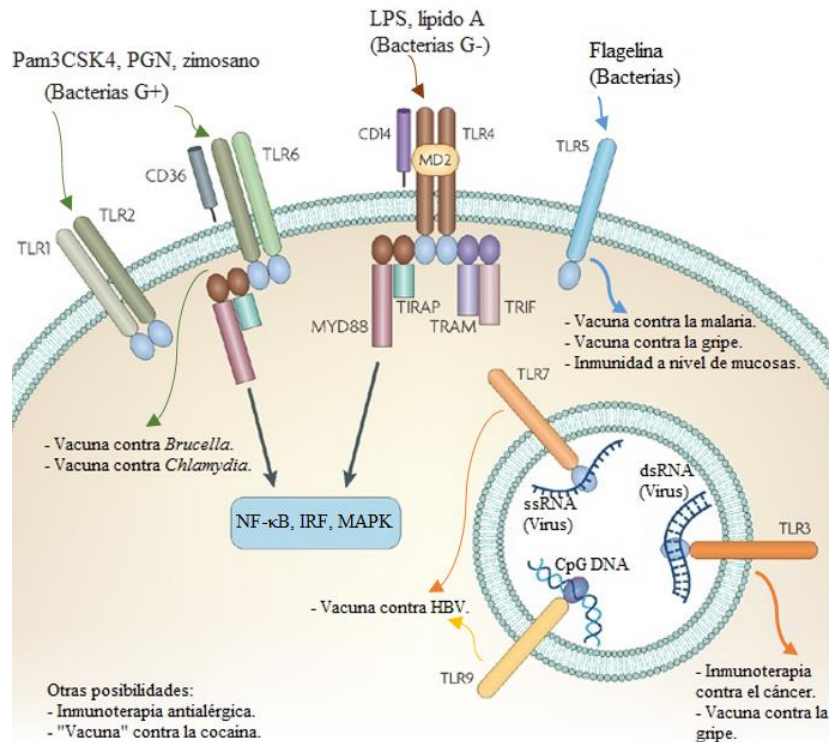


Fig 5. Conjunto de estrategias analizadas en la revisión⁶⁰

5. Conclusiones

El conjunto de la literatura analizada coincide en señalar la eficacia de la estimulación de los receptores TLR para potenciar la respuesta inmune en las vacunas. En general puede observarse que estas estrategias generan una respuesta inmune más fuerte y duradera y mejoran la protección ante la exposición al patógeno.

Las principales ventajas del uso de los agonistas de TLR como adyuvante es que su mecanismo de acción es conocido y en general son seguros, estimulan tanto la inmunidad innata como la adaptativa al tener un papel clave en la maduración de las DCs, pueden generar inmunidad a nivel de mucosa, dan buenos resultados tanto en administración parenteral como intranasal y al estimular el sistema inmune ofrecen potencial para la formulación de vacunas a partir de antígenos poco inmunogénicos, mejorar su perfil de seguridad o su uso en poblaciones cuya respuesta de otro modo sería subóptima. Como contrapunto, pueden producir reacciones adversas derivadas de la exacerbación de la respuesta inmune, y existen datos insuficientes sobre su uso en humanos.

Se puede concluir por lo tanto que este es un campo prometedor y es necesario continuar las investigaciones necesarias para su uso en pacientes.

Bibliografía

1. Kumar H, Kawai T, Akira S. *Toll-like receptors and innate immunity*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2009; 388: 621–625.
2. Murphy K, Travers P, Walport M. (2008). *Janeway's Immunobiology*. 7ª edición. 2008. Garland. ISBN 0815341237.
3. Mitchell J. et al. *Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerization domain in the regulation of health and disease*. Journal of Endocrinology. 2007; 193: 323-330.
4. Beutler B. *Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling*. Nature. 2004; 430(6996):257-63.
5. Adaptado de Cell Signaling Technology. www.cellsignal.com.
6. Niess JH et al. *CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance*. Science. 2005; 307 (5707): 254–258.
7. Randolph, GJ et al. *Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels*. Nature Reviews Immunology. 2005; 5 (8): 617–628.
8. Said A, Weindl G. *Regulation of Dendritic Cell Function in Inflammation*. Journal of Immunology Research. 2015. 2015; 2015: 743169.
9. Bousso P, Robey E. *Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes*. Nature Immunology. 2003; 4 (6): 579–585.
10. Shakhari G. et al. (2005). *Stable T cell-dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo*. Nature Immunology. 2005; 6 (7): 707–714.
11. Speckmann, EJ et al. *Physiologie*, 5ª edición. 2008. Urban & Fischer.
12. Murray PR. *Microbiología Médica*. 2006. Mosby (Elsevier Science).
13. Norval M. *Virus–Cell Interactions*. *Medical microbiology*. 18ª edición. 2012. Elsevier. ISBN 9780702051197.
14. Alexopoulou L. et al. *Recognition of double-stranded RNA and activation of NFκB by Toll-like receptor 3*. Nature. 2001; 413(6857):732-8.
15. Matsumoto M. et al. *Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double stranded RNA-mediated signaling*. BBRC. 2002; 293(5):1364-9.
16. Yamamoto M. et al. *Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway*. Science. 2003; 301: 640.
17. AdipoGen Life Sciences:
www.adipogen.com/media/catalog/product/p/o/poly_ic_schematic_structure.jpg
18. Adaptado de: T Kawai, S Akira. *TLR signaling*. Cell death and differentiation. 2006; 13(5):816-25.
19. Kawai T, Akira S. *Toll like receptor and RIG-I-like receptor signaling*. Annals of the New York Academy of Sciences. 2008; 1143:1-20.
20. Seya T, Azuma M, Matsumoto M. *Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer*. Expert Opinion on Therapeutic Targets. 2013; Vol. 17, Iss. 5.
21. Seya T, Shime H, Takeda Y, Tamematsu M, Takashima K, Matsumoto M. *Adjuvant for vaccine immunotherapy of cancer – focusing on Toll-like receptor 2 and 3 agonists for safely enhancing antitumor immunity*. Cancer Science. 2015; 106:1659-1668.
22. Damo M, Wilson DS, Simeoni E, Hubbell JA. *TLR-3 stimulation improves anti-tumor immunity elicited by dendritic cell exosome-based vaccines in a murine model of melanoma*. Scientific Report. 2015; 5: 17622.

23. Chaput N et al. *Dendritic cell derived-exosomes: biology and clinical implementations*. Journal of Leukocyte Biology. 2006; 80: 471–478.
24. Stoorvogel W, Kleijmeer M J, Geuze H J & Raposo G. *The biogenesis and functions of exosomes*. Traffic. 2002; 3: 321–330.
25. Pitt J M et al. *Dendritic Cell-Derived Exosomes as Immunotherapies in the Fight against Cancer*. The Journal of Immunology. 2014; 193: 1006–1011.
26. Théry C, Zitvogel L & Amigorena S. *Exosomes: composition, biogenesis and function*. Nature Reviews Immunology. 2002; 2: 569–79.
27. Robbins P D & Morelli A E. *Regulation of immune responses by extracellular vesicles*. Nature Reviews Immunology. 2014; 14: 195–208.
28. Matsumoto M. et al. *Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and CTL activation without significant cytokine production in vivo*. Nature Communications. 2015; 6: 6280.
29. Jasani B, Navabi H, Adams M. *Ampligen: A potential toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer*. Vaccine. 2009; Vol 27, Iss 25–26: 3401-3404.
30. World Health Organization. *WHO position paper: influenza vaccines*. Weekly epidemiological record. 2005 Vol. 80, 33: 277–288.
31. Kawaoka Y. *Influenza Virology: Current Topics*. Caister Academic Press. 2006. ISBN 978-1-904455-06-6.
32. Harrison. *Principios de Medicina Interna*. 16ª edición. 2006. McGraw-Hill.
33. Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. *Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly(I:C12U), a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge*. Microbes and Infection. 2007; Vol 9, Iss 11: 1333-1340.
34. Ichinohe T, Aina A, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H. *Poly(I:C12U) adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants*. Vaccine. 2009; Vol 27, Iss 45: 6276-6279.
35. Aina A, Tashiro M, Hasegawa H. *Cross-protective immunity against influenza virus infections induced by intranasal vaccination together with a TLR3-mucosal adjuvant*. Human Vaccines. 2011; Vol. 7, Iss. sup1.
36. Sharma N et al. *Sphingosine-1-phosphate suppresses TLR-induced CXCL8 secretion from human T cells*. Journal of Leukocyte Biology. 2013; 93 (4): 521–528.
37. Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SL, Cookson BT, Aderem A. *Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility*. Nature Immunology. 2013, 4 (12); 1247–53.
38. Oliveira BH, Silva MR, Braga CJM, Massis LM, Ferreira LCS, M. E. Sbrogio-Almeida ME, Takagi M. *Production of native flagellin from Salmonella Typhimurium in a bioreactor and purification by tangential ultrafiltration*. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 2011; vol.28, n.4: 575-584.
39. Mizel SB et al. 2003. *Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes*. The Journal of Immunology. 2003; 170(12): 6217-23.
40. World Health Organization. *World Malaria Report 2008*. 2008.
41. Camacho AG, Teixeira LH, Bargieri DY, Boscardin SB, Soares IS, Nussenzweig RS et al. *TLR5-dependent immunogenicity of a recombinant fusion protein containing an immunodominant epitope of malarial circumsporozoite protein and*

- the FliC flagellin of Salmonella Typhimurium*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2011; 106 (Suppl 1): 167-171.
42. Carapau D, Mitchell R, Nacer A, et al. *Protective Humoral Immunity Elicited by a Needle-Free Malaria Vaccine Comprised of a Chimeric Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein and a Toll-Like Receptor 5 Agonist, Flagellin*. Infection and Immunity. 2013; 81(12):4350-4362.
 43. Qian F, Guo A, Li M, Liu W, Pan Z, Jiang L, Wu X, Xu H. *Salmonella flagellin is a potent carrier–adjuvant for peptide conjugate to induce peptide-specific antibody response in mice*. Vaccine. 2015; Vol 33, Iss 17: 2038-2044.
 44. Bargieri DY, Leite JA, Lopes SC, Sbrogio-Almeida ME, Braga CJ, Ferreira LC, Soares IS, Costa FT, Rodrigues MM. *Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of Salmonella Typhimurium*. Vaccine. 2010; Vol 28, Iss 16: 2818-2826.
 45. Liu G, Song L, Reiserova L, Trivedi U, Li H, Liu X, Noah D, Hou F, Weaver B, Tussey L. *Flagellin-HA vaccines protect ferrets and mice against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) infections*. Vaccine. 2012; Vol 30, Iss 48: 6833-6838.
 46. Song L, Xiong D, Kang X, et al. *An avian influenza A (H7N9) virus vaccine candidate based on the fusion protein of hemagglutinin globular head and Salmonella typhimurium flagellin*. BMC Biotechnology. 2015; 15:79.
 47. Kim JR, Holbrook BC, Hayward SL, et al. *Inclusion of Flagellin during Vaccination against Influenza Enhances Recall Responses in Nonhuman Primate Neonates*. Journal of Virology. 2015; 89(14):7291-7303.
 48. Hong SH, Byun YH, Nguyen CT, Kim SY, Seong BL, Park S, Woo GJ, Yoon Y, Koh JT, Fujihashi K, Rhee JH, Lee SE. *Intranasal administration of a flagellin-adjuvanted inactivated influenza vaccine enhances mucosal immune responses to protect mice against lethal infection*. Vaccine. 2012; Vol 30, Iss 2: 466-474.
 49. Lycke N. *Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations*. Nature Reviews Immunology. 2012; 12:592–605.
 50. Vajdy M, Srivastava I, Polo J, Donnelly J, O’Hagan D, Singh M. *Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines*. Immunology and Cell Biology. 2004; 82(6):617–27.
 51. Sansonetti, PJ. *War and peace at mucosal surfaces*. Nature Reviews Immunology. 2004; 4: 953–964.
 52. Van Maele L, Fougeron D, Janot L, Didierlaurent A, Cayet D, Tabareau J, et al. *Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity*. Mucosal Immunology. 2014; 7: 489–500.
 53. Fougeron D, Van Maele L, Songhet P, Cayet D, Hot D, Van Rooijen N, Mollenkopf HJ, Hardt WD, Benecke AG, Sirard JC. *Indirect Toll-like receptor 5-mediated activation of conventional dendritic cells promotes the mucosal adjuvant activity of flagellin in the respiratory tract*. Vaccine. 2015; 33(29):3331-41.
 54. Retamal-Díaz A, Riquelme-Neira R, Sáez D, Rivera A, Fernández P, Cabrera A, Guzmán CA, Oñate A. *Use of S-[2,3-Bisphalmitoyloxy-(2R)-Propyl]-R-Cysteinyl-Amido-Monomethoxy Polyethylene Glycol as an Adjuvant Improved Protective Immunity Associated with a DNA Vaccine Encoding Cu,Zn Superoxide Dismutase*

- of Brucella abortus in Mice*. Clinical and Vaccine Immunology: 2014; 21(11):1474-1480.
55. Cheng C, Jain P, Bettahi I, Pal S, Tifrea D, de la Maza LM. *A TLR2 agonist is a more effective adjuvant for a Chlamydia major outer membrane protein vaccine than ligands to other TLR and NOD receptors*. Vaccine. 2011; 29(38):6641-6649.
 56. Wang Y, Chen K, Wu Z, et al. *Immunizations with hepatitis B viral antigens and a TLR7/8 agonist adjuvant induce antigen-specific immune responses in HBV-transgenic mice*. International journal of infectious diseases. 2014; 29:31-36.
 57. Cooper CL, Angel JB, Seguin I, Davis HL, Cameron DW. *CPG 7909 adjuvant plus hepatitis B virus vaccination in HIV-infected adults achieves long-term seroprotection for up to 5 years*. Clinical Infectious Diseases. 2008; 46(8):1310–1314.
 58. Lockner JW, Eubanks LM, Choi JL, et al. *Flagellin as Carrier and Adjuvant in Cocaine Vaccine Development*. Molecular Pharmaceutics. 2015; 12(2):653-662.
 59. Aryan Z, Rezaei N, *Toll-like receptors as targets for allergen immunotherapy*. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology. 2015; Vol 15, Iss 6: 568-574.
 60. Adaptado de Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. *Toll-like receptors and cancer*. Nature Reviews Cancer. 2009; 9: 57-63.