



EDITORIAL UNIVERSIDAD DE TALCA
Vicerrectoría Académica

Colección e-book

Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica



Editores

Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.

e-book

Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica

Editores

Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.



EDITORIAL UNIVERSIDAD DE TALCA
COLECCIÓN E-BOOK
Serie de libros electrónicos

Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica

Editores

Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.

EDITORIAL UNIVERSIDAD DE TALCA
Vicerrectoría Académica
COLECCIÓN E-BOOK
Serie de libros electrónicos



Registro de propiedad intelectual © N° 128.873

ISBN: 978-956-7059-86-7

EDITORIAL UNIVERSIDAD DE TALCA

Talca- Chile, julio de 2009
Edición soporte papel año 2002

Diseño Editorial:
Marcela Albornoz Dachelet

Corrección de textos:
María Cecilia Tapia Castro





Registro de propiedad intelectual N° 128.873
ISBN: 956-7059-51-9

EDITORIAL UNIVERSIDAD DE TALCA

Talca - CHILE, 2002

Ilustraciones
BQ. Marcos Pérez Cid

Diseño gráfico
Marcela Albornoz Dachelet

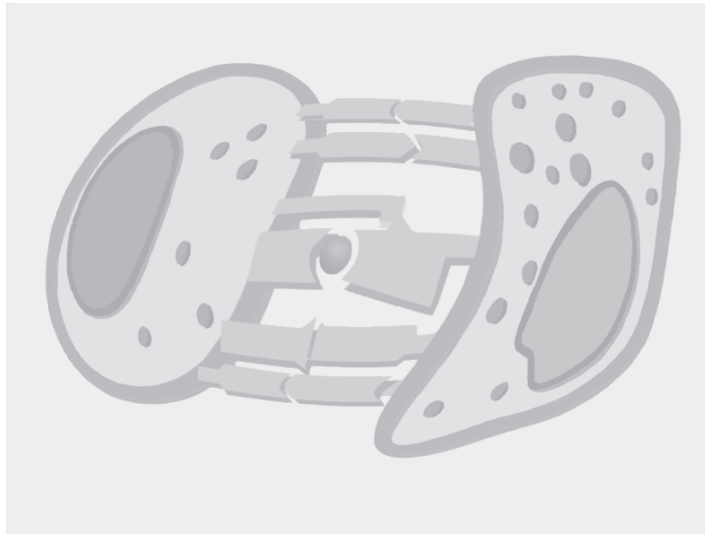
Revisión de textos
María Cecilia Tapia Castro

La ilustración de la portada muestra la interacción entre una Célula Presentadora de Antígeno y un Linfocito T. Se representan algunas de las moléculas que participan: Receptor de células T (TCR), molécula del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), Péptido Antigénico y Moléculas de Adhesión Celular.

Diagramación e impresión
Gutenberg-Talca
Impreso en Chile



Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica



Editores

***Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.***







UNIVERSIDAD DE TALCA

FUNDAMENTOS DE INMUNOLOGÍA BÁSICA Y CLÍNICA

Editores

Prof. Dr. Iván Palomo González
Unidad de Inmunología y Hematología
Departamento de Bioquímica Clínica
e Inmunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

Prof. Dr. Arturo Ferreira Vigouroux
Programa Disciplinario de Inmunología
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Prof. Dra. Cecilia Sepúlveda Carvajal
Unidad de Inmunología
Departamento de Medicina
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Prof. Dr. Mario Roseblatt Silber
Fundación Ciencias para la Vida
Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Prof. Dr. Ulises Vergara Castillo
Escuela de Postgrado, Facultad de Medicina y
Departamento de Medicina Preventiva,
Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad de Chile.



AUTORES DE CAPÍTULOS

Dra. Ana María Agar Muñoz

Unidad de Inmunología
Clínica Alemana

Prof. Dra. Edilia Andrews García

Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Prof. Dra. Adriana Ardiles Sandoval

Policlínico de Medicina Integral
Servicio de Medicina
Hospital San Juan de Dios

BQ. Alejandra Arenas Celfé

Sección Histocompatibilidad
Unidad de Inmunología
Instituto de Salud Pública

Dr. Miguel Barría Maldonado

Instituto de Inmunología
Facultad de Medicina
Universidad Austral de Chile

Prof. Dra. María Inés Becker Contreras

Unidad de Inmunología
Facultad de Ciencias Biológicas
P. Universidad Católica de Chile

Prof. Dr. Rosario Billetta D'aquila

Programa disciplinario de Inmunología
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Prof. Dra. María Rosa Bono Merino

Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Dra. Luz P. Blanco Palma

Laboratorio de Inmunobioquímica
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Prof. Dra. Eva Burger

Departamento de Inmunología
Instituto de Ciencias Biomédicas
Universidad de San Pablo, Brasil

Prof. Dr. Antonio Cabral

Departamento de Reumatología
Instituto Nacional de Nutrición
Salvador Subiran, México

Prof. Dr. Flavio Carrión Arriagada

Unidad de Inmunología
Facultad de Medicina
Universidad de Los Andes

Dr. Darwins Castillo Alvarez

Sección Inmunodiagnóstico
Unidad de Inmunología
Instituto de Salud Pública

Prof. Dr. Edgardo Carrasco Calderón

Departamento de Medicina Oriente
Facultad de Medicina
Universidad de Chile
Instituto Nacional del Tórax

Prof. Dra. Mónica Cornejo De Luigi

Unidad de Inmunología
Facultad de Medicina
Universidad de Valparaíso



Prof. Dr. Alfredo De Ioannes Ilis
Unidad de Inmunología
Facultad de Ciencias Biológicas
P. Universidad Católica de Chile

Prof. Dra. Patricia Díaz Amor
Departamento de Medicina Experimental
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Dra. Susana Elgueta Miranda
Sección Histocompatibilidad
Unidad de Inmunología
Instituto de Salud Pública

Prof. Dr. Patricio Esquivel Sánchez
Instituto de Inmunología
Facultad de Medicina
Universidad Austral de Chile

Prof. Dr. Heriberto Fernández Jaramillo
Instituto de Microbiología Clínica
Facultad de Medicina
Universidad Austral de Chile

Prof. Dr. Jorge A. Fernández Vargas
Unidad de Virología
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Prof. Dr. Arturo Ferreira Vigouroux
Programa disciplinario de Inmunología
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Prof. Dr. Hugo Folch Vilches
Instituto de Inmunología
Facultad de Medicina
Universidad Austral de Chile

Prof. Dr. Ricardo Forastiero Valcarcel
Unidad de Hematología
Universidad Favarolo
Buenos Aires, Argentina

Prof. Dr. Enrique González Villanueva
Laboratorio de Biología Molecular
Instituto de Biología y Biotecnología
Universidad de Talca

Prof. Dr. Jorge González Cortés
Unidad de Parasitología
Departamento de Tecnología Médica
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Antofagasta

Dra. María Antonieta Guzmán Meléndez
Unidad de Inmunología
Servicio de Medicina
Hospital Clínico
Universidad de Chile

Prof. Dr. Gustavo Hoecker Salas
Unidad de Inmunogenética
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Prof. Dra. Mónica Imarai Bahamonde
Departamento de Biología
Facultad de Química y Biología
Universidad de Santiago de Chile

Prof. Dr. Sergio Jacobelli Gabrielli
Departamento de Reumatología e
Inmunología Clínica
Facultad de Medicina
P. Universidad Católica de Chile

Prof. Dra. Cecilia Koenig Samohod
Departamento Biología Celular y
Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
P. Universidad Católica de Chile



Dra. María Angélica Marinovich
Unidad de Reumatología
Departamento de Medicina Interna
Universidad de Chile
Hospital Clínico San Borja-Arriarán

Prof. Dr. Benjamín Martínez Rondanelli
Departamento de Patología Oral
Facultad de Odontología
Universidad Mayor

Dr. Rodrigo Mora Sanhueza
Programa Doctorado en Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Prof. Dra. Cristina Navarrete
Departamento de Histocompatibilidad e Inmunogenética
The London Blood Transfusion Center
Londres, Inglaterra

Dr. Rodrigo Naves Pichuante
Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada

Dra. Ximena Norambuena Rodríguez
Unidad de Inmunología
Servicio de Pediatría
Hospital Exequiel González Cortés

Prof. Dr. José M. Ojeda Fernández
Unidad de Virología
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Prof. Dr. Mauricio Oqueteaux Tacchini
Departamento de Hematología y Oncología
Facultad de Medicina
P. Universidad Católica de Chile

Prof. Dr. Iván Palomo González
Unidad de Inmunología y Hematología
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

Prof. Dr. Jaime Pereira Garcés
Departamento de Hematología y Oncología
Facultad de Medicina
P. Universidad Católica de Chile

Prof. Dra. Silvia Pierangeli
Departamento de Microbiología e Inmunología
Morehouse School of Medicine
Atlanta, Georgia, USA.

Prof. Dr. Javier Puente Piccardo
Laboratorio de Inmunobioquímica
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Prof. Dr. Arnoldo Quezada Lagos
Departamento de Pediatría
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Dr. Santiago Rivero Díaz
Departamento de Reumatología e Inmunología Clínica
Facultad de Medicina
P. Universidad Católica de Chile

Prof. Dr. Cristián Rodríguez Guiraldes
Unidad de Inmunología
Facultad de Medicina
Universidad de Los Andes



Prof. Dr. Mario Roseblatt Silber
Fundación Ciencias para la Vida
Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Prof. Dr. Flavio Salazar-Onfray
Programa disciplinario de Inmunología
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Prof. Dra. Cecilia Sepúlveda Carvajal
Unidad de Inmunología
Departamento de Medicina
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Prof. Dra. Mireya Silva Batista
Laboratorio Clínico Inmunolab

Téc. Quím. Valeska Simon Zegers
Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Prof. Dr. Julio Sharfstein
Instituto de Biofísica Carlos Chagas
Filho. UFRJ
Laboratory of Molecular Immunology
CCS
Rio de Janeiro, Brasil

BQ. Carolina Valenzuela Barros
Sección Inmunodiagnóstico
Unidad de Inmunología
Instituto de Salud Pública

Prof. Dr. Claudio Vásquez Guzmán
Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Química y Biología
Universidad de Santiago de Chile

Prof. MgCs. Marcela Vásquez Rojas
Unidad de Inmunología y Hematología
Departamento de Bioquímica Clínica e
Imunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

Dra. Pilar Vega Covarrubias
Sección Inmunidad Celular
Laboratorio CIDI

Prof. Dr. Ulises Vergara Castillo
Laboratorio de Inmunología
Facultad de Ciencias Veterinarias y
Pecuarias
Universidad de Chile

Prof. Dra. Juana Villegas Moraga
Departamento de Medicina Interna
Facultad de Medicina
Universidad de la Frontera

Prof. Dr. Luis Zaror Cornejo
Instituto de Microbiología Clínica
Facultad de Medicina
Universidad Austral de Chile

**Prof. Dra. Marta Zelazko de
Cheistwer**
Servicio de Inmunología
Hospital Nacional de Pediatría
Juan P. Garrahan
Buenos Aires, Argentina

Dr. Claudio Zúñiga Marti
Laboratorio de Inmunología
Facultad de Ciencias Veterinarias y
Pecuarias
Universidad de Chile



PATROCINIO

International Union of Immunology Societies (IUIS)
Asociación Latinoamericana de Inmunología (ALAI)
Sociedad Chilena de Inmunología (SOCHIN)
Sociedad Chilena de Alergia e Inmunología

Network for Research and Training in Parasitic Diseases
at the Southern Cone of Latin America, SIDA, Suecia

Universidad de Talca
Universidad de Chile
 Facultad de Medicina
 Facultad de Ciencias
 Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
 Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
P. Universidad Católica de Chile
 Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Austral de Chile
 Facultad de Medicina
Universidad de Valparaíso
 Facultad de Medicina
Universidad de Santiago de Chile
 Facultad de Química y Biología
Universidad de la Frontera
 Facultad de Medicina
Universidad de Antofagasta
 Facultad de Ciencias Médicas
Universidad de Los Andes
 Facultad de Medicina
Universidad Mayor
 Facultad de Odontología
Universidad Favaloro (Argentina)
Instituto de Salud Pública de Chile

AUSPICIO

International Union of Immunology Societies (IUIS)

Biomérieux S.A.
Equilab
Laboratorio Clínico Talca Ltda.



A nuestras queridas familias y a nuestros estimados alumnos



CONTENIDOS

	Página
PREFACIO	31
PRÓLOGO	35
SECCIÓN I: GENERALIDADES SOBRE INMUNIDAD	37
Capítulo 1	39
INTRODUCCIÓN A LA INMUNOLOGÍA: LAS BASES BIOLÓGICAS DE LA INDIVIDUALIDAD	
<i>Prof. Dr. Gustavo Hoecker S.</i>	
Capítulo 2	45
HISTORIA DE LA INMUNOLOGÍA	
<i>Prof. Dr. Iván Palomo G. y Prof. Dr. Arturo Ferreira V.</i>	
1. Introducción	47
2. Dos siglos de inmunología	48
2.1. Inmunidad	48
2.2. Serología	48
2.3. Inmunoquímica	48
2.4. Inmunobiología	48
3. Premios Nobel	49
Capítulo 3	53
CÉLULAS Y ÓRGANOS DEL SISTEMA INMUNE	
<i>Prof. Dr. Iván Palomo G., Prof. Dr. Jaime Pereira G. y Prof. Dra. Cecilia Koenig S.</i>	
1. Introducción	55
2. Células del sistema inmune	55
2.1. Hematopoyesis	55
2.2. Linfocitos	57
2.3. Sistema fagocítico mononuclear	62
2.3.1. Monocitos	62
2.3.2. Macrófagos	63
2.3.3. Células dendríticas	65
2.4. Granulocitos	65
2.4.1. Neutrófilos	65
2.4.2. Eosinófilos	73
2.4.3. Basófilos	74
3. Órganos linfoides	75
3.1. Órganos linfoides primarios	75
3.1.1. Médula ósea	75
3.1.2. Timo	78
3.2. Órganos linfoides secundarios	80
3.2.1. Ganglios linfáticos	80
3.2.2. Bazo	82
3.2.3. Tejido linfoide asociado a mucosa	83
3.2.4. Amígdalas	84



4.	Tránsito linfocitario	84
----	-----------------------	----

Capítulo 4 87

INMUNIDAD INNATA

Prof. Dr. Iván Palomo G., Prof. Dra. Adriana Ardiles S. y Prof. Dr. Ulises Vergara C.

1.	Introducción	89
2.	Componentes de la inmunidad innata o natural	90
3.	Fase de reconocimiento en la respuesta inmune innata	93
4.	Fase efectora en la respuesta inmune innata	94
5.	Proyección clínica	98
6.	Filogenia de la respuesta inmune innata	99

SECCIÓN II: ESPECIFICIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE 101

Capítulo 5 103

ANTÍGENOS

Prof. Dra. María Inés Becker C. y Prof. Dr. Alfredo De Ioannes I.

1.	Introducción	105
2.	Conceptos generales	105
2.1.	Antígeno	105
2.2.	Inmunogenicidad y antigenicidad	106
2.3.	Determinante antigénico	106
2.4.	Haptenos	108
3.	Características del antígeno que lo hacen inmunogénico	108
3.1.	Tamaño	109
3.2.	Presencia de grupos químicos activos	109
3.3.	Conformación espacial de los epítopos	110
3.4.	Movilidad atómica	110
4.	Naturaleza química de los antígenos	110
4.1.	Proteínas	110
4.2.	Carbohidratos	111
4.3.	Lípidos	112
4.4.	Ácidos nucleicos	113
5.	Clasificación de los antígenos según las células inmunes involucradas en su reconocimiento	113
5.1.	Antígenos timo-dependientes	113
5.2.	Antígenos timo-independientes	113
6.	Clasificación general de los antígenos según su función	113
6.1.	Antígenos de trasplante	113
6.2.	Antígenos tumorales	113
6.3.	Autoantígenos	113
6.4.	Antígenos de diferenciación	114
6.5.	Superantígenos	114
6.6.	Alergenos	114

Capítulo 6 117

RECEPTOR DE LINFOCITOS B E INMUNOGLOBULINAS

Prof. Dr. Iván Palomo G., Prof. Dra. María Inés Becker C., Prof. Dra. Silvia Pierangeli y Prof. Dr. Ulises Vergara C.

1.	Introducción	119
2.	Receptor de linfocitos B (BCR): Estructura y función	120
2.1.	Inmunoglobulina de membrana	121
2.2.	Complejo accesorio Igα/Igβ	124



3.	Linfocitos B y señales accesorias de coestimulación	125
3.1.	Antígenos T-dependientes y antígenos T-independientes	125
3.2.	Co-Receptor CD21 (CR2)	125
4.	Subpoblaciones linfocitarias B1 y B2	126
5.	Estructura y función de inmunoglobulinas	126
5.1.	Estructura general	127
5.2.	Dominios de inmunoglobulinas y regiones hipervariables	128
5.3.	Variaciones isotípicas, alotípicas e idiotípicas	129
5.3.1.	Variaciones isotípicas	130
5.3.2.	Variaciones alotípicas	130
5.3.3.	Variaciones idiotípicas	130
5.4.	Clases y subclases de inmunoglobulinas	130
6.	Respuesta inmune humoral	135
6.1.	Avidez	136
6.2.	Afinidad	136
7.	Bases genéticas de la diversidad de inmunoglobulinas	136
7.1.	Genes de inmunoglobulinas	137
7.1.1.	Genes de cadenas pesadas	138
7.1.2.	Genes de cadenas livianas	138
7.2.	Reordenamiento génico	139
7.2.1.	Reordenamiento de cadenas pesadas	140
7.2.2.	Reordenamiento de cadenas livianas	140
7.2.3.	Reordenamiento impreciso del DNA	141
7.2.4.	Diversificación de la región N	141
7.2.5.	Exclusión alélica	142
7.2.6.	Exclusión isotípica	142
7.2.7.	Cambio de clase de cadenas pesadas	142
7.3.	Hipermutación somática	143
7.4.	Control de la transcripción de los genes de inmunoglobulinas	144
7.5.	Estimación numérica de la diversidad de anticuerpos	144
8.	Edición del receptor linfocitario	145
9.	Biosíntesis y ensamblaje de las inmunoglobulinas	146

Capítulo 7 149

RECEPTOR DE LINFOCITOS T Y SEÑALES ACCESORIAS DE COESTIMULACIÓN

Prof. Dr. Ulises Vergara C. y Prof. Dr. Iván Palomo G.

1.	Introducción	151
2.	Estructura del receptor T	152
2.1.	TCR $\alpha\beta$	152
2.2.	TCR $\gamma\delta$	153
3.	Estructura y función del complejo CD3	154
4.	Receptor T y reconocimiento antigénico	154
4.1	Linfocitos TCD4 , linfocitos TCD8 y restricción MHC	156
4.2.	Células TNK	157
5.	Genética molecular del receptor T	159
5.1.	Genes de cadenas TCR α , TCR β , TCR γ y TCR δ	159
5.1.1.	Genes de cadenas TCR α	159
5.1.2.	Genes de cadenas TCR β	159
5.1.3.	Genes de cadenas TCR γ	160
5.1.4.	Genes de cadenas TCR δ	161
5.2.	Reordenamiento génico	161
6.	Linfocitos T y señales accesorias de coestimulación	163
7.	Homeostasis y desarrollo post-tímico de linfocitos T	165



Capítulo 8 167

COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Prof. Dr. Ulises Vergara C., Prof. Dr. Iván Palomo G., Dr. Claudio Zúñiga M. y Prof. Dra. Cristina Navarrete

1.	Introducción	169
2.	Genes y moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad	170
2.1.	Genes del MHC	171
2.1.1.	Genes de clase I	171
2.1.2.	Genes de clase II	172
2.1.3.	Genes de clase III	173
2.1.4.	Otros genes del MHC	173
2.2.	Estructura y función de las moléculas MHC	174
2.2.1.	Estructura y función de las Moléculas MHC de clase I	174
2.2.2.	Estructura y función de las Moléculas MHC de clase II	174
3.	El concepto de restricción MHC	175
4.	Otras moléculas de presentación	176
4.1.	Moléculas CD1	176
5.	Herencia de los genes HLA	176
6.	Complejo Principal de Histocompatibilidad y enfermedad	176
7.	Nomenclatura y tipificación HLA	178

Capítulo 9 179

PROCESAMIENTO, PRESENTACIÓN Y RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO

Prof. Dr. Ulises Vergara C., Dr. Claudio Zúñiga M., Prof. Dr. Iván Palomo G., y Prof. Dra. Cristina Navarrete

1.	Introducción	181
2.	Linfocitos T y reconocimiento antigénico	181
2.1.	Subpoblaciones linfocitarias T y reconocimiento peptídico	182
2.2.	Linfocitos T $\gamma\delta$	182
2.3.	Células NK	182
2.4.	Células presentadoras de antígenos	183
3.	Tráfico celular y procesamiento antigénico	184
4.	Antígenos endógenos y exógenos	184
5.	Fragmentos peptídicos y moléculas MHC	184
6.	Procesamiento y presentación de antígenos endógenos	185
7.	Procesamiento y presentación de antígenos exógenos	187
8.	Presentación alternativa de péptidos	189

Capítulo 10 191

ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS

Prof. Dr. Javier Puente P.

1.	Introducción	194
2.	Activación de los linfocitos T	195
2.1.	Relación estructura-función del complejo TCR	195
2.2.	Secuencias de activación en el TCR-CD3 y cadenas ξ	196
2.3.	Proteínas tirosina quinasas en la activación de los LT	196
2.4.	Proteínas adaptadoras en la activación de los linfocitos	198
2.5.	Modelo general de activación de los LT	198
2.6.	Las dos señales necesarias para la activación de los LT	201
3.	Activación de los linfocitos B	202
3.1.	Secuencias de activación en el BCR y sub-unidades asociadas	202
3.2.	Modelo general de activación de los LB	202
4.	Activación de las células NK	205



4.1. Modelo de activación de las células NK	205
---	-----

Capítulo 11 CITOQUINAS	209
---	-----

Dr. Rodrigo Naves P. y Prof. Dra. María Rosa Bono M.

1. Introducción	211
2. Propiedades generales de las citoquinas	211
3. Receptores de las citoquinas y mecanismos de transducción de señales	219
3.1. Receptores de citoquinas	219
3.2. Transducción de señales	223
4. Principales actividades biológicas de las citoquinas	223
4.1. Inmunidad innata	223
4.1.1. Inmunidad antiviral	224
4.1.2. Citoquinas e inflamación	224
4.2. Citoquinas y respuesta inmune	225
4.2.1. Citoquinas y diferenciación de células linfoides	225
4.2.2. Células Th1 y Th2	226
4.2.3. Activación de linfocitos B	228
4.2.4. Respuesta inmune específica mediada por células	228
4.3. Citoquinas y hematopoyesis	229
4.3.1. Factores estimuladores de colonias	230
4.3.2. Otras citoquinas estimuladoras de la hematopoyesis	231
4.3.3. Citoquinas supresoras	232
5. Quimioquinas	232
5.1. Quimioquinas en la diferenciación linfocitaria	232
5.2. Quimioquinas en la recirculación de los linfocitos a través de los órganos linfoides secundarios	234
5.3. Quimioquinas en el “homing” de los linfocitos a sitios efectoros periféricos	235
5.4. Quimioquinas y enfermedades	235
5.5. Quimioquinas y terapia	237

Capítulo 12 RECEPTORES DE ADHESIÓN, “HOMING” Y ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS	239
--	-----

Dr. Jorge Rodrigo Mora S. y Prof. Dr. Mario Rosemblatt S.

1. Introducción	241
2. Modelo general de adhesión leucocitaria	242
3. Receptores de adhesión y sus ligandos	244
3.1. Receptores de adhesión de la familia de las integrinas	245
3.2. Receptores de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas (SFIg)	246
3.3. Moléculas de adhesión de la familia de las selectinas	248
4. Interacciones linfocito-endotelio	248
4.1. Tráfico linfocitario a través del endotelio inflamado	250
4.2. Tráfico linfocitario a través del endotelio columnar (HEV)	252
4.3. Tráfico linfocitario hacia la piel	253
5. Regulación del posicionamiento (“homing”) de linfocitos	253
6. Receptores de adhesión en la diferenciación y activación linfocitaria	257
6.1. Receptores de adhesión y diferenciación temprana en la médula ósea	257
6.2. Receptores de adhesión y diferenciación en el microambiente de los OLS	258

Capítulo 13 ONTOGENIA Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS B Y T	261
--	-----

Dr. Rodrigo Naves P. y Prof. Dr. Mario Rosemblatt S.

1. Introducción	263
-----------------	-----



2.	Regulación génica de la diferenciación linfocitaria	264
3.	Diferenciación y maduración de linfocitos B	266
3.1.	Etapa antígeno-independiente	266
3.2.	Etapa antígeno-dependiente	267
4.	Diferenciación y maduración de linfocitos T	269
4.1.	Migración de los precursores de linfocitos T	269
4.2.	Diferenciación	269
4.3.	Selección tímica	271

Capítulo 14 275

REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Prof. Dr. Ulises Vergara C., Dr. Claudio Zúñiga M. y Prof. Dr. Iván Palomo G.

1.	Introducción	277
2.	Regulación de la respuesta inespecífica	277
2.1.	Regulación del sistema del complemento	277
2.2.	Regulación de la acción de células NK	277
3.	Regulación de la respuesta inmune específica	278
3.1.	Mecanismos inmunológicos y no inmunológicos de regulación	279
3.2.	Deleción y anergia clonal. Tolerancia inmunológica	280
3.3.	Activación de linfocitos T supresores	281
3.4.	Regulación mediante linfocitos Th1 y Th2	282
3.5.	Regulación idiotípica o red idiotipo-anti-idiotipo	283
3.6.	Regulación o “feedback” por anticuerpos y complejos inmunes	284
3.7.	Regulación por Prostaglandinas	286
3.7.1.	Prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	286
3.7.2.	Prostaglandina 15-d PGJ ₂	286

Capítulo 15 289

NEUROINMUNOLOGÍA

Prof. Dr. Hugo Folch V., Dr. Miguel Barría M. y Prof. Dr. Patricio Esquivel S.

1.	Introducción	291
2.	Interacciones entre el sistema nervioso central, sistema endocrino y sistema inmune	292
2.1.	Inervación de los órganos linfoides	293
2.2.	Existencia de un eje Sistema nervioso central-hipófisis-sistema inmune	293
2.3.	El SNC tiene “conocimiento” de la entrada de antígeno al organismo y responde a él	294
2.4.	El sistema inmune produce hormonas	294
2.5.	El sistema inmune tiene receptores para hormonas y neuropéptidos	295
2.6.	Otras señales derivadas del sistema inmune tienen efecto en el sistema neuroendocrino	295
3.	Resultante de la interacción del sistema nervioso, sistema endocrino y el sistema inmune: evidencias en el organismo vivo que demuestran su efecto en la respuesta inmune	297
3.1.	Efecto del “stress” en la respuesta inmune	297
3.2.	Depresión e inmunidad	297
3.3.	Efecto de los factores sociales en la respuesta inmune	297
3.4.	Las drogas psicoactivas alteran el funcionamiento del sistema linfoide	298
3.5.	Las hormonas sexuales modulan la respuesta autoinmune	298
4.	Algunos casos en que el sistema inmune origina cambios o trastornos en el sistema nervioso	298
4.1.	Efecto de los anticuerpos a nivel del sistema nervioso	298
4.2.	Efecto de complejos antígeno-anticuerpo en el sistema nervioso central	298
4.3.	Rol patogénico de linfocitos T, macrófagos y citoquinas en el tejido nervioso	298



Capítulo 16 299

INMUNIDAD DE MUCOSAS

Prof. Dr. Ulises Vergara C. y Prof. Dr. Iván Palomo G.

1. Introducción 301
2. Sistema inmune de mucosas 302
 - 2.1. Organización estructural 302
 - 2.2. Transporte y presentación de antígenos 304
3. Funciones efectoras de la inmunidad de mucosas 305
 - 3.1. Respuesta inmune de anticuerpos 305
 - 3.2. Respuesta inmune celular 306
4. Inmunización a través de mucosas 307
 - 4.1. Uso de adyuvantes 308
5. Tolerancia inducida a través de mucosas 309

Capítulo 17 311

INMUNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Prof. Dra. Mónica Imarai B. y Prof. Dra. Juana Villegas M.

1. Introducción 313
2. El sistema inmune asociado a la mucosa reproductiva 314
 - 2.1. El sistema inmune asociado a la mucosa reproductiva de la hembra 314
 - 2.2. El sistema inmune asociado a la mucosa reproductiva del macho 316
3. Inducción de la respuesta inmune en la mucosa reproductiva 316
 - 3.1. Inducción de la respuesta inmune en la mucosa reproductiva de la hembra 316
 - 3.2. Respuesta inmune a las infecciones en la mucosa reproductiva de la mujer 317
4. El sistema inmune local en el embarazo 318
 - 4.1. La Interfase materno fetal 318
 - 4.2. Expresión de MHC en las células trofoblásticas 318
 - 4.3. Las células NK de la decidua 319
 - 4.4. Los linfocitos T de la decidua 319
 - 4.5. Citoquinas en la preñez 320
5. Factores inmunológicos que afectan la fertilidad 320
 - 5.1. Aborto espontáneo recurrente de causa inexplicada 320
 - 5.2. Anticuerpos antiespermáticos 321

SECCIÓN III: MECANISMOS EFECTORES DE LA RESPUESTA INMUNE 325

Capítulo 18 327

SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Prof. Dr. Arturo Ferreira V. y Prof. Dr. Julio Scharfstein

1. Introducción 329
2. Generalidades sobre la activación y regulación del Sistema del Complemento 331
 - 2.1. Generación de enlaces covalentes por parte de C3b y C4b, al reaccionar con estructuras de las superficies atacadas por el sistema 335
 - 2.2. Las C3 y C5 convertasas de las rutas clásica y alterna son funcionalmente homólogas 336
3. Ruta clásica: algunos detalles moleculares 337
 - 3.1. Unión C1 337
 - 3.2. Activación de C4 y C2 338
 - 3.3. Convertasa de C3 339
 - 3.4. Convertasa de C5 340
 - 3.5. Mecanismos que confinan la activación del complemento a las membranas blanco ("target") o culpables 340
 - 3.6. Rutas de las lectinas 340



4.	Ruta alterna: algunos detalles moleculares	341
4.1.	Activación de la ruta alterna	342
4.2.	Papel de la properdina	344
5.	Fase terminal: generación del complejo destructor de membranas	344
5.1.	Generación de C5-8	344
5.2.	Polimerización de C9	345
5.3.	Efecto funcional de la inserción del MHC en las membranas	346
5.4.	Perspectivas futuras del estudio de la fase final de la activación del complemento	347
6.	Algunos aspectos genéticos del Complemento	347
7.	Complemento y enfermedad	347

Capítulo 19 349

INMUNIDAD MEDIADA POR CÉLULAS

Dra. Luz Blanco P. y Prof. Dr. Javier Puente P.

1.	Introducción	351
2.	Citolisis mediada por linfocitos T	352
2.1.	Mecanismo membranolítico	355
2.2.	Mecanismo dependiente de la interacción FasL-Fas	356
3.	Citolisis mediada por célula NK	358
3.1.	Citotoxicidad mediada por células NK	358
3.2.	Receptor FcγRIIIA (CD16)	360
4.	Métodos de estudio del proceso citolítico	361
5.	Hipersensibilidad retardada (HR)	362

Capítulo 20 365

RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR IgE

Prof. Dr. Arnoldo Quezada L. y Dr. Edgardo Carrasco C.

1.	Introducción	367
2.	Características de la IgE	367
3.	Mastocitos y Basófilos	367
4.	Receptores para IgE y liberación de mediadores	368
5.	Regulación de la síntesis de IgE	371
6.	Rol biológico de la respuesta mediada por IgE	372
7.	Aplicaciones biomédicas	373

SECCIÓN IV: INMUNOLOGÍA CLÍNICA 375

Capítulo 21 377

HIPERSENSIBILIDAD

Prof. Dr. Arnoldo Quezada L. y Dra. Ximena Norambuena R.

1.	Introducción	379
2.	Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad	380
3.	Hipersensibilidad inmediata mediada por IgE (tipo I)	381
4.	Hipersensibilidad citotóxica (tipo II)	382
5.	Hipersensibilidad mediada por complejos inmunes (tipo III)	383
6.	Hipersensibilidad retardada mediada por células (tipo IV)	384

Capítulo 22 387

ANAFILAXIS

Prof. Dra. Patricia Díaz A.

1.	Introducción	389
2.	Fisiopatología	389



2.1.	Mastocitos	389
2.2.	Degranulación de mastocitos y basófilos	390
2.3.	Participación de cascadas de la inflamación en la reacción anafiláctica y anafilactoidea	393
2.4.	Alteraciones Funcionales	393
3.	Causas de anafilaxis	394
3.1.	Fármacos	394
3.2.	Látex	394
3.3.	Picaduras de himenópteros	394
3.4.	Alimentos	394
3.5.	Anafilaxis inducida por inmunoterapia	395
3.6.	Anafilaxis inducida por ejercicio	395
3.7.	Anafilaxis idiopática	395
4.	Causas de reacciones anafilactoideas	395
4.1.	Aditivos	395
4.2.	Medios de contraste	395
4.3.	Ácido acetil salicílico (AAS) y anti-inflamatorios no esteroideos (AINE)	395
5.	Reacciones anafilácticas y anafilactoideas en pabellones quirúrgicos	396
6.	Signos y síntomas	396
7.	Laboratorio	397
8.	Tratamiento	397

Capítulo 23 399

AUTOINMUNIDAD

Dra. Ana María Agar M. y Dra. María Angélica Marinovic M.

1.	Introducción	401
2.	Formas clínicas y características comunes	401
3.	HLA y enfermedades autoinmunes	403
4.	Patogenia de las enfermedades autoinmunes	404
5.	Autotolerancia	404
5.1.	Falla de la tolerancia central del linfocito T	405
5.2.	Falla de la tolerancia periférica del linfocito T	405
5.3.	Falla de la tolerancia del linfocito B	405
6.	Citoquinas y enfermedades autoinmunes	406
7.	Nuevos tratamientos	407

Capítulo 24 409

ENFERMEDADES REUMÁTICAS

Prof. Dr. Sergio Jacobelli G. y Prof. Dr. Santiago Rivero D.

1.	Introducción	411
2.	Artritis Reumatoidea	411
2.1.	Patogenia	412
2.1.1.	Genética	412
2.1.2.	Infecciones	413
2.1.3.	Autoinmunidad	414
2.2.	Clínica y tratamiento	416
3.	Lupus eritematoso sistémico	416
3.1.	Patogenia	416
3.1.1.	Factores genéticos	417
3.1.2.	Factores ambientales	417
3.1.3.	Disregulación del sistema inmune	417
3.1.4.	Inflamación y daño celular/tisular	419
3.2.	Clínica y tratamiento	419



Capítulo 25 423

SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO

Prof. Dr. Iván Palomo G., Prof. Dr. Antonio Cabral, Prof. Dra. Silvia Pierangeli y Prof. Dr. Ricardo Forastiero V.

1.	Introducción	425
2.	Antígenos y anticuerpos	425
2.1.	Antígenos	425
2.2.	Anticuerpos	426
3.	Mecanismos de trombosis	427
3.1.	Biosíntesis de eicosanoides e isoeicosanoides	427
3.2.	Sistema antitrombótico de la proteína C	428
3.3.	Vía del factor tisular	428
3.4.	Sistema fibrinolítico	428
3.5.	Anexinas y activación celular	428
3.6.	Inmunidad celular y perfil de citoquinas	429
3.7.	Asociación con factores genéticos de riesgo trombótico	429
4.	Manifestaciones clínicas	429
4.1.	Manifestaciones vaso-oclusivas	429
4.2.	Manifestaciones hemocitopénicas	430
4.3.	Otras manifestaciones	430
5.	Laboratorio	430
5.1.	Anticardiolipina por ELISA	431
5.2.	Anticoagulante Lúpico	432
5.3.	Pruebas de laboratorio más específicas para el diagnóstico de SAF	432
5.4.	¿Qué pruebas de laboratorio se deben usar en el diagnóstico de SAF?	432
6.	Tratamiento	433

Capítulo 26 437

CITOPENIAS INMUNES

Prof. Dr. Iván Palomo G., Prof. Dr. Jaime Pereira G. y Prof. MgCs. Marcela Vásquez R.

1.	Introducción	439
2.	Anemias hemolíticas inmunes	439
2.1.	Sistemas antigénicos de los glóbulos rojos	439
2.2.	Anemias hemolíticas inmunes	441
2.2.1.	Anemias hemolíticas aloinmunes	442
2.2.2.	Anemias hemolíticas autoinmunes	443
3.	Trombocitopenias inmunes	445
3.1.	Sistemas antigénicos de las plaquetas	446
3.2.	Trombocitopenias inmunes	447
3.2.1.	Trombocitopenias aloinmunes	449
3.2.2.	Trombocitopenias autoinmunes	451
4.	Neutropenias inmunes	453
4.1.	Sistemas antigénicos de los neutrófilos	453
4.2.	Neutropenias inmunes	454
4.2.1.	Neutropenias aloinmunes	454
4.2.2.	Neutropenias autoinmunes	455

Capítulo 27 459

GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

Prof. Dra. Mireya Silva B. y Prof. Dr. Mauricio Oqueteaux T.

1.	Introducción	461
2.	Estudio inmunológico de las gammapatías monoclonales	462
2.1.	Pesquisa de una proteína monoclonal	462



2.2.	Identificación de una proteína monoclonal	463
2.3.	Cuantificación de inmunoglobulinas	465
2.4.	Viscosidad sérica	465
2.5.	Beta-2 microglobulina	465
2.6.	Proteína C reactiva	465
2.7.	Interleuquina-6	466
2.8.	Estudios inmunológicos en orina	466
3.	Gammapatía monoclonal de significado incierto	466
3.1.	Aspectos generales	466
3.2.	Evolución de las MGUS en el tiempo	466
4.	Mieloma múltiple	467
4.1.	Manifestaciones clínicas	467
4.2.	Pronóstico	468
5.	Variedades infrecuentes de mieloma múltiple y otras gammapatías	469
5.1.	Mieloma "indolente"	469
5.2.	Leucemia de células plasmáticas	470
5.3.	Mieloma osteoesclerótico	470
5.4.	Plasmocitoma extramedular	470
5.5.	Plasmocitoma óseo solitario	470
5.6.	Macroglobulinemia de Waldenström (MW)	470
5.7.	Enfermedad de cadenas livianas	470
5.8.	Amiloidosis primaria	471
5.9.	Enfermedad por cadenas pesadas	471
6.	Diagnóstico diferencial entre MGUS y MM	471
7.	Patogenia	472
7.1.	Papel de la IL-6 y vía de la ciclina D1	472
7.2.	Genes supresores de tumores	473
7.3.	Apoptosis de CPs	473
7.4.	Papel del estroma en las discrasias de CPs	473
8.	Tratamiento	473

Capítulo 28 477

ENFERMEDADES ORALES DE ORIGEN INMUNOLÓGICO

Prof. Dr. Benjamín Martínez R.

1.	Introducción	479
2.	Reacciones de hipersensibilidad orales	479
3.	Manifestaciones orales de inmunodeficiencias	480
3.1.	Candidiasis oral en infección por VIH	480
3.2.	Leucoplasia pilosa	482
3.3.	Sarcoma de Kaposi	482
4.	Enfermedades autoinmunes orales	482
4.1.	Síndrome de Sjögren	482
4.2.	Úlcera oral recurrente (aftas)	484

Capítulo 29 489

OTRAS ENFERMEDADES INMUNOMEDIADAS

Prof. Dra. Cecilia Sepúlveda C.

1.	Introducción	491
2.	Algunas enfermedades inmunomediadas	491
2.1.	Lupus eritematoso sistémico	491
2.2.	Artritis reumatoidea	492
2.3.	Enfermedades mediadas por anticuerpos	492
2.4.	Otras enfermedades	494



Capítulo 30 495

INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

Prof. Dra. Mónica Cornejo De L. y Prof. Dra. Marta Zelazko de Ch.

1. Introducción 497
2. Inmunodeficiencias primarias 499
 - 2.1. Aspectos genéticos de las IDP 499
 - 2.2. Estudios de laboratorio inmunológico para el diagnóstico de IDP 500
 - 2.3. Características de las IDP 501
 - 2.3.1. Defectos predominantemente de anticuerpos 501
 - 2.3.2. Defectos combinados de células T y B 503
 - 2.3.3. Inmunodeficiencias asociadas a otros defectos 507
 - 2.3.4. Defectos congénitos de inmunidad natural 508
 3. Tratamiento de las inmunodeficiencias congénitas 509

Capítulo 31 511

INMUNODEFICIENCIAS SECUNDARIAS

Dra. María Antonieta Guzmán M. y Prof. Dra. Cecilia Sepúlveda C.

1. Introducción 513
2. Infección por VIH y SIDA 513
 - 2.1. Magnitud del problema 514
 - 2.2. Características del virus 514
 - 2.3. Progresión de la infección por VIH-1 517
 - 2.4. Ingreso al organismo 517
 - 2.5. Respuesta inmune anti-VIH 518
 - 2.6. Diagnóstico de laboratorio 530
 - 2.7. Tratamiento 530
3. Sistema inmune fetal y neonatal 519
 - 3.1. Inmunidad celular 519
 - 3.2. Inmunidad humoral 519
 - 3.3. Inmunidad innata 519
4. Envejecimiento y sistema inmune 520
 - 4.1. Inmunidad celular 520
 - 4.2. Inmunidad humoral 521
5. Inmunidad y nutrición 521
 - 5.1. Inmunidad celular 522
 - 5.2. Déficit de nutrientes específicos 522
6. Inmunodeficiencia inducida por cirugía y trauma 522
7. Inmunodeficiencia secundaria a enfermedades infecciosas 523
 - 7.1. Inmunodeficiencia secundaria a infecciones virales 523
 - 7.2. Inmunodeficiencia secundaria a infecciones bacterianas y fúngicas 524
 - 7.3. Inmunodeficiencia secundaria a infecciones parasitarias 525
8. Inmunodeficiencia secundaria a enfermedades infiltrativas y tumores 525
 - 8.1. Evasión de la respuesta inmune por tumores 525
 - 8.2. Defectos inmunológicos en tumores 526
9. Inmunodeficiencia secundaria a terapia inmunosupresora 526
 - 9.1. Mecanismos de acción 526
 - 9.2. Impacto de la inmunodeficiencia asociada a inmunosupresora 529

Capítulo 32 531

INMUNIDAD FRENTE A BACTERIAS

Prof. Dra. Eva Burger; Prof. Dra. Edilia Andrews G. y Prof. Dr. Heriberto Fernández J.

1. Introducción 533



2.	Inmunidad frente a bacterias extracelulares	533
2.1.	Características generales de las bacterias extracelulares	533
2.2.	Mecanismos de inmunidad natural	534
2.2.1.	Mecanismos comunes a bacterias extra e intracelulares	534
2.2.2.	Inmunidad natural a bacterias extracelulares	535
2.3.	Inmunidad adquirida a bacterias extracelulares	536
2.3.1.	Neutralización de toxinas o enzimas bacterianas por anticuerpos	536
2.3.2.	Efectos directos del sistema del complemento	536
2.3.3.	Efecto conjunto de anticuerpo, complemento y lisozima	536
2.3.4.	Opsonización y facilitación de la fagocitosis	536
3.	Inmunidad frente a bacterias intracelulares	537
3.1.	Características generales de las bacterias intracelulares	537
3.2.	Inmunidad natural a bacterias intracelulares	537
3.2.1.	Células NK	537
3.2.2.	Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos	538
3.3.	Inmunidad adquirida a bacterias intracelulares	538
3.3.1.	Macrófagos activados	538
3.3.2.	Linfocitos T	538
3.3.3.	Efecto conjunto de linfocitos T CD4+ y CD8+	539
3.3.4.	Linfocitos T- $\gamma\delta$	539
3.3.5.	Citoquinas	539
3.3.6.	Granulomas	540
4.	Análisis comparativo del desarrollo de inmunidad en infecciones por bacterias extracelulares e intracelulares	540
5.	Estrategias de intervención inmune en relación a bacterias intracelulares	540
5.1.	Tipos de vacunas para bacterias intracelulares en uso	541
5.2.	Desarrollo de nuevas vacunas	541
5.2.1.	Identificación de antígenos protectores	541
5.2.2.	Cepas vaccinales atenuadas y recombinantes	541
5.2.3.	Vacunas de subunidades y empleo de adyuvantes	541
5.2.4.	Vacunas DNA	542

Capítulo 33 545

INMUNIDAD FRENTE A HONGOS

Prof. Dra. Eva Burger, Prof. Dr. Luiz Zaror C., y Prof. Dr. Heriberto Fernández J.

1.	Introducción	547
1.1.	Consideraciones históricas	547
1.2.	Características generales de algunos hongos oportunistas	547
1.3.	Características generales de algunos hongos patógenos	548
1.4.	Características generales de los dermatofitos	548
1.5.	Conceptos sobre inmunidad a hongos patógenos	549
2.	Inmunidad natural	549
2.1.	Factores hormonales	549
2.2.	Concentración de hierro	549
2.3.	Sistema del complemento	550
2.4.	Células “natural killer” (NK)	550
2.5.	Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN)	550
2.6.	Macrófagos	550
3.	Inmunidad humoral a hongos	551
3.1.	Papel de la inmunidad humoral	551
3.2.	Mecanismos protectores de la inmunidad humoral	551
4.	Inmunidad celular a hongos	552
4.1.	Macrófagos	552



4.2.	Linfocitos T	522
4.3.	Citoquinas	553
4.4.	Granulomas	553
5.	Mecanismos de inmunidad protectora	554
5.1.	Mecanismo principal	554
5.2.	Otros mecanismos	555

Capítulo 34 557

RESPUESTA INMUNE FRENTE A VIRUS

Prof. Dr. José M. Ojeda F. y Prof. Dr. Jorge A. Fernández V.

1.	Introducción	559
2.	Infección viral	560
2.1.	Interacción virus-huésped	560
3.	Respuesta inmune en infecciones virales	560
3.1.	Inmunidad antiviral natural	561
3.1.1.	Producción de IFN tipo I y otras citoquinas	561
3.1.2.	Células NK	561
3.1.3.	Activación del complemento y fagocitosis	561
3.2.	Inmunidad antiviral específica	562
3.2.1.	Inmunidad humoral	562
3.2.2.	Inmunidad celular	562
3.3.	Evasión de la respuesta inmune por virus	564
3.3.1.	Persistencia intracelular	564
3.3.2.	Variación antigénica	564
3.3.3.	Interacción con componentes del sistema inmune	565
3.3.4.	Interferencia con la presentación antigénica	565
3.3.5.	Simulación molecular	566
3.3.6.	Inmunosupresión	566

Capítulo 35 567

INMUNIDAD FRENTE A PARÁSITOS

Prof. Dr. Ulises Vergara C. y Prof. Dr. Jorge González C.

1.	Introducción	569
2.	Respuesta inmune frente a protozoos	570
2.1.	Desarrollo de inmunidad protectora	572
2.2.	Activación de macrófagos infectados	574
2.3.	Activación de linfocitos T CD8+	575
2.4.	Rol de los anticuerpos en el control de protozoos	575
3.	Respuesta inmune frente a nemátodos intestinales	576
3.1.	Aspectos generales de la respuesta inmune	577
3.1.1.	Enterocitos	577
3.1.2.	Inmunoglobulinas	577
3.1.3.	Linfocitos	578
3.1.4.	Células mieloides	578
3.2.	Respuesta Th2 y protección inmunológica	578
3.2.1.	Mecanismos efectores y resistencia a la infección	579
3.3.	Respuesta Th1 y susceptibilidad a la infección	579
4.	Respuesta inmune frente a tremátodos intestinales	580
4.1.	Inmunidad protectora frente a Schistosoma	581
4.1.1.	Eosinófilos	582
4.1.2.	Macrófagos	582
4.2.	Inmunidad en la rata	583
4.3.	Inmunidad en el ratón	583
4.4.	Interferencia con la inmunidad	584



Capítulo 36 587

VACUNAS

Prof. Dr. Ulises Vergara C. y Prof. Dr. Rosario Billetta

1. Introducción 587
2. Vacunas naturales o tradicionales 590
3. Vacunas recombinantes 593
4. Vacunas anti-idiotípicas 596
5. Vacunas sintéticas 596
6. Vacunas de DNA 598
7. Vacunas Genómicas 600
8. Adyuvantes, inmunomoduladores e inmunogenicidad 600

Capítulo 37 605

MECANISMOS DE INMUNIDAD ANTITUMORAL

Prof. Dr. Flavio Salazar O. y Prof. Dr. Javier Puente P.

1. Introducción 607
2. Defensa inmunológica contra el cáncer 608
 - 2.1. La hipótesis de vigilancia inmunológica antitumoral 608
 - 2.2. Componentes de la respuesta inmune antitumoral 608
 - 2.2.1. Respuesta inmunológica humoral 609
 - 2.2.2. Respuesta inmunológica celular 609
3. Antígenos asociados a tumores 610
 - 3.1. Clasificación de AAT reconocidos por LT 610
4. Estrategias tumorales de evasión inmunológica 610
 - 4.1. Disminución de la expansión de las moléculas MHC 610
 - 4.2. Factores inmunosupresores producidos por los tumores 613
5. Terapia inmunológica contra el cáncer 613
 - 5.1. Anticuerpos monoclonales 613
 - 5.2. Terapia biológica contra el cáncer 614
 - 5.2.1. Utilización de citoquinas 615
 - 5.2.2. Terapia celular adoptiva 615
 - 5.3. Inmunización activa contra tumores 617

Capítulo 38 619

MECANISMOS INMUNOLÓGICOS DEL RECHAZO DE ALOINJERTOS

Prof. Dra. Cecilia Sepúlveda C.

1. Introducción 621
2. Rechazo de aloinjertos 621
 - 2.1. Presentación directa de aloantígenos 622
 - 2.2. Presentación indirecta de aloantígenos 622
 - 2.3. Células que participan en el rechazo 623
3. Mecanismos efectores del rechazo 623
 - 3.1. Rechazo hiperagudo 623
 - 3.2. Rechazo agudo 624
 - 3.3. Rechazo crónico 624
4. Prevención y tratamiento del rechazo 624
 - 4.1. Inmunosupresión 624
 - 4.2. Selección de donantes 625
 - 4.3. Inducción de tolerancia 625



Capítulo 39 627

INMUNOMODULADORES

Prof. Dra. Cecilia Sepúlveda C. y Dra. María Antonieta Guzmán M.

1. Introducción 629
2. Principales Inmunomoduladores 629
 - 2.1. Antiproliferativos 629
 - 2.2. Antagonistas de las Inmunofilinas 630
 - 2.3. Glucocorticoides 631
 - 2.4. Agentes biológicos 631
 - 2.5. Citoquinas 632
 - 2.6. Trasplante de médula ósea 633
 - 2.7. Células autólogas modificadas 633
 - 2.8. Isoprinosine 633
3. Efectos Adversos de los Inmunomoduladores 633

SECCIÓN V: MÉTODOS INMUNOLÓGICOS Y DE BIOLOGÍA MOLECULAR 635

Capítulo 40 637

MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS

Dr. Darwins Castillo A. y BQ. Carolina Valenzuela B.

1. Introducción 640
2. Inmunoanálisis 641
 - 2.1. Inmunoanálisis con reactivos no marcados 641
 - 2.1.1. Reacción de precipitación 641
 - 2.1.1.1. Reacción de precipitación en medio líquido 641
 - a) Precipitación en tubo 641
 - b) Floculación 642
 - c) Turbidimetría 642
 - d) Nefelometría 643
 - e) Precipitación de complejos inmunes solubles 643
 - 2.1.1.2. Reacción de precipitación en gel 643
 - a) Inmunodifusión doble 643
 - b) Inmunodifusión radial 644
 - c) Inmunoelectroforesis 644
 - d) Inmunofijación 645
 - e) Contrainmunoelectroforesis 645
 - f) "Rocket" inmunoelectroforesis 646
 - g) Inmunoelectroforesis cruzada o bidimensional de Laurell 647
 - 2.1.2. Reacción de aglutinación 647
 - a) Aglutinación directa 647
 - b) Aglutinación indirecta 648
 - c) Aglutinación pasiva 648
 - 2.1.3. Reacción con participación del complemento 648
 - a) Fijación del complemento 648
 - b) Actividad hemolítica del complemento 648
 - 2.2. Inmunoanálisis con reactivos marcados 648
 - 2.2.1. Inmunoanálisis fluorescente 648
 - a) Microscopía inmunofluorescente 648
 - b) Inmunoanálisis de fluorescencia polarizada 649
 - c) Inmunoanálisis de fluorescencia unida a enzima 650
 - d) Citometría de flujo 650



2.2.2.	Enzimainmunoanálisis (EIA)	650
a)	EIA homogéneo	650
b)	EIA heterogéneo	651
c)	Electroinmunotransferencia o “Western blot” o “Immunoblotting”	651
2.2.3.	Radioinmunoanálisis (RIA)	652
a)	RIA en fase soluble	652
b)	RIA en fase sólida	652
c)	Detección inmunorradiométrica para antígeno	652
2.2.4.	Quimiluminiscencia	652
2.2.5.	Bioluminiscencia	652

Capítulo 41 655

MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA INMUNIDAD CELULAR

Prof. Dr. Jorge González C. y Dra. Pilar Vega C.

1.	Introducción	657
2.	Preparación y aislamiento de diferentes poblaciones celulares	658
2.1.	Métodos de purificación tradicionales	658
2.2.	Separación inmunomagnética	659
3.	Estudio de la respuesta inmune celular específica	660
3.1.	Estudio de las subpoblaciones de linfocitos	660
3.2.	Estudio de las funciones de inmunidad celular específica	662
3.3.	Estudio de la síntesis de citoquinas y sus receptores	670
3.4.	“DNA microarrays”	675
3.5.	Pruebas para evaluar reacciones de hipersensibilidad retardada (RHR)	676
3.6.	Estudios de la especificidad de células T	676
3.7.	Detección de células T “supresoras”	677
4.	Estudio de la inmunidad celular inespecífica	678
4.1.	Ensayos funcionales de neutrófilos	678
4.2.	Ensayos funcionales de eosinófilos	679
4.3.	Funciones de monocitos y macrófagos	679
5.	Evaluación de laboratorios del paciente infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana.	
	Un modelo del estudio de las deficiencias en la respuesta celular	682
5.1.	Estudio fenotípico de linfocitos	682
5.2.	Estudio de la respuesta proliferativa	683
5.3.	Estudio de la respuesta citotóxica	683
5.4.	Evaluación de los niveles de citoquinas y subpoblaciones de linfocitos T	684

Capítulo 42 685

LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y TRASPLANTE DE ÓRGANOS

Dra. Susana Elgueta M., BQ. Alejandra Arenas C. y Prof. Dra. Cristina Navarrete

1.	Introducción	687
2.	Nomenclatura HLA	689
2.1.	Herencia	690
3.	Tipificación HLA	691
3.1.	Técnica serológica	691
3.2.	Técnica celular	692
3.3.	Técnica molecular	692
4.	Anticuerpos HLA	693
4.1.	Anticuerpos reactivos con panel	693
4.2.	Crossmatch	694
5.	Requerimientos de histocompatibilidad para trasplante	695
6.	Otras aplicaciones de la tipificación HLA	696



Capítulo 43 699

CITOMETRÍA DE FLUJO: PRINCIPIOS BÁSICOS Y APLICACIONES

Téc. Quím. Valeska Simon Z. y Prof. Dra. María Rosa Bono

1.	Introducción	701
2.	Principios generales	701
2.1.	Sistemas de fluidos	702
2.2.	Sistema óptico	703
2.3.	Sistema electrónico	703
2.4.	Reactivos para citometría de flujo	704
3.	Aplicaciones de la citometría de flujo	705
3.1.	Determinación de poblaciones celulares	705
3.2.	Fenotipificación de neoplasias hematológicas	708
3.2.1.	Fenotipificación de leucemias	708
3.2.2.	Fenotipificación de linfomas	710
3.3.	Enfermedad de Hodgkin	713
3.4.	Trasplante de médula ósea	713
3.5.	Análisis de DNA y ciclo celular	714
3.6.	Análisis de enfermedad residual mínima	715

Capítulo 44 719

ANTICUERPOS MONOCLONALES

Prof. Dra. María Inés Becker C. y Prof. Dr. Alfredo E. De Ioannes I.

1.	Introducción	722
2.	Fundamentos del desarrollo de hibridomas	722
2.1.	Mielomas	722
2.2.	Fusión celular	723
2.3.	Medio de selección	723
3.	Etapas de la producción de hibridomas murinos	724
3.1.	Inmunización	724
3.2.	Fusión	725
3.3.	Selección y crecimiento	726
3.4.	Subclonación y congelación	727
3.5.	Cultivo masivo	727
4.	Anticuerpos monoclonales versus anticuerpos policlonales	727
4.1.	Especificidad	727
4.2.	Avidez y afinidad	729
5.	Aplicaciones de los anticuerpos monoclonales	729
5.1.	Investigación básica	729
5.2.	Medicina	730
5.3.	Biotecnología	731
6.	Otros tipos de hibridomas	731
6.1.	Heterohibridomas	731
6.2.	Hibridomas humanos	732

Capítulo 45 737

MÉTODOS FUNDAMENTALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Prof. Dr. Claudio Vásquez G. y Prof. Dr. Enrique González V.

1.	Introducción	739
2.	Bases de la Biología Molecular	739
2.1.	El DNA es el material genético	740
2.2.	Componentes del DNA	740
2.3.	Estructura del DNA	741
3.	Las nuevas tecnologías	741



3.1.	Endonucleasas de restricción	742
3.2.	Clonamiento del DNA	742
3.3.	Transferencia de “Southern”	743
3.4.	Transformación de células	743
3.5.	Secuenciación del DNA	744
3.6.	Reacción de la polimerasa en cadena	745
3.7.	Animales transgénicos y “knock out” de genes	746
4.	La expresión génica en organismos eucarióticos	747
4.1.	Estructura de los genes eucarióticos	747
4.2.	El proceso de expresión génica y sus etapas	748
4.3.	La expresión diferencial de genes y su regulación	749
5.	Métodos de análisis de la expresión génica	752
5.1.	Hibridación “Northern”	752
5.2.	Reacción de la polimerasa en cadena acoplada a la reacción de la transcriptasa reversa (RT-PCR)	753
5.3.	Análisis del perfil transcripcional mediante el método de “differential display” de mRNAs.	753
5.4.	Hibridación sustractiva	755

Capítulo 46 757

GRUPOS DE DIFERENCIACIÓN ANTIGÉNICA

Prof. Dr. Iván Palomo G., Prof. Dr. Flavio Carrión A. y Prof. Dr. Cristián Rodríguez G.

1.	Introducción	759
2.	Estructura de los antígenos de membrana	775
2.1.	Proteínas de transmembrana tipo I	775
2.2.	Proteínas de transmembrana tipo II	775
2.3.	Proteínas de transmembrana tipo III	776
3.	Moléculas CD asociadas a líneas celulares	777
3.1.	Moléculas CD expresadas principalmente en "stem cell"	777
3.2.	Moléculas CD expresadas principalmente en células B	777
3.3.	Moléculas CD expresadas principalmente en células T	778
3.4.	Moléculas CD expresadas principalmente en células NK	779
3.5.	Moléculas CD expresadas principalmente en granulocitos	780
3.6.	Moléculas CD expresadas principalmente en monocitos-macrófagos	780
3.7.	Moléculas CD expresadas principalmente en plaquetas	780
4.	Familias de moléculas CD	781
5.	Algunas aplicaciones de la nomenclatura CD en Inmunología	781

GLOSARIO 785

ÍNDICE ALFABÉTICO GENERAL DE MATERIAS 801



PREFACIO

Nuestras primeras palabras queremos que sean para dedicar un homenaje póstumo a **César Milstein**, quien junto a George Köhler, en la década del setenta, desarrollaron la metodología para obtener anticuerpos monoclonales. Tal importancia científica representó su aporte, que recibieron el Premio Nobel en 1984 (ver capítulo 2). El Dr. Milstein, nació el 8 de octubre de 1927 (Bahía Blanca, Argentina) y falleció a comienzos del presente año. Después de obtener el Doctorado en Química en la Universidad de Buenos Aires (1957), obtuvo el grado de PhD en la Universidad de Cambridge, Inglaterra, institución en la que trabajaba cuando recibió el máximo premio científico. Su conferencia (Nobel Lecture, 8 de diciembre, 1984) se tituló “From the structure of antibodies to the diversification of the immune response”. Dada la importancia de esta herramienta en el estudio molecular de diversas macromoléculas y que su aplicación se realiza tanto en ciencias básicas como en clínica, dedicamos un capítulo del libro a la descripción de los anticuerpos monoclonales (capítulo 44).

Por otra parte, en las personas de Walter Gilbert, Francis Collins y J. Craig Venter, queremos expresar nuestro reconocimiento a todos los científicos que participaron en uno de los más importantes avances de la biología moderna, nos referimos a la decodificación del genoma humano. Mientras trabajábamos en la edición de este libro: **Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica**, la noticia recorrió el mundo, a mediados de 2000, primero, y luego a comienzos de 2001. Alrededor de 50 años después que James Watson y Francis Crick publicaran en Nature (Abril de 1953) la estructura del DNA, dos grupos de investigadores (del Proyecto Genoma Humano y de una compañía privada), publicaron, en febrero de 2001, en Nature y Science, respectivamente, la información sobre el genoma humano. Describieron que los humanos tenemos alrededor de 30.000 genes, número significativamente menor de los, aproximadamente, 80.000 que se esperaba. Deseamos que el nuevo conocimiento que se generará en los próximos años, a partir de este significativo avance científico, sea utilizado en la búsqueda de terapias para las casi cinco mil enfermedades genéticas conocidas y en el tratamiento del cáncer.

Adicionalmente, queremos expresar en estas líneas nuestro reconocimiento a los inmunólogos, ex-académicos de la Universidad de Chile, Dra. Olga Pizarro y Dr. Tulio



Pizzi, por sus contribuciones a la inmunología, en el conocimiento de la inmunogenética H2, y por su labor en la formación de especialistas en Inmunología Clínica y los aportes en el ámbito de la Enfermedad de Chagas, respectivamente.

*El libro **Fundamentos de Inmunología** (Julio de 1998, 33 capítulos) representó un aporte significativo a la enseñanza de la Inmunología moderna en Chile. El respaldo del Comité Editorial de la Editorial de la Universidad de Talca, de los inmunólogos, profesores de Inmunología y de los alumnos de pre y postgrado nos compromete a entregar un texto de calidad internacional y que pueda ser utilizado en Chile como también en otros países de lengua española.*

*Este texto cuenta con 46 capítulos, estructurados en cinco secciones: En la sección I, **Generalidades sobre inmunidad**, entre otros aspectos se incluye el capítulo “Introducción a la Inmunología: las bases biológicas de la individualidad celular”, escrito por el Dr. Gustavo Hoecker, destacado Inmunólogo y Premio Nacional de Ciencias; además en la sección hay un capítulo dedicado a las células y órganos del sistema inmune. La sección II, **Especificidad de la respuesta inmune**, trata sobre moléculas del sistema inmune, como por ejemplo las inmunoglobulinas, los receptores de células T, Complejo Principal de Histocompatibilidad y las citoquinas. La sección III, **Mecanismos efectores de la respuesta inmune**, principalmente está dedicada al sistema del complemento y a la citotoxicidad mediada por células. La sección IV, **Inmunología clínica**, se refiere a las enfermedades que presentan un mecanismo patogénico de tipo inmune. Finalmente la sección V, **Métodos inmunológicos y de biología molecular**, presenta los principios de los métodos inmunoquímicos y de inmunidad celular, y de biología molecular.*

Salvo excepciones, los capítulos están escritos por dos o más autores, lo que garantiza una mayor calidad al contenido. Participan 64 inmunólogos; además de destacados inmunólogos chilenos participaron siete inmunólogos de universidades extranjeras (Estados Unidos, Inglaterra, México, Brasil y Argentina), lo cual es una fortaleza que destacamos.

*Por tratarse de un texto docente, con el propósito de facilitar la lectura, en los capítulos se han numerado los subtítulos, y en cada uno de ellos se ha incluido, al comienzo, un **Índice de capítulo** y **Resumen**; y al final las **Lecturas Sugeridas**. Para cerrar el libro se incluye un **Glosario** que comprende los términos inmunológicos más usados y un **Índice alfabético general de materias**.*

En los últimos años se han realizado importantes avances en el conocimiento del Sistema Inmune y en las aplicaciones de la nueva información. Ello justifica que, actualmente, los Planes de Estudios de las carreras de la salud y biológicas en general, incluyan Inmunología como asignatura independiente. Siendo este un libro docente, está dirigido a alumnos de carreras que, en sus Planes de Estudios, tienen esta asignatura: Medicina, Odontología, Medicina Veterinaria, Bioquímica, Química y Farma-



cia, Tecnología Médica, Biotecnología y Licenciatura en Biología, entre otras. Creemos que el libro también será de gran utilidad para alumnos de postgrado y profesionales que se interesen en esta disciplina.

Si bien el texto está escrito en castellano, se usarán algunos términos y siglas en inglés por lo difundido de su uso, como por ejemplo LT “helper”, TCR, entre otros.

Agradecemos a las personas que colaboraron en la edición del libro; a la correctora de textos, Profesora María Cecilia Tapia Castro, por el interés puesto en esta obra como también por su excelente trabajo profesional; a la diseñadora gráfica Marcela Albornoz D. y al BQ Marcos Pérez C., quien realizó las figuras del libro; a la secretaria Haydée Alvarez A., nuestro reconocimiento por su destacada colaboración en el trabajo de preedición.

Agradecemos a las instituciones que han respaldado nuestro trabajo con su patrocinio: la International Union of Immunology Societies (IUIS) en la persona de la Prof. Dr. Genevieve Milon, Chairperson IUIS Education Committee; la Asociación Latinoamericana de Inmunología (ALAI); la Sociedad Chilena de Inmunología (SOCHIN); y la Sociedad Chilena de Alergia e Inmunología. También agradecemos a la Universidad Favaloro (Argentina), Universidad de Chile (Facultades de Medicina, de Ciencias, de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, de Ciencias Veterinarias y Pecuarias), Pontificia Universidad Católica de Chile (Facultad de Ciencias Biológicas), Universidad Austral de Chile (Facultad de Medicina), Universidad de Valparaíso (Facultad de Medicina), Universidad de Santiago de Chile (Facultad de Química y Biología), Universidad de la Frontera (Facultad de Medicina), Universidad de Antofagasta (Facultad de Ciencias de la Salud), Universidad de Talca (Facultad de Ciencias de la Salud), Universidad Mayor (Facultad de Odontología), Universidad de Los Andes (Facultad de Medicina) e Instituto de Salud Pública de Chile.

Damos las gracias a la Universidad de Talca, en la persona de su Rector, Prof. Dr. Álvaro Rojas Marín, y a la Editorial de esta institución en la persona del Vicerrector de Extensión y Comunicaciones, Prof. Dr. Pedro Zamorano Pérez, por el apoyo otorgado durante el desarrollo de esta obra.

Finalmente, expresamos nuestro deseo que este libro sea de utilidad e interés para alumnos y profesionales que quieran conocer algo más sobre las células, moléculas y mecanismos del sistema inmune, tanto en situaciones de normalidad como en enfermedad.

*Dr. Iván Palomo González
Dr. Arturo Ferreira Vigoroux
Dra. Cecilia Sepúlveda Carvajal
Dr. Mario Roseblatt Silber
Dr. Ulises Vergara Castillo
Editores*





PRÓLOGO

Al calor de las nuevas tecnologías de biología celular y molecular, y de la reciente aparición de la genómica, la proteómica y la bioinformática, la Inmunología moderna se desarrolla de forma vertiginosa. Se produce un volumen colosal de nuevos conocimientos, algunos de los cuales echan por tierra nuestros “dogmas” más repetidos, y los nuevos descubrimientos y conceptos sobre cómo opera el sistema inmune se convierten rápidamente en productos aplicables en la prevención y en el tratamiento de las enfermedades, gracias a la Biotecnología. Es este el contexto donde se mueve la enseñanza de la Inmunología de estos tiempos, que debe combinar el estímulo al instinto de experimentación y el alto rigor académico, con la idea de que es importante convertir los conocimientos en objetos de impacto real para nuestras sociedades.

*Con un extenso contenido formado por cinco secciones y cuarenta y seis capítulos, **Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica**, descolla por su cuidadosa elaboración, resultado del trabajo de un grupo importante de inmunólogos. Las generalidades de la Inmunología, los aspectos más específicos de la respuesta inmune, la Inmunología Clínica y algunos de los métodos más empleados para la aplicación de estos conocimientos, o para su descubrimiento, forman parte de un texto que está llamado a jugar un rol importante en la docencia de esta ciencia.*

Sólo me queda felicitar a los autores de este excelente texto y conminar a sus lectores a enfrentar con esfuerzo y dedicación los nuevos retos que impone el desarrollo de la Inmunología en Latinoamérica para experimentadores y clínicos, más ahora cuando tenemos el honor y el compromiso de organizar el Congreso Mundial de Inmunología del 2007, cuya sede fue recientemente concedida a Río de Janeiro.

*Jorge Victor Gavilondo Cowley, D.Sc.
Presidente de la Asociación Latinoamericana de Inmunología
(ALAI) 2000-2002*





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Roseblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

SECCIÓN I

GENERALIDADES SOBRE INMUNIDAD







Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Roseblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN A LA INMUNOLOGÍA: LAS BASES BIOLÓGICAS DE LA INDIVIDUALIDAD CELULAR

Gustavo Hoecker S.*

* Premio Nacional de Ciencias, 1989.





El avance sorprendente de la ciencia y la tecnología ha adquirido tal velocidad que, por una parte, su último fruto, la biología molecular ha conducido a identificar las moléculas responsables de la herencia como sus productos de traducción, las proteínas, y se están visualizando los caminos complejos por los cuales discurren todas las funciones vitales.

Los seres vivos desde las bacterias hasta los elefantes, incluido el hombre, se caracterizan por una **individualidad** podría decirse **total** o sea que no existen dos seres **exactamente** iguales. De esto se infiere que otra característica mayor de las especies vivientes es la **heterogeneidad**. Esta resulta de la recombinación, tanto de los factores hereditarios, los genes, como de los factores ambientales que comparten los miembros de una misma **especie**.

En el segundo capítulo de este libro, que detalla el desarrollo histórico de nuestra disciplina, verán que el avance del conocimiento ha sido el resultado de la práctica de la crianza de plantas y de la observación de las propiedades y enfermedades en todos los seres vivos, algunos de los cuales morían y otros se recuperaban y sobrevivían. Se dedujo que la producción y la resistencia a las enfermedades, dependían de la individualidad de cada miembro del grupo biológico, lo que llevó a la **selección artificial** de las especies domésticas. Independientemente de ésta, la selección natural, al azar, trabaja sobre todos los seres vivos.

La inmunología en su estado presente, podría decirse que empezó en 1900 y ha crecido paralelamente con el redescubrimiento y progreso de la genética. Los hechos fundamentales fueron el descubrimiento en el suero de las inmunoglobulinas, que reaccionaban **específicamente** con ciertas células, bacterias, hongos o parásitos y sus productos de secreción. El centro de este progreso fue el desarrollo de la teoría química de los **receptores** y de sus agentes específicos que debemos a Ehrlich en lo químico, y a Carl Landsteiner, primero, por su descubrimiento de los grupos sanguíneos humanos (1900) y segundo, por su demostración de la **inmunogenicidad** de sustancias químicas **artificiales** que, ligadas a proteínas naturales, reaccionaban **específicamente**

a las inmunoglobulinas de los animales inyectados.

Deseo señalar en un paréntesis, que Landsteiner era, y fue hasta su muerte, un anatomopatólogo que hizo autopsias todos los días desde las 6 a las 8 de la mañana. De ahí, subía a su modesto laboratorio para leer, hacer experimentos, pensar y describir sus resultados. Ambos, Ehrlich y Landsteiner, fueron Premios Nobel y son el origen de la inmunología **humoral clásica** y sus extensos descubrimientos acerca del origen y causas de casi todas las enfermedades infecciosas, y de las aplicaciones a la transfusión sanguínea. Landsteiner mismo fue el descubridor de la mayor parte de los antígenos mayores de los glóbulos rojos humanos (ABO y Rh).

El continuo y rápido progreso de la inmunología demostró que unas células insignificantes, pero muy abundantes en el organismo (aproximadamente un décimo del peso total), los **linfocitos**, eran responsables de la producción de las inmunoglobulinas: los **linfocitos B**. Esta era una clara indicación de una extensa **heterogeneidad** celular, inaparente a la inspección microscópica. Existía, también, una **inmunidad celular**.

La simple observación permitió ver que al comienzo de las infecciones y en los primeros cinco días, los organismos se defendían de los agentes infecciosos y parasitarios. Existía una **inmunidad natural**. Los elementos celulares centrales en esta inmunidad eran los **macrófagos** y a nivel humoral, una serie de diferentes sustancias que eran activadas o existían naturalmente en el suero (alexinas, sustancia A, complemento, etc.). Debemos a Metchnikoff, un biólogo general, el descubrimiento de esta fracción celular fundamental de la inmunidad tanto natural como inducida.

Establecida en los primeros 50 años del siglo pasado las bases de la inmunidad humoral y su estructuración genética, se expandió una cantidad enorme de investigaciones acerca de la **heterogeneidad** de los linfocitos. Primero se descubrió que la respuesta humoral era el resultado de la **multiplicación clonal** de un escaso número de linfocitos (Jerne, 1952) portadores de **receptores** específicos para una porción menor, aproximadamente 10 a 12 aminoácidos, de la



macromolécula inmunogénica, el **epítipo**. La unión de ambos transmitía una señal que llegaba al núcleo. Éste, a su vez, traducía la señal y sus productos estimulaban a unos pocos **clones** de linfocitos a **multiplicarse** y a **diferenciarse**. La respuesta total puede ser la secreción de inmunoglobulinas específicas, la conversión del linfocito neutro en un **linfocito citotóxico** para los agentes infectantes o uno de colaboración y estimulación del complejo inmunitario.

El desarrollo de la inmunología, como dependiente de los genes y éstos, a su vez, agentes inmutables, salvo excepcionales y poco frecuentes mutaciones, explicaban la individualidad como resultado de las recombinaciones de los genes en el curso de las generaciones, pero no existía una explicación para la inmensa cantidad de inmunoglobulinas específicas. No había una interpretación para esta extensa heterogeneidad adaptativa del individuo que se manifestaba sólo en los linfocitos, y que tenía una base genética desde que se transmitía a todos los miembros de un mismo clon y a sus productos. El único problema comparable era el sistema nervioso. La clave siguió al descubrimiento por Barbara McClintock y Jacob y Monod (1958) de los “genes saltarines”, o sea, de los fenómenos de recombinación genética en células **somáticas**.

Susumi Tonegawa en 1976 descubrió que los genes característicos de las inmunoglobulinas, **v** por **variable**, **j** por unión (**joint** en inglés), y **c** por **constante** (ver capítulo 6) eran totalmente **uniformes** en el embrión, inmunológicamente inmaduro y en cambio, en el adulto, inmunológicamente maduro, eran **extremadamente heterogéneos**. De esto concluyó que la heterogeneidad era el resultado de la recombinación somática de los genes para las regiones **v**, **j** y **c**. A esta heterogeneidad contribuye también una alta tasa de mutaciones espontáneas en este sistema.

Podríamos decir que la inmunología clásica termina con el descubrimiento de las bases de la especificidad de los trasplantes de tejidos. Era un hecho conocido en los mamíferos que sólo los **autotrasplantes** se establecen: los **alotrasplantes** - entre individuos de la misma especie - son siempre rechazados. Con mayor razón, los trasplantes entre diferentes especies - los **heterotrasplantes**, no prenden: o sea, que los organismos reconocen “lo propio” y lo distinguen de lo ajeno. Debemos a George Snell el descubrimiento de las bases de este fenómeno: los genes de **histocompatibilidad** y, en especial, una familia de ellos, los **genes mayores (MHC)**, HLA y H.2 en el hombre y el ratón, respectivamente. Las diferencias entre dador y receptor entre éstos provoca el rechazo del injerto en no más de 10 a 12 días, los otros genes **H**, determinan rechazos

más débiles - 20 o más días. Peter Gorer en Inglaterra e investigadores chilenos establecieron que los genes mayores de histocompatibilidad determinaban, un “complejo” de antígenos que se heredaban estrechamente ligados (ver capítulo 8) y se expresaban en prácticamente todas las células del organismo (Gorer et al, 1955; Hoecker et al, 1954) y que había, por lo menos, dos clases diferentes, **1** y **2**, de este sistema que se expresaban diferencialmente en los linfocitos de clase 1, en los linfocitos citotóxicos y los linfocitos B, y de clase 2 en los linfocitos originados en el timo, linfocitos **T**. Estas eran las células responsables de la **inmunidad adquirida**. El sistema inmunológico, como todas las funciones vitales, es de una eficacia, economía y adaptabilidad increíble frente a las variantes inmunogénicas ambientales.

Las investigaciones siguientes cuyos detalles pueden verse en los diversos capítulos de este libro, analizan las interrelaciones celulares y humores de la respuesta inmune, en especial, los aspectos moleculares de estos procesos. El estado actual de la investigación inmunológica se centra en especial en los **caminos moleculares** que siguen, por una parte los **factores** inmunogénicos y por otra la respuesta inmune específica y algunos factores estructurales y metabólicos que **regulan** la respuesta inmune.

Scott & Rawson (Sc.Am., June, 2000 54- 64) señalan que las células de nuestro cuerpo tienen una sorprendente red de comunicaciones internas y que comprender estos circuitos ayuda a los científicos a desarrollar nuevas terapias para muchos y serios desórdenes.

La biología molecular, en especial la genética, establecieron que la estimulación específica de los genes nucleares se traduciría en proteínas específicas en el citoplasma. Éstas eran con frecuencia, enzimas hidrolíticas y el citoplasma parecía un saco de enzimas y otras moléculas. Un sistema así no permitiría transmitir las proteínas inducidas. Y es característico de los seres vivos que los sistemas de comunicación intracelular, a diferencia de las comunicaciones extracelulares, se transmiten **sin ningún error**. Cuando se producen errores -mutaciones- las funciones metabólicas y orgánicas funcionan mal, o los seres mutantes, mueren. De lo cual se deduce que en el interior de las células existen caminos exactos entre las **moléculas mensajeras** vgr. un antígeno, y los receptores específicos para ellas. A esta unión se sigue un complejo grupo de señales moleculares que llega hasta el núcleo. En éste, un gen específico se activa y su acción se traduce en la producción y secreción de la proteína que él determina.

Para que esto ocurra, los mensajeros cruzan cada una de las estructuras celulares protegidas



de la destrucción enzimática por su unión con moléculas de algunos sistemas que no son hidrolizables. Entre éstos y muy importantes, son los antígenos mayores de histocompatibilidad (MHC). Se sabe que las moléculas MHC de clase I pueden asociarse a receptores de superficie para diversas hormonas -beta-adrenérgicas, insulina, interleuquina -2, endorfinas y otras. Ligado a este problema está el hecho que los linfocitos citotóxicos sólo se activan si son portadores en la superficie de antígenos de clase I. Los antígenos solubles a su vez, pueden penetrar al citoplasma unidos a antígenos MHC de clase II de aquí vuelven a la superficie celular donde las inmunoglobulinas circulantes y el complemento los eliminan a través de los macrófagos.

Este no es solamente un caso especial para el sistema inmunológico sino que un proceso continuo para todas las funciones celulares y puede decirse que todos los sistemas están interconectados incluido el sistema nervioso.

Como último comentario, creo poder predecir que en este siglo y en base a información inmunogenética y técnicas moleculares ya en uso, cambiará substancialmente la farmacología: se fabricará vacunas de DNA o RNA, se inoculará genes para la producción de anticuerpos y células específicas, adecuadas para la mayor parte de las enfermedades infecciosas, bacterianas, parasitarias, virales y autoinmunes. Como resultado, el hombre vivirá unos cuantos años más y aparecerán otras enfermedades o disfunciones todavía no conocidas o estudiadas. Tendrán buena tarea los jóvenes inmunólogos clínicos.

LECTURAS SUGERIDAS

Hoecker, G., Counce Sh., Smith, P., **The antigens determined by the H-2 locus. A rhesus-like system in the mouse**, Proceedings of the National Academy of Sciences, 1954; 40: 1040 - 1051.

Monod, J., **Le hasard et la nécessité. Essai sur la philosophie naturelle de la biologie moderne**, Editions du Seuil, Paris, 1975.

Scott J. D., Pawson R., "Cell communication: the inside story", Scientific American, 2000, pp. 54 - 61.





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 2

HISTORIA DE LA INMUNOLOGÍA

Iván Palomo G. y Arturo Ferreira V.

-
- 1. Introducción**
 - 2. Dos siglos de inmunología**
 - 2.1. Inmunidad
 - 2.2. Serología
 - 2.3. Inmunoquímica
 - 2.4. Inmunobiología
 - 3. Premios Nobel**





RESUMEN

La Inmunología tiene una historia de aproximadamente 200 años, los que se pueden separar en dos períodos: 1796-1958 y 1959 a la fecha. Este último período se ha caracterizado por importantes avances en el conocimiento del sistema inmune a nivel molecular.

Veintitres científicos han obtenido quince Premios Nobel por sus aportes en el campo de la Inmunología: Boehringer, Koch, Erlich, Metchnikoff, Richet, Bordet, Lansteiner, Theiler, Bovet, Burnet, Medawar, Edelman, Porter, Yalow, Benacerraf, Dousset, Snell, Jerne, Koller, Milstein, Tonegawa, Doherty y Zinkernagel.

En este capítulo se menciona los avances más importantes en inmunidad, serología, inmunoquímica e inmunobiología, realizados durante los dos siglos de historia de esta ciencia.

1. INTRODUCCIÓN

El origen de la inmunología se ha relacionado con el descubrimiento de la vacuna contra la viruela, hace aproximadamente 200 años (1796), aporte realizado por Edward Jenner, un médico rural inglés. Jenner, observó que las personas que contraían la “vacuna” (erupción viral leve que afectaba al ganado y que se transmitía a las ordeñadoras), quedaban protegidas contra la viruela. Esta observación le llevó a transferir pus de una lesión de vacuna de una ordeñadora, al brazo de un niño, al cual seis semanas más tarde volvió a inocular, pero esta vez con pus tomado de una pústula de viruela y el niño no enfermó.

En dos siglos de historia de la inmunología se han realizado importantes avances científicos en áreas como la serología, inmunidad celular, inmunología molecular e inmunogenética. Por otra parte, se han postulado y demostrado mecanismos inmunológicos que explican la patogenia de enfermedades como las alergias, las inmunodeficiencias, las gammapatías monoclonales y las enfermedades autoinmunes. Además, se han desarrollado áreas como son la inmunofarmacología, la inmunología del cáncer y la inmunología de trasplante.

Los doscientos años de historia de la inmunología pueden ser divididos en dos períodos: 1796-1958 y 1959 a la fecha.

Período 1796-1958. Al menos treinta y cinco destacados investigadores hicieron contribuciones seminales en este período. En 1796, casi un siglo después que Jenner inmunizara contra la viruela, Louis Pasteur realizó importantes investigaciones en relación a la atenuación de vacunas. Otros investigadores de este período fueron

Metchnikoff que investigó la fagocitosis, Koch que hizo aportes fundamentales sobre hipersensibilidad y Landsteiner que demostró la existencia de varios sistemas antigénicos en los glóbulos rojos humanos.

Período 1959 a la fecha. Este período, se inicia con los hallazgos sobre estructura de los anticuerpos realizados en 1959 por Porter y Edelman (Premio Nobel en 1972; ver punto 3). Estas cuatro décadas, llamado período de la Inmunología Molecular, se ha caracterizado por la velocidad en la generación de nuevo conocimiento y tecnología. Durante estos años se han identificado las moléculas que son propias del sistema inmune, y de los genes que las codifican. Entre los descubrimientos más relevantes de este período se pueden citar, la obtención de anticuerpos monoclonales, el conocimiento de la genética de las inmunoglobulinas, la descripción de los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC). Además, en este período se realizó el aislamiento de las moléculas y genes de los receptores de células T, de citoquinas y de moléculas de adhesión celular.

Adicionalmente se han conocido importantes aspectos moleculares de la activación linfocitaria. Por otra parte, estos conocimientos de inmunología básica han permitido importantes avances en el conocimiento de la patogenia y tratamiento de diferentes enfermedades inmunes.

En este capítulo sólo se hará una relación de los principales investigadores en inmunología indicando una breve descripción de sus contribuciones.



2. DOS SIGLOS DE INMUNOLOGÍA

A continuación se describen, brevemente, los aportes realizados por alrededor de setenta científicos durante los doscientos años de historia de la inmunología. Han sido separados en cuatro áreas (inmunidad, serología, inmunoquímica e inmunobiología) y ordenados cronológicamente en cada una de ellas.

En este punto los Premios Nobel sólo serán nombrados ya que su aporte se describe en el punto 3. Algunos de ellos son citados en más de un área.

2.1. Inmunidad

JENNER, Edward. En 1796 realizó la inmunización contra la viruela.

PASTEUR, Louis. En 1880 describió lo que representó la primera vacuna atenuada. Observó que los cultivos viejos del bacilo del cólera, al ser inoculados en aves no provocaban la enfermedad. Por otra parte, describió que la incubación de *Bacillus anthracis* a 42°C, hacía perder la virulencia del bacilo. Posteriormente, en 1885, desarrolló una vacuna contra la rabia, atenuando el virus causante de la enfermedad.

METCHNIKOFF, Elie. Obtuvo el Premio Nobel en 1908 (ver punto 3).

NUTTALL, George. En 1888 demostró que la sangre desfibrinada era bactericida por sí misma y sugirió que en dicho fenómeno participaría una sustancia termolábil presente en el suero.

VON BEHRING, Emil. Obtuvo el Premio Nobel en 1901 (ver punto 3).

EHRlich, Paul. Obtuvo el Premio Nobel en 1908 (ver punto 3).

WRIGTH, Almroth y DOUGLASS, Stewart. En 1903 demostraron que ciertas sustancias presentes en el suero, que denominaron opsoninas, favorecían la fagocitosis de bacterias.

RAMON, Gastón. En 1923 observó que al tratar las toxinas con formaldehído, éstas perdían sus efectos nocivos y conservaban la actividad antigénica. Los toxoides resultantes comenzaron a usarse como vacunas.

THEILER, Max. Obtuvo el Premio Nobel en 1951 (ver punto 3).

ISAACS, Alick y LINDENMANN, Jean. En 1957 describieron el interferón.

2.2. Serología

GRÜBER, Max y DURHAM, Herbert. En 1896 demostraron la reacción de aglutinación del *Vibrio cholerae* y del bacilo de la tifoidea por antisueros específicos.

WIDAL, Georges. En 1886 desarrolló la prueba de serodiagnóstico para fiebre tifoidea.

KRAUSS, Rudolf. En 1987 observó que los filtrados de cultivos bacterianos o los extractos de bacterias lisadas, precipitaban con antisueros bacterianos.

BORDET, Jules. Obtuvo el Premio Nobel en 1919 (ver punto 3).

VON WASSERMANN, August. En 1906 desarrolló la prueba de fijación del complemento para el diagnóstico de la sífilis.

COONS, Albert. En 1942 desarrolló una técnica de marcación de los anticuerpos basada en la unión covalente del isotiocianato de fluoresceína.

COOMBS, Robin. En 1945 desarrolló la prueba de antiglobulinas.

OUCHTERLONY, Örjan; OUDIN, Jacques y ELECK, Stephen. Entre 1946 y 1948 desarrollaron pruebas de inmunodifusión.

GRABAR, Pierre y WILLIAMS, Curtis. En 1953 modificando la prueba de inmunodifusión en gel, desarrollaron la técnica de inmunoelectroforesis.

YALOW, Rosalyn. Obtuvo el Premio Nobel en 1977 (ver punto 3).

2.3. Inmunoquímica

EHRlich, Paul. Obtuvo el Premio Nobel en 1908 (ver punto 3).

OBERMAYER, Friedrich y PICK, Ernst. En 1906 observaron que la nitrificación o yodación de las proteínas, modifican su especificidad serológica.

ARRHENIUS, Svante. En 1907 acuñó el término inmunoquímica. La primera contribución importante, en esta rama de la inmunología, fue el estudio de los haptenos.

LANDSTEINER, Karl. Obtuvo el Premio Nobel en 1930 (ver punto 3).

MARRACK, John. En 1934 propuso un nuevo modelo de reacción antígeno-anticuerpo, basado en la polivalencia, es decir la presencia de varios sitios de combinación, de cada uno de ellos.

HEIDELBERGER, Michael y KENDALL, F.E. En 1935, diseñaron una técnica de precipitación cuantitativa que permitió expresar la cantidad de anticuerpos en mg de proteína por ml, en lugar de usar el método de titulación.

KABAT, Elvin y TISELIUS, Arne. En 1938 demostraron que los anticuerpos están en la fracción gamma-globulina del suero.

PORTER, Rodney y EDELMAN, Gerald. Obtuvieron el Premio Nobel en 1972 (ver punto 3).

2.4. Inmunobiología

KOCH, Robert. Obtuvo el Premio Nobel en 1905 (ver punto 3).

RICHEt, Charles. Obtuvo el Premio Nobel en 1913 (ver punto 3).



LANDSTEINER, Karl. Obtuvo el Premio Nobel en 1930 (ver punto 3).

VON PIRQUET, Clemens y SCHICK, Bela. En 1905 estudiaron la Enfermedad del suero. Pirquet realizó varios aportes sobre la alergia que siguen siendo válidos.

EHRlich, Paul. Obtuvo el premio Nobel en 1908.

PRAUSNITZ, Carl y KÜSTNER, Heinz. En 1921 publicaron sus observaciones sobre la reagina, una sustancia de tipo anticuerpo presente en el suero y asociada con procesos alérgicos. Hoy se acepta que la reagina corresponde a la IgE.

HAUROWITZ, Félix. En 1930 formuló la teoría del molde o plantilla para la formación de anticuerpos.

BOVET, Daniel. Obtuvo el Premio Nobel en 1957 (ver punto 3).

BURNET, Macfarlane y MEDAWAR, Peter. Obtuvieron el Premio Nobel en 1960 (ver punto 3).

WITEBSKY, Ernest. En 1956 estableció los criterios para demostrar la existencia de una enfermedad autoinmune.

SNELL, George; DAUSSET, Jean y BENACERRAF, Baruj. Obtuvieron el Premio Nobel en 1980 (ver punto 3).

MILSTEIN, César; KÖHLER, George y JERNE, Nils. Obtuvieron el Premio Nobel en 1984 (ver punto 3).

TONEGAWA, Susumu. Obtuvo el Premio Nobel en 1987 (ver punto 3).

DOHERTY, Peter y ZINKERNAGEL, Rolf. Obtuvieron el Premio Nobel en 1996 (ver punto 3).

JANEWAY, Charles; MEDZHITOV, Ruslan y PRESTON-HURLBURT, Paula. En 1997 (*Nature*, 388:394-397) comunicaron la existencia en humanos de la proteína Toll, homóloga a la descrita en *Drosophila* y que induce respuesta inmune natural y adquirida. Se trata de una proteína de transmembrana que presenta un dominio extracelular rico en leucina y otro citoplasmático homólogo al que presenta el receptor de interleuquina 1 (IL-1R). Ambas proteínas transducen señales a través de NF-κB. Este hallazgo ha significado el primer ejemplo de una conexión a nivel molecular entre el sistema inmune innato y adaptativo.

3. PREMIOS NOBEL

Entre 1901 y 1996 veintitrés científicos han obtenido el Premio Nobel por sus aportes a la inmunología y temas afines (tabla 2-1).

A continuación se indican algunos antecedentes sobre los Premios Nobel otorgados a científicos que han hecho aportes significativos en Inmunología:

1901, Von Behring

Emil Von Behring (1854-1917) recibió el primer Premio Nobel en Medicina. Estudió en el Instituto Koch en Berlín. Entre 1890 y 1892, junto a sus colaboradores, demostró que la inmunidad contra la difteria y el tétano se basaba en antitoxinas y demostró que la administración pasiva de sueros antitoxina diftérica y antitoxina tetánica, respectivamente, podían curar estas enfermedades. Creó así una estrategia terapéutica que sería usada más tarde en otras patologías.

1905, Koch

Robert Koch (1843-1910), médico que inicialmente investigó sobre el *Bacillus anthracis* en un pequeño pueblo de Alemania y luego trabajó en el Instituto Koch en Berlín. Hizo contribuciones en metodología de cultivo y aislamiento bacteriano, y publicó los famosos postulados de Koch para probar la etiología. Hizo aportes en varias enfermedades pero fueron sus aportes en relación a tuberculosis: descripción del *Micobacterium tuberculosis* y la reacción de tuberculina (fenómeno de hipersensibilidad retardada), los que le hicieron merecedor del Premio Nobel.

1908, Metchnikoff y Ehrlich

Elie Metchnikoff (1845-1916) nació en Rusia y estudió zoología. En 1884, trabajando en un laboratorio de biología marina en Italia, realizó las observaciones iniciales sobre células fagocíticas de estrella de mar, que le permitieron desarrollar la teoría de inmunidad celular (fagocitosis; ver capítulos 3 y 4). Después siguió investigando sobre fagocitosis en el Instituto Pasteur en París.

Paul Ehrlich (1854-1916), nació en Alemania y estudió Medicina. Realizó aportes en las áreas de inmunidad, serología e inmunobiología. Ehrlich desarrolló varias tinciones citoquímicas en tejidos; desarrolló las tinciones más usadas en hematología para teñir las células sanguíneas. En 1891, siendo asistente de Koch, comenzó a realizar estudios inmunológicos. En 1897 hace su primera contribución a la inmunología describiendo un método para estandarizar la preparación de toxina y anti-toxina diftérica. Ehrlich hizo contribuciones teóricas sobre la formación de anticuerpos; postuló la hipótesis de las cadenas laterales. También planteó algunos mecanismos en la patogenia de hemólisis inmune. Más adelante hizo importantes aportes en el tratamiento de tripanosomiasis y sífilis.



Tabla 2-1. Premios Nobel por investigaciones en Inmunología

Año	Investigador	Aporte
1901	Emil von Behring	Terapéutica con antisueños
1905	Robert Koch	Tuberculosis
1908	Paul Ehrlich	Teorías sobre inmunidad
	Elie Metchnikoff	Fagocitosis
1913	Charles Richet	Mecanismo de la Anafilaxia
1919	Jules Bordet	Acción bactericida del Complemento
1930	Karl Landsteiner	Grupos sanguíneos humanos
1951	Max Theiler	Vacuna contra la Fiebre amarilla
1957	Daniel Bovet	Antihistamínicos
1960	Macfarlane Burnet y Peter Medawar	Tolerancia inmunológica
1972	Gerald Edelman y Rodney Porter	Estructura química de las inmunoglobulinas
1977	Rosalyn Yalow	Radioinmunoanálisis
1980	Baruj Benacerraf, Jean Dausset y George Snell	Inmunogenética e Histocompatibilidad
1984	Niels Jerne	Teoría selectiva Red idiotipo/anti-idiotipo Tecnología del hibridoma
	Georges Koller y César Milstein	
1987	Susumu Tonegawa	Genética de las inmunoglobulinas
1996	Peter Doherty y Rolf Zinkernagel	Restricción genética de la respuesta inmune

1913, Richet

Charles Richet (1850-1935). Nació en París, Francia y estudió Medicina. Interesado en la fisiología estudió el efecto del veneno de invertebrados marinos sobre mamíferos. Junto a Paul Portier describió la Anafilaxia (ver capítulos 21 y 22). Así mostró que los mecanismos protectores de la inmunidad también podrían causar enfermedad.

1919, Bordet

Jules Bordet (1870-1960) fue un médico nacido en Bélgica. Siendo joven fue a estudiar con Metchnikoff en el Instituto Pasteur en París. Hace importantes contribuciones al entendimiento del mecanismo bactericida mediado por complemento (ver capítulo 18). En 1899 describe el fenómeno de hemólisis específica. Luego, junto a Octave Gengou, describe el fenómeno de fijación de complemento y sus posibilidades diagnósticas.

1930, Landsteiner

Karl Landsteiner (1868-1943), médico de Viena. En 1901, estudiando anticuerpos antieritrocitarios identificó el sistema antigénico ABO en los glóbulos rojos (ver capítulos 4 y 26). Posteriormente, en 1926, con Philip Levine describe el sistema MNP y en 1940 con Alexander Wiener describe el sistema Rh. En otro orden, Landsteiner fue el primero en demostrar que la

poliomielitis se podía producir en primates no humanos y uno de los primeros en hacer la misma observación en sífilis. Por otra parte, contribuyó a entender las bases químicas de las interacciones antígeno-anticuerpo.

1951, Theiler

Max Theiler (1899-1972), nació en Sudáfrica, estudió Medicina en Inglaterra y luego viajó a Estados Unidos. Demostró que la Fiebre amarilla era causada por un virus filtrable; luego obtuvo virus atenuados y logró inmunizar contra esta infección. Sus estudios permitieron obtener la actual vacuna contra la Fiebre amarilla.

1957, Bovet

Daniel Bovet (1907-), fisiólogo y farmacólogo. Trabajó con Emile Roux en el Instituto Pasteur (París) en la respuesta del sistema nervioso autónomo a varios productos químicos. Se interesó en sustancias que pudieran oponerse a la acción de la histamina y desde allí surgieron drogas antihistamínicas para el tratamiento de alergias (Asma y Fiebre del heno) (ver capítulos 21 y 22).

1960, Burnet y Medawar

Macfarlane Burnet (1899-1985), médico australiano. Alrededor de 1950 Burnet junto con proponer una teoría sobre la formación de



anticuerpos (teoría de la selección clonal), postuló que la respuesta inmune se desarrolla tardíamente durante la vida embrionaria e involucra un sistema de reconocimiento de lo propio y lo extraño. En otras palabras planteó que el autorreconocimiento (tolerancia a los antígenos propios) sucede en la vida neonatal por contacto de las células formadoras de anticuerpos con nuevos antígenos; cuando el feto sintetiza estas células por primera vez.

Peter Medawar (1915-1987), inicialmente se interesó en la reparación de tejidos y problemas asociados a los trasplantes. Algunos años después comprobó la teoría postulada por Burnet en experimentos realizados en ratones.

1972, Porter y Edelman

Rodney Porter (1917-1985) de la Universidad de Oxford y Gerald Edelman (1929-) de la Universidad Rockefeller. Recibieron el Premio Nobel por sus trabajos en la estructura química de los anticuerpos (inmunoglobulinas). Ambos trabajaron con la misma inmunoglobulina, hoy conocida como IgG, pero cada investigador la trató con diferentes métodos analíticos.

Porter empleó diferentes enzimas; en 1958, a partir de la molécula IgG purificada, utilizando papaína obtuvo dos fragmentos Fab (fragmento que une antígeno) iguales y un fragmento Fc (fragmento cristalizable) (ver capítulo 6).

Edelman, a partir de IgG de Mieloma Múltiple (ver capítulo 27) y utilizando urea (reductor), obtuvo la separación en cadenas pesadas (H) y livianas (L) (ver capítulo 6). También demostró que diferentes anticuerpos de cerdos guinea tenían distinta movilidad electroforética.

Luego Porter y colaboradores demostraron que cada molécula de inmunoglobulina estaba formada por dos cadenas H y dos cadenas L.

Posteriormente Porter, Edelman y otros investigadores realizaron la primera secuenciación aminoacídica parcial de las cadenas de los anticuerpos. En 1969 Edelman y colaboradores realizaron la secuenciación aminoacídica completa de la molécula de inmunoglobulina, lo que ayudó a definir sus diferentes dominios funcionales.

1977, Yalow

A comienzos de la década del 50, Rosalyn Yalow (1921-) junto a su colaborador Solomon Berson, estudiaron las causas de la resistencia a la insulina en la diabetes. Demostraron la formación de anticuerpos anti-insulina; el complejo antígeno-anticuerpo lo pudieron medir desarrollando un método inmunorradiométrico de competencia en que marcaban con un isótopo el antígeno. Este método ha servido de base a las técnicas de radioinmunoanálisis actualmente usadas para la

detección de diferentes antígenos en el orden de los nanogramos o picogramos (ver capítulo 40).

1980, Benacerraf, Dausset y Snell

Se les otorgó el Premio Nobel a Benacerraf, Dausset y Snell por sus trabajos en moléculas genéticamente determinadas en la superficie celular y que regulan las reacciones inmunológicas.

George Snell (1903-1996) a mediados de la década del cuarenta desarrolló cepas congénicas de ratones, las que sólo se diferencian en un locus génico. Junto con Peter Gorer, comprobaron que los genes controlan la síntesis del antígeno II, denominado posteriormente H-2; hoy conocido como Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase II (MHC-II) (ver capítulo 8). Además demostraron que de estos antígenos depende el éxito o el fracaso de los injertos entre ratones congénicos. En los experimentos que condujeron a estos fundamentales hallazgos participó Gustavo Hoecker S, profesor e inmunólogo chileno, y Premio Nacional de Ciencias 1989.

Jean Dausset (1916-), francés, descubrió que los pacientes que reciben múltiples transfusiones sanguíneas producen isoanticuerpos contra los leucocitos del dador. Dichos anticuerpos reaccionan con los antígenos de superficie de los leucocitos del dador (HLA, «human leukocyte antigen») (ver capítulo 8) o con el mismo antígeno en los leucocitos de otras personas. Poco después se relacionó la producción de una respuesta inmune a los HLA con los rechazos de injertos (ver capítulo 38).

Baruj Benacerraf (1920-) y colaboradores demostraron que otros genes presentes en el locus del Complejo Principal de Histocompatibilidad, en la región I, también participan en el control de la respuesta inmune.

1984, Milstein, Köhler y Jerne

César Milstein (1927-) y George Köhler (1946-1995) en la década del setenta desarrollaron la metodología para obtener anticuerpos monoclonales (ver capítulo 44). Henry Kunkel y colaboradores (1955) mostraron que los mielomas, tumores de células plasmáticas (ver capítulo 27) producían anticuerpos monoclonales; en 1962 Michael Potter mostró que dicho tumor podía ser inducido en ratones y otros mostraron que podían crecer indefinidamente en cultivo.

En 1974 Köhler inició un postdoctorado en el laboratorio de Milstein en Cambridge; ambos emprendieron la tarea de immortalizar células formadoras de anticuerpo por fusión con células de mieloma, con el propósito de estudiar las bases genéticas de la diversidad de los anticuerpos. Para ello usaron una línea celular mutante de mieloma deficiente en la enzima hipoxantina



fosforibosiltransferasa; células que mueren en un medio que contiene hipoxantina, aminoptirina y timidina (medio HAT), pero las células híbridas (hibridomas) sobreviven, pudiendo ser seleccionadas. Estas sintetizan anticuerpos con una única especificidad (anticuerpos monoclonales) en forma indefinida. Los anticuerpos monoclonales han sido una poderosa herramienta en el estudio molecular de diversas macromoléculas y su aplicación se realiza tanto en ciencias básicas como en clínica.

Nils Jerne (1912-1994) realizó varias contribuciones a la inmunología. Principalmente hizo aportes teóricos. En 1955 fue el primer científico moderno que planteó la teoría selectiva para la formación de los anticuerpos, en la cual el antígeno selecciona el anticuerpo a partir de un repertorio preformado. En 1971 postula una hipótesis sobre el desarrollo de especificidades del repertorio de células T; dice que el principal estímulo para que los linfocitos se dividan en el timo son los antígenos MHC. En 1974 desarrolla la teoría más importante; predijo que cada molécula de anticuerpo tiene una región inmunogénica específica llamada marcador idiotípico, que estimularía la formación de un segundo anticuerpo que reaccionaría con ese marcador y así sucesivamente (red idiotipo-anti-idiotipo), pudiendo representar uno de los principales mecanismos reguladores de la respuesta inmune (ver capítulo 14).

1987, Tonegawa

Susumu Tonegawa (1939-) recibió el Premio Nobel por sus trabajos en biología molecular de los genes de inmunoglobulinas, mostrando cómo se genera la diversidad de las inmunoglobulinas.

En 1965 Dreyer y Bennett propusieron que podría ser necesario menos DNA para codificar las diferentes especificidades de las inmunoglobulinas si múltiples genes para regiones variables (V) se combinaban con un único gen para región constante (C) (ver capítulo 6).

En 1976 Tonegawa y Hozumi confirmaron la hipótesis de Dreyer y Bannett; demostraron que en el DNA embrionario los segmentos génicos V y C estaban separados. Luego Tonegawa, Gilbert y Maxam mostraron, en diferentes células, que estos dos genes estaban aún separados por DNA no codificante (intron). Más adelante, Tonegawa y Philip Leder, encontraron que la secuencia aminoácídica de la región V de la cadena L tenía más aminoácidos que los codificados por los segmentos génicos V. Tonegawa y colaboradores pronto encontraron el segmento restante que llamaron J ("joining", unión). Posteriormente Tonegawa y Leroy Hood describieron que en el caso de la región variable de las cadenas H, inter-

venía otro segmento génico adicional a V y J que denominaron D ("diversity", diversidad) (ver capítulo 6). Los trabajos de Tonegawa han tenido repercusión en el conocimiento de la variabilidad genética de los receptores de linfocitos T (TCR).

1996, Doherty y Zinkernagel

A Peter Doherty (1940-) y Rolf Zinkernagel (1944-) se les otorgó el Premio Nobel por la demostración de la restricción MHC en el reconocimiento de antígenos virales sobre células infectadas, por parte de los linfocitos T citotóxicos. En la década del setenta Doherty y Zinkernagel realizaron experimentos en un sistema *in vitro* que permitía medir la capacidad de células efectoras de destruir células blanco infectadas por virus; utilizaron el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) que infecta ratones. Cuando los dos tipos celulares (linfocito T citotóxico y célula blanco) pertenecían a la misma cepa de ratón, la muerte fue eficiente. En cambio cuando ambas células pertenecían a ratones con diferente haplotipo MHC, la destrucción de las células blanco generalmente no ocurre. Ellos concluyeron que la célula efectora debía reconocer dos señales sobre la célula infectada, una derivada del virus y otra de las moléculas MHC presentes en la célula blanco (ver capítulo 9).

LECTURAS SUGERIDAS

Barret, J., **Inmunología médica**, Capítulo 1, Quinta edición, Ed. Interamericana, México, 1990.

Hoecker, G., "Los Complejos Mayores de Histocompatibilidad", *Universum*, año 9:61-72, 1994.

Silverstein, A., **A history of Immunology**, Appendix B and appendix C, Ed. Academic Press Inc., California, 1988.

Silverstein, A., "The history of Immunology" en **Fundamental Immunology**, Chapter 2, Ed. Paul W., Leppincott-Raven, Publisher, 1999.

Stites, D. and Terr, A., **Basic and Clinical Immunology**, Chapter 1, Seventh edition, Ed. Appleton & Lange, USA, 1991.



Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 3

CÉLULAS Y ÓRGANOS DEL SISTEMA INMUNE

Iván Palomo G., Jaime Pereira G. y Cecilia Koenig S.

- 1. Introducción**
- 2. Células del sistema inmune**
 - 2.1. Hematopoyesis
 - 2.2. Linfocitos
 - 2.3. Sistema fagocítico mononuclear
 - 2.3.1. Monocitos
 - 2.3.2. Macrófagos
 - 2.3.3. Células dendríticas
 - 2.4. Granulocitos
 - 2.4.1. Neutrófilos
 - 2.4.2. Eosinófilos
 - 2.4.3. Basófilos
- 3. Órganos linfoides**
 - 3.1 Órganos linfoides primarios
 - 3.1.1. Médula ósea
 - 3.1.2. Timo
 - 3.2. Órganos linfoides secundarios
 - 3.2.1. Ganglios linfáticos
 - 3.2.2. Bazo
 - 3.2.3. Tejido linfoide asociado a mucosa
- 4. Tránsito linfocitario**





RESUMEN

Las células del sistema inmune que incluyen linfocitos, granulocitos y monocitos-macrófagos, se forman en la médula ósea a partir de células pluripotentes, a través de un proceso finamente regulado y en el que participan varias citoquinas.

Los linfocitos son las células que participan en la inmunidad adquirida o específica. Las células T participan en la inmunidad celular y las células B en la inmunidad humoral. Una tercera subpoblación de linfocitos, las células NK, participan en la inmunidad celular de tipo innata.

Las células del Sistema Fagocítico Mononuclear (monocitos, macrófagos y células dendríticas) tienen como función fagocitar, actividad más desarrollada en los macrófagos, que son células tisulares derivadas de los monocitos circulantes.

Los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) presentan particularidades morfológicas y funcionales. La principal función de los neutrófilos es su capacidad fagocítica. En el capítulo se explican los procesos de activación, quimiotaxis, fagocitosis y bacteriolisis.

Los órganos linfoides se pueden clasificar en primarios (timo y médula ósea) y secundarios (bazo, ganglios linfáticos y tejido linfoide asociado a mucosas). En el timo maduran los LT y en la médula ósea los LB. En los órganos linfoides secundarios, los linfocitos toman contacto con los antígenos y es en ellos donde se genera la respuesta inmune específica (células efectoras y de memoria). En estos órganos existen zonas ricas en células B, y otras en que, principalmente, existen células T.

La capacidad de los linfocitos de recircular entre los órganos linfoides secundarios, vasos linfáticos, conducto torácico y vasos sanguíneos le permiten tomar contacto con antígenos en diferentes lugares del organismo.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune humano, y de los vertebrados en general, consiste en varios órganos y diferentes tipos de células, que le permiten al organismo distinguir lo propio y eliminar lo extraño.

En este capítulo se revisan los aspectos fundamentales de las células del Sistema Inmune, que participan en la inmunidad específica e inespecífica (ver capítulo 4), y los órganos que componen este sistema, tanto los que participan en la producción y maduración celular, como los que sirven para encuentro de las células del sistema inmune con los antígenos.

2. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE

Las células del sistema inmune incluyen linfocitos y diferentes células fagocíticas, organizadas en los tejidos linfoides. Las células del sistema inmune derivan de células pluripotentes de

la médula ósea, órgano en que ocurre la hematopoyesis, proceso por el cual se forman, diferencian y maduran las células sanguíneas.

2.1. Hematopoyesis

En el feto la hematopoyesis ocurre en el hígado y en el bazo. A partir del nacimiento se suspende este proceso en esos órganos y se incrementa en la médula ósea, sitio donde había comenzado en los últimos meses de gestación. En la médula ósea tres aspectos son importantes a considerar: (a) la estructura anatómica (ver punto 3.2.1): disposición tridimensional de vasos sanguíneos y diferentes tipos celulares; (b) el estroma: incluye varios tipos celulares, (fibroblastos, adipocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales de los sinusoides) y macromoléculas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, laminina, hemonectina, tenascina, trombospodina y proteoglicanos).

En la médula ósea las células hemato-



poyéticas se distribuyen en tres compartimientos morfo-funcionales: (a) compartimiento de células madres, (b) compartimiento mitótico o de división y (c) compartimiento de maduración – almacenamiento (figura 3-1).

eritroblástica se reconocen las etapas, proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto poliromatófilo, eritroblasto ortocromático, reticulocito y glóbulo rojo. En la línea linfoide, a partir de la CFU-L, después de un proceso de di-

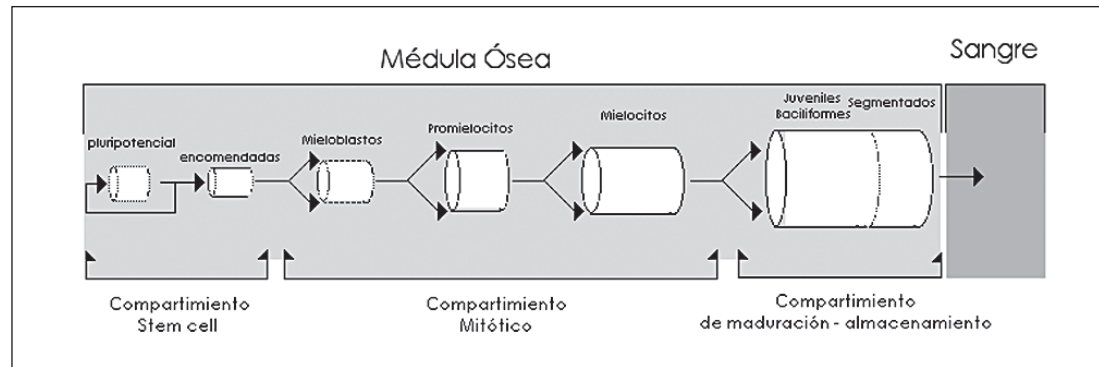


Figura 3-1. Compartimientos celulares en la médula ósea. Se distinguen 3 compartimientos morfo-funcionales: de células madres (“stem cells”), mitótico y de maduración – almacenaje. En la figura, los dos últimos compartimientos ejemplifican la serie granulocítica, representándose el tamaño relativo de los diferentes compartimientos.

Las células del compartimiento “stem cell” (de células madres) corresponden a menos del 1% de las células de la médula. No son identificables morfológicamente, por lo que deben ser estudiadas en cultivos *in vitro*. La “stem cell” o célula madre pluripotente, también denominada CFU-ML (Unidad formadora de colonias mieloides y linfoides) tiene la capacidad de dividirse y autoperpetuarse. Da origen a dos líneas celulares principales, mieloide y linfoide (figura 3-2). En la línea mieloide, a partir de la CFU-GEMM (granulocítica, eritroide, monocítica y megacariocítica) se producen dos diferentes CFU “encomendadas”, CFU-GM (granulocito, monocito) y CFU-MegE (megacariocito, eritroide); posteriormente se generan las CFU-G, CFU-M, CFU-E, CFU-Meg. En el compartimiento mitótico, a partir de las CFU de las líneas celulares específicas antes mencionadas, se generan las primeras células reconocibles morfológicamente de cada línea celular: mieloblasto en el caso de los granulocitos, que posteriormente madurará a promielocito y luego a mielocito etapa en la cual se diferencian las tres líneas específicas de los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos); las etapas posteriores de maduración de los granulocitos corresponden a juveniles, baciliformes y segmentados. Por su parte, la serie monocítica madura en las etapas de monoblasto y monocito. De la CFU-Meg, la línea megacariocítica se reconoce las etapas de megacarioblasto, megacariocito y plaquetas; por su parte en la serie

ferenciación y maduración se originan los linfocitos T y linfocitos B.

En el proceso de diferenciación y maduración de las diferentes líneas celulares, participan varios factores de maduración y citoquinas secretadas por células del estroma (ver capítulo 11). Existen factores que actúan sobre progenitores de multilínea: “Kit ligand”, GM-CSF (CSF: Factor estimulador de colonias), G-CSF, interleuquina (IL)-3, IL-4, IL-6, IL-11, IL-12, “Flt-3 ligand”, Factor inhibidor de leucemia (LIF), Oncostatin (OSM). Algunos de estos factores participan también en la maduración de algunas líneas celulares en particular. Entre los factores de maduración de los granulocitos y monocitos, se reconocen a GM-CSF; G-CSF favorece la maduración a neutrófilos, M-CSF a monocitos, IL-5 a eosinófilos y “Kit ligand” a basófilos. Por su parte, el regulador fisiológico de la maduración eritroide es la eritropoyetina (EPO) y de los megacariocitos la trombopoyetina (TPO) también denominada “mpl-ligand”. “Kit ligand” también parece tener participación en la maduración eritroide.

En la línea linfoide B, que a diferencia de los linfocitos T, maduran en la médula ósea, el factor de maduración es la IL-7.

Las células de las diferentes líneas hematopoyéticas presentan receptores para los factores de maduración antes nombrados. En la tabla 3-1 se resumen los principales factores maduración hematopoyéticos y sus receptores.

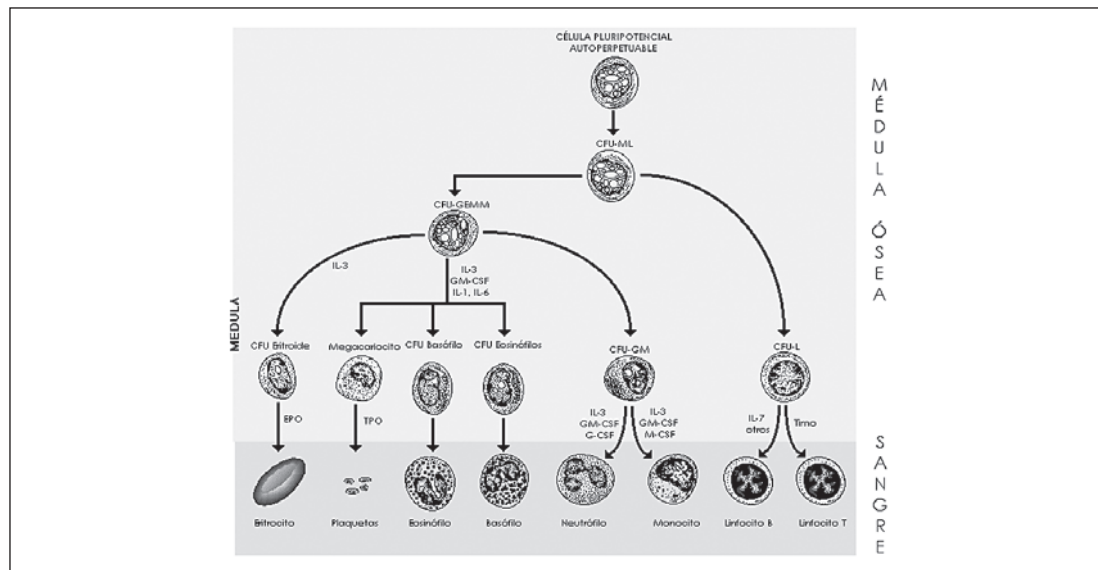


Figura 3-2. Esquema de la Hematopoyesis. La célula madre pluripotencial autoperpetuable, da origen a una célula pluripotencial, también denominada CFU-ML (Unidad formadora de colonias mieloideas y linfoides), de la que se originan: a) el progenitor mieloide (CFU-GEMM), a partir del cual por procesos de maduración y diferenciación se originan los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, eritrocitos y plaquetas; y b) el progenitor linfoide (CFU-L), que después de un proceso de maduración y diferenciación, da origen a los linfocitos T y linfocitos B. Se muestra los puntos de acción de las citoquinas (IL-1, IL-3, IL-6 e IL-7) y factores estimuladores de colonias (CSF) específicos, que participan como factores reguladores de la granulopoyesis y linfopoyesis. EPO, eritropoyetina; TPO, trombopoyetina.

Tabla 3-1. Factores de maduración hematopoyéticos y sus receptores

Factor	Receptor
Eritropoyetina (EPO)	EPOR
Kit ligand (KL)	“Kit”
Interleuquina-1, etc. (IL-1, etc.)	“IL-1 receptor”
Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF)	“G-CSF receptor”
Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófago (GM-CSF)	“G-CSF receptor”
Factor estimulador de colonias de monocito-macrófago (M-CSF, CSF-1)	CSF-1R
Interferón (IFN) α , β , γ	“IFN- α , β , γ receptor”
Trombopoyetina (TPO, mpl, ligand)	mpl
Factor inhibidor de leucemia (LIF)	“LIF receptor”
Oncostatin M (OSM)	“OSM receptor”
Factor de crecimiento transformante α (TGF- α)	“EGF receptor”
Factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1)	IGF-1R
“Flt-3 ligand” (FL)	Flt-3, STK
“Flk-1 ligand”	Flk-1

2.2. Linfocitos

Los linfocitos, junto con las células presentadoras de antígeno (CPA) son la base celular de la respuesta inmune específica. Actualmente los

linfocitos son uno de los tipos de células mejor estudiadas. Dado que una parte importante del libro trata sobre la inmunidad específica y, por lo

tanto, sobre la ontogenia y función de las diferentes subpoblaciones de linfocito, en este capítulo el tema será tratado sólo en sus aspectos generales.

Características generales

Los linfocitos constituyen aproximadamente el 20-25% de los leucocitos circulantes en el adulto (tabla 3-2). Desde el punto de vista morfológico, en frotis sanguíneo teñido con May Grünwald-Giemsa se distinguen dos tipos: los **linfocitos pequeños** (7-9 µm) que presentan una relación núcleo/citoplasma alta y representan la mayoría, y los **linfocitos grandes** (11-20 µm), que presentan citoplasma más abundante (figura 3-3). El núcleo generalmente es redondo u oval y compuesto predominantemente de heterocromatina. Los nucléolos pueden no observarse con tinción de May Grünwald-Giemsa. En los linfocitos grandes puede observarse gránulos citoplasmáticos (linfocitos granulares grandes).

Los denominados "linfocitos activados" corresponden a linfocitos asociados a una respuesta inmune. Estos linfocitos estimulados antigénicamente se caracterizan por presentar citoplasma abundante, hiperbasófilo (azul intenso) y de bordes irregulares.

A la microscopía electrónica de barrido, los linfocitos en reposo presentan una superficie lisa; que se hace irregular (velluda) al estar activados.

Los linfocitos, al igual que otros leucocitos, se pueden movilizar. Inicialmente se forma un pseudópodo que rodea la célula y al contraerse empuja el núcleo hacia delante quedando una cola citoplasmática llamada urópodo (ura: cola, podi: pie), presentando la célula un aspecto de espejo de mano o pera. La velocidad es de aproximadamente 20 µm/minuto, la que aumenta cuando la célula es estimulada. El urópodo, además de permitir el movimiento facilita las interacciones con otras células (linfocitos, macrófagos), etc.

Los linfocitos además de presentar diferen-

Tabla 3-2. Leucocitos normales en sangre periférica del humano adulto normal

Tipo de célula	%	Número absoluto (/µL)
Leucocitos (totales)		4 - 10 x10 ³
Neutrófilos	60-65	2 - 7 x10 ³
Eosinófilos	0-4	0 - 0,4 x10 ³
Basófilos	<1	0,1 - 1 x10 ³
Monocitos	4-10	0,2 - 0,8 x10 ³
Linfocitos	20-25	1,5 - 3,5 x10 ³

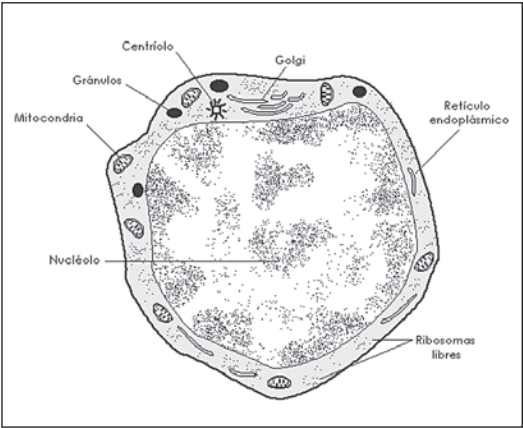


Figura 3-3. Esquema de estructura subcelular de un linfocito pequeño. En el frotis de sangre teñido con May Grünwald - Giemsa los linfocitos pequeños presentan un diámetro similar a los glóbulos rojos (7-9 mm). A la microscopía electrónica se observa nucléolo y un pequeño aparato de Golgi. Además, en su escaso citoplasma presenta algunos ribosomas y un pequeño retículo endoplásmico y escasos gránulos.

cias morfológicas son un grupo heterogéneo estructural y funcionalmente. Se dividen en tres grupos funcionales diferentes: los **linfocitos T (LT)** que participan en la inmunidad adquirida de tipo celular, los **linfocitos B (LB)** que participan en la inmunidad adquirida de tipo humoral y las **células NK ("Natural Killer")** que no expresan marcadores de células T ni células B y que participan en la inmunidad natural o innata.

Las células T y B, originadas a partir de la CFU-L en la médula ósea (figura 3-2), experimentan un proceso de maduración y diferenciación en el timo y médula ósea (tejido bolsa equivalente en el humano). La mayor parte de los linfocitos que se encuentran en la sangre, linfa, ganglio linfático y timo son linfocitos T, en cambio un mayor porcentaje de los linfocitos presentes en la médula ósea son linfocitos B; en el bazo y amígdalas el porcentaje de ambas subpoblaciones es similar.



Las células plasmáticas generalmente presentan forma ovalada. Corresponden a las células efectoras de la línea linfóide B (productoras de inmunoglobulinas). El núcleo, con una distribución radial de la heterocromatina, está ubicado excéntricamente y el citoplasma presenta una gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso que le otorga la intensa basofilia que le caracteriza al ser teñidas estas células con May Grünwald - Giemsa. A nivel perinuclear presenta un desarrollado aparato de Golgi (figura 3-4).

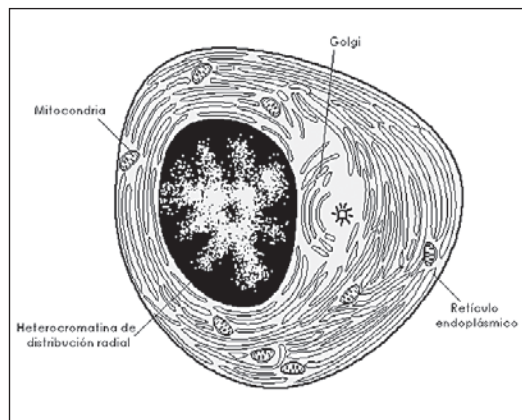


Figura 3-4. Esquema de la estructura subcelular de una célula plasmática. Las células plasmáticas presentan un diámetro de 10-25 mm. Se ubican principalmente en los órganos linfoides secundarios y muy raramente en sangre periférica.

En el estudio hematológico de rutina de los linfocitos sanguíneos sólo se utiliza la tinción de May-Grünwald-Giemsa, metodología que no permite conocer la línea celular de los linfocitos. En caso de requerirse dicha información, como es el caso de diagnóstico diferencial de leucemias, se puede recurrir a tinciones citoquímicas que identifican la presencia o ausencia de ciertas enzimas y otras moléculas en el citoplasma de los linfocitos. Más recientemente se utiliza citometría de flujo para identificar las subpoblaciones de linfocitos (ver capítulo 43). Al respecto, el uso de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos permite identificar marcadores de superficie designados con el **sistema CD** ("cluster designation") a modo de ejemplo se muestran algunos en la (tabla 3-3) (ver capítulo 45). De esta forma se reconoce como marcadores de las células T al complejo CD3 y a las dos subpoblaciones más importantes de esta línea celular se les identifica por ser **CD4+** (LT "helper") o **CD8+** (LT citotóxicos). Basándose en el patrón de secreción de citoquinas, se reconocen dos

subpoblaciones de células T "helper": LTh1 y LTh2. Los LTh1 secretan IL-2, IFN- γ , IL-3 y estimulan la inmunidad mediada por células; los LTh2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y favorecen la respuesta inmune humoral. Por su parte, los linfocitos B se reconocen por la expresión en su membrana de inmunoglobulinas IgM y en algunos casos IgD. Además son CD19+, CD20+, CD22+ y también expresan moléculas MHC clase II. Las células NK presentan los siguientes marcadores: Fc γ RIII (CD16), CD56 y CD57.

Diferenciación de linfocitos

Los linfocitos se generan a partir de la CFU-L de la médula ósea (ver punto 2.1) que presenta desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) en el núcleo y expresa CD34, C-Kit y HLA-DR (tipo de molécula MHC clase II en humanos) en la membrana celular. La línea linfóide B madura en la propia médula ósea y la línea linfóide T en el timo. En ambos casos la maduración implica una **etapa independiente de antígeno**, que ocurre en la médula ósea (línea B) y en el timo (línea T), y una **etapa dependiente de antígeno** que en ambas líneas celulares ocurre en los órganos linfoides secundarios (ver punto 3.2). La maduración de las células B se puede separar en dos estadios previos al LB maduro: **Pro-B** en que las células son TdT+, CD10+, CD19+, CD24+, CD34+, CD38+ y HLA-Dr+ y **Pre-B** se caracterizan por ser TdT+, CD10+, CD19+, CD20+, CD24+, CD38+ y cadenas μ citoplasmáticas + (de IgM; ver capítulo 6). Las **células B maduras** presentan el siguiente Inmunofenotipo: CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD38, IgM, IgD (no siempre) y FcR.

Las etapas finales de diferenciación de los LB tienen lugar en periferia, en algún órgano linfóide secundario (ver punto 3.2) y son antígeno dependientes. En el punto siguiente se explica muy brevemente el proceso de activación linfocitaria que ocurre como consecuencia de la interacción, en este caso, entre IgM o IgD de membrana de un LB y el antígeno respectivo. Los LB vírgenes expresan en su membrana IgM y IgD y son CD10-, CD23-, CD38- y CD77-; de tomar contacto con el antígeno expresa CD23. Luego, como célula precursora del centro germinal en los folículos linfoides (ver punto 3.2) el fenotipo que le caracteriza es IgM+, e IgD+, CD10+, CD23-, CD38+ y CD77- (figura 3-5). Posteriormente en la zona oscura del centro germinal, las células



Tabla 3-3. Moléculas CD asociadas a linfocitos

CD	Sinónimo	Expresión célula	Función(es)
CD2	LFA-2	LT, células NK	CAM
CD3		LT	Transducción de señales
CD4		LT "helper"	Adhesión, transducción de señales
CD7		LT y timocitos	
CD8		LT citotóxicos	Adhesión, transducción de señales
CD10	CALLA	LT inmaduros	
CD11b	CR3 (α)	Granulocitos, monocitos, NK	CAM. Con CD18 forma Mac-1 Receptor de iC3b
CD16	Fc γ RIII	Granulocitos, macrófagos, células NK	Receptor de baja afinidad para IgG
CD19		Células B	Regulación de activación
CD20		Pre-B y LB	¿Regulación de activación?
CD21		LB	Receptor de C3d y virus de Epstein Barr
			Ligando de CD23
CD22	Fc ϵ RIIa	LB maduros	CAM
CD23		LB activados	Receptor de IgE de afinidad intermedia
CD25		LT, LB, macrófagos	Con cadena 70 KDa forma receptor alta afinidad IL-2
	Receptor de IL-2 baja afinidad	Activados	
CD28		LT citotóxicos	
CD29	VLA (β)	Amplia	CAM con CDw49a,b,c,d,e,f
CD35	CR1	Granulocitos, monocitos, eritrocitos LB	Receptor de C3b
CD40	ICAM-1	LB	Une CD40-L. Activación de LB.
CD54		Amplia	CAM
CD55		Amplia	Regulador del complemento
CD56		NK, algunos LT	
CD57		NK, algunos LT	

CD, "cluster designation"; CAM, molécula de adhesión celular; LB, linfocitos B; LT, linfocitos T; LFA, antígeno asociado a función de linfocito; ICAM, molécula de adhesión intercelular; VLA, antígeno muy tardío; DAF, "Decay Accelerating factor"; NK, células "Natural Killer".

(centroblastos) son IgM+, IgD- CD10+, CD23-, CD38+ y CD77-; luego en la zona clara del mismo centro las células (centrocitos) presentan el siguiente fenotipo; IgG+ o IgM+ o IgE+, CD10+, CD23-, CD38+ y CD77-. Durante la etapa de precursor del centro germinal y centroblasto ocurre el fenómeno de **mutación somática** y entre la etapa de centroblasto y de centrocito se produce el fenómeno de **cambio de clase** (ver capítulo 6). La última etapa es en la que se generan **células plasmáticas** (IgG+ o IgA+ o IgE+, CD10-, CD23-, CD38+ y CD77-) y **células de memoria** (IgG+ o IgA+ o IgE+, CD10-, CD23-, CD38- y CD77-). Por otra parte, se distinguen dos

subpoblaciones de células B, LB1 y LB2: Entre otros aspectos la subpoblación B1 presenta receptores BcR polirreactivos de baja afinidad y se encuentra mayoritariamente en el peritoneo y en el bazo. La subpoblación B2, constituye la mayor parte del repertorio linfocitario B y se encuentra fundamentalmente en los órganos linfoides secundarios y en la sangre (ver capítulo 6).

La mayoría de los linfocitos B1 se caracteriza por la expresión del marcador CD5 (glicoproteína monomérica de 67 kDa, propia de linfocitos T) y aunque su función es todavía un misterio, se ha sugerido que la activación de estas células conduce a la producción de anticuerpos que

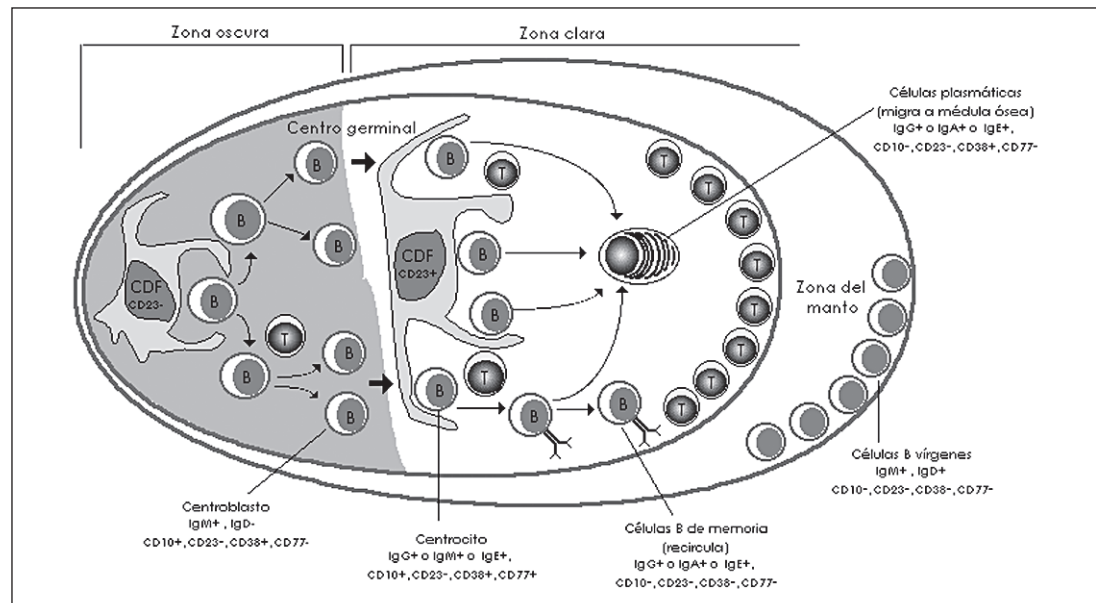


Figura 3-5. Maduración de los linfocitos B en el centro germinal de los folículos linfáticos. Los LB vírgenes toman contacto con el antígeno en la zona oscura del centro germinal (del folículo linfático). En esta zona ocurre la expansión clonal y mutación somática. Luego en la zona clara del centro germinal se produce el cambio de clase, y se generan células B de memoria (recirculan) y células plasmáticas (algunas migran a la médula ósea). CDF, célula dendrítica folicular.

proporcionan protección contra infecciones bacterianas durante la vida fetal, mucho antes que el repertorio linfocitario de la respuesta inmune adquirida sea completamente funcional. Además, en el repertorio adulto, los linfocitos B1 dan origen a células plasmáticas que secretan IgM y a una fracción importante de células plasmáticas productoras de IgA en el intestino. De hecho, la transferencia pasiva de linfocitos peritoneales B1 en ratones Scid (que sufren de una severa inmunodeficiencia combinada), reconstituye la producción de IgA contra muchas bacterias intestinales. Por otro lado la transferencia pasiva de células de hígado fetal o del omentum intestinal, a ratones irradiados, rápidamente reconstituye la subpoblación B1, mientras la transferencia de de precursores de médula ósea adulta reconstituye la subpoblación B2 pero no la B1.

En el repertorio linfocitario adulto, los linfocitos B1 son bastante frecuentes en la población B que sufre neoplasias y en aquéllos que reconocen una gran variedad de autoantígenos y reaccionan cruzadamente con antígenos bacterianos como polisacáridos y lipopolisacáridos. El repertorio de receptores BcR es bastante más limitado en los linfocitos B1 que en los linfocitos B2, sus reordenamientos génicos V_H son más restringidos, y, como no expresan la enzima TdT (Terminal deoxinucleotidil Transferasa), carecen de regiones N en las uniones VDJ.

Por su parte, la maduración de las células T se puede separar también en dos estadios previos al LT maduro: **Pro-T** que son TdT+, HLA-DR+, CD1+, CD2+, CD5+, CD7+, C-kit+ y CD3 citoplasmático +, y **Pre-T** que son TdT+, CD1+, CD4+, CD5+, CD7+, CD8+, CD3 citoplasmático + (ver capítulo 7). Las **células T maduras** presentan el siguiente inmunofenotipo: CD2+, CD3+, CD4+ ó CD8+, CD7+, TCR $\alpha\beta$ + (ver capítulo 7). Por otra parte, en base al diferente patrón de secreción de citoquinas, se distinguen dos subpoblaciones de células T “helper” (CD4+), LTh1 y LTh2 (ver capítulos 11 y 14).

Mayores antecedentes sobre la diferenciación de los linfocitos B y T, serán descritos en el capítulo 13.

Reconocimiento antigénico

Los LB y LT presentan receptores para antígenos específicos, como son la IgM de membrana que forma parte del BCR (Receptor de células B) y el TCR (Receptor de células T), respectivamente (ver capítulos 6 y 7).

Además de presentar un receptor diferente, las células B y células T reconocen el antígeno en diferente forma; en el caso de los LB las IgM de membrana reconocen el antígeno directamente, sin intervención de otra célula, en cambio en el caso de los LT los TCR reconocen péptidos extraños que son presentados por otra célula, unidos a mo-



lécúlas MHC, clase I si se trata de LTc y clase II si es LTh. Estos péptidos se originan durante el procesamiento del antígeno en células blanco (cuando son presentados en moléculas MHC clase I), y en las denominadas células presentadoras de antígeno (cuando son presentados en moléculas MHC clase II). En el capítulo 9 se explica en detalle el procesamiento de los antígenos a través de dos vías diferentes (endógena y exógena) según los péptidos sean presentados a LTc o LTh. Además se explica el concepto de restricción MHC.

Las células NK, que no expresan inmunoglobulinas ni TCR, poseen dos tipos de receptores: de activación (KAR: "Killer Activating Receptor") y de inhibición (KIR: "Killer Inhibition Receptor"). Los KAR reconocen patrones moleculares hidrocarbonados característicos de microorganismos y los KIR reconocen moléculas MHC propias en otras células; si éstas son propias transducen señales de inhibición de los mecanismos de citotoxicidad (ver capítulo 19).

Activación de los linfocitos

La unión del antígeno con el receptor específico de una célula T o B activa al linfocito mediante un delicado proceso bioquímico que implica transducción de señales al interior de la célula, generación de segundos mensajeros (IP_3 , DAG, Ca^{2+}) y fosforilación de proteínas (ver capítulo 10). Proteínas fosforiladas, se unen a secuencias reguladoras de genes que participan en la activación de los linfocitos. Como consecuencia de la activación, el linfocito sufre un proceso denominado **transformación blástica** que implica una serie de cambios estructurales y bioquímicos que terminan en la formación de una célula grande, de citoplasma basófilo (por aumento de retículo endoplásmico), núcleo laxo, semejante a un linfoblasto. La activación linfocitaria produce una **amplificación clonal** (etapa de proliferación de células con la misma especificidad antigénica), posteriormente ocurre una **producción de células efectoras**, responsables de la síntesis de anticuerpos (células plasmáticas) y de la inmunidad mediada por células (LT CD4+ y LT CD8+) y **células de memoria** (estas dos últimas como parte de la etapa de maduración) (figura 3-6).

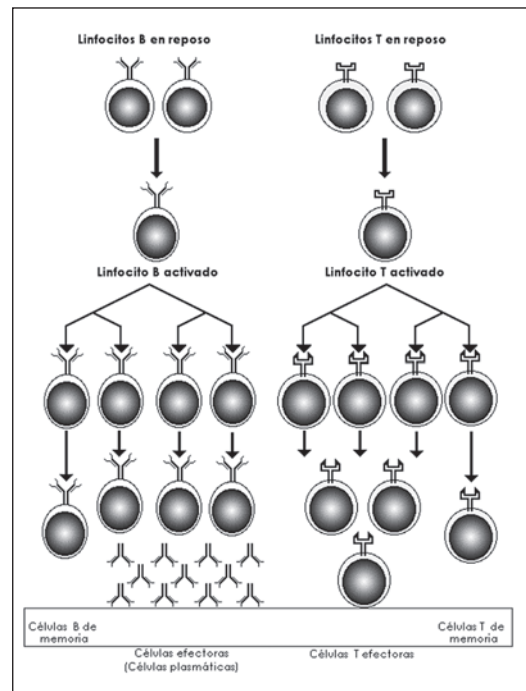


Figura 3-6. Esquema de la selección clonal de las células B y células T. Luego que un antígeno interacciona con la célula T y/o B que posee el receptor que le es específico, el linfocito es activado, sufriendo una transformación blástica. La activación linfocitaria lleva a una proliferación clonal y diferenciación celular con producción de células efectoras y de memoria, tanto en la línea celular B como T.

2.3. Sistema fagocítico mononuclear

Dada su relación ontogénica, y sus características estructurales y funcionales, a los monocitos y macrófagos se les agrupa en el denominado **Sistema fagocítico mononuclear (SFM)**, antes llamado sistema retículo endotelial. Se describirá en este punto a las células dendríticas (DC, "Dendritic Cells") por su origen común, aunque no son principalmente fagocíticas.

Estas células presentan un amplio espectro de funciones: (a) remoción de células muertas, senescentes, extrañas, y alteradas; (b) regulación de la función de otras células; (c) procesamiento y presentación de antígenos; (d) participación en reacciones inflamatorias; (e) destrucción de microorganismos y (f) destrucción de células neoplásicas.

2.3.1. Monocitos

Los monocitos presentan un diámetro de 12-15 μm (figura 3-7) y representan un 4-10% de los



leucocitos sanguíneos (tabla 3-2). En su citoplasma tienen gránulos azurófilos o primarios que contienen hidrolasas ácidas, que junto con los mecanismos oxidativos, participan en la destrucción de las partículas fagocitadas; al respecto es válido lo descrito antes para los neutrófilos.

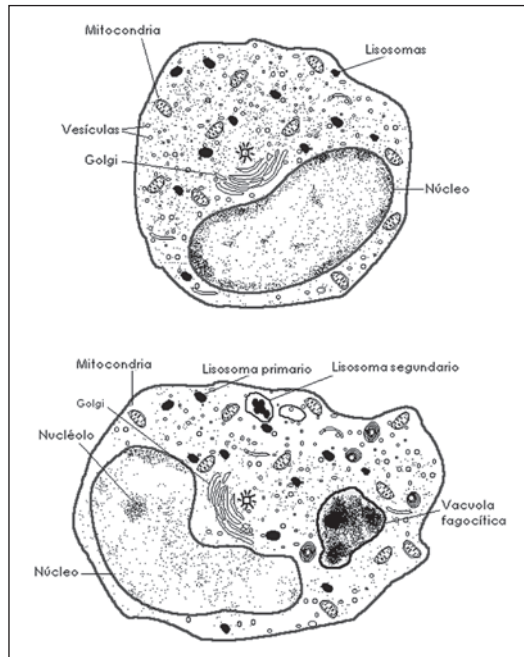


Figura 3-7. Esquema de la estructura subcelular de monocitos y macrófagos. Los monocitos son precursores sanguíneos de los macrófagos tisulares. Ambos tipos de células presentan un núcleo excéntrico arrionado. En la indentación presentan el aparato de Golgi. Ambos poseen escasa cantidad de retículo endoplásmico rugoso y las mitocondrias están distribuidas en el citoplasma. Los macrófagos son de mayor tamaño que los monocitos y presentan diferente forma y funciones según el tejido en que están ubicados. En los macrófagos es posible observar microfilamentos, liposomas, gotas de grasa y vesículas endocíticas conteniendo moléculas solubles y partículas de distintos tamaños que han sido internalizadas.

Después de salir de la médula ósea los monocitos circulan aproximadamente 8 horas; al igual que los neutrófilos, en la sangre se reconocen dos compartimentos, circulante y marginal; luego pasan a los tejidos donde se transforman en macrófagos. En relación a los monocitos los macrófagos son de mayor tamaño y presentan mayor capacidad fagocítica y microbicida. Pueden permanecer vivos entre algunos meses y años. Se encuentran en varios órganos, destacando su presencia en el hígado (células de Kupffer), riñones, pulmones (macrófagos alveolares e intersticiales), serosas (peritoneal y plural) bazo, ganglios linfáticos, cerebro, aparato reproductivo

(testículo, ovario, útero, oviductos), hueso (osteoclastos) e intestino. También se encuentran en la leche materna.

Receptores de fagocitos mononucleares

Los macrófagos y monocitos presentan una gama importante de receptores: para región Fc inmunoglobulinas, complemento, lipoproteínas, citoquinas y factores quimiotácticos, entre otras moléculas (tabla 3-4).

Las **Moléculas de Adhesión Celular (CAM)** participan en las uniones célula-célula y célula-matriz. En los monocitos y macrófagos, entre otras moléculas de adhesión se han descrito las moléculas LFA1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) y p150,95 o CR1(CD11c/CD18) de la familia integrinas y las moléculas CD2 e ICAM-1 (CD54) de la superfamilia de las inmunoglobulinas (SFIg) (ver capítulo 12).

2.3.2. Macrófagos

Los macrófagos pueden ser residentes (fijos en tejidos) o libres. Entre los primeros destacan:

- Macrófagos intestinales.** Los macrófagos se encuentran principalmente en la lámina propia del tracto gastrointestinal. Las áreas corticales ricas en linfocitos asociados a intestino (GAL) y las placas de Peyer contienen muy pocos macrófagos. Respecto a su función podrían participar en la presentación antigénica, en la fagocitosis de bacterias y células muertas.
- Macrófagos del hígado.** Las células de Kupffer se ubican en las paredes vasculares de los sinusoides hepáticos. Pueden fagocitar un espectro amplio de células y partículas, entre ellos, liposomas, bacterias, parásitos, virus, glóbulos rojos y plaquetas opsonizadas con IgG y/o complemento.
- Macrófagos cerebrales.** Estos macrófagos son llamados células microgliales. La función de estos macrófagos no es bien conocida, posiblemente participan en la inducción de la respuesta inmune y probablemente modulen la función neuronal.
- Macrófagos peritoneales.** Éstos se encuentran entre los macrófagos de serosas; tienen capacidad para destruir células neoplásicas y bacterias. En casos de peritonitis o ascitis



Tabla 3-4. Receptores de macrófagos y monocitos

Receptores de Inmunoglobulinas
FcγRI (CD64)
FcγRII (CD32): A, B y C
FcγRIII (CD16): A y B
FcεRI
FcεRI
FcεRII (CD23): A y B
FcαR
Receptores del Complemento
CR1 (CD35)
CR3 (CD11b/CD18)
Receptores de Citoquinas
TNF-R
IL-1R
M-CSFR
IFNγR
Receptores de factores quimiotácticos
De péptidos formilados
De quimioquinas
De C5a
Receptor de lipopolisacárido (CD14)
Receptores de lipoproteínas
LDL-R
Receptor "scavenger" (de LDL modificada)
Receptores de hormonas
De Glucocorticoides
De Insulina
De Estrógenos
Otras hormonas
Receptor de transferrina
Receptor de lactoferrina
Receptor de fibronectina

- maligna aumenta el número de macrófagos.
- e) Macrófagos de órganos reproductivos.** Los testículos contienen un gran número de macrófagos. Pueden participar en la fagocitosis de espermios moribundos no eyaculados y en la destrucción de microorganismos. En los ovarios los macrófagos pueden participar en la fagocitosis de células degenerativas del cuerpo lúteo.
- f) Macrófagos del hueso.** Los osteoclastos se encargan de la resorción ósea.
- g) Macrófagos del tejido conjuntivo:** Histiocitos.
- h) Macrófagos renales.** Células mesangiales de los glomérulos renales

Los macrófagos libres están situados en ór-

ganos linfoides secundarios; allí atrapan material extraño: macrófagos de los sinusoides esplénicos y de los senos medulares en los ganglios linfáticos.

Los macrófagos tienen una vida media mucho más larga que los neutrófilos en los tejidos (meses e incluso años).

Una subpoblación de los monocitos y macrófagos, expresa en su superficie **moléculas de clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)**, que participan en la presentación del antígeno a los linfocitos T "helper" (LTh) (ver capítulos 8 y 9). Por otra parte, sintetizan y secretan **citoquinas** como Interferón (IFN) α y β , IL-1 y Factor de necrosis tumoral (TNF).



2.3.3. Células dendríticas

Junto a los monocitos y macrófagos las DC son células presentadoras de antígeno, pero este último tipo celular es el que presenta una mayor capacidad, siendo muy eficiente en el inicio y modulación de la respuesta inmune. Morfológicamente se caracterizan porque del cuerpo celular salen prolongaciones alargadas.

Durante su maduración sufren una serie de cambios inmunológico-funcionales que les permiten una mayor adaptación a las circunstancias, así consiguen una mayor especialización en sus funciones de activación de linfocitos T.

Se ha demostrado la existencia de distintas líneas de DC, con diferentes estadios madurativos y vías de migración, lo que implica una distribución anatómica diferente. A partir de la célula pluripotencial CD34⁺ y en presencia de GM-CSF y TNF α se diferencia en: (a) CD1 α ⁺, CD14⁻, de las que se originan las células de Langerhans (DC de la piel) y (b) CD1 α ⁻, CD14⁺ que dan origen a las DC mieloides.

Las células de Langerhans se trasladan hacia tejidos no vascularizados como la epidermis en la piel, y las DC mieloides lo hacen hacia zonas vascularizadas, localizándose en los intersticios (DC intersticiales). Una vez que las células de Langerhans han incorporado el antígeno en la piel, migran por la linfa hacia los ganglios linfáticos donde lo presentan a las LT; las DC intersticiales, por su parte, migran hacia el bazo a través de la sangre.

Según su distribución las DC se clasifican en: (a) DC del tejido linfoide (DC interdigitantes); existen en la médula ósea y timo y se denominan de la zona marginal, cuando están presentes en bazo, (b) DC de los tejidos sólidos no linfoides (células de Langerhans, cuando se localizan en la epidermis y células intersticiales a las localizadas en el corazón y riñones) y (c) DC de fluidos a las que se encuentran en tránsito, tanto en los vasos linfáticos aferentes como en la sangre.

La maduración de la DC es fundamental en la iniciación de la respuesta inmune. Los estudios de maduración *in vitro* de DC se realizan a partir de monocitos obtenidos de sangre periférica e incubados en presencia de GM-CSF e IL-4; se obtiene así una población de **DC inmaduras**, células que expresan en su superficie moléculas MHC clase II en baja densidad,

receptor de manosa, quimioquina CCR5 (ver capítulo 11) y FcR, y no expresan la molécula de adhesión ICAM-1 y molécula coestimuladora B7. En el paso a DC maduras participan LPS (Lipopolisacárido) de la pared bacteriana, citoquinas como IL-1 y TNF α . Las **DC maduras** expresan en su superficie altos niveles de moléculas MHC clase II, de moléculas coestimuladoras (CD40, CD86/B7-2 y B7-1), de moléculas de adhesión (ICAM-1 y LFA-3) y de receptores para quimioquinas como CCR7 (ver capítulo 11).

In vivo, factores, tanto de tipo infecciosos como inflamatorios, influyen en estimular la maduración y el movimiento de las DC hacia los tejidos linfoides secundarios.

2.4. Granulocitos

Como se indicó antes, en la serie granulocítica, a partir del estadio madurativo de mielocito se reconocen tres líneas celulares diferentes: neutrófilos, eosinófilos y basófilos. En la tabla 3-2 se muestra el porcentaje que cada línea celular ocupa entre los leucocitos en los adultos y el número absoluto que representa.

2.4.1. Neutrófilos. En los adultos, los neutrófilos maduros representan aproximadamente el 65% de los $4-10 \times 10^3$ glóbulos blancos o leucocitos por microlitro de la sangre.

Los neutrófilos tienen un diámetro de 10-15 μ m y un núcleo segmentado con 2-5 lóbulos (figura 3-8). En su citoplasma se han descrito cuatro tipos de gránulos, los primarios o azurófilos (lisosomas), secundarios (específicos), terciarios y vesículas secretoras (tabla 3-5). Los **gránulos primarios**, son escasos en los estadios maduros, y contienen enzimas y proteínas microbicidas (entre otras, peroxidasa, lisozima, proteínas catiónicas) proteínas (elastasa, catepsina G y otras proteínas) e hidrolasas ácidas (entre otras, N-acetilglucuronidasa y catepsinas B y D). Los **gránulos secundarios**, son los más numerosos en los neutrófilos maduros; contienen lisozima, colagenasa, fosfatasas alcalina, lactoferrina y otras enzimas y proteínas. Los **gránulos terciarios** contienen principalmente gelatinasa. Las **vesículas secretoras**, al parecer formadas por endocitosis, contienen algunas proteínas plasmáticas.



Tabla 3-5. Contenido de los gránulos de los neutrófilos humanos

	Gránulos Primarios	Gránulos Secundarios	Gránulos Terciarios	Vesículas Secretoras
Membrana		CD11b (Mac-1)	CD11b (Mac-1)	CD11b (Mac-1)
		Citocromo b ₅₅₈	Citocromo b ₅₅₈	Citocromo b ₅₅₈
		Receptor de FMLP	Receptor de FMLP	Receptor de FMLP
		Receptor de laminina	Receptor de laminina	
		Receptor de uPA		Receptor de uPA
	CD63	CD15		Fosfatasa alcalina
	CD66c	CD66a		CD10, CD13, CD45
	CD68	CD666		CD16
		Receptor de fibronectina		DAF (CD55)
		Subunidad α de Proteína G		CR1 (CD35)
		Antígeno NB1		
		RAP1, RAP2		
		Receptor de Trombospondina		
		Receptor de TNF		
		Receptor de Vitronectina		
Matriz				
Agentes microbicidas				
	Lisozima	Lisozima	Lisozima	
	Mieloperoxidasa	Colagenasa		
	Defensinas			
	Proteínas catiónicas			
	Proteína bactericida			
	permeabilizante (BPI)			
Proteasas				
	Elastasa			
	Catepsina G			
	Proteinasa 3			
Hidrolasas ácidas				
	N-Acetilglucuronidasa			
	Catepsinas B y D			
	β -Glucuronidasa			
	β -Glicerofosfatasa			
	β -Galactosidasa			
	β -Glucosaminidasa			
	α -Fucosidasa			
	α -Manosidasa			
	N-Acetil- β -glucosaminidasa			
Otros	Sialidasa	Sialisidasa		
	Azurocidin	Pro-uPA		Pro-uPA/uPA
	Ácido mucopolisacárido	Apolactoferrina	Gelatinasa	Proteínas plasmáticas:
	Proteína ligante de heparina	β_2 -Microglobulina	Acetiltransferasa	Tetranectina,
	Factor inactivador de C5a	Histaminasa		Albúmina,
		Heparinasa		Otras
		Proteína ligante de Vitamina B12		
		Inhibidor de proteína Kinasa C		
		Otros		

FMLP, péptido formil-metil-leu-phe; uPA, Activador del plasminógeno tipo uroquinasa.

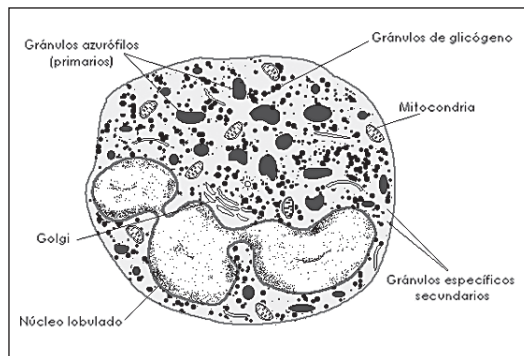


Figura 3-8. Esquema de la estructura subcelular de un neutrófilo. Célula de 10-15 μm . Debido al pH neutro de su citoplasma y contenido granular, éstos no se tiñen con la clásica tinción hematológica de May Grünwald-Giemsa. Una característica de los neutrófilos maduros es su núcleo segmentado. El citoplasma contiene un pequeño aparato de Golgi y retículo endoplásmico rugoso, y escasas mitocondrias y ribosomas. Los neutrófilos presentan dos tipos de gránulos, primarios y secundarios; estos últimos más numerosos en neutrófilos maduros. Además contienen numerosos y pequeños gránulos de glicógeno.

Algunas moléculas expresadas en la membrana de los neutrófilos son: (a) moléculas de adhesión (ver capítulo 12), entre ellas LFA-1 (CD11a), Mac-1 (CD11b), p150, 95 (CD11c), β_2 -integrina (CD18), ICAM-3 (CD50), L-selectina (CD62b), (b) receptores: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16), Receptor para C5a (CD68), receptor para G-CSF (CD114), (c) ectoenzimas: aminopeptidasa N (CD13, inactiva IL-8), endopeptidasa (CD10, inactiva FMLP) y (d) otros: “Decay accelerating

factor”, (DAF, CD55), Antígeno leucocitario común (CD45) (Proteína tirosina fosfatasa).

Una vez que los neutrófilos salen de la médula ósea, permanecen en circulación aproximadamente 7 horas, para luego pasar al azar a los tejidos, donde subsisten vivos 2-3 días. La producción y destrucción diaria de neutrófilos es de $0,9 \times 10^9/\text{Kg}$ de peso.

Para que los neutrófilos puedan cumplir su función de fagocitar y destruir las partículas ingeridas deben movilizarse al foco infeccioso.

Quimiotaxis

El movimiento de los neutrófilos al sitio de infección es dirigido por un gradiente químico (**quimiotaxis**). Entre otros factores quimiotácticos (tabla 3-6), para los que estos leucocitos poseen receptores, destacan algunas proteínas del complemento (C5a, C3a), péptidos formilados (Ej. N-formil-met-leu-phe, FMLP) y lípidos derivados de las bacterias, factor plaquetario 4 (PF4), metabolitos de la vía de la lipoxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico, especialmente el leucotrieno B₄ (LTB₄), y las llamadas quimioquinas, entre ellas la IL-8. Varios de estos factores han sido clonados y secuenciados. A modo de ejemplo el receptor de C5a es una proteína de transmembrana de 30 kDa y presenta tres “loops” extracelulares e intracelulares, siete dominios transmembrana, el extremo carboxilo citoplasmático y el extremo amino extracelular.

Tabla 3-6. Factores quimiotácticos para neutrófilos

Factor quimiotáctico	Fuente
Clásicos	
Péptidos formilados	Bacterias
Fragmento C5a	Activación del Complemento
Leucotrieno B ₄ (LTB ₄)	Metabolismo del ácido araquidónico
Factor activador de plaquetas (PAF)	Metabolismo de fosfatidilcolina
Quimioquinas C-X-C	
Interleuquina 8 (IL-8)	Linfocitos T, monocitos, células endoteliales, otras células.
β -tromboglobulina	Gránulos α de plaquetas
gro- α	Células endoteliales, monocitos, otras células.
ENA-78	Células epiteliales
Quimioquinas C-C	
MIP-1 $\alpha\beta$	Monocitos



Los factores quimiotácticos actúan a bajas dosis (0,1-1mM). El efecto biológico de los factores quimiotácticos es lograr una migración dirigida de los neutrófilos. La respuesta leucocitaria a los factores quimiotácticos es regulada positiva o negativamente por varios estímulos fisiológicos y farmacológicos. Varias citoquinas, como por ejemplo, $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ favorecen la quimiotaxis. En el caso del $IFN\gamma$ participa aumentando la hidrólisis de fosfatidilcolina por la fosfolipasa D. La desensibilización celular al estímulo del factor quimiotáctico puede ocurrir por aumento de cAMP o degradación del factor quimiotáctico.

Receptores que participan en la fagocitosis

Una etapa inicial de la fagocitosis es el reconocimiento, por parte de la célula fagocítica, de la partícula a ser fagocitada. Para ello las células fagocíticas poseen 2 grupos de receptores, capaces de reconocer: (a) ligandos propios de los organismos o células a fagocitar y (b) moléculas que se han unido a ellas y que favorecen la fagocitosis (opsoninas).

Entre los receptores que unen moléculas no opsonicas y que se presentan fundamentalmente los macrófagos, se encuentran: (i) los **receptores “scavenger”** que unen varios ligandos, entre otros, proteínas modificadas, polianiones (incluye ácidos nucleicos), fosfolípidos ácidos (incluye lipopolisacárido de bacterias Gram negativas y ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas y (ii) el **receptor de manosa**, que une carbohidratos.

Entre los receptores de opsoninas, se distinguen: (i) los **receptores de fragmento Fc de IgG** ($Fc\gamma R$) e IgA ($Fc\alpha R$) unidos a un dímero de cadenas γ , los **receptores del complemento** y otros receptores (de **colectinas** y de **proteínas plasmáticas**). Los receptores de Fc son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (ver capítulo 6), con 3 ($Fc\gamma RIA$) o 2 (otros receptores Fc) dominios tipo inmunoglobulina extracelulares, un dominio transmembrana y una corta cola citoplasmática; $Fc\gamma RIIB$, unido a glicofosfatidilinositol (GPI), es una excepción. En la tabla 3-7 se muestra en diferentes $Fc\gamma R$ y el $Fc\alpha R$ indicado las células que los presentan:

Los receptores del complemento incluyen CR1, una proteína de transmembrana que une C3b, y dos integrinas CD11b/CD18 y CD11c/CD18, llamadas también CR3 y CR4, respectivamente. Estos dos últimos receptores unen iC3b, molécula derivada de C3b y se une covalentemente a la superficie celular.

Otros receptores unen un grupo de moléculas llamadas colectinas, entre ellas la proteína que une manosa (MBL), molécula que participa en la activación del sistema del complemento y la proteína C reactiva (PCR) que se puede unir por ejemplo al carbohidrato C del *Streptococcus pneumoniae*. Además de receptores para las colectinas también existe receptores para algunas proteínas plasmáticas que se pueden unir a los microorganismos, por ejemplo receptores para fibrinógeno y fibronectina.

Tabla 3-7. Receptores de la región Fc de IgG e IgA

Receptor	CD	Células
$Fc\gamma RI^*$	CD64	Monocitos, macrófagos, Neutrófilos maduros tratados con $IFN\gamma$
$Fc\gamma RIIA$	CD32	Neutrófilos maduros, monocitos Macrófagos, plaquetas
$Fc\gamma RIIB$	CD32	Monocitos, macrófagos Linfocitos B, mastocitos
$Fc\gamma RIIIA$	CD16	Macrófagos, células NK Mastocitos
$Fc\alpha R$	CD89	Granulocitos, monocitos Macrófagos

* Tres locus génicos; I, alta afinidad; II, afinidad intermedia; III, baja afinidad

Transducción de señales en la fagocitosis

Se describirá el mecanismo de transducción de señales asociados a la fagocitosis mediada por FcγR. Los receptores FcγRI, FcγIIA y FcγIIIA comparten la capacidad para activar la cascada de tirosina kinasa. Los dominios ITAM (“immune-tyrosine activation motifs”) de la cadena γ de los receptores FcγR pueden ser fosforilados por tirosina kinasa de la familia SyK. Esta etapa es fundamental para la ingestión y polimerización de actina. Paralelamente, la unión ligando-receptor activa la **fosfolipasa C** la cual desdobla el fosfatidil inositol-4,5-difosfato (PIP₂) en inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) (figura 3-9). El IP₃ permite que se libere Ca²⁺ de los depósitos citoplasmáticos, el que tiene dos acciones: (a) desencadena el ordenamiento de los filamentos de actina y de la proteína contráctil miosina, responsables del movimiento de los neutrófilos y (b) activa la **fosfolipasa A₂** que convierte los fosfolípidos de membrana en ácido araquidónico a partir del cual se obtienen otros metabolitos. El

DAG activa la **proteína kinasa C** que fosforila proteínas que participan en los procesos de degranulación y secreción. La fosfolipasa D escinde fosfatidilcolina a ácido fosfatídico y colina; su activación se asocia a la unión de ligandos a receptores del complemento.

Adhesión de neutrófilos al endotelio

Para que los neutrófilos lleguen a los tejidos infectados, junto recibir la señal quimiotáctica, éstos deben unirse al endotelio, luego rodar sobre éste (“rolling”), sufrir un proceso de activación adicional y luego participar de un proceso de migración transendotelial. En este proceso tienen importante participación algunas moléculas de adhesión celular (capítulo 12), expresadas en forma constitutiva e inducida en la membrana de los neutrófilos y células endoteliales.

Aproximadamente la mitad de los neutrófilos circulantes forman parte del “pool” marginal, que mantienen interacción intermitente con el endotelio. Las moléculas de adhesión de la fami-

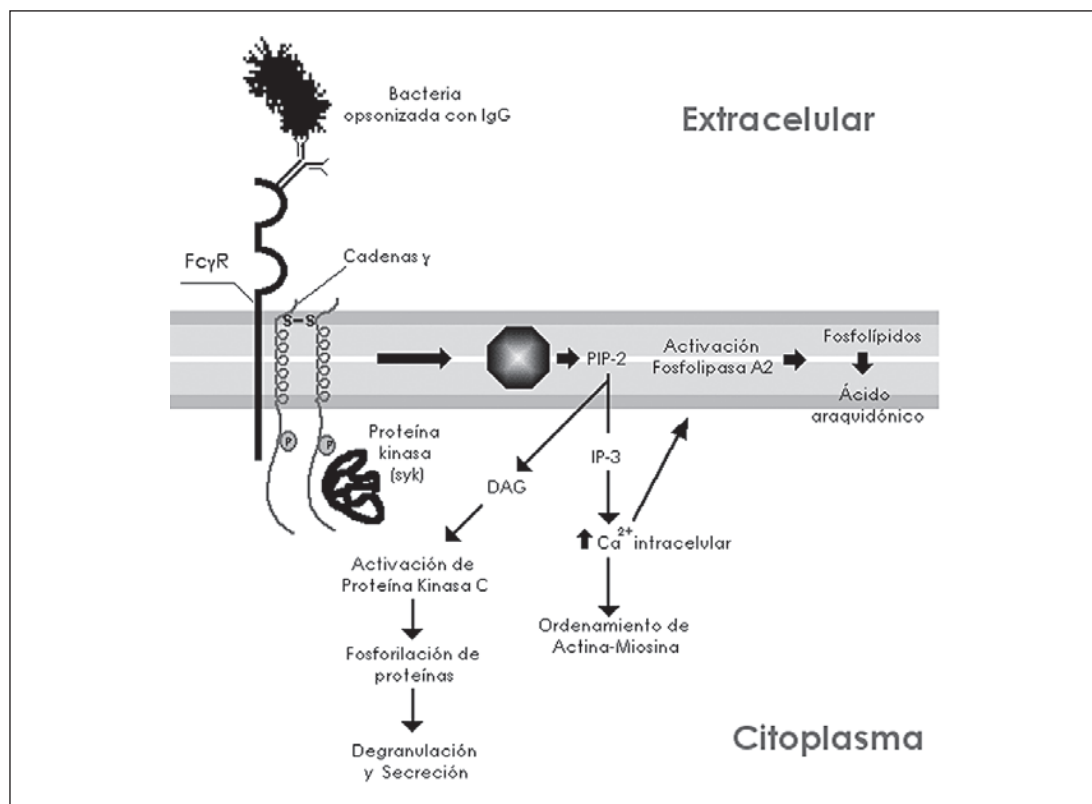


Figura 3-9. Activación de los neutrófilos a través de FcγR. La unión de bacterias opsonizadas con IgG a FcγR favorece la fosforilación de las cadenas γ del FcγR por proteína kinasa. Además se activa la fosfolipasa C que desdobla el fosfatidil inositol - 4,5-difosfato (PIP₂) en inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). La figura muestra esquemáticamente la participación de los segundos mensajeros (IP₃, Ca²⁺ y DAG).



lia selectinas (L-selectinas, CD62L en leucocitos y E-selectinas, CD62E en células endoteliales) y sus ligandos, carbohidratos sialilados, son responsables del “rolling” de los neutrófilos sobre el endotelio. La interacción de los factores quimiotácticos con sus respectivos receptores inicia el proceso de transducción de señales en los neutrófilos, lo que inicialmente se asocia con expresión de moléculas de adhesión de la familia integrinas, especialmente LFA-1 (CD11a-CD18) que se une a su ligando de la superfamilia de las inmunoglobulinas ICAM-1 (CD54) en las células endoteliales. Este último tipo de interacción resulta en un marcado incremento de la adhesión de los neutrófilos al endotelio y término del “rolling”. Luego los neutrófilos migran entre las células endoteliales al tejido.

Fagocitosis

La endocitosis, proceso por el cual el material es introducido en la célula, puede tomar la forma de una **pinocitosis** (bebiendo por células) y **fagocitosis** (comiendo por células). La fagocitosis es visible al microscopio óptico; la pinocitosis se refiere a la ingestión de macromoléculas. Ambos procesos involucran invaginación de la membrana celular y la formación de vesículas o vacuolas (fagosomas). La mayoría de las células pueden realizar pinocitosis, pero la fagocitosis es un proceso característico de los neutrófilos, monocitos y macrófagos, y, en mucho menor grado, de los eosinófilos y basófilos.

La **fagocitosis** de los microorganismos se ve favorecida si éstos están recubiertos (opsonizados)

con IgG (subclases 1 ó 3) y/o fracciones del complemento (C3b y/o C4b). Los neutrófilos al igual que los monocitos y macrófagos, poseen receptores para la región Fc de IgG (FcγR) y para C3b y C4b (tabla 3-8). La unión de estas opsoninas con el receptor respectivo, activa la célula fagocítica, ésta emite prolongaciones que engloban al microorganismo. El fagosoma formado por la membrana plasmática, posteriormente se fusiona con la membrana de los gránulos citoplasmáticos que descargan su contenido enzimático en el interior del fagosoma (figura 3-10). El DAG, a través de la proteína quinasa C que fosforila proteínas, “gatilla” la degranulación.

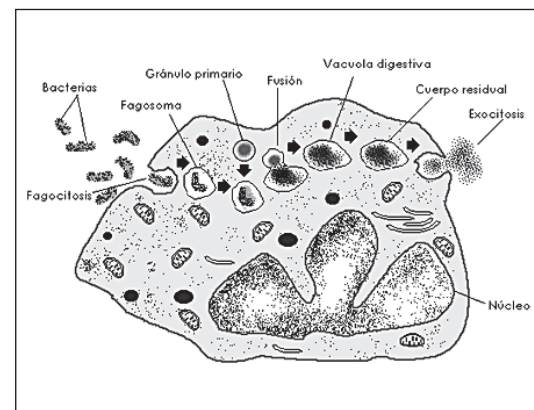


Figura 3-10. Esquema de fagocitosis. Se muestra el proceso de fagocitosis de bacterias opsonizadas. La unión de gránulos primarios y específicos con el fagosoma forman la vacuola digestiva. La degradación bacteriana conduce a la formación de un cuerpo residual y a la expulsión (exocitosis) de componentes no degradables.

Tabla 3-8. Receptores para inmunoglobulinas y fracciones del complemento en los granulocitos y monocitos/macrófagos.

	FcεRI	FcεRII	FcγRI	FcγRII	FcγRIII	C5aR	CR1	CR3
Neutrófilos	-	+	-	+?	+	+	+	+
Eosinófilos	-	+	-	-	+	+	+	+
Basófilos	+	-	-	-	+	+	+	+
Monocitos/ macrófagos	?	-	+	+	+	+	+	+

FcεR, Receptor para IgE (I, alta afinidad; II, afinidad intermedia); Fcγ, Receptor para IgG (I, alta afinidad; II, afinidad intermedia; III, baja afinidad); C5aR, receptor de C5a; CR1, receptor de C3b; CR3, receptor de iC3b.



Antes se indicó el contenido de cada uno de los tres tipos de gránulos de los neutrófilos (tabla 3-5). Así por ejemplo los gránulos azurófilos contienen componentes antibacterianos; también contienen elementos como elastasa que puede favorecer el movimiento de los neutrófilos al hidrolizar algunos componentes de la matriz extracelular. Los gránulos secundarios son liberados más fácilmente de los neutrófilos, conteniendo entre otras moléculas, algunas que activan el sistema del complemento. También contienen colagenasa, que al igual que la elastasa puede favorecer el movimiento de las células fagocíticas. Por otra parte, la apolactoferrina al unir hierro puede tener un efecto antimicrobiano, entre otras razones por privar de este elemento a las bacterias. Por su parte, la gelatinasa contenida en los gránulos terciarios puede participar, junto a otros componentes, en la modificación de la matriz extracelular durante el desplazamiento de los neutrófilos. En otro orden, proteínas de membrana de los gránulos terciarios y de las vesículas secretoras, pueden aumentar su expresión en la superficie celular, después de la activación.

Mecanismos microbicidas

Una vez fagocitados los microorganismos, éstos son destruidos por mecanismos dependientes e independientes del oxígeno, también denominados mecanismos oxidativos y no oxidativos, respectivamente (tabla 3-9).

Tabla 3-9. Mecanismos antimicrobianos de los neutrófilos

Dependientes del oxígeno

- Mediados por mieloperoxidasa
 - Ácido hipocloroso (HOCl)
- Independientes de mieloperoxidasa
 - Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
 - Ión superóxido (O_2^-)
 - ¿Otros?

Independientes del Oxígeno

- pH ácido
- Lisozima
- Lactoferrina
- Defensinas
- Proteína bactericida permeabilizante (BPI)
- Proteínas catiónicas de los gránulos

a) Mecanismos antimicrobianos dependientes del oxígeno. Durante la fagocitosis, proceso dependiente de energía, se produce un aumento del consumo de oxígeno, de la oxidación de la glucosa y de la producción de metabolitos del oxígeno, fenómeno también denominado “estallido respiratorio” (figura 3-11). La generación de estos últimos se debe a la activación de la NADPH oxidasa que al oxidar el NADPH reduce el oxígeno molecular a ión superóxido (O_2^-), el que se convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Los metabolitos del oxígeno pueden actuar a través de un mecanismo dependiente o independiente de mieloperoxidasa (MPO), enzima presente en alta concentración en los gránulos primarios, los que son degranulados al interior del fagosoma (figura 3-11). La MPO, en presencia de un ión haluro como Cl^- (o Br^-), transforma el H_2O_2 , generada por mecanismos dependientes de oxígeno pero independiente de MPO, en ácido hipocloroso (HOCl), un potente oxidante y antimicrobiano, (antibacteriano, antifúngico, antiviral y antimicoplasma). Los radicales superóxido e hidroxilo, por sí solos tienen acción microbicida.

La oxidasa dependiente de NADPH, es un complejo multienzimático que incluye dos proteínas de membrana (de dos tipos de gránulos: vesículas secretoras y gránulos secundarios) y tres citosólicas, cuando la célula está en reposo (figura 3-12). El componente de membrana es un heterodímero formado por una proteína de 91 kDa (gp91phox) y una proteína de 22 kDa (p22phox). Estas proteínas, junto con flavin adenin dinucleótido (FAD) forman un flavocitocromo denominado citocromo b_{558} . Adicionalmente en la membrana participa una proteína de unión de nucleótidos de guanina denominada rap1. La subunidad de 91 kDa presenta el sitio de unión para el NADPH. Ambas subunidades presentan grupos HEME. El componente citoplasmático está formado por tres proteínas independientes: p40phox, p74phox y p67 phox. Además participa otra proteína de unión de nucleótidos de guanina, rac2; en reposo una GDP y cuando la célula es activada une GTP.

Precozmente durante la activación, las vesículas secretoras y posteriormente los gránulos secundarios, se fusionan con la membrana plasmática, la cual durante la fagocitosis se invagina y por tanto la membrana de los fagosomas presentará las proteínas de membrana de la NADPH oxidasa. Como consecuencia de la activación de los neutrófilos, proceso en

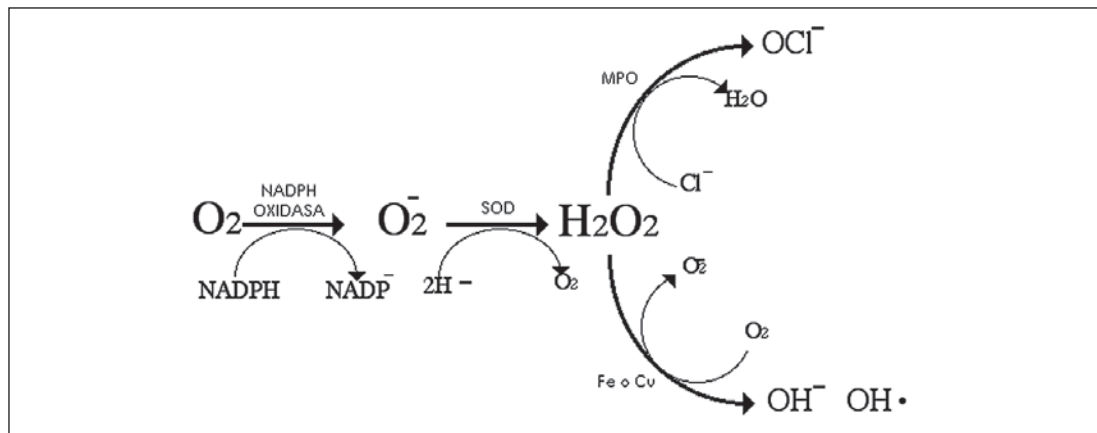


Figura 3-11. Mecanismos microbicidas oxidativos. Una oxidasa cataliza la reducción de oxígeno a ión superóxido (O_2^-) a expensas del NADPH. El NADPH es regenerado a través de la vía de las hexosas. El O_2^- es transformado en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y O_2 por la superóxido dismutasa (SOD). Reacciones posteriores que comprometen al H_2O_2 y al O_2^- , llevan a la formación de dos tipos de compuestos microbicidas: radicales libres altamente oxidantes (OH^\bullet) o halógenos oxidados (por ejemplo: ácido hipocloroso, $HOCl$).

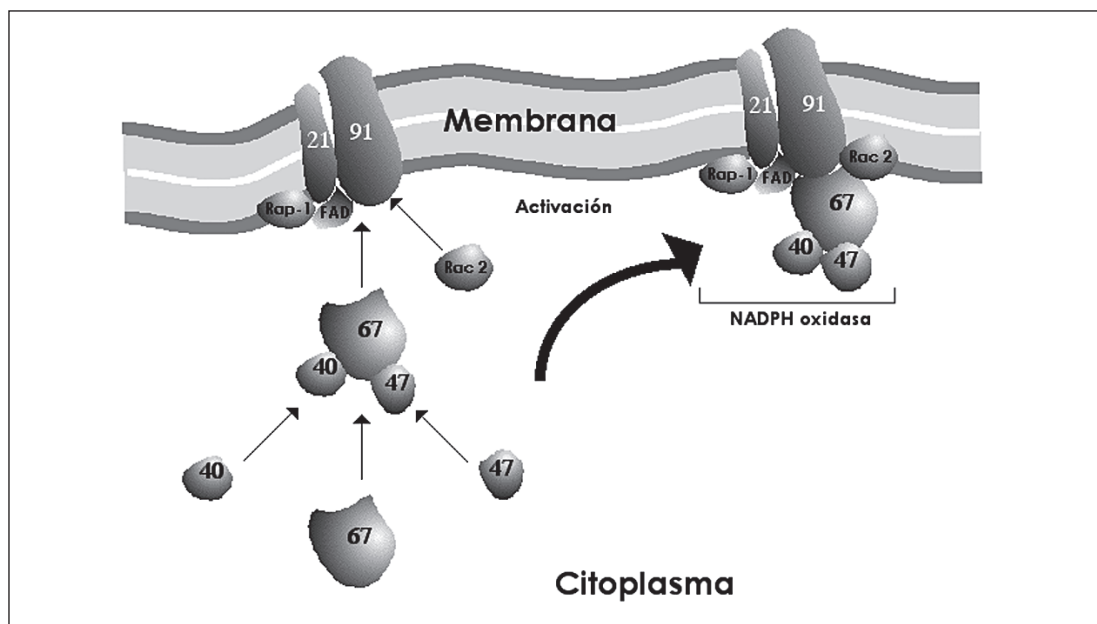


Figura 3-12. NADPH oxidasa. La oxidasa dependiente NADPH está formada por proteínas de membrana (22 y 91 kDa), unidas a flavin adenin dinucleótido (FAD) y a proteínas citosólicas (40, 47 y 67 kDa y Rac-2). Estas últimas se translocan a la membrana cuando el neutrófilo es activado.

que p47phox es fosforilada, las proteínas citosólicas son translocadas a la membrana plasmática, formándose y activándose el complejo NADPH oxidasa.

La enfermedad granulomatosa crónica es una inmunodeficiencia primaria, caracterizada por una mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas y fúngicas. Es causada por mutaciones que producen una pérdida o inactivación de una de las subunidades principales de la

NADPH oxidasa (p47phox, p67phox, p22phox o p91phox).

b) Mecanismos antimicrobianos independientes del oxígeno. Estos mecanismos funcionan en ausencia de metabolitos del oxígeno, situación que se presenta en un ambiente anaeróbico; sin embargo ambos tipos de mecanismos, oxidativos y no oxidativos, a menudo participan en forma sinérgica. En los meca-





nismos microbicidas independientes del oxígeno participan proteínas y enzimas presentes en los gránulos citoplasmáticos de los fagocitos (tabla 3-3). Entre otros componentes de estos mecanismos destacan: (a) la **lisozima**, enzima catiónica que destruye el péptidoglican de la pared celular, principalmente de las bacterias Gram positivas; (b) la **proteína bactericida permeabilizante** (BPI), proteína catiónica que permeabiliza la membrana bacteriana; (c) la **cathepsina G**, una serino proteasa con actividad sobre bacterias Gram negativas y (d) las **defensinas**, péptidos de 29-34 aminoácidos, ricos en arginina y cisteína, y que presentan actividad microbicida sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y algunos virus.

En la figura 3-13 se muestra un resumen de los mecanismos microbicidas durante la fagocitosis.

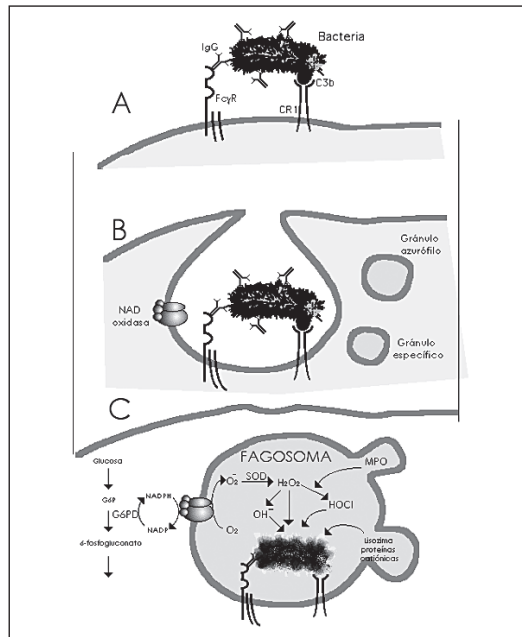


Figura 3-13. Fagocitosis y mecanismos microbicidas. (A) Bacteria opsonizada con IgG y C3b se une a una célula fagocítica a través de los respectivos ligandos (FcγR y CR1). (B) Luego de emitir pseudópodos la bacteria es fagocitada, los gránulos azurófilos y secundarios se acercan al fagosoma en formación, y se estructura la NADPH oxidasa. (C) En el fagosoma se inicia el “estallido respiratorio” en el que a partir de oxígeno molecular y con participación de la superóxido dismutasa (SOD) se genera peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y por acción de la mieloperoxidasa (MPO) de los gránulos azurófilos se genera ácido hipocloroso (HOCl). Adicionalmente participan otros componentes bactericidas (lisozima y otras proteínas) de los gránulos específicos. La enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) pertenece a la vía de derivación de la hexosa monofosfato.

Una vez muertas las bacterias en el interior de los fagolisosomas, son degradadas por **hidrolasas ácidas**, que por la generación de ácido láctico durante la glicólisis, encuentran su pH óptimo para actuar.

2.4.2. Eosinófilos. Los eosinófilos son células de aproximadamente 10 μm de diámetro y cuyo núcleo es generalmente bilobulado (figura 3-14) y su citoplasma anaranjado con tinción de hematoxilina-eosina. Representan el 1-4% de los leucocitos sanguíneos (tabla 3-2); alrededor del 99% de los eosinófilos se encuentra en los tejidos donde llegan luego de un breve paso de aproximadamente 30 minutos por la sangre, después de salir de la médula ósea.

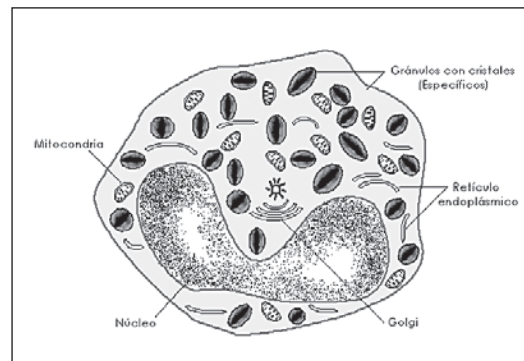


Figura 3-14. Esquema de la estructura subcelular de los eosinófilos. Los eosinófilos son leucocitos de aproximadamente 10 μm de diámetro. Presentan un núcleo bilobulado con un nucléolo medianamente grande. En el citoplasma se observan ribosomas, mitocondria y pequeña cantidad de retículo endoplásmico rugoso. El aparato de Golgi es pequeño. Un hecho característico de los eosinófilos son sus gránulos esféricos u ovales.

Gránulos

Los eosinófilos presentan dos tipos de gránulos en su citoplasma: gránulos específicos de eosinófilos y gránulos pequeños. Los gránulos específicos, aproximadamente 20 por célula, en su centro presentan la proteína básica mayor (MBP) y algunas citoquinas; en la matriz contienen proteína catiónica eosinófila (ECP), peroxidasa eosinófila (EPO), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) y algunas citoquinas. Los gránulos pequeños que almacenan arilsulfatasa, se encuentran en los eosinófilos maduros.



Otras moléculas sintetizadas en los eosinófilos

Cuando los eosinófilos son estimulados secretan algunos mediadores derivados de membrana: Leucotrieno C₄ (LTC₄), leucotrieno B₄, 15-HETE y PAF.

Los eosinófilos pueden sintetizar varias citoquinas proinflamatorias; se ha descrito mRNA para ellas: Interleuquinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-10, IL-16) factores de crecimiento (TGF α , TGF β , TNF α , GM-CSF), Interferones (IFN γ) y quimioquinas (IL-8, MIP-1 α y RANTES).

Receptores de membrana

Uno de los receptores más importantes desde el punto de vista fisiopatológico son los receptores de Fc de IgE de baja afinidad (Fc ϵ RIII) (tabla 3-8).

Acumulación de eosinófilos en tejidos

La quimiotaxis, adhesión a células endoteliales y matriz extracelular parece ser controlada por la respuesta inmune de células T y subsecuente liberación de citoquinas. Las citoquinas liberadas en procesos alérgicos son las que participan en respuestas inmunes tipo Th2 (IL-4, IL-5), en cambio en la reacción de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) se encuentran citoquinas asociadas a respuesta tipo Th1 (Ej. IL-2, IFN γ). La liberación de IL-5 por LTh2 sensibilizados luego de su estimulación con antígeno específico, se puede asociar al desarrollo de eosinofilia durante enfermedad alérgica.

Las citoquinas además de participar en la diferenciación de los eosinófilos a partir de los precursores, contribuyen a su acumulación en el tejido inflamado. En esta última función participan principalmente IL-3, IL-5, GM-CSF, PF4, LTB₄, IL-8 y RANTES.

En la adhesión a endotelio y migración transendotelial participan, al igual que para los neutrófilos, las moléculas de adhesión celular: selectinas, integrinas y de la superfamilia de las inmunoglobulinas (ver punto 2.2.1).

Algunas citoquinas (IL-3, IL-5 y GM-CSF) prolongan la sobrevivencia de los eosinófilos en los tejidos. Estas citoquinas también aumentan la capacidad citotóxica de ellos.

Eosinófilos y patologías

Hay varias situaciones patológicas en que aumenta la cifra absoluta de eosinófilos en la sangre (eosinofilia). Destacan: (a) las infecciosas parasitarias, particularmente por helmintos, en las cuales se ha observado que los eosinófilos pueden tener una acción efectora (capítulo 35) y (b) las enfermedades alérgicas (capítulos 21 y 22). Enfermedades mieloproliferativas, otras neoplasias y algunos fármacos (Ej. Penicilina, Tetraciclina, Nitrofurantoina) pueden asociarse con eosinófilos.

2.4.3 Basófilos. Los basófilos representan menos del 1% de los leucocitos sanguíneos (tabla 3-2). Al igual que los otros granulocitos maduros presentan un diámetro aproximado de 10 μ m. En los frotis sanguíneos teñidos con May-Grünwald Giemsa, los gránulos citoplasmáticos ácidos que se caracterizan por presentar un intenso color azul violeta, casi cubren completamente el núcleo bilobulado. La figura 3-15 muestra un esquema de su estructura subcelular.

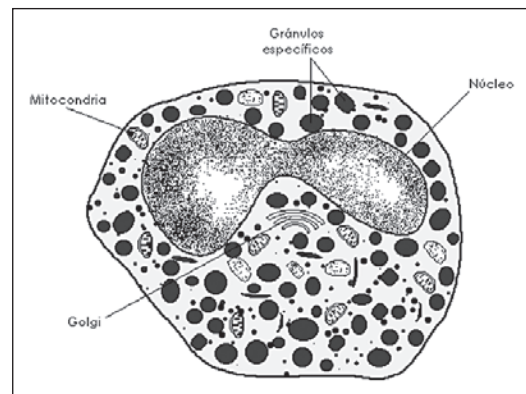


Figura 3-15. Esquema de la estructura subcelular de un basófilo. El núcleo es bilobulado y la cromatina presenta una distribución similar a los neutrófilos y eosinófilos. Presenta un pequeño aparato del Golgi y retículo endoplasmático; escaso número de ribosomas libres y mitocondrias.

Los basófilos son muy similares a los mastocitos o células cebadas, en cuanto a la composición de sus gránulos y a su función.

La diferenciación a basófilos y mastocitos desde células inmaduras (CD34⁺, c-kit⁻, Fc ϵ RI⁻) ocurre a través de varias etapas en que estos y otros marcadores de membrana se van modificando. Las células cebadas maduras presentan el siguiente fenotipo Fc ϵ RI⁺ y c-kit⁺ y los basófilos son Fc ϵ RI⁺, c-kit⁻, CD23⁺. Además al igual que los eosinófilos son CD25⁺ y CD125⁺.

En la tabla 3-10 se indican las principales proteínas de membrana de los basófilos y mastocitos. Ambos tipos de células presentan receptores de alta afinidad para IgE (FcεRI), sólo los basófilos presentan integrinas y solamente los mastocitos presentan c-kit.

Tabla 3-10. Proteínas de membrana de basófilos y células cebadas

Marcador	Básófilo	Mastocitos
FcεRI	+	+
FcγRII	-	+
Integrina CD11a/18	-	+
Integrina CD11b/18	-	+
Integrina CD11c/18	-	+
IL-2R (CD25)	-	+
C-Kit (CD117)	+	-
IL-3Rα (CD123)	-	+
IL-3/5/GMRβ	-	+

En las primeras etapas de maduración participa el factor de “stem cell” o “c-kit ligand”. En la maduración de células cebadas participan citoquinas como IL-3, IL-6. En cultivos celulares se han descrito las CFU de basófilo y eosinófilos (CFU- baso/eo).

En la diferenciación de basófilos la principal citoquina que participa es IL-3; también participan GM-CSF, IL-4 e IL-5. Esta última promueve además la diferenciación de eosinófilos. El TGF-β, en presencia de IL-3 suprime la diferenciación de eosinófilos y favorece la diferenciación de basófilos.

Varias moléculas mediadoras de inflamación son liberadas desde ambos tipos celulares por mecanismos mediados por unión de IgE u otros mecanismos. Ambas células contienen histamina, PAF, condroitinsulfato, LTB₄, LTC₄, IL-4 e IL-13. Sólo en los mastocitos, óxido nítrico (NO), prostaglandinas D₂ (PGD₂), PGF₂, tromboxano A₂, triptasa, carboxipeptidasa A, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, TNFα, TGF-β, IFNγ. Sólo en los basófilos, MIP-1α.

Varios factores pueden activar la secreción de mediadores de inflamación por parte de basófilos y células cebadoras. Entre ellos, la unión de una molécula de IgE (o IgG) y su respectivo antígeno (alergeno) a los FcεRI (o FcγRII), anafilotoxinas (C3a y C5a), lectinas (ej.

Concavalina A), algunas citoquinas (ej. IL-1, MIP-1α). El péptido formil-met-leu-phe sólo estimula la secreción de los basófilos.

Ambos tipos celulares participan en las etapas iniciales del proceso inflamatorio, pero en las etapas más avanzadas de reparación sólo lo hacen los mastocitos. Así, inicialmente ambos secretan mediadores inflamatorios: (Histamina, IL-4, quimioquinas; basófilos: IL-13; mastocitos: TNFα, etc.), moléculas que durante el proceso van disminuyendo. Por su parte, las células cebadas durante el desarrollo del proceso siguen liberando otros mediadores, ahora antiinflamatorios (IL-10, TGF-β, etc.) y más adelante, moléculas que favorecen la reparación tisular (proteinasas, factores de crecimiento y otras citoquinas).

Varios fármacos antialérgicos y antiinflamatorios inhiben la secreción de mediadores desde los basófilos y mastocitos; sus acciones son múltiples y variadas. Entre ellas se incluyen: Agonistas de B₂, antagonistas de H₁, corticoides y ciclosporina A, entre otros.

3. ÓRGANOS LINFÓIDES

Desde un punto de vista inmunológico, los órganos y tejidos linfoides, se pueden clasificar en primarios y secundarios (figura 3-16). Más recientemente se han descrito los tejidos linfoides terciarios; parte de ellos son descritos aquí como tejido asociado a mucosas (punto 3.2.3) y se incluye además en este concepto el tejido linfoide asociado a piel (ver capítulo 16).

3.1. Órganos linfoides primarios

En los órganos linfoides primarios, timo y médula ósea en el hombre, las células linfoides experimentan un proceso de proliferación y diferenciación a células T y células B, respectivamente. Este proceso no requiere presencia de antígenos extraños (antígeno independiente). Allí los linfocitos adquieren el repertorio de receptores antigénicos específicos (LT: TCR y LB: IgM e IgD) y aprenden a distinguir entre lo propio y lo extraño.

3.1.1. Médula ósea

En la médula ósea, a partir de la segunda mitad del embarazo y en el resto de la vida, ocurre la diferenciación y maduración de los glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas

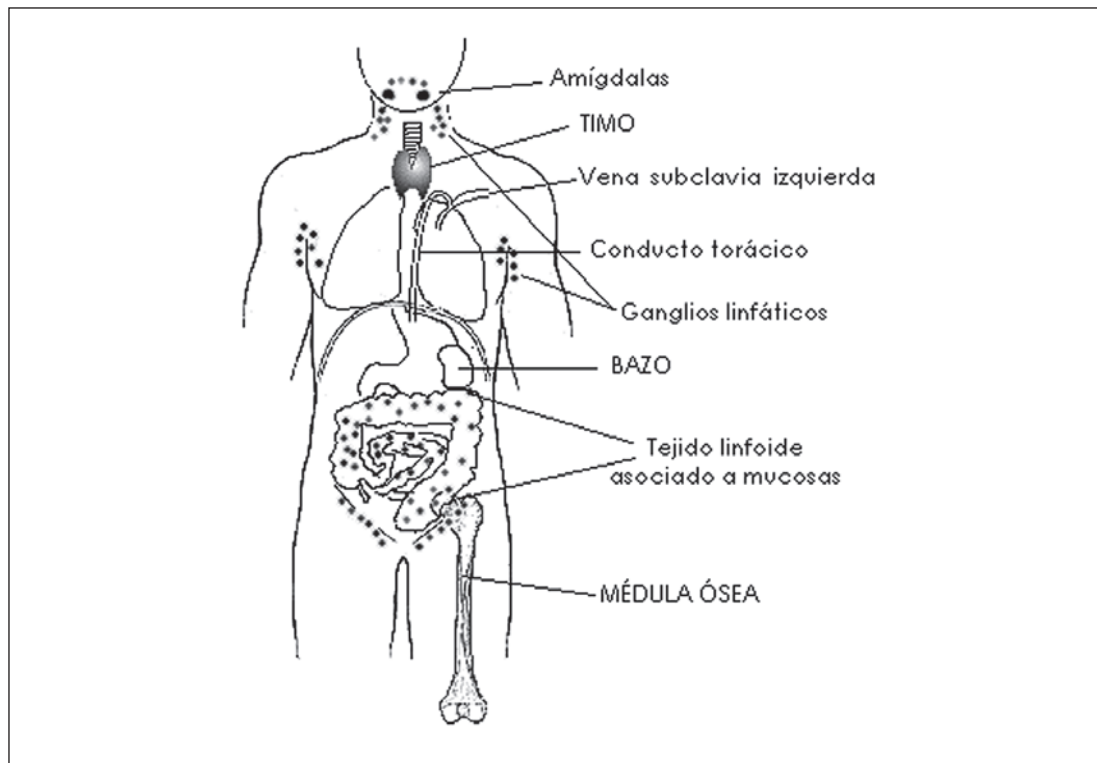


Figura 3-16. Órganos linfoides. Se muestran los órganos linfoides primarios, (Médula ósea y Timo) secundarios (Bazo, Ganglios linfáticos: cervicales, axilares mesentéricos e inguinales), tejido asociado a mucosa (GALT: intestinal; BALT: bronquial) y amígdalas (palatinas, faríngea y linguales). Además se indica el lugar de drenaje de los linfocitos desde el conducto torácico a la sangre (vena subclavia izquierda).

(Hematopoyesis, ver punto 2.1). Entre los leucocitos, tiene especial interés en este caso la maduración de los linfocitos B.

En el hombre y otros mamíferos, la médula ósea es el tejido equivalente a la bolsa de Fabricio, órgano en el que se diferencian los linfocitos B en las aves; el origen de "B" se refiere a bolsa. La bolsa de Fabricio es un órgano linfoepitelial, que corresponde a un trozo de intestino modificado, localizado cerca de la cloaca; los folículos están en la corteza y médula de la bolsa.

La médula ósea se encuentra en la cavidad medular de los huesos largos (principalmente en las epífisis) y en los espacios existentes entre las trabéculas de los huesos esponjosos.

Histología. La médula ósea está formada por dos importantes compartimientos: vascular y hematopoyético (figura 3-17).

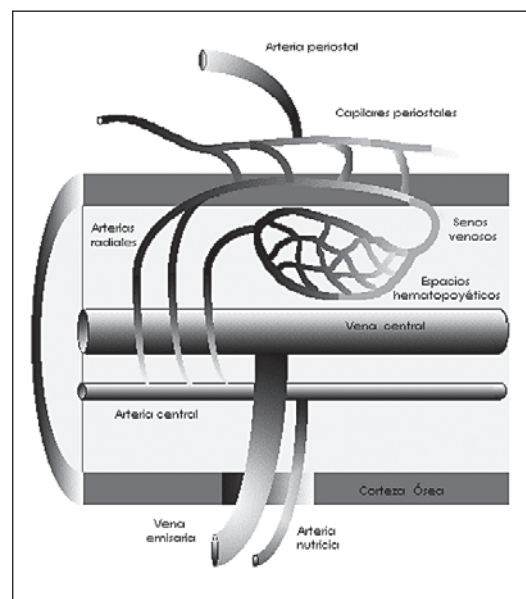


Figura 3-17. Estructura general de la médula ósea. Se destaca el compartimiento vascular (arterias, venas y sinusoides) y del compartimiento hematopoyético.





Los vasos sanguíneos del **compartimiento vascular** forman un esqueleto estructural en la médula ósea. La sangre que ingresa a la médula ósea lo hace por las arterias nutricias que perforan la diáfisis a través de los agujeros nutricios. Estas arterias entran en la cavidad medular y dan origen a la arteria longitudinal central, desde la cual se generan pequeños vasos que irrigan tanto la médula como el hueso cortical. Las ramas dirigidas a la médula descargan su sangre a capilares los cuales vacían en una extensa red de sinusoides. Los sinusoides (45 a 80 μm de diámetro) están compuestos por células endoteliales, una lámina basal y una capa externa de células reticulares; estas últimas cubren aproximadamente el 50% de la superficie endotelial. Estos sinusoides drenan en una vena longitudinal central, que a su vez descarga su contenido en venas que salen del hueso por el conducto nutricio.

El pasaje transendotelial de células maduras, desde el compartimiento hematopoyético a la sangre ocurre directamente a través de poros de mi-

gración transitorios ($<4 \mu\text{m}$ de diámetro) que se forman en las células endoteliales de los sinusoides.

El **Compartimiento hematopoyético** está formado por los islotes de células hematopoyéticas de las diferentes líneas celulares (serie granulocítica, serie monocítica, serie eritroblástica, serie megacariocítica y serie linfóide), en sus distintos estadios madurativos. En células se ubican entre los sinusoides, y entre éstos y la cortical del hueso.

Además de las células hematopoyéticas en la médula ósea también existen otras células que forman parte de denominado estroma medular. Entre ellas destacan: macrófagos, células reticulares y algunas células adiposas (figura 3-18). Estas células participan activamente en la regulación de la hematopoyesis secretando citoquinas y factores de maduración. Adicionalmente los macrófagos fagocitan núcleos expulsados por los eritroblastos ortocromáticos al madurar a reticulocitos, células alteradas y células muertas.

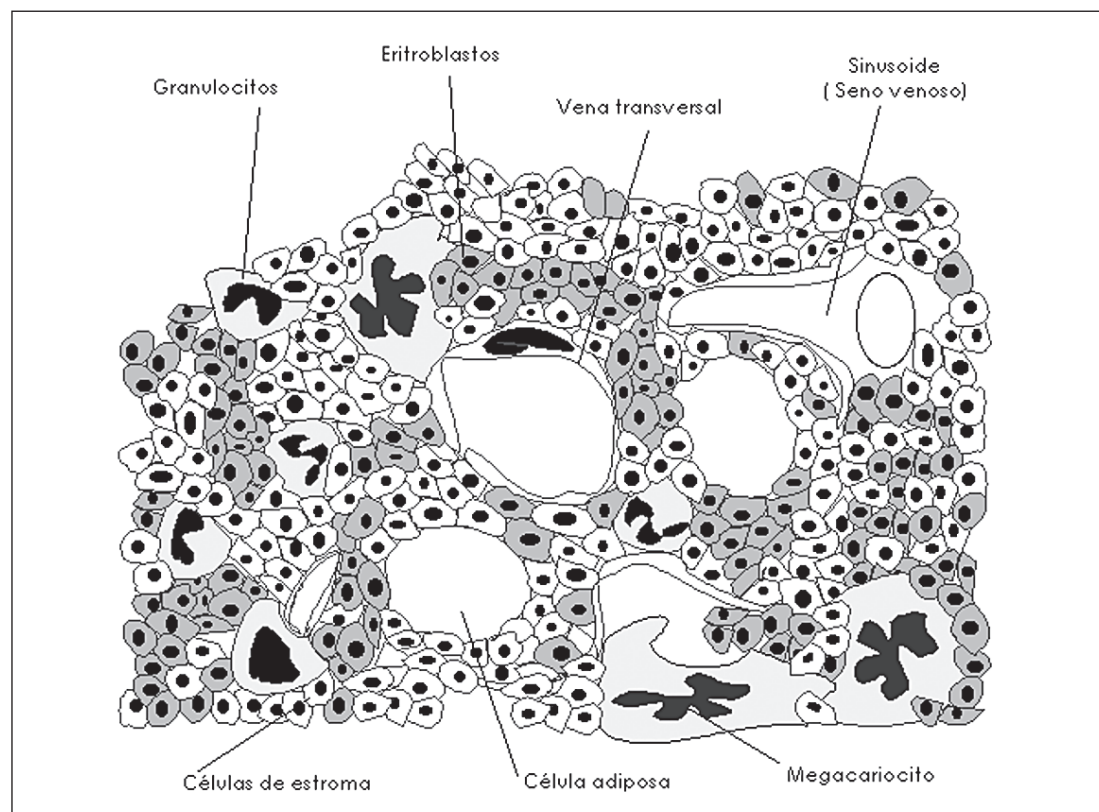


Figura 3-18. Estructura histológica de la médula ósea. La médula ósea está formada por vasos sanguíneos, sinusoides, células del estroma y células hematopoyéticas. Los distintos tipos de células se desarrollan en islotes hematopoyéticos ubicados a diferente distancia de la pared de los sinusoides, según el linaje celular.



La hematopoyesis implica un complejo proceso de maduración y diferenciación celular. A partir de una célula pluripotencial se originan los diferentes tipos de leucocitos (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos), glóbulos rojos y plaquetas. En dicho proceso participan varias citoquinas (ver punto 2.1). Por otra parte, las moléculas de adhesión celular (ver capítulo 12) presentes en las células hematopoyéticas y del estroma, y la matriz extracelular tienen fundamental participación en el proceso de maduración y focalización en la médula ósea. En el caso particular de los linfocitos, las células B maduran en la propia médula ósea. En la figura 3-19 se muestra esquemáticamente este proceso.

llegan, en estado inmaduro, desde la médula ósea.

En el humano, el timo comienza a originarse hacia el final de la sexta semana de gestación. Para el nacimiento el timo está totalmente desarrollado.

El timo es un órgano de naturaleza linfoepitelial que se ubica en el mediastino antero-superior, sobre los grandes vasos del corazón (figura 3-16). Su tamaño y grado de desarrollo varían con la edad del individuo, alcanzando su máximo desarrollo (40 a 50 gramos), cerca de la pubertad, después de la cual empieza a involucionar, proceso que continúa hasta avanzada edad.

Histología. Es el único órgano linfoide lobulado; está formado por dos lóbulos, derecho e izquierdo

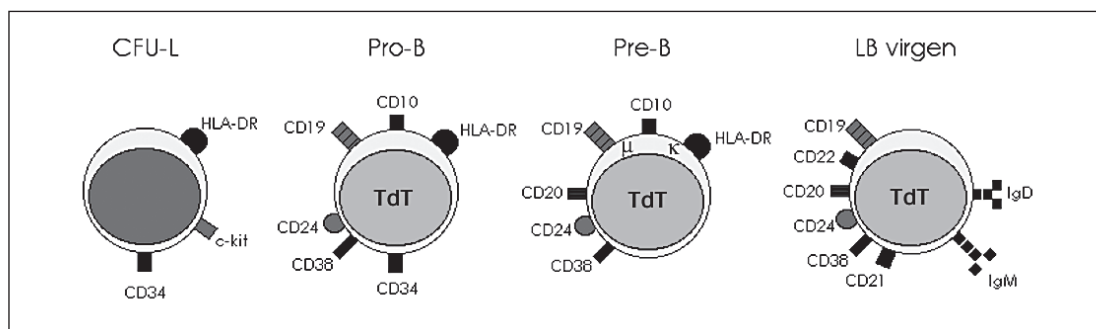


Figura 3-19. Maduración de células B en la médula ósea. Esquemáticamente se muestra la secuencia de maduración de las células B a partir de una célula madre ("stem cell"); durante este proceso depende de células de estroma (células reticulares, entre otras). Otro aspecto importante es que muchas células no reordenan correctamente los segmentos génicos VDJ o VJ (ver capítulo 6) y sufren apoptosis por lo que son fagocitadas por los macrófagos medulares. Las células B vírgenes (este proceso no ha requerido de contacto con antígeno) pasan a la sangre a través de los sinusoides y luego a los órganos linfoides secundarios donde pueden tomar contacto con el antígeno para el cual presentan especificidad. Se indican los principales marcadores en diferentes etapas de maduración. μ , cadena pesada mu (IgM); k, cadena liviana de Ig; TdT, desoxinucleotidil transferasa terminal.

Respecto a las células T, si bien éstas maduran en el timo, desde la médula ósea emigran células "encomendadas" a madurar como linfocitos T. Usando citometría de flujo (ver capítulo 43), en médula ósea, se ha detectado una subpoblación que coexpresa CD34 (marcador de "Stem Cells"), CD2, CD7 y CD3 citoplasmático (marcadores de línea T). Sin embargo, también se propone la existencia de un progenitor común para ambos linajes celulares, B y T. Otros hallazgos indican que CD44 podría participar en el "homing" de las células linfoides que llegan al timo a madurar como células T.

3.1.2. Timo

La principal función del timo es participar en la maduración y diferenciación de los linfocitos T a partir de la proliferación y diferenciación de linfocitos troncales inmunológicamente no competentes que

unidos por tejido conectivo. Ambos lóbulos están rodeados por una cápsula de tejido conectivo; ésta emite numerosos tabiques al interior de los lóbulos subdividiéndolos en miles de lobulillos de 0,5-2 mm. Cada lóbulo posee una zona periférica y más rica en células, denominada corteza y la médula. Los tabiques llegan hasta el límite corticomedular (figura 3-20).

El estroma laxo, compuesto por células reticulares epiteliales entreteje la corteza y la médula. En el retículo se encuentran linfocitos, macrófagos y células dendríticas interdigitantes.

Las Células reticulares epiteliales tienen un aspecto variable. Presentan prolongaciones en forma de estrella, que interaccionan entre sí. En la periferia de la corteza y alrededor de los vasos sanguíneos, estas células conforman una capa continua de células planas.



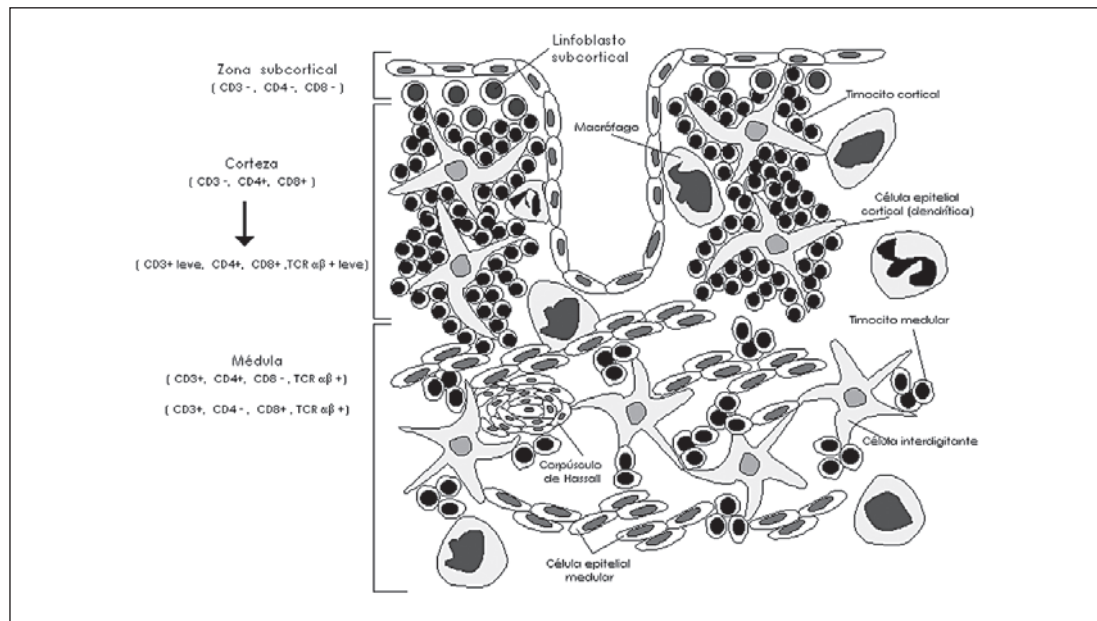


Figura 3-20. Estructura histológica del timo. En cada lóbulo del timo se pueden describir 2 regiones: corteza y médula. En ambas zonas, corteza y médula tímica, existen células linfoides, reticulares epiteliales y macrófagos. En la corteza ocurren los procesos de selección positiva y negativa de las células linfoides T (ver texto) en el que participan las células reticulares epiteliales corticales. Las células linfoides a medida que maduran migran a la médula tímica desde donde emigran a la sangre. A medida que maduran las células linfoides expresan diferentes marcadores de superficie.

En la médula existen más células reticulares epiteliales que en la corteza, conformando en la primera los corpúsculos de Hassall.

Las células reticulares epiteliales expresan en su superficie moléculas MHC de clase I y de clase II, las que al interactuar con las células linfoides son fundamentales en el proceso de maduración de estos últimos. Esto es especialmente significativo en la corteza capsular.

Los Macrófagos se encuentran en cantidad moderada en la corteza, pero son más abundantes en la médula. También expresan moléculas MHC de clase I y II.

Las Células dendríticas interdigitantes se encuentran en abundante cantidad en el límite córticomedular y en la médula, se ubican entre el retículo que conforman las células retículo epiteliales. Al igual que estas últimas presentan largas prolongaciones citoplasmáticas a través de las cuales toman contacto con los linfocitos. Al igual que las células reticulares epiteliales expresan en su membrana moléculas MHC clase I y II, y participan en la maduración de los linfocitos.

Las Células linfoides se localizan entre las ma-

llas que dejan las células retículo epiteliales. Las células linfoides son mucho más abundantes en la corteza que en la médula. En la corteza subcapsular externa son células grandes ($\approx 15 \mu\text{m}$); corresponden a linfoblastos (células linfoides inmaduras). En el resto de la corteza y médula son más pequeños.

Después de la pubertad, cuando el timo comienza a involucionar, pierde peso y aumenta progresivamente la proporción de **adipocitos** (células grasas); sin embargo durante toda la vida persisten restos de parénquima. En el adulto una vez que se ha formado un “pool” de células T periféricas, aparentemente no es necesario la producción de grandes cantidades de linfocitos T.

Respecto a los **Vasos sanguíneos**, el timo es irrigado por sangre que fluye a través de arterias que ingresan por la cápsula, formando arteriolas en los tabiques. Aquí se forman las vénulas interlobulares las cuales se vacían en la vena tímica eferente. Los capilares presentan un endotelio rodeado de una gruesa lámina basal. La corteza sólo es irrigada por capilares, éstos participan de la llamada **barrera hematotímica**, que protegería a las células linfoides en maduración en la corteza tímica, contra sustancias antigénicas circulantes.



Fisiología. En el timo ocurre la maduración de los linfocitos T, células que participan de la inmunidad celular e indirectamente en la inmunidad humoral.

Células linfoides inmaduras llegan, desde la médula ósea (durante la gestación: del saco vitelino, bazo e hígado) a la región subcapsular de la corteza tímica donde se diferencian a células T inmaduras (timocitos). En el proceso de maduración, desde células doble negativas (CD4-, CD8-) y CD3- y TCR- a células T CD4+ (LTh) o CD8+ (LTc) y CD3+ y TCR+, las células linfoides se movilizan desde la corteza a la médula tímica. Durante este recorrido interactúan con células reticulares epiteliales y células dendríticas interdigitantes, las cuales expresan en su membrana moléculas de MHC clase I y II.

En el proceso de maduración ocurren los procesos de selección, positiva y negativa (ver capítulo 13). En la primera, los linfocitos que a través de su TCR reconocen las moléculas MHC propias son seleccionados positivamente (pueden continuar el proceso de maduración); los otros sufren apoptosis. Las células que pasan la primera etapa son sometidas a la llamada selección negativa, durante la cual son eliminadas (apoptosis) las que, a través de su TCR, reconocen con alta afinidad antígenos propios en las moléculas MHC de clase I o II de las células reticulares epiteliales o células dendríticas interdigitantes. Durante el proceso de maduración tímica sobrevive alrededor del 5% de las células linfoides que proliferaron en la corteza tímica.

Las células T maduras, (LTc y LTh), abandonan la médula tímica a través de las venas que drenan al timo.

La falta de desarrollo congénita de timo se denomina Síndrome de DiGeorge. Estas personas no pueden producir linfocitos T, desarrollando una inmunodeficiencia grave (ver capítulo 30).

3.2. Órganos linfoides secundarios

Los diferentes tejidos linfoides secundarios presentan especificidades asociadas a sus funciones, sin embargo tienen algunas características estructurales comunes: (a) presentan mecanismos para transportar los antígenos al microambiente linfoide; (b) tienen adaptaciones vasculares especializadas para atraer linfocitos, desde la sangre, especialmente vírgenes; y (c) presentan regiones donde principalmente existen LT o LB, llamadas zona T y zona B, respectivamente.

Los órganos linfoides secundarios incluyen los **ganglios linfáticos**, el **bazo** y el **tejido linfoide**

asociado a mucosas (MALT). Los órganos secundarios, son los tejidos donde los linfocitos vírgenes (B y T) interactúan con los antígenos y con otras células del sistema inmune; es aquí donde se inicia la respuesta inmune. En estos tejidos existe un microambiente linfoide altamente organizado, donde las células B y T toman contacto con el antígeno y como consecuencia de ello se activan y proliferan (expansión clonal), desarrollándose dos subpoblaciones, células efectoras y células de memoria.

3.2.1. Ganglios linfáticos

Los ganglios linfáticos son pequeños órganos linfoides ovales y encapsulados, de 1-3 cm de diámetro. A diferencia de otros órganos linfoides, están interpuestos en el trayecto de los vasos linfáticos, actuando como filtros a través de los cuales pasa la linfa en su camino hacia la sangre; entre otros elementos filtran bacterias, otros microorganismos y otras sustancias extrañas.

Los ganglios linfáticos se encuentran en número variable en ciertas zonas del cuerpo, pero son más abundantes en las regiones axilar, cervical, inguinal, en las cavidades corporales (Ej. Mesenterio) y a lo largo de los vasos mayores (figura 3-16).

Histología. Los elementos de sostén del ganglio linfático son: (i) **cápsula:** rodea al ganglio y está compuesta de tejido conectivo, (ii) **trabéculas:** son prolongaciones de la cápsula hacia el interior del parénquima ganglionar, específicamente de la corteza y (iii) **tejido reticular:** red tridimensional formada por células y fibras reticulares, suspendidas de la cápsula y trabéculas, que forma la estructura del órgano. En uno de los bordes donde la cápsula es más gruesa se distingue el hilio.

El parénquima del ganglio se divide en dos regiones: corteza y médula (figura 3-21). La **corteza**, es la zona más externa y separada en compartimientos por las trabéculas. Se distinguen las cortezas externa y profunda (o paracorteza). La corteza externa alberga los denominados **folículos** (o nódulos) **linfoides primarios** que son agregados esféricos de LB (vírgenes y de memoria). Estos nódulos pueden presentar un **centro germinativo**, denominándose así **folículos linfoides secundarios**. Estos últimos se forman cuando se desarrolla una respuesta inmune; en el centro germinal se encuentran LB llamados centroblastos. Aquí se generarían los LB de me-

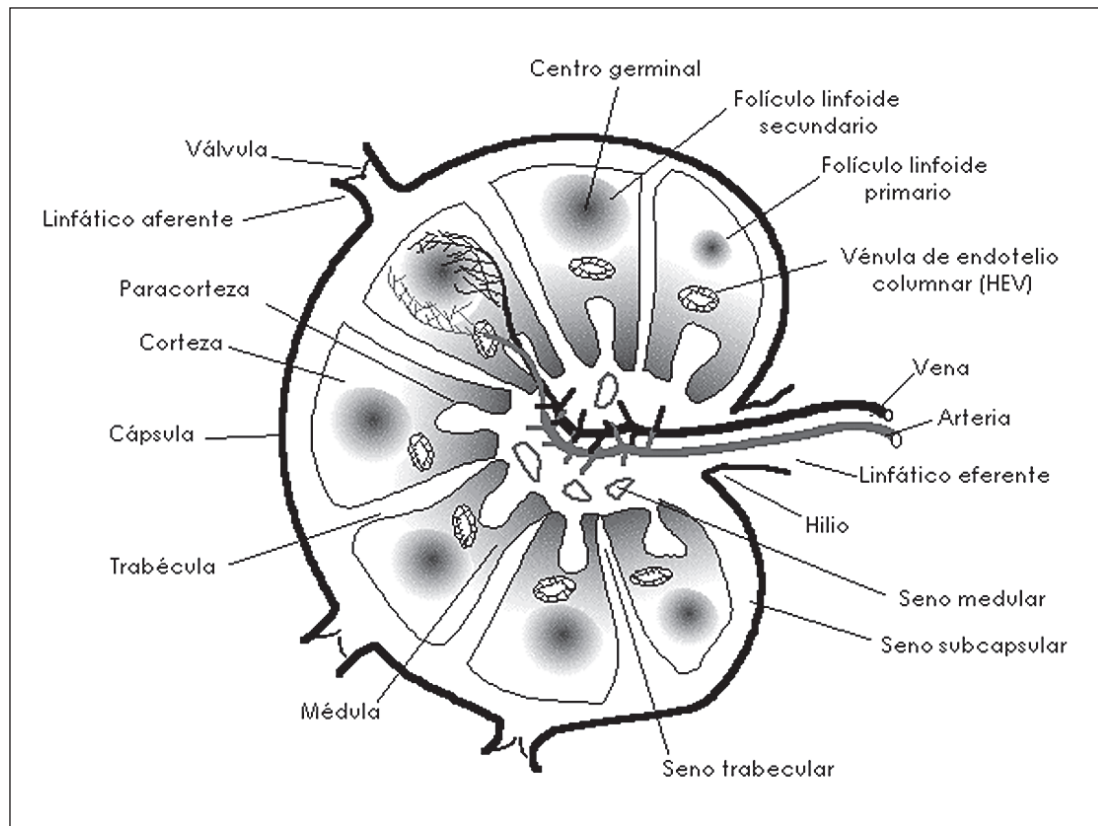


Figura 3-21. Estructura histológica de un ganglio linfático. El ganglio posee elementos de sostén (cápsula, trabéculas y tejido reticular). Su parénquima se divide en corteza y médula; en la corteza existe tejido linfoide organizado como folículos y en la médula existen cordones de tejido linfoide separados por senos medulares. Vasos linfáticos aferentes y eferentes entran y salen de los ganglios, respectivamente.

moria y células plasmáticas (células efectoras de las células B). La región periférica de los folículos secundarios se denomina **zona del manto o calota**, formada por linfocitos que están emigrando del centro germinal.

La corteza externa es una zona dependiente de médula ósea o zona B. En la corteza profunda (paracorteza) no existen folículos y está poblada principalmente de células T. (zona dependiente de timo, zona T) Las células presentadoras de antígeno emigran hacia esta zona para presentar los antígenos en moléculas MHC clase II a los LTh. Si éstas se activan, ocurrirá una expansión clonal y aumentará la anchura de la paracorteza. Las células T recién formadas emigran hacia los senos medulares, dejan el ganglio y van a la zona de actividad antigénica. Las **vénulas de endotelio columnar (HEV)** están localizadas en esta región; a través de este tipo de epitelio los linfocitos de la circulación general ingresan al parénquima ganglionar. En la interacción de los linfocitos con

el endotelio y migración transendotelial participan moléculas de adhesión, en forma similar a lo descrito para los neutrófilos (ver punto 2.4.1.). Los LB que ingresan migran a la corteza y la mayoría de los LT, permanecen en la corteza profunda.

La **médula** corresponde a la parte más interna del ganglio. Consiste en los llamados cordones medulares constituidos por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Estos cordones están ubicados alrededor de los senos medulares, los que convergen a la región del hilio donde desembocan en los vasos linfáticos eferentes. Los linfocitos de los cordones están en proceso de emigrar desde la corteza para entrar en los senos medulares y así vía linfáticos eferentes alcanzar el conducto torácico, y luego la circulación general (ver punto 4).

Los vasos que llegan al ganglio se llaman **vasos linfáticos aferentes** y se introducen en él por varios puntos de la superficie convexa y vacían la linfa en el seno subcapsular. Este seno se conti-



núa con los senos corticales o paratrabeculares (paralelos a las trabéculas) los que descargan la linfa en los senos medulares que a su vez drenan la linfa en los vasos linfáticos eferentes. Éstos abandonan el ganglio por el hilio; ambos vasos linfáticos, aferentes y eferentes poseen válvulas. También entran y salen a través del hilio (zona cóncava del ganglio), los vasos sanguíneos (arteria y vena) y nervios. Otros tejidos linfoides como las amígdalas, el bazo y el timo tienen sólo vasos linfáticos eferentes.

Fisiología. Entre las funciones de los ganglios linfáticos, está el filtrar la linfa que ingresa vía vasos linfáticos aferentes, así los macrófagos pueden fagocitar alrededor del 90% de los antígenos que ingresan a los ganglios. Esto causa un proceso inflamatorio con aumento de volumen del ganglio.

Además de la fagocitosis del antígeno en los ganglios linfáticos los linfocitos B y/o T toman contacto con los antígenos. Una respuesta inmune primaria (primer contacto con el antígeno específico) la respuesta se inicia con activación de LTh vírgenes, ubicados en la corteza profunda; aproximadamente 48 horas después de la activación se transforman en linfoblastos los que sufren mitosis generándose a los 5 días un clon de LTh efectores y de memoria. Si el agente infeccioso es intracelular (Ej. Virus) se activan los LTC que reconocen los antígenos expresados en moléculas MHC de clase I (ver capítulos 8 y 9).

Al mismo tiempo que se activa la respuesta inmune celular los escasos LB existentes en la cor-

teza profunda y otros reclutados desde la corteza externa pueden endocitar el antígeno, procesarlo y presentarlo a los LTh. Por su parte, los LT CD4+ facilitan la respuesta inmune humoral, particularmente en el caso de los llamados antígenos timo dependientes (ver capítulo 5). Así en la paracorteza se generan pequeños focos de diferenciación y maduración de LB a células plasmáticas las que secretarán anticuerpos (IgM, IgG) que llegan a la sangre vía linfa eferente. Posteriormente algunos LTh y LB migran a los folículos primarios de la corteza externa amplificando la respuesta inmune. Allí se generan linfoblastos, llamados en este caso centroblastos. Por un proceso de maduración y selección por afinidad van siendo seleccionados los que presentan mayor afinidad por el antígeno. También ocurre aquí el fenómeno denominado **cambio de clase** (ver capítulo 6).

3.2.2 Bazo

El bazo es el órgano linfoide de mayor tamaño del cuerpo (aproximadamente 150 g en adultos); está situado en el peritoneo, en la región superior izquierda del abdomen.

El bazo está rodeado por una cápsula de tejido conectivo desde la cual parten trabéculas hacia el parénquima del órgano (figura 3-22). Por el hilio entran la arteria esplénica y nervios, y salen por la vena esplénica y vasos linfáticos. La estructura del órgano está dada por una red tridimensional de fibras y células reticulares, conectadas a la cápsula y trabéculas (similar a los ganglios linfáticos).

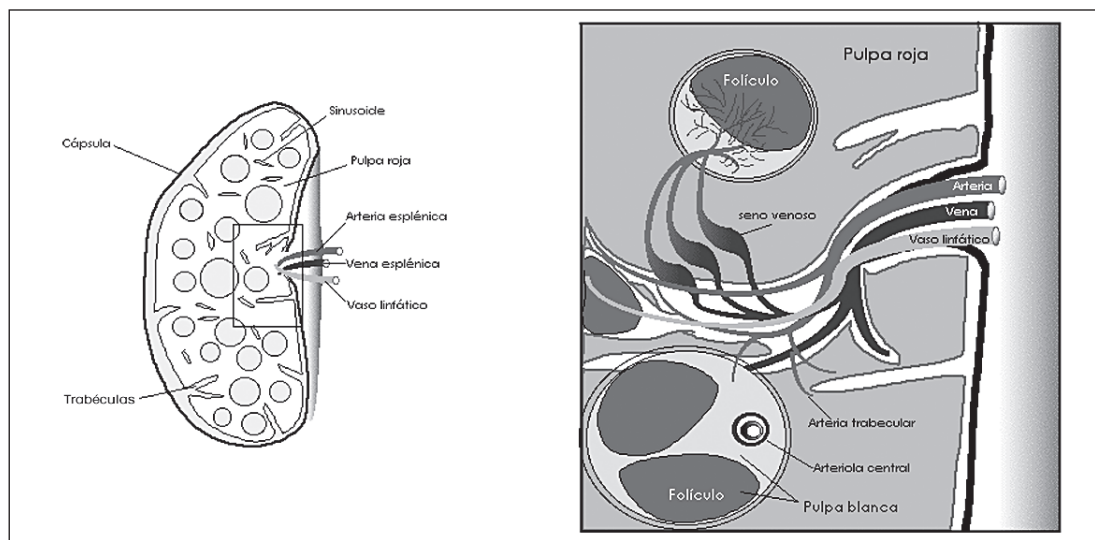


Figura 3-22 Estructura histológica del bazo. Una cápsula de tejido conectivo rodea al bazo; de ésta se originan trabéculas hacia el parénquima. La pulpa blanca está compuesta principalmente por linfocitos. La pulpa roja la componen sinusoides venosos, células y fibras reticulares, eritrocitos, macrófagos, linfocitos y granulocitos.



La arteria esplénica se ramifica en las arterias trabeculares, las que al presentar un diámetro de 0,2 mm dejan las trabéculas y son rodeados por linfocitos denominándose a éstos **vaina linfática periarterial** y al vaso, arteria central. Luego ésta pierde la vaina linfática y se subdivide en varias arterias penicilares, que entran la llamada pulpa roja (ver más adelante). El extremo de las arterias penicilares corresponden a capilares arteriales terminales que descargan la sangre en los senos esplénicos. Éstos drenan en las venas pequeñas de la pulpa, las que van aumentando de calibre, llegando a formar la vena esplénica, que drena en la vena cava.

El parénquima esplénico o pulpa esplénica, se divide en pulpa blanca y pulpa roja. La **pulpa blanca** está compuesta por tejido linfoide, principalmente linfocitos, estrechamente asociados a la arteria central, a cuyo alrededor forman la vaina linfática periarterial. En ésta existen principalmente células T (aproximadamente 70% de CD4+ y 30% de CD8+). Las células B están organizadas en folículos, generalmente incorporados en la vaina linfática periarterial. Los folículos primarios contienen células B no estimuladas y los folículos secundarios son sitios de activación y proliferación de células B, y contienen centro germinal. La pulpa blanca está rodeada por una delgada zona marginal que la separa de la pulpa roja, que contiene células B, células “helper”, macrófagos y células dendríticas interdigitantes (células presentadoras de antígeno).

En la zona marginal también se encuentran los senos marginales; aquí es donde las células y antígenos transportados por la sangre tienen acceso al parénquima del bazo. Así puede ocurrir: (i) contacto entre los antígenos y las células presentadoras de antígeno; (ii) los macrófagos pueden fagocitar microorganismos y células senescentes; (iii) células T y B de la sangre pueden ingresar a la pulpa blanca; y (iv) los LTh, reconocen antígenos presentados en moléculas MHC clase II por las células dendríticas interdigitantes; esto dará lugar a activación y proliferación clonal en la pulpa blanca (folículo secundario).

A modo de resumen, los linfocitos se forman en la pulpa blanca, las células B de memoria y células plasmáticas en los folículos linfáticos y las subpoblaciones de células T en las vainas linfáticas periarteriales. Los LB y LT recién formados entran en los senos marginales y emigran hacia el sitio inflamatorio, o forman parte de la reserva

recirculante de linfocitos. La mayoría de las células plasmáticas emigran a la médula ósea para sintetizar y secretar anticuerpos en los senos medulares; sólo algunas se quedan en la zona marginal para hacer lo propio en los senos marginales.

La **pulpa roja** está compuesta de sinusoides venosos separados por cordones parenquimatosos, que consisten en mallas de células reticulares y fibras reticulares, en la que existen abundantes eritrocitos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y granulocitos. Estos macrófagos son responsables de retirar de la circulación los glóbulos rojos y plaquetas, senescentes y alterados.

Desde el punto de vista inmune, el bazo presenta una función similar a los ganglios linfáticos, la diferencia fundamental radica en que el bazo es el más importante sitio de respuesta inmune a antígenos circulantes y los ganglios linfáticos participan en la respuesta inmune a antígenos presentes en la linfa. El concepto de respuesta inmune se refiere a la respuesta inmune innata y específica, tanto celular (fagocitosis, activación de células T) como humoral (activación de células B con la consiguiente síntesis de anticuerpos).

3.2.3 Tejido linfoide asociado a mucosa

En muchas regiones del cuerpo, el tejido linfoide no está encapsulado como en los ganglios linfáticos y el bazo. Se trata de tejido linfoide difuso sin organización especial, que no se separa con precisión del tejido conectivo vecino, pero que presenta folículos linfoides aislados. A estos tejidos se le denomina **tejido linfoide asociado a mucosa (MALT)**, las localizaciones más características son las asociadas a la mucosa intestinal (**GALT**, “gut”) y respiratoria (**BALT**, “broncus”) (figura 3-16); también existe en la mucosa urogenital (ver capítulo 16). Además de linfocitos, células que se encuentran en mayor porcentaje, también se hallan linfoblastos, células plasmáticas y macrófagos. Los folículos de los MALT son similares a los existentes en el bazo y los ganglios linfáticos; las regiones centrales son ricas en células B, igual que los centros germinales.

GALT. Todo el tracto gastrointestinal contiene MALT. Sin embargo, el intestino delgado, principalmente el íleon, además de folículos linfoides aislados, contiene conglomerados linfoides denominados **placas de Peyer**. Éstas presentan un folículo formado por células B, rodeado por una región más laxa de células T y macrófagos que



actúan como CPA. Las placas de Peyer no cuentan con vasos linfáticos aferentes, pero sí presentan vasos linfáticos eferentes que drenan en los ganglios linfáticos mesentéricos. Los linfocitos llegan a las placas a través de pequeñas arteriolas que son drenadas por HEV. Si bien el íleon está revestido por epitelio cilíndrico simple, las zonas adyacentes a los folículos linfoides de las placas están cubiertas por células de tipo escamoso (pequeñas y anchas) llamadas células M, a través de las cuales los antígenos lumenales penetran por pinocitosis y fagocitosis. (figura 3-23)

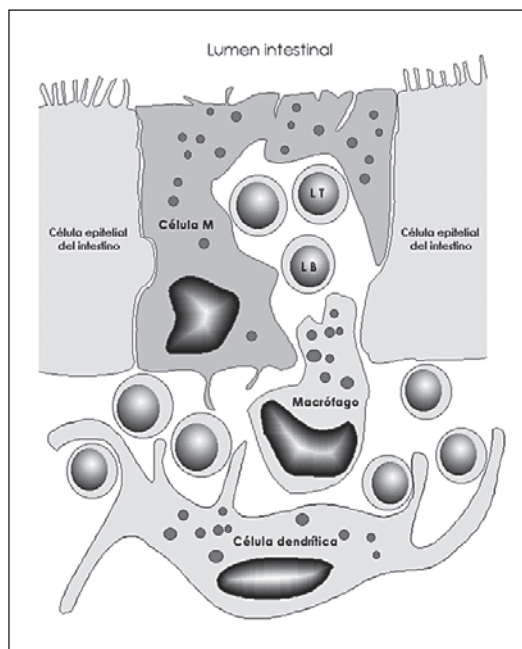


Figura 3-23. Participación de las células M en la incorporación de antígenos hasta las placas de Peyer. Las células M, expuestas hacia el lumen intestinal, permiten el ingreso de antígenos por pinocitosis y fagocitosis. De esta forma los antígenos pueden tomar contacto con los linfocitos y macrófagos de las placas de Peyer.

BALT. El tejido linfoide asociado la mucosa de bronquios es, estructuralmente, similar a las placas de Peyer, presenta folículos ricos en células B, y sectores en que existen LT y CPA. El BALT se encuentra en los bronquios de todos los lóbulos pulmonares; se ubica principalmente en las bifurcaciones de los bronquios y bronquiolos. Al igual que en el GALT en la zona adyacente a los folículos linfoides el epitelio cilíndrico es reemplazado por células M descritas en el GALT. Tampoco presentan vasos linfáticos aferentes, pero sí eferentes y está ricamente vascularizado.

La **IgA** es la clase de anticuerpo que más activa y eficientemente puede ser secretada a través del epitelio. Ello le significa una importante participación en la defensa contra patógenos a nivel de las vías respiratorias y del tracto intestinal. En el intestino la producción de IgA se inicia por el ingreso de los antígenos a las placas de Peyer, donde células T de regiones interfoliculares y células B foliculares, son estimuladas. Algunos de los linfocitos B se diferencian a células productoras de IgA y migran a la lámina propia, ubicada bajo el epitelio de mucosa. Las citoquinas más importantes en el cambio de clase a isotipo IgA son el factor de crecimiento transformante B (TGF-B) e IL-5 (ver capítulo 6). Algunas células B activadas migran a los centros germinales de las placas de Peyer, donde ocurren proliferación de los LT y mutaciones somáticas de los genes de Ig, lo que conduce a una mayor afinidad de los anticuerpos. Los linfocitos productores de IgA pueden permanecer en la lámina propia o pueden migrar a otras mucosas u órganos linfoides.

3.2.4 Amígdalas

Las amígdalas son agregados encapsulados, de manera incompleta, de folículos linfoides. Existen 3 tipos de amígdalas: (a) palatinas: bilaterales, localizadas en los límites de la cavidad oral y la faringe; (b) faríngea: única, ubicada en el techo de la faringe nasal y (c) linguales: varias, se encuentran en superficie dorsal del tercio posterior de la lengua (figura 13-16). Por su estratégica localización, las amígdalas están directamente expuestas a tomar contacto con antígenos inhalados e ingeridos. El parénquima de los diferentes tipos de amígdalas es similar, está conformado por folículos linfoides ricos en células B, los que pueden presentar centros germinales. Reaccionan a los antígenos formando linfocitos y estableciendo una reacción inflamatoria. La superficie de las amígdalas está recubierta por epitelio, diferente en cada caso.

4. TRÁNSITO LINFOCITARIO

Una parte de los linfocitos formados en la médula ósea pasa al timo, donde se diferencia a células T y otra parte se diferencia a células B en la propia médula ósea. Luego de adquirir en los órganos linfoides primarios, los receptores que los caracterizan como linfocitos T ("helper" y



citotóxicos) y linfocitos B, las células linfoides vírgenes pasan a través de la circulación general a los tejidos linfoides secundarios. El paso desde la sangre por las HEV se ve favorecido por moléculas de adhesión (ver capítulo 12); moléculas que presentan ciertas diferencias dependiendo del tipo de linfocito (virgen o de memoria) y del tejido de destino (ganglio linfático, placas de Peyer, GUT o piel). Allí toman contacto con los antígenos para los cuales presentan especificidad. En los órganos linfoides secundarios se ubican en zonas específicas, así los folículos linfoides son ricos en LB y la paracorteza (de los ganglios linfáticos) es rica en LT. Aquí en los órganos linfoides secundarios se generan los linfocitos de memoria (T y B) y efectores (linfocitos T citotóxico y células plasmáticas). Los linfocitos salen de los ganglios linfáticos a través de los vasos linfáticos eferentes, para llegar nuevamente a la circulación a través del conducto torácico y conducto linfático derecho (figura 3-24).

En condiciones normales, los linfocitos están recirculando permanentemente, lo cual proporciona una vigilancia inmunológica más eficiente, al permitir la presencia de todo el repertorio de linfocitos antígeno-específicos, en diferentes partes del organismo.

LECTURAS SUGERIDAS

Austyn, J. and Wood, K., **Principles of cellular and molecular immunology**, Chapter 1, Oxford University Press, New York, 1993.

Babior, B., "NADPH oxidase: An update", *Blood*, 93(5):1464-1476, 1999.

Bokoch, G., "Chemoattractant signaling and leucocyte activation", *Blood* 86(5):1649-1660, 1995.

Degos, L; Linch, C.; Löwenberg, B., **Textbook of Malignant Haematology**, Chapters 3, 4, Martin Dunitz, 1999.

Gartner, L. y Hiatt, J., Traducido por Sapiña, S., **Histología, texto y atlas**, Capítulos 10 y 12, Interamericana, 1997.

Geneser, F., **Histología: sobre bases moleculares**, Capítulos 10, 11 y 16, Editorial Panamericana, 2001.

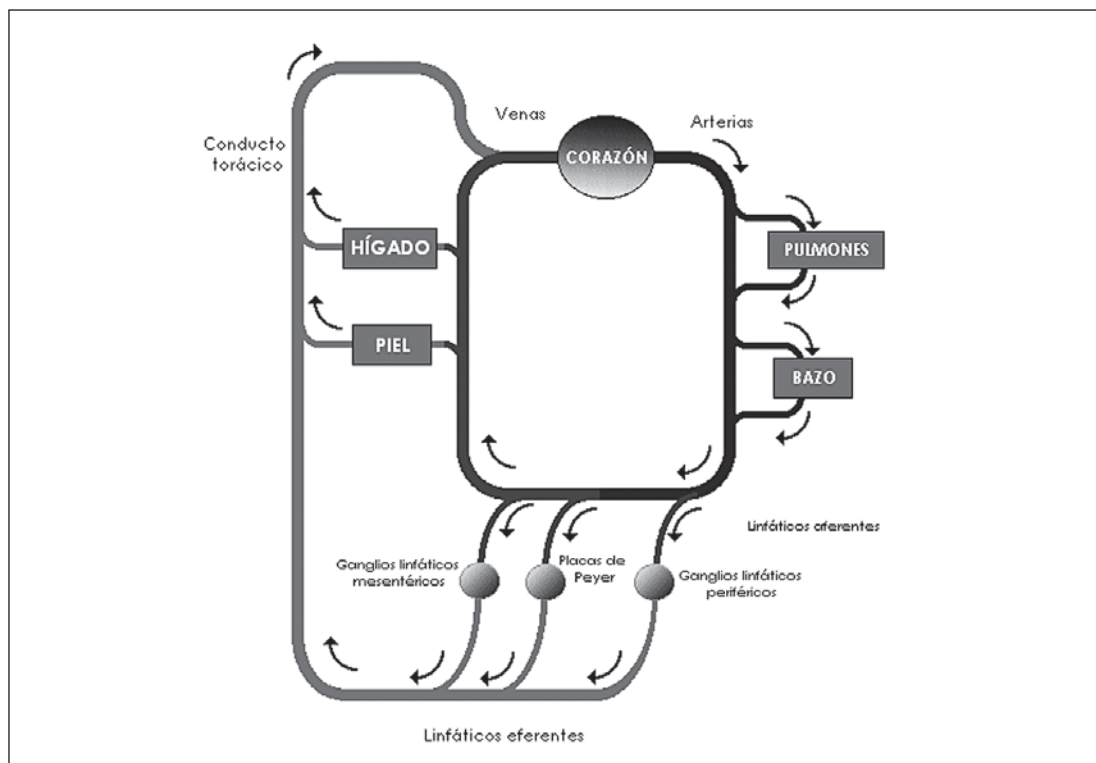


Figura 3-24. Recirculación de los linfocitos. Una vez que las células T y B salen de los órganos linfoides primarios como linfocitos maduros, pasan a través de la circulación general a los tejidos linfoides secundarios. Desde los ganglios linfáticos, salen a través de los vasos linfáticos eferentes y vuelven a la circulación general, fundamentalmente, por el conducto torácico.



Hampton, M.; Kettle, A.; Winterbourn, C., “Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing”, *Blood*, 92(9): 3007 - 3017, 1998.

Lee, R.; Foerter, J.; Lukeng, J.; Pareskevas, F.; Greer, J.; Rodgers, G., Editors, **Wintrobe's clinical hematology**, Chapters 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, Lippincott Williams E. Wilkins, Philadelphia, 1998.

Palomo, I. y Pereira, J., “Fundamentos inmunológicos” en **Fisiopatología de las citopenias inmunes**, Editorial Universidad de Talca, Talca, 1995.

Paul, W., Editor, **Fundamental Immunology** (Four Edition), Chapters 14, 30, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999.

Pereira, J., “Producción, cinética y función de los granulocitos” en **Fisiología de la sangre** (Mezzano, D. y Pereira, J., Editores), capítulo 7, Editorial Universitaria, P. Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile, 1993.

Stiene-Martin, A.; Lotspeich-Steininger, Ch.; Koepke, J., **Clinical Hematology: Principles, procedures and correlations**, Second edition, Chapter 23, 1998.



Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 4

INMUNIDAD INNATA

Iván Palomo G., Adriana Ardiles S. y Ulises Vergara C.

-
- 1. Introducción**
 - 2. Componentes de la inmunidad innata o natural**
 - 3. Fase de reconocimiento en la respuesta inmune innata**
 - 4. Fase efectora en la respuesta inmune innata**
 - 5. Proyección clínica**
 - 6. Filogenia de la respuesta inmune innata**





RESUMEN

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra la infección. Posee mecanismos de reconocimiento de diversidad limitada codificadas en la línea germinal. No posee memoria. Está constituido por diversos tipos celulares y moléculas solubles que juegan un rol en el reconocimiento de microorganismos y también en la fase efectora de la respuesta innata. Filogenéticamente es el mecanismo de defensa más antiguo y se ha conservado a lo largo de la evolución. Actúa rápidamente para eliminar al antígeno a través de mecanismos microbicidas y respuesta inflamatoria. Por ser sus mecanismos efectores tan potentes y con capacidad de producir daño tisular del huésped están finamente regulados por diversos mecanismos de control. La respuesta innata tiene la capacidad de alertar y dirigir la respuesta inmune adquirida orientándola hacia una respuesta celular o humoral específica.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es parte de los mecanismos biológicos destinados a mantener la integridad estructural y funcional de los individuos y, está genéticamente programado para la neutralización y eliminación tanto de agentes infecciosos, células y moléculas extrañas, como detritus y productos moleculares de células propias envejecidas, transformadas o tumorales.

Los componentes celulares y moleculares del sistema inmune se han separado tradicionalmente en componentes naturales o innatos y componentes adquiridos o específicos que han desarrollado estrategias, mecanismos y receptores distintos para el reconocimiento inmunológico. Así, mientras la inmunidad específica se basa en el tamaño y la diversidad del repertorio linfocitario T (10^{18}) y B (10^{14}) y requiere la activación y expansión clonal de linfocitos T y B únicos y específicos para el desarrollo de una respuesta inmune eficiente; el sistema innato utiliza unos pocos cientos de receptores de expresión constitutiva y no clonal en las células de la inmunidad natural y, cuya especificidad está dirigida a moléculas o patrones moleculares altamente conservados en grandes grupos de agentes infecciosos (PAMPs= Pathogen Associated Molecular Patterns).

La inmunidad innata es filogenéticamente más antigua que la adquirida, se ha conservado a lo largo de la escala evolutiva y constituye la primera línea de defensa contra la infección. Está constitui-

da por un conjunto de diversos tipos celulares y factores solubles encargados de la resistencia del huésped ante agentes infecciosos con los cuales nunca éste ha tenido contacto. A diferencia de la inmunidad específica, la inmunidad innata es de acción inmediata, no requiere exposición previa al antígeno y no se modifica con exposiciones repetidas al agente infeccioso. Su rapidez de activación y, por lo tanto, rapidez de la respuesta efectora a la infección, colocan a la inmunidad innata en una situación privilegiada para eliminar a los agentes infecciosos. Sin embargo, no debemos olvidar que en el curso de la evolución estos microorganismos han desarrollado diversas estrategias para evadir, distraer, suprimir o manipular en su propio beneficio, los diversos mecanismos efectores de la respuesta inmune. Por otra parte, los huéspedes han desarrollado mecanismos defensivos cada vez más selectivos y específicos. Esto ha significado mejorar, diversificar y amplificar mediante mecanismos de recombinación génica, el repertorio de receptores linfocitarios aumentando así la probabilidad que un linfocito individual y único reconozca antígenos del microorganismo. Estos cambios evolutivos han permitido el surgimiento de la inmunidad adquirida, optimizando la defensa inmunológica de los hospederos y por lo tanto su supervivencia en un ambiente siempre cambiante y de gran complejidad.

Existe una interacción bidireccional entre estos dos sistemas: el sistema inmune innato funciona como una alerta para el sistema inmune específico y puede determinar el tipo de respuesta



adquirida, ya sea humoral o celular. Por otra parte, el sistema inmune específico utiliza los mecanismos efectores de la inmunidad innata para eliminar a los microorganismos haciendo más eficiente el proceso de fagocitosis y amplificando la respuesta inflamatoria mediante la activación del complemento por la vía clásica (figura 4-1). Del balance entre la efectividad de los mecanismos inespecíficos para eliminar la infección y de la carga del agente infectante va a depender la evolución de la infección. Si ésta persiste por más tiempo, el influjo de monocitos y macrófagos al sitio de infección va a llevar al procesamiento y presentación de antígenos del agente infeccioso al sistema inmune específico, con su consecuente activación (figura 4-2). Después de un tiempo relativamente corto de 3 a 5 días, los anticuerpos producidos por la progenie de los clones de linfocitos B activados van a producir una opsonización adicional del agente infeccioso. La fijación de anticuerpos en la superficie bacteriana por sí sola puede no tener un efecto nocivo para la sobrevivencia bacteriana, sin embargo, a través de la activación de la vía clásica de complemento y de la fagocitosis se acelera la eliminación de dicho agente. A su vez, los linfocitos T (LT) secretan citoquinas que activan a los monocitos y macrófagos, permitiéndoles eliminar organismos ingeridos que resisten la destrucción por parte de células no activadas. Así, los mecanismos inespecíficos que iniciaron la reacción inmune vienen ahora a completar su efecto, bajo la dirección y activación de la inmunidad específica (figuras 4-1 y 4-2).

2. COMPONENTES DE LA INMUNIDAD INNATA

Los componentes del sistema inmune innato son un grupo heterogéneo de células y factores solubles (tabla 4-1). Estos componentes se ubican en posibles puntos de entrada de los agentes infecciosos desde el medio ambiente; en la circulación, donde pueden hacer una labor de vigilancia y, en los tejidos donde finalmente se llevará a cabo la respuesta efectora si es que el agente infeccioso ha logrado sobrepasar estas primeras barreras. Estos mecanismos son de tipo físico; están preformados o mantenidos bajo control por el huésped. Deben ser activados rápidamente en respuesta a la infección, pero debido a su alta potencia e inespecificidad, pueden producir daño tisular, por lo tanto, su activación debe ser regulada.

Con respecto a los **componentes celulares**

(tabla 4-1), se puede citar la integridad de la piel y de las mucosas del tracto respiratorio, digestivo y urogenital. Al estar las células epiteliales firmemente adheridas, constituyen una barrera muy importante en la resistencia del huésped a la infección. Cada sistema posee características particulares de acuerdo con su anatomía y fisiología. Así por ejemplo, en el aparato respiratorio, el flujo de aire o de fluidos a lo largo del epitelio, unido al movimiento ciliar ejerce una función de barrido de microorganismos que se hayan adherido al mucus impidiendo de esta manera la adhesión a las células epiteliales.

En la inmunidad innata participan linfocitos con características especiales que los hacen más afines con ésta que con la inmunidad adquirida. Estos linfocitos tienen un receptor para antígeno de diversidad limitada. Son los linfocitos T intraepiteliales y los linfocitos B-1. Los primeros producen citoquinas, activan fagocitos y causan la muerte de las células infectadas; y los segundos, producen anticuerpos naturales clase IgM. Constituyen un mecanismo preformado para enfrentar microorganismos que sobrepasan las barreras epiteliales.

Los mastocitos son otro tipo celular que participa en la inmunidad innata. Se ubican en las proximidades de pequeños vasos sanguíneos y posee mediadores de la inflamación preformados como histamina, serotonina, factor quimiotáctico para eosinófilos, factor quimiotáctico para neutrófilos, heparina, quimasa, peroxidasa, etc. También tienen la capacidad de secretar mediadores lipídicos de neoformación tales como las prostaglandinas, tromboxano y leucotrienos y mediadores proteicos de neoformación como las citoquinas. El lipopolisacárido puede inducir directamente la liberación de productos de los mastocitos e indirectamente, a través de la activación del sistema del complemento. Los mastocitos, por estas características, pueden iniciar y orquestar la respuesta inflamatoria en los sitios de infección.

Otros tipos de células que intervienen en la inmunidad innata son los polimorfonucleares (PMN) neutrófilos, eosinófilos, los monocitos y las células “natural killer” (NK). Todas estas células tienen la propiedad de circular y migrar. Ello les permite ejercer una vigilancia eficiente y una rápida llegada a los lugares de infección. Estas células se originan en la “stem cell” de la médula ósea, la que se diferencia a un precursor mielóide (que genera los granulocitos, monocitos y

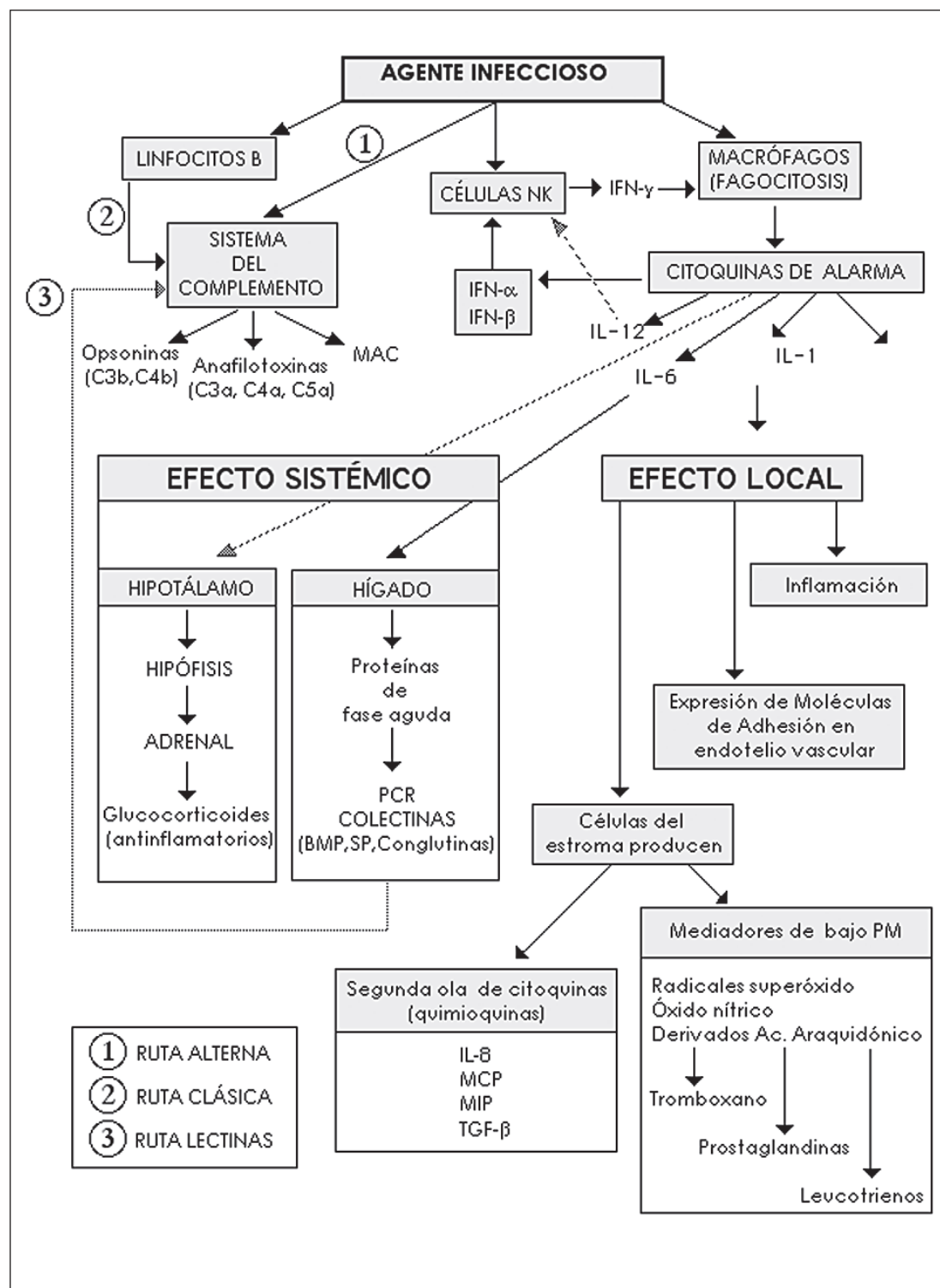


Figura 4-1. El sistema inmune. El sistema inmune está compuesto de dos ramas principales: inmunidad innata y adquirida. La confrontación del sistema inmune innato con patógenos lleva a su rápida activación y capacita al sistema inmune específico para responder apropiadamente. Existen interconexiones entre los mediadores solubles y celulares de ambos sistemas, que interactúan aumentando la eficacia de la respuesta. Modificado de Ploegh, HL., *Science* 1998; 280:248.

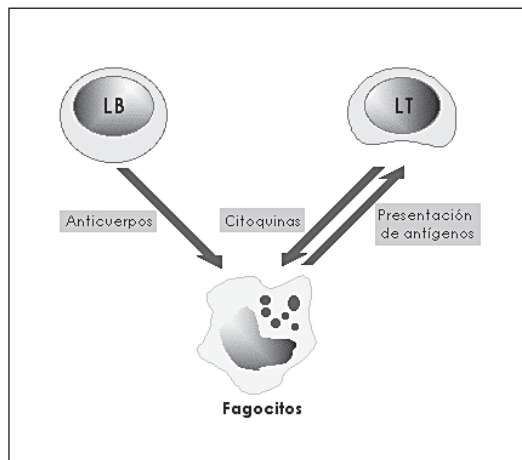


Figura 4-2. Interacciones entre inmunidad innata y adquirida. Los anticuerpos producidos por los linfocitos B, al unirse a los microorganismos actúan como agentes opsonizantes. Las citoquinas liberadas por las células T activan las células fagocíticas para destruir el material que éstos han endocitado. A su vez, los macrófagos y monocitos pueden presentar el antígeno a las células T y causar su activación.

macrófagos) y a un precursor linfoide del cual derivan las células NK (ver capítulo 3).

Los polimorfonucleares son el tipo celular más numeroso a nivel circulante. Son de corta vida y se producen en gran número en la respuesta inflamatoria. Estas células deben migrar al sitio de infección abandonando el torrente sanguíneo en respuesta a señales moleculares. Los PMN poseen gránulos primarios y secundarios. Los gránulos primarios contienen mieloperoxidasa, que potencia la actividad microbicida del peróxido de hidrógeno; lisozima, que hidroliza uniones glicosídicas entre ácido acetilmurámico y

acetilglucosamina en la pared celular bacteriana; hidrolasas neutras y ácidas, que degradan macromoléculas microbianas, y proteínas catiónicas que destruyen bacterias gram negativas. Los gránulos secundarios contienen lisozima, lactoferrina, que tiene la capacidad de que el hierro requerido para el crecimiento microbiano lo que produce bacteriostasis y colagenasa que digiere macromoléculas bacterianas.

Los monocitos son los precursores circulantes de los macrófagos tisulares. Se encuentran en gran número en tejido conectivo, pulmón (macrófagos alveolares e intersticiales), hígado (células de Küpfer), bazo (macrófagos esplénicos), cerebro (células de la microglía).

Las células NK o linfocitos granulares grandes presentan actividad citotóxica directa y citotoxicidad dependiente de anticuerpos y participan en defensa contra células infectadas por virus precozmente durante la infección (ver capítulo 19). No expresan receptores de linfocitos T. Poseen receptores de activación KAR (“Killer Activating Receptor”) que reconocen patrones moleculares o PAMPs hidrocarbonados propios de los agentes infecciosos y activan la citotoxicidad directa. Receptores Fc reconocen anticuerpos específicos unidos a la membrana de los agentes infecciosos y activan la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Las células NK poseen además receptores de inhibición KIR “Killer Inhibition Receptor” que reconocen moléculas codificadas por el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) y transducen señales de inhibición de la citotoxicidad contra células propias que expresan estas moléculas MHC.

Además de ser una barrera física, la piel y

Tabla 4-1. Componentes de la inmunidad innata

Celulares	Solubles
Células epiteliales de la piel y mucosas	Defensinas, lisozima y otras
Linfocitos T intraepiteliales	Sistema del complemento
Linfocitos B-1	Colectinas
Mastocito	Pentraxinas
Polimorfonucleares neutrófilos	Factores de coagulación
Monocitos	Citoquinas:
Macrófagos	TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN
Células Natural Killer	Quimioquinas:
	IL-8, MC, MIP





mucosas poseen sustancias como ácidos grasos (piel), enzimas como lisozima (presente en saliva, sudor, lágrimas) y péptidos antibacterianos como defensinas con acción microbicida o inhibidora del crecimiento bacteriano.

A nivel digestivo, participan la lisozima de la saliva, el pH ácido del estómago, las criptidinas (péptidos antibacterianos generados en las criptas del intestino delgado), y la flora normal que compete por nutrientes con microorganismos patógenos y también elabora sustancias antibacterianas tales como las colicinas, que previenen la colonización por otro tipo de bacterias dentro del intestino.

Además de los **Componentes solubles** mencionados en relación con las barreras epiteliales y mucosas, en la inmunidad innata hay otros componentes de este tipo, que participan en la fase de reconocimiento y en la fase efectora (tabla 4-1). A continuación se describen brevemente:

El complemento es un sistema de proteínas plasmáticas que interactúan entre sí de una manera regulada. Es un mecanismo efector de la inmunidad humoral inespecífica y tiene un rol amplificador de la respuesta inflamatoria. Los precursores de este sistema deben ser activados secuencialmente por reacciones bioquímicas a través de dos vías principales: clásica y alterna, que comparten una secuencia terminal común. La vía clásica se activa por inmunocomplejos de IgG o IgM y la vía alterna se activa por lipopolisacáridos de pared bacteriana, polisacáridos y agregados de inmunoglobulinas. La vía de las lectinas de la activación del complemento es gatillada por la unión de polisacáridos microbianos a lectinas circulante (ver capítulo 18).

Las colectinas son una familia de proteínas caracterizadas por la presencia de un dominio colágeno-símil y un dominio lectina. Juegan un rol en la inmunidad innata al actuar como receptores de patrones de reconocimiento y pueden activar al complemento vía unión de C1q.

Las pentraxinas son una familia de proteínas del plasma que contienen cinco unidades globulares. La proteína C reactiva es el miembro más importante de esta familia: (a) es un reactante de fase aguda que se sintetiza a nivel hepático, (b) su ligando es polisacárido bacteriano, (c) reconoce también constituyentes fosfolipídicos de células dañadas, (d) funciona como opsonina y (e) puede activar el complemento por vía clásica, por su unión a C1q.

El sistema de la coagulación además de participar en la hemostasia y contribuir a evitar localmente la diseminación de la infección, está estrechamente unido a la injuria tisular y al proceso in-

flamatorio secundario a la infección. Interviene en la fase de reparación tisular y en consecuencia en la recuperación de la integridad de los tejidos. El sistema de la coagulación, junto a las otras cascadas plasmáticas enzimáticamente gatilladas, como el sistema de las quininas, el sistema de la fibrinólisis y el sistema del complemento, son mediadores de la inflamación. Estos sistemas se interrelacionan por lo que la activación de uno de ellos puede producirá la activación de los otros. La puesta en marcha de la acción de los mediadores plasmáticos de la inflamación junto con la activación de los mediadores celulares, contribuye a la eliminación del agente infeccioso a través de la respuesta inflamatoria local. Las citoquinas son una familia de proteínas que participan tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adquirida (ver capítulo 11). Ellas son producidas por diversos tipos celulares. Comunican células del sistema inmune entre sí. Ejercen acciones locales y a distancia sobre diferentes tipos celulares. Las citoquinas que participan en la inmunidad innata son generadas por macrófagos activados en sitios de infección.

Hay citoquinas de alarma o proinflamatorias como interleuquina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF) e interleuquina 6 (IL-6), las cuales inducen en la etapa precoz de la infección una respuesta inflamatoria local dirigida a contenerla y, eventualmente, inducen una respuesta sistémica o de fase aguda. Otras citoquinas tienen función quimiotáctica para leucocitos como interleuquina 8 (IL-8). La interleuquina 12 (IL-12) activa células NK y estimula a los macrófagos, la interleuquina 10 (IL-10) inhibe a los macrófagos y los interferones (IFN) α y β tienen actividad antiviral.

3. FASE DE RECONOCIMIENTO EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA

La diferencia esencial entre los sistemas inmunológicos innato y adquirido es el modo a través del cual reconocen a los microorganismos. El sistema inmune innato emplea proteínas codificadas en la línea germinal. Reconoce estructuras compartidas por diferentes tipos de microorganismos (patrones moleculares). Estas proteínas pueden ser receptores de superficie celular o sustancias solubles de diversidad limitada.

Las principales moléculas solubles de reconocimiento de la inmunidad innata, en general, reconocen estructuras carbohidrato (tabla 4-2). Las prin-



cipales son Proteína C reactiva, Proteína amiloide sérica, “mannose binding protein” (MBP), “lipopolysaccharide binding protein” (LBP), CD14 soluble y C3. Es importante destacar que algunos de estos receptores solubles tienen la capacidad de activar complemento y de esa manera pueden favorecer la fagocitosis, amplificar la respuesta inflamatoria y lisar a microorganismos. Otros son profagocíticos. Claramente se puede ver que la función de reconocimiento está unida a funciones efectoras.

Subsecuentemente la activación del macrófago es el resultado de señales gatilladas por la subunidad “Toll-like-4”. La activación de los macrófagos se evidencia a través de la estimulación de síntesis de proteínas que van a favorecer la función microbicida (oxidasas, óxido nítrico sintetasa), la trombosis (factor tisular), la remodelación tisular (proteasas, factores de crecimiento, factores angiogénicos), inflamación local y respuesta de fase aguda (IL-1, IL-6 y TNF), activación de otros tipos celulares (IL-12) y

Tabla 4-2. Inmunidad innata: moléculas solubles de reconocimiento

	Síntesis hepática	Ubicación sérica	Ligando: Polisacáridos	Ligando: Proteína matriz extracelular	Activación complemento	Profagocítica
PCR	+	+	+		+	+
PAS	+	+	+	+		+
MBP	+	+	+		+	+
LBP	+	+	+		+	
sCD14		+	+			+
C3	+	+	+		+	+

PCR, Proteína C reactiva; PAS, Proteína amiloide A; MBP, “Mannose binding protein”; LBP, “Lipopolysaccharide binding protein”; sCD14, CD14 soluble.

Los principales receptores celulares de reconocimiento de la inmunidad innata (tabla 4-3) se ubican en la membrana celular de polimorfonucleares neutrófilos, monocitos y macrófagos, dotándolos así de la capacidad de vigilancia de microorganismos que puedan haber ingresado al huésped habiendo sobrepasado la barrera inicial del sistema de defensa inespecífico. Reconocen glicoproteínas y lipopolisacáridos bacterianos comunes a muchos patógenos y que no están presentes en células de mamíferos. Son los receptores de patrones de reconocimiento. Además, los receptores solubles y celulares de reconocimiento pueden actuar en conjunto para llevar a cabo su función. De este modo el sistema sensor de lipopolisacárido (LPS) del macrófago está constituido por tres componentes: una proteína plasmática de unión a LPS que es LBP, un receptor de superficie celular para LPS que es CD14 y un receptor transductor de señales llamado receptor “Toll-like-4”. LPS circulante es inicialmente unido a LBP y luego es entregado a CD14 sobre la superficie del macrófago donde la LBP es liberada.

estimulación de la respuesta específica a través de presentación antigénica y de la expresión de moléculas coestimuladoras. Entre otros receptores celulares de reconocimiento que presentan los polimorfonucleares neutrófilos se encuentran el receptor para el péptido bacteriano que contiene residuos N-formil metionil y el receptor para fragmento de complemento como CR3, que puede directamente reconocer bacterias para fagocitosis.

4. FASE EFECTORA EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA

La unión ligando-receptor induce respuestas celulares que estimulan la inflamación y la acción microbicida. Entre los sistemas mediadores de la inflamación juega un rol preponderante el sistema de las cascadas plasmáticas enzimáticamente gatilladas: sistema de la coagulación, sistema de las quininas, sistemas de la fibrinólisis y sistema del complemento (figura 4-3). Estos siste-

Tabla 4-3. Inmunidad innata: receptores celulares de reconocimiento

	Ubicación	Ligando	Función
Receptor de manosa	Macrófago tisular	Glicoproteínas microbianas	Fagocitosis
Receptores scavenger	Macrófago tisular	Pared celular de bacterias y hongos	Fagocitosis
Receptor CD14/Toll-like	Monocitos y macrófagos	LPS	Activación de macrófagos
Receptor CR3	Monocitos, macrófagos y PMN neutrófilos	iC3b, LPS	Fagocitosis, adhesión
Receptor péptido N-formilmetionil	PMN neutrófilos, macrófagos	Proteínas bacterianas	Activación neutrófilos y macrófagos

LPS, “Lipopolysaccharide” (lipopolisacárido) ; PMN, polimorfonucleares.

mas están interrelacionados y juegan un papel amplificador de la respuesta inflamatoria. El factor Hageman o factor XII es fundamental; su activación (por superficies cargadas negativamente, como colágeno, membranas basales, expuestos durante la injuria tisular) inicia la cascada de la coagulación, del sistema de las quininas y de la fibrinolisis. La plasmina activa al sistema del complemento; factores derivados de éste participan en la inflamación aguda, como C3a y C5a, que actúan sobre el mastocito produciendo su degranulación y liberando histamina, lo que produce aumento de la permeabilidad vascular y vasodilatación. C5a favorece la adhesión, quimiotaxis y activación de leucocitos. C3b es una

opsonina y favorece la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos. La activación del sistema de las quininas libera bradiquinina, que aumenta la permeabilidad vascular y también provoca dolor. Además, el quininógeno, de alto peso molecular, es un cofactor en la activación del factor Hageman. La caliceína por sí misma, al ser un activador de este factor, permite la amplificación autocatalítica del estímulo inicial. Los neutrófilos y macrófagos activados matan microorganismos por medio de enzimas lisosomales, intermediarios reactivos del oxígeno y óxido nítrico, o sea también en relación con estos receptores de superficie celular se puede ver la unión entre función de reconocimiento y funciones efectoras.

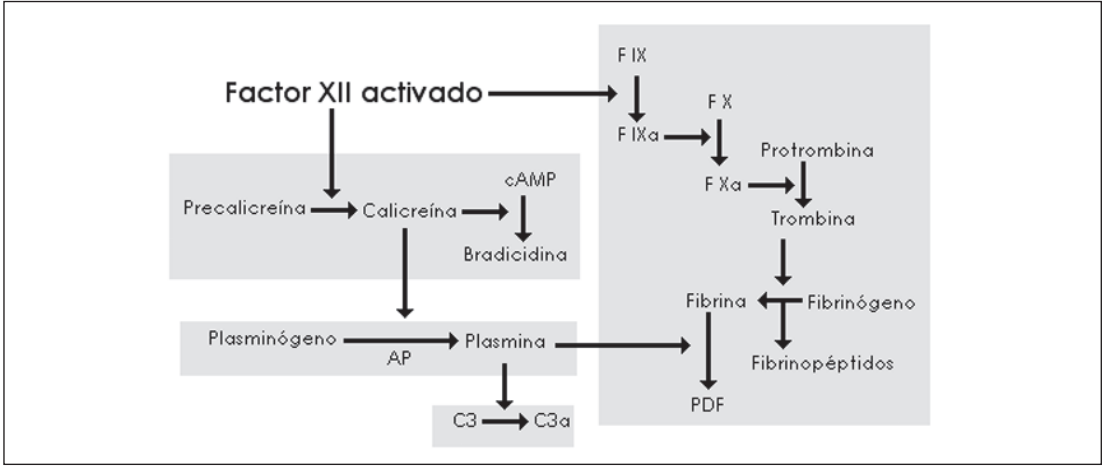


Figura 4-3. Sistemas mediadores del plasma en la inflamación. Proteínas de los sistemas de la coagulación, de la fibrinolisis, de las cininas y del complemento interaccionan, participando como mediadores químicos de la inflamación. CAPM, cininógeno de alto peso molecular; AP, activador del plasminógeno; PDF, productos de degradación de la fibrina.



Con respecto a mediadores de la inflamación de origen celular los productos derivados del metabolismo del ácido araquidónico son fundamentales (figura 4-4). Luego de su liberación desde fosfolípidos de membranas a través de la activación de fosfolipasa A₂, el ácido araquidónico es metabolizado a través de dos vías, la vía de la cicloxigenasa y la vía de la lipoxigenasa. En la vía de la cicloxigenasa se obtienen secuencialmente, entre otros metabolitos, los endoperóxidos prostaglandinas G₂ y H₂, tromboxano A₂ (agregante plaquetario y vasoconstrictor), prostaciclina o prostaglandina I₂ (antiagregante plaquetario y vasodilatador) y las prostaglandinas E₂, F₂α y D₂ (vasodilatadores). El tromboxano A₂ se sintetiza, fundamentalmente, en las plaquetas y la prostaciclina en las células endoteliales. En la vía de la lipoxigenasa se genera el ácido hidroxiperoxisatetraenoico (HETE), un potente agente quimiotáctico para los neutrófilos. El HETE puede originar el leucotrieno A₄, a partir del cual se generan los leucotrienos B₄ (factor quimiotáctico) y leucotrienos C₄, D₄ y E₄, que aumentan la permeabilidad vascular. El término leucotrieno se debe a que presentan una cadena conjugada triénica y que se aislaron originalmente en los leucocitos.

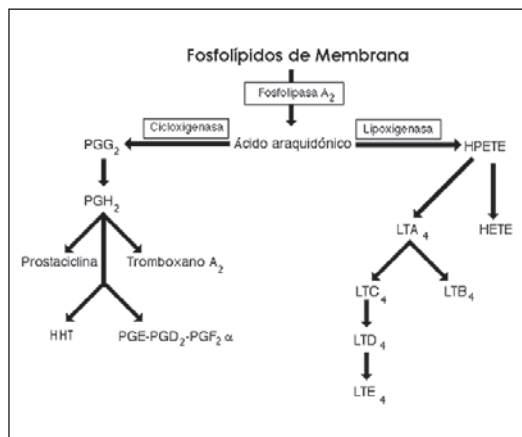


Figura 4-4. Metabolitos del ácido araquidónico. Una vez desesterificado por la fosfolipasa A₂, el ácido araquidónico es metabolizado a través de las vías de la cicloxigenasa y de la lipoxigenasa. PGG₂ y PGH₂, endoperóxidos; PGI₂, prostaciclina; PGE₂, PGF₂α y PGD₂, prostaglandinas; HPETE, ácido hidroxiperoxisatetraenoico; LTA₄-LTE₄, leucotrienos.

La respuesta inflamatoria local se evidencia semiológicamente por los cinco signos clásicos: aumento de volumen, eritema, aumento de temperatura local, dolor e impotencia funcional. Dichos signos son la expresión clínica de los cam-

bios vasculares de aumento de flujo y de permeabilidad, producidos por los mediadores químicos de la inflamación y el reclutamiento de leucocitos hacia los sitios de infección con la formación subsecuente del infiltrado inflamatorio. Este reclutamiento es estimulado por citoquinas y mediado por moléculas de adhesión. Estas moléculas son glicoproteínas unidas a la membrana celular que permiten a la célula interactuar con otra (ver capítulo 12). La migración de los leucocitos se realiza a través del endotelio de la vénula postcapilar. Productos bacterianos como lipopolisacáridos e IL-1 y TNF secretados por macrófagos estimulan a las células endoteliales para expresar secuencialmente selectinas e integrinas que median la adhesión preferencial de diferentes tipos de leucocitos. Las selectinas intervienen en la unión inicial, laxa del leucocito con la célula endotelial y las integrinas median la unión estable entre aquellas células. Esta unión es previa a la migración del leucocito a través de los espacios intercelulares endoteliales. Los quimioattractantes activan la adhesividad de las integrinas y dirigen la migración de los leucocitos de acuerdo al gradiente de concentración de factores quimiotácticos hasta llegar al foco de infección (figura 4-5).

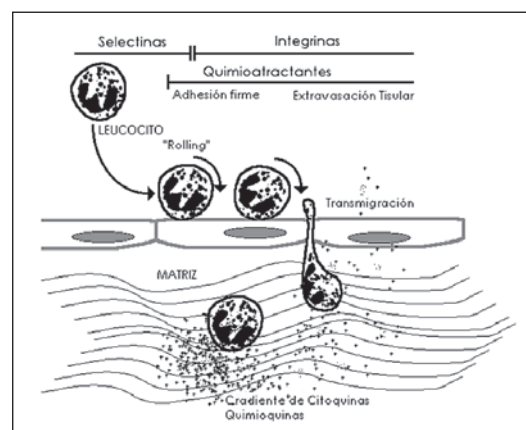


Figura 4-5. Migración de leucocitos en inflamación. Varias familias de moléculas de adhesión controlan la migración de leucocitos durante la inflamación; las selectinas facilitan el rodamiento ("rolling"), las quimioquinas dan las señales que convierten la interacción de baja afinidad mediada por selectinas en una interacción de alta afinidad mediada por integrinas previa a la extravasación de leucocitos.

Los neutrófilos inician el englobamiento a través de la proyección de pseudópodos alrededor del microorganismo, y luego fusionan los polos distales de aquellos, para formar el fagosoma.



Los gránulos citoplasmáticos de los leucocitos polimorfonucleares se fusionan a la base del fagosoma y descargan su contenido dentro de él. Estos gránulos, como se dijo anteriormente, contienen enzimas y otras sustancias bactericidas o bacteriostáticas. Cuando los fagocitos son activados por estímulos particulados o solubles, la vía glicolítica y el shunt hexosamonofosfato, son estimulados para producir nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH). NADPH es un sustrato para la enzima NADPH oxidasa, que es activada. Esta activación reduce el oxígeno molecular a anión superóxido, que es convertido a H_2O_2 , el cual por medio de la acción de la mieloperoxidasa, también presente en fagocitos, forma OCl^- , potente citotóxico (ver capítulo 3). Otra vía incluye la producción de óxido nítrico. Los neutrófilos activados expresan una enzima inducible llamada óxido nítrico sintetasa que genera óxido nítrico a partir del aminoácido arginina y oxígeno molecular; en presencia de otras especies reactivas de oxígeno dentro de la vacuola fagocítica el óxido nítrico se convierte en otros productos altamente tóxicos para microorganismos. Hay un aumento del consumo de oxígeno por el neutrófilo llamado estallido respiratorio que se produce inmediatamente después de la fagocitosis. Estas vías oxidativas proporcionan algunos de los efectos antimicrobianos preponderantes de los neutrófilos. La generación de radicales libres es regulada cuidadosamente para evitar daño tisular por el sistema del glutatión, catalasa, superóxidodismutasa, etc.

La respuesta de fase aguda se caracteriza por un conjunto de cambios que afectan al sistema nervioso, endocrinológico y hematológico. También se presentan alteraciones del metabolismo y de la nutrición. Pero, sin duda, lo más llamativo es la respuesta febril y la síntesis de proteínas de fase aguda. Estos cambios reemplazan a los mecanismos homeostáticos normales por nuevos equilibrios y prioridades los que presumiblemente contribuyen a mejorar la respuesta adquirida. La mayor parte de estos cambios se presentan dentro de las etapas iniciales de la infección y son mediados por IL-1, TNF e IL-6. La síntesis de estas citoquinas es inducida por lipopolisacáridos bacterianos que estimulan al macrófago. La respuesta de fase aguda se caracteriza por la presencia de fiebre, somnolencia, anorexia; aumento de ACTH, cortisol y catecolaminas y disminución de “Insulin like growth factor 1” (IGF-1); aumento de la cantidad de neutrófilos inmaduros circulan-

tes, anemia de enfermedades crónicas y trombocitosis; balance nitrogenado negativo, pérdida de masa muscular, disminución de la gluconeogénesis, aumento de la lipólisis del tejido adiposo y caquexia; disminución del zinc y del hierro sanguíneos; y aumento de la síntesis hepática de proteínas de fase aguda.

En general, las proteínas de fase aguda tienen funciones destinadas a favorecer la eliminación de agentes infecciosos, limitar el daño tisular, favorecer la reparación y por lo tanto restablecer la homeostasis (tabla 4-4). Hay proteínas de fase aguda cuyos niveles séricos aumentan significativamente y se conoce su evolución durante el curso de la infección. La variación de estos parámetros tiene utilidad clínica para el seguimiento de las infecciones. Las proteínas de fase aguda cuyos niveles tienen mayor modificación son: Proteína C reactiva y proteína amiloide sérico. También aumenta MBL (“Mannose Binding Lectin”). La Proteína C reactiva inicia su aumento sérico entre seis u ocho horas de iniciado el proceso, alcanzando el máximo nivel a los dos o tres días. La Proteína C reactiva y MBL actúan como opsoninas y activan complemento, por lo tanto el huésped puede disponer rápidamente de dos proteínas con propiedades funcionales que facilitan la fagocitosis y amplifican la respuesta inflamatoria. La concentración sérica de otras proteínas disminuye durante la respuesta de fase aguda; estas proteínas no son requeridas para la defensa del huésped.

La respuesta de fase aguda disminuye al eliminarse la infección, por la inhibición de citoquinas mediada por glucocorticoides y por citoquinas reguladoras, como IL-10, que inhibe a los macrófagos activados. IL-10 está involucrada en el control homeostático de la inmunidad innata.

En relación con la evolución temporal de la respuesta inmune innata y adquirida, los mecanismos innatos actúan inmediatamente ya que se produce el reconocimiento por efectores preformados inespecíficos (0-4 horas). Los mecanismos de inmunidad innata son seguidos horas después por respuestas inducidas precoces (4-96 horas) que pueden ser activados por la infección pero no dan inmunidad protectora. Estas etapas precoces ayudan a mantener la infección bajo control mientras los linfocitos específicos para el antígeno y que pertenecen al sistema inmune específico son activados (más de 96 horas). Las citoquinas y moléculas coestimuladoras producidas durante estas etapas precoces tienen un importante rol en dar



Tabla 4-4. Proteínas de fase aguda

Reactantes positivos	Reactantes negativos
Complemento: C3, C4, C9, Factor B, MBL, Inhibidor de C1, C4b-bp.	Albúmina Transferrina Transtiretina IGF-1 Factor XII α Feto proteína
Coagulación y fibrinolisis: Fibrinógeno, Plasminógeno, Activador tisular de plasminógeno, Uroquinasa, Proteína S, Vitronectina, Inhibidor I del activador de plasminógeno.	
Antiproteasas: Inhibidor α_1 proteasa, α_1 Antiquimotripsina, Inhibidor de la tripsina pancreática.	
Proteínas de transporte: Céculoplasmina, Haptoglobina, Hemopexina.	
Otras: Proteína C reactiva, Amiloide A sérico, α_1 -Glicoproteína ácida, Fibronectina, Ferritina, Angiotensinógeno, LPS-bp.	

MBL: “Mannose binding lectin”; C4b-bp: C4b “binding protein”; LPS-bp: “Lipopolysaccharide binding protein”; IGF-1: “Insulin like growth factor 1”.

forma a la respuesta inmune específica y puede determinar que una respuesta sea mediada por LT o LB.

En la inmunidad innata, microorganismos que son reconocidos e ingeridos por macrófagos, activan macrófagos o células presentadoras de antígenos (CPA) para secretar citoquinas y expresar moléculas coestimuladoras como B7-1 y B7-2 que en conjunto con el antígeno estimulan al LT específico. Microorganismos extracelulares que son reconocidos a nivel sérico pueden activar complemento; la proteína C3d liberada durante esta activación como producto de clivaje de C3 se une a CR2 de LB específico para ese antígeno y que ha recibido, al reconocer al microorganismo, su primera señal de activación. CR2 es un receptor para C3d que está presente en LB maduros. La unión de C3d a CR2 da la segunda señal de activación para LB y de este modo se inicia la respuesta inmune humoral específica.

5. PROYECCIÓN CLÍNICA

La importancia de la inmunidad innata queda de manifiesto al pensar en las patologías que

se asocian con mayor frecuencia a pacientes que presentan deficiencias de este sistema. Estos pacientes presentan infecciones muy graves y recurrentes especialmente bacterianas o por hongos a pesar de tener un sistema inmune adquirido intacto.

Es así como pacientes con alteraciones de barrera cutánea como los grandes quemados presentan infecciones muy graves y pacientes con deficiencias cuantitativas o cualitativas de polimorfonucleares neutrófilos presentan infecciones recurrentes principalmente bacterianas (ver capítulo 30). Las deficiencias cualitativas pueden ser primarias (deficiencias de gránulos azurófilos y específicos, deficiencias de adhesión leucocitaria, deficiencias de generación de metabolitos intermediarios del oxígeno, etc.) o pueden ser adquiridos (deficiencias de quimiotaxis y fagocitosis que se observan en Diabetes Mellitus e Insuficiencia Renal crónica).

Las deficiencias cuantitativas también pueden ser primarias o adquiridas. Neutropenias menores a 500 células/ μ L, conllevan un serio riesgo de infección por hongos o bacterias cuyo pronóstico va a depender de la rapidez de la caída de los neutrófilos, de la reserva medular, de la duración



y de la causa de la neutropenia. Entre las neutropenias adquiridas, las más importantes son las autoinmunes y las secundarias a drogas citotóxicas.

Pacientes con deficiencias del sistema de complemento se presentan con diferentes cuadros clínicos según las fracciones del complemento que estén deficitarias (ver capítulos 18 y 30). Aquellos con deficiencias de C1, C2 y C4 presentan asociación a patologías autoinmunes como Lupus Eritematoso Sistémico y discoide con mayor frecuencia que la población general. Aquellos con déficit de C3, Factor H, Factor I, Properdina presentan susceptibilidad a infecciones piógenas. Por último los pacientes con déficit de los componentes finales del sistema del complemento (Complejo de ataque a la membrana) y con déficit de los componentes de la vía alterna son más susceptibles a infecciones fulminantes por *Neisserias*.

Existen déficit inmunes fisiológicos que contribuyen a una mayor susceptibilidad a infecciones en pacientes pediátricos. En el período de recién nacido la inmadurez del sistema inmune inespecífico contribuye a este hecho. Se puede evidenciar también la importancia de la inmunidad innata al revisar la maduración de los componentes de ésta durante la etapa postnatal y en los primeros años de vida y su relación con la inmunidad adquirida. La respuesta inmune específica a la mayoría de los antígenos depende de complejas interacciones entre macrófagos, LT y LB. Pero la expresión completa de mecanismos de defensa del huésped requiere la maduración de otras líneas celulares y componentes séricos relacionados con la fase efectora de la inmunidad. Esto incluye complemento, fagocitos, mastocitos, basófilos, etc., que son componentes de la inmunidad innata. En el recién nacido los niveles de complemento son bajos en comparación con los del adulto, y los fagocitos presentan una inmadurez fisiológica. Hay una producción defectuosa y una migración disminuida de polimorfonucleares al foco infeccioso. Hay una capacidad disminuida de la “stem cell” para responder a las demandas de la infección. Además, la producción de factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) por monocitos está disminuida. También se ha invocado déficit funcionales intrínsecos de los PMN del recién nacido. Estos pueden presentar defectos en adherencia, agregación, migración, fagocitosis y funciones microbicidas. Esto se ha asociado con déficit de maduración que se expresa en alteración de la

transducción de señales, disminución en la expresión de receptores en la superficie celular, alteración de la estructura del citoesqueleto y disminución en la producción de intermediarios reactivos del oxígeno. En los recién nacidos también se ha descrito deficiencia de regulación de expresión de moléculas de adhesión (selectinas e integrinas) en PMN lo que podría explicar la falla relativa de estas células para formar el infiltrado inflamatorio.

Los monocitos en el recién nacido son semejantes a los de los adultos en cantidad, capacidad fagocítica, capacidad microbicida, perfil enzimático y propiedades migratorias al azar. Son funcionalmente deficientes en relación con la activación de LT y en presentación antigénica de aloantígenos y antígenos virales. Los monocitos del recién nacido presentan menor capacidad de producción de IL-6 y TNF. Este hecho conlleva menor reactividad inflamatoria y menor respuesta febril en esta etapa de la vida. La adhesión de los monocitos está disminuida lo que incide en el reclutamiento de estas células al foco de infección.

La actividad de las células NK en los recién nacidos está disminuida con respecto al adulto. Responden menos a señales de activación exógenas.

Durante el período de lactante hay una maduración de los fagocitos y un aumento progresivo de las concentraciones de complemento.

6. FILOGENIA DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA

Los mecanismos de la inmunidad innata están presentes en todos los organismos en diferente forma. La defensa del huésped en invertebrados es mediada por células y moléculas que se parecen a los mecanismos efectores de la inmunidad innata de los organismos superiores.

Los invertebrados, por ejemplo, equinodermos, anélidos y artrópodos, poseen barreras defensivas físico químicas, procesos de coagulación y cicatrización de heridas. La fagocitosis está presente en todos los invertebrados. Los equinodermos y artrópodos además poseen factores humorales defensivos naturales o inducibles y un sistema lítico análogo al complemento. En algunos invertebrados como esponjas, celenterados, anélidos, artrópodos, tunicados y equinodermos hay reacciones de reconocimiento de injertos alogénicos, limitadas y de corta duración. Los



mecanismos específicos y especializados propios de la inmunidad adquirida se encuentran sólo en vertebrados. No obstante lo anterior, existen semejanzas entre reconocimiento de patógenos, vías de señales y mecanismos efectores de inmunidad innata en animales inferiores y mamíferos lo que apunta a un ancestro común de estas defensas.

Recientemente, la inmunidad innata ha logrado despertar mayor interés en investigación ya que la permanencia de sus mecanismos en especies más evolucionadas que cuentan con el sistema de inmunidad adquirida, avala su eficacia en la primera línea de defensa, y conjuntamente con eliminar la infección, es capaz de estimular y orientar la respuesta inmune específica.

LECTURAS SUGERIDAS

Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S., **Cellular and molecular immunology**, Fourth edition, W B Saunders Company, Philadelphia, 2000.

Cotran, R.S.; Kumar V.; Robbins, S.L., **Pathologic basis of disease**, Fifth Edition, W B Saunders Company, Philadelphia, 1994.

Fearon, D.T.; Locksley, R.M., "The Instructive Role of Innate Immunity in the Acquired Immune Response", *Science*; 272 (15):50-54, 1996.

Gabay, C.; Kushner, I., "Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation", *New Engl J Med.*; 340 (6):448-454, 1999.

Galli, S.J.; Maurer, M.; Lantz, C.S., "Mast cells as sentinels of innate immunity", *Current Opinion in Immunology*; 11:53-59, 1999.

Hoffmann, J.A.; Kafatos F.C., Janeway C.A., Ezekowitz R.A.B., "Phylogenetic perspectives in innate immunity", *Science*; 284 (may 21):1313-1318, 1999.

Holt, P.G., "Postnatal maturation of immune competence during infancy and childhood", *Pediatr Allergy Immunol.*; 6:59-70, 1995.

Holland, S.M.; Gallin, J.I., "Evaluation of the patient with recurrent bacterial infections", *Annu Rev Med.*; 49:185-199, 1998.

Janeway, C.A.; Travers, P.; Walport, M.; Capra, J.D., **Immunobiology. The immune system in health and disease**, Fourth edition, Current Biology Publications, Elsevier Science Ltd./ Garland Publishing, London, 1999.

Jurlow, E., Ed. **Inflamación y reparación tisular**, Mediterráneo, Santiago, 1996.

Kopp, E.B.; Medzilitov, R., "The Toll-receptor family and control of innate immunity", *Current Opinion in Immunology*; 11:13-18, 1999.

Mackay, I.; Rosen, F.S.; Delves, P.J.; Roitt, I.M., "The immune system", *New Engl J Med*; 343 (1):37-49, 2000.

Ploegh, H.L., "Viral strategies of immune evasion", *Science*; 280 (10):248-253, 1998.

Rabb, H.; Bonventre, J.V., "Leukocyte Adhesion Molecules in Transplantation", *Am J Med.* 1999; 107:157-165.

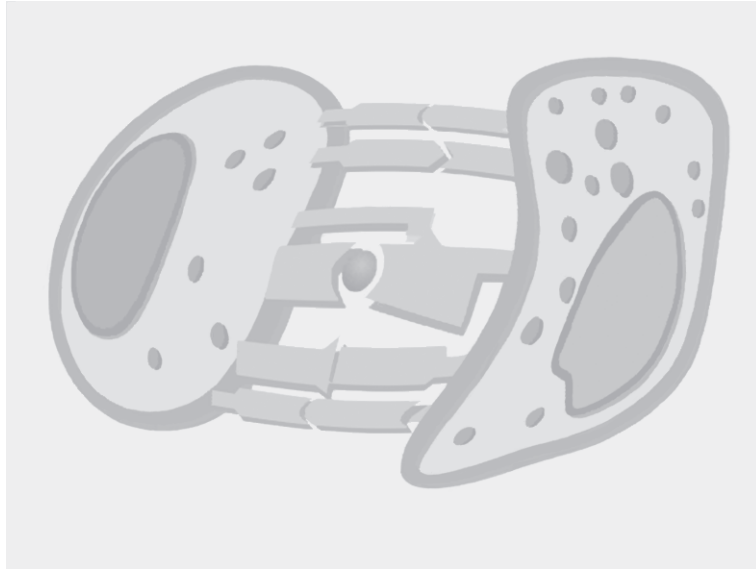
Yang K.D.; Hill, H.R., "Immune responses to infectious diseases: an evolutionary perspective", *Pediatr Infect Dis J.*; 15 (4):355-364, 1996.



Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

SECCIÓN II

ESPECIFICIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE







Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 5

ANTÍGENOS

María Inés Becker C. y Alfredo De Ioannes I.

- | | |
|--|---|
| 1. Introducción | 4.2. Carbohidratos |
| 2. Conceptos generales | 4.3. Lípidos |
| 2.1. Antígeno | 4.4. Ácidos nucleicos |
| 2.2. Inmunogenicidad y antigenicidad | 5. Clasificación de los antígenos según las células inmunes involucradas en la respuesta |
| 2.3. Determinante antigénico | 5.1. Antígenos timo-dependientes |
| 2.4. Haptenos | 5.2. Antígenos timo-independientes |
| 3. Características del antígeno que lo hacen inmunogénico | 6. Clasificación general de los antígenos según su función |
| 3.1. Tamaño | 6.1. Antígenos de trasplante |
| 3.2. Presencia de grupos químicos activos | 6.2. Antígenos tumorales |
| 3.3. Conformación espacial de los epítomos | 6.3. Autoantígenos |
| 3.4. Movilidad atómica | 6.4. Antígenos de diferenciación |
| 4. Naturaleza química de los antígenos | 6.5. Superantígenos |
| 4.1. Proteínas | 6.6. Alergenos |





RESUMEN

Los antígenos son compuestos de diversa naturaleza química –provenientes del medio o generados por el propio organismo– que son capaces de inducir una respuesta inmunológica en los vertebrados, propiedad denominada inmunogenicidad. La interacción del antígeno con los productos de la respuesta inmune y especialmente, con los anticuerpos –propiedad denominada antigenicidad– ha permitido conocer la estructura y función de numerosos antígenos, demostrándose que los productos de la respuesta inmune interactúan con regiones específicas del antígeno, denominadas epítomos, los cuales pueden corresponder a una secuencia aminoacídica determinada (epítomos lineales) o a un arreglo espacial de la cadena polipeptídica (epítomos conformacionales).

Aunque la capacidad inmunogénica de un antígeno depende de su naturaleza química intrínseca (tamaño, forma, movilidad atómica, presencia de grupos químicos activos y residuos aromáticos) también está relacionada con la capacidad de respuesta del organismo y, en este sentido, son determinantes sus características genéticas y su historial inmunológico.

1. INTRODUCCIÓN

Los conceptos de antígeno e inmunógeno son tan antiguos como la inmunología. Inicialmente se asoció el concepto de vitalidad y patogenicidad a la capacidad de inducir una respuesta inmune protectora: los inmunólogos del siglo pasado se resistían a pensar que algo inerte e inocuo –esencialmente inútil– pudiera despertar una respuesta inmune. Esa línea de pensamiento asociaba a la microbiología como una disciplina secundaria, limitando el desarrollo de vacunas para la profilaxis de enfermedades graves que afectaban a la humanidad. Con el tiempo, la patogenicidad como requisito de la inmunogenicidad, cedió el paso al uso de cepas bacterianas atenuadas, o, simplemente se utilizaron microorganismos con reacción cruzada para inducir una protección efectiva, siendo el caso más notable el desarrollo de la vacuna para la viruela por Jener. La demostración por parte de Ehrlich y Von Behring que microorganismos muertos por fijación con formaldehído o por calentamiento eran inmunogénicos, fue un nuevo paso para acercarse a la esencia del reconocimiento inmunológico.

A principios de este siglo, se pudo inducir inmunidad protectora con fracciones de microorganismos, los toxoides, que son exotoxinas bacterianas inactivadas, demostrándose que los

conceptos de vitalidad y patogenicidad eran perfectamente dissociables de la inmunogenicidad, lo que determinó que la inmunología se independizara de la microbiología. Fue en esta época cuando Landsteiner, padre de la inmunoquímica, acuñó el concepto de determinante antigénico o epítomo y definió serológicamente los grupos sanguíneos humanos.

2. CONCEPTOS GENERALES

2.1. Antígeno

La definición de **antígeno** deriva de la esencia misma del sistema inmune: su capacidad para reconocer en forma específica, en una molécula, características que no son constituyentes normales del organismo, mediante la activación de linfocitos B o T.

Los antígenos pueden ser compuestos de diversa naturaleza química provenientes del medio, que se encuentran presentes en microorganismos, plantas, alimentos, fármacos y cosméticos, etc. Los antígenos también pueden ser compuestos que se generan en el organismo como resultado del metabolismo en el caso de la detoxificación de drogas, como resultado de una transformación neoplásica (antígenos tumorales) o como manifestación de enfermedades autoinmunes



(autoantígenos).

2.2. Inmunogenicidad y antigenicidad

Dos propiedades de un antígeno son inmunogenicidad y antigenicidad.

Cuando un antígeno induce una respuesta del sistema inmune se dice que es inmunogénico, propiedad que está íntimamente relacionada con la capacidad de estimular linfocitos T en el caso de las proteínas y con la actividad mitogénica de los polisacáridos en las células B. Aunque la capacidad inmunogénica de una molécula depende de varios factores intrínsecos relacionados con su estructura química, esta propiedad es la sumatoria de una serie de influencias que reflejan tanto el historial inmunológico del animal como los atributos genéticos de que éste dispone para reconocerlo como tal. Es decir: el repertorio de células B, la actividad de células T “helper” y células T supresoras, la red idiotipo-anti-idiotipo y el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) (ver capítulo 8).

Recientemente, se ha postulado que las moléculas, para ser inmunogénicas además de ser capaces de ser reconocidas por los receptores específicos, deberían generar señales de peligro para el sistema inmune por medio de receptores de la respuesta innata, como son los de la familia Toll, descritos inicialmente en *Drosophila melanogaster*, que reconocen estructuras más generales presentes en compuestos bacterianos como son el LPS por el receptor TLR4, péptido glicanos, lipoproteínas bacterianas y lipoarabino-mananos de micobacterias por el receptor TLR2. El DNA bacteriano con motif CpG es reconocido por TLR9. La estimulación de estos receptores finalmente converge en la activación del factor NFkB, que induce la expresión de genes defensivos y pro-inflamatorios en células claves de la respuesta innata. Por esta razón, la incorporación de bacterias o productos de ellas en los adyuvantes para aumentar la inmunogenicidad de proteínas, tiene como fundamento la estimulación de células accesorias del sistema inmune.

El término **antigenicidad** se refiere a la capacidad de interacción de un antígeno con los productos de una respuesta inmune, ya sea con anticuerpos o con células T. Aunque muchos de los conceptos definidos aquí han surgido del estudio de la reacción antígeno-anti-

cuerpo, también pueden ser aplicados a la relación del antígeno con receptores específicos de las células T. Sin embargo, a los fragmentos peptídicos presentados clásicamente por los MHC a los Receptores de células T (TCR), se han agregado lípidos y glicolípidos presentes en micobacterias que son presentados por CD1.

En resumen, gran parte del conocimiento disponible sobre la estructura y función de numerosos antígenos se debe a que ha sido posible desarrollar anticuerpos específicos contra ellos; esto ha permitido estudiar las regiones del antígeno con las cuales dichos anticuerpos interactúan y también ha hecho posible comprender las condiciones y mecanismos fisicoquímicos que gobiernan esta interacción.

2.3. Determinante antigénico

El lugar de reconocimiento específico de los anticuerpos en el antígeno se denomina **determinante antigénico** o **epítopo**. En general, los epítopos presentes en proteínas y macromoléculas corresponden a zonas flexibles que poseen grupos químicos ricos en posibilidades de interacción con el sitio activo de los anticuerpos. Como se verá más adelante, la presencia de grupos aromáticos y de regiones con alta movilidad atómica es determinante en la interacción antígeno-anticuerpo.

Los antígenos proteicos pueden contener uno o más determinantes antigénicos diferentes -a menos que la proteína tenga subunidades o segmentos repetidos- y, en teoría, cada uno de ellos puede interactuar con un anticuerpo.

La observación que los anticuerpos producidos contra una proteína nativa a menudo no reaccionan con la proteína desnaturalizada, llevó a definir dos clases de determinantes antigénicos: los de tipo **lineal o secuencial** y los de tipo **conformacional o discontinuo**, como lo ilustra la figura 5-1, utilizando la proteína lisozima como modelo.

Los determinantes lineales, derivan de la estructura primaria de la proteína; corresponden a epítopos formados por aminoácidos adyacentes en la secuencia polipeptídica, y se calcula que el tamaño necesario de un epítopo para unir un anticuerpo específico es de unos seis aminoácidos de longitud. Estos epítopos se localizan en la superficie o en una región extendida de la molécula. Si los determinantes lineales se encuentran al inte-

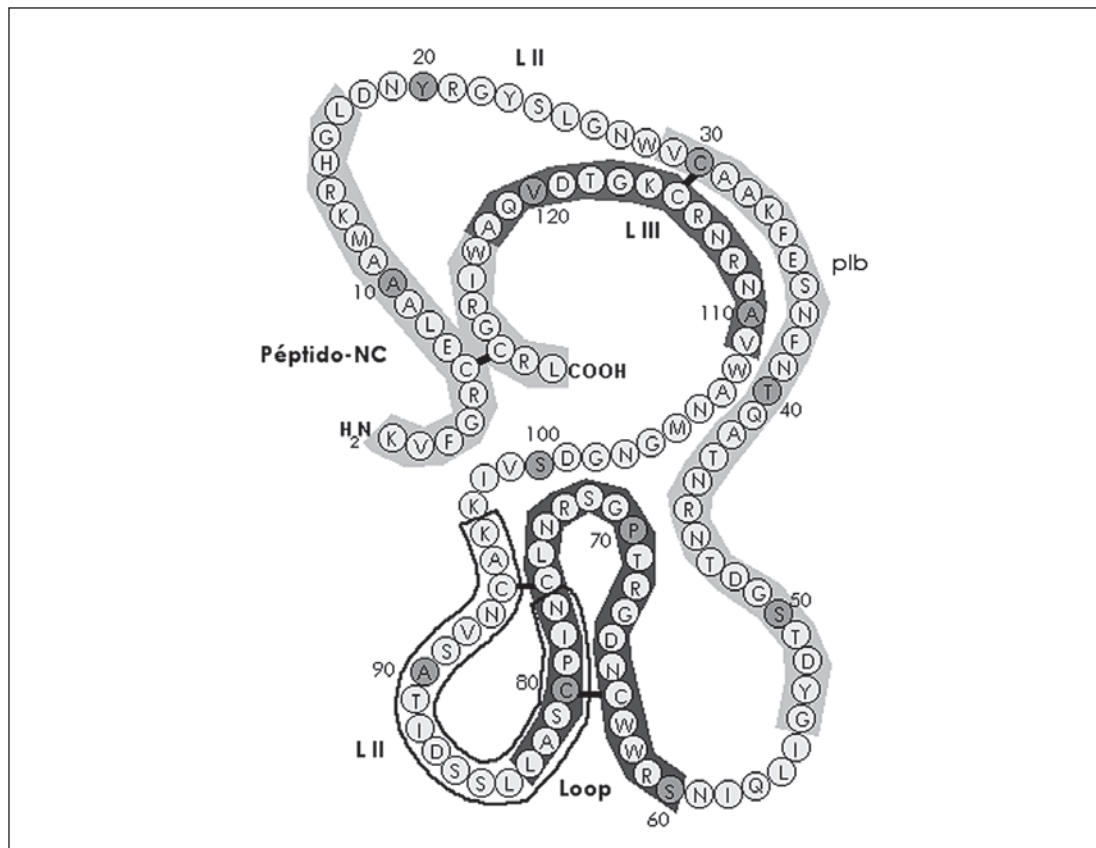


Figura 5-1. Estructura antigénica de la lisozima de huevo de pollo. La lisozima es una pequeña proteína globular cuya estructura primaria consiste en una cadena polipeptídica de 129 aminoácidos unida por cuatro puentes disulfuro. Estudios cristalográficos apoyados con antisueros convencionales de cabra y conejo y anticuerpos monoclonales murinos, han permitido definir en su estructura antigénica 8 péptidos principales denominados de la siguiente forma: N-C; LII, plb; una región continua entre los aminoácidos 34 y 54 dentro de plb; péptido 8; región del “loop” (asa) entre los residuos 60 a 83; “loop” II y “loop” III. Para determinar la importancia de diferentes aminoácidos en la unión de los anticuerpos, se han realizado estudios con anticuerpos dirigidos contra la región del “loop” (la más inmunogénica, junto con el péptido N-C) utilizando lisozima obtenida de huevos de diferentes aves, péptidos derivados de la proteína nativa y péptidos sintéticos en que algunos aminoácidos han sido modificados. Los resultados demuestran claramente que no todos los aminoácidos de esta región contribuyen a la antigenicidad de este péptido, siendo la arginina que se encuentran en la posición 68, el requerimiento principal para la unión de los anticuerpos. Se ha demostrado que la antigenicidad de esta molécula depende de su estructura conformacional intacta, puesto que existe muy poca reacción cruzada entre lisozima nativa y desnaturalizada.

rior de la proteína, es necesario desnaturalizarla para hacer accesibles los anticuerpos.

Los determinantes conformacionales corresponden a epítopos derivados del arreglo espacial o plegamiento de la cadena peptídica; es decir, dependen de la estructura secundaria y terciaria de la proteína, siendo en ciertos casos estabilizados por puentes disulfuro.

Con ayuda de los anticuerpos monoclonales (ver capítulo 44) -una de cuyas propiedades más poderosas es que se unen a un sólo epítipo del antígeno- se ha logrado conocer la estructura antigénica completa de algunas proteínas globulares, que han sido utilizadas como antígenos modelo. Entre ellas se encuentran la mioglobina,

la lisozima, el citocromo c y la albúmina del suero. Los estudios con estas proteínas han permitido definir los siguientes conceptos sobre la estructura antigénica de las proteínas: (a) prácticamente toda la superficie de una proteína puede ser inmunogénica y antigénica a la vez y puede incluir múltiples determinantes antigénicos a menudo sobrepuestos. (b) muchos sitios antigénicos presentan un arreglo tridimensional de residuos de aminoácidos que requieren la conformación nativa de la proteína, para su integridad antigénica. c) en un antígeno dado, los determinantes potencialmente inmunogénicos varían de una especie a otra y dependen tanto de las diferencias estructurales entre el antígeno y las proteínas propias del



huésped como de los mecanismos que regulan las interacciones entre las diferentes subpoblaciones celulares que desarrollan la respuesta inmune.

De tal modo, se puede decir que en algunas proteínas los epítomos están suficientemente separados como para unir anticuerpos específicos sin interferirse; pero, algunas moléculas tienen epítomos sobrepuestos y, a menudo, la unión del primer anticuerpo puede interferir estéricamente con la unión de otro anticuerpo. Además hay casos de epítomos que se exponen a raíz de un cambio conformacional producido por la unión de un anticuerpo a otro epítomo de la molécula. Finalmente, se pueden producir **neoeptótopos** como resultado, por ejemplo, del tratamiento de una proteína con proteasas.

Cabe destacar que el conjunto de anticuerpos que predominan después de una inmunización con una proteína nativa, no es igual al repertorio potencial total del animal. Ciertas secuencias y a veces residuos individuales sobre la superficie de la proteína, pueden identificarse como inmunodominantes: son aquellos a los cuales se dirige la mayor parte de la respuesta inmune. Esto puede deberse a propiedades estructurales especiales intrínsecas de esa región y a factores genéticos propios del animal.

El elemento estructural del determinante antigénico que se proyecta distalmente desde la masa central del antígeno y, que aporta mayor cantidad de energía libre para la interacción con el anticuerpo, se denomina **grupo inmunodominante** y determina la especificidad del anticuerpo. Este concepto surgió de los estudios para determinar las fuerzas responsables de la estabilidad de la unión antígeno-anticuerpo. Dado que ellas afectan la especificidad de la unión, se puede afirmar lo siguiente: Los anticuerpos reaccionan más efectivamente con antígenos que estimulan su formación que con otros. Dentro de este contexto, se les designa como **antígenos homólogos**. Sin embargo, ocasionalmente, como resultado de una reacción cruzada, algunos anticuerpos reaccionan con mayor afinidad con un **antígeno heterólogo** (antígeno diferente al que generó el anticuerpo) que con uno homólogo; es el caso de los anticuerpos denominados heteroclíticos.

2.4. Haptenos

No todas las moléculas son inmunogénicas; por ejemplo, numerosas sustancias pequeñas de

masa molecular inferior a 5 kDa (alergenos, drogas, mono u oligosacáridos y oligopéptidos) sólo pueden actuar como inmunógenos al ser acopladas químicamente a macromoléculas de inmunogenicidad probada, que funcionan como transportadoras; son los denominados **haptenos**.

La base del concepto de la íntima relación de la respuesta inmune a un antígeno con su estructura química, fue planteada por Landsteiner a principios del siglo XX. Este investigador acopló varios haptenos a diferentes proteínas transportadoras y demostró que los anticuerpos producidos contra estas proteínas conjugadas artificialmente, exhibían reacciones específicas con los grupos introducidos (figura 5-2). Debido a que también se formaban anticuerpos contra la proteína transportadora, para evidenciar la antigenicidad del hapteno, fue preciso emplear antígenos de prueba, en los que el mismo hapteno estaba acoplado a una proteína no relacionada.

Cuando se desarrollan anticuerpos policlonales o monoclonales contra un hapteno, se observa que, en gran parte de ellos, el reconocimiento del hapteno depende total o parcialmente de nuevas estructuras, generadas por el tipo de enlace químico aportado por el agente acoplante. Este hecho tiene gran trascendencia: si los anticuerpos están destinados a reconocer el hapteno en solución como en el caso de un RIA o un ELISA de competencia (ver capítulo 40), la única forma para que esto ocurra será modificando el hapteno con el mismo compuesto utilizado para acoplarlo a la proteína transportadora.

En conclusión, los haptenos no inducen la producción de anticuerpos pero sí son capaces de reaccionar específicamente con ellos, ofreciendo al inmunólogo un modelo excepcional para investigar los mecanismos de la reacción antígeno-anticuerpo, ya que la estructura de por lo menos uno de los reactivos, el hapteno, es conocida.

3. CARACTERÍSTICAS DEL ANTÍGENO QUE LO HACEN INMUNOGENICO

Como se ha mencionado, existen varios factores que influyen en la inmunogenicidad de una proteína. Algunos son de carácter intrínseco y tienen que ver con su propia naturaleza química, lo que determina su hidrofiliidad y su flexibilidad. En cambio, otros factores son extrínsecos y están relacionados con la capacidad de respuesta del ani-




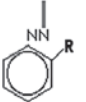
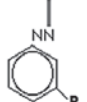
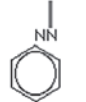

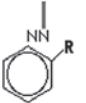
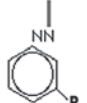
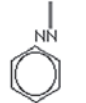
A			
ANTISUERO CONTRA: Globulina de caballo—NN— 			
ENSAYO CON ANTIGENO: Globulina de pollo substituida con:			
			
	orto	meta	para
R= SO ₃ ⁻	++	++	±
R=AsO ₃ H ⁻	-	+	-
R=COO ⁻	-	±	-
B			
ANTISUERO CONTRA: Globulina de caballo—NN— 			
ENSAYO CON ANTIGENO: Globulina de pollo substituida con:			
			
	orto	meta	para
R= CH ₃	++	++	++
R= Cl	+	++	++
R= NO ₂	±	+	++

Figura 5-2. Efecto sobre la reacción antígeno-anticuerpo de la posición y naturaleza de grupos hapténicos substituidos en una proteína transportadora. Landsteiner desarrolló antisueros de conejo específicos contra globulina de suero de caballo substituida con haptenos como sulfonato de m-aminobenceno (**A**) y p-azotoluidina (**B**). Luego estudió, mediante reacciones de precipitación, el efecto que producían sobre la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, modificaciones de la posición y naturaleza de los grupos hapténicos substituidos en globulina de pollo. La intensidad de la reacción observada (cantidad de precipitado) se señala en una escala arbitraria que va desde 0 a dos cruces (++). La reacción con el hapteno homólogo se destaca en negrita.

mal y con la dosis de antígeno: concentraciones muy pequeñas no producen estimulación de la respuesta inmune y concentraciones muy elevadas pueden inhibirla.

En la última década, con el desarrollo de la tecnología de péptidos sintéticos, se ha identificado las propiedades de una molécula que inciden directamente en su inmunogenicidad. Así, construyendo péptidos de un mismo aminoácido, péptidos que combinan las diferentes propiedades de los aminoácidos, péptidos lineales y ramificados, elaborados exclusivamente con la forma D o L de los aminoácidos o con mezclas de ambos, ha quedado en evidencia que, para la producción de anticuerpos es determinante la ramificación y arreglo espacial del péptido, la naturaleza levogira (L) de los aminoácidos y la presencia de aminoácidos con núcleos aromáticos.

3.1. Tamaño

Se sabe que las proteínas de masa molecular superior a 10 kDa son inmunogénicas. Sin embargo, algunas proteínas de menor masa, inoculadas con un coadyuvante apropiado, inducen la producción de anticuerpos; también ocurre lo inverso es decir existen proteínas de elevada masa molecular que no son buenos inmunógenos; es el caso de las histonas, las protaminas y la gelatina. Su falta de inmunogenicidad se explica en parte porque carecen de grupos químicos activos.

3.2. Presencia de grupos químicos activos

Ha quedado en evidencia que la inmunogenicidad de las proteínas depende de la presencia de ciertos grupos químicos activos, especialmente los de carácter polar.



La presencia en la superficie de las proteínas de aminoácidos con residuos aromáticos o con grupos cargados positivos (Lisina) o negativos (Glutámico y Aspártico) contribuye a aumentar su antigenicidad.

Otro aminoácido frecuentemente involucrado es Tirosina y un buen ejemplo de la importancia de este aminoácido es la proteína Nicrosina presente en invertebrados. El estudio cristalográfico de Nicrosina no revela en condiciones normales la presencia de una tirosina expuesta en la superficie; pero la síntesis de la proteína recombinante, en la que se introduce un cambio en el residuo de tirosina no expuesto, conduce a la pérdida de un epítipo. Un análisis de cristales de Nicrosina que incluyen el Fab de un anticuerpo monoclonal contra ella, muestra claramente que, a consecuencia de la interacción antígeno-anticuerpo, se produce un cambio conformacional en la proteína: la Tirosina emerge a la superficie y participa activamente en la interacción. Este ejemplo, pone de manifiesto la notable dinámica de la reacción antígeno-anticuerpo y la importancia de la movilidad atómica en la definición de un epítipo.

3.3. Conformación espacial de los epítipos

La palabra epítipo presupone que las regiones antigénicas corresponden a prominencias sobre la superficie de la molécula, lo cual es válido en muchos casos; pero también se ha descrito que pueden ser hondonadas de la superficie y que el sitio de unión del anticuerpo se introduce en la cavidad epitópica.

3.4. Movilidad atómica

Dado que el repertorio de receptores del sistema inmune humoral es finito y se genera durante el desarrollo embrionario de los vertebrados, antes de la exposición con los antígenos, la posibilidad de que una estructura antigénica se una a algún receptor depende de su capacidad de interactuar con cierta afinidad con un receptor preexistente. Por lo tanto, la flexibilidad de las estructuras antigénicas contribuye a su antigenicidad ya que les permite adaptarse a receptores preexistentes. Este fenómeno también se observa en las regiones hipervariables de los anticuerpos, que también presentan alta movilidad molecular.

4. NATURALEZA QUÍMICA DE LOS ANTÍGENOS

En general las proteínas son las moléculas más inmunogénicas y, en orden decreciente, les siguen los carbohidratos, los lípidos y los ácidos nucleicos.

4.1. Proteínas

Las proteínas son antígenos timo dependientes, es decir, en su reconocimiento participan linfocitos T y B. Debido a su gran complejidad estructural, puesto que además de estructura primaria, secundaria y terciaria, poseen múltiples epítipos, lo que las hace a la vez antigénicas e inmunogénicas. La agregación y la presencia de formas poliméricas aumentan la inmunogenicidad de las proteínas.

Para conocer la estructura antigénica de algunas proteínas, se ha usado la cristalografía y, sin duda, la herramienta más utilizada actualmente son los anticuerpos monoclonales, que han permitido realizar mapeos epitópicos precisos de numerosas proteínas modelo -como Lisosima, Mioglobina y Albúmina- y también de proteínas utilizadas en la formulación de vacunas para humanos, por ejemplo, el antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B y las proteínas de la cubierta del virus del SIDA.

El análisis antigénico de proteínas virales tiene gran relevancia, puesto que mediante síntesis peptídica, se cree que podrían construirse vacunas compuestas de aquellos péptidos que producen anticuerpos capaces de neutralizar la infectividad viral. Esta idea ha sido abordada experimentalmente con varios modelos, entre ellos se ha utilizado dos antígenos de superficie del virus de la influenza, denominados Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA). También este concepto se ha aplicado en el análisis de antígenos de patógenos como *Plasmodium falciparum* (agente causal de la malaria) y de *Trypanosoma cruzi* (agente causal de la Enfermedad de Chagas) que poseen mecanismos que les permiten evadir la respuesta inmune del hospedero; sin embargo, a la fecha no se tienen resultados plenamente satisfactorios.

Otro ejemplo de antígeno proteico es el sistema antigénico Rh de los glóbulos rojos. El sistema Rh es uno de los sistemas sanguíneos más polimórficos, ya que a la fecha se han descrito 47 antígenos diferentes, siendo comunes sólo cinco,



que se denominan: D, C, c, E y e (ver capítulo 26). El antígeno más importante de este sistema es el antígeno proteico D, ya que su tipificación determina que la sangre del paciente sea clasificada como Rh positiva (presencia del antígeno D) o negativa (ausencia del antígeno D). La proteína D está compuesta por 417 aminoácidos, tiene una masa molecular en torno a 30 kDa y no es glicosilada. Presenta 12 dominios transmembrana ricos en aminoácidos hidrofóbicos. La diferencia entre los antígenos D, difiere de C/c y E/e se basa en cambio de aminoácidos. El paso de eritrocitos fetales a la circulación materna puede inducir anticuerpos anti Rh (D+) en la madre cuando ésta carece de estos antígenos (ver capítulo 26).

4.2. Carbohidratos

Los determinantes antigénicos de numerosas sustancias de interés biológico, corresponden a carbohidratos que se encuentran en glicolípidos y glicoproteínas. Buenos ejemplos son el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram-negativas y el sistema de antígenos de grupo sanguíneo en humanos, como el sistema ABO.

LPS

La diversidad antigénica entre las especies de bacterias Gram negativas, reside en las diferencias estructurales de los componentes del LPS, antiguamente denominado endotoxina, porque estaba unido a la célula y tenía carácter termoestable. El LPS es el principal blanco de la respuesta inmune humoral contra este tipo de patógenos.

La estructura química del LPS puede dividirse en tres regiones: el polisacárido O-específico, que también actúa como sitio receptor para algunos bacteriófagos y confiere la especificidad serológica; el polisacárido central, que contiene ácido 2-ceto-3-desoxioctónico (KDO) y heptosa, que son compuestos exclusivos de bacterias; y, finalmente, el lípido A (región III) donde reside la toxicidad.

Sistema ABO

En humanos, se conocen actualmente 19 sistemas de grupos sanguíneos, que suman más de 200 antígenos. Sin embargo, dos de ellos el sistema ABO y el sistema Rh, son los de mayor importancia clínica desde el punto de vista transfusional,

en trasplantes y en otros procesos patológicos (ver capítulo 26).

El sistema ABO fue descrito a principio de este siglo por Landsteiner, quien descubrió que el suero de dadores humanos normales aglutinaba a los eritrocitos de otros dadores. Al analizar el patrón de reacciones, definió los principales antígenos de este sistema como A, B y O, que corresponden a determinantes antigénicos de naturaleza oligosacárida. Los antígenos del sistema ABO se heredan en forma autosómica, siendo los genes A y B codominantes entre sí y dominantes sobre O.

El sistema ABO se caracteriza por su ubicuidad, puesto que los antígenos están presentes en alta densidad sobre la superficie de los eritrocitos y células epiteliales y también se reconocen en numerosas secreciones como la saliva, leche, y mucosa gástrica, entre otras. Los antígenos del sistema ABO se caracterizan también porque en un individuo existe la presencia natural de anticuerpos IgM contra el producto de el o los alelos que él no posee. La formación de estos anticuerpos se explica en parte, por la ubicuidad de este tipo de oligosacáridos, ya que también se encuentran antígenos muy similares en la pared de numerosas bacterias, algunas de las cuales se localizan en la flora normal del intestino. Por otra parte, también se postula que se formarían como consecuencia del paso de eritrocitos maternos a la circulación fetal en el momento del parto.

El conocimiento de la estructura química de los antígenos ABO se facilitó enormemente por el hecho que los determinantes antigénicos corresponden a oligosacáridos, que pueden ser preparados mediante síntesis química. Por lo tanto, fue posible utilizarlos en estudios de inhibición de la aglutinación de eritrocitos por haptenos. Posteriormente, se realizó un avance enorme con el advenimiento de los anticuerpos monoclonales, puesto que permitieron realizar una fina disección de los diferentes tipos de cadenas oligosacáridas presentes en cada grupo.

Desde el punto de vista bioquímico, los antígenos del sistema ABO están constituidos por cadenas de oligosacáridas, formadas por azúcares unidos por enlaces a (1-2 ó 1-4) b (1-3), producto de la acción de glicosiltransferasas -del tipo fucosil, N-acetil y galactosil transferasas- que actúan sobre un sustrato tetrasacárido denominado paraglobósido. Este posee una galactosa como residuo terminal, unida por enlace b (1-3) o b (1-4), según se trate de un tetrasacárido tipo I (en



antígenos secretados) o tipo 2 (sobre eritrocitos), respectivamente. Posteriormente, sobre la galactosa terminal actúa una fucosiltransferasa denominada H, que le adiciona una fucosa por enlace a (1-2). De esta forma, se completa una cadena denominada antígeno H, que está presente en la membrana plasmática de todos los eritrocitos, anclada vía una proteína integral de membrana denominada Banda 3 (figura 5-3).

La especificidad antigénica en los individuos del grupo A, está dada por la adición de N-acetilgalactosamina a la sustancia H y, en los individuos del grupo B, por la adición de galactosa, azúcares que constituyen el grupo inmunodominante de los determinantes antigénicos A y B, respectivamente. Los individuos del grupo O sólo poseen el antígeno H.

Es importante destacar que dentro de cada grupo existen variaciones: son los subgrupos de A y B, que reflejan diferencias cuantitativas, según el número de epítomos presentes en la superficie del eritrocito y cualitativas, según el largo y ramificación de las cadenas oligosacáridas.

4.3. Lípidos

Los lípidos son, en general, poco inmunogénicos, fundamentalmente por su poca solubilidad en agua; sin embargo, al unirse a proteínas, algunos pueden generar epítomos. En el caso de lípidos compuestos, como los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas, la fracción lipídica participa activamente en la mitogenicidad de estas sustancias.

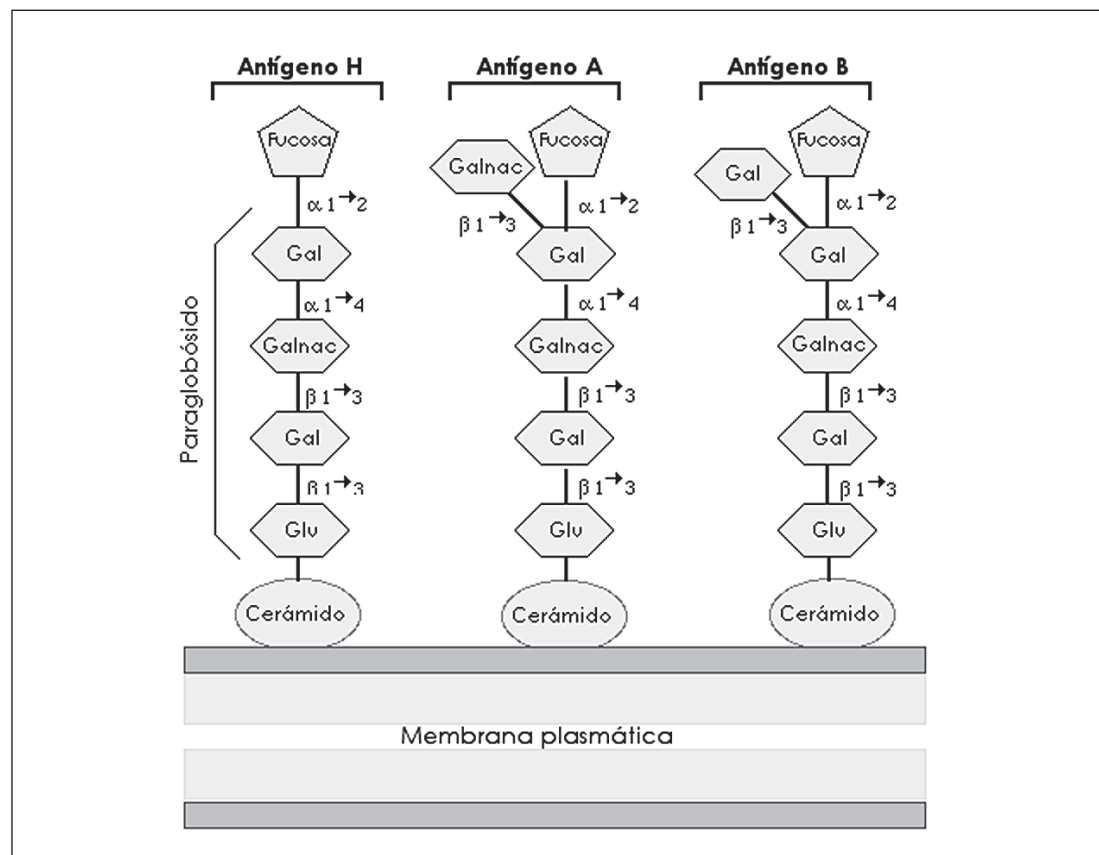


Figura 5-3. Estructura de los antígenos ABO de grupo sanguíneo humano. Los antígenos ABO tienen estructura de tipo carbohidrato y están presentes en numerosos tejidos, siendo sintetizados bajo el control de varios genes que codifican para glicosiltransferasas. Se pueden expresar de diferentes formas: como oligosacáridos en la orina, como glicoproteínas en las secreciones y fluidos corporales y como glicolípidos en las membranas de numerosas células. El compuesto básico inicial desde el cual crecen las cadenas oligosacáridas que conforman los antígenos ABO, es un compuesto de tipo cerámido (formado por una molécula de glucosa y galactosa) que está anclado a un glicolípido. Sobre el paraglobosido actúa una transferasa que agrega una fucosa (Fuc) en el azúcar terminal, formándose de esta forma el producto denominado sustancia H, que posteriormente es convertida en sustancia A o B por la apropiada adición de una molécula de N-acetilgalactosamina (Galnac) o galactosa (Gal) respectivamente. (Glu), glucosa.



4.4. Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son poco inmunogénicos ya que para inducir anticuerpos requieren ser conjugados a proteínas inmunogénicas. Sin embargo, en varias patologías de tipo autoinmune -en que componentes normales del organismo pasan a ser autoantígenos- es frecuente observar la presencia de anticuerpos anti-DNA, actividad que ayuda al diagnóstico de las enfermedades. De hecho, existen anticuerpos que reconocen diferentes formas de DNA como el denominado tipo Z, entre otros.

5. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS SEGÚN LAS CÉLULAS INMUNES INVOLUCRADAS EN SU RECONOCIMIENTO

5.1. Antígenos timo-dependientes

Abundante evidencia experimental muestra que la producción de anticuerpos por las células B contra numerosos antígenos y especialmente para los de naturaleza proteica requiere de la ayuda de células T, de ahí que se los denomine **antígenos timo-dependientes**. En la década de los 60, dos grupos de investigadores, Miller y Mitchell en Australia y Claman en Denver, demostraron que animales deficientes en células T, por timectomía neonatal eran incapaces de producir anticuerpos contra antígenos proteicos; sin embargo, cuando se reconstituían con células tímicas, esta capacidad se restauraba. Estudios posteriores revelaron que la capacidad de ayuda de las células T corresponde a una subpoblación de linfocitos T denominada T “helper” (LT CD4+).

Los antígenos timo-dependientes provocan respuestas primarias caracterizadas por la síntesis de anticuerpos de la clase IgM, pero en exposiciones posteriores al antígeno maduran hacia IgG (suero) o IgA (secreciones) y células de memoria, a diferencia de las respuestas a los antígenos timo-independientes, que sólo estimulan la producción de anticuerpos de la clase IgM y muy pocas células de memoria.

5.2. Antígenos timo-independientes

Algunos antígenos, como los polisacáridos y lipopolisacáridos de bacterias, son capaces de activar linfocitos B sin la ayuda de linfocitos T “helper”; son los denominados **antígenos timo-**

independientes. Entre las propiedades que presentan estos antígenos podemos mencionar las siguientes: (a) Son moléculas de gran tamaño con epítopos repetidos, lo que les permite interactuar con múltiples receptores de la superficie, dando como resultado una reacción de alta avidez que induce el coronamiento (“capping”) de los mismos, (b) Son mitogénicos, es decir, inducen proliferación de los linfocitos B y (c) Pueden activar la vía alternativa del complemento.

6. CLASIFICACIÓN GENERAL DE LOS ANTÍGENOS SEGÚN SU FUNCIÓN

6.1. Antígenos de trasplante

El trasplante de tejido incompatible y la maternidad múltipara van acompañados de la inducción de altos títulos de anticuerpos que reconocen a los antígenos de histocompatibilidad, especialmente de Clase I. Esto se debe al alto polimorfismo genético de la cadena pesada de estas moléculas en la especie humana y en los animales superiores. Estos antisueros naturales, han sido una herramienta fundamental para entender las reglas que gobiernan la histocompatibilidad y prolongar la sobrevida de los trasplantes. Los antígenos o moléculas MHC de clase II son menos potentes en la inducción de anticuerpos y en la actualidad se usan técnicas de biología molecular para su tipificación.

6.2. Antígenos tumorales

Se han descrito numerosos anticuerpos monoclonales que son reactivos con antígenos que se expresan exclusivamente o, en mayor cantidad en células tumorales, por lo tanto son utilizados en diagnóstico clínico de humanos como marcadores de la presencia de células neoplásicas. Entre estos antígenos, se encuentran marcadores de melanoma, carcinoma colo-rectal, neuroblastoma, antígeno prostático y antígenos de leucemias linfáticas, entre otros.

6.3. Autoantígenos

Existen procesos patológicos en que el sistema inmunológico reconoce como antígenos componentes propios; son las denominadas enfermedades autoinmunes. Si bien pueden afectar cualquier órgano de un individuo, las más frecuentes



incluyen: la sustancia blanca del cerebro y la espina dorsal (Esclerosis múltiple); los revestimientos de las articulaciones (Artritis reumatoide); las células secretoras de la insulina (Diabetes mellitus juvenil). Otras enfermedades autoinmunitarias destruyen las conexiones entre nervios y músculos (miastenia gravis), producen ampollas en la piel (Pénfigo vulgar) o destruyen los riñones y otros órganos (Lupus eritematoso sistémico) (ver capítulo 23).

6.4. Antígenos de diferenciación

El término **antígeno de diferenciación** surge del uso de los anticuerpos como herramienta para identificar moléculas que se localizan en determinados tipos celulares o tejidos. Sin embargo, este término es ambiguo, porque se refiere tanto a los antígenos específicos de estado como los antígenos específicos de tejido.

Un antígeno que se reconoce exclusivamente durante una etapa del desarrollo embrionario de un organismo, pero que posteriormente no es reconocido en células terminalmente diferenciadas corresponde a un **antígeno específico de estado**; mientras que un antígeno reconocido en cierto tipo celular diferenciado, que sirve como marcador para distinguirlo de otro, es propiamente un **antígeno específico de tejido**. En esta última categoría se pueden incluir aquellos antígenos que reconocen en tipos celulares embrionarios, son los denominados **marcadores de linaje celular**.

6.5. Superantígenos

Se definen como superantígenos (Sags) numerosas proteínas de microorganismos bacterianos (estafilococos, estreptococos, micobacterias, y micoplasmas, entre otras) y virales (del tipo rabdovirus y retrovirus), que se unen a moléculas MHC clase II y que estimulan las células T predominantemente vía unión directa al dominio Vb del receptor de la célula T, fuera de la región de unión al antígeno (ver capítulo 7). Se les denomina Sags debido a que el número de células T involucradas en la respuesta inmune es mucho mayor que el de las células específicas a antígenos proteicos convencionales.

Los superantígenos de microorganismos están presentes en diferentes formas. En el caso de las bacterias, generalmente son proteínas secretadas como por ejemplo las enterotoxinas estafilocócicas; mientras que en el virus de la ra-

bia, el Sag se encuentra incluido en la partícula infecciosa como una proteína que encapsula el material nuclear. En el caso de algunos retrovirus, como el que produce tumores mamarios en algunas cepas endogámicas de ratón, se produce expresión de Sags después de la infección e integración del DNA proviral en el genoma del hospedero.

6.6. Alergenos

Los alergenos son antígenos capaces de provocar reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato (minutos después de su exposición) o retardado (días después del desafío antigénico) (ver capítulos 21 y 22). Desde el punto de vista bioquímico, los alergenos incluyen polisacáridos, proteínas y haptenos de origen sintético y naturales. En este último caso se incluye la sustancia exudada por el Litre, compuesto que pertenece a la familia de los urushioles, que incluyen especies como el *Poyson ivy*, *Poyson oak* y *Laca Japónica*, entre otros, que provocan severas alergias en humanos susceptibles.

El Litre es un árbol de la familia Anacardiaceae que causa una severa dermatitis de contacto en campistas, guardabosques, scouts, etc, que transitan por la zona central de Chile. Como resultado del metabolismo secundario de la planta, se produce un compuesto identificado como 3 pentadecyl-10-en catecol, que es el responsable de la alergia. Esta pequeña molécula es un clásico hapteno, es decir, sólo causa la alergia cuando se une a proteínas de la piel del huésped. A pesar de su potencia, no se ha descrito al alergeno del litre como un inductor de anticuerpos. La reacción alérgica es de tipo retardado, es decir los síntomas se comienzan a observar después de 24 horas de exposición al hapteno en un individuo ya sensibilizado y participan en ella células T CD8+. Las lesiones que provoca este alergeno son exudativas y presentan infiltración de macrófagos y monocitos.

Aunque este tipo de compuestos se conoce desde principios de este siglo, los mecanismos celulares y moleculares que conducen a esta alergia son poco conocidos. Se sabe que la cadena alifática es fundamental para la inmunogenicidad, porque solubiliza el alergeno en las membranas celulares; por otra parte, el anillo catecólico permite la reacción electrofílica con grupos amino de las proteínas de la piel, modificándolas (véase figura 5-4).

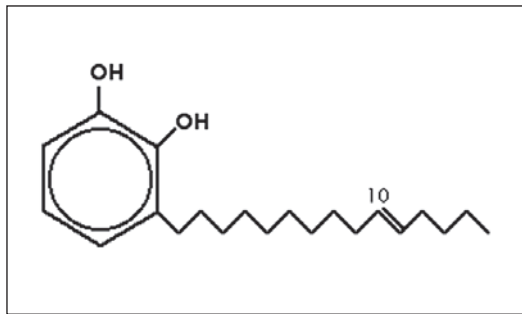


Figura 5-4. Estructura del compuesto activo del litre; 3-pentadecil (10-enil) catecol.

De esta forma, los péptidos modificados por el Litre emergen a la superficie de las células epidérmicas unidas a moléculas MHC de clase I y clase II, los cuales inician y desencadenan la reacción alérgica.

Debido a que los ratones de cepas utilizadas en experimentación también son sensibles al litre, han sido un modelo muy valioso en el estudio de los componentes celulares involucrados en la alergia provocada por este compuesto. La eliminación selectiva de subpoblaciones de linfocitos T con anticuerpo monoclonales específicos para cada una de ellas (anti-CD4+ ó anti-CD8+), ha mostrado que los linfocitos T CD4+ regulan esta respuesta en ratones y que los linfocitos T CD8+ son los efectores. Nuestro grupo de investigación también ha encontrado evidencia de que la cadena alifática se metaboliza intracelularmente, lo que sugiere que el producto final del litre que modifica las proteínas propias no sería el mismo que produce la planta.

Recientemente, se ha demostrado que los urushioles inhiben la respiración mitocondrial a nivel del Complejo III. Este fenómeno es específico, porque requiere la presencia de la estructura catecólica y de la cadena alifática, ya que pentadecil fenol y 3 metil catecol no ejercen una inhibición significativa en la respiración. El alérgeno del poison ivy, que posee tres veces más insaturaciones en la cadena alifática, es el inhibidor más potente de la respiración y el más alérgico en humanos. Estudios recientes en que se analiza la unión de Litreol marcado con ^3H en la cadena alifática a proteínas mitocondriales, muestran la aparición de proteínas marcadas específicamente de una masa molecular relativa en torno a 30 kDa, que se encuentran distribuidas en la membrana mitocondrial interna.

LECTURAS SUGERIDAS

Aderem, A., Ulevitch, R.J., "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response", *Nature*, 17, 782-787, 2000.

Barlow, D.J., Edwards, M.S., Thornton J.M., "Continuous and discontinuous protein antigenic determinants", *Nature*, 322: 747 – 748, 1986.

Benjamin C., Berzofsky J.A., East IJ., Gurd, FRN., Hannum, C., Leach SJ., Margoliash E., Michael JG., Miller A., Prager EM., Reichlin M., Sercarz EE., Smith-Gill SJ., Todd PE., Wilson AC. "The antigenic structure of proteins: A reappraisal", *Ann. Rev. Immunol*, 2: 67 – 101, 1984.

Berzofsky, J. A., Berkower, I.J., "Immunogenicity and antigen structure" en **Fundamental Immunology**, Editor: W. Paul, 4ª Edición, Raven Press, New York, pp. 651 – 700, 1999.

Davies, D.R., Padlan, E.A., "Antibody-antigen complexes", *Ann. Rev. Biochem*, 59: 439 – 473, 1990.

Janeway, C.A., Travers, P., Walpot, M., Capra, J.D., **Immuno Biology. The immune system in health and disease**. CB Current Biology Publications Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, 1999.

Landsteiner, K., Van der Scheer J., "Serological studies on azoproteins. Antigens containing azo components with aliphatic side chains", *J. Exp. Med.*, 59: 751 – 768, 1934.

Laver, W.G., Gillian, M.A., "Immune recognition of protein antigens" en **Current Communications in Molecular Biology**, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1985.

López C.B., Kalergis A.M., Becker M. I., Garbarino J.A., De Ioannes A.E., "Contact Dermatitis to the Urushiol Related Compound 3-pentadecyl (10 enyl) catechol is Mediated by CD8+ Cells and Regulated by CD4+ Cells in Mice", *J. Allergy and Immunology* 117: 194-201, 1998.



Moody, D.B., Ulrichs, T., Muhlecker, W., Young, D.C., Gurcha, S.S., Grant, E., Rosat J.P., Brenner, M.B., Costello, C.E., Besra, G.S., Porcelli, S.A., “CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in *Mycobacterium tuberculosis* infection”, *Nature*, 404, 884 – 888, 2000.

Palomo G., I., Pereira G., J., **Fisiopatología de las citopenias inmunes.** Editorial Universidad de Talca, 1995, Talca - Chile.

Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Paterson, Y., Olson, A.J., Lerner, R.A., “The atomic mobility component of protein antigenicity”, *Ann. Rev. Immunol.*, 3: 501- 535, 1985.



Capítulo 6

RECEPTOR DE LINFOCITOS B E INMUNOGLOBULINAS

Iván Palomo G., María Inés Becker C., Silvia Pierangeli y Ulises Vergara C.

1. **Introducción**
2. **Receptor de linfocitos B (BCR): Estructura y función**
 - 2.1. Inmunoglobulina de membrana
 - 2.2. Complejo Ig α /Ig β
3. **Linfocitos B y señales accesorias de coestimulación**
 - 3.1. Antígenos T-dependientes y antígenos T-independientes
 - 3.2. Co-Receptor CD21
4. **Subpoblaciones linfocitarias B1 y B2**
5. **Estructura y función de inmunoglobulinas**
 - 5.1. Estructura general
 - 5.2. Dominios de inmunoglobulinas y regiones hipervariables
 - 5.3. Variaciones isotípicas, alotípicas e idiotípicas
 - 5.3.1. Variaciones isotípicas
 - 5.3.2. Variaciones alotípicas
 - 5.3.3. Variaciones idiotípicas
 - 5.4. Clases y subclases de inmunoglobulinas
6. **Respuesta inmune humoral**
 - 6.1. Avidéz
 - 6.2. Afinidad
7. **Bases genéticas de la diversidad de inmunoglobulinas**
 - 7.1. Genes de inmunoglobulinas
 - 7.1.1. Genes de cadenas pesadas
 - 7.1.2. Genes de cadenas livianas
 - 7.2. Reordenamiento génico
 - 7.2.1. Reordenamiento de cadenas pesadas
 - 7.2.2. Reordenamiento de cadenas livianas
 - 7.2.3. Reordenamiento impreciso del DNA
 - 7.2.4. Diversificación de la región N
 - 7.2.5. Exclusión alélica
 - 7.2.6. Exclusión isotípica
 - 7.2.7. Cambio de clase de cadenas pesadas
 - 7.3. Hipermutación somática
 - 7.4. Control de la transcripción de los genes de inmunoglobulinas
 - 7.5. Estimación numérica de la diversidad de anticuerpos
8. **Edición del receptor linfocitario**
9. **Biosíntesis y ensamblaje de las inmunoglobulinas**





RESUMEN

La inmunidad específica humoral se asocia a linfocitos B y anticuerpos. Los aspectos más importantes que revisa este capítulo son: la estructura y función del Receptor de células B (BCR) y de inmunoglobulinas, y las bases genéticas de la diversidad de estas últimas.

El **BCR** es un complejo glicoproteico hetero-oligomérico transmembrana, que incluye dos subunidades: una inmunoglobulina de membrana (IgM o IgD) responsable del reconocimiento específico del antígeno y el complejo accesorio Ig- α /Ig- β , conservado en todos los linfocitos B y responsable de la transducción de señales de activación. Dependiendo de la naturaleza química del antígeno, la activación de los linfocitos B, requerirá señales accesorias de coestimulación, proporcionadas por el correceptor CD21 (CR2) y por linfocitos T “helper”.

Las **inmunoglobulinas** (Igs) son una familia de glicoproteínas estructuralmente relacionadas, presentes en la membrana de linfocitos B y en el suero y fluidos titulares. La unidad estructural básica de las inmunoglobulinas está dada por un monómero glicoproteico formado por cuatro cadenas polipeptídicas - dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) idénticas: IgG (2 γ , 2 κ ó 2 λ), IgM (2 μ , 2 κ ó 2 λ), IgA (2 α , 2 κ ó 2 λ), IgD (2 δ , 2 κ ó 2 λ) e IgE (2 ϵ , 2 κ ó 2 λ). Entre las regiones funcionales más importantes de la estructura de las Igs destacan la región de unión con el antígeno (Fab), ubicada en el extremo amino y el fragmento Fc que participa en funciones efectoras tales como: activación del sistema del complemento, activación de células fagocíticas, citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), inmunidad de mucosas, inmunidad neonatal, hipersensibilidad inmediata y regulación de la respuesta inmune.

Cada cadena, H y L, presenta sólo un dominio variable. Las cadenas H presentan 3 ó 4 dominios constantes y las cadenas L solamente un dominio constante.

La **variabilidad idiotípica de las Igs** se genera somáticamente en la médula ósea (en humano), durante un proceso de diferenciación que es independiente del antígeno y que permite que cada linfocito B esté provisto de un BCR único. El repertorio de estos receptores y por tanto de Igs secretadas, es generado al azar durante un proceso regulado de reordenamiento o recombinación de segmentos génicos V(D)J. En humanos, los genes para codificar las cadenas H, κ y λ , se encuentran en el cromosoma 14, 2 y 22, respectivamente. La variabilidad puede aumentar por otros mecanismos que serán descritos en el capítulo.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de una respuesta inmune humoral requiere la selección, activación y expansión clonal de linfocitos B individuales provistos de un receptor antígeno-específico (BCR: “B cell receptor”) anclado en su membrana plasmática. Esta habilidad de un individuo para responder virtualmente a cualquier antígeno, depende de la capacidad del sistema inmune para generar un repertorio muy grande de linfocitos, cada uno de los cuales expresa un receptor específico para un epítipo antigénico particular. Por otra parte, la naturaleza clonal del reconocimiento antigénico, constituye un elemento esencial de la respuesta inmune, puesto que aún cuando el sistema inmu-

ne puede reconocer una gran variedad de antígenos distintos, sólo aquellos clones linfocitarios con la especificidad apropiada para un epítipo del antígeno particular, serán expandidos por división celular.

El receptor de un linfocito B (BCR) es un complejo glicoproteico transmembrana que incluye una inmunoglobulina (Ig) de membrana propia de cada linfocito y responsable del reconocimiento específico del antígeno. Cuando un individuo es expuesto a un antígeno extraño, sólo aquellos linfocitos cuyo BCR es capaz de reconocer un epítipo antigénico, serán activados y expandidos para diferenciarse en linfocitos B de memoria o en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Las células plasmáticas producen



generalmente sólo un tipo de anticuerpo y éste siempre corresponde a la forma secretada o soluble de la Ig de membrana del linfocito B del cual deriva la célula plasmática. La forma de membrana de una Ig es un componente estructural y funcional del receptor BCR; su forma soluble o secretada constituye en cambio un anticuerpo, que conserva la especificidad por el antígeno y es además responsable de la función efectora de la respuesta inmune humoral: neutralización del antígeno, reclutamiento y activación de fagocitos, activación del sistema del complemento, reclutamiento y activación de células NK, macrófagos y otras células capaces de realizar citotoxicidad dependiente de anticuerpos.

La expresión de un receptor BCR responsable de la iniciación de una respuesta inmune contra diversos agentes infecciosos y otros antígenos, es uno de los eventos cruciales en el desarrollo de los linfocitos B. Durante este proceso, receptores antígeno-específicos únicos, son expresados por linfocitos individuales después del reordenamiento regulado de segmentos génicos para cadenas livianas y pesadas de una inmunoglobulina. La naturaleza azarosa del reordenamiento génico, acoplado a la mayor complejidad que se consigue con el apareamiento de cadenas pesadas y livianas crea una increíble diversidad en el repertorio linfocitario B. Aunque tal diversidad permite el reconocimiento de un gran número de proteínas extrañas, la independencia antigénica del reordenamiento génico inevitablemente conduce a la generación de linfocitos B autorreactivos. Para evitar la autoinmunidad inducida por la eventual activación de estas células autorreactivas, el sistema inmune debe poner en marcha mecanismos que le permitan inducir tolerancia a antígenos propios. Entre estos mecanismos se encuentran la eliminación por apoptosis de las células autorreactivas (delección clonal), la inhibición de su actividad (anergia clonal), o la edición de su receptor mediante un reordenamiento secundario de segmentos génicos para cadenas livianas, lo que conduce a modificar la especificidad del BCR autorreactivo.

Linfocitos B apropiadamente activados proliferan y luego diferencian en células plasmáticas o en células B de memoria. Durante este proceso de diferenciación los linfocitos B expresan estrategias únicas que llevan a diversificar aun más el repertorio de receptores BCR: (i) hipermutación somática que conduce a un aumento de la afinidad del receptor por su epítipo antigénico, (ii)

recombinación o reordenamiento génico, que conduce al "switching isotípico" o cambio de clase de la inmunoglobulina del BCR en linfocitos B de memoria, y (iii) reordenamientos génicos secundarios, que conducen a la edición del receptor.

En el presente capítulo se describe la estructura y función del receptor linfocitario B (BCR), las características estructurales y funcionales de las distintas clases de inmunoglobulina y los mecanismos genéticos que explican su diversidad y heterogeneidad: recombinación V(D)J, hipermutación, reordenamiento de clase y edición del receptor.

2. RECEPTOR DE LINFOCITOS B (BCR): ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

El receptor de los linfocitos B (BCR) es generado somáticamente durante la diferenciación linfocitaria, lo cual permite que cada célula B esté provista de un receptor único que no está codificado en el DNA germinal y no está predestinado a reconocer un antígeno extraño particular.

El repertorio linfocitario es generado al azar y, los linfocitos B cuyo receptor es capaz de reconocer un epítipo antigénico particular serán seleccionados para su proliferación y expansión clonal. La interacción BCR-antígeno inicia la transducción de señales bioquímicas que conducen a la activación, proliferación y diferenciación linfocitaria; además gatillan la internalización endocítica del complejo y el procesamiento y presentación de fragmentos antigénicos a linfocitos T-antígeno específicos, en aquellos casos en que el desarrollo de respuesta inmune requiere de colaboración de linfocitos T "helper" (LTh).

El BCR es un complejo glicoproteico heterooligomérico transmembrana, que incluye dos subunidades, estructural y funcionalmente distintas y no covalentemente unidas entre sí (figura 6-1). La primera subunidad corresponde a una inmunoglobulina (Ig) de membrana, que actúa como receptor clonotípico propio de cada linfocito y responsable del reconocimiento específico del antígeno. La segunda subunidad, denominada complejo accesorio Ig- α /Ig- β , es invariante o (conservado) en todos los linfocitos B y, responsable del transporte y expresión del receptor clonotípico en la membrana y de la transducción de señales de activación, luego de la interacción BCR-antígeno.

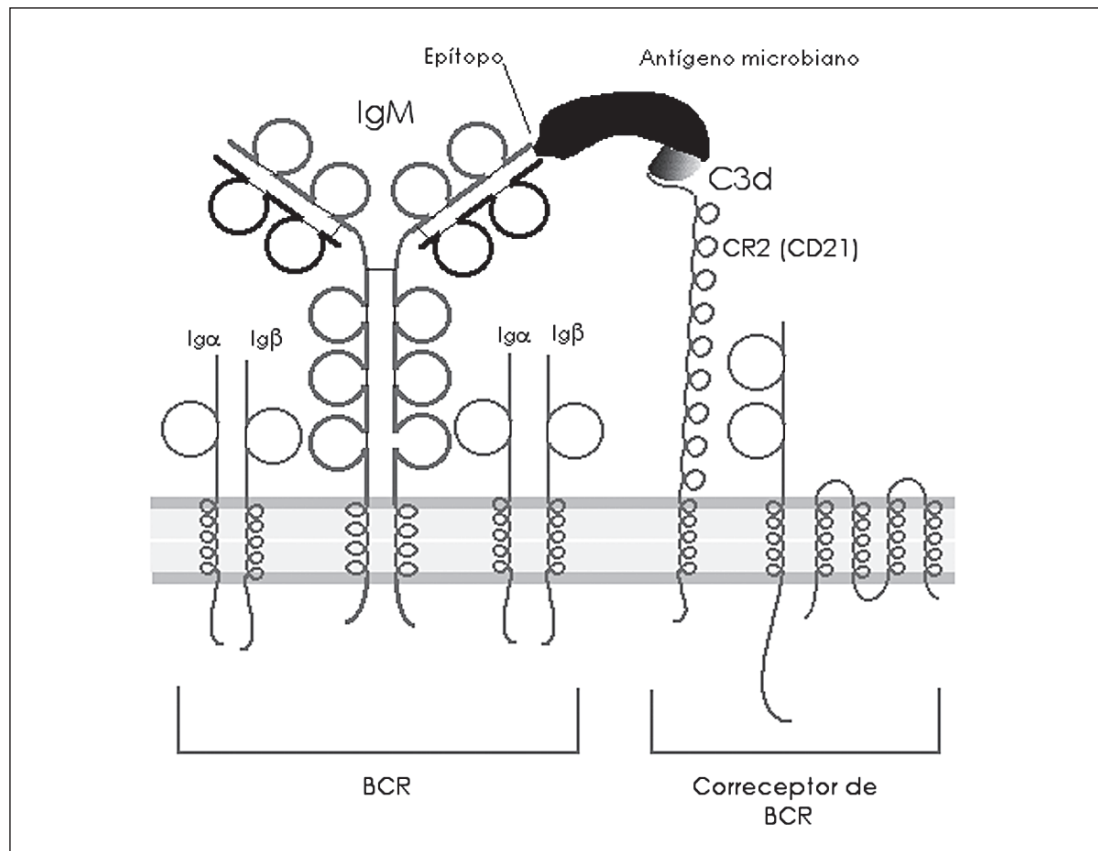


Figura 6-1. Estructura del receptor linfocitario BCR y del corresponsor CD21. El receptor de un linfocito B (BCR) está constituido por una Ig de membrana, responsable del reconocimiento específico del antígeno y por un complejo accesorio Ig- α /Ig- β , responsable del transporte y expresión del receptor BCR en la membrana y de la transducción de señales de activación, luego de la interacción BCR-antígeno. La proliferación y diferenciación de los linfocitos B, requiere además de señales accesorias de coestimulación proporcionadas por el corresponsor CD21. Mientras el receptor BCR reconoce al antígeno, el corresponsor reconoce C3d, que se ha unido al antígeno luego de la proteólisis enzimática parcial de C3 por activación del sistema del complemento durante el reconocimiento innato del antígeno. CD21 reconoce C3d y CD19 transduce luego las señales accesorias de coestimulación.

2.1. Inmunoglobulina de membrana

Todas las inmunoglobulinas, tanto de membrana como de secreción, tienen una estructura básica general constituida por 4 cadenas polipeptídicas: 2 cadenas pesadas (H, "heavy") idénticas entre sí y 2 cadenas livianas (L, "light"), también idénticas entre sí. Las cadenas pesadas y livianas se asocian de modo tal que forman una estructura simétrica compuesta por dos heterodímeros H/L idénticos y unidos covalentemente entre sí por uno o más puentes disulfuro (figura 6-2). De esta manera, en la estructura tetramérica básica de una Ig, la interacción entre las regiones variables aminoterminales de las cadenas H y L, forman dos sitios idénticos de combinación para el antígeno. La estructura de las Ig se describe en el punto 5 de este capítulo.

Así como la capacidad para unir antígeno reside, fundamentalmente, en la especificidad y afinidad de los sitios de combinación aminoterminales de una Ig, su eventual capacidad para activar mecanismos efectores de respuesta inmune, reside en la región constante carboxiterminal de las cadenas pesadas.

En la Ig de membrana, la región constante carboxiterminal de sus cadenas pesadas incluye una región hidrofóbica transmembrana de 25 aminoácidos, que no está presente en la Ig de secreción y es responsable del anclaje obligado de la Ig a la membrana plasmática de linfocitos B. La región carboxiterminal de las cadenas pesadas incluye además un dominio citoplasmático, cuya longitud varía entre los distintos isotipos de Ig de membrana (3 residuos aminoácidos en IgM y 28 residuos en IgG). El anclaje a la membrana

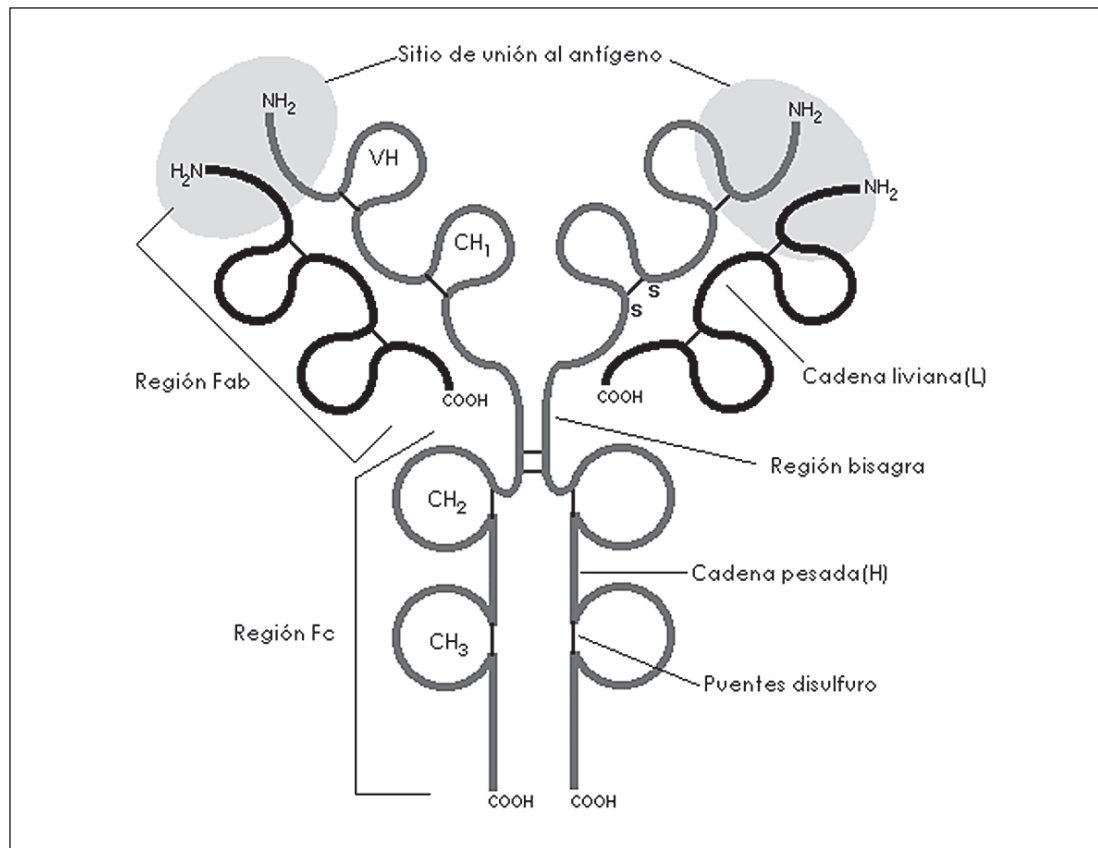


Figura 6-2. Los anticuerpos están constituidos por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) unidas por enlaces disulfuro (S-S) e interacciones no covalentes. Los dominios variables de 110 aminoácidos de cadenas pesadas y livianas forman el sitio de unión para el antígeno. Los dominios constantes (CH1 a CH3) determinan las funciones efectoras de un anticuerpo. Las cadenas pesadas de IgM e IgE, contienen un dominio constante adicional (CH4), que no existe en los otros isotipos inmunoglobulínicos.

impide que los dominios carboxiterminales de las cadenas pesadas estén disponibles para reclutar y activar mecanismos efectoras de respuesta inmune. Por lo tanto, una Ig de membrana es una molécula bivalente y monofuncional: tiene capacidad para unir específicamente el antígeno (mediante 2 sitios de combinación idénticos), pero carece de función efectora.

Los anticuerpos o Ig de secreción, que están presentes en el plasma y otros fluidos de un individuo, son en cambio moléculas bifuncionales: conservan la capacidad de unir el mismo antígeno, pero además los extremos libres carboxiterminales de sus cadenas pesadas tienen la capacidad de reclutar y activar mecanismos efectoras destinados a la eliminación del antígeno (fagocitosis, sistema del complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpos).

Variaciones estructurales en la región constante carboxiterminal de la cadena pesada, deter-

minan la existencia de 5 clases de cadena pesada, denominadas μ , δ , γ , α y ϵ . De esta manera, la asociación de una misma región variable a distintas regiones constantes pesadas, conduce a la producción de distintas clases o isotipos de Ig (IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente) que difieren en su capacidad para reclutar y activar distintos mecanismos efectoras de respuesta inmune humoral.

En su etapa final de maduración y previo al encuentro con el antígeno, los linfocitos B vírgenes expresan simultáneamente en su membrana receptores BCR que contienen IgM y receptores BCR que contienen IgD, ambos con idéntica especificidad y afinidad por el epítipo antigénico pero con distinta región constante en sus cadenas pesadas. Luego del primer encuentro con el antígeno, los linfocitos B vírgenes proliferan aumentando el número de linfocitos epítipo-específicos para el antígeno, los cuales se diferencian

luego en células plasmáticas (con la habilidad de sintetizar y secretar altos niveles de lo que será el repertorio primario de anticuerpos IgM), y en distintos linfocitos B de memoria que difieren en la clase de Ig de membrana que expresan como parte de su receptor BCR (figura 6-3).

Los linfocitos B de memoria, aún cuando conservan las cadenas livianas y las regiones variables de las cadenas pesadas de su receptor clonotípico (y por lo tanto, mantienen la especificidad por el mismo antígeno), han sufrido durante su diferenciación antígeno-dependiente: (i) un pro-

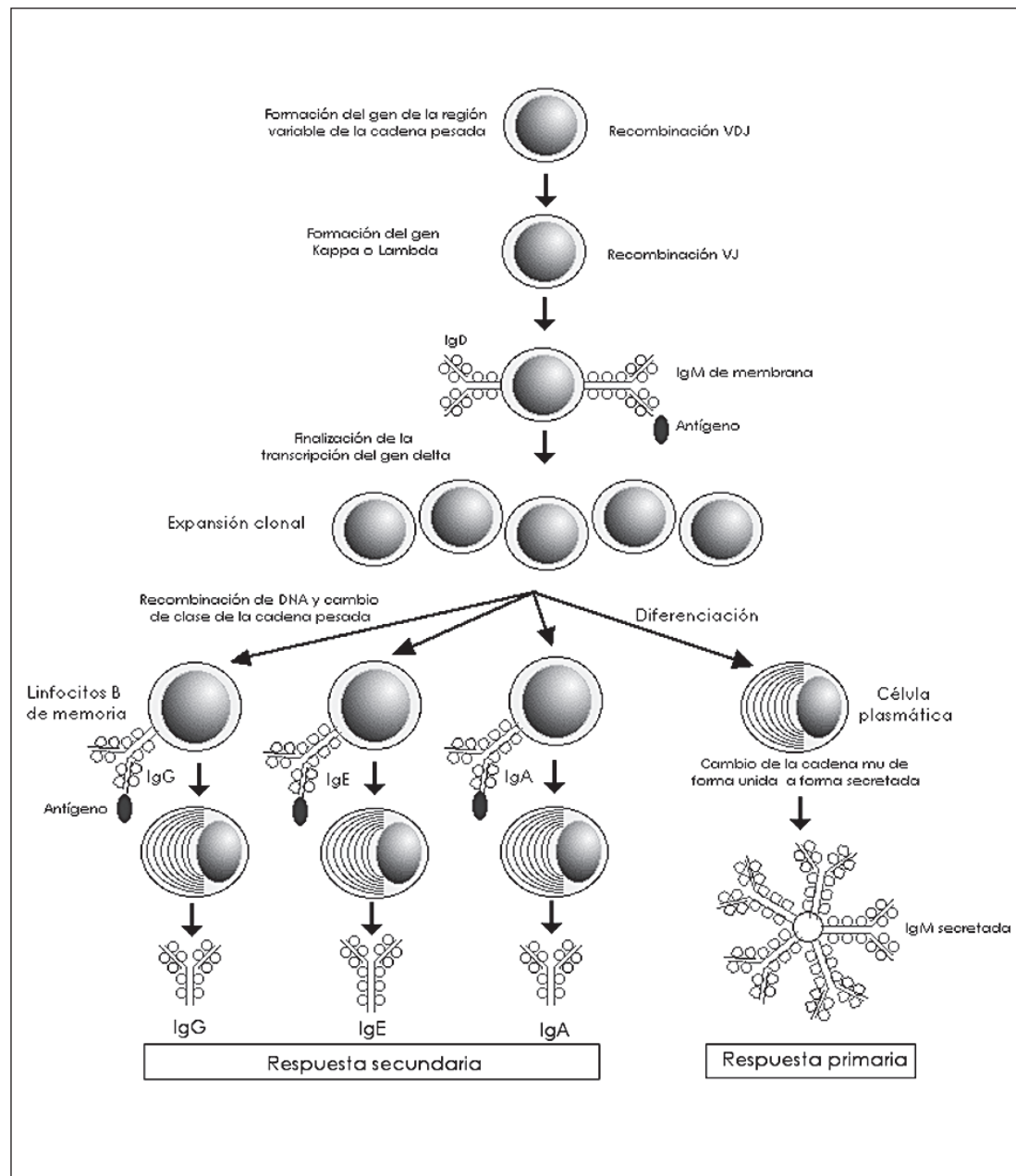


Figura 6-3. Diferenciación de células plasmáticas y de linfocitos B de memoria. Luego de la expansión clonal de linfocitos B vírgenes (gatillada por su encuentro con el antígeno), los linfocitos se diferenciarán en células plasmáticas responsables de la síntesis del repertorio primario de anticuerpos IgM, o en linfocitos B de memoria en los que se produce "switching" isotípico hacia IgG, IgA o IgE, y mutación somática que conduce a un aumento de afinidad por el mismo antígeno. Un encuentro posterior de cada linfocito B de memoria con el antígeno, gatillará la generación de células plasmáticas que sintetizarán los respectivos anticuerpos de clase IgG, IgA o IgE.



ceso de hipermutación somática, que conduce a una mayor afinidad por el antígeno, y (ii) un proceso de recombinación génica, que conduce a un cambio de la región constante pesada μ expresada en los linfocitos B vírgenes originales, por una región constante distinta (γ , α ó ϵ) en los linfocitos B de memoria.

Durante la diferenciación antígeno-independiente de linfocitos B (que ocurre en los órganos linfoides primarios), opera un mecanismo de filtro o de selección del receptor, que ha evolucionado para seleccionar sólo aquellos linfocitos cuyo BCR será más útil en el desarrollo de una respuesta inmune en la periferia (ver capítulo 13). Durante la diferenciación antígeno-dependiente (que ocurre en los centros germinales de los órganos linfoides periféricos), opera un mecanismo de selección que ha evolucionado para seleccionar aquellos linfocitos B de memoria que presentan mayor afinidad por el antígeno y que simultáneamente han realizado el “switching” isotípico o cambio de clase de la cadena pesada, para expresar IgG, IgA o IgE como parte de su receptor BCR (figura 6-3). En un siguiente encuentro con el antígeno, los linfocitos B de memoria se diferenciarán en células plasmáticas que secretarán la misma clase de inmunoglobulina expresada como parte del receptor BCR del linfocito B de memoria del cual derivan.

2.2. Complejo accesorio Ig- α /Ig- β

En los linfocitos B, las inmunoglobulinas recientemente sintetizadas son transportadas a la superficie celular sólo cuando están no covalentemente asociadas con las proteínas accesorias Ig- α (CD79a) e Ig- β (CD79b), que se encuentran como heterodímeros covalentemente unidos mediante puentes disulfuro. Los complejos BCR parcialmente ensamblados, en los que falta cualquiera de sus componentes polipeptídicos (cadenas H, L, Ig- α o Ig- β) son retenidos en el retículo con la participación de diversas chaperoninas (proteínas que ayudan a que los procesos intracelulares ocurran adecuadamente). Además de su participación en el ensamblaje y transporte del BCR, las cadenas Ig- α e Ig- β desempeñan un rol fundamental en la transducción de señales de activación en los primeros estados de diferenciación de los linfocitos B en los órganos linfoides primarios (hígado fetal, médula ósea o bolsa de Fabricio), y en la diferenciación de linfocitos B periféricos en los órganos linfoides

secundarios, luego del reconocimiento e interacción específica BCR-antígeno.

Ig- α e Ig- β son proteínas de 30 a 45 kDa (variaciones en el peso molecular obedece al grado de glicosilación de cada molécula), cuyo dominio transmembrana contiene grupos polares que pueden interactuar con grupos similares de la región transmembrana de la Ig del BCR. Las moléculas Ig- α e Ig- β presentan además, dominios extracelulares y dominios citoplasmáticos similares a los de las proteínas del complejo CD3 del receptor TCR de linfocitos T, y que funcionan de manera también similar en la transducción de señales de activación luego del encuentro con un antígeno que contiene epítopos reconocibles por el receptor linfocitario. La valencia, grado de agregación, concentración local y persistencia del antígeno parecen tener una importante influencia en la generación de las señales intracelulares que conducirán a la tolerancia por antígenos propios o la iniciación de una respuesta humoral contra antígenos extraños.

La unión del antígeno a la inmunoglobulina del receptor BCR, conduce a la fosforilación de los dominios citoplasmáticos de Ig- α (61 aminoácidos) y de Ig- β (48 aminoácidos) que contienen secuencias de 26 aminoácidos ricas en tirosina (ITAM: "Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs") y al reclutamiento y activación de diversas tirosina quinasas.

La evidencia experimental en ratones, sugiere que los individuos deficientes en la expresión de Ig- β muestran un desarrollo linfocitario B completamente bloqueado, en un estado equivalente al de CD44^{low} CD25⁺ del desarrollo linfocitario T. Los reordenamientos V_H hacia D_HJ_H están marcadamente reducidos, mientras los reordenamientos D_H a J_H ocurren normalmente (V, D, J se explica en punto 7 de este capítulo). De esta manera Ig- β parece involucrado en la iniciación del reordenamiento V_H hacia D_HJ_H , antes de funcionar como parte de la subunidad de transducción de señales en el receptor pre-BCR. Un ratón mutante que carece de la mayor parte del dominio citoplasmático de Ig- α , exhibe sólo un trastorno moderado en el desarrollo B temprano, aun cuando está casi completamente bloqueada la aparición de linfocitos B periféricos. Todo lo anterior indica que se requiere un heterodímero Ig- α /Ig- β intacto para el desarrollo y mantención de linfocitos B maduros en la periferia.

Por último, el modelo más ampliamente aceptado sobre la organización del receptor de



linfocitos B, sugiere que el BCR es un complejo proteico en el que la Ig de membrana está unida a dos heterodímeros Ig- α /Ig- β , uno a cada lado de la molécula (figura 6-1). Sin embargo, estudios recientes sugieren que en el complejo Ig-Ig- α /Ig- β , la molécula de Ig está asociada a un único heterodímero Ig- α /Ig- β y que, en la superficie celular, distintos BCR se asocian luego en oligómeros, en microdominios, regiones o "rafts" lipídicos ricos en colesterol y esfingolípidos.

3. Linfocitos B y señales accesorias de coestimulación

La activación de linfocitos B requiere la unión del antígeno a la Ig de membrana del receptor BCR. Sin embargo, la valencia, grado de agregación, concentración local y persistencia del antígeno, parecen tener una importante influencia en la generación de señales intracelulares que conducirán a la tolerancia por antígenos propios o la iniciación de una respuesta contra antígenos extraños. Por otro lado, dependiendo de la naturaleza química del antígeno, la entrada en el ciclo celular y la proliferación y diferenciación de los linfocitos B, requerirá señales accesorias de coestimulación, proporcionadas por el correceptor CD21 (CR2) y por LTh antígeno-específicos, que expresan moléculas coestimuladoras de membrana (CD40L, CD28) y liberan diversas citoquinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , TGF- β). Estas señales accesorias de coestimulación son indispensables para la inducción del "switching" isotípico y la hipermutación que conducen a la síntesis de anticuerpos con diversas funciones efectoras y mayor afinidad por el antígeno.

3.1. Antígenos T-dependientes y Antígenos T-independientes

La activación de linfocitos B puede ser T-dependiente o T-independiente, dependiendo de si requiere o no de señales accesorias de coestimulación proporcionada por LTh. Esta segunda señal de coestimulación puede ser proporcionada a través de CD40 que interactúa con su ligando CD40L (CD154) expresado en la membrana de linfocitos T activados y por B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) que se expresan en linfocitos B activados e interactúan con su ligando CD28, constitutivamente expresado en linfocitos T. Individuos que sufren el síndrome de hiper-IgM li-

gado al cromosoma X, representan un claro ejemplo de la importancia de las señales accesorias de coestimulación en la función de los linfocitos B (ver capítulo 30). En los pacientes con este síndrome (muy susceptibles a las infecciones piógenas), los niveles séricos de anticuerpos IgG, IgA e IgE son muy bajos y en circulación sólo expresan IgM, debido a que son incapaces de realizar "switching" isotípico, maduración de afinidad y generación de linfocitos B de memoria. Paradójicamente el síndrome de hiper-IgM ligado al cromosoma-X es más un defecto de los linfocitos T que de linfocitos B, ya que es consecuencia de una deficiente expresión de CD40L en LTh.

En la respuesta a antígenos T-dependientes, la interacción BCR-antígeno y la transducción de señales a través del complejo Ig- α /Ig- β conduce rápidamente a: (i) entrada de los linfocitos en el ciclo celular, (ii) rescate de la apoptosis, (iii) aumento en la expresión de moléculas MHC de clase II y de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, y (iv) aumento de la expresión de receptores para citoquinas liberadas por linfocitos T. Sin embargo, en ausencia de las señales accesorias de coestimulación, el reconocimiento antigénico y la transducción de señales a través de complejo Ig- α /Ig- β inevitablemente terminan en anergia o en apoptosis de los linfocitos B antígeno-específicos.

Los antígenos T-independientes (entre los que se encuentran polisacáridos y proteínas poliméricas de origen bacteriano), no inducen la formación de centros germinales y son, por lo tanto, incapaces de inducir la generación de linfocitos B de memoria. Estos antígenos inducen generalmente anticuerpos IgM de baja afinidad, debido a que son incapaces de inducir la hipermutación que conduce a la producción de anticuerpos de alta afinidad y porque el "switching" isotípico está severamente limitado en ausencia de las citoquinas producidas por LTh.

3.2. Correoceptor CD21 (CR2)

Así como los linfocitos T expresan las moléculas CD4 o CD8 que actúan como correceptores linfocitarios de activación celular, los linfocitos B expresan en su membrana el correceptor CD21 que funciona en coordinación con el receptor BCR, para gatillar la proliferación y diferenciación de linfocitos B antígeno-específicos (figura 6-1). Mientras el receptor BCR reconoce al antígeno, el correceptor CD21 reconoce C3d que está



covalentemente unido al antígeno y ha sido generado por digestión parcial de C3 durante la activación del sistema del complemento inducida por el reconocimiento innato del antígeno. De esta manera, el receptor CD21 permite integrar el reconocimiento innato de antígenos bacterianos por el sistema del complemento, con la respuesta inmune humoral a través de la activación y diferenciación de linfocitos B. La molécula CD21 se expresa también en células dendríticas foliculares y es responsable de la retención prolongada del antígeno en el tiempo y la mantención de los linfocitos B de memoria.

El correceptor CD21 (también conocido como CR2 o receptor para complemento tipo 2) se expresa en la membrana de los linfocitos B como un complejo proteico que incluye 3 proteínas distintas: CD21, CD19, y CD81 (también denominado TAPA-1). En el complejo CD21/CD19/CD81, el correceptor CD21 actúa como subunidad que une C3d y asocia el reconocimiento del antígeno por el sistema del complemento, a la activación de linfocito B a través de la transducción de señales bioquímicas gatilladas por CD19.

4. Subpoblaciones linfocitarias B1 y B2

En el repertorio linfocitario B (estimado en 10^{14} linfocitos B distintos), se distinguen al menos dos subpoblaciones celulares denominadas B1 y B2, que presentan características estructurales y funcionales distintas, tienen distinta distribución anatómica y se generan a distintas edades durante la ontogenia de los LB. La **subpoblación linfocitaria B1** se desarrolla durante la vida fetal/neonatal, presenta receptores BCR polirreactivos de baja afinidad, se asocia a la producción de anticuerpos naturales T-independientes y se encuentra mayoritariamente en el peritoneo, la cavidad peritoneal y en el bazo. La **subpoblación linfocitaria B2** se genera a partir de células progenitoras de la médula ósea adulta, constituye la mayor parte del repertorio linfocitario B, su activación es T-dependiente y se encuentra fundamentalmente en los órganos linfoides secundarios y en el torrente sanguíneo.

La mayoría de los linfocitos B1 se caracteriza por la expresión del marcador CD5 (glicoproteína monomérica de 67 kDa, propia de linfocitos T) y aunque su función es todavía un misterio, se ha sugerido que la activación de estas células conduce a la producción de anticuerpos que proporcionan protección contra infecciones

bacterianas durante la vida fetal, mucho antes que el repertorio linfocitario de la respuesta inmune adquirida sea completamente funcional. Además, en el repertorio adulto, los linfocitos B1 dan origen a células plasmáticas que secretan IgM y a una fracción importante de células plasmáticas productoras de IgA en el intestino. De hecho, la transferencia pasiva de linfocitos peritoneales B1 en ratones Scid (presentan una severa inmunodeficiencia combinada), reconstituye la producción de IgA contra muchas bacterias intestinales. Por otro lado la transferencia pasiva de células de hígado fetal o del omentum intestinal, a ratones irradiados, rápidamente reconstituye la subpoblación B1, mientras la transferencia de precursores de médula ósea adulta reconstituye la subpoblación B2 pero no la B1.

En el repertorio linfocitario adulto, los linfocitos B1 son bastante frecuentes en la población B que sufre neoplasias y en aquellos que reconocen una gran variedad de autoantígenos y reaccionan cruzadamente con antígenos bacterianos como polisacáridos y lipopolisacáridos. El repertorio de receptores BCR es bastante más limitado en los linfocitos B1 que en los linfocitos B2, sus reordenamientos génicos V_H son más restringidos, y, como no expresan la enzima TdT (Deoxinucleotidil Transferasa Terminal), carecen de regiones N en las uniones VDJ.

5. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS

Las inmunoglobulinas son una familia de glicoproteínas estructuralmente relacionadas, presentes en la membrana de linfocitos B y en el suero y fluidos titulares de todos los vertebrados, con excepción de los ciclostomos. Sus genes se expresan exclusivamente en los linfocitos B y, en respuesta a la exposición a un antígeno, se secretan como anticuerpos que actúan como mediadores de la inmunidad humoral específica. Aunque todos los anticuerpos tienen una estructura monomérica básica similar, se agrupan en clases estructural y funcionalmente distintas.

En la última década, los esfuerzos de numerosos inmunólogos se han centrado tanto en el análisis de la estructura de los anticuerpos, como en la comprensión de los mecanismos genéticos que dan cuenta de su síntesis y del potencial prácticamente ilimitado del repertorio linfocitario.



5.1. Estructura general

La unidad estructural básica de las inmunoglobulinas está dada por un monómero glicoproteico formado por cuatro cadenas polipeptídicas -dos cadenas livianas (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) también idénticas-covalentemente unidas por puentes disulfuro y estabilizadas por uniones no covalentes, como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones electrostáticas. Al asociarse una cadena pesada con una liviana, sus extremos aminoterminales forman un paratopo o sitio de unión para el antígeno; existen por lo tanto, dos sitios de combinación por monómero de Ig (figura 6-2). Esto significa que una Ig es una molécula bivalente, que puede interactuar simultáneamente con dos epítomos idénticos. Sin embargo, algunos anticuerpos se secretan como multímeros inmunoglobulínicos, en los cuales monómeros Ig se asocian covalentemente entre sí mediante una cadena peptídica adicional, denominada **cadena J**. En estos casos, anticuerpos multiméricos como IgM e IgA, presentan una valencia mayor (proporcional al número de sitios de unión para el antígeno) y pueden estar presentes en las secreciones, gracias a su capacidad de unirse a un receptor poli-Ig existente en la cara basolateral de células epiteliales del tracto respiratorio, gastrointestinal y genitourinario.

Las **cadenas pesadas** tienen un peso molecular que fluctúa entre 55 y 77 kDa. Están constituidas por aproximadamente 450 ó 550 aminoácidos y contienen 3 a 15% de carbohidratos, que resultan esenciales para mantener la estructura del monómero inmunoglobulínico y favorecer la activación del sistema del complemento y la unión a receptores Fc. Cada cadena pesada está formada por segmentos o dominios de 110 aminoácidos, que incluyen un dominio variable (V_H) aminoterminale que forma parte del paratopo y tres o cuatro dominios constantes (C_H) carboxiterminales, que determinan la función efectora de un anticuerpo.

Diferencias estructurales en la región carboxiterminale, permiten reconocer, en un mismo individuo, cinco clases o isotipos de cadenas pesadas, que se designan con letras griegas: gamma (γ) presente en la IgG, mu (μ) en la IgM, alfa (α) en la IgA, delta (δ) en la IgD y épsilon (ϵ) en la IgE.

La cadena pesada contiene además una región bisagra, rica en prolina y de gran flexibili-

dad, ubicada entre los dominios C_{H1} y C_{H2} . La longitud de la región bisagra varía de 10 a 60 aminoácidos en los distintos isotipos de Ig y su flexibilidad es determinante en la orientación espacial de los paratopos y en la eficiencia de la unión antígeno-anticuerpo.

Las **cadenas livianas** de la Ig, tienen un peso molecular en torno a 25 kDa; no contienen carbohidratos y están constituidas por aproximadamente 220 aminoácidos, separados en un dominio variable (V_L) aminoterminale y un dominio constante (C_L) carboxiterminale. Variaciones estructurales en el dominio constante carboxiterminale, permiten distinguir dos tipos de cadena liviana: kappa (κ) y lambda (λ). En una Ig, las cadenas livianas son siempre idénticas entre sí; por lo tanto, un monómero inmunoglobulínico sólo puede tener cadenas de tipo kappa o de tipo lambda, pero nunca de ambas.

Utilizando enzimas proteolíticas como papaína y pepsina, se ha logrado degradar monómeros de Ig y establecer que el reconocimiento del antígeno y la función efectora de la respuesta inmune, residen en fragmentos definidos y distintos de la molécula. La papaína ataca selectivamente cada cadena pesada justo en el sitio aminoterminale del enlace disulfuro intracadena pesada, liberando tres grandes fragmentos: un fragmento Fc y dos fragmentos idénticos de aproximadamente 45 kDa, denominados Fab (fragmento de unión con el antígeno) que contienen la cadena liviana completa (V_L y C_L) y los dominios V_H y C_{H1} de la cadena pesada (figura 6-4). Los fragmentos monovalentes Fab, pueden unirse específicamente al antígeno pero no lo precipitan, puesto que presentan un único sitio de combinación con el antígeno. El tercer fragmento, denominado Fc (fragmento cristalizabile) de aproximadamente 50 kDa, contiene el segmento carboxiterminale de la cadena pesada, es responsable de la función efectora de un anticuerpo y, presenta una gran facilidad para cristalizar en soluciones amortiguadoras neutras.

El **fragmento Fc** de un anticuerpo, participa en funciones efectoras tales como: activación del sistema del complemento, activación de células fagocíticas, citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), inmunidad de mucosas, inmunidad neonatal, hipersensibilidad inmediata y regulación de la respuesta inmune. Distintos tipos celulares (monocitos, células NK, macrófagos, células cebadas y granulocitos, entre otras) pre-



sentan en su membrana plasmática receptores Fc (FcR) isotipo-específicos para el fragmento Fc de distintas clases de anticuerpos (FcγR, FcαR, FcεR). Estos receptores Fc, presentan un dominio citoplasmático implicado en la transducción de señales de activación tales que, la naturaleza de la respuesta efectora dependerá del isotipo de Ig unida al FcR y del tipo de célula que expresa el receptor.

El tratamiento de un anticuerpo con pepsina, genera un fragmento bivalente $F(ab')_2$, que contiene dos fragmentos Fab covalentemente unidos entre sí y pequeños fragmentos peptídicos derivados de la degradación de la región carboxiterminal Fc, de las cadenas pesadas (figura 6-4).

5.2. Dominios de inmunoglobulinas y regiones hipervariables

La secuenciación completa de una molécula de inmunoglobulina, permitió definir los sitios de unión al antígeno y localizar las regiones responsables de las actividades biológicas secundarias o efectoras de los anticuerpos. Se descubrió así que las cadenas pesadas y livianas de los Igs están estructuradas en regiones o dominios homólogos y globulares, de aproximadamente 110 aminoácidos, que forman un asa o “loop” característico, unido por puentes disulfuro intracatenarios (figuras 6-1 y 6-2).

La homología aminoacídica entre los distintos dominios de la molécula, sugiere que las inmunoglobulinas se habrían originado a partir de un gen ancestral común, que codificaba para un polipéptido de 110 aminoácidos y de función desconocida. En el curso de la evolución este gen habría sufrido sucesivas duplicaciones y mutacio-

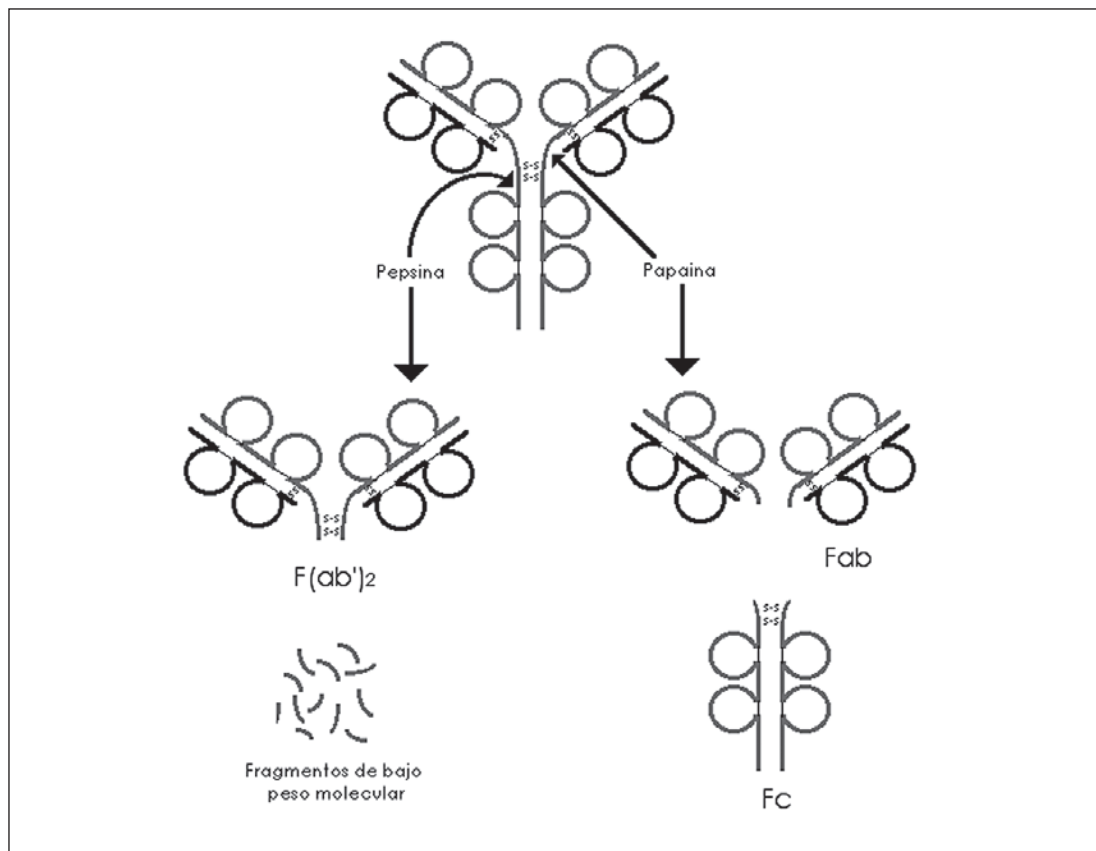


Figura 6-4. Fragmentos obtenidos por acción de papaína y pepsina, sobre la molécula de inmunoglobulina. La papaína separa la Ig en dos fragmentos monovalentes Fab que conservan la capacidad de unir específicamente el antígeno y, un fragmento Fc, responsable de la función efectora de un anticuerpo. La pepsina en cambio, escinde la molécula en un fragmento bivalente $F(ab')_2$ con dos sitios de combinación para el antígeno y, en múltiples péptidos de bajo peso molecular derivados de la degradación del fragmento Fc.



nes, que generaron las distintas clases y subclases de inmunoglobulinas.

La comparación de la secuencia aminoacídica de cadenas pesadas y livianas de diferentes Igs, revela la existencia de una gran variabilidad en el extremo aminoterminal, que constituye precisamente el dominio variable (V_H y V_L) de cada cadena. En el extremo carboxilterminal de las cadenas pesadas y livianas en cambio, los distintos dominios presentan una muy escasa variación constituyendo los dominios constantes (C_H o C_L) de cada cadena. En las cadenas pesadas γ , α y δ existen tres dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}), mientras en las cadenas pesadas μ y ϵ , existen cuatro dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4}). En las cadenas livianas existe sólo un dominio constante C_L (figuras 6-1 y 6-2).

Cada dominio de la molécula de inmunoglobulina tiene la forma de un cilindro compuesto por dos hojas: una contiene tres hebras de cadenas polipeptídicas y la otra cuatro. En cada hoja, las hebras adyacentes son antiparalelas y forman una estructura secundaria tipo beta u hoja plegada. Ambas hojas están alineadas en forma casi paralela y tienen enlaces disulfuro intracadenas entre dos cisteínas altamente conservadas, cada una perteneciente a una de las hélices de cada lámina (figura 6-5). Las proteínas que presentan una estructura similar, se clasifican en el grupo denominado superfamilia de las inmunoglobulinas.

De los 110 aminoácidos de la región variable de las cadenas H y L, sólo participan en el sitio de unión con el antígeno alrededor de 30 residuos de cada cadena, situados en las regiones de mayor variabilidad aminoacídica, denominadas **re-**

giones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDR: "Complementary-Determining-Region"). Los CDRs que son tres segmentos cortos de 10 aminoácidos (denominados CDR1, CDR2 y CDR3), no contiguos en la secuencia primaria de cadenas pesadas y livianas. En ambos tipos de cadenas H y L las regiones hipervariables se localizan en las posiciones 25-35, 50-60 y 90-100 de la cadena polipeptídica. Adyacente a los CDR existen segmentos de aminoácidos de menor variabilidad, conocidos como regiones marco, regiones de entramado o regiones flanqueantes FR1, FR2, FR3 y FR4 (FR: "Framework-Regions"), situadas en las posiciones 1-30, 35-50, 60-90 y 98-110, respectivamente. Estas regiones FR proporcionan un marco estructural para la yuxtaposición de los CDR y conformación del paratopo y, eventualmente, pueden estar involucradas en el contacto con el antígeno, especialmente cuando se trata de haptenos, donde uno o más CDRs puede estar fuera de la región de contacto con el antígeno.

Las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas pueden dividirse en subgrupos, según la secuencia aminoacídica de las regiones de entramado. El número de subgrupos depende de cada especie. En humanos, existen cuatro subgrupos para cadenas kappa, seis para cadenas lambda y tres para cadenas pesadas.

5.3. Variaciones isotípicas, alotípicas e idiotípicas

El sistema inmune es capaz de generar un repertorio linfocitario B estimado entre 10^{14} y 10^{16}

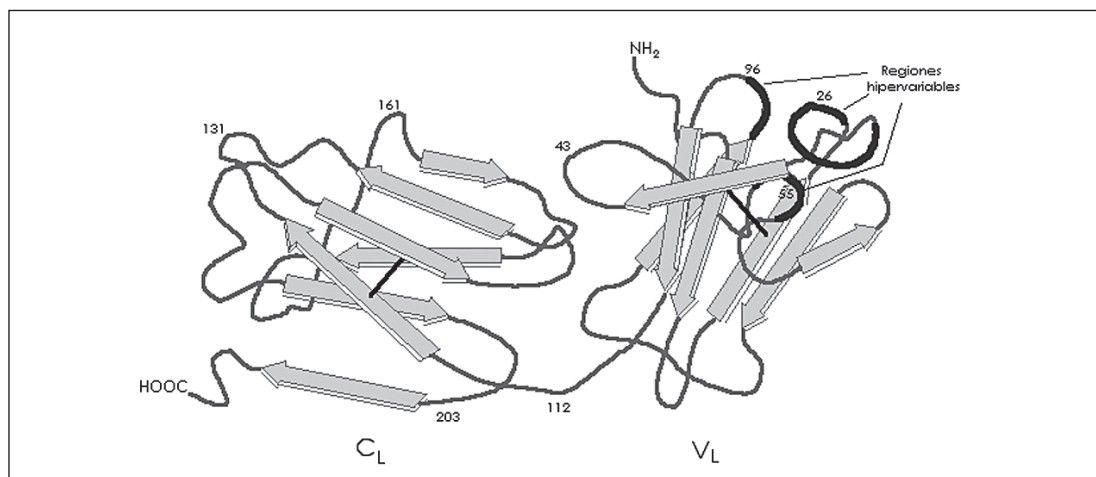


Figura 6-5. Dominio constante y variable de una cadena liviana. Los dominios tienen una estructura beta mantenida por puentes disulfuro. En el extremo de la región variable, las regiones hipervariables forman parte del sitio de unión al antígeno. Este sitio se completa con las regiones hipervariables presentes en la cadena pesada.





células distintas y capaces de originar un repertorio de anticuerpos de igual diversidad. Las funciones biológicas de este repertorio de anticuerpos estarán fundamentalmente determinadas por variaciones en la especificidad y afinidad de sus paratopos y por diferencias estructurales en la región carboxiterminal (Fc), de sus cadenas pesadas.

El estudio de las variaciones estructurales y/o funcionales de cadenas pesadas y livianas, ha permitido identificar en los anticuerpos 3 tipos distintos de variaciones, denominadas: (i) variaciones isotípicas expresadas en los dominios constantes de cadenas pesadas o livianas de todos los individuos de una especie, (ii) variaciones alotípicas expresadas en los dominios constantes de cadenas pesadas o livianas de algunos, pero no todos los individuos de una misma especie, y (iii) variaciones idiotípicas, expresadas en las regiones variables o en los paratopos de distintos anticuerpos.

5.3.1. Variaciones isotípicas

Definen variaciones estructurales en la región constante de cadenas livianas o pesadas de una inmunoglobulina. Así, diferencias aminoacídicas en el dominio constante, de cadenas livianas que expresan la misma región variable V_L , determinan la existencia de dos tipos o isotipos de cadenas livianas, denominados kappa (κ) y lambda (λ).

Diferencias estructurales en la región constante de cadenas pesadas que expresan la misma región variable V_H , determinan la existencia de 5 clases o isotipos de cadenas pesadas (denominadas μ , δ , γ , α y ϵ) que conducen a la existencia de 5 clases o isotipos de inmunoglobulinas que difieren en su función efectora y se denominan IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente.

5.3.2. Variaciones alotípicas

Definen variaciones estructurales en las regiones constantes de las cadenas pesadas o livianas de una clase de Ig, entre diferentes individuos de una misma especie. Estas variaciones se heredan en forma estrictamente mendeliana y no ligada al sexo. Los isotipos se expresan en todos los individuos de una especie, mientras los alotipos se expresan sólo en algunos individuos de la especie.

Así, en humanos se han descrito cinco grupos distintos de marcadores alotípicos denominados Gm, Am, Mm (que se expresan en los dominios constantes de las cadenas pesadas γ , α y μ , respectivamente), Km que se expresa en el dominio constante de las cadenas livianas kappa y Hv que se expresa en el dominio variable de las cadenas pesadas y debe por lo tanto ser considerado como marcador idiotípico. Variaciones en la región constante de las cadenas pesadas de IgG han permitido distinguir al menos 24 variantes distintas (3 de las cuales han sido asociadas con IgG1, 1 asociada con IgG2, 13 asociadas con IgG3 y 7 variantes que no han sido asociadas a una subclase particular).

5.3.3. Variaciones idiotípicas

La utilización de inmunoglobulinas como antígeno, ha permitido definir determinantes antigénicos específicos, denominados idiotopos, asociados a las regiones o dominios variables de cada Ig. El conjunto de **idiotopos** de una inmunoglobulina, particularmente aquellos asociados al sitio de combinancia o paratopo, definen el llamado **idiotipo** de esa Ig o anticuerpo particular. Los idiotipos son generalmente propios o específicos de anticuerpos derivados de un clon linfocitario B particular (idiotipos privados) o pueden ser compartidos por varios clones linfocitarios (idiotipos públicos).

5.4. Clases y subclases de inmunoglobulinas

En mamíferos superiores, específicamente en humanos, se reconocen clases y subclases de inmunoglobulinas que difieren en tamaño, carga, composición aminoacídica y contenido de carbohidratos de sus cadenas pesadas. Electroforéticamente, presentan un espectro de migración, que va desde la fracción gamma a la alfa del suero normal. Las fracciones en que migran más frecuentemente son: IgG en la fracción gamma, IgA en gamma-beta, e IgM e IgD en beta.

La tabla 6-1, presenta las características fisicoquímicas de las Igs humanas y la tabla 6-2 muestra sus características biológicas.



Tabla 6-1. Características fisicoquímicas de las inmunoglobulinas humanas

Característica	Clase de Inmunoglobulina				
	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
Cadenas H	γ	μ	α	δ	ϵ
Subclases de cadenas H	$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$	μ_1, μ_2	α_1, α_2	—	—
Cadenas L	κ ó λ	κ ó λ	κ ó λ	κ ó λ	κ ó λ
Peso molecular (kDa)	150	970	160 - 400	184	188
Número de monómeros	1	5	1 - 2	1	1
Carbohidratos (%)	2 - 3	12	7 - 11	9 - 13	12
S	7	19	7 - 18	7	8
Valencia	2	10	2-4	2	2
Cadena J	No	Sí	Sí, polimérica	No	No

H, pesada; L, liviana; S, coeficiente de sedimentación.

Inmunoglobulina G. La IgG representa el 70-75% del repertorio total de inmunoglobulinas, siendo en su mayor parte de la subclase IgG₁. Es una glicoproteína monomérica que posee dos cadenas pesadas g y dos cadenas livianas (κ o λ) (figura 6-2). Su peso molecular es de aproximadamente 150 kDa y está glicosilada en un 2 a 3%. Existen cuatro subclases (IgG₁ a IgG₄) originadas por pequeñas diferencias en la región constante de la cadena pesada, particularmente a nivel de la región bisagra. Son los anticuerpos predominantes en la sangre, linfa y fluidos peritoneal y cerebrospinal. En cuanto a su comportamiento térmico, las IgG reaccionan mejor a 37°C.

Los anticuerpos de clase IgG predominan en la respuesta inmune secundaria y tienen una vida

media de aproximadamente 21 días. Entre sus propiedades biológicas destaca que todas las subclases (con excepción de IgG₂), pueden unirse al sincitiotrofoblasto placentario a través de los dominios CH1 y CH2; son por lo tanto, capaces de atravesar la placenta y responsables de la protección del recién nacido en los primeros meses de vida. La IgG es también importante en la inducción de fagocitosis (opsonización) dado que sus dominios CH1 y CH2 pueden unirse a receptores (FcγR) presentes en la superficie celular de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Todas las subclases de IgG (excepto IgG₄ que lo hace muy débilmente), unen el primer componente (C1q), del sistema complemento y pueden por lo tanto, activar complemento a través del dominio CH2.

Tabla 6-2. Características biológicas de las inmunoglobulinas humanas

Característica	Clase de Inmunoglobulina				
	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
Porcentaje del total de Ig en la sangre	70 - 75	10	15 - 20	£ 1	≥ 1
Concentración en el suero (mg/ml)	800 - 1600	50 - 200	140 - 400	0,3 - 40	0,01 - 0,1
Fija complemento	Sí	Sí	Sí	No	No
Atraviesa la placenta	Sí	No	No	No	No
Unión a macrófagos y neutrófilos	Sí	No	No	No	No
Unión a células cebadas y basófilos	No	No	No	No	Sí
Unión a plaquetas	Sí	No	No	No	No





Inmunoglobulina M. La IgM tiene un peso molecular de aproximadamente 970 kDa y representa el 10% del repertorio total de anticuerpos. Es una inmunoglobulina o anticuerpo polimérico con 10 ó 12 sitios de unión para el antígeno (dados por 5 ó 6 monómeros inmunoglobulínicos) y está glicosilada en un 12%. La estructura básica del monómero IgM está dada por dos cadenas pesadas μ y dos cadenas livianas κ o λ .

Las cadenas μ poseen cuatro dominios constantes (figura 6-6). Las subunidades se unen a través de enlaces disulfuro entre los dominios $C\mu 3$. La polimerización de la molécula se ve favorecida por la existencia de la cadena J (“joining” o de unión), de aproximadamente 15-20 kDa, que se une a nivel de los penúltimos residuos de cisteína de cadenas μ , entre la primera y la última unidades monomérica del polímero. El 80% de la IgM se encuentra en el espacio intravascular.

La IgM es la inmunoglobulina predominan-

te en la respuesta inmune primaria y tiene una vida media de 5 días. Es la Ig más eficiente en la fijación de complemento, en las reacciones de lisis celular y en la potenciación de las reacciones de fagocitosis. Es una inmunoglobulina que reacciona bien a temperaturas inferiores a 37°C.

Inmunoglobulina A. La IgA representa de 10 a 5% del total de inmunoglobulinas corporales. Puede ser monomérica (160 kDa) o dimérica (385 kDa); la forma dimérica existente en las secreciones, se denomina IgA secretora (IgAs); Los anticuerpos IgA poliméricos presentan, al igual que las IgM poliméricas, la cadena J y el llamado **componente secretor** (glicoproteína de 70 kDa), que constituye un remanente del receptor poli-Ig (poli-IgR) sintetizada por las células epiteliales (figura 6-7). La cadena J se une al dominio CH3 y el componente secretor al dominio CH2 del dímero IgA.

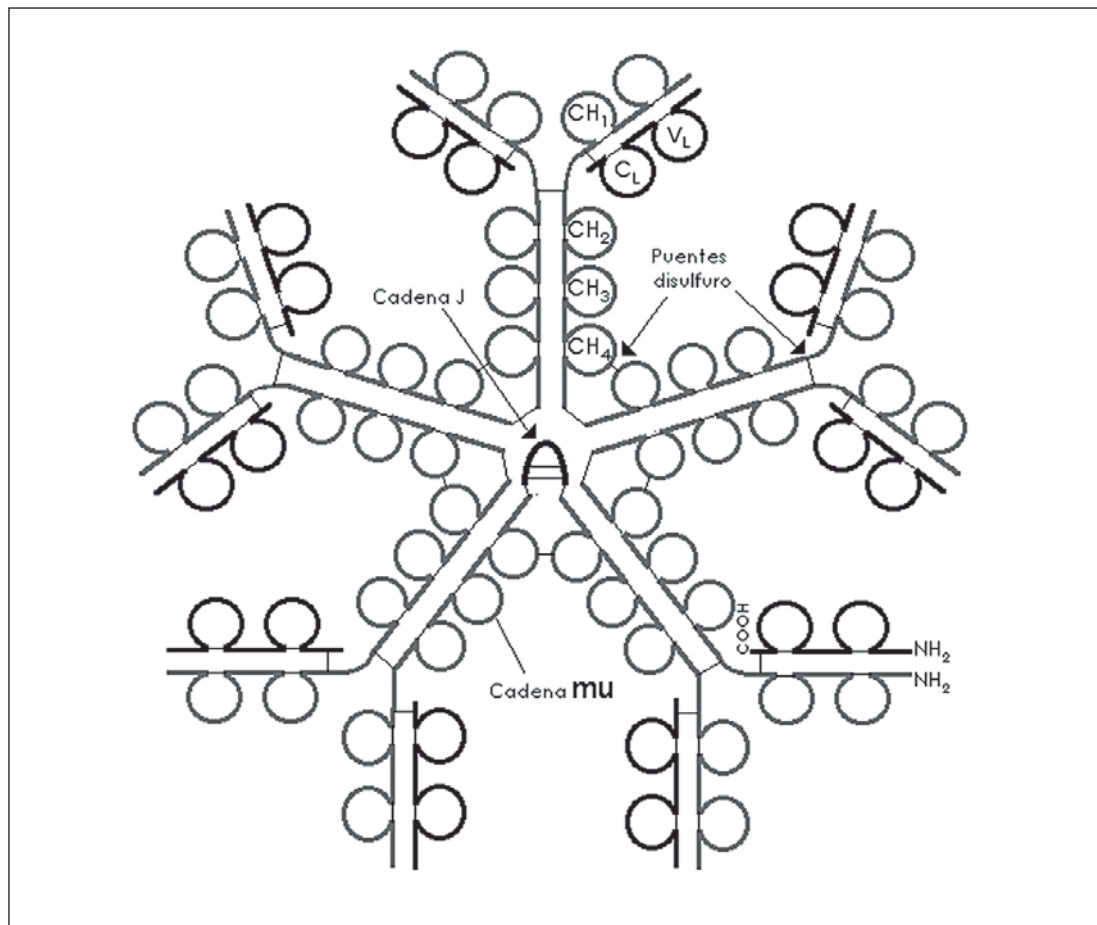


Figura 6-6. Estructura de la Inmunoglobulina M. Las cinco unidades estructurales básicas se unen por puentes disulfuro. Las cadenas μ poseen cuatro dominios constantes. Una cadena J inicia el ensamblaje del pentámero.

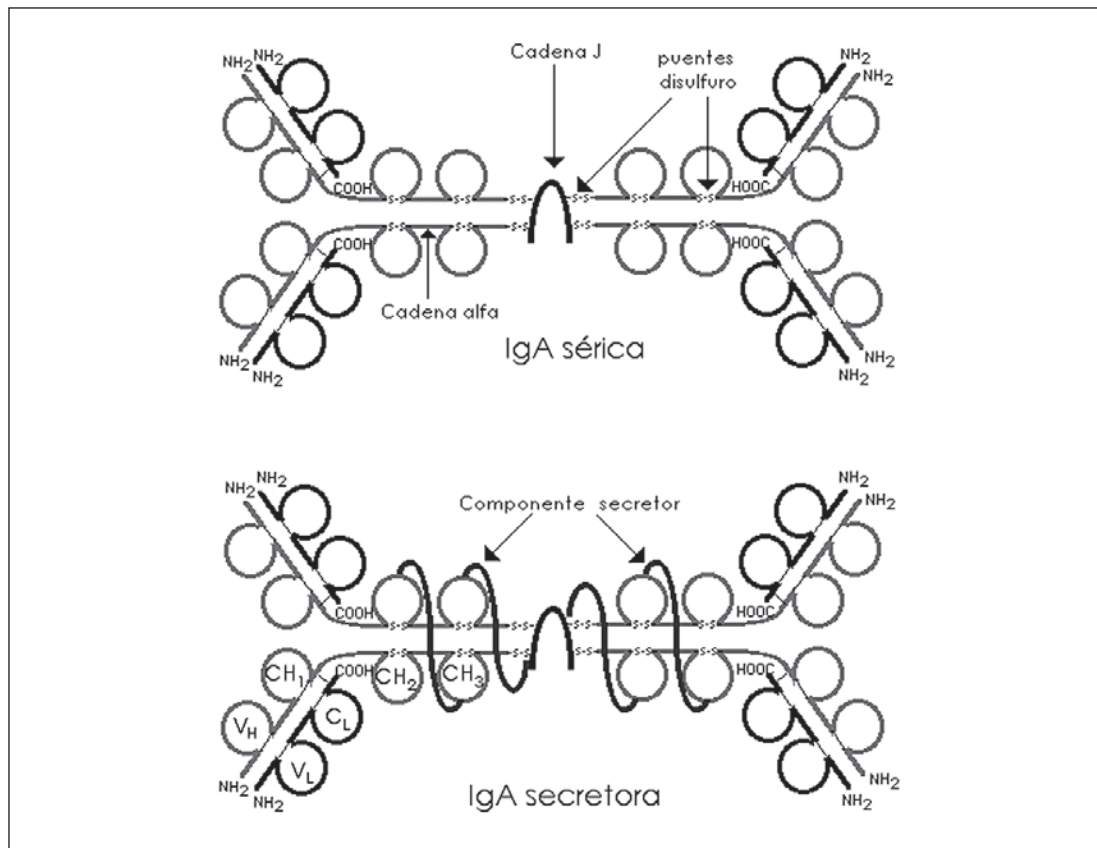


Figura 6-7. Inmunoglobulina A monomérica, dimérica y de secreción. Las IgA monomérica y dimérica corresponden a formas séricas; la dimérica tiene una cadena J. La IgA secretora, además de la cadena J, presenta un componente secretor.

La IgA es la principal inmunoglobulina presente en leche, saliva, lágrimas, y secreciones respiratorias y digestivas. Las células epiteliales sintetizan el poli-IgR en el retículo endoplásmico, y luego de pasar por el complejo Golgi será expuesto, como receptor para las IgA e IgM poliméricas, en la superficie basolateral de la célula epitelial. La unión no covalente, del extremo carboxiterminal del anticuerpo al receptor es dependiente de la cadena J. El complejo IgA-poli-IgR (o IgM-poli-IgR) ingresa por endocitosis a la célula epitelial y es luego transportado a la superficie apical o luminal del epitelio (transcitosis) donde el receptor será parcialmente digerido, dejando un fragmento o componente secretor covalentemente unido al anticuerpo secretado. El componente secretor protege a IgA e IgM, de la acción de las enzimas proteolíticas presentes en las secreciones (figura 6-8).

Entre las propiedades de la IgA destacan las siguientes: neutraliza los virus, activa el sistema del complemento por la ruta alterna y por la ruta

de las lectinas, impide la adherencia de bacterias a la superficie de la mucosa intestinal y su porción Fc se une al receptor fagocítico Fc α -R (CD89).

Existen dos subclases de IgA (IgA₁ e IgA₂) que presentan pequeñas diferencias en las regiones constantes de las cadenas alfa. No se han observado diferencias en la actividad biológica.

Inmunoglobulina D. La IgD tiene un peso molecular de aproximadamente 185 kDa, está glicosilada en un 9 a 14% y tiene una vida media de 2 a 3 días. Existe controversia sobre su función; sin embargo, se piensa que por encontrarse presente en cantidades importantes sobre la membrana de los linfocitos B circulantes, podría estar involucrada en la activación de dichas células como receptor de antígeno. Representa menos del 1% del total de las inmunoglobulinas y la mayor parte se encuentra en el espacio intravascular (figura 6-9).

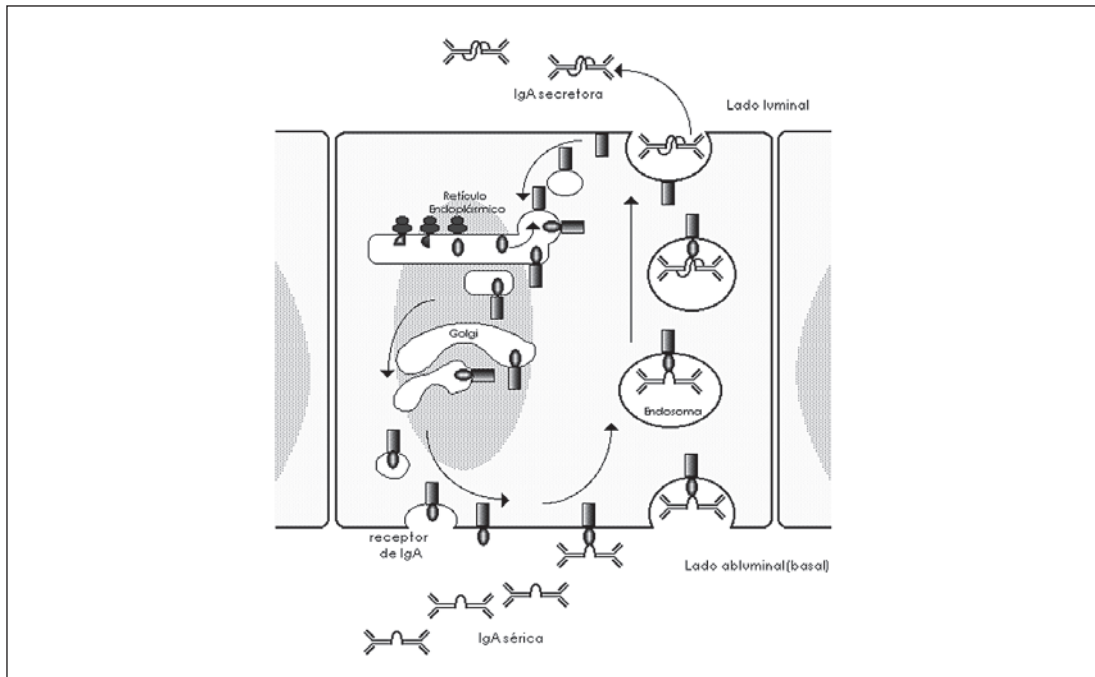


Figura 6-8. Proceso de secreción de la IgA. La IgA plasmática dimérica se une al receptor poli-Ig expuesto en la superficie basolateral de la célula epitelial e ingresa a la célula como complejo poli-Ig-IgA, por endocitosis. Posteriormente, hacia el lado luminal de la célula, el receptor poli-Ig, es parcialmente digerido, dejando un fragmento o componente secretor, covalentemente unido a la IgA dimérica secretada.

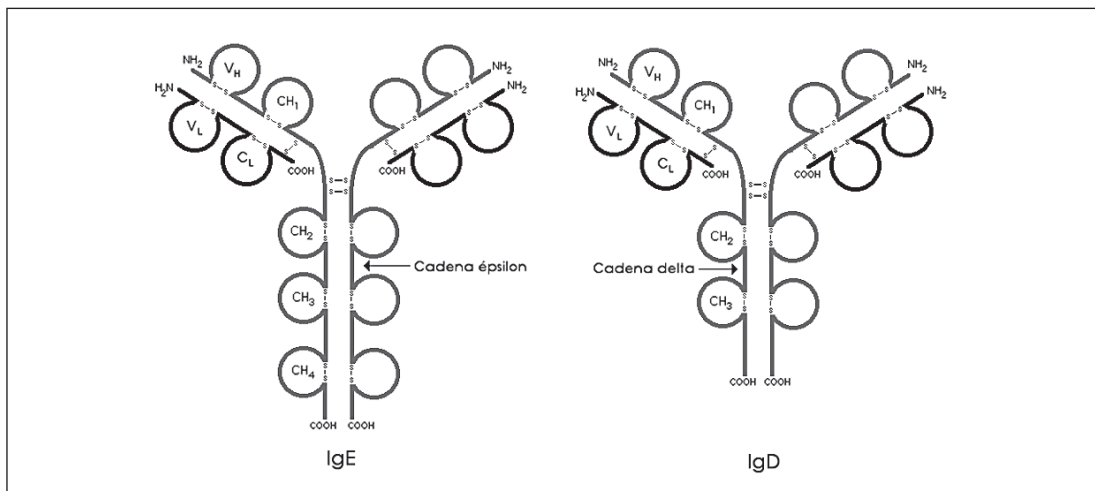


Figura 6-9. Estructura de las inmunoglobulinas E y D. La IgD y la IgE son inmunoglobulinas monoméricas de aproximadamente 185 y 190 kDa, respectivamente. Las cadenas ϵ poseen cuatro dominios constantes.

Inmunoglobulina E. La IgE es una glicoproteína de aproximadamente 190 kDa, que se encuentra glicosilada en un 12% y tiene una vida media de 2 a 3 días. Las cadenas ϵ presentan cuatro dominios constantes (figura 6-9). La IgE representa menos del 1% del total de las

inmunoglobulinas y el 50% de ella se encuentra en el espacio intravascular. La región Fc de la IgE se une con facilidad a receptores específicos de alta afinidad (receptores Fc ϵ RI), constitutivamente expresados en la membrana de células cebadas, basófilos y eosinófilos, de





esta manera estas células adquieren receptores antígeno-específicos. La unión de antígenos (alergenos) a las IgE unidas a mastocitos y basófilos, gatilla no sólo la degranulación celular y la liberación (exocitosis) de mediadores de inflamación (histamina, serotonina, triptasa), sino también la síntesis de citoquinas (IL-4, IL-5, IL-6, TNF) y de mediadores derivados del ácido araquidónico (leucotrieno C₄, prostaglandina D₂). La liberación de estos mediadores de hipersensibilidad inmediata en reacciones alérgicas como asma, fiebre del heno y urticaria, induce rápidamente edema de la mucosa bronquial, secreción de mucus, contracción de la musculatura lisa y, subsecuentemente, infiltrado leucocitario en el sitio de inflamación.

Un FcεR de baja afinidad y rol biológico hasta ahora desconocido (FcεRII) se expresa constitutivamente en linfocitos B (receptor FcεRIIA) o en respuesta a IL-4, en monocitos y eosinófilos (receptor FcεRIIB o CD23).

6. RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Los anticuerpos producidos por las células plasmáticas -que representan el estado final de diferenciación de los linfocitos B- son mediadores de la respuesta inmune humoral y por lo tanto, responsables de la neutralización y eliminación de diversos antígenos, gatillando una variedad de reacciones inmunológicas. Una de las características esenciales de esta respuesta es su carácter específico y heterogéneo; es decir, se sintetizan anticuerpos de distinta clase, avidéz y afinidad, capaces de interactuar con epítopos antígenicos según un claro patrón temporal.

En un individuo que por primera vez toma contacto con un antígeno, se distinguen cuatro fases en la respuesta primaria de producción de anticuerpos (figura 6-10): (i) Fase de latencia, en la que no se detectan anticuerpos, (ii) Fase logarítmica, en la cual el título del anticuerpo se eleva en forma exponencial, (iii) Fase de meseta, en cual el título de anticuerpos se estabiliza, y (iv) Fase de descenso, en cual la concentración de anticuerpos disminuye por eliminación o catabolismo.

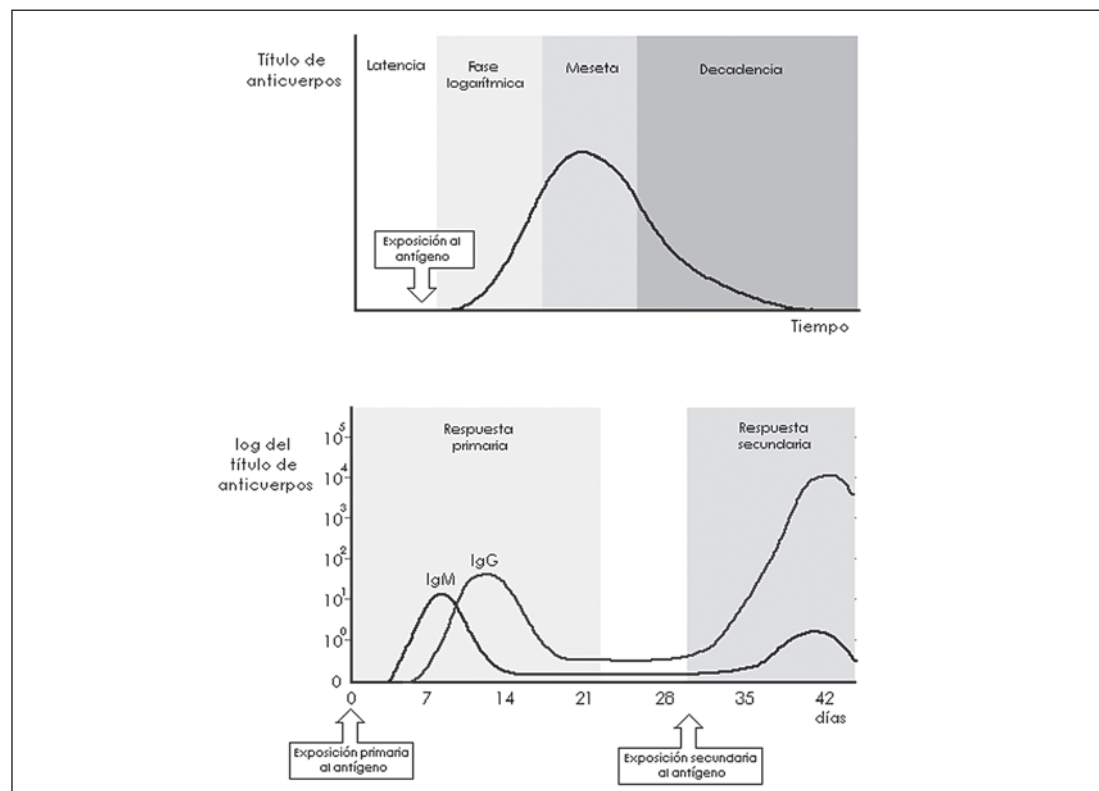


Figura 6-10. Respuesta inmune humoral. La figura superior presenta las etapas de una respuesta inmune humoral, expresadas como título de anticuerpos: Fase de latencia, logarítmica, de meseta y de decadencia. La figura inferior muestra diferencias entre las respuestas inmune humoral primaria y secundaria, particularmente respecto a la clase de inmunoglobulinas y al título de los anticuerpos. Se destaca que en la respuesta primaria, se pesquisa primero IgM en bajo título y en la respuesta secundaria predomina la síntesis de IgG, en un título significativamente superior (ver cambio de clase).



Aunque estas fases de la curva de producción de anticuerpos se presentan siempre en la respuesta primaria, en los posteriores contactos con el antígeno (respuesta secundaria, terciaria, etc.), pueden distinguirse los siguientes aspectos (figura 6-10): (i) Evolución cronológica, fase de latencia más corta y fases de meseta y de descenso más largas, (ii) Título de anticuerpos, en la fase de meseta mucho mayor concentración de anticuerpos, (iii) Clase de anticuerpos, en la respuesta primaria para los antígenos timo-dependientes, se sintetizan y secretan fundamentalmente anticuerpos de isotipo IgM, de gran avidez, en cambio en la respuesta secundaria se encuentran casi exclusivamente anticuerpos de isotipo IgG, y (iv) Afinidad de los anticuerpos, generalmente mucho mayor en la respuesta secundaria o posterior. Este fenómeno se denomina maduración de la afinidad y es consecuencia de la hipermutación somática en los genes recombinados del anticuerpo y de una expansión selectiva de los clones de alta afinidad.

6.1. Avidez

El término avidez se refiere a la fuerza con que un anticuerpo se une a un antígeno multivalente y, por lo tanto, tiene relación con la afinidad y con la valencia del antígeno y del anticuerpo. Si tanto el antígeno como el anticuerpo tienen carácter multivalente, la fuerza de unión entre ellos es mayor que la suma de las afinidades.

Debido a que la avidez de un anticuerpo es una función de los métodos utilizados para medirla (precipitación con sulfato de amonio o con suero anti-Ig o, seroneutralización de fagos o bacterias, entre otros), sólo puede expresarse en unidades arbitrarias.

6.2. Afinidad

El término “afinidad de un anticuerpo”, es una expresión termodinámica de la fuerza de la interacción entre un epítipo del antígeno y el sitio de combinación de un anticuerpo; por lo tanto, es una medida de la compatibilidad estereoquímica entre ambas moléculas y puede aplicarse a interacciones que involucren determinantes simples (como los haptenos).

La afinidad resulta de la suma de las fuerzas de repulsión y atracción (puentes de hidrógeno, interacciones de Van der Waals, interacciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas) entre

el antígeno y el anticuerpo. Operacionalmente, esto significa que mientras mayor es la afinidad de la interacción, es más difícil separar los componentes del complejo antígeno-anticuerpo.

Dado que las interacciones antes mencionadas no son covalentes, la unión antígeno-anticuerpo se puede representar por la constante de asociación o afinidad K_a , (que se expresa en M^{-1}). Se obtiene asumiendo que esta reacción obedece rigurosamente a la ley de acción de masas, como sigue:



* Concentración Molar

La K_a se puede medir por varias técnicas, tales como: diálisis en equilibrio, radioinmunoensayo y precipitación con sulfato de amonio de complejos antígeno-anticuerpo.

7. BASES GENÉTICAS DE LA DIVERSIDAD DE LAS INMUNOGLOBULINAS

En los vertebrados superiores el tamaño y diversidad del repertorio linfocitario, aumenta la probabilidad que un linfocito individual encuentre un antígeno que se una a su receptor de superficie y gatille la proliferación y diferenciación celular a través de un proceso de selección clonal de linfocitos.

El receptor de un linfocito B (BCR) es generado somáticamente en el órgano linfóide primario, durante un proceso de diferenciación antígeno independiente que permite que cada linfocito B esté provisto de un receptor único, cuyas cadenas pesadas y livianas no están codificadas en el DNA germinal y no está predeterminado a reconocer un antígeno extraño particular.

El repertorio de receptores linfocitarios B es generado al azar durante un proceso regulado de reordenamiento o recombinación de segmentos génicos V(D)J (como ocurre en humanos), por conversión génica (como ocurre en pollos y conejos) o por mutación somática (como ocurre en ovejas). Además durante la recombinación V(D)J, puede introducirse una



mayor diversidad por: (i) corte impreciso de los segmentos génicos que se recombinan, (ii) agregado de nucleótidos al azar, en los sitios de corte y unión de los distintos segmentos génicos y, (iii) combinación al azar de distintas cadenas pesadas y livianas. A estos mecanismos de generación de diversidad en el órgano linfoide primario, se agregarán luego, en los órganos linfoides secundarios, mecanismos antígeno-dependientes como: (i) la hipermutación de las regiones hipervariables (CDRs) de cadenas pesadas y livianas, (ii) el “switching” isotípico o cambio de clase de las cadenas pesadas y (iii) la edición del receptor a través de reordenamientos secundarios V en las cadenas livianas.

7.1. Genes de inmunoglobulinas

En el DNA germinal de los vertebrados superiores no existen genes que codifiquen la síntesis de cadenas pesadas y livianas de una inmunoglobulina; al contrario estos genes deben ser creados o ensamblados a partir de copias múltiples de pequeños segmentos génicos, en un proceso de recombinación sitio-específico, catalizado por un complejo enzimático denominado **recombinasa** (figuras 6-11 y 6-12).

Los segmentos génicos que codifican las distintas regiones o dominios de cadenas pesadas y livianas de una inmunoglobulina, se encuentran agrupados en tres grupos o familias génicas distintas: (i) una única familia génica H, que incluye

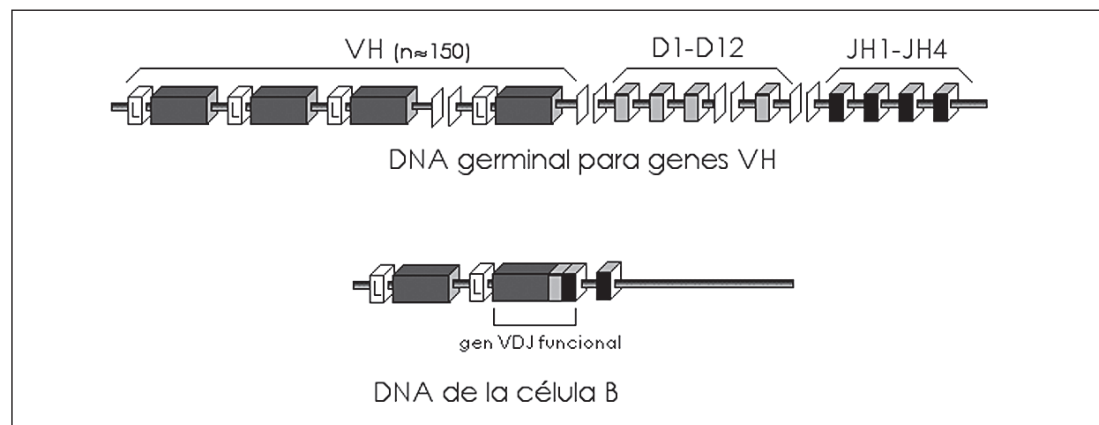


Figura 6-11. Generación del gen activo de la cadena pesada. El gen activo para una cadena H surge de cuatro genes (V, D, J y C) de la línea germinal. Mediante recombinación somática se unen a una de las secuencias V, D y J, formando la región variable. Los genes para región constante (nueve en el ser humano) están situados río abajo (hacia 3'). Uno de los genes constantes se une a los segmentos ya recombinados que codifican la región variable. El montaje final de las secuencias se realiza durante el procesamiento del RNA.

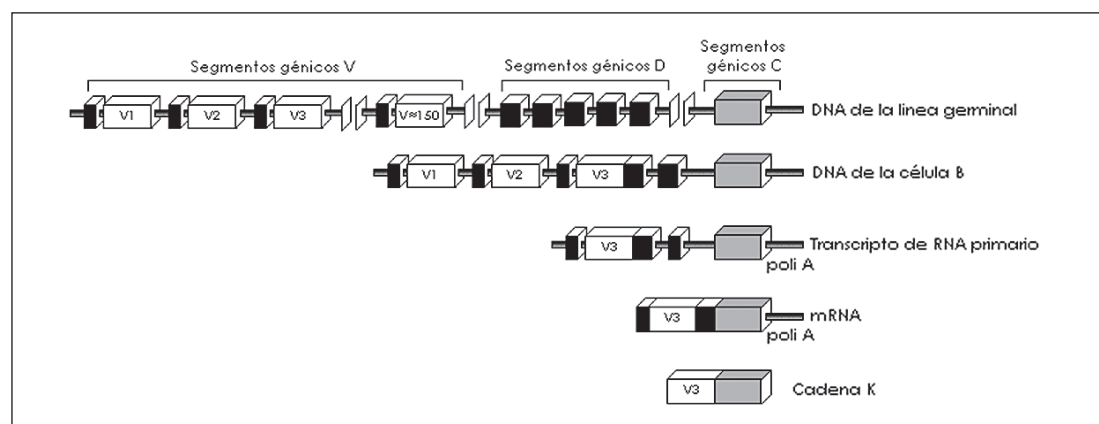


Figura 6-12. Recombinación de segmentos génicos y generación de RNA mensajero para cadenas livianas. En la célula precursora de un linfocito B, los distintos segmentos génicos se encuentran en configuración germinal y deben recombinarse para generar un gen que codifique la cadena liviana de una inmunoglobulina.





genes C_H (constantes), genes V_H (variables), genes J_H (unión) y genes D_H (diversidad) de las cadenas pesadas; (ii) dos familias génicas livianas distintas (κ y λ) que incluyen genes C_L (constantes), genes V_L (variables) y genes J_L (unión). En humanos, los segmentos génicos que codifican las cadenas pesadas se encuentran en el cromosoma 14 y los de cadenas livianas κ y λ en los cromosomas 2 y 22, respectivamente. En el ratón, en cambio, los genes para cadenas pesadas se ubican en el cromosoma 12, y los genes para cadenas livianas κ y λ , se ubican en los cromosomas 6 y 16, respectivamente.

7.1.1. Genes de cadenas pesadas

La región variable de una cadena pesada (V_H , de aproximadamente 110 aminoácidos), se genera a partir de tres segmentos génicos distintos: un segmento génico variable V_H , de 285 pares de bases, que codifica los primeros 95 aminoácidos y dos segmentos génicos distintos (de diversidad D_H y de unión J_H) que codifican los últimos 13 aminoácidos del dominio variable. Cada segmento génico V_H contiene además en su extremo 5', una pequeña secuencia nucleotídica de 60 a 90 pares de bases, que codifican una secuencia aminoacídica líder o señal aminoterminal hidrofóbica de 20 a 30 aminoácidos, que permite la síntesis de la cadena liviana en ribosomas asociados al retículo endoplásmico celular. Iniciada la síntesis de la cadena liviana, la secuencia líder o señal es luego, rápidamente removida del extremo amino de la proteína (figura 6-11).

El sitio de ensamblaje de los segmentos $V(D)J$ codifica la tercera región hipervariable (CDR3), de la cadena pesada, mientras las dos primeras regiones hipervariables (CDR1 y CDR2), están codificadas dentro del segmento génico V_H .

La región constante de la cadena pesada está codificada por un segmento génico o minigen constante C_H que contiene 3 ó 4 exones (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , C_{H4} : que codifican la región constante de las cadenas pesadas de los anticuerpos) y exones más pequeños que codifican la región transmembrana y el dominio citoplasmático de las cadenas pesadas de Ig del receptor linfocitario BCR (figura 6-1). Los minigenes de cadenas pesadas de diferentes isotipos (C_{μ} , C_{δ} , C_{γ} , C_{α} y C_{ϵ}), están ordenadas en series (en tándem), en un orden que es característico de cada especie.

En humanos, el repertorio genómico de ca-

denas pesadas ocupa 1250 kilobases (kb), en el brazo largo del cromosoma 14, y consiste de 123 a 129 segmentos génicos variables V_H , 27 segmentos génicos D_H , 9 segmentos génicos J_H y 11 minigenes constantes C_H . Los segmentos génicos variables ocupan una posición muy cercana al telómero cromosómico y entre ellos se distinguen 41 pseudogenes y sólo 82 a 86 segmentos funcionales que se clasifican en 7 familias o subgrupos cuyos miembros presentan más de 70% de homología. Los minigenes constantes ocupan una posición más centromérica en el cromosoma 14 humano. Se han descrito además, fuera del cromosoma 14 humano, 35 segmentos génicos huérfanos y no funcionales que no contribuyen a la síntesis de cadenas pesadas: 9 segmentos V_H y 10 segmentos D_H en el cromosoma 15; 16 segmentos V_H en el cromosoma 16 y un segmento V_H en el cromosoma 9.

Los pseudogenes o segmentos génicos no funcionales, aunque no contribuyan directamente a la diversidad de las cadenas, pueden constituir un importante reservorio de diversidad, puesto que pueden utilizarse en la recombinación desigual (conversión génica) con segmentos génicos funcionales y generar así nuevos segmentos génicos funcionales.

7.1.2. Genes de cadenas livianas

La región o dominio variable de una cadena liviana (V_L de aproximadamente 110 aminoácidos), se genera a partir de dos segmentos génicos distintos: un segmento génico variable V_L , de 285 pares de bases, que codifica los primeros 95 aminoácidos y, un segmento génico de unión J_L , de 39 pares de bases que codifica los últimos 13 aminoácidos del dominio variable liviano (aminoácidos 96 al 108 en dirección aminocarboxilo). Cada segmento génico V_L contiene además en el extremo 5', una pequeña secuencia nucleotídica de 60 a 90 pares de bases, que codifica una secuencia aminoacídica líder o señal hidrofóbica, ubicada en el extremo amino de la cadena liviana (figura 6-12).

El dominio constante de la cadena liviana está codificado por un segmento o minigen constante (C_L) que contiene un único exón de aproximadamente 330 pares de bases, puesto que las cadenas livianas no contienen dominios transmembrana y citoplasmático (figura 6-1).



a) Genes de cadena kappa

En humanos el repertorio genómico para cadenas livianas kappa (κ), ocupa 1820 kb en el brazo corto del cromosoma 2 y consiste de 76 segmentos variables $V\kappa$ (agrupados en 7 familias distintas, y cuyos miembros muestran más de 70% de homología), 5 segmentos génicos de unión $J\kappa$ y un único gen constante $C\kappa$. Los segmentos variables $V\kappa$, están separados en dos grupos o “clusters”: uno distal conteniendo 36 genes en 400 kb (más centromérico y en posición 5', más lejos del gen constante $C\kappa$) y, otro más proximal conteniendo 40 segmentos génicos en 600 kb (en posición más telomérica y en posición 3', más cercano al gen constante $C\kappa$).

Se ha descrito además un haplotipo raro que contiene sólo el “cluster” proximal con 40 segmentos génicos $V\kappa$ distribuidos en 7 familias, de los cuales 18-20 son segmentos funcionales. En este haplotipo se han identificado y secuenciado, además, 28 segmentos génicos $V\kappa$ adicionales y “huérfanos”, distribuidos en distintos cromosomas: 3 ubicados en el brazo corto del cromosoma 2, (pero fuera del locus mayor $IgL\kappa$), 13 segmentos en el brazo largo del cromosoma 2, 6 segmentos en el cromosoma 22, 1 en el cromosoma 1, 1 en el cromosoma 15 y 4 fuera del cromosoma 2.

b) Genes de cadenas lambda

En humanos el repertorio genómico de cadenas livianas lambda (λ), ocupa 1050 kb en el brazo largo del cromosoma 22 y contiene: 70-71 segmentos variables $V\lambda$, que ocupan 900 kb (dependiendo del haplotipo), 7 a 11 segmentos constantes ($C\lambda$) en posición más telomérica y, además, cada segmento génico constante está precedido por un único segmento génico $J\lambda$. Los segmentos génicos $V\lambda$ ocupan una posición más centromérica y entre ellos se distinguen 14 pseudogenes y 56-57 segmentos $V\lambda$ funcionales, agrupados en 11 familias distintas. Se han descrito además dos segmentos génicos huérfanos ubicados en el cromosoma 8 humano y dos segmentos $V\lambda$ y dos segmentos constantes $C\lambda$, en el cromosoma 22, por fuera del locus mayor de cadenas livianas lambda.

7.2. Reordenamiento génico

El reordenamiento génico se realiza de manera definida y ordenada, recombinando primero los segmentos génicos que codifican las cadenas pe-

sadas y luego los segmentos génicos que codifican las cadenas livianas.

La recombinación es iniciada por un complejo enzimático o recombinasa, que reconoce y corta de manera específica, una secuencia señal de recombinación (RSS: "Recombination Signal Sequence") que flanquea o es adyacente a cada uno de los segmentos génicos $V(D)J$ que deben reordenarse. Cada secuencia RSS consta de un heptámero conservado (5' CACAGTG) y un nonámero también conservado (5' ACAAAAACC), separados entre sí por un espaciador no conservado de 12 ó 23 pares de bases (figura 6-13). Los espaciadores definen dos tipos distintos de secuencias de recombinación (denominadas 12-RSS y 23-RSS) y, el reordenamiento se realiza de manera tal que una recombinación eficiente sólo ocurre cuando un segmento génico que contiene el espaciador 12-RSS, se reordena con un segmento génico distinto que contiene el espaciador 23-RSS. Esta restricción del reordenamiento génico, se conoce como “la regla 12/23” y determina qué segmentos podrán recombinarse entre sí, dependiendo de la posición de las secuencias 12-RSS o 23-RSS, en el extremo 5' o 3' de cada segmento génico (figura 6-14). La secuencia RSS se encuentra en el extremo 3' de cada segmento variable V , en el extremo 5' de cada segmento de unión J y en ambos extremos, 5' y 3', de los segmentos génicos de diversidad D .

El proceso de recombinación o reordenamiento génico es altamente complejo e implica la participación de una maquinaria enzimática (recombinasa) que incluye componentes de expresión exclusivamente linfocitaria y componentes que forman parte de la maquinaria de reparación del DNA celular.

El reordenamiento $V(D)J$ es iniciado por los productos de expresión linfóide-específica de los genes RAG-1 y RAG-2 (RAG: "Recombination Activating Gene") que reconocen y cortan las secuencias RSS, adyacentes a cada segmento génico que será recombinado. Las secuencias RSS son primero reconocidas por la maquinaria de recombinación y luego aproximadas en estrecha yuxtaposición o sinapsis para cortar de manera precisa el DNA, en el límite entre el heptámero de cada secuencia RSS y el segmento génico codificante. Proteínas de alta movilidad de los grupos 1 y 2 (HMG1/2) parecen desempeñar un rol auxiliar en estos eventos tempranos de la recombinación génica. El corte o daño en el DNA

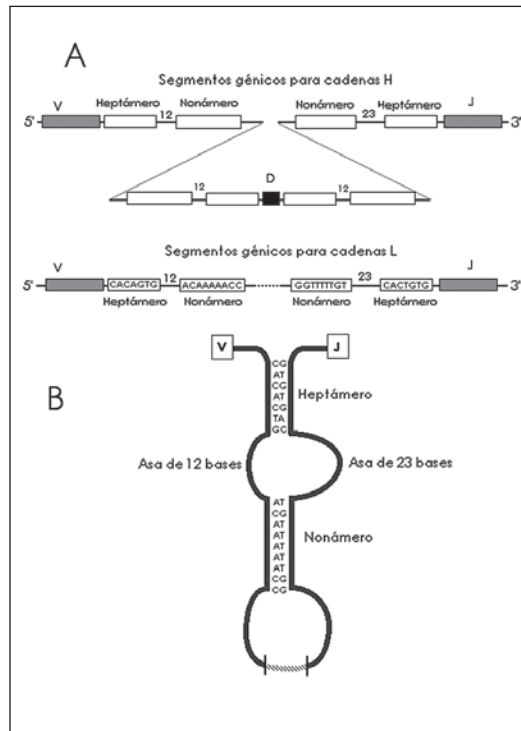


Figura 6-13. Recombinación de segmentos génicos V(D)J. La recombinación de segmentos génicos es iniciada por un complejo enzimático (recombinasa) que reconoce y corta de manera específica una secuencia señal de recombinación (RSS) que flanquea los segmentos génicos que deben reordenarse. Cada secuencia RSS consta de un heptámero conservado (5' CACAGTG) y un nonámero también conservado (5' ACAAAAACC), separados entre sí por un espaciador no conservado de 12 ó 23 pares de bases. El reordenamiento se realiza de manera tal que una recombinación eficiente sólo ocurre cuando un segmento que contiene el espaciador 12-RSS, se reordena con un segmento génico distinto que contiene el espaciador 23-RSS (regla 12/23).

es ahora detectado por la maquinaria celular de reparación del DNA, que incluye una proteína quinasa DNA dependiente (DNA-PK), reclutada en sitio del daño a través de su interacción con el heterodímero regulador Ku70/Ku80, que reconoce los extremos cortados del DNA. La quinasa DNA-PK es una proteína de 450 kDa, codificada por el gen XRCC7 y perteneciente a la familia de las fosfatidil inositol (PI) quinasas. Forma también parte de la maquinaria de reparación el producto del gen XRCC4 que se une a la DNA-PK y actúa como una ligasa IV para unir los extremos cortados del DNA codificante, en los eventos finales de reparación del DNA. Pevio a la reparación final del DNA, una exonucleasa puede remover nucleótidos al azar y la enzima TdT puede

agregar nucleótidos en los extremos libres de los segmentos génicos codificantes, incrementando notablemente la diversidad generada durante este proceso de reordenamiento o recombinación génica.

7.2.1. Reordenamiento de cadenas pesadas

El reordenamiento de segmentos génicos en el locus para cadenas pesadas, se realiza en un orden preciso e implica la eliminación o delección, de todos los segmentos que separan a aquéllos que deben recombinarse. Primero se reordena un segmento génico de diversidad D, con un segmento de unión J, eliminando toda la secuencia nucleotídica que los separa, pero manteniendo todos los segmentos génicos que están en posición y dirección 5' del segmento D y en posición y dirección 3' del segmento J que se recombina. Luego, uno de los segmentos génicos variables V, se recombina con el complejo DJ ya reordenado, eliminando los segmentos que los separan y conservando aquéllos que están en posición y dirección 5' de V y en dirección 3' del complejo DJ.

El DNA ya reordenado, es ahora utilizado como molde para la síntesis de una RNA o transcrito primario que incluirá, tantos los segmentos génicos V(D)J recombinados, como los genes constantes C μ y C δ , ubicados en dirección 3' de los segmentos J. El transcrito primario es luego procesado de manera tal que: (i) se eliminan por "splicing" los segmentos J que separan V(D)J de C μ C δ y los segmentos génicos V, situados en dirección 5' del complejo V(D)J reordenado. Se eliminará además C μ o bien C δ , para generar por "splicing" alternativo, dos RNA mensajeros distintos: uno que contiene V(D)J-C μ y codificará una cadena pesada de tipo μ y otro que contendrá V(D)J-C δ y codificará la síntesis de una cadena pesada delta; (ii) se agrega un capuchón de 7-metil guanosina en el extremo 5' del RNA, y (iii) se agrega una cola de poli-A (de 150 a 200 adeninas), en el extremo 3' de V(D)J-C μ y en el extremo 3' de V(D)J-C δ , para generar mRNA funcionales, que serán transportados desde el núcleo al citoplasma celular pro-B, para la síntesis de las respectivas cadenas pesadas H μ y/o H δ .

7.2.2. Reordenamiento de cadenas livianas

El reordenamiento de segmentos génicos



de cadenas livianas kappa o lambda se realiza de manera similar al reordenamiento de cadenas pesadas. Primero se reordenan al azar segmentos génicos V y J, con delección del DNA que separa los segmentos que se recombinan y mantención de los segmentos génicos que están en dirección 5' del segmento V y en dirección 3' del segmento J que se recombina. El complejo VJ reordenado, se recombina ahora con un gen constante C, eliminando todo el DNA que los separa. Si los segmentos J y C están asociados en un mismo grupo o "cluster", el reordenamiento de un J determinado implicará la recombinación, del gen C asociado a ese segmento génico J.

Reordenado el DNA, se sintetiza ahora un transcrito primario que será procesado para generar el RNA mensajero que codifica la síntesis de una cadena liviana kappa o lambda.

7.2.3. Reordenamiento impreciso del DNA

El reordenamiento de segmentos génicos y el corte de las secuencias RSS adyacentes a cada

segmento, presenta cierto grado de imprecisión que contribuye a aumentar la diversidad del repertorio linfocitario. Esto significa que en linfocitos que utilizan los mismos segmentos génicos para generar las cadenas y livianas de su receptor BCR, el corte impreciso del DNA conducirá a variaciones aminoacídicas codificadas por diferencias en el número de nucleótidos en la región de unión de los segmentos génicos recombinados (figura 6-14).

El reordenamiento impreciso también puede llevar a reordenamientos no funcionales que estén fuera del marco de lectura, de modo que el DNA no pueda transcribirse

7.2.4. Diversificación de la región N

Linfocitos que utilizan los mismos segmentos génicos V(D)J para generar las cadenas pesadas y livianas de su receptor, pueden presentar un BCR con claras diferencias aminoacídicas como consecuencia de la remoción o agregado de nucleótidos en la región de unión de esos segmentos V(D)J. El agregado aleatorio de nucleótidos

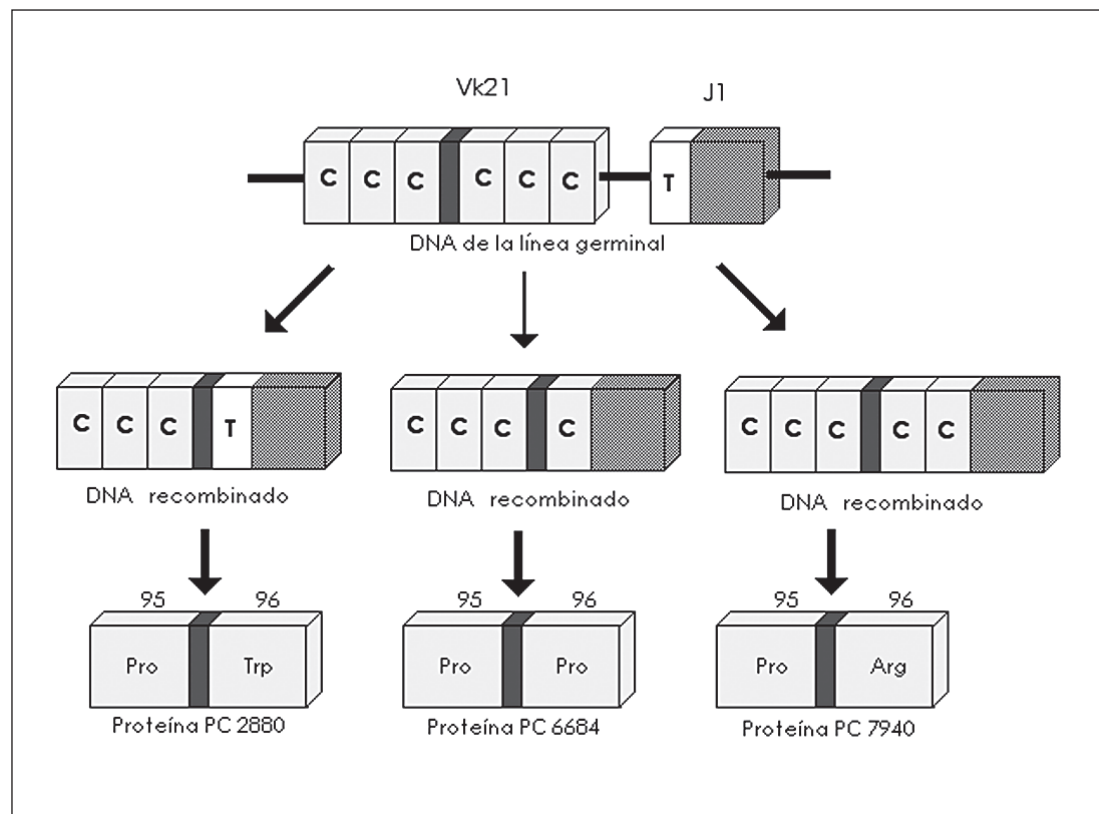


Figura 6-14. Reordenamiento impreciso del DNA. El punto de corte nucleotídico durante la recombinación entre segmentos V y J, puede variar en un margen de varios nucleótidos, dando lugar a diferentes secuencias nucleotídicas en el gen activo de la cadena kappa. El aminoácido 96 podría estar codificado por los codones TGG (triptófano), CGG (arginina) y CCG (prolina).





que no están codificados en el DNA germinal es catalizado por la enzima TdT conduce a la generación de la llamada región N (N: "New nucleotides") que, en algunos casos, puede incluir hasta 20 nuevos nucleótidos, en la región de unión de los segmentos génicos reordenados.

Durante la reparación del DNA en la región de unión de los segmentos génicos, pueden también transferirse nucleótidos desde la hebra no codificante, a la hebra codificante del DNA, generando las denominadas secuencias nucleotídicas P.

El agregado de nucleótidos en la región de unión de los segmentos génicos V(D)J que se recombinan, puede llevar a reordenamientos no funcionales que estén fuera del marco de lectura, generando codones sin sentido o de término, en dos de cada tres reordenamientos.

7.2.5. Exclusión alélica

El receptor linfocitario BCR, está constituido por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas livianas también idénticas, implicando que cada linfocito B sólo puede expresar el locus paterno o materno, para la síntesis de una cadena pesada o para la síntesis de una cadena liviana kappa o lambda. La síntesis de una cadena pesada μ , como resultado del reordenamiento exitoso de segmentos génicos V(D)J en el alelo de uno de los cromosomas homólogos (materno o paterno), inhibe o excluye irreversiblemente el reordenamiento génico en el alelo del otro cromosoma (exclusión alélica).

El reordenamiento génico en un cromosoma puede no traducirse en la síntesis de la respectiva cadena polipeptídica debido a que: (i) durante el reordenamiento de segmentos génicos V(D)J se produce delección o generación de codones de término de lectura, (ii) el reordenamiento es exitoso pero no se generan mRNA funcionales, debido a un procesamiento inadecuado del transcrito primario, y (iii) el reordenamiento génico es incompleto, puesto que se recombinan algunos segmentos (D_H-J_H o V_H-D_H) pero no todos aquéllos necesarios para generar un adecuado transcrito primario.

Si la recombinación V(D)J en un cromosoma materno o paterno genera un reordenamiento no productivo, el segundo cromosoma (paterno o materno, respectivamente) será reordenado; incluso cabe la posibilidad de corregir combinaciones aberrantes en un cromosoma recurriendo a un segundo reordenamiento (reordenamiento secundario) sobre el mismo cromosoma.

7.2.6. Exclusión isotípica

El reordenamiento de los genes que codifican inmunoglobulinas es desde luego complejo, pero es también altamente ordenado: primero se reordenan los segmentos génicos que codifican cadenas pesadas y luego, la familia de segmentos kappa se reordena antes que aquéllos que codifican la cadena liviana lambda.

El reordenamiento productivo (paterno o materno) de una cadena liviana kappa implica por lo tanto exclusión alélica materna o paterna del locus kappa y simultáneamente exclusión de los cromosomas que contienen los segmentos génicos que codifican la expresión del isotipo liviano lambda (exclusión isotípica).

La generación de genes funcionales que codifiquen la expresión de cadenas pesadas y livianas de una inmunoglobulina depende del fenómeno ensayo-error durante el reordenamiento de segmentos génicos y depende de diversos elementos reguladores positivos ("enhancers") y negativos ("suppressors"), ubicados entre los segmentos génicos que deben reordenarse.

7.2.7. Cambio de clase de cadenas pesadas

Una estrategia adicional para la diversificación del repertorio de anticuerpos de un individuo es, durante la generación de linfocitos B de memoria, el cambio de clase de la región constante de la cadena pesada.

Los linfocitos B vírgenes clonalmente expandidos luego del encuentro con su antígeno específico sufrirán una diferenciación que incluye un proceso de recombinación génica que conduce a un cambio de la región constante expresada en el linfocito virgen original, por una región constante distinta (γ , α ó ϵ) en la cadena pesada del receptor clonotípico del linfocito B de memoria. De esta manera la asociación de una misma región variable (que mantiene la especificidad por el antígeno), a distintas regiones constantes pesadas conduce a un cambio en la función efectora de los anticuerpos, que difieren así en su capacidad para reclutar y activar distintos mecanismos efectores de la respuesta inmune humoral (figura 6-15).

La recombinación génica de cambio de clase es gatillada por señales accesorias de coestimulación linfocitaria (dependientes fundamentalmente de CD40/CD40L y citoquinas) e implica el reconocimiento de secuencias nucleotídicas Ss

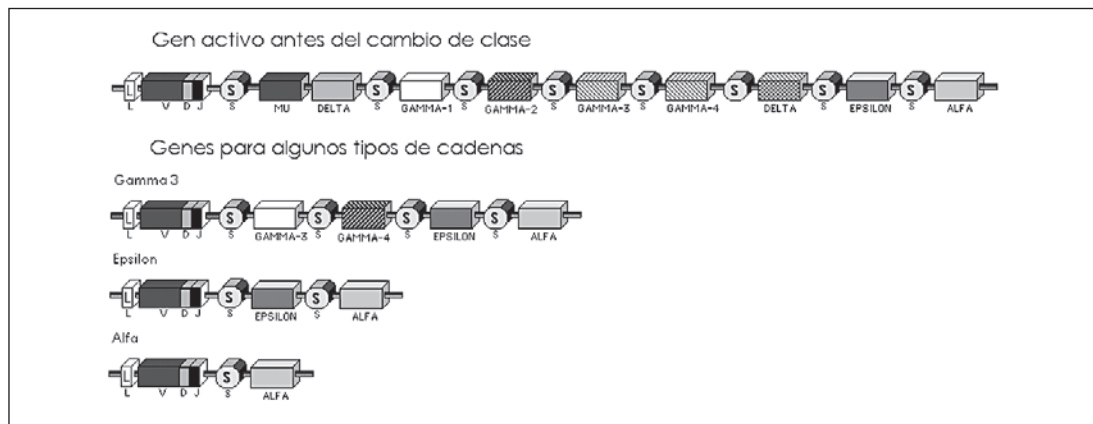


Figura 6-15. Cambio de clase de cadenas pesadas. Cuando un linfocito sintetiza cadenas mu o delta, el gen de las cadenas pesadas presenta la ordenación ilustrada en la parte superior de la figura. Las secuencias S intervienen en un proceso de recombinación que une la secuencia VDJ a una de los otros genes para la región constante. Decidida la clase, el DNA se transcribe y el RNA se procesa, formándose un mRNA específico para la región gamma-3, épsilon o alfa, según el ejemplo de la figura.

("Switching sequences") de 1 a 10 kb localizadas en el extremo 5' de cada segmento o gen constante pesado (excepto en el extremo 5' del gen δ).

En general las secuencias de "switching" tienen la forma (GAGCT) $_n$ GGGGT, donde el primer elemento está repetido en tándem de 1 a 7 veces y luego la secuencia completa está repetida hasta 150 veces en una región de DNA que ocupa de 1 a 10 kb y está ubicada entre 1 a 4 kb hacia arriba del extremo 5' del gen constante. El reordenamiento implica además la participación de una recombinasa de "switching" que no es sitio-específica porque la región Ss puede variar enormemente en longitud y los cortes en el DNA no necesariamente ocurren dentro de la región de cambio de clase.

Aunque los componentes de la recombinasa de "switching" no han sido claramente definidos, se ha logrado establecer que no incluye los productos de los genes RAG-1 y RAG-2 y que contiene componentes de la maquinaria de reparación del DNA celular y un complejo proteico denominado SWAP ("Switching Activation Protein") en el que se han identificado cuatro proteínas: nucleoplasmina, poli-ADP-ribosa polimerasa, nucleolina y la proteína SWAP-70.

El cambio de clase de cadenas pesadas es regulado de manera tal que diferentes citoquinas, producidas fundamentalmente por linfocitos T CD4+, promueven el cambio hacia un isotipo particular de inmunoglobulina. En humanos por ejemplo, la interleuquina-4 (IL-4) promueve el "switching" IgE, mientras que "Transforming

Growth Factor " beta (TGF- β) e IL-5 promueven el cambio hacia IgA. En ratones, el interferón gamma (IFN- γ) induce un cambio selectivo hacia IgG2a, que activa el sistema del complemento y promueve la fagocitosis de agentes infecciosos opsonizados por estos anticuerpos.

Por otra parte, dependiendo del sitio de entrada y la distribución del antígeno en el organismo, puede inducirse una respuesta inmune caracterizada por la síntesis de distintas clase de anticuerpos. Así un antígeno que ingresa a la circulación sanguínea o linfática inducirá la síntesis de distintos isotipos, mientras aquellos que ingresan por vía oral o respiratoria activan preferentemente inmunidad de mucosas caracterizada por la secreción de IgA. En algunos individuos existe además una clara predisposición genética (atopia) a desarrollar alergias como resultado de la síntesis y secreción de IL-4 e IL-5 que estimulan la producción de IgE y la diferenciación específica de eosinófilos, respectivamente.

En el hombre, el ordenamiento de genes para las regiones constantes de las cadenas pesadas en dirección 5' a 3' en el cromosoma 14 es el siguiente: mu, delta, gamma (1-4), épsilon y alfa (1-2). En el ratón, el cromosoma 12 presenta el orden: mu, delta, gamma-3, gamma-1, gamma-2b, gamma-2a, épsilon y alfa (figura 6-16)

7.3. Hipermutación somática

El proceso de recombinación V(D)J genera un repertorio primario de inmunoglobulinas el que,



luego del encuentro con el antígeno en los órganos linfoides secundarios, será enormemente diversificado en los centros germinales, a través de un proceso de mutación puntual en sus regiones hipervariables o CDRs. El microambiente particular de los centros germinales, no sólo favorece la expansión clonal de los linfocitos antígeno-específicos sino que también favorece el "switching" isotípico y la modificación paratópica de cadenas pesadas y livianas. Aquellos linfocitos en los cuales el proceso de hipermutación genera un receptor de mayor afinidad por el antígeno, serán selectivamente seleccionados para continuar su maduración en linfocitos B de memoria.

El nivel de mutación en las regiones hipervariables de una inmunoglobulina, se ha estimado en 10^{-3} pares de bases por generación, lo cual es seis órdenes de magnitud más alto que una mutación espontánea. Aunque la mayoría de estas mutaciones son cambios puntuales, se ha logrado establecer que las delecciones representan entre 4-7% de las mutaciones, mientras las duplicaciones representan casi el 1% de las modificaciones en las regiones hipervariables.

Las mutaciones parecen estar de alguna manera asociadas al proceso de transcripción y confinadas a un dominio de hipermutación ("HYM domain") que se extiende 2000 pares de bases (2 kb) hacia abajo, en dirección 5'-3' desde el promotor asociado a cada segmento V que se ha recombinado. Por otro lado, la hipermutación no parece ser un proceso al azar puesto que las transiciones son más frecuentes que las transversiones y los nucleótidos que contienen Adenina son más frecuentemente utilizados que aquéllos que contienen Timina.

La figura 6-3 muestra esquemáticamente la diferenciación celular del linfocito B en presencia del antígeno: activación, proliferación celular y cambio de clase.

7.4. Control de la transcripción de los genes de inmunoglobulinas

La regulación de la transcripción de los genes de Igs, es uno de los modelos mejor estudiados para entender la transcripción de genes que se expresan de manera tejido-específica y dependientes del estado de desarrollo. El mapeo de los genes de Igs, revela que cada uno contiene múltiples elementos regulatorios, promotores y estimuladores ("enhancers"), que son especialmente activos en linfocitos B.

Los promotores se ubican inmediatamente hacia el extremo 5' del segmento V que se va a transcribir. Su función consiste en garantizar transcripciones exactas y específicas, determinando dónde inicia la transcripción la ARN-polimerasa II. La organización básica de todos los promotores de inmunoglobulinas presenta dos secuencias ricas en adenina (A) y timina (T). Una de ellas está restringida sólo a tejido linfóide y tiene un elemento temático ("motif") de 8 nucleótidos, ATTTGCAT o la secuencia inversa. La otra secuencia, no es restringida ya que también se encuentra en otros linajes celulares, es la denominada TATA "box". Mutaciones de estas secuencias reducen drásticamente la transcripción de los genes de Igs.

Los "enhancers" son secuencias de DNA cuya función principal es aumentar la tasa de transcripción de los genes recombinados. A diferencia de los promotores, pueden actuar cuando están ubicados a distancia, ya sea río arriba (hacia el extremo 5') o río abajo (hacia el extremo 3'). Se han identificado en ratones y seres humanos, para locus de cadenas pesadas y livianas, demostrándose que algunos han sido muy conservados durante la evolución; es el caso de los denominados ENH_{IH} , y $ENH_{3'H}$ y ENH_{IK} . Por ejemplo en el ratón, se cree que una consecuencia de la recombinación VDJ es acercar al promotor ubicado hacia 5' de un gen V al "enhancer" localizado hacia 3' de los segmentos JH, permitiendo un inicio más eficiente de la transcripción.

Se han identificado factores nucleares que son activados por estímulos externos, y que se unen a "enhancer" de cadenas pesadas y livianas. Es el caso del factor llamado NF- κ B; reconoce un "motif" de 10 pares de bases llamado κ B que es crucial en la actividad de ENH_{IK} , puesto que mutaciones de κ B la eliminan. Las interacciones de estos factores proteicos entre sí, y con secuencias de DNA reguladoras, son críticos en la estimulación de la transcripción de genes específicos de inmunoglobulina en linfocitos B.

7.5. Estimación numérica de la diversidad de anticuerpos

Diversos mecanismos genéticos contribuyen a la diversidad de los anticuerpos: (i) múltiples genes V en la línea germinal, (ii) recombinación de los genes VJ en las cadenas livianas y VDJ en las cadenas pesadas, (iii) imprecisión en la recombinación, (iv) diversidad de región N, (v)



mutación somática, y (vi) combinación de las cadenas H y L.

El aporte estimado de los mecanismos más clásicos a la generación de la diversidad de los anticuerpos en el ratón, se resume en la tabla 6-3.

La formación de un gen activo en la región variable de la cadena pesada puede generar un número muy grande de posibilidades genéticas. En el hombre hay 80 genes V en la línea germinal y 6 genes J activos. Si se estima que los genes D se componen de 50 miembros, la recombinación somática VDJ puede generar, aproximadamente, unas 24.000 combinaciones genéticas diferentes (80x6x50). Si este número se multiplica por un factor de 100 debido a la flexibilidad recombinatoria, se obtiene un total de 2.400.000 cadenas diferentes.

En las cadenas livianas de tipo kappa, la unión de uno de los cientos de genes para región variables (más de 150) a uno de los cinco genes J, puede producir hasta 750 genes V activos diferentes (150x5). Por el mecanismo de flexibilidad combinatoria, el número potencial de recombinaciones VJ puede aumentar unas 10 veces la diversidad, llegando a ser de 7.500 cadenas L diferentes (150x5x10).

Si se considera la potencialidad para generar diversidad que poseen las cadenas H y L, resulta un total posible de 18.000 millones de anticuerpos (2.400.000 posibles cadenas H x 7.500 posibles cadenas L), generados a partir de sólo aproximadamente 300 segmentos génicos

distintos, localizados en la línea germinal.

Los linfocitos B periféricos no expresan simultáneamente todo el repertorio. Las células B maduras localizadas principalmente en los folículos linfoides primarios y secundarios, presentan una vida media de sólo algunas semanas, si no unen antígeno, mueren. Diariamente, la médula ósea libera a circulación más de 5×10^7 linfocitos B, de tal forma que se va renovando el “pool” de especificidades.

8. Edición del receptor linfocitario

La naturaleza aleatoria del reordenamiento génico, acoplada a la mayor complejidad proporcionada por la combinación de distintas cadenas pesadas y livianas, crea una enorme diversidad en el repertorio de anticuerpos que, aunque permite el reconocimiento de agentes infecciosos puede eventualmente contener receptores autorreactivos. Para evitar una eventual respuesta autoinmune el sistema inmune debe poner en marcha mecanismos que le permitan inducir tolerancia a antígenos propios: (i) la eliminación por apoptosis de las células autorreactivas (delección clonal), (ii) la inhibición de su actividad (anergia clonal), y (iii) la edición o modificación antígeno-dependiente del receptor linfocitario BCR, mediante un reordenamiento secundario de segmentos génicos, particularmente aquéllos que codifican cadenas livianas.

Aparentemente el fenómeno de edición del re-

Tabla 6-3. Estimación de la diversidad de anticuerpos en ratón, considerando algunos de los mecanismos genéticos involucrados

Mecanismo	Cadenas H	Cadenas L κ	Cadenas L λ
Genes de la línea germinal			
Segmentos V	250 - 1000	250	2
Segmentos J	4	4	3
Segmentos D	12	—	—
Recombinación somática			
V x J x D	10.000 - 40.000	1000	6
Asociación de cadenas H - L			
H x kappa		$1 - 4 \times 10^7$	
H x lambda		$5 - 10 \times 10^4$	
Potencial total de diversidad del repertorio		$10^9 - 10^{11}$	



ceptor linfocitario B, no sólo puede ocurrir a nivel central en el órgano linfóide primario, sino también en los órganos linfoides secundarios e implica la reexpresión de las proteínas RAG-1 y RAG-2.

9. Biosíntesis y ensamblaje de las inmunoglobulinas

Al igual que la mayoría de las proteínas de secreción y de membrana, las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas son sintetizadas en ribosomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER), donde los péptidos líderes son escindidos cotranslacionalmente.

La asociación covalente vía puentes disulfuro de cadenas H y L también se produce en el RER, donde además se agregan a los residuos de asparagina oligosacáridos ricos en manosa. Luego las Igs nacientes se dirigen a las cisternas del aparato de Golgi, donde los carbohidratos ricos en manosa se convierten en sus formas maduras (tipo O-unido y tipo N-unido) incorporando cadenas laterales de azúcares. Finalmente, las moléculas de inmunoglobulinas son transportadas a la membrana plasmática ancladas en vesículas y son secretadas por un fenómeno de pinocitosis inversa (figura 6-16).

Otros péptidos que se unen a la estructura básica de las inmunoglobulinas son regulados coordinadamente, como en el caso de las cadenas J (IgA e IgM).

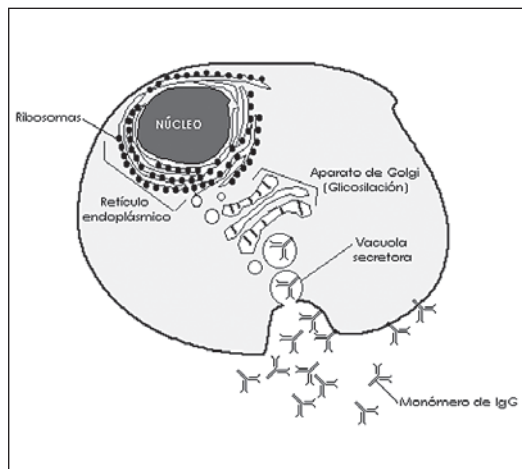


Figura 6-16. Biosíntesis y ensamblaje de las inmunoglobulinas. Las cadenas H y L de las inmunoglobulinas son sintetizadas y ensambladas vía puentes disulfuro en el RER, donde además se agregan oligosacáridos ricos en manosa, que posteriormente maduran en el aparato de Golgi incorporando otros azúcares. Las inmunoglobulinas son transportadas a la membrana plasmática ancladas a la membrana de vesículas y secretadas por pinocitosis inversa.

LECTURAS SUGERIDAS

Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S., **Cellular and Molecular Immunology**, Fourth Edition, W.B. Sanders Company, USA, Capítulos 3, 9 y 14, 2000.

Bishop, G.A., Hostager, B.S., "B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes". *Curr. Opin. Immunol.* 13: 278-285, 2001.

Davies, D.R., Matzger, H., "Structural basis of antibody function", *Ann. Rev. Immunol.*, 1: 87 - 117, 1983.

Durandy, A., Honjo, T., "Human genetic-defects in class-switch recombination (hyper-IgM síndromes)", *Curr. Opin. Immunol.* 13: 543-548, 2001.

Fagarasan, S., Honjo, T., "T-independent Immune Response: New Aspects of B Cell Biology", *Science* 290: 89-92, 2000.

Fearon, D.T., Carroll, M.C., "Regulation of B Lymphocytes Response to Foreign and Self-antigens by the CD19/CD21 Complex", *Annu. Rev. Immunol.* 18: 393-422, 2001.

Fugmann, S.D.; Lee, A.I.; Shickett, P.E.; Villey, I.J.; Schatz, D.G., "The RAG Proteins and V(D)J Recombination: Complexes, Ends and Transposition", *Annu. Rev. Immunol.* 18: 495-527, 2000.

Grawunder, U., Harfst, E., "How to make ends meet in V(D)J recombination", *Curr. Opin. Immunol.*, 13: 186-194, 2001.

Hayakawa, K., Ardí, R.R., "Development and function of B-1 cells", *Curr. Opin. Immunol.* 12: 346-353, 2000.

Jacobs, H., Bross, L., "Towards an understanding of somatic hypermutation", *Curr. Opin. Immunol.* 13: 208-218, 2001.

Kurosaki, T., "Functional dissection of BCR signalling pathways", *Curr. Opin. Immunol.* 12: 276-281, 2000.



Lefranc, M.P., "Locus Map and Genomic Repertoire of Human Ig Genes", *Immunologist* 8: 80-87, 2000.

Martín, F., Kearney, J.F., "B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets", *Curr. Opin. Immunol.* 13: 195-201, 2001.

Matsuuchi, L., Gold., M.R., "New views of BCR structure and organization", *Curr. Opin. Immunol.* 13: 270-277, 2001.

Moshous, P. et al., "Artemis, a Novel DNA Double-Strand-Break Repair/V(D)J Recombination Protein, Is Mutated in Human Severe Combined Immune Deficiency", *Cell* 105: 177-186, 2001.

Mostov, K.E., "Transepithelial transport of immunoglobulins", *Ann. Rev. Immunol.* 12: 63-84, 1994.

Paul, W., **Fundamental Immunology**, Fourth Edition, Raven Press, USA, Capítulos 3, 4, 5, 6 y 7, 1999.

Roos, A., et al., "Human IgA activates the Complement System Via the Mannan-Binding Lectin Pathway", *J. Immunol.* 167: 2861-2868, 2001.

Schamel, W.W.A., Reth, M., "Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor", *Immun.* 13: 5-14, 2000.

Van Parijs, L., Abbas, A.K., "Homeostasis and Self-Tolerance in the Immune System: Turning Lymphocytes Off", *Science* 280: 243-248, 1998.

Wagner S.D., Neuberger M.S., "Somatic hypermutation of immunoglobulin genes", *Ann. Rev. Immunol.* 14: 441 - 457, 1996.





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Roseblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 7

RECEPTOR DE LINFOCITOS T Y SEÑALES ACCESORIAS DE COESTIMULACIÓN

Ulises Vergara C. e Iván Palomo G.

- | | |
|--|---|
| 1. Introducción | 5. Genética molecular del receptor T |
| 2. Estructura del receptor T | 5.1. Genes de cadenas TCR α , TCR β ,
TCR γ y TCR δ |
| 2.1. TCR $\alpha\beta$ | 5.1.1. Genes de cadenas TCR α |
| 2.2. TCR $\gamma\delta$ | 5.1.2. Genes de cadenas TCR β |
| 3. Estructura y función del complejo CD3 | 5.1.3. Genes de cadenas TCR γ |
| 4. Receptor T y reconocimiento antigénico. | 5.1.4. Genes de cadenas TCR δ |
| 4.1. Linfocitos TCD4, linfocitos TCD8 y restricción MHC | 5.2. Reordenamiento génico |
| 4.2. Células TNK (Linfocitos T $\alpha\beta$ NK1.1 o NKT). | 6. Linfocitos T y señales accesorias de coestimulación |
| | 7. Homeostasis linfocitaria y desarrollo post-tímico de linfocitos T |





RESUMEN

Así como los linfocitos B reconocen el antígeno a través de receptores BCR, los linfocitos T lo hacen a través de receptores TCR. Éstos son heterodímeros $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ que reconocen péptidos antigénicos unidos a moléculas MHC (de clase I o II) o antígenos glicolipídicos unidos a moléculas CD1. Los receptores T se expresan asociados al complejo CD3, que entre otras funciones, participa en la transducción de señales de activación de la célula, una vez que el TCR ha reconocido el antígeno.

El capítulo se refiere además al fenómeno de restricción MHC. Por otra parte, se describe la subpoblación de linfocitos $T\alpha\beta$, denominada células TNK, las cuales pueden ser CD4+, CD8+, o CD4- y CD8-, y presentan marcadores de células NK.

En humanos los segmentos génicos que codifican para las cadenas $TCR\alpha$ y $TCR\delta$ se encuentran en el cromosoma 14 y los de las cadenas $TCR\beta$ y $TCR\gamma$ en el cromosoma 7. El capítulo revisa en detalle los mecanismos de variabilidad genética del TCR, los que son similares a los descritos para BCR. La diversidad del repertorio linfocitario T se ha estimado más elevada (10^{18}) que la del repertorio linfocitario B (10^{14}). Los segmentos génicos que codifican para las cadenas $TCR\beta$ se reordenan primero que los segmentos génicos para cadenas $TCR\alpha$; en las células B se reordenan primero los segmentos génicos de cadenas pesadas y luego aquellos de las cadenas livianas. Al igual que en el reordenamiento génico de las inmunoglobulinas, en el reordenamiento de segmentos génicos de cadenas del TCR también existen los fenómenos de exclusión alélica y exclusión isotípica ($T\alpha\beta$ versus $T\gamma\delta$).

Las células T, además del TCR y de las moléculas CD4 o CD8, expresan otros receptores de membrana que resultan importantes en la transducción de señales accesorias de coestimulación, en la estabilidad de la interacción linfocito T-célula presentadora de antígeno, o en el reclutamiento, recirculación y "homing" linfocitario. Entre estos receptores se encuentran: CD28, CD40L, CD2, LFA-1 y CD45.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de una respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos, se asocia primariamente a los linfocitos B y requiere el reconocimiento antigénico por el receptor (BCR) de linfocitos B específicos. El desarrollo de una respuesta inmune celular en cambio, se asocia a linfocitos T y requiere el reconocimiento antigénico por el receptor (TCR, "T cell receptor") de linfocitos T específicos.

Los mecanismos efectores humoral y celular de respuesta inmune resultan entonces de la selección, activación y expansión clonal de dos poblaciones linfocitarias distintas, que utilizan mecanismos y receptores distintos de reconocimiento antigénico. Así, mientras el repertorio linfocitario B puede reconocer directamente antígenos solubles o de membrana de muy diversa naturaleza química (proteínas, carbohidratos,

lípidos, ácidos nucleicos, haptenos), el repertorio de receptores linfocitarios T reconoce fundamentalmente proteínas antigénicas en forma de fragmentos peptídicos unidos a moléculas de presentación MHC ("Major Histocompatibility Complex") o antígenos glicolipídicos unidos a moléculas de presentación CD1, expresadas en la membrana de células presentadoras de antígeno (ver capítulo 9).

En el repertorio linfocitario B (estimado en 10^{14} linfocitos B distintos) se distinguen al menos dos subpoblaciones celulares, denominadas B1 y B2, que presentan características estructurales y funcionales distintas y se generan a diferentes edades durante la ontogenia linfocitaria. La subpoblación B1 se desarrolla durante la vida fetal/neonatal, presenta receptores polirreactivos de baja afinidad, se asocia a la producción de anticuerpos naturales T-independientes y se encuentra mayoritariamente en las cavidades



peritoneal y pleural. La subpoblación linfocitaria B2 que se genera a partir de células progenitoras de la médula ósea adulta, constituye la mayor parte del repertorio linfocitario B, su activación es linfocito T-dependiente y se encuentra, fundamentalmente, en los órganos linfoides secundarios y en el torrente sanguíneo.

En el repertorio linfocitario T (estimado en 10^{18} linfocitos T distintos) se distinguen también dos subpoblaciones celulares, denominadas linfocitos $T\alpha\beta$ y linfocitos $T\gamma\delta$, que presentan TCR con características estructural y funcionalmente distintas. Entre los linfocitos $T\alpha\beta$ se distinguen además 3 subpoblaciones celulares distintas denominadas linfocitos $T CD4^+$, linfocitos $T CD8^+$ y linfocitos TNK. Los linfocitos TNK (denominados también células NKT: "natural killer T cells"), corresponden a una subpoblación linfocitaria $T\alpha\beta$, que presenta marcadores o receptores propios de células NK ("natural killer").

2. ESTRUCTURA DEL RECEPTOR T

En el receptor de un linfocito B se distinguen dos subunidades, estructural y funcionalmente distintas: el receptor clonotípico representado por una inmunoglobulina de membrana (responsable del reconocimiento antigénico) y el complejo accesorio $Ig\alpha/Ig\beta$, responsable del transporte y expresión del BCR en la membrana y de la transducción de señales de activación cuando el receptor clonotípico une específicamente un antígeno.

De manera similar, en el receptor de un linfocito T se describen también dos subunidades estructural y funcionalmente distintas: el receptor clonotípico $T\alpha\beta$ o $T\gamma\delta$ (responsable del reconocimiento específico del antígeno) y el complejo accesorio CD3, responsable del transporte y expresión del TCR en la membrana y de la transducción de señales de activación cuando el receptor clonotípico T une específicamente su antígeno.

El receptor clonotípico TCR es un heterodímero $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ formado por dos cadenas glicoproteicas de 40 a 60 kDa, covalentemente unidas entre sí por puentes disulfuro. Como ocurre en los linfocitos B, este receptor tiene una distribución clonal, indicando que clones linfocitarios con distinta especificidad antigénica expresarán distintos TCR. De la misma manera, la región variable de los componentes clonotípicos del receptor TCR presenta, como en las inmunoglobulinas, tres regiones CDR que en el caso de los linfocitos $T\alpha\beta$,

reconocerán un complejo formado por un fragmento peptídico alojado en el bolsillo de presentación de una molécula MHC, o un antígeno glicolipídico unido a una molécula CD1. La mayoría de los linfocitos $T\gamma\delta$ no reconocen el antígeno en la forma de un complejo MHC-peptido, aunque moléculas MHC-Ib no clásicas (como CD1, H-2M3 y $Q\alpha$ de ratón) pueden presentar ciertos antígenos a esta subpoblación de LT. Además algunos linfocitos $T\gamma\delta$ pueden reconocer directamente al antígeno, de la misma manera como hacen los linfocitos B.

Linfocitos $T\gamma\delta$ y $T\alpha\beta$ recombinan su DNA y expresan su receptor clonotípico, en momentos distintos durante la ontogenia linfocitaria tímica. Así, linfocitos $T\gamma\delta$ emergen tempranamente desde el timo y expresan un receptor denominado TCR1 que se genera antes que el receptor TCR2, cuya expresión está limitada a los linfocitos $T\alpha\beta$, que maduran más tardíamente en el órgano linfóide primario. Aunque el timo es el principal sitio anatómico de desarrollo linfocitario T, se ha descrito en el intestino la existencia de una línea celular T distinta, generada extratímicamente a partir de precursores celulares presentes en la lámina propia intestinal.

2.1. TCR $\alpha\beta$

El 90 a 95% de los clones presentes en el repertorio linfocitario expresan copias múltiples de un receptor $T\alpha\beta$, constituido por las glicoproteínas α y β covalentemente unidas entre sí por enlaces disulfuro (figura 7-1) y no covalentemente unidas al complejo accesorio CD3 (figura 7-2) (ver punto 3).

La cadena α es una glicoproteína ácida de 40-50 kDa y la cadena β es una glicoproteína básica o neutra de 40-45 kDa. Ambas cadenas tienen similitud estructural con las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas, presentando una región o dominio variable aminoterminal de 102-119 aminoácidos ($V\alpha$ y $V\beta$) y un dominio constante carboxiterminal de 138 a 170 aminoácidos ($C\alpha$ y $C\beta$, respectivamente). Tal como ocurre con los linfocitos B, la diversidad y especificidad del TCR están dadas fundamentalmente por las regiones hipervariables o determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 de los dominios $V\alpha$ y $V\beta$, que se asocian y configuran de manera tal que se forma un único paratopo T, que presenta por el antígeno una afinidad entre 10^{-5} y 10^{-7} M, en los distintos clones linfocitarios $T\alpha\beta$.

En la región constante carboxiterminal de las cadenas $T\alpha$ y $T\beta$ (o $T\gamma$ y $T\delta$), se distinguen 4 domi-

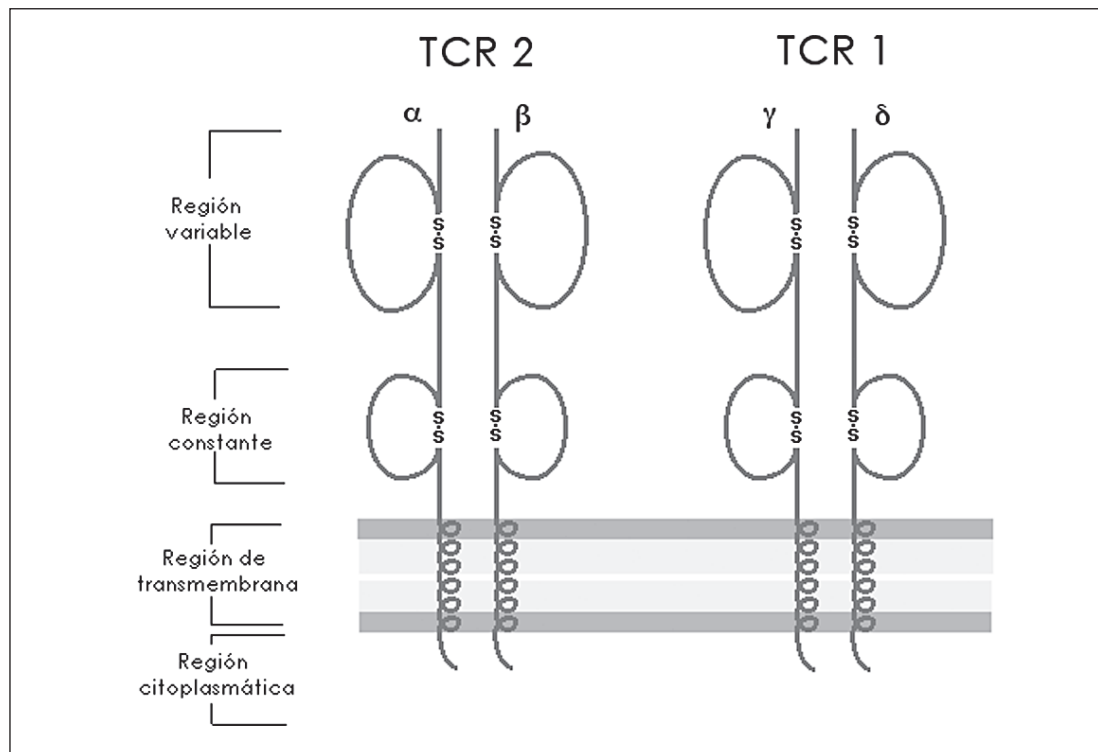


Figura 7-1. Estructura esquemática del receptor linfocitario T. El receptor TCR está formado por dos cadenas polipeptídicas covalentemente unidas entre sí por puentes disulfuro. Los receptores TCR2 presentan cadenas α y β , los TCR1 cadenas γ y δ . En cada una de las cadenas α y β (o γ/δ), existe un dominio variable aminoterminal y un dominio constante carboxiterminal, de manera similar a lo que ocurre en las cadenas pesadas y livianas del receptor linfocitario B (BCR).

nios estructural y funcionalmente distintos: a) un dominio constante extracelular hacia el extremo aminoterminal y que forma un “loop” semejante a los dominios constantes de inmunoglobulinas; b)

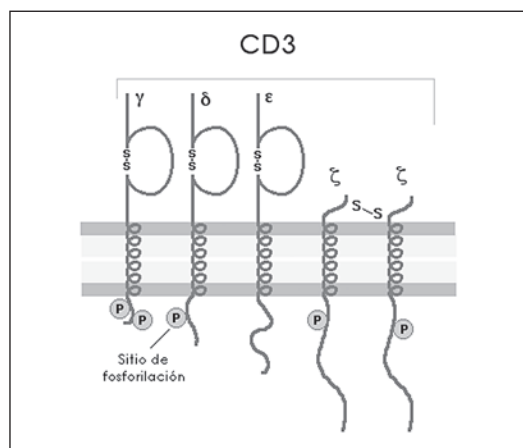


Figura 7.2. Complejo CD3. El complejo CD3 está constituido por cinco proteínas transmembrana denominadas γ , δ , ϵ , y $\zeta\zeta$ (o $\zeta\eta$). El complejo CD3 está funcionalmente asociado con la expresión del TCR en la membrana y con la transducción de señales de activación, luego del reconocimiento antigénico.

una región bisagra inmediatamente por fuera de la membrana plasmática linfocitaria y que contiene el enlace disulfuro que une el heterodímero $\alpha\beta$ del receptor clonotípico $T\alpha\beta$; c) un dominio hidrofóbico transmembrana de 20 a 25 aminoácidos y que incluye residuos polares conservados como arginina y lisina, que permiten la unión no covalente con residuos de ácido glutámico y ácido aspártico negativamente cargados del complejo accesorio CD3; d) un dominio citoplasmático carboxiterminal, de 5 a 12 aminoácidos.

2.2. TCR $\gamma\delta$

Entre los linfocitos $T\gamma\delta$ pueden distinguirse diferentes subpoblaciones celulares que se desarrollan en momentos distintos de la ontogenia linfocitaria; expresan distintos dominios variables $\gamma\delta$ y tienen distinta distribución tisular periférica. En ratones por ejemplo, los linfocitos $T\gamma\delta$ que se encuentran en la piel, se desarrollan neonatalmente y expresan regiones variables distintas de los linfocitos $T\gamma\delta$ que se encuentran en vagina, útero y lengua, que se diferencian más tardíamente en el timo.



Los linfocitos $T\gamma\delta$ constituyen entre 5 a 10% del repertorio linfocitario T en sangre periférica, bazo y ganglios linfáticos de humanos, ratones y aves; pero pueden representar hasta el 50% de los linfocitos intraepiteliales en piel y mucosas intestinal y génitourinaria murina. En ovejas, los linfocitos $T\gamma\delta$ pueden representar hasta el 30% de los linfocitos T periféricos.

Las cadenas γ (45-55 kDa) y δ (40-50 kDa) de receptor clonotípico $T\gamma\delta$, son glicoproteínas de membrana con estructura similar a las cadenas α y β del receptor $T\alpha\beta$. Ambas presentan un dominio variable aminoterminal y un dominio constante carboxiterminal que incluye una región bisagra, un dominio transmembrana, y una corta cola citoplasmática. Las distintas regiones γ y δ presentan características similares a las descritas para las cadenas polipépticas del receptor $T\alpha\beta$ (figura 7-1).

3. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL COMPLEJO CD3

Los receptores clonotípicos $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$ se expresan asociados de manera no covalente, al complejo accesorio CD3, que representa la subunidad responsable del transporte y expresión del TCR en la membrana y de la transducción de señales de activación, luego del reconocimiento antigénico por el receptor clonotípico T.

El complejo CD3 está constituido por cinco proteínas denominadas γ , δ , ϵ , ζ y η de 25, 20, 20, 16 y 22 kDa, respectivamente (figuras 7-3 y 7-4). Las proteínas del complejo CD3 se asocian entre sí de manera tal que se forman tres dímeros dis-

tintos, dos de los cuales corresponden a los heterodímeros $\gamma\delta$ y $\delta\epsilon$. En aproximadamente el 90% de los linfocitos T, el tercer dímero corresponde al homodímero $\zeta\zeta$ y sólo el 10 % de los linfocitos T periféricos expresan el heterodímero $\zeta\eta$. Los dominios transmembrana de cada una de las proteínas del complejo CD3 contienen residuos aminoacídicos negativamente cargados, que se asocian no covalentemente con residuos transmembrana positivamente cargados de los receptores clonotípicos $T\alpha\beta$ o $T\gamma\delta$.

4. RECEPTOR T Y RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO

Los linfocitos $T\alpha\beta$ MHC-restringidos, expresan receptores clonotípicos que sólo reconocen fragmentos peptídicos presentados por moléculas MHC de clase I o de clase II, en la superficie de las células presentadoras profesionales y otras células (figura 7-4). Los linfocitos $T\alpha\beta$ CD1-restringidos, expresan en cambio receptores clonotípicos que sólo reconocen antígenos glicolipídicos, asociados a moléculas de presentación CD1, expresadas en la membrana de células presentadoras profesionales (células dendríticas, macrófagos y linfocitos B).

Linfocitos T citotóxicos $T\alpha\beta$ reconocen antígenos MHC clase I-restringidos y son primariamente responsables de la eliminación de células infectadas con virus o bacterias intracelulares. Para la mayoría de las células, los antígenos MHC clase I-restringidos, derivan de proteínas sintetizadas en el citoplasma de la misma célula, exis-

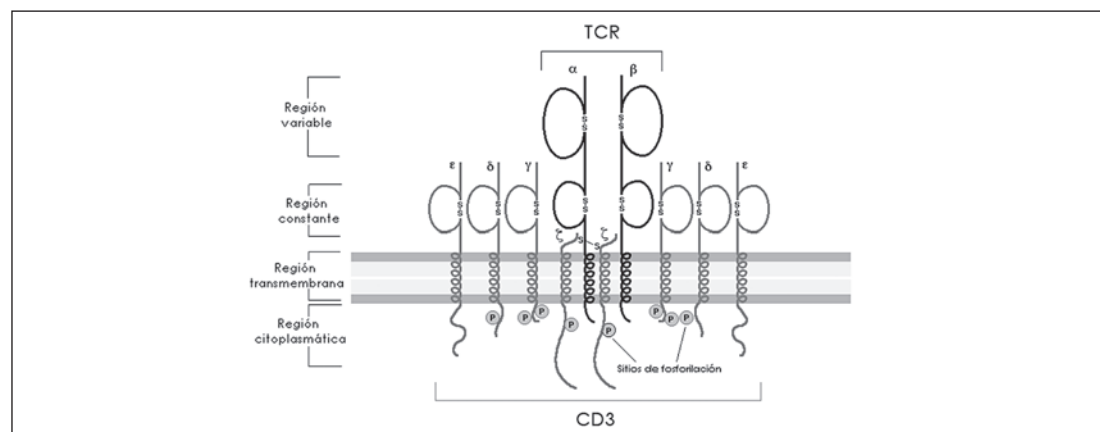


Figura 7-3. Relación estructural TCR-CD3. La asociación entre TCR y del CD3 es no covalente. Se produce una interacción electrostática entre aminoácidos transmembrana con carga positiva del TCR, con aminoácidos negativamente cargados del complejo CD3. Existen enlaces disulfuro entre las cadenas $\alpha\beta$ (o $\gamma\delta$) del receptor T, y entre los homo o heterodímeros formados por las cadenas ζ y η .

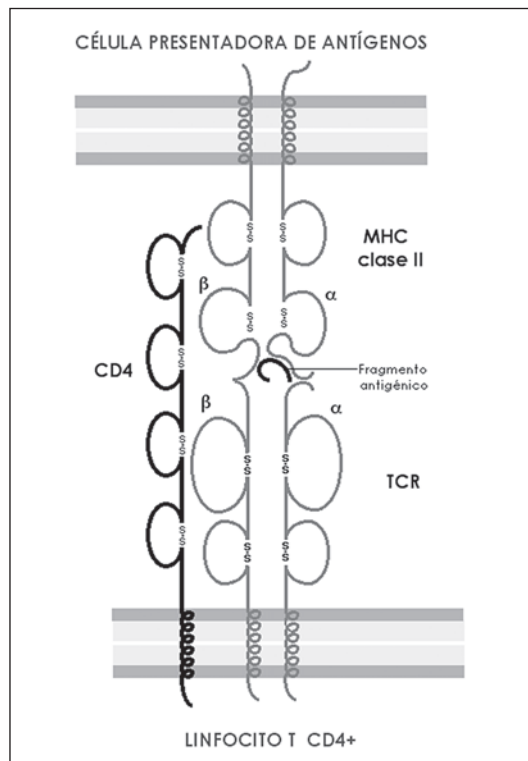


Figura 7-4. TCR $\alpha\beta$ y reconocimiento antigénico MHC-clase II-restringido. El receptor linfocitario T $\alpha\beta$, reconoce el complejo molecular MHC-fragmento peptídico. La molécula CD4 actúa como co-receptor reconociendo una región conservada, en cadena β de la molécula MHC de clase II.

tiendo un acceso limitado de antígenos exógenos a esta vía endógena de procesamiento y presentación antigénica. Sin embargo, existe una subpoblación de células presentadoras (particularmente células dendríticas) que pueden capturar antígenos exógenos tejido específicos en la periferia y presentarlos, asociados a moléculas MHC de clase I, a linfocitos T citotóxicos en los ganglios linfáticos, mediante un mecanismo de presentación cruzada (“cross-priming”). Además, en infecciones con *Mycobacterium tuberculosis*, se activan también linfocitos citotóxicos T $\alpha\beta$ CD1-restringidos que reconocen glicolípidos bacterianos y linfocitos citotóxicos T $\gamma\delta$ que reconocen ligandos fosforilados.

Las células dendríticas son células de origen medular que están normalmente presentes en un estado inmaduro en epitelios y tejidos periféricos. Estas células dendríticas son capaces de una efectiva fagocitosis de células apoptóticas y de endocitosis y macropinocitosis de antígenos solubles, pero no expresan moléculas MHC y ligandos coestimuladores, en los niveles requeridos para la activación de linfocitos T. Esta forma de incorporación antigénica por células inmaduras, resulta en un mayor y mejor “cross-priming” de antígenos exógenos en el contexto de moléculas MHC de clase I por células dendríticas maduras, lo que re-

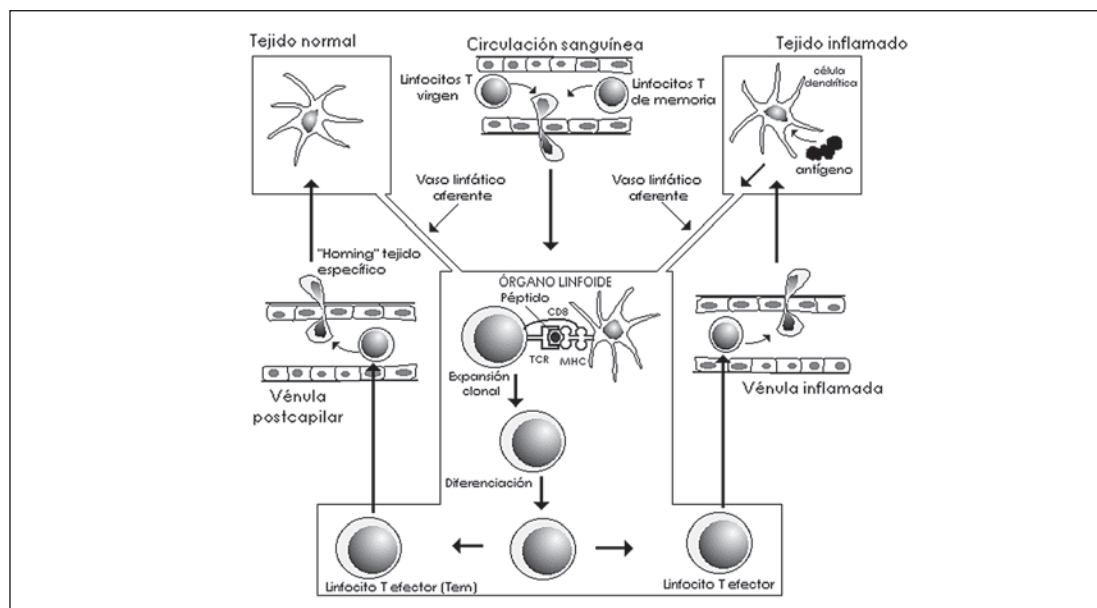


Figura 7-5. Migración de células dendríticas y linfocitos T. Células dendríticas inmaduras capturan antígenos en los tejidos periféricos y migran a los tejidos linfoides convirtiéndose en células maduras que expresan altos niveles de moléculas MHC y ligandos coestimuladores para los linfocitos T. Los linfocitos se movilizan desde el torrente sanguíneo a los órganos linfoides secundarios y luego de su activación y expansión clonal se diferencian en linfocitos T efectores y linfocitos T de memoria central (T_{MC}) y linfocitos de memoria efectores (T_{EM}).





sulta fundamental, tanto para el desarrollo de una respuesta inmune dependiente de linfocitos T citotóxicos, como para la inducción de tolerancia a lo propio.

En respuesta a un estímulo inflamatorio (generalmente proporcionado por citoquinas proinflamatorias o productos bacterianos), las células dendríticas inmaduras capturan material antigénico en la periferia (microorganismos, células apoptóticas y detritus celulares) e inician su diferenciación en células maduras que pierden sus receptores para quimioquinas inflamatorias y aumentan la expresión de receptores para quimioquinas de tejidos linfoides. Las células dendríticas en maduración se movilizan hacia los órganos linfoides secundarios donde culminan su diferenciación expresando altos niveles de moléculas MHC y ligandos coestimuladores que las convierten en células maduras extraordinariamente eficientes en la presentación de antígenos a linfocitos T vírgenes (figura 7-5). Mediante la secreción de distintos patrones de citoquinas, las células dendríticas maduras inducen y regulan la respuesta inmune promoviendo la activación y diferenciación de linfocitos T, la expansión clonal de linfocitos B, la producción de anticuerpos y la estimulación de la actividad citotóxica de células NK y la producción de IFN- γ .

Los linfocitos T vírgenes se movilizan desde el torrente circulatorio a las regiones T de los órganos linfoides secundarios, en busca de antígenos presentados por células dendríticas. Como consecuencia de su estimulación, los linfocitos T proliferan por expansión clonal y se diferencian en células efectoras que expresan receptores que les permiten luego migrar a las áreas de linfocitos B del órgano linfoide secundario o hacia los sitios de inflamación en los tejidos periféricos. Aún cuando la mayoría de los linfocitos T efectoras son de corta vida media, unos pocos sobreviven durante varios años como linfocitos T de memoria que pueden separarse en dos subpoblaciones de acuerdo a sus habilidades migratorias: (i) las llamadas células efectoras de memoria (T_{EM}), migran a los tejidos periféricos y (ii) las denominadas células T de memoria central (T_{CM}), permanecen en circulación. Esta última subpoblación expresa receptores de "homing" similares a los de linfocitos T vírgenes que les permite migrar preferentemente a los órganos linfoides secundarios donde, luego de una reestimulación con el antígeno, inducirán el desarrollo de una respuesta inmune secundaria y la

generación de nuevos linfocitos T de memoria.

Se ha sugerido que la expresión de CCR7, un receptor para las quimioquinas MIP ("Macrophage Inflammatory Protein") y SLC ("Secondary Lymphoid Chemokine") controla el "homing" a órganos linfoides secundarios y permite separar los linfocitos de memoria T efectoras (CCR7-) que tienen función efectora inmediata y representan la primera línea de defensa inmune específica, de los linfocitos de memoria centrales CCR7+ que carecen de función efectora inmediata pero patrullan los órganos periféricos y constituyen la línea defensiva de reserva. Los linfocitos T efectoras CCR7- producen citoquinas efectoras como IFN- γ , IL-4, IL-5 o expresan perforina (linfocitos T citotóxicos).

4.1. Linfocitos T CD4, Linfocitos T CD8 y restricción MHC

Linfocitos $T\alpha\beta$ parecen reconocer sólo fragmentos peptídicos presentados en asociación con moléculas MHC o fragmentos glicolipídicos presentados en asociación con moléculas CD1, en la superficie de células presentadoras profesionales. Este fenómeno se explica como resultado del proceso de "educación tímica" que permite que durante la diferenciación en este órgano linfoide primario, precursores linfocitarios T sean positivamente seleccionados en función de su capacidad para reconocer antígenos asociados a moléculas de presentación antigénica en la membrana de células del epitelio tímico.

La mayoría de los linfocitos periféricos $T\alpha\beta$, son linfocitos MHC restringidos que expresan el correceptor CD4 o el correceptor CD8, y han sido positivamente seleccionados en función de su capacidad para reconocer sólo fragmentos peptídicos asociados a moléculas MHC de clase I (linfocitos $T\alpha\beta$ CD8+) o fragmentos peptídicos asociados a moléculas MHC de clase II (linfocitos $T\alpha\beta$ CD4+) (figura 7-6).

El correceptor CD4 es una glicoproteína transmembrana de 55 kDa que se expresa en aproximadamente el 65% de los linfocitos periféricos $T\alpha\beta$; reconoce una región conservada ($\beta 2$) de la molécula MHC de clase II y transduce señales accesorias de coestimulación linfocitaria T.

El correceptor CD8 es un heterodímero $\alpha\alpha$ o un heterodímero $\alpha\beta$, de 78 kDa, que se expresa en aproximadamente el 35% de los linfocitos $T\alpha\beta$ de sangre y tejido linfoide periférico, reconoce una región conservada ($\alpha 3$) de la molécula MHC de

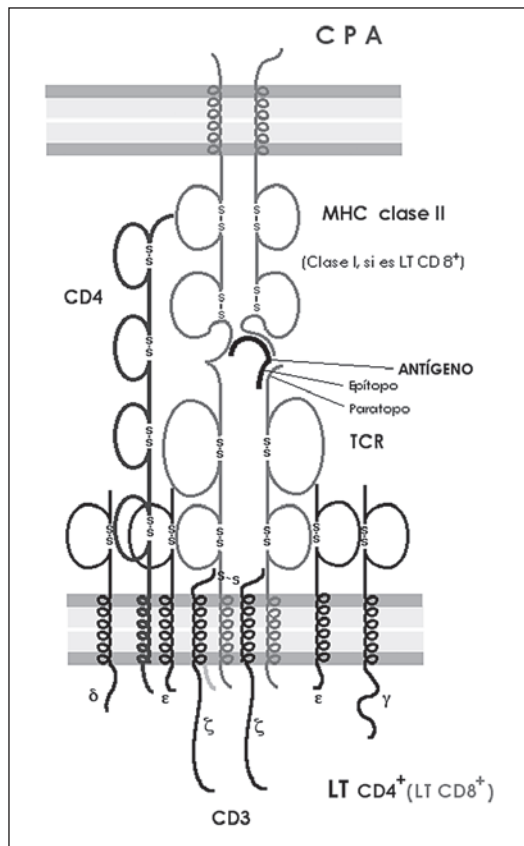


Figura 7-6. Estructura del receptor de la célula T, complejo CD3 e interacción con el complejo MHC-peptido.

clase I y transduce señales accesorias de coestimulación linfocitaria T, luego de su interacción con la molécula MHC de clase I.

Los linfocitos T CD4⁺ expresan funciones de colaboración o “helper” por medio de citoquinas que activan macrófagos y/o linfocitos B, mientras los linfocitos T CD8⁺ actúan primariamente como células citotóxicas que destruyen las células infectadas.

Los linfocitos T CD4⁺ MHC de clase II-restringidos desempeñan un rol muy importante en la inmunidad protectora contra bacterias y protozoos, mientras los linfocitos T CD8⁺ MHC de clase I-restringidos resultan fundamentales en la respuesta inmune contra infecciones virales. Sin embargo, la respuesta inmune contra bacterias intracelulares involucra la participación no sólo de linfocitos T CD4⁺ MHC-II restringidos, sino también de diversas subpoblaciones linfocitarias entre las que se encuentran células T CD8⁺ MHC-I restringidos, linfocitos T $\gamma\delta$ que reconocen fosfoligandos en ausencia de células presentadoras de antígeno y finalmente, linfocitos

T $\alpha\beta$ restringidos por moléculas MHC de clase Ib y linfocitos T $\alpha\beta$ y T $\gamma\delta$ restringidos por moléculas CD1 que reconocen ligandos bacterianos altamente conservados.

Durante mucho tiempo se pensó que los linfocitos T sólo reconocían fragmentos peptídicos presentados por moléculas MHC de clase I o de clase II. Sin embargo, el descubrimiento de las moléculas CD1 que presentan ligandos glicolipídicos, ha permitido la identificación de subpoblaciones linfocitarias T $\alpha\beta$ CD1-restringidas: TCD4⁺, TCD8⁺, TCD4⁻, CD8⁻ (TDN o doble negativos) y de linfocitos T β NK1.1 (células TNK o NKT), que constituyen poblaciones celulares heterogéneas presentes en diferentes tejidos.

Las moléculas CD1 se expresan predominantemente en células presentadoras profesionales e incluyen 4 moléculas distintas en humanos (CD1a, CD1b, CD1c y CD1d) y sólo una en ratones (CD1d). Las moléculas son similares a las moléculas MHC de clase I, están no covalentemente unidas a la β 2-microglobulina, pero su bolsillo de presentación antigénica es más estrecho y más profundo que el de las moléculas MHC y une su ligando glicolipídico mediante interacciones hidrofóbicas.

Las moléculas CD1a, b y c (grupo I) se expresan en timocitos corticales y células dendríticas, mientras las moléculas CD1d (grupo II) se encuentran principalmente en células epiteliales, timocitos corticales, hepatocitos y células presentadoras de antígeno profesionales (células dendríticas, macrófagos y linfocitos B). Glicolípidos como fosfatidil inositol manósido (PIM), lipoarabino manan (LAM), ácido micólico y hexosil-1-fosfo-isoprenoide, son presentados a linfocitos T $\alpha\beta$, por moléculas CD1 del grupo I (tabla 7-1). Tanto en humanos como en ratón, se ha descrito que las moléculas CD1d presentan α -galactosil ceramida existente en esponjas marinas.

4.2. Células TNK

Las células TNK (linfocitos T $\alpha\beta$ NK1.1 o NKT) corresponden a una subpoblación heterogénea de linfocitos T $\alpha\beta$, que presentan marcadores propios de las células NK o “natural killer” e incluye células TNK CD4⁺, células TNK/CD8⁺ y células TNK DN (CD4⁻ CD8⁻) que presentan distinta distribución tisular (timo, hígado, bazo, ganglios linfáticos y médula ósea). El marcador NK1.1 corresponde a NKR1C o CD161.



Tabla 7-1. Antígenos lipídicos presentados por moléculas CD1 humanas

Antígeno	Linfocitos T	Molécula CD1
Glicolípidos bacterianos		
Lípidos no definidos	Tαβ	CD1a
Lipoarabinomanan (LAM)	Tαβ	CD1b
Glucosa monomicolato	Tαβ	CD1b
Fosfatidil inositol (PI)	Tαβ	CD1b
Hexoxil 1- fosfoisoprenoide	Tαβ	CD1c
Glicolípidos autólogos		
Lípidos no definidos	Tαβ	CD1a
Gangliósidos cerebrales	Tαβ	CD1b
Lípidos no definidos	Tαβ y Tγδ	CD1c
Lípidos no definidos	TNK	CD1d
Otras moléculas		
A-Galactosil Ceramida	TNK	CD1d

La diversidad de su receptor Tαβ es bastante restringida y limitada a la expresión de unas pocas cadenas TCRα (Vβ8-2, Vβ7, Vβ2 y Vα14Ja281 en el ratón y de sus equivalentes Vβ11 y Vα24JaQ en humanos), que resultan CD1d restringidas. La proporción de células TNK varía en diferentes tejidos y representan subpoblaciones funcionalmente distintas en el hígado (30-50%), médula ósea (20-30%) y timo (10-20%), y son menos frecuentes en órganos como bazo (3%), ganglios linfáticos (0,3%), sangre periférica (4%) y pulmón (7%).

Las células TNK CD4+ y TNK DN parecen ser de origen tímico, puesto que no se desarrollan en ratones atímicos o en ratones neonatalmente timectomizados. Las células TNK CD8+ en cambio, parecen tener un origen extratímico, puesto que se encuentran normalmente en la periferia en ratones timectomizados neonatalmente.

Las células TNK constituyen una subpoblación linfocitaria heterogénea en la que es posible encontrar células CD1-restringidas y células MHC-restringidas (estas últimas expresan TCR de mayor diversidad), que tienen la capacidad de secretar diferentes citoquinas (IL-4, IFN-γ, TNF), dependiendo del microambiente tisular. La producción de altos niveles de IL-4 e IFN-γ, sugieren un rol regulador en el desarrollo de las respuestas Th1 y Th2 dependientes. El desarrollo de una respuesta Th2 sería estimulada a través de

la secreción de IL-4. El desarrollo de una respuesta Th1 sería inhibida mediante la secreción de IL-4, IL-10 y TGF-β. Las células TNK también producen altos niveles de quimioquinas, tales como MIP-α y MIP-β, lo que concuerda con su capacidad para reclutar monocitos, células dendríticas mieloides y linfocitos Tαβ convencionales, e iniciar una respuesta inmune adquirida. Finalmente la actividad efectora citotóxica de las células TNK, es mediada por perforina y granzimas.

Se desconoce la influencia de moléculas co-estimuladoras y otros receptores asociados a las células T NK y aunque es claro que el receptor TCR de células TNK responde a moléculas CD1d, el ligando natural de CD1d es todavía desconocido. La mayoría de las células TNK reconoce moléculas CD1d asociadas a un ligando hidrofóbico, probablemente glicolipídico y de naturaleza desconocida. Sin embargo, se ha sugerido que podría ser glicofosfatidil inositol (GPI) y/o fosfatidil inositol manósido (PIM). La molécula α-galactosil ceramida derivada de esponjas marinas se une a moléculas CD1d, estimula linfocitos TNK CD4+ y TNK DN y parece imitar al ligando natural de CD1d en humanos y ratones.

Las células TNK tienen también la habilidad de responder no sólo a ligandos específicos derivados de agentes patógenos sino también a ligandos lipídicos autólogos derivados de células tumorales y parecen desempeñar un rol impor-



tante en la regulación de la respuesta inmune a células tumorales y agentes patógenos y en la mantención de la tolerancia a lo propio.

5. GENÉTICA MOLECULAR DEL RECEPTOR T

El TCR es generado a partir de la recombinación somática de segmentos génicos, durante un proceso de diferenciación que permite que cada linfocito $T\alpha\beta$ o $T\gamma\delta$ esté provisto de copias múltiples de un receptor clonotípico único que no está codificado en el DNA germinal de la célula precursora.

La organización genómica de los TCR es similar a la organización de las inmunoglobulinas y contiene tanto segmentos génicos V(D)J que codifican la región variable, como segmentos génicos C, que codifican la región constante de cada cadena del receptor clonotípico. De esta manera el repertorio de linfocitos T (estimado en 10^{18} linfocitos T distintos), es generado también al azar por reordenamiento génico V(D)J y, la variabilidad TCR, generada por la recombinación de distintos segmentos génicos, será también enormemente diversificada por: (i) corte impreciso de los segmentos génicos que se recombinan, (ii) agregado de nucleótidos al azar en los sitios de corte y unión de los distintos segmentos génicos, (iii) combinación al azar de cadenas $TCR\alpha$ y $TCR\beta$ (o $TCR\gamma$ y $TCR\delta$), y (iv) edición del receptor $T\alpha\beta$ o $T\gamma\delta$.

5.1. Genes de cadenas $TCR\alpha$, $TCR\beta$, $TCR\gamma$ y $TCR\delta$

En el DNA germinal de un vertebrado, no existen genes que codifiquen la síntesis de los componentes polipeptídicos del receptor clonotípico TCR. Al contrario, estos genes deben ser generados o ensamblados, por una recombinasa sitio-específica que reordena segmentos génicos V(D)J, distintos de aquéllos utilizados para ensamblar los genes que codifican las cadenas pesadas y livianas del receptor de linfocitos B (ver capítulo 6).

Los segmentos génicos que codifican las distintas regiones o dominios de las cadenas $TCR\alpha$, $TCR\beta$, $TCR\gamma$ o $TCR\delta$, se encuentran agrupados en cuatro grupos o familias génicas distintas:

- Familia $TCR\alpha$: incluye segmentos génicos $V\alpha$ y $J\alpha$ (codifican la región variable de la

cadena $TCR\alpha$) y, un segmento génico $C\alpha$ (codifica la región constante $TCR\alpha$).

- Familia $TCR\beta$: incluye segmentos génicos $V\beta$, $D\beta$, $J\beta$ y $C\beta$.
- Familia $TCR\gamma$: incluye segmentos génicos $V\gamma$, $J\gamma$ y $C\gamma$.
- Familia génica $TCR\delta$: incluye segmentos $V\delta$, $D\delta$, $J\delta$ y $C\delta$.

En humanos, los segmentos génicos que codifican las cadenas $TCR\alpha$ y $TCR\delta$, se encuentran en el cromosoma 14 (en región alejada del locus para cadenas pesadas de Inmunoglobulinas (Ig), mientras los segmentos génicos de cadenas $TCR\beta$ y $TCR\gamma$, se encuentran en el cromosoma 7. En ratones, los segmentos génicos que codifican las cadenas $TCR\alpha$ y $TCR\delta$, se encuentran en el cromosoma 14, mientras los segmentos génicos que codifica las cadenas $TCR\beta$ y $TCR\gamma$, se encuentran en los cromosomas murinos 6 y 13, respectivamente.

5.1.1. Genes de cadenas $TCR\alpha$

El repertorio genómico de cadenas $TCR\alpha$ ocupa 1000 kilobases en el brazo largo del cromosoma 14 humano e incluye 54 segmentos génicos variables $V\alpha$ en posición centromérica, 61 segmentos génicos de unión $J\alpha$ y, un único segmento constante $C\alpha$, en posición más telomérica. Como ocurre en el repertorio genómico de las inmunoglobulinas, cada segmento TCR variable, está precedido de una secuencia líder o señal (L), en posición 5' (figura 7-7).

Los segmentos génicos $V\alpha J\alpha$, situados en posición 5', se encuentran separados de $C\alpha$, por una región genómica que contiene los segmentos génicos de la cadena $TCR\delta$.

El potencial de este repertorio genómico consiste de 41 a 47 segmentos funcionales $V\alpha$ (que pertenecen a 35-37 subgrupos o subfamilias) y 50 segmentos funcionales $J\alpha$. Entre los segmentos variables se encuentran además 5 segmentos designados $TCRV\alpha/V\delta$ que pueden reordenarse con $J\alpha$ o con $D\delta$ y pueden, por lo tanto, utilizarse en la generación de genes $TCR\alpha$ o $TCR\delta$.

5.1.2. Genes de cadenas $TCR\beta$

En humanos, el repertorio genómico de cadenas $TCR\beta$ ocupa 620 kb en el brazo largo del

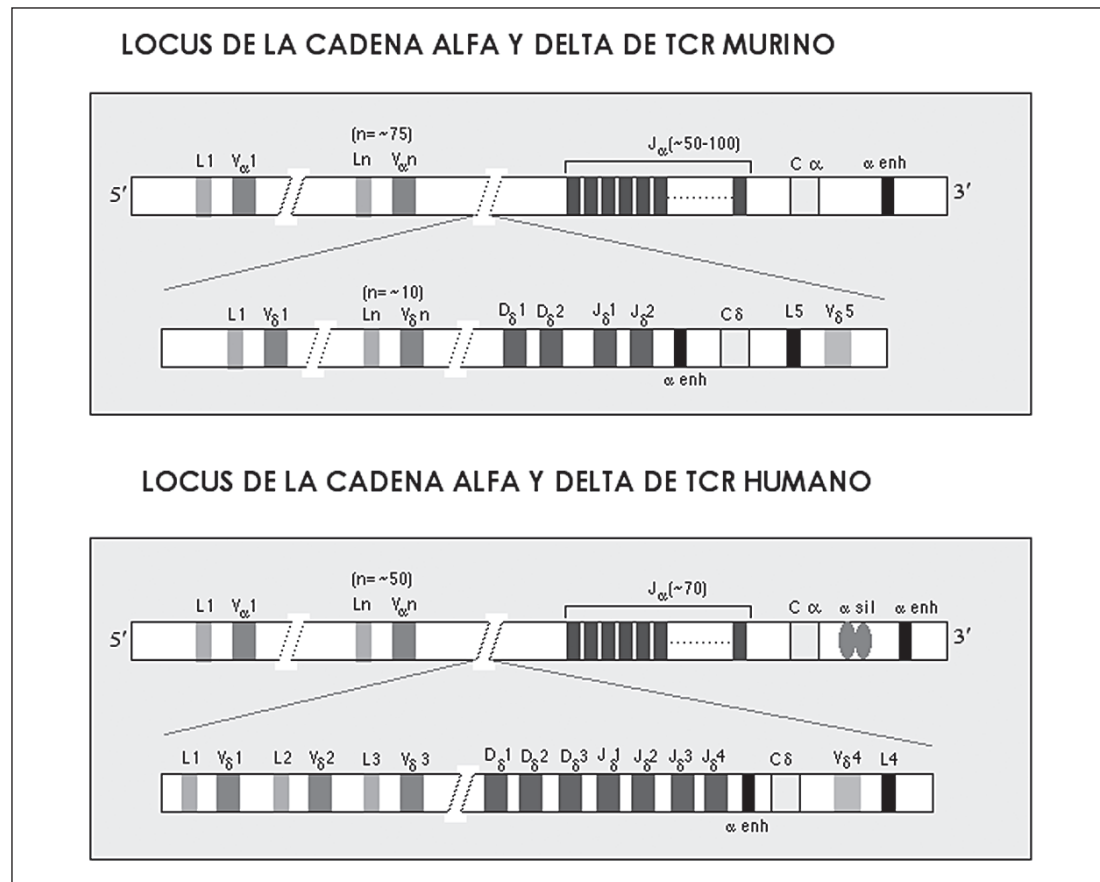


Figura 7-7. Distribución de los segmentos génicos TCR α y TCR δ . En el cromosoma 14 humano y 14 murino, se encuentran el locus que contiene los segmento génicos V α y C α asociado a segmentos J α y D α . Los segmentos V α y J α , localizados en posición 5', están separados de C α por el locus TCR δ .

cromosoma 7 y consiste de 62-65 segmentos génicos variables V β y de segmentos D β , J β y C β que se encuentran separados en dos grupos ("clusters") distintos. El primer grupo, situado en posición 5', contiene un segmento D1 β , seis segmentos J1 β (J1 β 1 a J1 β 6) y un segmento C1 β . El segundo grupo, situado en posición 3' con respecto al primero, incluye un segmento D2 β , ocho segmentos J2 β y un único segmento C2 β .

Los segmentos V β se encuentran en posición más telomérica, pero existe un segmento génico V β 30, en orientación invertida con respecto a la transcripción, localizado en posición 3', más centromérico que el segundo "cluster" D2 β J2 β C2 β . El repertorio genómico potencial consiste de 39-46 segmentos V β funcionales, que pertenecen a 23 subgrupos o subfamilias. Cada segmento J β codifica 3-5 aminoácidos, mientras los segmentos, segmentos D β , codifican de 15 a 17 residuos aminoácidos. Cada segmento varia-

ble precedido de un exón líder (L) o señal (figura 7-8).

Se han descrito además, 6 segmentos V β huérfanos, localizados en el brazo corto del cromosoma 9 humano.

5.1.3. Genes de cadenas TCR γ

El locus TCR γ humano ocupa 165 kb en el brazo corto del cromosoma 7 y consiste de 12-15 segmentos génicos variables V γ , en posición más centromérica y dos "clusters" de segmentos C γ J γ . El primer grupo contiene tres segmentos J1 γ y un único segmento C1 γ . El segundo grupo, situado en posición más telomérica, contiene dos segmentos J2 γ y un segmento a C2 γ . El repertorio potencial incluye 4-6 segmentos V γ que se agrupan en dos subfamilias y los dos "clusters" D γ J γ C γ (figura 7-9).

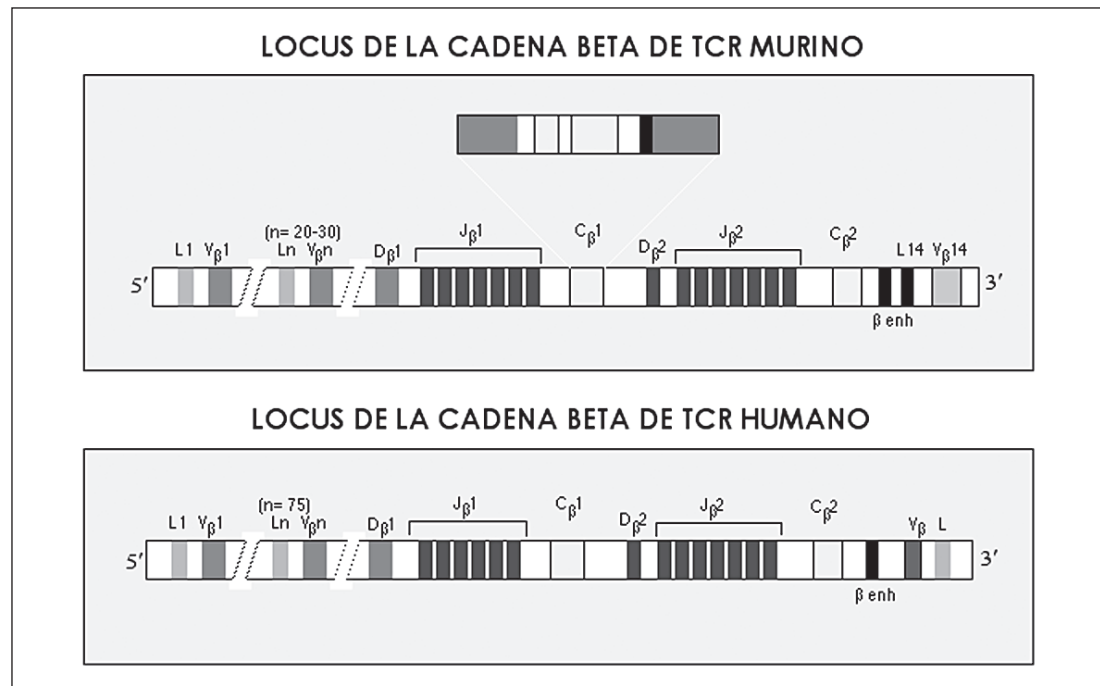


Figura 7-8. Distribución de segmentos génicos TCR β . En los cromosomas 7 humano y 6 murino, se encuentran distribuidos los segmentos V β y los dos conjuntos C β con sus respectivos segmentos génicos J β y D β .

5.1.4. Genes de cadenas TCR δ

En humanos el locus TCR δ ocupa una región de 60 kb localizada dentro del locus TCR α y contiene un cluster formado por un segmento génico V δ (V δ 3), tres segmentos D δ , cuatro segmentos J δ D y un único gen C δ (figura 7-7).

El locus TCR δ contiene además un segmento génico V δ (V δ 3), localizado hacia abajo en posición 3' del gen C δ y, un segmento génico variable V δ 1, localizado 360 kb hacia arriba en dirección 5', entre los segmentos V α . Todos los segmentos génicos TCR/D δ son funcionales y a ellos

se agregan, finalmente, los 5 segmentos TCRV α /V δ (mencionados en 5.1.1.), que pueden comportarse como funcionales o como pseudogenes.

5.2. Reordenamiento génico

Al igual como ocurre en las células B inmaduras, respecto a las inmunoglobulinas, en las células T precursoras los segmentos génicos V(D)J y C que codifican las cadenas TCR, se encuentran en una configuración germinal no funcional y deben reordenarse por recombinación sitio-específica, para generar la enorme diversidad

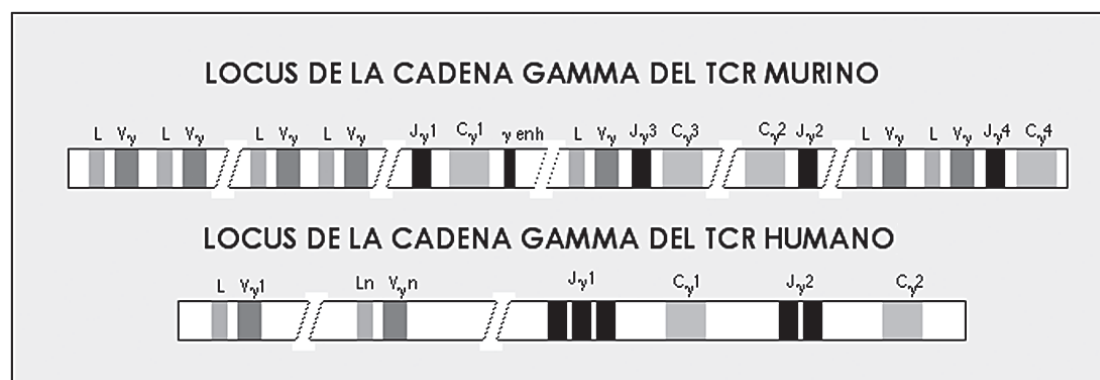


Figura 7.9. Familia de segmentos génicos TCR γ murino y humano.





del repertorio linfocitario T, durante un proceso regulado de maduración y educación tímica.

La recombinación de segmentos génicos V(D)J, es fundamental en el desarrollo del sistema inmune de los vertebrados e implica la participación de una recombinasa que reconoce y corta secuencias específicas de recombinación (12-RSS y 23-RSS) (figura 7-10) y de una compleja maquinaria de reparación del DNA que incluye una proteína quinasa DNA-dependiente (DNA-PK), las proteínas Ku/Ku80 y Artemisa, la DNA ligasa IV (ver capítulo 6), y diversas otras proteínas como Xrcc, histona H2AX y el complejo Mre11/rad50/Nbs1. Deben además existir diversos factores de remodelación de la cromatina, que limitan el acceso a las secuencias de recombinación RSS de modo tal que las regiones genómicas que contienen los segmentos V(D)J y C, de Ig o TCR, sólo estén disponibles en ciertos tipos celulares y en ciertos estados de desarrollo, según el microambiente tisular.

El orden en el reordenamiento, es similar a como ocurre con las inmunoglobulinas y también implica el cumplimiento de la regla 12/23 y la eliminación o delección de todos los segmentos que separan a aquéllos que deben recombinarse (ver capítulo 6). Así, en las cadenas TCR β y TCR δ , primero se reordena un segmento génico de diversidad D, con un segmento de unión J, eliminando toda la secuencia nucleotídica que los separa. Luego uno de los segmentos variables V, se recombina con el complejo DJ ya reordenado,

eliminando los segmentos génicos que los separa. Sin embargo, dada la existencia de "clusters" DJC, la selección de un determinado segmento D obliga a la recombinación con los segmentos J y C, incluidos en el mismo "cluster".

El DNA ya reordenado, será luego utilizado como molde para la síntesis de un transcrito primario, el que una vez procesado dará origen al correspondiente mRNA que codifica la cadena TCR (figura 7-11).

La maquinaria de recombinación de segmentos génicos es siempre la misma, tanto en linfocitos B como linfocitos T. Sin embargo, sólo las Ig se reordenan en linfocitos B, y sólo cadenas TCR se reordenan en los linfocitos T. Además en cada una de estas líneas celulares existe un orden preciso de reordenamiento de modo tal que las cadenas pesadas se reordenan siempre antes que las cadenas livianas del BCR y las cadenas TCR β se reordenan siempre antes que las cadenas TCR α en los linfocitos T.

La diversidad potencial de los TCR se estima mayor que en las inmunoglobulinas y ello obedece, fundamentalmente a una mayor diversificación de las regiones N (generada por agregado de nucleótidos al azar) y P (generada por transferencia de nucleótidos desde la hebra no codificante del DNA. Además, a diferencia de lo que ocurre con las inmunoglobulinas, los genes de TCR ya reordenados no sufren hipermutaciones en sus CDRs, que conduzcan a cambios en la función o afinidad del receptor, durante la respuesta inmune.

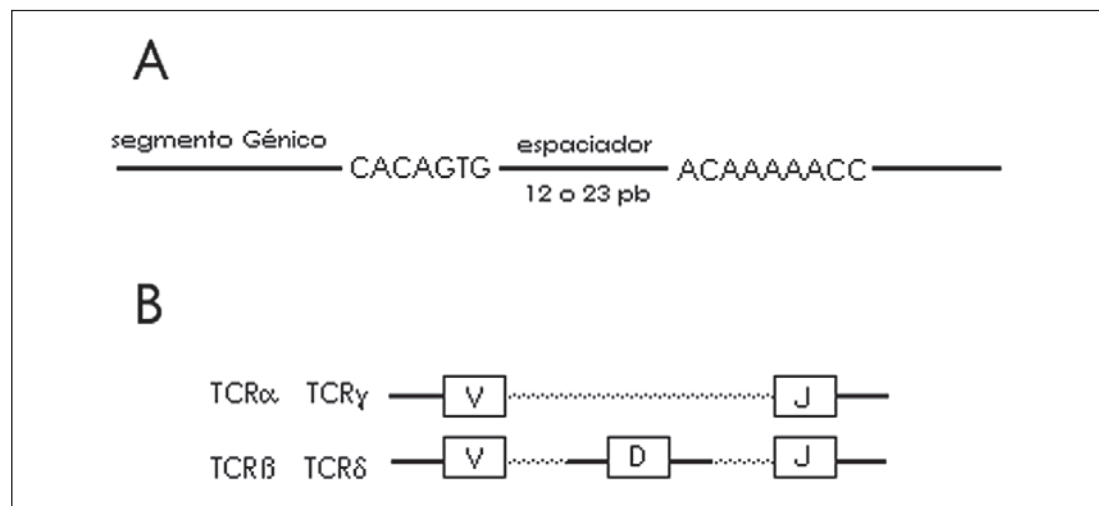


Figura 7-10. Secuencia señal de recombinación (RSS) y segmentos génicos V(D)J. (A) Heptámero, espaciador y nonámero de las secuencias RSS. (B) Los diversos reordenamientos de los segmentos génicos V(D)J que generan los genes que codifican las cadenas TCR α , TCR γ , TCR β y TCR δ . Las secuencias 12-RSS se muestran con triángulos abiertos y las secuencias 23-RSS con triángulos cerrados.

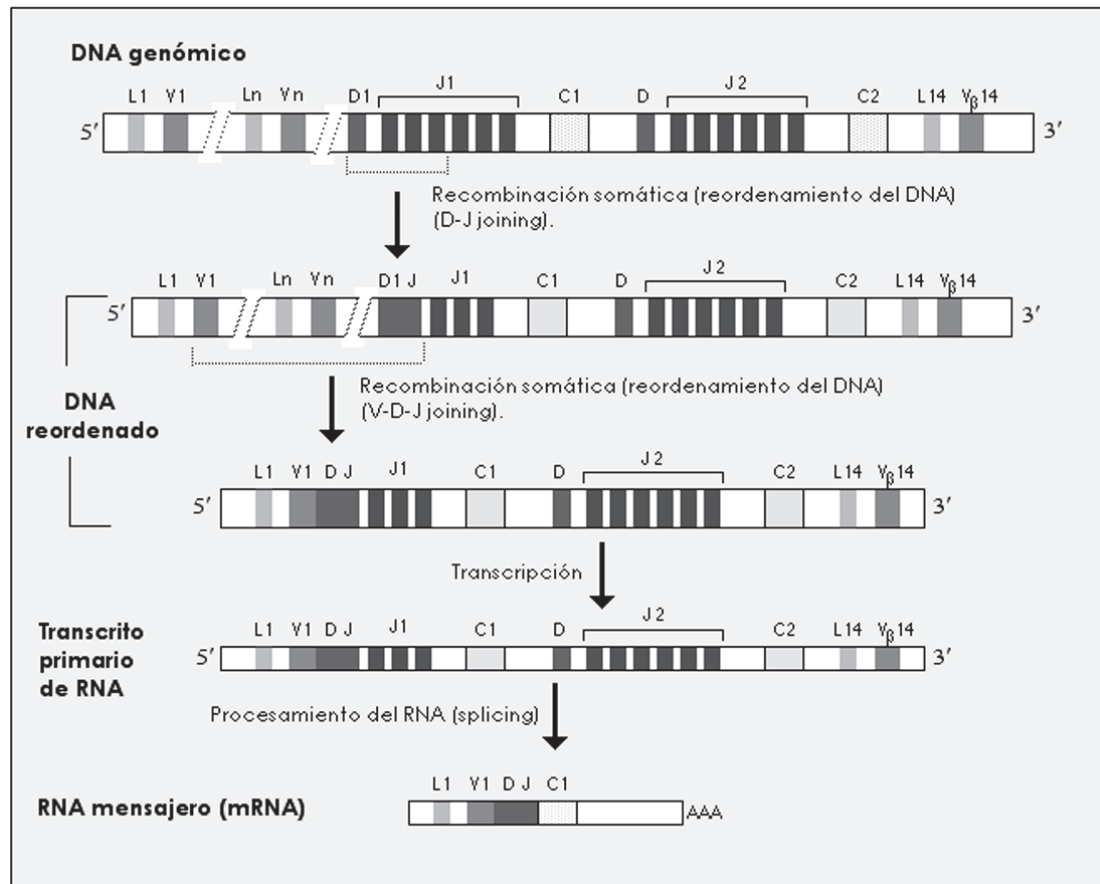


Figura 7-11. Reordenamiento génico y transcripción de la cadena TCR β . El proceso se inicia con el reordenamiento de un segmento génico D β y un segmento J β . Luego, el complejo D β -J β ya reordenado, se recombina con un segmento V β . Posteriormente, el transcrito primario será procesado para generar el mRNA que codifica la cadena TCR β .

Finalmente, sólo uno de los dos loci de cada una de las cadenas TCR α , TCR β , TCR γ o TCR δ D β que existen en el DNA germinal, será funcionalmente reordenado y expresado en un linfocito T maduro. De esta manera, al igual que en los genes de inmunoglobulinas, el fenómeno de exclusión alélica impide que se reordenen ambos alelos de un mismo gen. Así por ejemplo, sólo cuando del reordenamiento de segmentos génicos β en uno de los cromosomas homólogos, se obtiene un gen TCR β no funcional (que no puede ser transcrito o el transcrito no puede ser traducido) se inicia el reordenamiento de segmentos β en el otro cromosoma homólogo. Si de ambos alelos β se obtienen genes no funcionales, se induce apoptosis de la célula T en diferenciación. El fenómeno de exclusión isotípica que ocurre entre las cadenas livianas κ y λ de las

inmunoglobulinas, es también válido para los genes TCR, puesto que un reordenamiento TCR γ δ excluye todo reordenamiento TCR α β y viceversa.

6. LINFOCITOS T Y SEÑALES ACCESORIAS DE COESTIMULACIÓN

Los linfocitos T, aparte del receptor TCR y de los correceptores CD4 y/o CD8, expresan otros receptores de membrana que, aunque no reconocen antígenos, resultan fundamentales en la transducción de señales accesorias de activación celular (moléculas accesorias), en la estabilización de la interacción linfocitoT-célula presentadora de antígeno (CPA), o en el reclutamiento, recirculación y “homing” linfocitario (moléculas de adhesión) (figura 7-12).

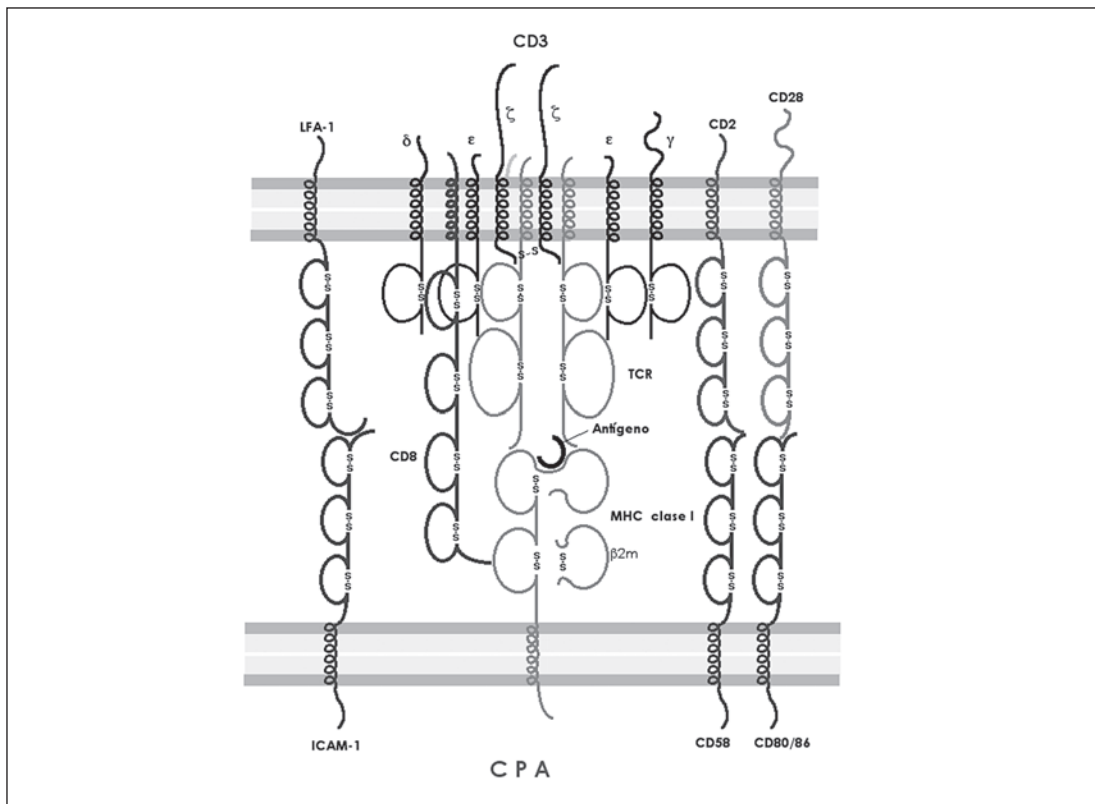


Figura 7-12. Activación de linfocitos T y señales accesorias de coestimulación. Además del receptor TCR, del complejo CD3 y de los correceptores CD4 o CD8, los linfocitos T expresan otros receptores de membrana (CD2, CD28, LFA-1, CD40L, etc.), que resultan fundamentales en la transducción de señales accesorias de coestimulación, en la estabilización de la interacción linfocito T-célula presentadora o en el reclutamiento, recirculación y "homing" linfocitario.

En ausencia de señales accesorias de coestimulación, el reconocimiento antigénico y la transducción de señales a través del complejo TCR-CD3, no conduce a activación celular. Al contrario, señales aisladas transducidas por TCR-CD3, conducen a anergia celular y/o apoptosis. Las señales adicionales requeridas para la activación de linfocitos T, son fundamentalmente proporcionadas por moléculas coestimuladoras expresadas en la membrana de células vecinas o de células presentadoras de antígeno y por mediadores solubles como citoquinas.

Entre las moléculas accesorias expresadas en la superficie de linfocitos T y que unen moléculas coestimuladoras, se encuentran:

- CD8 y CD4, que se unen a moléculas MHC de clase I y II, respectivamente,
- CD28 que une sus ligandos B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), expresados en células presentadoras de antígeno (CPA) activadas.

- CD40L (CD154), que se expresa en linfocitos T activados y une su ligando CD40 (constitutivo en la CPA).
- CD2 (LFA-2), que une su ligando LFA-3 (CD58 en humanos) CD48 en ratón.
- LFA-1 ("Leukocyte Function Associated Antigen-1") que une su ligando ICAM ("Intercellular Adhesión Molecule-1" o CD54).
- CD45, una tirosín fosfatasa que une su ligando CD22. La isoforma CD45RA se expresa en linfocitos T en reposo y CD45RO en linfocitos T activados.

Además, moléculas como ICOS ("Inducible costimulator", similar a CD28 pero no une CD80 o CD86), citoquinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, TNF) y diversas moléculas de adhesión (integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$, selectinas), también proporcionan señales secundarias o terciarias que facilitan o promueven la activación y/o diferenciación





de distintas subpoblaciones de linfocitos T.

Sin embargo, no todas las señales proporcionadas por citoquinas o moléculas de superficie, proporcionan estímulos coactivadores. Así por ejemplo, IL-10 y TGF- β ("transforming growth factor- β "), a menudo inhiben diversas poblaciones linfocitarias T, B y NK. De manera similar, la unión a CTLA-4 (CD152, una molécula homóloga a CD28 y que se expresa en la superficie de linfocitos T activados), a sus ligandos CD80 o CD86, también proporciona señales de inhibición linfocitaria.

El efecto de las señales accesorias de coestimulación va a depender de diversos factores; entre éstos se encuentran: el número de complejos MHC-péptido que inician las señales de transducción, la afinidad, avidez y duración de esa interacción y el nivel de moléculas coestimuladoras que amplifican las señales iniciales de activación.

Células dendríticas y linfocitos B, expresan constitutivamente moléculas MHC, CD40, ICAM-1, LFA-3 y son bastante eficientes en la captura y procesamiento de antígeno. Sin embargo, sólo una vez activadas (y como consecuencia de la expresión de altos niveles de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 y de moléculas de presentación MHC), se convertirán en potentes células estimuladoras de linfocitos T. La maduración de la célula presentadora de antígeno, aumenta notablemente los niveles de CD80 y CD86, que se coexpresan en microdominios de membrana junto a moléculas MHC, lo que favorece la efectividad de las señales transducidas por TCR/CD3 y CD28. La unión de CD28 a CD80 o CD86 gatilla la activación de linfocitos T, la expresión de CD40L que potencia la activación y la síntesis de IL-2 y sus receptores (IL-2R), todo lo cual conduce a la proliferación y diferenciación linfocitaria (figura 7-12). En una fase posterior, las moléculas CD80 y CD86 las puede modular la diferenciación Th1/Th2 e inhibir la respuesta celular T, ya sea directamente mediante la unión a su ligando CLA-4 (expresado en la fase final de activación de los linfocitos) o indirectamente promoviendo la generación de células T reguladoras.

7. HOMEOSTASIS Y DESARROLLO POST-TÍMICO DE LINFOCITOS T

Una de las características del sistema inmune es que el número total y la distribución de los

distintos clones linfocitarios están bajo control homeostático. Por lo tanto, nuevos linfocitos que son continuamente generados en los órganos linfoides primarios y secundarios (linfocitos vírgenes y linfocitos activados/linfocitos memoria, respectivamente) deben competir con los linfocitos residentes en los distintos órganos y tejidos y mantener la diversidad del repertorio linfocitario.

Luego del encuentro con el antígeno, los linfocitos T vírgenes se convertirán en células T efectoras o en células T de memoria, que se distinguirán de los linfocitos vírgenes en función del patrón de moléculas de adhesión y de receptores para citoquinas que expresan en su membrana. Como la homeostasis de linfocitos vírgenes y de memoria se regula independientemente, nuevos linfocitos T de memoria reemplazarán sólo a otros linfocitos T de memoria; de esta manera el número de linfocitos vírgenes y de memoria permanecerá relativamente constante y equivalente en la periferia.

En los últimos años se ha establecido que aún en ausencia de antígeno, la sobrevida post-tímica de los clones linfocitarios T, es un proceso activo y requiere la interacción continua de linfocitos vírgenes periféricos con moléculas MHC para las cuales los linfocitos fueron positivamente seleccionados en el timo. En ratones por ejemplo, linfocitos T CD8 MHC de clase I (H-2D^b)-restringidos sobrevivirán sin proliferar si se transfieren pasivamente a ratones de haplotipo H-2D^b, pero no sobrevivirán si se transfieren a ratones de haplotipo H-2D^k que expresan moléculas MHC de clase I distintas. Si la transferencia es hacia ratones que expresan bajos niveles de moléculas H-2D^b de clase I, sobrevivirá sólo una pequeña fracción de los linfocitos T CD8 adoptivamente transferidos y esta fracción será proporcional al nivel de expresión de estas moléculas MHC de clase I en el individuo receptor.

Aunque el antígeno no parece ser un prerequisite para la sobrevida de los linfocitos de memoria, el tamaño de un clon linfocitario antígeno-específico puede disminuir en ausencia del antígeno, simplemente por mecanismos homeostáticos. Se ha sugerido, por lo tanto, que la vida media de los linfocitos memoria está determinada por la frecuencia con que los linfocitos se encuentran con el antígeno y del espacio disponible para su sobrevida en el repertorio linfocitario T. Así, la memoria inmunológica contra un antígeno que se encuentra una única vez, será relativamente corta, mientras que el encuentro fre-



cuenta con un antígeno será suficiente para mantener o aumentar el tamaño clonal de los linfocitos T antígeno-específicos, generando una memoria inmunológica casi indefinida, debido a la generación continua de nuevas células de memoria.

El compartimiento linfocitario T puede ser mantenido o reemplazado por nuevas células que emergen desde el órgano linfoide primario o bien por repoblamiento a partir de la expansión periférica de clones linfocitario T maduros, sobre todo cuando la actividad tímica disminuye como consecuencia de la edad.

LECTURAS SUGERIDAS

Burdin, N. and Kronenberg M., "CD-1 mediated immune response to glycolipids", *Curr. Opin. Immunol.* 11: 326-331, 1999.

Fagarasan S. and T. Honjo. "T-Independent Immune Response: New Aspects of Cell Biology", *Science* 290: 89-92, 2000.

Freitas A.A. and Rocha B., "Population Biology of Lymphocytes: The flight for survival", *Annu. Rev. Immunol* 18: 83-111, 2000.

Fugmann S.D. et al., "The RAG Proteins and V(D)J Recombination: Complexes, Ends and Transposition", *Annu. Rev. Immunol.* 18: 495-527, 2000.

Gellert, M., "V(D)J Recombination: RAG Proteins, Repair Factors, and Regulation", *Annu. Rev. Biochem.* 71: 101-132, 2002.

Godfrey, D.I., et al., "NKT cells: facts, functions and fallacies", *Immunol. Today* 21: 573-583, 2000.

Grauwunder U. and Harfst E., "How to make ends meet in V(D)J recombination", *Curr. Opin. Immunol.* 13: 186-194, 2001.

Hayday A.C., "γδCells: A Right Time and a Right Place for a Conserved Third Way of Protection", *Annu. Rev. Immunol.* 18: 975-1026, 2000.

Kronenberg M., Naidenko O., Koning F., "Right on target: Novel approaches for the direct visualization of CD1-specific T cell responses", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98: 2950-2952, 2001.

Lanzavecchia A. and Sallusto F., "Dynamics of T lymphocyte Responses: Intermediates, Effectors and Memory Cells", *Science* 290: 92-97, 2000.

Lefranc, M.P., "Locus maps and genomic repertoire of the human T-cell receptor genes", *Immunologist* 8: 72-80, 2000.

MacDonald H.R., Radke F., Wilson A., "T cell fate specification and αβ/γδ lineage commitment", *Curr. Opin. Immunol.* 13: 219-224, 2001.

Martin F. and Kearney J.F., "B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets". *Curr. Opin. Immunol.* 13: 195-201, 2001.

Matsuuchi L. and Gold M.R., "New views of BCR structure and organization", *Curr. Opin. Immunol.* 13: 270-277, 2001.

Nemazee, D., "Receptor selection in B and T Lymphocytes", *Annu. Rev. Immunol.* 18: 19-51, 2000.

Ravecht J.V. and Lanier L.L., "Immune Inhibitory Receptors", *Science* 290: 84-89, 2000.

Saito, H. et al., "Role of gut cryptopatches in early extrathymic maturation of intestinal intraepithelial T cells", *J. Immunol.* 164: 3616- 3626, 2000.

Sallusto, F. et al., "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potential and effector functions", *Nature* 401: 708-712, 1999.

Schaible, U.E., Kaufmann, S.H.E. "CD1 and CD1-restricted T cells in infection with intracellular bacteria", *Trends Microbiol.* 8: 419-425, 2000.

Von Adrian, U.H, Mackay, C.R. "T-cell function and migration", *NEJM.* 343: 1020-1034, 2000.

Wilson, S.B., Byrne, M.C. "Gene expression in NKT cells: defining a functionally distinct CD1d-restricted T cell subset. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 555-561.



Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 8

COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Ulises Vergara C., Iván Palomo G., Claudio Zúñiga M. y Cristina Navarrete

- 1. Introducción**
- 2. Genes y moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad**
 - 2.1. Genes del MHC
 - 2.1.1. Genes de clase I
 - 2.1.2. Genes de clase II
 - 2.1.3. Genes de clase III
 - 2.1.4. Otros genes del MHC
 - 2.2. Estructura y función de las moléculas MHC
 - 2.2.1. Estructura y función de las moléculas MHC clase I
 - 2.2.2. Estructura y función de las moléculas MHC clase II
- 3. El concepto de restricción MHC**
- 4. Otras moléculas de presentación**
 - 4.1. Moléculas CD1
- 5. Herencia de los genes HLA**
- 6. Complejo Principal de Histocompatibilidad y enfermedad**
- 7. Nomenclatura y tipificación HLA**





RESUMEN

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) es un complejo génico altamente polimórfico que controla la expresión de moléculas que desempeñan un rol fundamental en las interacciones celulares que inducen y regulan la respuesta inmune a través del procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T.

Los genes de clase I del MHC (en el hombre llamado HLA) controlan la expresión de los antígenos de histocompatibilidad clásicos HLA-A, -B, -C y no clásicos HLA-E, -F, G y MIC, y su función principal es la de presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T $\alpha\beta$ citotóxicos CD8+, linfocitos T $\gamma\delta$ y a células NK.

Los genes de clase II (HLA-DR, -DQ y -DP en el hombre) corresponden a los antiguos genes de respuesta inmune (genes Ir) y codifican la expresión de moléculas que presentan péptidos a linfocitos T CD4+ (linfocitos T "helper").

Los genes de clase III codifican la expresión de los factores de complemento C4, Bf y C2. El complejo incluye además genes que codifican la expresión de moléculas importantes en el procesamiento antigénico como por ejemplo tapasina, LMP2, LMP7, TAP1, TAP2, DM y DO y moléculas involucradas en la respuesta inflamatoria (TNF α , TNF β , Linfotoxinas, hsp70).

1. INTRODUCCIÓN

La defensa inmunológica contra diversos agentes infecciosos depende de la habilidad del sistema inmune para reconocer antígenos del agente patógeno y poner en marcha un conjunto de mecanismos que incluyen la activación del complemento y la activación, tanto de células fagocíticas como de distintas células inmunocompetentes. El desarrollo de una respuesta inmune efectiva implica entonces una compleja serie de eventos que conducen a activación celular y la generación de células efectoras que secretan anticuerpos y células citotóxicas (ver capítulo 10), que destruirán al agente infeccioso, o a la célula infectada en el caso de patógenos intracelulares.

En general, tanto la respuesta contra antígenos extraños (inmunidad) como la tolerancia a antígenos propios, están sujetas a un coordinado y complejo mecanismo de regulación que incluye inmunoglobulinas (ver capítulo 6), receptores de células T (TCR) (ver capítulo 7) receptores de células NK (ver capítulo 10), citoquinas (ver capítulo 11) y moléculas codificadas por el denominado Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, "Major Histocompatibility Complex"). Una falla en estos mecanismos de regulación de la inmunidad o la tolerancia puede

conducir al desarrollo de inmunodeficiencia (ver capítulos 30 y 31) o autoinmunidad (ver capítulo 23), respectivamente.

El MHC está constituido por un conjunto de genes que controlan la expresión de moléculas que desempeñan un rol fundamental en el procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T y en la regulación de las interacciones celulares que caracterizan la respuesta inmune. Este complejo génico parece estar presente en todos los vertebrados y en algunos invertebrados, lo que revela un origen temprano en la evolución de las distintas especies.

El MHC es un sistema poligénico que contiene muchos genes estructural y funcionalmente relacionados y altamente polimórficos, puesto que en la población existen múltiples alelos para cada gen. Los distintos genes del complejo están además estrechamente ligados y tienden a heredarse como una unidad, como un complejo supergénico o haplotipo, entendiéndose como tal a una combinación particular de genes en un complejo génico o en un cromosoma. En la población de individuos de la especie existirá teóricamente entonces, tantos haplotipos MHC como diferentes combinaciones de alelos de los distintos genes del complejo.

El Complejo Principal de Histocompatibili-



dad fue originalmente descrito por Peter Gorer en el ratón (1936), como un locus de grupos sanguíneos que controlaba la expresión de diversos antígenos en los glóbulos rojos. Gorer definió, inicialmente, cuatro antígenos eritrocitarios, denominados antígenos I, II, III y IV, y más tarde demostró que el denominado antígeno II se expresaba también en diversos tejidos y jugaba un rol decisivo en la susceptibilidad o resistencia al trasplante de tumores y en la aceptación o rechazo del trasplante de tejidos entre distintas cepas consanguíneas o endogámicas de ratón. Trasplantes entre cepas genéticamente idénticas (cepas isogénicas o singénicas) son aceptados, mientras los trasplantes entre cepas genéticamente distintas (cepas alogénicas) que presentan alelos distintos de uno o más genes son rápida y fuertemente rechazados. Sólo en las cepas que rechazaban el trasplante, era posible detectar anticuerpos que reaccionaban con el antígeno-II, proporcionando evidencia acerca de la naturaleza inmunológica de la resistencia al trasplante de tumores y del rechazo al trasplante de tejidos.

Más tarde, en 1948, George Snell designó a los genes y antígenos, responsables de la compatibilidad tisular, como genes y antígenos de histocompatibilidad, respectivamente. Así el locus y antígeno-II de grupo sanguíneo, se designaron como locus y antígeno de histocompatibilidad-2 (o locus y antígeno H-2, respectivamente). Muy pronto se demostró que el locus H-2 era en realidad un conjunto de genes, estrechamente ligados que controlaban la expresión de diversos antígenos de histocompatibilidad. Como estos antígenos inducían el más rápido y el más fuerte rechazo al trasplante de tejidos, el conjunto génico fue definitivamente designado como Complejo Principal de Histocompatibilidad-2 o Complejo H-2 del ratón.

El MHC humano, HLA ("Human Leukocyte Antigen"), fue descrito en la década del 50 por Dausset y van Rood, a partir de anticuerpos leucoaglutinantes encontrados en el suero de pacientes politransfundidos y de madres múltiparas, que reaccionaban con los leucocitos presentes en los productos sanguíneos transfundidos lo que dio el nombre al sistema.

Los antígenos de histocompatibilidad fueron durante muchos años reconocidos como el mayor obstáculo al trasplante de tejidos entre distintos individuos de la misma especie. Sin embargo, parecía claro que esta no era la función o el

significado biológico de las moléculas codificadas por el Complejo Principal de Histocompatibilidad, puesto que el trasplante de tejidos es un fenómeno artificial, que no ocurre espontáneamente en la naturaleza. Así, en las décadas del 60 y del 70, se demostró que la capacidad para desarrollar una respuesta inmune contra diversos antígenos naturales y sintéticos, estaba bajo el control de genes MHC (genes de respuesta inmune o genes Ir). Finalmente, se demostró que la función biológica real de estas moléculas era la de actuar como presentadoras de antígenos (incluido aloantígenos) a los linfocitos T. Asimismo se demostró que estos antígenos altamente polimórficos al ser expresados en la membrana participaban en el fenómeno de rechazo al trasplante de tejidos mediante un mecanismo de reconocimiento directo e indirecto (figura 8-1). En el caso de reconocimiento directo estos antígenos son reconocidos directamente por las células T del receptor y reconocimiento indirecto, cuando la presentación de péptidos antigénicos derivados de estas moléculas ocurre por las células presentadoras autólogas. Este último mecanismo es el que está involucrado en el reconocimiento de cualquier otro antígeno ya sea derivado de proteínas virales, bacteria u otra molécula polimórfica.

2. GENES Y MOLÉCULAS DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Análisis inmunogenéticos, funcionales y más recientemente estudios de biología molecular, han permitido identificar más de 200 genes en el locus MHC. Éstos se han separado en tres familias o clases distintas: genes de clase I, de clase II y de clase III. En el complejo HLA estos genes ocupan una extensión de alrededor de 4 millones de pares de bases, en el brazo corto del cromosoma 6 humano. En el ratón el complejo H-2 ocupa una extensión de alrededor de 3 millones de pares de bases, en el cromosoma 17 murino.

Los genes de clase I y de clase II codifican la expresión de proteínas integrales de membrana que participan en la discriminación entre lo propio y lo ajeno, al actuar como elementos de restricción en la presentación de antígenos a linfocitos T. Los genes de clase III, en cambio, codifican la expresión de proteínas plasmáticas que tienen una función completamente distinta, puesto que forman parte de la cascada de activación del

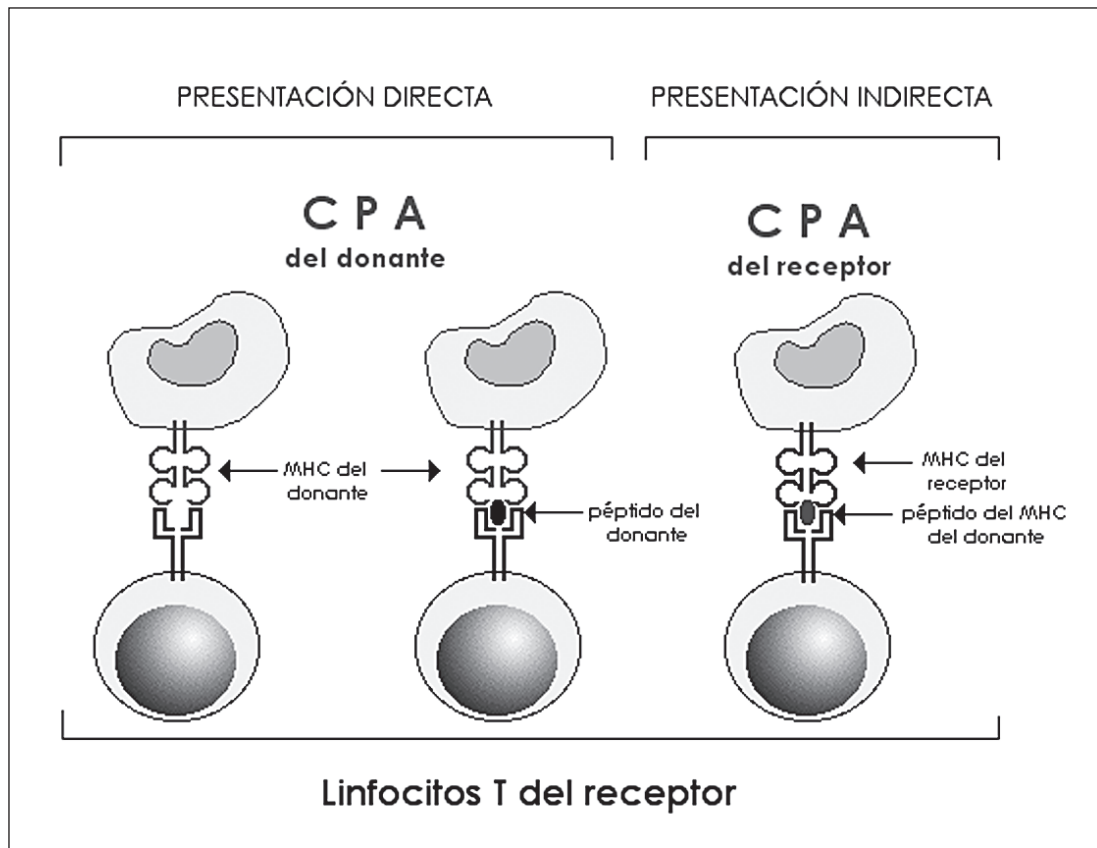


Figura 8-1. Mecanismos de presentación directa e indirecta de moléculas MHC del injerto por parte de células T del receptor.

sistema del complemento.

En el complejo existen varios genes de clase I y de clase II, cada uno de los cuales presenta múltiples alelos (y por tanto elevado polimorfismo), que codifican la expresión de diferentes moléculas de clase I o de clase II y por lo tanto con distintas capacidades para presentar fragmentos peptídicos a linfocitos T específicos. Esta forma de organización del MHC confiere a los distintos individuos una enorme capacidad para presentar y responder a una gran variedad de antígenos distintos, ya que los diferentes alelos de cada gen son codominantes, es decir los productos moleculares de cada alelo se expresan y funcionan de manera independiente en la superficie celular.

2.1. Genes del MHC

2.1.1. Genes de clase I

Los genes de clase I controlan la expresión de los antígenos clásicos y no clásicos. Los antígenos **clásicos** de histocompatibilidad de clase

I (Ia: HLA-A, -B y C en el humano y H-2 K, D y L en el ratón) se expresan en la mayoría de las células nucleadas del organismo y son los que han sido tradicionalmente reconocidos como el mayor obstáculo al trasplante de tejidos entre individuos de la misma especie. La participación de estas moléculas en el rechazo de tejidos es sólo un efecto secundario de su rol fisiológico como elemento de restricción en la presentación antigénica a linfocitos T CD8⁺. Estos linfocitos (T citotóxicos o T supresores), son incapaces de reconocer el antígeno en su conformación natural y sólo lo reconocen en la superficie de una célula presentadora de antígeno, en asociación con una molécula MHC de clase I.

Estos genes presentan un alto grado de polimorfismo, es decir en la población se describe un elevado número de variantes alélicas para cada uno de estos locus. Por ejemplo en el ratón, en el locus K se han descrito más de 100 alelos, considerando las cepas de laboratorio y poblaciones silvestres. En los humanos se han descrito, hasta ahora, 209 alelos HLA-A, 414

alelos del gen B y 101 del gen C .

Cada gen de clase I codifica la cadena pesada o cadena alfa del heterodímero glicoproteico y está formado por 7 exones: el exón 1 codifica para el péptido señal, los exones 2, 3 y 4 para los dominios $\alpha 1$ a $\alpha 3$ de la cadena α (ver punto 2.2.1), el exon 5 para el dominio transmembrana y los exones 6 y 7 para la región citoplasmática.

Los genes de clase I **no clásicos** (Ib) incluyen HLA-E, -F, -G y MIC en el humano y H2-Q, -T y -M en el ratón. Éstos son menos polimórficos, se expresan en forma más restringida a través de las diversas células y tejidos y tienen una función diferente. La mayoría de ellos participan en la interacción con receptores de células NK. Además están los genes relacionados con la cadena pesada de clase I (MIC) A, B, C y D de los cuales sólo A y B se expresan. Los genes MIC codifican para moléculas reconocidas por linfocitos T $\gamma\delta$ en situaciones de stress.

2.1.2 Genes de clase II

Los genes de clase II corresponden, a los antiguamente denominados como genes de respuesta inmune (genes Ir) del Complejo Principal de Histocompatibilidad y controlan la expresión de moléculas de clase II, involucradas en la presentación de fragmentos peptídicos a los linfocitos T CD4+.

En el Complejo HLA humano los genes de clase II se ubican en las regiones HLA-DP, -DQ y -DR del complejo. En el ratón los genes de Clase II se ubican en las regiones I-A e I-E del sistema H-2 murino (figura 8-2).

Los genes de clase II están formados por 4 exones: el exon 1 codifica para el péptido señal, los exones 2 y 3 codifican para los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y el exon 4 codifica para las regiones transmembrana y citoplasmática.

Cada región contiene por lo menos dos genes:

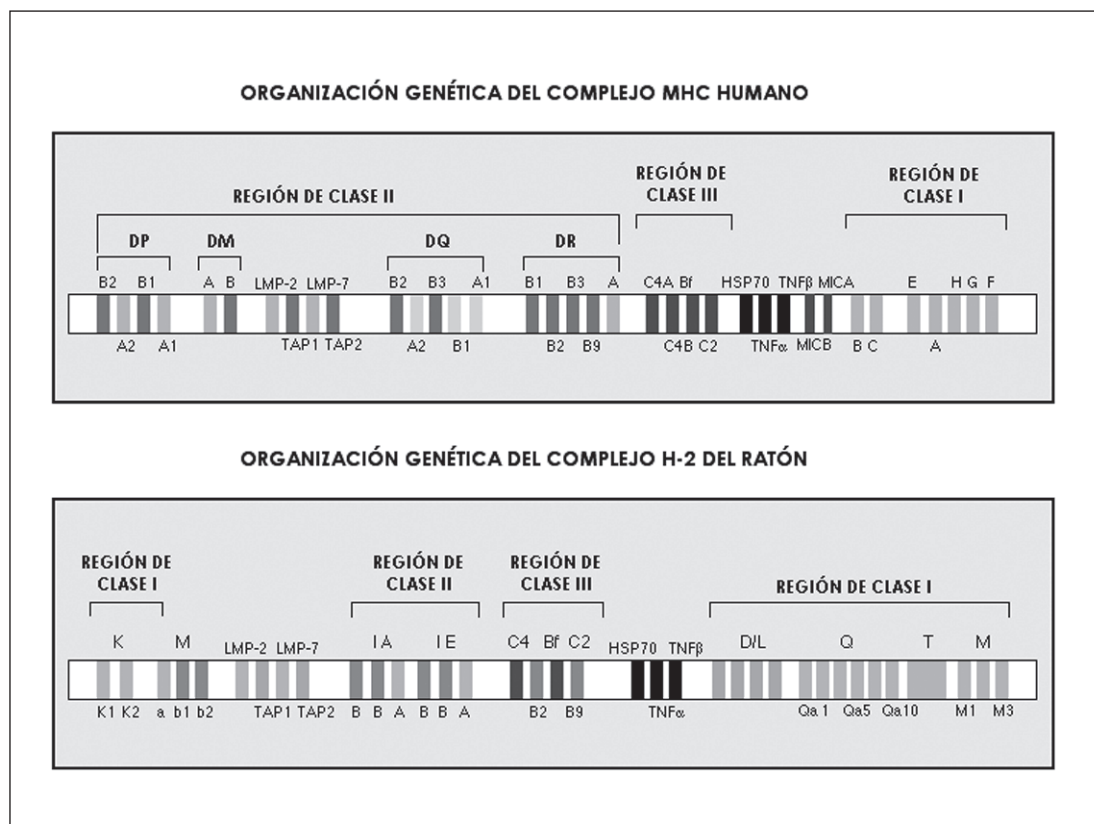


Figura 8-2. Organización Genética del Complejo Principal de Histocompatibilidad en humanos (Complejo HLA) y en el ratón (Complejo H-2). Tanto en humanos como en el ratón los genes de clase I incluyen a los genes clásicos altamente polimórficos (genes de clase Ia), como genes oligomórficos o monomórficos (genes de clase Ib). En humano los genes de clase II se ubican en las regiones DP, DQ y DR y en el ratón corresponden a los genes de las regiones IA e IE que codifican la cadena alfa (genes A) y genes que codifican la cadena beta (genes B) de la molécula de clase II. Los genes clase III codifican para algunos componentes del sistema del complemento y otras proteínas.



uno que codifica la cadena alfa (gen A) y otro que codifica la cadena beta (gen B) de la molécula de clase II, y el heterodímero se forma siempre a partir de cadenas α y β codificadas por genes de la misma región. En la región DR, por lo menos hay descritos 4 genes B funcionales (B1 y B3 ó B4 ó B5'), por lo tanto en esta región se pueden originar 2 moléculas DR diferentes dependiendo del haplotipo. Los genes de clase II también, presentan un alto grado de polimorfismo, al igual que los genes Ia. Sin embargo en el caso de estos genes solamente el DQA y DPA son polimórficos; el DRA es relativamente monomórfico y hasta el momento se han descrito sólo dos variantes. Esto en contraste a los 273 alelos DRB1, 21 DQA, 45 DQB, 19 DPA y 93 DPB. Por lo tanto el número de moléculas de clase II distintas que puede codificar una región de clase II, depende del número de combinaciones α - β que puedan formarse a partir de los distintos genes funcionales A y B de la región. En un individuo heterocigoto, con un haplotipo distinto en cada cromosoma homólogo, el número de combinaciones es aún mayor, dado que no sólo pueden codificarse moléculas de clase II a partir de genes A y B que están en posición cis (genes en el mismo cromosoma), sino también a partir de genes A y B en posición trans (genes en cromosomas homólogos distintos) (figura 8-3). Sin embargo la mayoría de las moléculas expresadas están codificadas en cis ya que las moléculas codificadas en trans no son estables.

2.1.3. Genes de clase III

Los genes de clase III también codifican la expresión de proteínas plasmáticas que cumplen

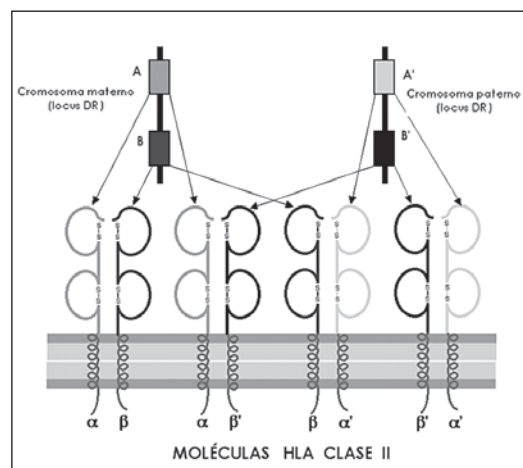


Figura 8-3. Asociación de cadenas $\alpha\beta$ del mismo cromosoma (apareamiento cis) y de cromosomas opuestos (apareamiento trans). Un individuo heterocigoto para los genes DRA1 y DRB1 puede codificar para 2 cadenas α y 2 cadenas β diferentes por lo que puede formar cuatro cadenas DR diferentes.

una función completamente distinta a las moléculas de clase I y de clase II, puesto que codifican la expresión de moléculas como C2, C4 y factor B (Bf) que forman parte de la cascada de activación del sistema del complemento (ver capítulo 18) (figura 8.2).

Tanto en el Complejo HLA como en el Complejo H-2, la región de los genes de Clase III contiene: el gen que codifica la expresión del segundo factor del complemento (C2), dos genes (C4A y C4B) que codifican la expresión de dos formas del cuarto factor del complemento (C4), el gen que codifica el factor B (Bf) de la ruta alterna del sistema del complemento, los genes CYP-21A y CYP-21B que codifican la expresión de la 21 hidroxilasa (21-OH), enzima involucrada en la síntesis de esteroides.

Entre los genes de clase III están también los que codifican para el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), Linfotoxina A, B y C y aquellos que codifican la expresión de proteínas de shock térmico de 70 kDa (hsp 70) (figura 8-2). Estas moléculas están relacionadas con fenómenos inflamatorios y algunos autores han planteado la posibilidad de clasificar esta región como genes clase IV.

2.1.4. Otros genes del MHC

En la región de los genes clase II se ubican una serie de genes que codifican para moléculas involucradas en el procesamiento antigénico por las moléculas de clase I tales como, tapasina (tps), LMP2 y LMP7, TAP1 y TAP2 y aquellas involucradas en la selección y presentación de péptidos antigénicos a las moléculas de clase II incluidos DMA y DMB y DOA y DOB.

No todos los genes ligados en el Complejo Principal de Histocompatibilidad pueden clasificarse como genes de clase I, II ó III. En esta categoría se encuentran: (a) los genes LMP-2 y LMP-7 que codifican subunidades de la maquinaria citoplasmática de degradación o procesamiento de proteínas (Proteasoma), (b) los genes TAP-1 y TAP-2 que codifican las subunidades de un transportador peptídico ATP dependiente (TAP, "Transporter Associated with Antigen Processing"), (c) el gen que codifica para la proteína Tapasina, chaperona involucrada en la formación del complejo molécula MHC-péptido, en el interior del retículo endoplásmico (d) los genes DMA y DMB que codifican la expresión de las subunidades del heterodímero o molécula DM, involucrada en la unión de fragmentos peptídicos a las moléculas de



clase II. Todas estas moléculas están involucradas en el procesamiento antigénico y sus genes mapean en la región de los genes clase II.

2.2. Estructura y función de las moléculas MHC

2.2.1. Estructura y función de las moléculas clase I

Las moléculas MHC de clase Ia se expresan en todas las células nucleadas en niveles de 10^4 a 10^5 moléculas por célula, particularmente en células linfoides. Una menor expresión de estas moléculas MHC de clase I se observa en células germinales y glóbulos rojos.

Las moléculas MHC de clase Ia y Ib son glicoproteínas integrales de la membrana plasmática y se expresan como un heterodímero constituido por una cadena pesada o cadena α de 45 kDa (codificada por los genes MHC de clase I) y una cadena liviana de 12 kDa, la Beta-2 microglobulina ($\beta 2m$) no codificada por el MHC, sino por un gen situado en el cromosoma 15 en humanos y en el cromosoma 2 en el ratón (figura 8-4).

Las moléculas clase Ia (B, C, A en el humano y K, D, L en el ratón) se caracterizan por expresarse en prácticamente todas las células nucleadas, también en los glóbulos rojos y plaquetas; su función se asocia a la presentación de péptidos antigénicos principalmente de origen endógeno a los linfocitos T CD8+.

Las cadenas α y β de la molécula de clase I están no covalentemente unidas y sólo la cadena alfa se encuentra anclada a la membrana plasmática celular.

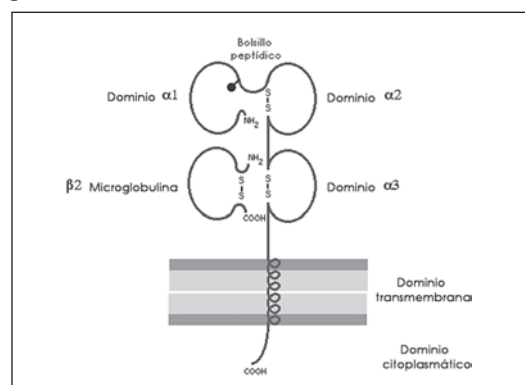


Figura 8-4. Esquema de las moléculas MHC de clase I. La molécula MHC de clase I es un heterodímero glicoproteico formado por una cadena pesada de 45 kDa codificada por el complejo MHC y una cadena liviana de 12 kDa, $\beta 2m$, codificada en el cromosoma 15 humano y en el cromosoma 2 murino. El bolsillo o sitio de unión de fragmentos peptídicos se conforma de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la cadena α .

La cadena α contiene aproximadamente 330 aminoácidos y su conformación en la membrana es tal que presenta distintas regiones o dominios claramente definidos: 3 dominios extramembrana denominados $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, de alrededor de 90 aminoácidos cada uno; una región hidrofóbica transmembrana de alrededor de 25 aminoácidos de anclaje en la membrana y, una cola o segmento citoplásmico de 30 aminoácidos (figura 8-4). Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ conforman la ranura o bolsillo de unión para la presentación de fragmentos peptídicos, de 8-9 aminoácidos, a células T CD8+. El dominio $\alpha 3$ presenta una región de unión no covalente a la $\beta 2m$ y un sitio o región no polimórfica o monomórfica para interacción con la molécula CD8, co-receptor linfocitario.

Tanto el dominio $\alpha 3$, como la $\beta 2m$ presentan una secuencia aminoacídica y una conformación similar a los dominios constantes de las moléculas de inmunoglobulinas (ver capítulo 6). Por lo tanto las moléculas de clase I se clasifican dentro del gran grupo de proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. La mayor parte del polimorfismo de las moléculas de clase I está localizado en los dominios alfa 1 y alfa 2.

Los productos de los genes clásicos de clase I (HLA-A, -B y -C) interactúan con el receptor de las células T y con el receptor KIR (killer/immunoglobulin like receptor) presente en las células T y NK, respectivamente. Por otra parte, HLA-E interactúa con los receptores tipo lectina presente en las células NK. Los productos de los genes MIC que no están unidos a la $\beta 2m$, no participan en la presentación de antígenos a los linfocitos T $\alpha \beta$, pero sí son reconocidos por linfocitos T $\gamma \delta$ intraepiteliales.

2.2.2. Estructura y función de las moléculas clase II

A diferencia de las moléculas MHC de clase I, que se expresan en virtualmente todas las células nucleadas, las moléculas MHC de clase II tienen una distribución más restringida expresándose en forma constitutiva en células como linfocitos B, monocitos, macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas y, en general en células presentadoras de antígeno (CPA). Células endoteliales, epiteliales y estromales no expresan moléculas MHC de clase II en forma constitutiva, pero pueden



hacerlo bajo el estímulo de citoquinas como interferón gamma ($\text{IFN}\gamma$), lo que puede tener importantes consecuencias en la respuesta inmune normal y/o en el desarrollo de autoinmunidad. Los linfocitos T son claramente negativos para moléculas MHC de clase II, pero también pueden expresarlas como resultado de la activación celular.

Las moléculas MHC de clase II también son glicoproteínas integrales de la membrana celular y están constituidas por dos cadenas polipeptídicas, α y β , no covalentemente asociadas y codificadas por genes de clase II del complejo.

Tanto en la cadena α (32-34 kDa), como en la cadena β (28-32 kDa) del heterodímero de clase II, se distinguen claramente: dos dominios extracelulares de 90 aminoácidos, $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y $\beta 1$ y $\beta 2$, respectivamente; una región o dominio hidrofóbico transmembrana de alrededor de 25 aminoácidos para anclaje en la membrana celular y, una pequeña cola citoplasmática de longitud variable en las distintas moléculas MHC de clase II (figura 8-5). La ranura o bolsillo peptídico de presentación antigénica está conformado por los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ y, normalmente, presenta a los linfocitos T CD4^+ fragmentos peptídicos de 13 a 15 aminoácidos. El polimorfismo de esta molécula está localizado principalmente en los dominios alfa 1 y alfa 2 de las moléculas y está concentrado en tres regiones hipervariables que son las que hacen contacto directo con el péptido antigénico y/o el receptor de células T.

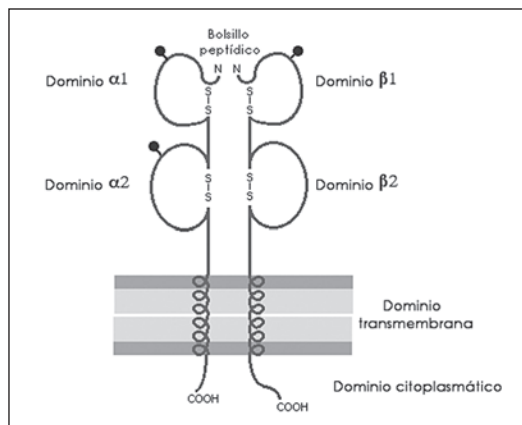


Figura 8-5. Esquema de las moléculas MHC de clase II. La molécula de clase II es un heterodímero glicoproteico constituido por una cadena α de 32-34 kDa y una cadena β de 28-34 kDa. Ambas cadenas están codificadas por genes MHC de clase II y están asociadas no covalentemente. El bolsillo o sitio de unión de fragmentos peptídicos se conforma de los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ y de las cadenas α y β respectivamente.

Los dominios $\alpha 3$ y $\beta 3$ de las moléculas de clase II, lo mismo que el dominio $\alpha 3$ y la $\beta 2m$ de las moléculas de clase I, tienen una secuencia aminoácida y una conformación similar a los dominios constantes de las moléculas de inmunoglobulinas y se clasifican entonces dentro de la misma superfamilia de las inmunoglobulinas.

3. EL CONCEPTO DE RESTRICCIÓN MHC

Un linfocito T, específico para un fragmento peptídico presentado en el contexto de una molécula MHC particular, sólo reconocerá este complejo molécula MHC-péptido y no reconocerá el mismo péptido presentado en el contexto de una molécula MHC de la misma clase (I o II), pero distinta. El genotipo o la molécula MHC restringe entonces la especificidad del linfocito T, el que no reconoce a la molécula MHC o al fragmento peptídico, sino sólo al complejo MHC-péptido específico.

El origen del fenómeno de restricción MHC se encuentra en el proceso de diferenciación o "educación tímica", puesto que en el timo se produce la selección positiva de linfocitos T, en función de su capacidad para reconocer fragmentos peptídicos en el contexto de moléculas MHC propias. Sin embargo, un linfocito T citotóxico específico para un fragmento peptídico presentado en el contexto de una molécula MHC de clase I propia, puede reconocer o reaccionar cruzadamente con un fragmento peptídico extraño, presentado en el contexto de una molécula MHC de clase I extraña o contra un péptido propio presentado en el contexto de una molécula de clase I extraña o alogénica. De esta manera puede entonces explicarse, al menos en parte, el rechazo al trasplante de tejidos, puesto que antígenos propios o extraños (alogénicos) están siendo presentados en el contexto de moléculas MHC extrañas en la superficie de células extrañas o alogénicas, presentes en el tejido del donante. Un fenómeno similar puede explicar la denominada reacción del trasplante o injerto contra el huésped (GvH, "graft-versus-host"), en la que linfocitos T citotóxicos presentes en el tejido trasplantado (linfocitos alogénicos) reaccionan contra tejidos o células del receptor.



4. OTRAS MOLÉCULAS DE PRESENTACIÓN

4.1. Moléculas CD1

Las moléculas CD1 son glicoproteínas transmembrana constituidas por una cadena alfa de 43-49 kDa asociada no covalentemente a una $\beta 2m$. Lo anterior indica una semejanza estructural con las moléculas MHC clase I, con las cuales comparten una limitada pero significativa homología de secuencia (20%). Estas moléculas son codificadas por genes fuera del MHC (cromosoma 1 humano y 3 murino) y tienen un bajo polimorfismo. Su transporte intracelular es TAP o Ii independiente, moléculas importantes en el movimiento de las moléculas clase I y II, respectivamente. Aunque existe evidencia de que estas moléculas están presentes en, al menos, todos los mamíferos, la mejor caracterización se ha hecho en humano y ratón. Los miembros de la familia CD1 se dividen en dos grupos, sobre la base de sus secuencias aminoacídicas. El grupo I comprende sólo moléculas descritas en humano: CD1a, CD1b y CD1c; al parecer no habría proteínas grupo I en el ratón. El grupo II incluye a CD1d en el humano, y CD1d.1 y CD1d.2 en el ratón.

Las moléculas CD1 son fundamentalmente expresadas en timocitos inmaduros y células presentadoras de antígeno, incluyendo células dendríticas, macrófagos activados por citoquinas y linfocitos B. Esto es un indicio de la participación de estas moléculas en la presentación antigénica, pero a diferencia de las moléculas convencionales, ellas participan en la presentación de lípidos y glicolípidos a linfocitos CD4+, CD8+ y dobles negativos (DN). Glicolípidos de micobacterias, como manósidos de fosfoinositol (PIM), lipoarabinomananos (LAM), ácido micólico y hexosil-1-fosfoisoprenoide (hPIP) se presentan en el contexto de moléculas CD1, grupo I.

Las moléculas CD1d (del grupo II) interactúan con las recientemente descritas NKT cells. Las células NKT representan una subpoblación linfocitaria que expresa receptores T (TCR) y NK (CD161). Estas células utilizan una cadena invariante del TCR alfa (Va14Ja281 en el ratón y Va24JaQ en el humano). A pesar que se sabe que estas células participan en la regulación de la respuesta inmune, los mecanismos precisos no están aún bien definidos.

Las moléculas CD1 forman parte, al parecer,

de mecanismos complementarios para establecer una respuesta inmune adecuada en la infección con bacterias intracelulares y abre la posibilidad del uso de antígenos glicolípidicos en posibles vacunas, por ejemplo contra la tuberculosis.

5. HERENCIA DE LOS GENES HLA

Los genes HLA se heredan en forma codominante, por tanto los alelos de ambos locus son expresados, así dos set de moléculas HLA o haplotipos pueden ser pesquisados en las células, uno heredado del padre y otro de la madre.

Existe un 25% de posibilidades que 2 hijos compartan ambos haplotipos (HLA idénticos), un 25% de posibilidades que no compartan ningún haplotipo y un 50% de posibilidades que compartan un haplotipo (figura 8-6).

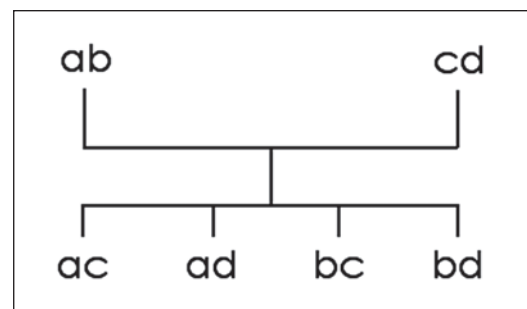


Figura 8-6. Herencia de haplotipos HLA. En la figura, (a) y (b) representan los dos haplotipos maternos, y (c) y (d) representan los dos haplotipos paternos. Al heredar uno de los haplotipos de cada padre, pueden obtenerse los haplotipos (ac), (ad), (bc) y (bd). Existe un 25% de posibilidades que dos hijos deen HLA idénticos (ejemplo (ac) y (ac)), un 25% de posibilidades que sean totalmente HLA no idénticos (ejemplo (ac) y (bd)) y 50% de posibilidades que ellos sean HLA semi-idénticos.

6. COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y ENFERMEDAD

Durante muchos años se ha sabido que la resistencia o susceptibilidad a contraer diversas enfermedades está en muchos casos determinada por factores genéticos y, en los últimos años se han identificado diversos marcadores genéticos que son idénticos o están estrechamente ligados a los genes que confieren resistencia o susceptibilidad a la enfermedad. El análisis de tales marcadores permite no sólo identificar a los individuos que están en riesgo de contraer o desarrollar una cierta enfermedad, sino también estudiar o determinar la patogénesis de la enfermedad.



Ciertos genes o haplotipos del MHC parecen estar asociados con la susceptibilidad o resistencia a desarrollar algunas enfermedades. Sin embargo, los exactos mecanismos responsables de estas asociaciones son variados y en general nos están claramente definidos. Se postula que esta asociación puede ser debida a la semejanza entre péptidos propios y péptidos derivados de patógenos como por ejemplo *Klebsiella*, lo que llevaría al desarrollo de una respuesta autoinmune. Este sería el mecanismo que explicaría la asociación entre HLA-B27 y Artritis Anquilosante (AS). Otra posibilidad es que la asociación se deba a la presentación preferencial de ciertos péptidos derivados de patógenos u otros antígenos como es el caso de la enfermedad celiaca (EC) y el Púrpura aloinmune neonatal (PAN). En el caso de la EC los alelos HLA-DQ2 y DQ5 presentan péptidos derivados del gluten a los linfocitos T y éstos

están directamente involucrados en la patología de la EC. En el caso de PAN los péptidos son derivados del aloantígeno HPA1a que son presentados por el alelo HLA-DRB3*0101 y que lleva a la producción de anticuerpos patógenos en contra de este aloantígeno, resultando en grave trombocitopenia en el recién nacido. Finalmente es posible que esta asociación sea con un gen aún no identificado que se encuentra en desequilibrio de unión con algunos de los genes de HLA como es el caso de Hemocromatosis Hereditaria (HH) y HLA-A3. Hoy se sabe que HH ocurre como resultado de mutaciones en el gen HFE localizado telomérico de HLA-A. La asociación con HLA-A3 se debe al desequilibrio de unión con ese alelo en un haplotipo ancestral en el cual se originó la mutación inicial. En este caso se habla de enfermedades ligadas al HLA.

En la tabla 8-1 se muestran algunos ejemplos de asociaciones entre HLA y enfermedades.

Tabla 8-1. Enfermedades asociadas y ligadas al sistema HLA

Enfermedades asociadas a HLA

Coriorretinopatía de Birdshot	HLA-A29
Enfermedad de Behçet's	HLA-B51
Espondilitis anquilosante	HLA-B27
Malaria	HLA-B53
Diabetes Mellitus insulino dependiente	HLA-DQ8
Artritis reumatoidea	Aminoácidos 70-74 codificados por gen DRBI (QKRAA or QRRRAA)
Narcolepsia	HLA-DQBI*0602/DQAI*0102
Enfermedad celiaca	HLA-DQBI*0201/DQAI*0501
Deficiencia selectiva de IgA	HLA-DRBI*0301/-DQBI*02
Desarrollo de anticuerpos HPA-Ia PAN	HLA-DRB3*0101
No respuesta de anticuerpos con vacunas para VHB	HLA-B44-DR7-DQ2 (en Caucásicos) HLA-B8-DR-DQ2 (en Caucásicos) HLA-B564-DR4-DQ4 (en Japoneses)
Remoción de HCV circulante	HLA-DRBI*11-DQB1*0301

Enfermedades ligadas a HLA

Hemocromatosis	(HLA-A3) gen HFE C282Y y H63D
Deficiencia de 21 OH	(HLA-B27) gen 21 OH

PAN, Púrpura aloinmune neonatal; VHB, Virus de Hepatitis B; (), Alelo asociado



El riesgo relativo a desarrollar una enfermedad se calcula a partir de la frecuencia del alelo o haplotipo en la población enferma y su frecuencia en la población control sana. Así, en una tabla de 2 x 2, el número de individuos enfermos y sanos que presentan o carecen de un determinado alelo o haplotipo HLA es:

		Alelo HLA		Riesgo relativo = $\frac{A/D}{B/C}$
		+	-	
Enfermos	A	B		
Sanos	C	D		

Así, por ejemplo, la Espondilitis anquilosante presenta un riesgo relativo de 87.4 y Enfermedad Celiaca 10.8.

7. NOMENCLATURA Y TIPIFICACIÓN HLA

Las moléculas MHC clase I y II son muy polimórficas. En humanos (HLA) actualmente se les identifica con una nueva nomenclatura que incluye el locus (Ej. A, de clase I), seguido de un asterisco (*) y 3 ó 4 dígitos en que los dos primeros corresponden a la especificidad serológica y los dos segundos al número de la variante. Ejemplo: HLA-A*0203 .

La tipificación HLA, requerida entre otras situaciones, para trasplantes y determinación de riesgo de enfermedad, se estudia a través de pruebas serológicas (microlinfocitotoxicidad), métodos celulares y de biología molecular (ver capítulo 42).

LECTURAS SUGERIDAS

Bahram, S., and Spies, T., "The MIC gene family", *Res. Immunol.* 147:328-334, 1996.

Barber, L.D., and Parham, P., "Peptide binding to major histocompatibility complex molecules", *Ann. Rev. Cell Biology* 9:163-206, 1993.

Braud, V., Alland, D., "And Mc Michael A. Functions of non classical MHC and non-MHC-encoded class I molecules", *Curr. Opin. Immunol.* 11: 100-108, 1999.

Campbell, R., and Trowsdale, J., "A map of the human Major Histocompatibility Complex", *Immunol. Today.* 18: 43-45, 1997.

Gruen, J., and Weissman, S., "Evolving views of the Major Histocompatibility Complex", *Blood* 11: 4252-4246, 1997.

Jackson, M.R. and Peterson, P.A., "Assembly and intracellular transport of MHC class I molecules", *Ann. Rev. Cell Biology* 9: 207-233, 1993.

Kirberg, J., Berns, A. and von Boehmer, H., "Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to Major Histocompatibility complex-encoded molecules", *J. Exp. Med.* 8: 1269-1275, 1997.

Matsuda, J. and Kronenberg, M., "Presentation of self and microbial lipids by CD1 molecules", *Curr. Opin. Immunol.* 13: 19-25, 2001.

Schaible, U. and Kaufmann, H., "CD1 and CD1-restricted T cells in infections with intracellular bacteria", *Trends Microbiol.* 9: 419-425, 2000.

Sette, A. and Sidney, J., "HLA supertypes and supermotifs: a functional perspective on HLA polymorphism", *Curr. Opin. Immunol.* 10: 478-482, 1998.

Steven, G.E., Marsh, J., Julia G. Bodmer, E. Ekkehard D. Albert et al., "Nomenclature for factors of the HLA system", *European journal of immunogenetics.* 28:377-424. 2000.



Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 9

PROCESAMIENTO, PRESENTACIÓN Y RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO

Ulises Vergara C., Claudio Zúñiga M., Iván Palomo G. y Cristina Navarrete

- 1. Introducción**
- 2. Linfocitos T y reconocimiento de antígenos**
 - 2.1. Subpoblaciones linfocitarias T y reconocimiento peptídico
 - 2.2. Linfocitos T $\gamma\delta$
 - 2.3. Células NK
 - 2.4. Células presentadoras de antígenos
- 3. Tráfico celular y procesamiento antigénico**
- 4. Antígenos endógenos y exógenos**
- 5. Fragmentos peptídicos y moléculas MHC**
- 6. Procesamiento y presentación de antígenos endógenos**
- 7. Procesamiento y presentación de antígenos exógenos**
- 8. Presentación alternativa de péptidos**





RESUMEN

Los linfocitos T reconocen fundamentalmente antígenos proteicos, en forma de fragmentos peptídicos presentados en asociación con una molécula del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) en la membrana de una célula presentadora de antígenos (CPA). Así la presentación antigénica en el contexto de una molécula MHC y el reconocimiento del complejo molécula MHC-péptido por el receptor T, proporciona al sistema inmune de un mecanismo de control o detección de proteínas anormales en células transformadas o tumorales y de proteínas extrañas en células infectadas por virus, bacterias o parásitos.

Las evidencias experimentales sugieren que el procesamiento antigénico y la unión de fragmentos peptídicos a moléculas MHC parece depender tanto del origen del antígeno, como del tráfico antigénico a través de distintos compartimientos celulares. Así, los antígenos intracelulares o endógenos son procesados o degradados por la maquinaria multicatalítica citoplasmática (Proteasoma) y los fragmentos peptídicos allí generados son luego translocados al retículo endoplásmico, con la participación de un transportador ATP-dependiente (TAP). En el retículo, los péptidos endógenos serán unidos a una molécula MHC clase I y sólo el complejo correctamente ensamblado será transportado y expresado en la superficie celular, para su presentación a linfocitos T CD8+. Los antígenos extracelulares serán en cambio, internalizados por la célula presentadora y procesados en un compartimiento ácido celular (endolisosoma o fagolisosoma). Los fragmentos peptídicos aquí generados son luego asociados a una molécula MHC clase II y sólo el complejo correctamente ensamblado, se expresará en la membrana celular para la presentación del fragmento peptídico a linfocitos T CD4+.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es parte de los mecanismos biológicos destinados a mantener la integridad estructural y funcional de los individuos y está genéticamente programado para defendernos de la agresión de agentes infecciosos, células y moléculas extrañas.

El sistema inmune está constituido por células con capacidad para reconocer y neutralizar o eliminar moléculas extrañas (linfocitos B, linfocitos T y células NK) y por células accesorias que cumplen una importante función en el procesamiento y presentación de antígenos (monocitos, macrófagos, células dendríticas, células interdigitantes, etc.).

2. LINFOCITOS T Y RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO

Los linfocitos B pueden reconocer epítopos estructurales, continuos o de secuencia y/o

epítopos conformacionales o discontinuos en antígenos de naturaleza química tan variada como proteínas, hidratos de carbono, lípidos y ácidos nucleicos. Los linfocitos T en cambio, reconocen fundamentalmente determinantes continuos o de secuencia en antígenos proteicos y, sólo en forma de pequeños fragmentos peptídicos presentados en asociación con una molécula del Sistema o Complejo Principal de Histocompatibilidad, en la superficie de una CPA. Dada la elevada homología tanto estructural como funcional, entre el receptor antigénico de los linfocitos B (BCR) y el receptor de los linfocitos T (TCR), no existía hasta ahora una explicación satisfactoria que diera cuenta de esta capacidad limitada o restringida de los linfocitos T para reconocer fundamentalmente epítopos o determinantes antigénicos de naturaleza proteica. Sin embargo, todo parece indicar que esta restricción estaba determinada por las moléculas MHC, que sólo son capaces de unir o presentar fragmentos peptídicos. Pero con el reconocimiento de las moléculas CD1, que son capaces de presentar antígenos lipídicos o glicolipídicos a los linfocitos



T CD4⁺, CD8⁺ y DN, ésta visión limitada ha cambiado y al parecer el receptor T es capaz de reconocer antígenos de diversa naturaleza química, aunque presentados por moléculas diferentes a las clásicas MHC. De todas maneras, además de estos mecanismos complementarios, la presentación antigénica en el contexto de moléculas del MHC y la detección o reconocimiento del complejo molécula MHC-péptido por el receptor de un linfocito T, proporciona al sistema inmune de un mecanismo de control o detección de la expresión de proteínas anormales en células transformadas o tumorales y de proteínas extrañas en células infectadas por virus, bacterias o parásitos.

2.1. Subpoblaciones linfocitarias T y reconocimiento peptídico

Los linfocitos T (TCR $\alpha\beta$) tanto como citotóxicos (LTc) y linfocitos T supresores (LTs) reconocen fragmentos peptídicos asociados o presentados por moléculas MHC clase I, mientras los linfocitos T "helper" (LTh), reconocen fragmentos peptídicos asociados a moléculas MHC clase II. Esta especificidad en el reconocimiento de péptidos asociados a una clase particular de molécula MHC está determinado por las moléculas CD4 y CD8, que actúan como co-receptor linfocitario para el reconocimiento de la molécula MHC. Así, la molécula CD8 sólo se une con la molécula de clase I, reconociendo una región monomórfica situada en el dominio α -3 de esta molécula MHC. La molécula CD4 en cambio, sólo se une con la molécula MHC clase II, reconociendo una región monomórfica situada en el dominio β -2.

El reconocimiento antigénico asociado a moléculas MHC clase I resulta en la destrucción citotóxica de la célula presentadora o célula blanco, mientras el reconocimiento de antígenos en el contexto de moléculas MHC clase II conduce a la activación y proliferación de distintas subpoblaciones de células T "helper", con síntesis y secreción de una combinación particular de citoquinas que promueven una amplificación de la respuesta inmune humoral o celular, al activar linfocitos B y/o macrófagos, y diversas células inflamatorias.

La respuesta inmune humoral y celular son reguladas por subpoblaciones distintas de células T "helper". Así, los linfocitos T helper 1 (Th1) participan en la regulación de la respuesta inmune celular (reacciones inflamatorias, de hipersensibilidad retardada y citotóxicas) y se caracterizan por la sín-

tesis y secreción de interleuquina 2 (IL-2), interleuquina 12 (IL-12), interferon gamma (IFN γ) y factor de necrosis tumoral β (TNF β). Los linfocitos T helper 2 (Th2) en cambio, regulan la respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos y se caracterizan por la síntesis y secreción de interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 5 (IL-5), interleuquina 6 (IL-6) e interleuquina 10 (IL-10).

El reconocimiento específico y restringido por las moléculas del MHC está mediado fundamentalmente por linfocitos T que poseen el receptor $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$).

2.2 Linfocitos T $\gamma\delta$

Los linfocitos T $\gamma\delta$ se encuentran predominantemente en tejidos epiteliales, tienen una diversidad restringida y forman parte de las respuestas innatas a patógenos intracelulares y a tumores. Estos linfocitos no requieren de las moléculas clásicas presentadoras de antígenos ni tampoco utilizan las vías clásicas de reconocimiento antigénico utilizado por los linfocitos T $\alpha\beta$. Sin embargo, esta subpoblación de linfocitos T si reconocen los antígenos no clásicos de clase I, MICA y MICB que se expresan principalmente en células tumorales de origen epitelial que han sido sometidas a stress. El reconocimiento específico de estas moléculas está mediado por el receptor NK (NKG2D) expresado en estos linfocitos. Los linfocitos T $\gamma\delta$ también reconocen antígenos no peptídicos (lípidos) tales como isopentenyl pirofosfatasa (IPP) derivados de *M. tuberculosis*. El reconocimiento de estos antígenos es mediado por la presencia de CD1 y en la mayoría de los casos requiere de la capacitación y transporte de antígeno a un compartimiento intracelular ácido en la CPA similar al procesamiento de péptidos restringido por las moléculas de MHC clase II (ver punto 7). Sin embargo, el sistema de transporte TAP1/TAP2 o las moléculas DM no son requeridas ya sea para la expresión de CD1 o para la función presentadora de estas moléculas (capítulo 8).

2.3 Células NK

Las células NK están directamente involucradas en la respuesta inmune en contra de virus, parásitos, bacterias intracelulares y tumores. También contribuyen directamente a la eliminación de células alogénicas y, mediante la secreción de citoquinas, participan en la regulación de otras funciones



inmunológicas, como la producción de anticuerpos y la hematopoyesis. Las células NK presentan en su membrana una gran variedad de receptores. Los receptores como CD2, CD69 y CD16 funcionan en forma independiente de la expresión de moléculas de MHC, mientras que otros si dependen de la expresión de las moléculas clásicas y no clásicas de MHC clase I. En este último grupo se encuentran los receptores del tipo C lectin-like (NKC) por ejemplo CD94/NKG2D y los "Ig like receptors" (LRC), por ejemplo KIRs (ver capítulo 10). Los receptores de la familia NKC están localizados en el cromosoma 12 mientras que los LRC en el cromosoma 19. Tanto los NKC como los LRC incluyen receptores de inhibición y activación de las células NK, que tienen como ligandos moléculas MHC de clase I clásicas y no clásicas (tabla 1). Estos receptores son altamente polimórficos y su variación está dada no sólo por mutaciones en los distintos genes, sino también por su expresión diferencial en distintos individuos, vale decir no todos los individuos expresan el mismo número de receptores.

2.4 Células presentadoras de antígeno

La posibilidad que linfocitos T puedan

reconocer péptidos antigénicos, está en gran parte determinada por las características de las células presentadoras de antígeno: monocitos, macrófagos, células dendríticas, células interdigitantes, linfocitos B. etc. De éstas, las células dendríticas (CD), son sin duda las más importantes debido a su capacidad para activar linfocitos T "naive". Las CD forman parte de un grupo heterogéneo de células que se encuentran en los órganos linfoides secundarios y en la periferia, en distintos estadios de diferenciación y maduración. En los tejidos periféricos, las CD inmaduras tienen un grado moderado de síntesis y expresión de moléculas MHC de clase II y una gran capacidad fagocítica. Luego de su reclutamiento y activación, ya sea por citoquinas u otros estímulos capaces de señalar la presencia de patógenos o de daño tisular, se produce un aumento pasajero en la síntesis de moléculas MHC de clase II, seguido de una disminución de la capacidad fagocítica, luego de la captura o incorporación de antígenos. Estas CD inmaduras, migran luego a los órganos linfoides secundarios, donde completan su proceso de maduración para el adecuado procesamiento y presentación de antígenos a linfocitos T.

Utilizando marcadores de membrana de la serie mieloide (CD11c y CD33) se ha podido identificar, en sangre periférica, 2 subpoblaciones de células dendríticas de origen mieloide y una subpoblación CD11-, de origen linfóide o plasmocitoide. Las CD de origen mieloide son más propensas a secretar IL-12 (una citoquina inductora de respuesta Th1), mientras que las CD de origen linfóide secretan IL-10, que promueve una respuesta de tipo TH2. La subpoblación mieloide tiene la capacidad de inducir respuestas proliferativas contra diversos antígenos y aloantígenos mientras que la subpoblación linfóide tiene una función limitada como célula presentadora de antígeno, pero parece también involucrada en la inducción de tolerancia.

La presentación de fragmentos antigénicos asociados a moléculas MHC ha llevado a los inmunólogos a preguntarse dónde y cómo se realiza el procesamiento antigénico en la célula presentadora y cómo y dónde se realiza la asociación de los fragmentos peptídicos a las moléculas MHC clase I o clase II. ¿Existe alguna relación entre el procesamiento y presentación de antígenos y la síntesis, transporte y expresión de las moléculas MHC en la membrana de la célula presentadora?.

Tabla 9-1. Interacción entre moléculas MHC clase I y los receptores activadores e inhibidores de las células NK.

Ligandos	Receptores activadores
HLA-E	CD94/NKG2C (DAP 12)
MIC	NKG2D (DAP 10)
HLA-C	KIR2DS (DAP 12)
HLA-B	KIR3DS (DAP 12)
HLA-G	KIR2DL4
Ligandos	Receptores inhibidores
HLA-E	CD94/ NKG2A/
HLA-C	KIR2DL
HLA-B	KIR3DL
HLA	ILT2/4



3. TRÁFICO CELULAR Y PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO

La evidencia experimental hasta ahora acumulada sugiere que el procesamiento antigénico y la unión de péptidos a moléculas MHC parece depender tanto del origen del antígeno como del tráfico antigénico a través de distintos compartimientos celulares. Así, los antígenos intracelulares y extracelulares constituyen desafíos distintos para el sistema inmune puesto que los fragmentos peptídicos derivados de antígenos intracelulares o endógenos son normalmente unidos a moléculas MHC clase I y presentados a linfocitos T CD8+, mientras los antígenos extracelulares o exógenos se unen a moléculas MHC clase II y son normalmente presentados a linfocitos T CD4+. La asociación de fragmentos peptídicos a moléculas MHC clase I o clase II es entonces función de la ruta de introducción del antígeno a la célula y de su susceptibilidad al procesamiento o degradación en distintos compartimientos celulares.

El aislamiento e identificación de líneas celulares con defectos en el procesamiento y presentación de antígenos, ha constituido un avance significativo en el conocimiento de la biología de la respuesta celular T y del ensamblaje y transporte de las moléculas MHC. Así, la línea celular RMA-S derivada de células mutagenizadas de linfoma H-2^b de ratón transformadas por virus de Rauscher y la línea linfoblastoide humana LBL 721.174, expresan bajos niveles de moléculas MHC en la superficie celular, aún cuando sintetizan niveles normales de la cadena alfa de la molécula clase I y de beta-2 microglobulina ($\beta 2m$). La incubación de estas líneas celulares con péptidos virales capaces de unirse específicamente a las moléculas MHC clase I, conduce a la expresión del complejo MHC-péptido en la superficie celular y a su destrucción citotóxica si se les cocultiva con linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos para ese complejo MHC-péptido. Estos fenómenos no ocurren si las líneas celulares se infectan con el virus original, sugiriendo un defecto en el procesamiento y presentación de antígenos y una relación con el ensamblaje de las moléculas MHC.

4. ANTÍGENOS ENDÓGENOS Y EXÓGENOS

Antígenos proteicos endógenos son todas aquellas proteínas residentes en el citoplasma de

la CPA o de la célula blanco de la respuesta inmune. Estas proteínas son generalmente sintetizadas en ribosomas libres en el citoplasma o pueden corresponder a proteínas derivadas de virus, bacterias o parásitos intracelulares; pero, para todas ellas, sus fragmentos peptídicos se generan mediante proteólisis citoplasmática. Los fragmentos antigénicos deben ser luego translocados o transportados al retículo endoplásmico, donde se encuentran las moléculas MHC clase I sintetizadas en ribosomas asociados al retículo.

Los antígenos proteicos exógenos corresponden a proteínas extracelulares internalizadas mediante la unión a un receptor específico de la superficie celular o en fase fluida mediante vesículas membranosas en procesos de fagocitosis, pinocitosis o endocitosis. Las proteínas así internalizadas serán procesadas en un compartimiento ácido celular (fagolisosoma o endolisosoma) y los fragmentos peptídicos allí generados serán luego asociados a una molécula MHC clase II para su transporte y expresión en la superficie celular.

5. FRAGMENTOS PEPTÍDICOS Y MOLÉCULAS MHC

La evidencia experimental indica que las moléculas MHC clase I unen preferentemente, péptidos de 8 a 9 aminoácidos generados en el citoplasma celular. Las moléculas MHC clase II en cambio, unen preferentemente péptidos de 13 a 15 aminoácidos, generados en un compartimiento ácido celular (compartimiento endocítico MIIC). Esta diferencia en la longitud de los fragmentos peptídicos que pueden asociarse a moléculas clase I o clase II parece depender de la estructura y conformación del bolsillo de unión de la molécula MHC: el bolsillo es cerrado en las moléculas de clase I y abierto en las moléculas clase II. De esta manera las moléculas clase II puede unir péptidos de mayor longitud que las moléculas clase I.

Cuando se purifican moléculas MHC por inmunoprecipitación de extractos celulares con anticuerpos monoclonales específicos para moléculas clase I o clase II, se encuentra que ellas coprecipitan con los fragmentos peptídicos alojados en su bolsillo de unión. La secuenciación de los fragmentos peptídicos, eluidos o aislados del complejo MHC-péptido por denaturación ácida, demuestra la existencia de 2 a 3 residuos

conservados de anclaje a la molécula MHC.

En los péptidos de 8 a 9 aminoácidos que se unen a las moléculas MHC clase I, los residuos de anclaje se encuentran normalmente en los extremos amino y carboxilo del fragmento peptídico y sólo pueden ser ocupados por un aminoácido específico o por residuos aminoacídicos que contienen cadenas laterales similares o estrechamente relacionadas. El extremo carboxiterminal es con frecuencia un aminoácido con cadena lateral alifática (como isoleucina, leucina o valina) o cargada positiva o negativamente.

Péptidos distintos pueden entonces asociarse a la misma molécula MHC, siempre y cuando los residuos de anclaje tengan la naturaleza y la posición que corresponde para una adecuada y estable asociación a esa molécula. Sin embargo, cada complejo MHC-péptido será reconocido por un linfocito T distinto y específico para ese complejo.

6. PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS ENDÓGENOS

Los antecedentes hasta ahora disponibles sugieren que los antígenos endógenos son degradados o procesados en el citoplasma celular, generando fragmentos peptídicos de 8 a 9 aminoácidos por acción de un complejo multicatalítico de 700 kDa, denominado **Proteasoma**, Macropainina o MCP ("multicatalytic proteinase"), que es responsable de la degradación de la mayoría de las proteínas en el citoplasma y el núcleo celular (figura 9-1). Esta estructura cilíndrica está formada por 4 anillos heptaméricos de subunidades alfa y beta (alfa7beta7beta7alfa7), a este cuerpo central se le puede adicionar una subunidad reguladora denominada 19S, que corresponde a un complejo ATPasa, generando el proteasoma 26S, responsable del procesamiento de la mayoría de las proteínas citoplasmáticas, unidas a una proteína señal llamada ubiquitina. Este proteosoma genera péptidos con un rango entre 5–30 aminoácidos, y alrededor de un 15% de ellos cae dentro del rango de 9-10 aminoácidos, que poseen la longitud apropiada para unirse a las moléculas MHC clase I. Bajo la influencia del interferón gamma, tres subunidades beta, denominadas X, Y y Z en el "house-keeping" proteasoma son reemplazadas por las subunidades homólogas LMP-7, LMP-2 y MECL-1, respectivamente y también se induce la unión de otra subunidad reguladora denominada 11S o PA28,

a esta estructura se le denomina inmunoproteasoma. **LMP-2 y LMP-7** ("low molecular mass protein") codifican en la región de los genes de clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad.

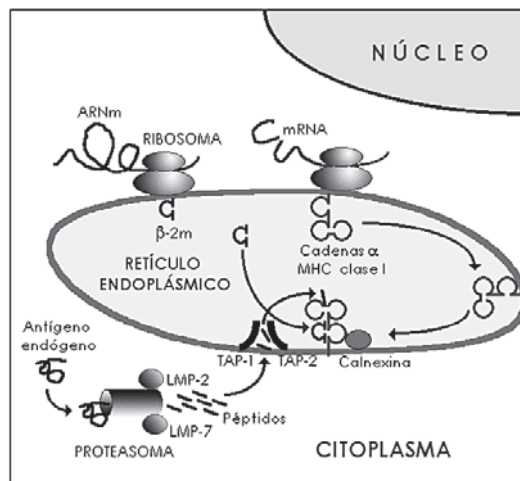


Figura 9-1. Procesamiento de antígenos endógenos. Antígenos endógenos son degradados por el Proteasoma citoplasmático, generando fragmentos peptídicos de 8 a 9 aminoácidos que serán translocados al retículo endoplásmico por el transportador TAP. En el retículo endoplásmico la molécula MHC clase I será ensamblada a partir de la cadena α de clase I, la β 2m y un fragmento peptídico específico. En el ensamblaje participan chaperonas como calnexina y proteínas de shock térmico (hsp 60 y hsp 70).

Al parecer los cambios anteriores no tienen consecuencias drásticas en la generación de péptidos, pero si se inducen algunas diferencias cualitativas, preferentemente en la región carboxiterminal de los péptidos generados. Las proteínas LMP tienen alguna homología con serín-proteasas, y aún cuando no existe evidencia directa y convincente que muestre su actividad enzimática, se supone que ellas se incorporan al proteasoma alterando sus propiedades catalíticas de endopeptidasa, de manera tal de aumentar la generación de algunos fragmentos peptídicos. Estudios realizados utilizando líneas celulares mutantes incapaces de generar fragmentos peptídicos, demuestran que la presentación antigénica puede restaurarse aún en ausencia de las subunidades codificadas por los genes LMP del sistema principal de histocompatibilidad, indicando que no existe un requerimiento absoluto de estas proteínas en la generación de péptidos. Sin embargo, esto no descarta la posibilidad que las moléculas LMP incrementen la eficacia del complejo enzimático, generando más frecuen-

temente fragmentos peptídicos escindidos después de aminoácidos básicos, ácidos o hidrofóbicos.

Estudios realizados con inhibidores específicos del proteasoma han revelado que frente a su inactivación se inducen o se hacen evidentes mecanismos proteolíticos compensatorios de la pérdida de actividad del proteasoma, que pueden corresponder a complejos proteicos semejantes o a sistemas de endo y exopeptidasas.

El sitio preciso donde los péptidos generados en el citoplasma se unen a las moléculas MHC es el retículo endoplásmico. El tratamiento de células con Brefeldina A (metabolito de hongos que bloquea el transporte de proteínas desde el retículo endoplásmico al Golgi) o con la proteína E19 derivada de citomegalovirus (que retiene moléculas MHC clase I en el retículo), bloquean o interfieren la presentación antigénica.

Los fragmentos peptídicos generados por el complejo multienzimático deben ser translocados desde el citoplasma al retículo donde se unirán a las moléculas MHC clase I, para su transporte a la superficie celular a través de la vía exocítica (figura 9-2). La evidencia experimental sugiere la participación de transportadores dependientes de ATP y codificados por los genes TAP-1 y TAP-2 localizados en las proximidades de los genes de clase II del MHC. Las **proteínas TAP-1 y TAP-2** se asociarían formando un heterodímero transportador en la membrana del retículo endoplásmico.

La transfección del gen TAP-2 en la línea celular RMA-S y de los genes TAP-1 y TAP-2 en la línea LBL 721.174 restablece la expresión de las moléculas MHC clase I y la adecuada presentación de antígenos.

La molécula MHC clase I está constituida por una glicoproteína integral de membrana (cadena pesada α de 45 kDa) que está asociada no covalentemente con una subunidad soluble de 12 kDa, la β -2 microglobulina, (β 2m) que no está codificada por genes MHC y se encuentra normalmente libre en el plasma y fluidos tisulares (ver capítulo 8). La cadena pesada alfa contiene 3 dominios extracelulares, dos de los cuales (α -1 y α -2) forman la región o bolsillo de unión para el fragmento peptídico. El tercer dominio (α -3), contiene una región para el reconocimiento o interacción con el co-receptor CD8 del linfocito T citotóxico, y una región para la unión no covalente con β 2m.

Tanto la cadena α como la β 2m de la molécula MHC clase I se sintetizan en ribosomas

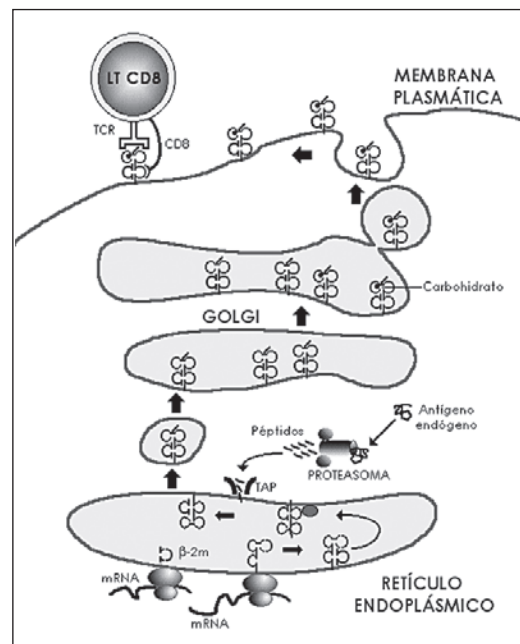


Figura 9-2. Tráfico antigénico y presentación de péptidos endógenos. En el contexto de MHC de clase I. En el retículo endoplásmico la molécula MHC clase II correctamente ensamblada a partir de la cadena α , β 2m y un fragmento peptídico, es transportado al Golgi y desde aquí presentado a un LT CD8+, en el contexto de una molécula MHC clase I. LMP, "Low molecular mass protein"; TAP, "Transporter associated with Antigen Processing".

asociados al retículo endoplásmico y pueden por lo tanto ensamblarse en el lumen del retículo. Sin embargo, la evidencia experimental sugiere que la unión de un fragmento peptídico es un requisito necesario para la conformación y ensamblaje estable de la molécula clase I y, en la mayoría de los casos, sólo el complejo trimolecular estable (péptido-cadena α - β 2m) abandona el retículo endoplásmico para completar su glicosilación en el Golgi y luego viajar a la superficie celular por la vía exocítica. Las moléculas MHC clase I, libres o mal ensambladas serían retenidas por proteínas residentes en el retículo endoplásmico (como la proteína p88 o calnexina), previniendo su degradación y manteniéndolas en una conformación compatible con el ensamblaje adecuado. La **calnexina** parece funcionar como molécula chaperona o chaperonina, para el plegamiento o conformación estable de diversas proteínas, incluyendo los TCR y las inmunoglobulinas. Si células de *Drosophila melanogaster* (que carecen de moléculas MHC, β 2m y TAP), se transfectan con los genes



para moléculas MHC clase I y de $\beta 2m$, se encuentra que estas células son capaces de expresar en su superficie, el complejo MHC- $\beta 2m$ o moléculas MHC libres. Si además de los genes MHC y $\beta 2m$, las células se transfectan también con el gen para calnexina, las moléculas MHC son retenidas en el retículo mediante asociación con calnexina y por lo tanto, no se expresan en la superficie celular.

Las chaperoninas cumplen un rol fundamental en la estabilidad de diversas proteínas, impidiendo su agregación y favoreciendo un adecuado plegamiento, ensamblaje y retención en diversos compartimientos celulares. La interacción de las moléculas MHC con chaperoninas residentes en el retículo endoplásmico asegura que distintas moléculas MHC unan fragmentos peptídicos en el compartimiento celular adecuado. Por otro lado, chaperoninas citosólicas de la familia de las proteínas de shock térmico de 60 kDa (hsp 60) y de 70 kDa (hsp 70), el heterodímero transportador TAP, calnexina y tapasina aseguran el transporte y asociación de los péptidos adecuados a las moléculas MHC de clase I (figura 9-2). Tapasina es una proteína transmembrana de 48 kDa, con una señal de retención en el retículo endoplásmico. Esta chaperona se une a la molécula MHC clase I y sirve de nexo para asociarse al complejo TAP. Habitualmente 4 complejos MHC I-Tapasina se unen a un transportador TAP, de manera de concentrar el número de moléculas MHC vacías en el lugar de entrada de los péptidos. Esta molécula, aparte de actuar como chaperona en el ensamblaje y retención de las MHC I, probablemente también participa como editora de péptidos, con una función semejante a lo que realiza la proteína DM en relación a las moléculas MHC clase II. Se supone además la existencia de un transportador, distinto de TAP, pero dependiente también de ATP, encargado del reflujo retrógrado de fragmentos peptídicos desde el retículo al citosol, para mantener un bajo nivel de péptidos en el retículo endoplásmico y favorecer la unión a las moléculas MHC, de los fragmentos peptídicos que presentan mayor afinidad. La glicosilación de fragmentos peptídicos en el retículo o su asociación con una molécula MHC clase I, evitaría el reflujo retrógrado de péptidos al citosol.

Ahora bien, aún cuando el heterodímero TAP transporta preferentemente fragmentos peptídicos de 8 a 10 aminoácidos, ello no impide que péptidos de hasta 30 aminoácidos puedan ser eficientemente transportados desde el citosol al retículo

endoplásmico. Al parecer más que el tamaño del péptido lo que importa para un transporte adecuado desde el citosol, es la naturaleza del extremo carboxiterminal del fragmento peptídico. Así en humanos, el heterodímero TAP es permisivo para el transporte de péptidos con cualquier extremo carboxi-terminal, excepto si este contiene prolina y probablemente glicina, existiendo moléculas MHC que unen preferentemente péptidos con extremos polares y otras que unen preferentemente péptidos con extremos carboxi-terminal hidrofóbicos. En ratones en cambio, TAP parece restringido a fragmentos peptídicos con extremo carboxi-terminal hidrofóbico.

En resumen, una molécula MHC clase I madura y correctamente ensamblada consiste de 3 subunidades: la cadena α MHC, la $\beta 2m$ y el fragmento peptídico alojado en el bolsillo de unión formado por los dominios α -1 y α -2 de la molécula MHC. La unión del péptido adecuado induce pequeños cambios conformacionales en la molécula MHC, lo que permite la disociación de las proteínas chaperonas. Este complejo trimolecular es fundamental no sólo para el correcto ensamblaje de la molécula MHC de clase I, sino también para su glicosilación en el Golgi, transporte efectivo por la vía exocítica y expresión en la superficie celular. Así células que carecen de $\beta 2m$ o del transportador TAP, acumulan en el retículo cadenas α MHC o complejos MHC- $\beta 2m$, respectivamente.

7. PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS EXÓGENOS

Antígenos proteicos exógenos internalizados mediante interacción ligando-receptor o en fase fluida mediante vesículas membranosas (en procesos de fagocitosis, pinocitosis o endocitosis), serán procesados en un compartimiento ácido celular (fagolisosoma endolisosoma) y los fragmentos peptídicos allí generados, serán luego asociados a una molécula MHC clase II para su transporte y presentación en la superficie celular (figura 9-3).

Las moléculas MHC clase II son heterodímeros glicoproteicos constituidos por una cadena alfa de 33 kDa y una cadena beta de 28 kDa, sintetizadas en ribosomas asociados al retículo endoplásmico y ensambladas en el lumen del mismo (ver capítulo 8). Al igual que las moléculas de clase I, el ensamblaje de las moléculas MHC clase II requiere

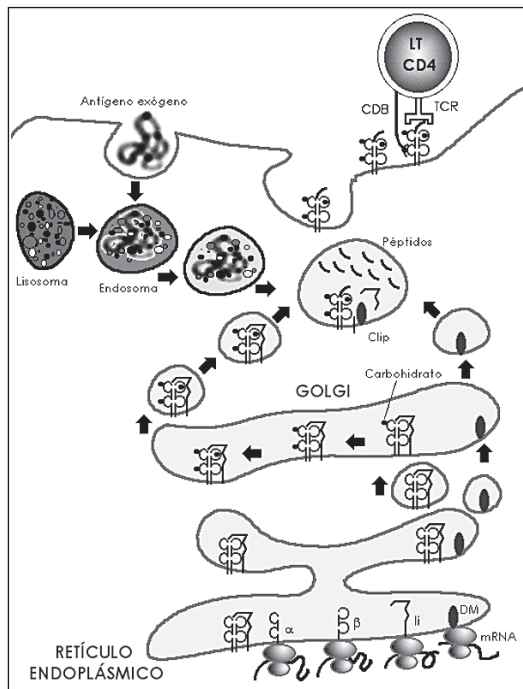


Figura 9-3. Procesamiento de antígenos exógenos y presentación en el contexto de molécula MHC clase II. En el retículo endoplásmico las moléculas MHC de clase II son ensambladas a partir de las cadenas α y β , y la cadena invariante Ii. La asociación de la cadena Ii bloquea el bolsillo peptídico de la molécula de clase II, además asegura su transporte a través de la vía endocítica al compartimiento ácido celular. Aquí se realiza el procesamiento de los antígenos exógenos y se realiza además la digestión parcial de la cadena Ii, dejando el péptido CLIP alojado en el bolsillo antes citado. La molécula DM que es transportada por la vía endocítica en forma independiente, participa en el desplazamiento de CLIP y en la unión de un fragmento peptídico exógeno al bolsillo MHC de clase II. El complejo MHC clase II péptico es luego transportado a la superficie celular para su presentación a un LT CD4+.

la interacción con diversas chaperoninas, entre las que se destaca la denominada cadena invariante gamma o **cadena invariante Ii**. La proteína **Calnexina** y chaperoninas de las familias de proteína de shock térmico hsp 70 y hsp 90 favorecen el ensamblaje de las cadenas α y β de la molécula clase II, pero el rol más importante en este proceso lo desempeña la cadena invariante Ii. La cadena invariante Ii no sólo favorece el ensamblaje del heterodímero α - β , sino que también impide que péptidos endógenos puedan unirse al bolsillo de las moléculas clase II y desvía o dirige el transporte del complejo trimolecular (alfa-beta-Ii) hacia la vía endocítica celular donde están siendo generados los péptidos exógenos.

El ensamblaje de las moléculas MHC clase I

ocurre completamente en el retículo endoplásmico, mientras el ensamblaje de las moléculas clase II se realiza en 2 etapas: (a) la primera ocurre en el retículo endoplásmico e implica la participación de calnexina para la asociación de las cadenas MHC alfa y beta entre si y con la invariante Ii. (b) La segunda etapa del ensamblaje de la molécula de clase II ocurre en el compartimiento ácido celular e implica la participación de un heterodímero proteico denominado **molécula DM** (molécula asociada a la región D, de clase II en el HLA humano), que favorece tanto la digestión parcial y remoción de la cadena invariante Ii del bolsillo de la molécula de clase II, como la asociación de un fragmento peptídico exógeno a esta molécula MHC.

La proteína Calnexina retendrá en el retículo endoplásmico las cadenas α y β de las moléculas clase II, si no se logra un correcto ensamblaje del complejo trimolecular (α - β -Ii). El bajo pH del compartimiento endocítico es fundamental para el procesamiento antigénico y el ensamblaje final de las moléculas clase II. Así, drogas lisosomotrópicas (primaquina, cloroquina, monosina, cloruro de amonio) que elevan el pH del compartimiento endocítico, inhibirán la presentación antigénica en el contexto de moléculas MHC clase II.

La cadena invariante Ii es una glicoproteína de membrana, no polimórfica, codificada en el cromosoma 5 humano y en el cromosoma 18 murino. Presenta 4 formas de distinto peso molecular (31, 33, 41 y 43 kDa) generadas por una combinación de procesamiento alternativo del transcrito primario y el uso de distintos sitios de iniciación de la síntesis proteica. Todas estas formas de la cadena invariante Ii poseen un extremo o dominio carboxiterminal, de 20 aminoácidos, que se une y bloquea el bolsillo peptídico de clase II impidiendo así la asociación de péptidos endógenos. Además, en la cola citoplasmática aminoterminal presentan una secuencia señal de 30 aminoácidos que dirige el transporte a la vía endocítica, del complejo MHC clase II-Ii, correctamente ensamblado en el retículo endoplásmico. En ausencia de la cadena invariante Ii, las moléculas MHC clase II pueden eventualmente unir péptidos endógenos en el retículo endoplásmico, pero su transporte y expresión en la superficie celular se hará a través de la vía exocítica, como ocurre con la presentación antigénica en el contexto de moléculas MHC clase I.

La cadena invariante, una vez sintetizada en



el retículo endoplásmico, forma homotrímeros que se ensamblarán con 3 heterodímeros α - β de clase II. De esta manera, el ensamblaje adecuado de la molécula de clase II en el retículo endoplásmico, implica en realidad la formación de un nonámero proteico constituido por 3 trímeros (α - β -Ii). El nonámero es entonces dirigido al complejo de Golgi y desde aquí el extremo amino terminal de la cadena invariante Ii desviará o dirigirá el transporte del complejo al compartimiento ácido o endocítico celular, denominado MIIIC (MHC class II Compartment). El bajo pH y la acción de cisteín proteasas (principalmente las catepsinas S y L del compartimiento endocítico), no sólo favorecen la degradación o procesamiento de los antígenos exógenos, sino también la digestión parcial del extremo carboxilo de la cadena invariante Ii. Se genera así un fragmento peptídico, que incluye los residuos aminoácidos 81 al 104 de Ii, denominado CLIP ("Class II-associated invariant-chain peptide"), que permanecerá unido al bolsillo del heterodímero de clase II. El heterodímero proteico DM, anteriormente mencionado, estaría involucrado en la liberación del péptido CLIP del bolsillo de las moléculas MHC de clase II y en la edición de los fragmentos peptídicos que se unirán a la molécula MHC. En ausencia del heterodímero DM, moléculas de clase II conteniendo el péptido CLIP se expresarán en la superficie celular.

La molécula DM humana (denominada molécula M en el ratón) está codificada por genes de la región de clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (genes HLA-DMA y HLA-DMB en humanos y, genes Ma, Mb1 y Mb2 en ratón). Su síntesis se realiza en ribosomas asociados al retículo endoplásmico, pero su ensamblaje y transporte final al compartimiento endocítico celular, se realizaría en forma independiente del complejo molécula MHC clase II-cadena invariante Ii.

Los péptidos derivados de proteínas endógenas son altamente promiscuos y por lo tanto capaces de ser presentados por una gran variedad de moléculas MHC de clase II. De este modo las moléculas de clase II pueden unirse a un rango más amplio de péptidos en el compartimiento endocítico, que las moléculas MHC de clase I, en el retículo endoplásmico rugoso. Es en el compartimiento endocítico donde se encuentra la molécula DM, que actúa editor peptídico, favoreciendo la presentación de péptidos de mayor afinidad y estabilidad. Las moléculas DM parecen funcionar: (a) removiendo el péptido CLIP ("Class

II associated Ii peptide") del bolsillo peptídico de las moléculas de clase II y (b) estabilizando los heterodímeros MHC de clase II vacíos o sin péptido. Esta estabilización previene la agregación y subsecuente degradación que sufren estos heterodímeros MHC, en ausencia del fragmento peptídico. De este modo las moléculas DM juegan un rol crucial en la presentación de antígenos exógenos.

8. PRESENTACIÓN ALTERNATIVA DE PÉPTIDOS

Péptidos endógenos pueden también presentarse en el contexto de moléculas **MHC clase II**. Esto puede explicarse por: (a) péptidos endógenos compiten con la cadena invariante Ii por el bolsillo de unión del heterodímero de clase I, (b) péptidos endógenos, generados en el citoplasma, pueden translocarse al compartimiento ácido celular, para su asociación con moléculas de clase II, (c) proteínas endógenas que han sido secretadas o que se expresan en la membrana celular, pueden ser internalizadas y luego procesadas en el compartimiento ácido celular y (d) autofagia de componentes celulares a partir del retículo endoplásmico y su transporte, por vía endocítica, al compartimiento ácido celular.

De manera alternativa, **péptidos exógenos** pueden presentarse asociados a **moléculas clase I**. Este fenómeno ocurre cuando fragmentos peptídicos o proteínas exógenas escapan del compartimiento endocítico DIC y luego de su degradación por la maquinaria citosólica de procesamiento antigénico, son translocados al retículo endoplásmico para su asociación a moléculas MHC clase I. Algunas bacterias intracelulares secretan lisinas de membrana que favorecerían el escape de antígenos o fragmentos peptídicos exógenos desde el compartimiento endocítico al citoplasma de la célula presentadora de antígeno.

LECTURAS SUGERIDAS

Amigorena, S.; Webster P., Drake, J.; Newcomb, J.; Cresswell, P. and Mellman I., "Invariant chain cleavage and peptide loading in MHC class II vesicles". *J. Exp. Med.* 181:1729-1741, 1995.



Brocke, P., Garbi, N., Momburg, F. and Hammerling G. J. "HLA-DM, HLA-DO and tapasin: functional similarities and differences", *Curr. Opin. Immunol.* 14: 22-29, 2002.

Cresswell P., "Assembly, transport and function of MHC class II molecules", *Ann. Rev. Immunol.* 12:259-293, 1994.

Denzin, L. K. and Cresswell, P., "HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha-beta dimers and facilitates peptide loading", *Cell* 82:155-165, 1995.

Fing, S. P.; Arp, B. and Pious, D., "HLA-DMA and DMB genes are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells", *Nature* 368:554-558, 1994.

Germain, R.N., "MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation", *Cell* 76:287-299, 1994.

Hitbold, E.M. and Roche, P.A., "Trafficking of MHC-class II molecules in the late secretory pathway", *Curr. Opin. Immunol.* 14: 30-35, 2002.

Howard, J.C., "Supoly and transport of peptides presented by class I molecules", *Current Opinion Immunol* 7:69-76, 1995.

Lennon-Duménil, A.M.; Bakke, A.H.; Wolff-Bryanty, P.; Ploegh, H.L. and Lagaudrieri-Gesbert, C., "A closer look at proteolysis and MHC-class II-restricted antigen presentation", *Curr. Opin. Immunol.* 14: 15-21, 2002.

Malcherek, G.; Gnau, V.; Jung, J.; Rammensee, H. G. and Melms, A. "Supermotifs enable natural invariant-chain derived peptides to interact with many major histocompatibility complex-class II molecules", *J. Exp. Med.* 181:527-536, 1995.

Matsuda, J.L. and Kronenberg, M., "Presentation of self and microbial lipids by CD1 molecules", *Curr. Opin. Immunol.* 13: 19-25, 2001.

Morris, P.; Shaman, J.; Attaya, M.; Amaya, M.; Goodman, S.; Bergman, C.; Monaco, J.J. and Mellins, E., "An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules", *Nature* 368:551-554, 1994.

Rammensee, H.G., "Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules", *Curr. Opin. Immunol.* 7:85-96, 1995.

Reisse Sousa, C., "Dendritic cell as sensors of infections", *Immunity* 14:495-498, 2001

Sadavisan, B.; Lehner, P.; Ortmann, B.; Spies, T. and Cresswell, P., "Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP", *Immunity.* 5:103-114, 1996.

Settle, A.; Southwood, S.; Miller, J. and Appella, E., "Binding of major histocompatibility complex class II to the invariant chain derived peptide, CLIP, is regulated by allelic polymorphism in class II", *J. Exp. Med.* 181:677-683, 1995.

Watts, C., "Antigen processing in the endocytic pathway", *Curr. Opin. Immunol.* 13: 26-31, 2001.

Williams, D.B. and Watts, T.H., "Molecular chaperones in antigen presentation", *Curr. Opin. Immunol.* 7:77-84, 1995.

Yewdell, J. and Bennink, J., "Cut and Trim: generating MHC class I-peptide ligands", *Curr. Opin. Immunol.* 13:13-18, 2001.



Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 10

ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS

Javier Puente P.

- 1. Introducción**
- 2. Activación de los linfocitos T**
 - 2.1. Relación estructura-función del complejo TCR
 - 2.2. Secuencias de activación en el TCR-CD3 y cadenas ξ
 - 2.3. Proteínas tirosina quinasas en la activación de los LT
 - 2.4. Proteínas adaptadoras en la activación de los linfocitos
 - 2.5. Modelo general de activación de los LT
- 3. Activación de los linfocitos B**
 - 3.1. Secuencias de activación en el BCR y sub-unidades asociadas
 - 3.2. Modelo general de activación de los LB
- 4. Activación de las células NK**
 - 4.1. Modelo de activación de las células NK





RESUMEN

El reconocimiento de los antígenos por parte de los receptores específicos de los linfocitos B y T, BCR y TCR respectivamente, es el evento que inicia la etapa de activación. El TCR ($\alpha\beta$), une específicamente al antígeno peptídico procesado ligado a las moléculas de MHC (clase I o II). El heterodímero $\alpha\beta$ de localización mayoritariamente extracelular, está asociado en forma no covalente a un complejo de proteínas de membrana denominado CD3- ζ cuyos componentes están localizados mayoritariamente en el extremo citoplasmático. Participan en la unión además los co-receptores CD4 o CD8, que se unen a determinantes no polimórficos de los MHC clase II y clase I respectivamente. Una de las principales características estructurales de los componentes del complejo CD3- ζ es la presencia de secuencias aminoacídicas que contienen residuos de tirosina (ITAM) que pueden ser fosforilados por PTK. Esta acción de las PTK ocurre sólo bajo las condiciones de la interacción TCR, y estructuras asociadas, con el antígeno. Las secuencias ITAM están presentes en todas las sub-unidades del complejo CD3- ζ y estando fosforiladas pueden interactuar con otras secuencias aminoacídicas del tipo SH2 presentes en diversas PTK citoplasmáticas como Zap-70, lo que permite una masiva fosforilación de proteínas adaptadoras citosólicas y de membrana y de enzimas. Las enzimas fosforiladas se activan y en estas condiciones fosforilan a otros sustratos celulares propagando la señal, proceso que se encarga de asociar el fenómeno de membrana con el citosol y el núcleo celular generando los cambios característicos en la expresión génica. Una de las proteínas activadas por fosforilación es la fosfolipasa $C\gamma 1$ o $C\gamma 2$ que permite la generación de los segundos mensajeros IP_3 , Ca^{2+} , DAG y la posterior activación de determinadas PK-C; estos primeros eventos son fundamentales para la respuesta proliferativa y efectora del respectivo LT. Otra interacción importante ocurre entre CD28 (LT) : B7.1, B7.2 (CPA); esta interacción aporta una segunda señal prácticamente obligatoria para una óptima activación de los LT.

El BCR, estructuralmente una Ig de membrana de localización principalmente en el extremo extracelular, se encuentra asociado a sub-unidades ($Ig\alpha$, $Ig\beta$) que poseen secuencias ITAM. La interacción del antígeno con el BCR y estructuras asociadas, que también poseen este tipo de secuencias permite el traspaso de la señal hacia el interior celular. Para ello como en el caso del TCR, el LB posee PTK unidas a membrana y citosólicas como la $p72^{syk}$ que pueden interactuar con los dominios ITAM fosforilados a través de las secuencias SH2 y otro tipo de quinasas como la PI-3 quinasa que puede interactuar con las secuencias del tipo SH2 y SH3. Participan también proteínas adaptadoras citosólicas que permiten agrupar una gran diversidad de proteínas y enzimas en la superficie celular. Una de las enzimas activadas por fosforilación unida a una proteína adaptadora, es la FL- $C\gamma$ que cataliza la hidrólisis del PIP_2 , la generación de los segundos mensajeros y la activación de la PK-C y calcineurina en forma similar a los LT. Estos eventos iniciales permiten la activación de otras señales que actúan a nivel del núcleo celular promoviendo los cambios en la expresión genética típicos de este tipo de linfocitos.

La activación de las células NK, tanto la ADCC como la citotoxicidad natural, ocurre a través de la interacción de receptores como Fc γ IIIR (CD16) con la fracción Fc de inmunoglobulinas o de los receptores NCR con sus ligandos, resulta también en una propagación de la señal a través de dominios ITAM fosforilados. En las células NK se han descrito también PTK de la familia *src* y *syk* y proteínas adaptadoras de membrana y citosólicas. La activación de los receptores CD16 y NCR, ambos asociados a sub-unidades de tipo ζ y DAP12 presentan fosforilación de secuencias ITAM y la generación de los mismos segundos mensajeros ya señalados. La descripción de un gran conjunto de receptores de inhibición, de la familia de las inmunoglobulinas (KIR) y lectinas (CD94-NKG2A) que reconocen segmentos conservados de los complejos MHC-I, representan uno de los aspectos fundamentales del control de su funcionalidad.



1. INTRODUCCIÓN

Los linfocitos B y T, pertenecientes a la respuesta inmunológica específica, tienen la capacidad de reconocer y discriminar, entre una vasta diversidad de estructuras, a aquellas que son agentes extraños para el organismo vertebrado, especialmente de carácter infeccioso. Para llevar a cabo estas funciones poseen receptores altamente específicos en su superficie para el reconocimiento de los antígenos: el receptor de antígenos de los linfocitos B (BCR) y el receptor de antígenos de los linfocitos T (TCR). Cada precursor linfocitario reordena exclusivamente sus genes únicos para estos receptores y los linfocitos maduros permanecen en estado quiescente en la ausencia de antígeno. El contacto del antígeno específico con estos linfocitos induce en éstas células un estado denominado activación, que implica su expansión en número, y en el caso de los LB la producción de anticuerpos y de los LT la adquisición de funciones efectoras tales como citotoxicidad y secreción de mediadores de la respuesta inmune denominadas citoquinas.

Además del receptor específico, intervienen otras moléculas de superficie denominadas co-receptores, moléculas de adhesión, receptores de moléculas co-estimuladoras; participando no solamente en la estabilización de la interacción antígeno-receptor, sino también en la generación de las señales bioquímicas características del proceso de activación o de inhibición de los linfocitos. La especificidad de esta respuesta está influida también por la localización de los mediadores participantes en zonas lipídicas específicas de la membrana plasmática.

Aun cuando entonces, la respuesta a un antígeno es comúnmente denominada activación, este término refleja toda la complejidad del proceso, que abarca desde la generación de las primeras señales bioquímicas, transducción de señales y la producción de segundos mensajeros, hasta cambios en la expresión genética y la morfología y funcionalidad de los linfocitos. En el presente capítulo se analizarán aquellos aspectos estructurales de los receptores y demás moléculas accesorias involucradas en el contacto con el antígeno respectivo y cómo esta situación inicia la serie de eventos bioquímicos que se encargan de la inter-comunicación entre un fenómeno de membrana con el citosol y núcleo celular. Para ello es indispensable aclarar

como tanto el BCR y TCR en conjunto con sus moléculas asociadas, que no poseen actividad enzimática transmiten una señal hacia el interior celular; cómo diversas enzimas proteína quinasas, bajo las determinadas condiciones de la interacción del antígeno con su receptor, son capaces de interaccionar con los extremos citosólicos de las sub-unidades de las moléculas asociadas y activarse fosforilando una serie de sustratos de membrana e intracelulares, especialmente enzimas y proteínas adaptadoras, que finalmente van a permitir la comunicación con el núcleo celular.

Los linfocitos B y T tienen receptores oligoméricos antigénicos que reconocen fundamentalmente distintas formas de los antígenos. Los LB para protección de patógenos extracelulares; sus receptores típicamente reconocen formas nativas o desnaturaladas de proteínas y carbohidratos ya sea solubles, particuladas o unidas a células. En contraste los LT protegen contra patógenos intracelulares, el TCR reconoce péptidos antigénicos proteolíticamente procesados (8-15 residuos) unidos a moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) de la célula presentadora de antígenos (CPA). Sin embargo, la transducción de señales que resulta de la interacción de cada receptor con su antígeno son muy similares.

Las células NK, pertenecientes a la respuesta inmunológica innata, pueden también reconocer ligandos. Por ejemplo el receptor CD16 (RFc γ III) de las células NK une al fragmento Fc de inmunoglobulina G, y de esta forma las células se activan utilizando mecanismos bioquímicos similares a los de los LB y LT.

Los tres grandes sistemas de integración de los organismos pluricelulares complejos son los sistemas: endocrino, nervioso e inmunológico, cada uno de ellos responde a una variedad de señales o mensajes característicos. Sin embargo, los mecanismos bioquímico-moleculares involucrados son universales; en este caso los receptores de membrana (BCR y TCR), al interaccionar con el antígeno y el receptor CD16 de las células NK al interactuar con su ligando, activan vías mediadas por proteína quinasas, quinasas de lípidos, proteínas adaptadoras de membrana y citosólicas permitiendo la hidrólisis del fosfolípido de membrana fosfatidil-inositol (PIP₂) a través de una isoenzima de la fosfolipasa C y la generación de los segundos mensajeros, inositol-trisfosfato (IP₃), diacilglicerol (DAG) y



Ca^{2+} . Estos son también segundos mensajeros de la acción de hormonas y de factores de crecimiento (sistema endocrino) y neurotransmisores (sistema nervioso).

2. ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T

2.1. Relación estructura-función del complejo TCR. El inmuno-receptor TCR es un oligómero complejo compuesto de los productos de seis genes (figura 10-1) (ver capítulo 7), todos ellos requeridos para una eficiente expresión en la membrana plasmática. Las cadenas α y β forman la sub-unidad de unión al ligando, responsable del reconocimiento de un péptido antigénico unido a moléculas de los complejos mayores de histocompatibilidad clase I o clase II de la célula presentadora, propagándose una respuesta que implica una interacción cooperativa entre el TCR, el complejo CD3 y las sub-unidades ζ (que pueden existir como dímeros o heterodímeros). Tanto el receptor como diversas proteínas que participan en la activación de los LT, se encuentran ubicadas en zonas lipídicas específicas de la membrana plasmática (ZLE), denominadas también GEM (micro-dominios enriquecidos en glico-lípidos), cuya composición bioquímica es diferente a la del resto de la membrana. Estos dominios están enriquecidos en colesterol y esfingolípidos y pueden ser experimentalmente visualizados en la célula y purificados para su estudio *in vitro*.

estimuladoras como CD28 (CTLA-4), ICOS, CD40L, 4-1BB, OX40; muchas de éstas son inducidas post-contacto con la CPA y moléculas de adhesión como CD2, CD5 y LFA-1 (figura 10-2). Este evento de unión entonces le permite, durante el desarrollo de las células T, entrar a selección positiva o bien a apoptosis, entrar al ciclo celular, producir citoquinas o adquirir una función efectora citolítica. Por lo tanto, todas las responsabilidades de las células T están radicadas en su TCR y en las estructuras accesorias. La interacción estable entre el TCR y el antígeno presentado ha sido denominada también “sinapsis inmunológica”, que implica tanto la interacción como la propagación de una señal hacia el interior de la célula.

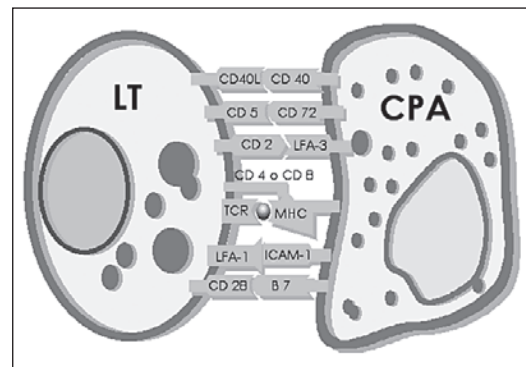


Figura 10-2. Representación esquemática de algunas de las interacciones moleculares que ocurren durante el reconocimiento antigénico en la interfase de un LT y una CPA. En este caso es un LT CD4, en el que las moléculas CD40L y CTLA-4 son inducidas por el contacto con la CPA, las restantes moléculas de superficie del LT son constitutivas.

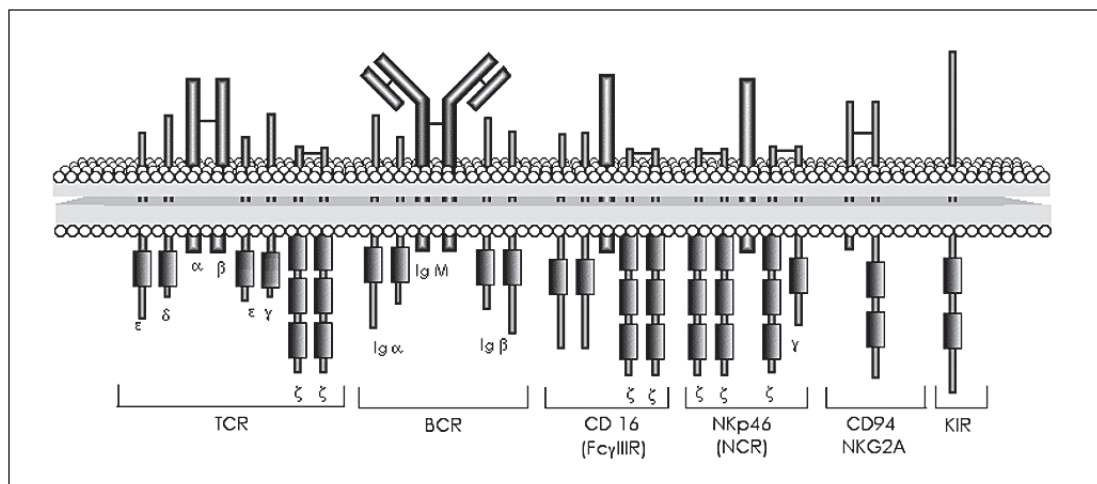


Figura 10-1. Estructura de los receptores de los linfocitos T, B y NK. TCR, BCR, FcγIIR (CD16), NKp46 (NCR) y de los receptores de inhibición CD94/NKG2A y KIR2DL4 y de sus sub-unidades. El número de las sub-unidades y sus asociaciones puede variar de acuerdo a la función celular. Las líneas interconectoras representan puentes disulfuro. Los rectángulos negros representan secuencias ITAM (motivos o secuencias de activación basados en tirosina del inmuno-receptor) y los rectángulos achurados, secuencias ITIM (motivos o secuencias de inhibición basados en tirosina del inmuno-receptor).





2.2. Secuencias de activación en el TCR-CD3 y cadenas ζ . Como se puede apreciar de la figura 10-1, las sub-unidades α y β , responsables de la unión al antígeno, tienen una estructura mayoritariamente extra-citoplasmática, lo que avala muy bien la función de unión. Sin embargo, ya a nivel estructural es posible descartarles una función importante en cuanto a la transducción de la señal, encontrándose por lo tanto ambas funciones en forma separada. La función de transducción de señales la cumplen el complejo CD3 y las sub-unidades ζ , que tienen una parte importante de su estructura en la zona citoplasmática, especialmente las sub-unidades ζ . La relevancia de CD3 y cadenas ζ ha quedado de manifiesto al usar mutantes que carecen de algunas de estas sub-unidades con la consecuente alteración en la activación de los LT. Analizando más detalladamente ahora la estructura primaria del complejo CD3- ζ , se pudo determinar que poseen secuencias de consenso en todas las sub-unidades, encontrándose incluso repetidas en las sub-unidades ζ . Estas secuencias de consenso que incluyen dos tirosinas son: YXX(L/I)X₍₇₋₈₎YXX(L/I), del código de aminoácidos de una letra, siendo X cualquier aminoácido. Estas secuencias (tabla 10-1), se encuentran en muchas otras proteínas con características similares a las descritas, no soportan mutaciones y constituyen en la actualidad un conocimiento clave para el entendimiento de la activación de los linfocitos. La nomenclatura para definir las se basa en que constituyen una secuencia o motivo de activación de reconocimiento del antígeno, secuencia que posee residuos de tirosina y leucina (o isoleucina) en posiciones características. En la actualidad se conocen estas secuencias como ITAM (motivo de activación basado en tirosinas del inmuno-receptor). Un primer hecho relevante de los ITAM, es que son fosforilados los residuos de tirosina a consecuencia de la unión del antígeno específico al TCR, situación que temporalmente ocurre en el orden de unos pocos segundos (5 a 30 s); mutantes en tirosina son inactivos. En segundo lugar ni el TCR ni ninguna de las sub-unidades hasta ahora analizadas posee una actividad fosforilante en tirosina, típica de las enzimas proteínas tirosina quinasas (PTK) por lo que deben actuar PTKs celulares específicas, siendo el proceso de la fosforilación un evento determinante en la secuencia de activación, pues además de las sub-unidades descritas, se fosforilan, río abajo, una serie de otras proteínas celulares, especialmente en residuos de tirosina.

Tabla 10-1. Secuencias ITAM

h ζ 1	Y N E L N L G R R E E Y D V L
hCD3 γ	Y Q P L K D R E D D Q Y S H L
hCD3 ϵ	Y E P I R K G Q R D L Y S G L
hCD3 γ	Y Q P L R D R D D A Q Y S H L
mIg α	Y E G L N L D D C S M Y E D I
mIg β	Y E G L N Y D Q T A T Y E D I

2.3. Proteínas tirosina quinasas en la activación de los LT. Hasta ahora se han descrito tres familias diferentes de proteínas tirosina quinasas (*Src*, *Syk* y *Tec*) en la activación de los LT. Las PTK no forman parte del receptor TCR ni de sus sub-unidades asociadas. Dos de las más importantes PTKs asociadas a este receptor pertenecen a la familia de proteínas *src*. La oncoproteína viral v-*src* fue la primera PTK descrita; identificándose posteriormente una amplia variedad de enzimas en todo tipo de organismos que comparten un alto grado de similitud estructural con esta oncoproteína, incluyendo dominios estructurales y regulatorios. Estructuralmente las PTK de la familia *src* consisten de uno o más sitios de acilación en el extremo amino-terminal, requeridos para su localización en la membrana plasmática en la zona lipídica específica; un dominio único (que define a cada uno de sus miembros) una homología *src* SH3, dominio que tiene una alta afinidad por secuencias aminoacídicas ricas en prolina; una homología *src* SH2, dominio con una alta afinidad por secuencias aminoacídicas que contengan tirosinas fosforiladas; un dominio catalítico, responsable de la actividad enzimática fosforilante y una secuencia regulatoria en el extremo carboxilo terminal (figura 10-3a). Las PTK de la familia *src* que en forma más consistente aparecen interviniendo en el proceso de activación de los LT son: la denominada *fyn*, de 59 kDa, (p59^{fyn}) posee dos isoenzimas una presente en el sistema inmune y otra en cerebro y la de 56 kDa (p56^{lck}) que se expresa exclusivamente en el sistema inmune (figura 10-3a).

Uno de los hechos más importantes en la participación de la p56^{lck} fue la demostración de su unión no covalente a los dominios citoplasmáticos de los co-receptores de membrana CD4 o CD8. Esta directa interacción obviamente sugiere un importante papel de esta enzima en la transducción de señales mediada por el TCR y numerosas evi-

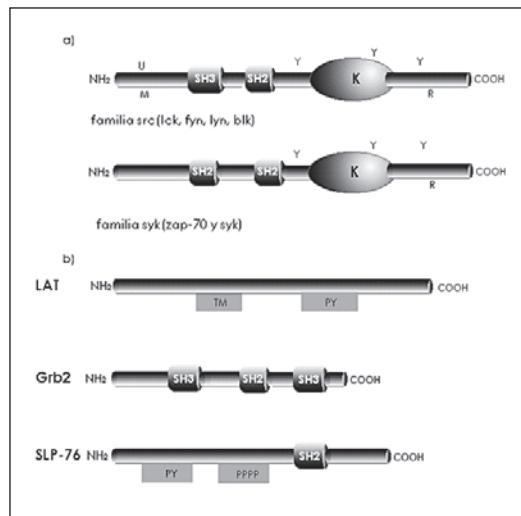


Figura 10-3. Dominios estructurales de proteínas que participan en transducción de señales en los linfocitos. A) Dominios estructurales de dos familias de PTK que participan en la activación de los linfocitos T y B. Desde el extremo amino hacia el C terminal: U, dominio único; M, modificación por ácido mirístico; SH3 y SH2 homologías *src* 3 y 2, respectivamente; K, dominio quinásico; R, dominio regulado; Y, residuo de tirosina. Los sitios con residuos de tirosina fosforilables del N al C terminal pueden ser hasta tres: Y en sitio inter-dominios (SH2 y K) fosforilada, permite asociación a otras proteínas; Y fosforilada en sitio catalítico (K) estimula su actividad e Y fosforilada en el sitio regulador R, bloquea su actividad. B) Dominios estructurales de proteínas adaptadoras de membrana y citosólicas: LAT, Grb2 y SLP-76; TM, dominio transmembrana; PY, dominio fosforilado en tirosina; PPPP, dominio rico en prolina.

dencias experimentales así lo confirman: células T en respuesta al antígeno específico responden con un rápido y transiente aumento en la actividad de esta enzima; ratones mutantes en esta enzima, presentan un profundo defecto en el desarrollo de las células T, estudios *in vitro* con la línea celular T Jurkat mutante en esta PTK demuestran que prácticamente no se produce el proceso de activación en respuesta a los estímulos correspondientes. Otra característica extraordinariamente interesante de la $p56^{lck}$ también reside en su estructura. Como se puede apreciar de la figura 10-3a, la enzima posee una homología SH2 y un extremo regulador C-terminal en que un residuo de tirosina puede encontrarse fosforilado y de hecho esa situación es la observada en el estado de reposo no estimulado. De esta forma se encuentra en la misma estructura proteica la posibilidad de interacción entre una secuencia SH2 y una secuencia que posee una tirosina fosforilable; el hecho de encontrarse fosforilada trae como consecuen-

cia el plegamiento de la proteína lo que le impide su acción catalítica. Para mantener esta situación, existen por un lado una PTK, la *Csk*, que se encarga de mantener siempre fosforilado ese sitio regulador y una fosfoproteína fosfatasa específica para residuos de tirosina fosforilados, la CD45. Esta enzima provoca la hidrólisis de ese residuo de fosfotirosina y la transforma en una PTK activa. La enzima CD45 se encuentra ampliamente distribuida en el sistema inmune.

La PTK $p59^{lyn}$ también puede encontrarse asociada directamente al TCR-CD3- ζ , específicamente se la ha encontrado asociada en forma no covalente a las sub-unidades ζ y componentes del CD3. Presenta también un rápido y transiente aumento en su actividad en respuesta a la estimulación del TCR y células mutantes en esta quinasa presentan una significativa reducción en el proceso de activación y proliferación celular lo que sugiere un importante papel de esta enzima en la transducción de señales en el linfocito.

El descubrimiento de otras PTK fuertemente asociadas al TCR sólo de células T estimuladas, abrió la posibilidad de la existencia de una asociación rápida y transiente de proteínas de la membrana con proteínas citosólicas. La PTK asociada a la sub-unidad ζ , resultó ser una proteína de 70 kDa, por lo que fue denominada ZAP-70 (proteína asociada a la sub-unidad zeta de 70 kDa). También se le ha encontrado asociada a sub-unidades CD3 y se encuentra expresada exclusivamente en células T y células NK. Nuevamente sus propiedades se explican muy bien por su estructura, es una enzima citosólica, que presenta dos homologías SH2 hacia el extremo amino-terminal de la proteína y un dominio catalítico con actividad de tirosina quinasa (figura 10-3a). La enzima ZAP-70 es altamente homóloga a la PTK *syk* de 72 kDa muy abundante en los linfocitos B y células mieloides, enzima que puede asociarse al BCR postulándose la función de nexo entre los procesos de membrana y citosólico/nucleares en ese tipo de linfocitos. Tanto Zap-70 como *syk* pertenecen a la familia de PTK *syk*. La Zap-70 es expresada a lo largo de todo el desarrollo de los linfocitos T, en cambio la *syk* aparece ligada más al desarrollo temprano de los linfocitos, siendo su expresión mucho menor en los linfocitos T maduros. Ambas PTK tienen, a través de sus dominios SH2, una alta afinidad por las secuencias ITAM fosforiladas. Más recientemente se ha incorporado una nueva familia de PTK: *Tec*, cuyos principales representantes son *Tec*, *Ikt* y *Txk*; si bien se



ha informado un cierto grado de redundancia en su funcionalidad utilizando ratones transgénicos, su principal función en la activación es la fosforilación de la FL-C γ y por lo tanto en el control de los niveles de Ca²⁺.

2.4. Proteínas adaptadoras en la activación de los linfocitos. El conocimiento de otro conjunto de proteínas, denominadas proteínas adaptadoras, en la activación de los linfocitos ha permitido una comprensión mayor de este fenómeno. Las proteínas adaptadoras se caracterizan por carecer de actividad catalítica, al menos hasta ahora conocida, y por tener la propiedad de dirigir interacciones específicas proteína-proteína y proteína-lípido. Se ha demostrado la participación coordinada de este tipo de proteínas en conjunto con los demás eventos bioquímicos del proceso de activación de los linfocitos. Algunos de las proteínas adaptadoras más relevantes para los LT aparecen en la figura 10-3b; se pueden apreciar algunos de los dominios estructurales que median las interacciones moleculares, además de los dominios SH2 y SH3 ya señalados, aparecen otros como PY (sitio fosforilable en tirosina) y PPPP (sitio rico en prolina). Las proteínas adaptadoras pueden ser ya sea de membrana o citosólicas, dos de las más representativas de cada una de éstas son las proteínas LAT y SLP-76. La proteína adaptadora de membrana LAT, descrita inicialmente en células Jurkat y luego en linfocitos T, células NK plaquetas y monocitos, pero no en los linfocitos B, representa el nexo de activación de los linfocitos T entre los eventos mediados por el TCR y las PTK iniciales, permitiendo explicar como una gran variedad de proteínas y enzimas se pueden asociar a la membrana plasmática. LAT es una proteína de membrana, posee un sitio transmembrana que le permite esta localización; posee además dos residuos de cisteína cercanos al sitio transmembrana. Estos residuos pueden ser modificados por palmitoilación lo que le permite a LAT, bajo esas condiciones, ubicarse específicamente en el área de las ZLE. Como posee además residuos de tirosina fosforilables (P-Y), una vez fosforilados estos sitios pueden interactuar con proteínas que posean segmentos SH2 y reclutarlas a la membrana plasmática. Esto ocurre con las enzimas fosfolipasa C (FL-C γ 1), fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3-quinasa) y las proteínas adaptadoras Grb2, Gads y SLP-76, entre otras. Tanto células mutantes en LAT, ya sea en tirosina, cisteína, o deficientes en su expresión, sufren trastornos en

la activación y maduración. Especialmente relevantes son las mutaciones en las cisteínas que sufren palmitoilación, en este caso LAT no puede ubicarse en la ZLE; aún cuando no se altera su capacidad de unirse a la membrana, pierde su propiedad de ser fosforilada y de participar como un regulador en la transducción de señales iniciada por el TCR. Ratones carentes del gen LAT, LAT^{-/-}, sufren una completa alteración en la maduración de los timocitos. La proteína adaptadora SLP-76 (proteína fosforilable de los leucocitos y que posee dominios SH2, es una proteína citosólica 76 kDa), específica de las células del sistema hematopoyético; se encuentra en los linfocitos T, células NK, monocitos y megacariocitos, pero no en los linfocitos B. De acuerdo a su estructura posee dominios ricos en prolina, P-Y y SH2, lo que le permite una amplia capacidad de interacción con otras proteínas. Una vez fosforilada se puede unir a las proteínas adaptadoras vav, Gads y a la PTK *Ikt* de la familia *Tec*. Al igual que en el caso de LAT, ratones mutantes en SLP-76 por recombinación homóloga, provocan una completa ausencia de LT en la periferia, el resultado es mas severo que la carencia de otras proteínas adaptadoras o de cualquiera de las PTK antes mencionadas, poniendo en evidencia la importancia de esta proteína adaptadora en los linfocitos T.

Como se ha podido apreciar, hasta este punto se han descrito proteínas participantes en el proceso de activación de los linfocitos que de una u otra manera están ubicadas en la membrana plasmática, ya sea como proteínas integrales de ésta o bien asociadas a las sub-unidades o coreceptores. Las preguntas que surgen entonces son ¿cómo se comunican estas estructuras con el citosol y con el núcleo celular?, ¿Si bien existen enzimas proteína quinasas, cómo éstas interactúan con sus sustratos citosólicos?, ¿Qué evento les indica a los sustratos proteicos citosólicos que se asocien en un momento determinado a la membrana y eventualmente se modifiquen por fosforilación?. El siguiente modelo de activación de los LT permitirá responder algunas de estas interrogantes.

2.5 Modelo general de activación de los LT. Manteniendo presente a la activación de los linfocitos como un proceso altamente complejo, podemos con los elementos proteicos estructurales y enzimáticos señalados visualizar un modelo simple de la activación de los LT como el de la figura 10-4 (a, b). La figura 10-4a indica la situa-



ción basal, previa a la interacción con el antígeno. Indudablemente la especificidad de la respuesta está dada por el reconocimiento por parte del TCR del péptido antigénico presentado por el MHC de la célula presentadora. Producida esta situación (Figura 10-4b), quedan los co-receptores CD4 o CD8 dependiendo del tipo de LT, topográficamente en posición de interactuar con la misma molécula de MHC pero en una región diferente a la de unión al TCR. Es decir CD4 o CD8 también pueden unirse al MHC, a un segmento no polimórfico, pero ese evento ocurre solamente en esta altamente restringida condición. Bajo estas condiciones la p56^{lck}, unida al co-receptor puede quedar ahora muy próxima a los diversos ITAM de las sub-unidades CD3- ζ , produciéndose la fosforilación masiva de estas secuencias. De este modo las moléculas co-receptoras, CD4/CD8, hacen a los péptidos antigénicos unidos a las moléculas de MHC, activadores mucho más eficientes de las células T comparados a los ligandos que se unen directamente al TCR. Esta función de fosforilación también la pueden efectuar la PTK p59^{lyn}, postulándose en este caso una activación de la enzima mediada por los cambios conformacionales siguientes a la interacción del TCR con el antígeno. Una vez generados ITAM fosforilados, puede entrar ahora en acción una PTK como la ZAP-70, pues se satisfacen los requerimientos para una interacción efectiva, es decir la presencia de homologías SH2 (ZAP-70) y de secuencias fosforiladas en tirosina (ITAM de las sub-unidades CD3 ζ). Estando ahora unida, puede a su vez ser fosforilada por las PTK de membrana ya mencionadas y de esta forma activarse y fosforilar otros sustratos celulares propagando la respuesta o bien por el hecho de estar fosforilada crear nuevos sitios de reclutamiento de proteínas que posean secuencias SH2. Enzimas como la ZAP-70 pueden actuar de una manera pivotal, dependiendo del estado del linfocito; en reposo, ubicada en el citosol; en estado activado, ligada a la membrana permitiendo, en conjunto con otras enzimas activadas, el traspaso de la información hacia el interior celular.

La localización de múltiples proteínas en la zona lipídica específica durante la activación de los linfocitos aparece como un requerimiento crucial. La presencia masiva en esta zona, durante la activación, de la proteína adaptadora LAT, permite que sea fosforilada por Zap-70, lo que a su vez permite la asociación con diversas proteínas adaptadoras y con enzimas explicando de paso

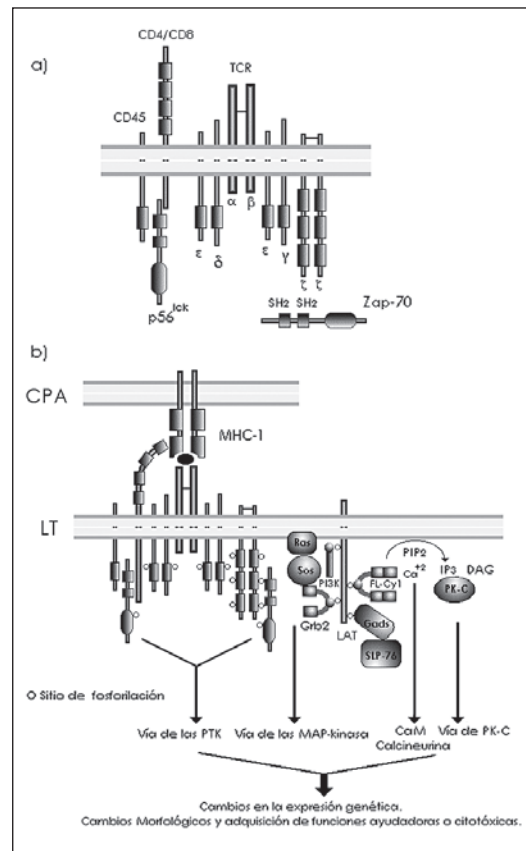


Figura 10-4. Mecanismo básico de activación de los LT. a) Tipos celulares participantes: LT que posee el complejo TCR-CD3- ζ , co-receptores CD4 o CD8, CD45 y enzimas proteína quinasa PTK intracelulares. La CPA, que posee la molécula de MHC (clase I o II) y el péptido antigénico. **b)** Interacción entre el péptido antigénico presentado y el TCR que inicia la serie de eventos de asociación, activación y fosforilación en que participan múltiples proteínas celulares como PTK, PK-C, fosfo-proteína fosfatasa, proteínas que poseen ITAM, proteínas adaptadoras, que culmina con la generación de segundos mensajeros y traspaso de la información al núcleo celular. El color azul de la membrana indica la zona lipídica específica (ZLE). Los rectángulos negros de las sub-unidades del TCR corresponden a los segmentos ITAM, figura 10-4 a y b, los círculos plomos adyacentes a las secuencias ITAM y también encontrados en otras proteínas, corresponden a la fosforilación de esos segmentos (figura 10-4b); en el caso de las enzimas y proteínas participantes, los cuadrados verdes corresponden a dominios SH3, y los óvalos amarillos a dominios SH2.

la acumulación de éstas a nivel de la membrana plasmática de los LT. Entre las proteínas asociadas están las isoenzimas de la fosfolipasa C (FLC) del tipo γ 1 o γ 2, la PI3-quinasa y la proteína adaptadora Grb2 que inicia la vía de activación de ras. El desdoblamiento del PIP₂ (fosfatidilinositol[4,5]bisfosfato), formando los productos IP₃ (inositol[1,4,5]trisfosfato) y DAG (diacilgli-



cerol) por parte de la FL-C es un hecho ampliamente descrito en la literatura, este tipo de enzimas puede ser activado ya sea por proteínas de tipo G, la isoenzima FL-C β ; o por fosforilación en residuos de tirosina, como es el caso de las isoenzimas FL-C γ . En el proceso de activación de los LT se ha observado hasta ahora, la participación solamente de isoenzimas del tipo C γ . Un análisis muy somero de la estructura de estas últimas, nos revela además de la existencia de secuencias que pueden ser fosforiladas, la existencia de secuencias tipo SH2, que le permiten por lo tanto interactuar con secuencias fosforiladas (en este caso de LAT), y de esta manera formar parte de la vía de activación. La FL-C γ 1 en estas condiciones es activada por fosforilación a través de la PTK Ikt. La FL-C γ 1 cataliza la hidrólisis del fosfolípido de membrana PIP₂ generando los segundos mensajeros IP₃ y DAG. Estos segundos mensajeros, inducidos a partir del TCR, son los responsables del muy rápido y persistente aumento en el Ca²⁺ citosólico y de la activación de la enzima pivotal proteína quinasa C de la cual existen más de una docena de isoenzimas, siendo las más importantes en los LT justamente las dependientes de Ca²⁺ y DAG (isoenzimas α y β). Las PK-C activadas pueden actuar fosforilando, en serina/treonina, una serie de sustratos proteicos propagando de este modo la señal. La enzima PI 3-quinasa, también se asocia a LAT fosforilado, y genera a partir del del PIP₂ el producto PIP₃ (fosfatidilinositol[3,4,5]trisfosfato) que es un activador de la PK-C ζ , reforzando el papel de estas isoenzimas. El aumento del Ca²⁺ intracelular y activación de la PK-C son eventos claves en la respuesta tanto de los linfocitos T y B. La elevación del Ca²⁺ intracelular además de activar directamente a enzimas, conduce a la interacción de este metal bivalente con la proteína moduladora dependiente de calcio, denominada calmodulina; el complejo calmodulina calcio produce por interacción proteína:proteína la activación de diversas enzimas, entre éstas la calcineurina, una fosfoproteína-fosfatasa (serina/treonina) que desfosforila al factor de activación de la transcripción (NFAT) citosólico, que bajo estas condiciones ingresa al núcleo y participa en la expresión del gen para IL-2, citoquina vital en el proceso de activación de los LT. Esta vía es inhibida por el fármaco ciclosporina A (CsA), fármaco que se une a proteínas citosólicas (ciclofilinas), siendo este complejo el inhibidor de la fosfatasa calcineurina, impidiendo de esta manera el traspaso de la infor-

mación e inhibiendo por lo tanto el proceso de activación de los LT. Este es uno de los pocos ejemplos directos que muestran la conexión entre la membrana y el núcleo celular.

La participación de la proteína ras, que se sabe inicia una vía importante en la activación de los LT, es insensible a la acción de CsA. La proteína ras (21 kDa) es una de las típicas proteínas que unen nucleótidos de guanina, GDP en el estado inactivo y GTP en el estado activo. La estimulación del TCR induce una marcada y rápida activación de ras que se manifiesta por su estado de unión a GTP. Esta activación se inicia a través de la interacción de Grb2 con LAT fosforilado, Grb2 puede interactuar con otras proteínas adaptadoras y con proteínas intercambiadoras de guanina (Sos) que permiten la unión de GTP a ras. Ras-GTP activa a la Raf-quinasa con la cual se inicia la activación secuencial de la cascada de las MAP-quinasas, vía también fundamental en la activación de los LT. La proteína adaptadora SLP-76 es también fosforilada por Zap-70, puede interactuar con otras proteínas como la PTK Ikt y con Gads. La Ikt en esa posición activa a la FL-C γ por fosforilación y Gads, actuando como puente, le permite interactuar con LAT. Como se puede apreciar entonces estas proteínas, LAT y SLP-76, actúan como andamios temporales que pueden reclutar una gran cantidad de proteínas en la superficie celular permitiéndoles activarse a través de la interacción proteína-proteína o a través de la fosforilación y de esta forma engranar toda la maquinaria bioquímica requerida en la transducción de señales.

Como resultado del proceso anterior, se activan diferentes vías: catalizadas por diversas familias de PTK, isoenzimas de PK-C, MAP-quinasas, calcineurina; lo que trae como consecuencia: a) cambios en el citoesqueleto, polimerización de actina y la reorientación del MTOC hacia la zona de contacto inter-celular; b) la activación de diversos factores transcripcionales que permiten la síntesis de citoquinas, proteínas citotóxicas, entre otras, necesarias para la funcionalidad de los LT CD4 y CD8.

La transducción de señales es un proceso rápido, su término en este caso se encuentra asociado a la activación de mecanismos de desfosforilación efectuadas por fosfatases específicas (fosfotirosina fosfatases). Nuevamente aquí se ha descrito un papel importante de CD45, esta enzima puede aparecer, en determinados períodos, in-



cluida o excluida de las zonas lipídicas específicas; pudiendo actuar como agente desfosforilante que va finalizando el proceso de activación. De acuerdo a lo anterior, CD45 participaría inicialmente desfosforilando el sitio regulador de la p56^{lck} y posteriormente sería excluida de las ZLE. Existen muchas familias de fosfatasa, una de éstas denominada SHP (fosfatasa que contiene dominios SH2), de la cual hay una gran variedad: SHP-1, 2, etc. Este tipo de enzimas tiene la importante propiedad de reconocer a las PTK activadas a medida que aumenta su grado de auto-fosforilación, y por ende de activación, pueden unirse a éstas a través de los dominios SH2, desfosforilando a la PTK y por lo tanto volviéndola al nivel basal. Este tipo de mecanismos es uno de los principales frenos de la activación de los linfocitos.

2.6. Las dos señales necesarias para la activación de los LT. Como los LT CD4 controlan la activación de los LB, macrófagos y, en algunos casos la activación de los LT CD8, su propia activación por parte del antígeno, puede representar uno de los eventos más importantes en la iniciación de la inmunidad adquirida. Desde hace ya varias décadas atrás, se sabía que la estimulación antígeno específica no era suficiente para llevar a cabo la expansión clonal de los LT. Posteriormente se demostró la presencia de una interacción co-estimuladora antígeno-independiente encargada de aportar la necesaria segunda señal. Esta segunda señal, por lo tanto, no es dependiente del TCR y se ha denominado señal co-estimuladora pues, siendo esencial, no induce por sí misma respuesta alguna en los LT. La interacción del TCR con el antígeno solamente, sin las señales co-estimuladoras accesorias puede llevar a la muerte del linfocito o a anergia, un estado en el que la célula no puede ser activada, aun cuando reciba todas las señales requeridas. Por lo tanto entonces el encuentro con el antígeno puede conducir a dos respuestas bien diferentes: proliferación y adquisición de funciones efectoras o inactivación y muerte celular.

Entre las moléculas responsables de ejercer esta co-estimulación aportadas por la CPA, se encuentran entre muchas otras, la proteína B7 (B7.1, B7.2 o CD80, CD86) (figura 10-2), siendo CD28 el receptor en los LT. La molécula de CD28 tiene una MM de 44 kDa, es un homodímero expresado en la mayoría de los LT, virtualmente en todos los LT CD4 y aproximadamente en el 50% de los LT CD8. La estimulación de los LT con

mAbs anti-TCR y simultáneamente con mAbs anti-CD28, produce una estimulación de la proliferación celular debido, fundamentalmente, a la síntesis y secreción de IL-2; produciéndose también la síntesis y secreción de otras numerosas citoquinas. Otro aspecto relevante en la estimulación de CD28 es su potenciación en la generación de las zonas lipídicas específicas, lo que resultaría en una mayor concentración de las proteínas participantes en la activación de los linfocitos. La importancia de B7 como co-estimulador ha quedado además de manifiesto en numerosos sistemas experimentales *in vivo*, un ejemplo demostrado por varios grupos lo constituye el trasplante de células tumorales no inmunogénicas, que se transforma en inmunogénicas al transfectarlas con el gen de B7. Si bien el mecanismo de acción mediado por CD28 no es del todo conocido, implica la fosforilación de su dominio citoplasmático en la secuencia YXXM, por quinasas de la familia *src* activadas por la interacción del TCR con el antígeno. Esta secuencia bajo estas condiciones puede asociarse con diversas enzimas como la PI3-quinasa, ras y la activación de la vía de las MAP-quinasas.

La glicoproteína CTLA-4 es altamente homóloga a CD28, ambas se unen a los mismos ligandos, pero CTLA-4 presenta algunas diferencias: a) une a los ligandos CD80 y CD86 con mucho mayor afinidad que CD28, aproximadamente 10 veces mayor, b) transmite una señal de inhibición al interior celular. La regulación de la expresión de CTLA-4 es un asunto crucial para ejercer sus efectos supresores, los LT en reposo no lo expresan y sólo comienza a aparecer una vez que éstos se han activado. El extremo citoplasmático de esta glicoproteína, contiene la secuencia YXXM que puede ser fosforilada por las quinasas de la familia *src*; una vez fosforilado puede interactuar específicamente con fosfoproteína fosfatasa como la SHP-2, la cual bajo estas condiciones se activa y cataliza la desfosforilación de las quinasas (*src*, *syk*, *tec*) y fosfoproteínas (LAT, SLP-76) requeridas para la transducción de señales de los LT. Al interactuar por lo tanto el TCR y CTLA-4, ocurriría el comienzo de la activación celular de los LT, se fosforila CTLA-4, estimulando la reacción de desfosforilación (por su asociación a fosfatasa) y la terminación de la respuesta. Actualmente, existe un amplio estudio de la utilización farmacológica de este efecto, utilizando proteí-



nas análogas a CTLA-4, que compitan con B7 de la CPA, como fármacos inmunosupresores.

El proceso de activación de los LT, incluyen al TCR, co-receptores moléculas de adhesión y receptores de co-estimulación; abarca un primer evento constituido por la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina y la generación de los segundos mensajeros IP_3 , Ca^{2+} y DAG. Esto constituye el traspaso de una señal o la transducción de señales desde el exterior al interior celular y que inicia a las vías bioquímicas ya señaladas, culminando con los típicos cambios en la expresión genética y cambios morfológicos y funcionales. El bloqueo de cualquiera de estas vías ya sea por inhibidores específicos o mutaciones que las inactiven, provoca una significativa disminución a anulación de la respuesta. Por otra parte, agentes que imiten los efectos de los segundos mensajeros como son los ésteres de forbol (estimuladores de la PK-C) e ionóforos de calcio (que favorecen el ingreso de Ca^{2+} al interior celular), reproducen muchos de los efectos río abajo, iniciados por el antígeno en contacto con el TCR. Además, existen evidencias aportadas por la patología inmunológica, en muchos casos de inmunodeficiencias combinadas severas (SCID) se ha observado que el factor deficitario corresponde a una de las proteínas o enzimas de las vías bioquímicas señaladas; el caso más conocido es la deficiencia de la enzima Zap-70.

Finalmente, dada la importancia de las PTK en diversos procesos tanto normales como patológicos, existe en la actualidad una rama importante de la farmacología dedicada a la interrupción de la transducción de señales a través de esta vía, diseñando inhibidores específicos de estas PTK que puedan ser utilizados como fármacos. En el caso del sistema inmune, las PTK que intervienen en el proceso de activación se expresan en forma prácticamente exclusiva en los linfocitos, lo que permitiría bloquear selectivamente su acción actuando como inmunosupresores.

3. ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS B

3.1. Secuencias de activación en el BCR y sub-unidades asociadas. Aún cuando la información sobre el mecanismo de activación de los linfocitos B está aun lejos de ser completa; el conocimiento creciente de la estructura del receptor de antígenos de las células B (BCR) y de sus sub-unidades asociadas ha ido dando paso a un mecanismo que ha

resultado ser muy similar al de los LT, y como veremos más adelante, al de las células NK. El BCR al igual que el TCR, cumple muchas funciones, permite la expansión proliferativa y diferenciación de las células preB en células B maduras y sirve también como receptor para internar antígenos y presentarlos a los LT CD4 ayudadores. Estructuralmente el BCR está compuesto de una molécula de Ig asociada no covalentemente con dos moléculas accesorias Ig- α (CD79a) e Ig- β (CD79b), las que se encuentran como heterodímeros unidos por puentes disulfuro (figura 10-1 y 10-5a). Las inmunoglobulinas de membrana difieren de las secretadas en cuanto a que se encuentran integradas a la membrana plasmática, con dominios extracelular, trans-membrana y citoplasmático; este último puede ser muy corto, tan sólo de unos pocos aminoácidos (en general de 3 a 35/40 residuos). Aunque es factible la expresión de todos los tipos de inmunoglobulinas como parte del BCR, son solamente mIgM y mIgD los que se encuentran con mayor frecuencia (aproximadamente 90%) sobre la superficie del linfocito. En el caso de la mIgM, las sub-unidades Ig α e Ig β , poseen 61 y 48 residuos de aminoácidos citoplasmáticos respectivamente. El análisis de la estructura primaria de estas sub-unidades permitió apreciar que cada una de éstas poseen una copia de los dominios ITAM, abriendo la posibilidad de la participación de PTK ya sea de membrana o solubles en la transmisión de la señal bioquímica al interior celular. Mutaciones en ambas tirosinas de los ITAM resultan en la total inactivación de los LB. Además del receptor, participan en la interacción co-receptores, CD19/CD21, moléculas de adhesión y moléculas de superficie celular que pueden también participar en la transducción de señales (CD40). Se encuentran también en la superficie de las células B, moléculas que promueven la inhibición, como CD22 y Fc γ RIIB1. Los co-receptores como CD19/CD21 en los LB, son de particular interés en el contexto de la transducción de señales mediada por el receptor antigénico, puesto que contribuyen directamente a la formación del complejo entre el receptor y el antígeno, aumentando por lo tanto la sensibilidad de la interacción (figura 10-5a).

3.2. Modelo general de activación de los LB. A continuación se analizará cómo la unión de un ligando específico (antígeno) al receptor BCR, desencadena una compleja serie de eventos bioquímicos que permitirán el desarrollo de la res-

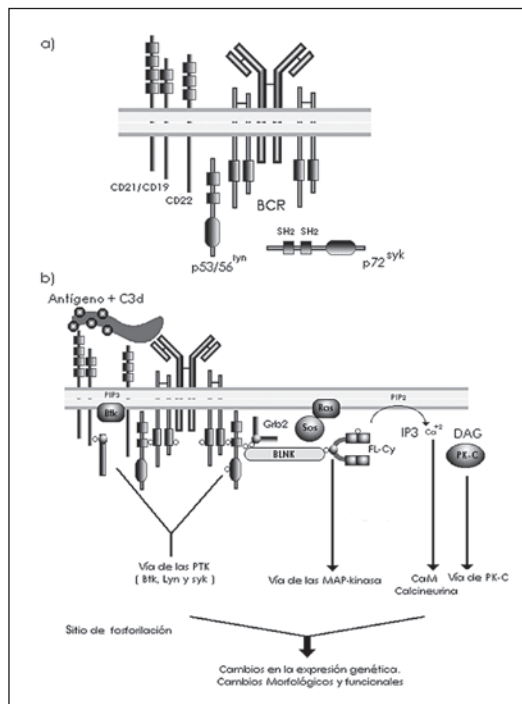


Figura 10-5. Mecanismo básico de activación de los LB. a) Estructura del BCR y sub-unidades asociadas (Ig- α , Ig- β), co-receptores CD19, CD21, CD22 y enzimas, principalmente PTK intracelulares. b) Interacción del BCR y estructuras asociadas con el antígeno (unido a un producto proteolítico del complemento) que inicia los eventos de asociación y de fosforilación de las secuencias ITAM y también de otras proteínas, la activación de proteína quinasas, generación de segundos mensajeros y traspaso de la información al núcleo celular. El PIP_3 producido por la PI3 -quinasa, permite la unión de la PTK Btk a la membrana.

puesta funcional de los LB. Es ya un hecho establecido la participación de diversas PTK de la familia *src*, como p55^{blk} , p56^{lck} , $\text{p53/56}^{\text{lyn}}$, y p59^{lyn} , que tienen la posibilidad de encontrarse unidas a la membrana plasmática o con el BCR de LB no estimulados (figura 10-5a). Estudios de unión *in vitro*, sugieren que las *src*-quinasas pueden interactuar con los receptores en reposo principalmente con la cadena $\text{Ig}\alpha$, a través de una asociación con el extremo amino-terminal de la quinasa. Otra PTK de importancia en la transducción de señales de los LB es la p72^{syk} ; esta enzima citoplasmática, altamente homóloga a la Zap-70, tiene también aquí una función similar. Nuevamente entonces, ni el receptor ni las sub-unidades asociadas poseen actividad enzimática alguna, encontrándose separados los módulos de unión al ligando de los módulos de transducción de la señal.

El modelo de la activación de los LB por lo tanto es análogo al de activación a través del TCR; la interacción con el antígeno favorece la activación de PTK de la familia *src*, como $\text{p53/56}^{\text{lyn}}$, la que a través de cambios conformacionales permiten la aproximación de la PTK a los dominios ITAM, fosforilándolos (figura 10-5b). Este hecho entonces puede permitir el reclutamiento masivo de la p72^{syk} citosólica, y otras PTK, a través ahora de la interacción de los dominios SH2 con los ITAM fosforilados en tirosina. Durante este proceso todas las PTK son fosforiladas y en general en este estado se encuentran activadas y además y muy importante van generando sitios de interacción con otras enzimas que posean dominios SH2 permitiendo el traspaso de la señal. La descripción del papel de proteínas adaptadoras citosólicas ha sido sustancial en el mecanismo de activación de los LB. Una de éstas denominada BLNK/SLP-65 es una proteína que posee secuencias SH2, secuencias ricas en prolina y secuencias fosforilables en tirosina, por lo cual puede interactuar simultáneamente con diversas proteínas participantes en la activación. Una vez fosforilada BLNK/SLP-65 por la PTK *syk*, puede en estas condiciones asociarse con esta quinasa, y con otras proteínas como Grb2, y FL-C γ 1. Por lo anterior BLNK/SLP-65 se encuentra fuertemente asociada a la membrana inmediatamente de producida la interacción con el antígeno, favoreciendo de esta forma la vía de ras – MAP-quinasas a través de Grb2 y la activación por fosforilación de la FL-C γ 1 y γ 2. Recordemos que estas isoenzimas catalizan la hidrólisis de PIP_2 y la generación de los segundos mensajeros IP_3 , DAG y Ca^{2+} .

El papel de los co-receptores es también relevante, pues se encargan de estabilizar una interacción entre el receptor y el antígeno que puede ser muy débil; en el caso de los LB es también un hecho claro que estos mecanismos permiten la amplificación de la señal recibida por el BCR. El principal co-receptor es un complejo molecular formado por CD19 y CD21 (receptor 2 del complemento, CR2). El co-receptor CD21 une un producto proteolítico del complemento (C3d) y de esta forma participa en conjunto con el BCR en el reconocimiento del antígeno. Además el CD19 se puede encontrar constitutivamente asociado al BCR y es también fosforilado en su dominio intracitoplasmático por la $\text{p53/56}^{\text{lyn}}$ post-contacto del BCR con el antígeno. El co-receptor CD19 una vez fosforilado puede reclutar a enzimas como la



PI3-quinasa, las PTK *lyn* y *fyn* y a la proteína adaptadora vav. Cada una de estas moléculas tiene una activa participación en los eventos bioquímicos de la activación de los LB. La PI3-quinasa genera como producto, el PIP_3 , molécula que puede interactuar con los sitios PH (homología tipo Plekstrin) que presentan proteínas como la PTK, *Btk* (tirosina quinasa de Bruton) y las FL-Cy. Las secuencias PH son dominios de aproximadamente 120 aminoácidos que reconocen al PIP_3 de la membrana; este reconocimiento específico les permite a estas proteínas asociarse a la membrana plasmática donde deben ejercer sus funciones. La participación de la PI3-quinasa aparece como muy importante en los LB, la enzima está compuesta de dos sub-unidades una de 110 kDa, sub-unidad catalítica, y una sub-unidad reguladora de 85 kDa que posee dominios SH2 y ricos en prolina. Esta enzima que aparece fuertemente unida a la membrana post-activación, posee en su sub-unidad reguladora regiones ricas en prolina que son afines a los dominios SH3 de las *src* PTK y regiones SH2, es decir tiene dos maneras de interactuar con elementos del BCR y activarse (Figura 9-5b). La proteína adaptadora vav, que es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina, puede activar una vez fosforilada a la familia de las GTPasas Rho, Rac-1, RhoA y Cdc42 que inician una de las vías de activación de las MAP-quinasas JNK y p38. La estimulación de las Rho GTPasas regula también la polimerización de la actina necesaria para la óptima movilización de Ca^{2+} . Los co-receptores de las células T pueden llegar a la proximidad del TCR a través de la interacción con la misma molécula de MHC, un mecanismo fisiológico similar puede visualizarse aquí, pues el entrecruzamiento en la superficie del BCR con CD19/CD21, puede lograrse por la unión a complejos inmunes que contengan tanto el antígeno y los fragmentos proteolíticos del complemento que se unan a CD21. El desdoblamiento por lo tanto del PIP_2 , la consecuente elevación del Ca^{2+} intracelular y la activación de las isoenzimas de la PK-C y de la calcineurina son parte de los mecanismos más importantes en la inducción de cambios en la expresión genética en los LB. Existen claros antecedentes sobre el agrupamiento de muchas de estas proteínas y enzimas en zonas lipídicas específicas, por lo cual este proceso también operaría en la activación de los LB.

Otras proteínas de membrana de importancia en la transducción de señales en los LB son CD22 y FcγRIIB; ambos regulan negativamente

a los LB. El CD22 está constitutivamente asociado al BCR, por lo que su función está asociada a la unión del BCR con el antígeno. En cambio FcγRIIB, sólo ejerce su acción inhibitoria a través de la interacción con antígenos asociados a IgG. Lo interesante de estas proteínas de membrana es que en sus dominios intra-citoplasmáticos poseen dominios compuestos de secuencias conservadas de aminoácidos denominadas ITIM (“motivos o secuencias de inhibición basados en tirosina del inmuno-receptor”) que consisten de dos pares de YXXL separados por 26 aminoácidos. Estos residuos de tirosina pueden ser fosforilados a través de la PTK *lyn*, la misma encargada de la activación de los LB; es decir, la misma señal de activación puede conducir a la regulación negativa y de esta forma modular la respuesta. Una vez fosforilados los ITIM pueden asociarse con fosfatasas: SHP-1, (fosfotirosina fosfatasas que posee dominios SH2) o con la fosfatasa de lípidos SHIP (inositol-polifosfato-5-fosfatasa que posee dominios SH2). El co-receptor CD22, al igual que los receptores de inhibición de las células NK que se analizarán más adelante, se asocia con SHP-1 que se encarga de desfosforilar a las enzimas y otras proteínas fosforiladas en tirosina, inhibiendo la formación de IP_3 y el proceso de activación en general. El receptor FcγRIIB se asocia con SHIP, cuyo efecto es regular los niveles del PIP_3 de la membrana, dando como producto $PI[3,4]P_2$ que no tiene efecto regulador, impidiendo la asociación de las proteínas con dominios PH a la membrana, inhibiendo por lo tanto la funcionalidad de los LB. El principal representante de este tipo de moléculas es la PTK *Btk*. El papel de CD22 es complejo pues, independientemente, puede interactuar con ligandos derivados del ácido siálico presentes en algunas glicoproteínas, y en este caso particular puede actuar como activador de los LB.

Son numerosas las evidencias que validan este modelo, especialmente evidencias genéticas. Algunos tipos celulares B no poseen $p72^{syk}$, observándose fosforilación de las sub-unidades de membrana solamente y ausencia de respuesta biológica funcional; la eliminación del gen para esta enzima (“knock-out” del gen) provoca también la eliminación de la respuesta funcional. La transfección de *syk* (modificación genética que permite la incorporación de *syk* al genoma celular) a estas células restaura la respuesta. Inhibidores de PTK inhiben también totalmente la funcionalidad y el tratamiento de LB con fármacos que activen a la PK-C y eleven los nive-



les intracelulares de Ca^{2+} , reproduce en gran medida los efectos mediados por el antígeno específico. La deficiencia genética de CD19, CD19^{-/-}, provoca una disminución de la respuesta humoral y la deficiencia genética de SHP-1, presenta una estimulación de la respuesta. La deficiencia de *lyn*, provoca una compleja alteración pues altera tanto los procesos de activación como de inhibición. La alteración genética de *Btk* provoca la patología agamaglobulinemia ligada al cromosoma X humano y una inmunodeficiencia ligada al cromosoma X en el ratón. En general la alteración de cualquiera de las vías señaladas va a perturbar la funcionalidad de los LB, poniendo en evidencia la importancia de su funcionamiento integral.

4. ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS NK

Las células NK (“natural killer” o “agresoras naturales”) son una tercera población de linfocitos, diferentes a los linfocitos B y T, pertenecientes al sistema inmune innato. Son una sub-población celular altamente heterogénea que se ha caracterizado en base a su función, fenotipo y morfología: **a)** función, pueden lisar en forma espontánea una amplia variedad de células (denominadas en general células blanco), tales como células tumorales, células transformadas por virus e infectadas por bacterias o parásitos; secretan además un conjunto determinado de citoquinas, especialmente IFN- γ . **b)** Fenotipo, expresan mayoritariamente el fenotipo TCR⁻, BCR⁻, CD3⁻, CD16⁺, CD56⁺; CD16, uno de los marcadores más representativos, es el receptor de baja afinidad que reconoce a la fracción Fc de IgG, por lo que se denomina también Fc γ IIIIR (figura 10-1). **c)** Morfología, corresponden a linfocitos granulares grandes. Una de las características más conocidas de las células NK es la eficiencia de su acción citolítica ejercida sobre células blanco que carecen parcial o completamente de la expresión de moléculas MHC-I, es decir no dependerían de la expresión de este complejo; sin embargo, como se podrá apreciar mas adelante, este concepto está comenzando a cambiar. La heterogeneidad de las células NK se manifiesta en que las sub-poblaciones pueden expresar diferentes moléculas de activación y de inhibición de su funcionalidad; es decir, moléculas que al interactuar por ejemplo *in vitro*, con anticuerpos monoclonales o a través de sus ligandos naturales específicos presentes en la cé-

lula blanco, provocan la activación o inhibición de su función. En un capítulo posterior se analizarán en detalle los mecanismos que explican la citotoxicidad, haciendo ahora sólo referencia a que ésta puede ser de dos tipos: **1)** citotoxicidad natural, lisa a células especialmente tumorales y transformadas por virus y **2)** citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) a través del receptor CD16 que reconoce a las células blanco recubiertas por anticuerpos del tipo IgG.

4.1. Modelo de activación de las células NK. La activación de las células NK más conocida hasta ahora, es la que ocurre a través de la interacción de CD16 con células blanco recubiertas con IgG. Como se puede apreciar de la Figura 10-1, el receptor CD16 está asociado a sub-unidades; éstas pueden ser de tipo ζ , o bien componentes del complejo CD3. Se han descrito componentes del complejo CD3 asociados a este receptor, lo que viene a representar una cierta analogía con el receptor de las células T (TCR). Considerando además que estas sub-unidades poseen dominios ITAM susceptibles de ser fosforiladas, el mecanismo de activación implica también un alto grado de fosforilación de proteínas similar al de los LT. Se han descrito en las células NK enzimas tales como: PTK de la familia *src*, *syk*; FL-C de tipo $\gamma 1$, $\gamma 2$; la vía de ras y MAP-quinasas y la presencia de proteínas adaptadoras como LAT, SLP-76, ya descritas, por lo que se desprende un modelo de activación celular muy similar a los ya señalados para los linfocitos B y T. Una vez que el receptor CD16 reconoce a las células blanco, a través del fragmento Fc de IgG, se inicia la maquinaria bioquímica de activación de las células NK. La cascada de fosforilación implica la generación posterior de los mismos segundos mensajeros IP₃, DAG y Ca^{2+} (figura 10-6).

La descripción de receptores de inhibición en las células NK ha sido uno de los más importantes aportes de los últimos años a la comprensión del mecanismo de acción de la citotoxicidad de éstas células. Estos receptores, que reconocen a las moléculas de MHC-I, específicamente a algunas secuencias protéicas conservadas de estos complejos, son básicamente de dos tipos o familias diferentes: **a)** los denominados KIR (“killer cell immunoglobulin-like receptors”), y los LIR humanos (“leukocyte immunoglobulin-like receptors”) que son receptores como su nombre lo dice de estructura extracitoplasmática similar a las inmunoglobulinas; **b)** proteínas del tipo de las



lectinas, como CD94-NKG2 humano y Ly-49 murino. Mientras los KIR y Ly49 pueden reconocer e interactuar con múltiples MHC-I del tipo clásico (A,B,C), los receptores CD94-NKG2 lo hacen con MHC-I no clásicos (HLA-E). Estos receptores poseen en sus dominios intracitoplasmáticos secuencias de inhibición del tipo ITIM, ya descritas para otros receptores. Al interactuar la célula NK con la célula blanco, si la célula NK posee receptores de inhibición que reconocen a su ligando respectivo en la célula blanco, se fosforilan los residuos de tirosina de estas secuencias de inhibición a través de las PTK de la familia *src*; una vez fosforilados los ITIM pueden asociarse con fosfoproteína fosfatasas SHP-1, SHP-2 que se encargan de desfosforilar a las proteínas quinasas activadas e inhibir el proceso general de fosforilación característico de la activación celular, inhibiendo por lo tanto la funcionalidad de las células NK. Es decir, el proceso de activación de las células NK, al igual que el de los linfocitos T y B, implica activación de quinasas y fosforilación de proteínas. El proceso de inhibición mediado por los receptores recién descritos, si bien requieren PTK para la fosforilación de las secuencias ITIM, activan a fosfatasas que frenan el proceso de activación. La figura 10-1 muestra dos ejemplos de receptores de inhibición.

Una complejidad adicional la representa la existencia de receptores del tipo de los de inhibición recién descritos, pero que carecen del sitio ITIM, y se comportan por lo tanto como receptores de activación de las células NK al interactuar con las moléculas de MHC-I. Uno de ellos el CD94-NKG2C, tiene asociada la sub-unidad denominada DAP12 (también llamada KARAP), que contiene una secuencia de activación ITAM. De este modo, las moléculas MHC-I pueden ser reconocidas por tres diferentes grupos de inmunoreceptores: TCR, que reconoce al antígeno presentado por éstas moléculas; CD8, co-receptor que reconoce a secuencias de aminoácidos conservadas de las moléculas MHC-I y los receptores recién descritos, que también reconocen secuencias de estas moléculas que pueden inhibir o activar la respuesta funcional de las células NK. Estos últimos receptores presentan además una distribución clonal en las células NK, que explica la heterogeneidad de éstas células.

Por lo que se ha analizado hasta ahora, se desprende un importante papel de los complejos MHC-I en la respuesta de las células NK. Recien-

temente se han descrito una de las más importantes familias de receptores de activación que vienen a responder muy satisfactoriamente al requerimiento principal de las células NK, es decir actuar sobre células deficientes o que carecen por completo de los complejos MHC-I. Estos receptores que están implicados en la citotoxicidad natural se han denominado justamente “receptores de la citotoxicidad natural” (NCR) y son : NKp46 (Figura 9-1), NKp44 y NKp30; su estructura externa es de la familia de las inmunoglobulinas y en su extremo citoplasmático se encuentran asociados a subunidades del tipo de CD3 ζ y DAP12, ambas poseen secuencias ITAM. Los NCR NKp46 y NKp30 se encuentran presentes exclusivamente en las células NK humanas, son los únicos con esta característica y por lo tanto son también los únicos marcadores representativos de este tipo de células. El receptor NKp44 se expresa en respuesta a IL-2 y está también presente en los LT. Si bien no se les conoce con precisión sus ligandos respectivos, se sabe que pueden actuar especialmente sobre células tumorales, transformadas por virus e incluso también sobre células autólogas normales, siendo su principal elemento regulador, la presencia o ausencia de los receptores de inhibición.

Por lo tanto, las células NK poseen un repertorio de receptores de activación y un repertorio de receptores de inhibición; ahora, se ha observado que al enfrentarse a una célula blanco que posea ligandos para ambos tipos de receptores, prima la inhibición. Si se pierde esta propiedad inhibitoria, principalmente por la menor o nula expresión de los complejos MHC-I, por parte de la célula blanco y está además presente el receptor de activación adecuado, en las células NK, ocurrirá la lisis de la célula blanco. Los receptores de inhibición también han sido descritos en los LT, por lo que representan uno de los principales factores de control de la activación de los linfocitos.

La descripción de receptores de inhibición en las células NK ha sido uno de los más importantes aportes de los últimos años. Estos receptores, que reconocen a las moléculas MHC-I, específicamente algunas secuencias conservadas de estos complejos, son básicamente de dos tipos o familias diferentes: a) los denominados KIR (“killer cell immunoglobulin-like receptors”), y los LIR humanos (“leukocyte immunoglobulin-like receptors”) que son receptores como su nombre lo dice de estructura extracitoplasmática similar a

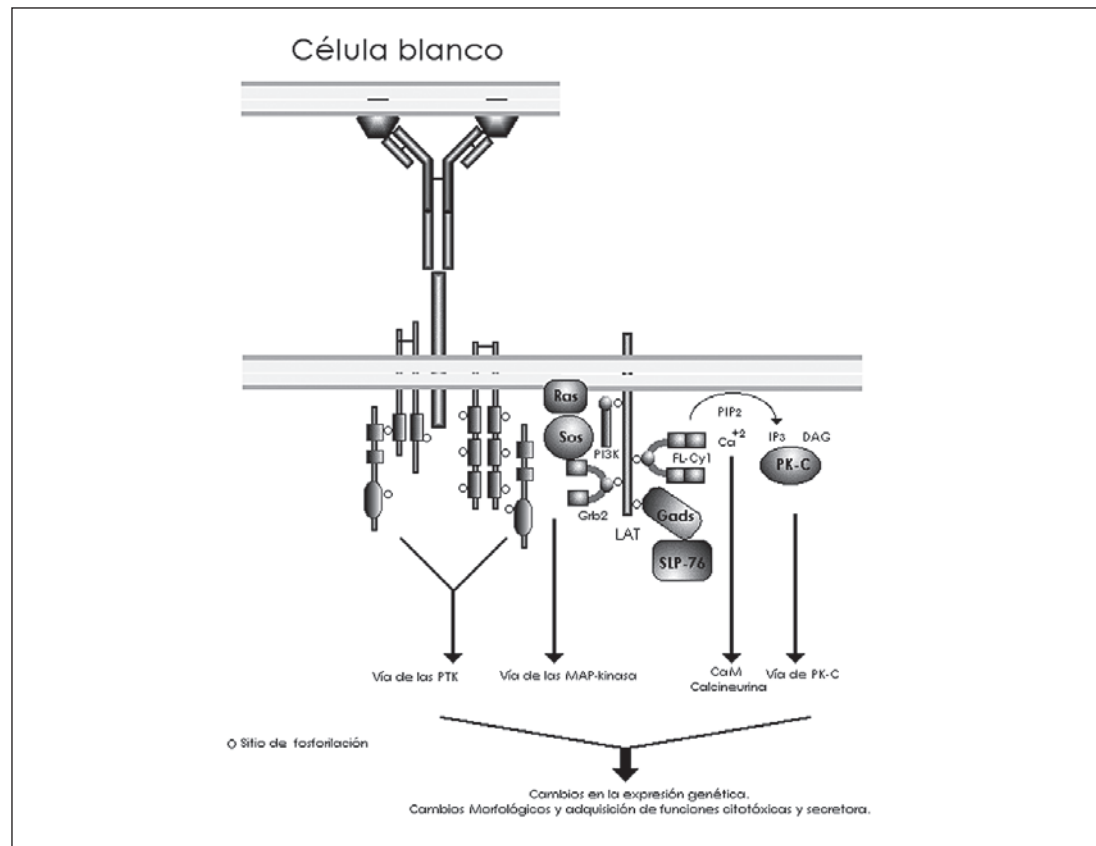


Figura 10-6. Mecanismo básico de activación de las células NK. Tipos celulares participantes en el mecanismo Citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC): células NK que poseen el receptor CD16 y sub-unidades γ y ζ ; las enzimas proteína quinasas PTK intracelulares, proteínas adaptadoras y otras son las que aparecen descritas en las figuras 10-4 y 10-5. La célula blanco en este caso, es reconocida por un anticuerpo (IgG), que actúa como puente entre esta célula y la célula NK.

las inmunoglobulinas. b) Heterodímeros como CD94-NKG2 humano y el homodímero Ly-49 murino, que son lectinas del tipo C. Mientras los KIR y Ly49 pueden interactuar con múltiples MHC-I clásicos (A,B,C), los heterodímeros CD94-NKG2 lo hacen con MHC-I no clásicos (HLA-E). Estos receptores poseen en sus dominios intracitoplasmáticos secuencias ITIM. Los residuos de tirosina de estas secuencias pueden ser fosforiladas al interactuar el receptor con su ligando, a través de las PTK de la familia *src*, o bien por el inicio de una reacción de activación de los linfocitos a través de un receptor de activación, en ambos casos una vez fosforilados los ITIM pueden asociarse con fosfoproteína fosfatasas SHP-1, SHP-2 que se encargan de desfosforilar a las proteínas activadas e inhibir el proceso, inhibiendo por lo tanto la funcionalidad de las células NK. La figura 10-1 muestra dos ejemplos de receptores de inhibición. Algunos receptores de inhibición tienen truncado el sitio ITIM, y se comportan como re-

ceptores de activación, uno de ellos el CD94-NKG2C, tiene asociada la molécula DAP12 (también llamada KARAP), que contiene una secuencia ITAM. De este modo, las moléculas MHC-I pueden ser reconocidas por tres diferentes grupos de inmunorreceptores: TCR, CD8 y los receptores recién descritos, que pueden inhibir o activar la respuesta. Estos últimos receptores presentan además una distribución clonal en las células NK.

Recientemente se han descrito una de las más importantes familias de receptores de activación que vienen a responder muy satisfactoriamente al requerimiento principal de las células NK, es decir actuar sobre células que son deficientes o que carecen por completo de los complejos MHC-I. Estos receptores que están implicados en la citotoxicidad natural se han denominado justamente “receptores de la citotoxicidad natural” (NCR) y son : NKp46 (figura 10-1), NKp44 y NKp30; su estructura externa es de la familia de las inmunoglobulinas y en su extremo citoplasmático



se encuentran asociados a subunidades del tipo de CD3 ζ y DAP12, ambas poseen secuencias ITAM. Los NCR NKp46 y NKp30 se encuentran presentes exclusivamente en las células NK humanas, son los únicos con esta característica y por lo tanto son también los únicos marcadores representativos de este tipo de células. El receptor NKp44 se expresa en respuesta a IL-2 y está también presente en los LT. Los NCR al ser activados por anticuerpos monoclonales presentan un aumento en la concentración intracelular de calcio, aumento de la citotoxicidad y de la secreción de citoquinas. Si bien no se les conoce con precisión sus ligandos respectivos, se sabe que pueden actuar sobre células tumorales y también sobre células autólogas normales, siendo su principal elemento regulador, la presencia o ausencia de receptores de inhibición. Por lo tanto, las células NK poseen un repertorio de receptores de activación y un repertorio de receptores de inhibición; al enfrentarse con una célula blanco que posea ligandos para ambos tipos de receptores, prima la inhibición; si se pierde esta propiedad, principalmente por menor o nula expresión de los complejos MHC-I y está además presente el receptor de activación adecuado, ocurrirá la lisis de la célula blanco. Los receptores de inhibición también se han descrito en los LT, por lo que representan uno de los principales factores de control de la activación de los linfocitos.

LECTURAS SUGERIDAS

Dustin M, Chan, A., "Signaling takes shape in the immune system". *Cell*, 103, 283-294, 2000.

Janes, P., Ley, S., Magee, A. & Kabouridis, P.S., "The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signaling". *Semin. Immunol.* 12, 23-34, 2000.

Kane, L. P., Lin J. & Weiss, A., "Signal transduction by the TCR for antigen". *Curr. Opin. Immunol.* 12, 242-249, 2000.

Kelly, M., & Chan, A., "Regulation of B cell function by linker proteins". *Curr. Opin. Immunol.* 12, 267-275, 2000.

Lanier, L., "NK cell receptors". *Annu. Rev. Immunol.* 16, 359-393, 1998.



Capítulo 11

CITOQUINAS

Rodrigo Naves P. y María Rosa Bono M.

- 1. Introducción**
- 2. Propiedades generales de las citoquinas**
- 3. Receptores de las citoquinas y mecanismos de transducción de señales**
 - 3.1. Receptores de citoquinas
 - 3.2. Transducción de señales
- 4. Principales actividades biológicas de las citoquinas**
 - 4.1. Inmunidad innata
 - 4.1.1. Inmunidad antiviral
 - 4.1.2. Citoquinas e inflamación
 - 4.2. Citoquinas y respuesta inmune
 - 4.2.1. Citoquinas y diferenciación de células linfoides
 - 4.2.2. Células Th1 y Th2
 - 4.2.3. Activación de linfocitos B
 - 4.2.4. Respuesta inmune específica mediada por células
 - 4.3. Citoquinas y hematopoyesis
 - 4.3.1. Factores estimuladores de colonias
 - 4.3.2. Otras citoquinas estimuladoras de la hematopoyesis
 - 4.3.3. Citoquinas supresoras
- 5. Quimioquinas**
 - 5.1. Quimioquinas en la diferenciación linfocitaria
 - 5.2. Quimioquinas en la recirculación de los linfocitos a través de los órganos linfoides secundarios
 - 5.3. Quimioquinas en el "homing" de los linfocitos a sitios efectores periféricos
 - 5.4. Quimioquinas y enfermedades
 - 5.5. Quimioquinas y terapia





RESUMEN

En este capítulo se describen algunas de las funciones de las citoquinas relacionadas con la respuesta inmune, en conjunto con las características propias de cada citoquina. La larga lista de citoquinas y quimioquinas que se mencionan representa sólo a aquellas más estudiadas. Las posibilidades que existen hoy en día para identificar y aislar nuevos tipos celulares como son las células T de memoria u otras, combinadas con las técnicas de biología molecular y el análisis de un gran número de genes homólogos, ha llevado a definir nuevas citoquinas que de otra manera sería imposible detectar. Por lo tanto es imposible pretender, hoy en día, tener una visión acabada de las citoquinas y sus funciones. La producción de ratones “knock out” y transgénicos para las citoquinas, sus receptores y las moléculas implicadas específicamente en la transducción de señales de las citoquinas es prometedora para el entendimiento de las funciones de las citoquinas. Sin embargo las propiedades intrínsecas de las citoquinas, tales como el pleiotropismo y su redundancia, la compleja red de interacciones célula-citoquina que producen, hace difícil pensar que se logrará en un futuro cercano entender la regulación a nivel de los organismos vivos.

Las citoquinas han sido implicadas en numerosas patologías las cuales a menudo se encuentran relacionadas no sólo con la respuesta inmune sino con otros sistemas tales como, el sistema nervioso central o el sistema endocrino. Muchas de las citoquinas enumeradas tienen potencial uso clínico. Sin embargo, a pesar de la enorme cantidad de trabajos que se han realizado con las citoquinas, de la explosión de conocimientos de los últimos años, y de las importantes funciones que ellas regulan, su uso en clínica humana actualmente ha sido autorizado sólo para un número muy reducido de citoquinas.

1. INTRODUCCIÓN

Las citoquinas son proteínas solubles producidas en forma transitoria por efecto de un estímulo. Éstas representan el lenguaje universal de las células, y gracias a ellas las células reconocen lo que está ocurriendo a su alrededor y establecen en consecuencia una respuesta. Las citoquinas participan, entre otros, en la proliferación y diferenciación celular, la hematopoyesis, la actividad microbida, la reacción inflamatoria, la respuesta inmune específica y no específica, y en procesos relacionados con el desarrollo de los organismos vivos. Las citoquinas regulan la respuesta inmune induciendo o inhibiendo la producción de otras citoquinas y sus respectivos receptores así como activando mecanismos de transducción de señales en células blanco o sobre ellas mismas. El número de citoquinas descubiertas ha ido en continuo aumento en los últimos años, así como los conocimientos en cuanto a los mecanismos regulatorios de éstas. Un conjunto particular de citoquinas corresponde a la familia de las

quimioquinas las que en total suman actualmente tantas como el resto de las citoquinas. Las quimioquinas serán tratadas en forma separada en este capítulo debido a que poseen propiedades particulares y a la importancia que han ido adquiriendo. Hoy en día existe una gran cantidad de conocimientos acerca de los mecanismos de acción de las citoquinas, sin embargo, sus acciones *in vivo* no son bien comprendidas debido a la complejidad de las numerosas interacciones celulares en las que ellas participan.

En la tabla 11-1 se muestra una cronografía del descubrimiento de las citoquinas.

2. PROPIEDADES GENERALES DE LAS CITOQUINAS

La mayor parte de las citoquinas han sido caracterizadas en cuanto a peso molecular, secuencia de DNA y aminoácidos, e incluso los genes que codifican para ellas han sido localizados a nivel de cromosomas tanto en humanos como en ratón. Los receptores de las citoquinas y sus



Tabla 11-1. Descubrimiento de las citoquinas

1957	Descubrimiento de la primera citoquina, IFN- γ .
1960-1970	Descripción de sobrenadantes con diferentes actividades biológicas.
1966	Se descubrió la primera linfoquina, MIF, factor producido por los linfocitos que Inhibe la migración de los macrófagos <i>in vitro</i>
1969	Definición de linfoquinas y monoquinas. Terminología inexacta.
1974	Se acuñó el término de citoquina.
1979	Definición de interleuquinas, IL-1 e IL-2.
Principios de 1980	Purificación de citoquinas por métodos bioquímicos
1981	Se utilizó por primera vez una citoquina en clínica humana, IFN- α .
Mediados de 1980	Clonamiento mediante técnicas de biología molecular de las citoquinas.
1985	Se utilizó IL-2 en clínica humana.
1989	Clonamiento de MIF
1990	Se clonaron los receptores para varias citoquinas
1993	Mecanismos de transducción de señal de las citoquinas. Caracterización de PTK y STAT asociadas a las respuestas de las distintas citoquinas.

mecanismos de acción molecular han sido también ampliamente estudiados en los últimos años. En la mayor parte de las investigaciones se utiliza la citoquina recombinante la que, en general, muestra las mismas funciones que las citoquinas producidas en forma natural.

Las principales características de las citoquinas se muestran en la tabla 11-2.

Cuando se descubrieron las citoquinas se pensó que ellas estaban relacionadas únicamente con la comunicación entre los leucocitos y de allí que se les dio el nombre de **interleuquinas** para lo cual se utilizó la abreviatura IL seguida de un número (por ejemplo IL-1, IL-2, etc.). Pero luego se demostró que la función biológica de estos factores solubles afectaba a células de otros orígenes. Fue entonces que se acuñó el término más general de **citoquinas**. Sin embargo, no todas las citoquinas son denominadas según esta terminología y en muchos casos se utiliza más bien una abreviatura relacionada con la función de la molécula (por ejemplo, TNF significa factor de necrosis tumoral en inglés, primera función asociada a esta citoquina). Además existe una

categoría especial de citoquinas, las **quimioquinas**, las cuales tienen propiedades quimiotáticas hacia diferentes tipos celulares, y poseen características especiales que las distinguen de las citoquinas. Por esta razón, y por la relevancia que ellas tienen actualmente, serán discutidas en una sección separada.

Las citoquinas son factores proteicos solubles, producidos transitoriamente frente a un estímulo. La producción de citoquinas es controlada a nivel transcripcional y existe un segundo nivel de control dado por la inestabilidad de los mRNA. La acción de las citoquinas es local, pudiendo en algunos casos, ejercer su función sobre la misma célula productora de la citoquina (**actividad autocrina**) o sobre células vecinas (**actividad paracrina**). En algunos casos pueden tener **actividad endocrina** cuando son producidas en grandes cantidades y pasan a la circulación.

En general, las citoquinas se encuentran en estado de monómeros, pero en algunos casos la forma activa está conformada por dímeros o trímeros de la misma molécula. Esta característica de las citoquinas es importante, ya que se piensa

Tabla 11-2. Características de las citoquinas

Citoquina	Tamaño	Fuente	Célula Blanco	Efecto sobre cada célula blanco	Bioensayo
IL-1- IL-1-	17-18 kDa	Monocitos/macrófagos, células de Langerhans, dendríticas, linfocitos T, B, NK, LGL, endoteliales, músculo, fibroblastos, epitelio tímico, astrocitos, microglia, glioma, keratinocitos.	Timocito Endotelial Hipotálamo Hígado Músculo	Coestimulador Activación, inflamación, coagulación Fiebre Proteínas fase aguda Catabolismo	Activación de timocitos o líneas celulares T. Inducción de PGE2 en fibroblastos.
IL-2	14-17 kDa	Linfocitos T	Linfocitos T NK Linfocitos B	Proliferación, producción de citoquinas Proliferación, activación Proliferación, síntesis de anticuerpos	Proliferación de linfocitos T activados, de líneas celulares dependientes de IL-2 o de linfocitos B coestimulados con anti-IgM.
IL-3	14-30 kDa	Linfocitos T	Progenitores hematopoyéticos: Linfocitos B Monocitos	Proliferación y diferenciación. Proliferación Activación	Proliferación de líneas celulares humanas TF-1, MO7e o AML-193. Estimulación de colonias eritroides, granuloides y mieloides en médula ósea.
IL-4	15-19 kDa	Linfocitos Th2 CD4+, algunas T CD8+, mastocitos, estroma de médula ósea.	Linfocitos B Linfocitos T	Cambio de clase de Ig a IgE, aumento MHC-II. Proliferación y diferenciación.	Proliferación de células T activadas con PHA, en presencia de anti-IL-2 o anti-IL-2R.

IL	Receptor	CD	Localización	Indicadores de activación	Indicadores de diferenciación	Indicadores de proliferación
IL-5	40-50 kDa	Linfocitos Th2 CD4+, mastocitos y eosinófilos.	Macrófagos Endoteliales Mastocitos	Estimula la expresión de moléculas de adhesión. Proliferación	Proliferación, diferenciación y activación En ratón, coestimulador de proliferación de linfocitos B activados. Aumenta la síntesis de IgA en linfocitos B maduros.	Diferenciación de eosinófilos. Proliferación de TF-1.
IL-6	22-29 kDa	Linfocitos T y B, macrófagos, estroma de médula ósea, fibroblastos, keratinocitos, astrocitos, endoteliales.	Timocitos Linfocitos B maduros Hígado	Coestimulador Proliferación Proteínas fase aguda		Proliferación de línea celular B9. Aumento de la secreción de Ig en líneas B linfoblastoides.
IL-7	20-28 kDa	Células del estroma de médula ósea, timo o bazo. Fibroblastos.	Progenitores de linfocitos B. Linfocitos T maduros	Proliferación y diferenciación Proliferación y diferenciación		Proliferación de precursores de linfocitos B.
IL-8	6-8 kDa	Monocitos, linfocitos, granulocitos, fibroblastos, endoteliales, epiteliales, keratinocitos, hepatocitos.	Leucocitos	Quimiotaxis y activación		Quimiotaxis o activación de neutrófilos
IL-9	30-40 kDa	Linfocitos Th2 activados por IL-2, linfoma de Hodgkin's.	Linfocitos T Mastocitos Precursores eritroides	Proliferación Proliferación Proliferación		Proliferación de líneas T linfoblastoides humanas estimuladas con PHA e IL-4.
IL-10	17-40 kDa	Th0 y Th2 murinas, linfocitos T CD4+ y CD8+ humanos, linfocitos B Ly-1+ murinos, monocitos,	Macrófagos	Inhibe la producción de citoquinas. Inhibe expresión de MHC-II.		Inhibición de la síntesis de IFN- γ por clones Th1 activados con mitógenos o antígeno o por



		macrófagos, keratinocitos.	Linfocitos B Timocitos Mastocitos	Proliferación y activación Proliferación Proliferación	células mononucleares de sangre periférica activadas. Proliferación de línea celular mastocítica MC/9 murina
IL-11	23 kDa	Fibroblastos estimulados con IL-1, líneas celulares de estroma de médula ósea.	Progenitores hematopoyéticos multipotencial, progenitores de megacariocitos y macrófagos. Plasmocitomas. Pre-adipocitos	Proliferación	Proliferación de plasmocitomas murinos dependientes de IL-6, tal como T1165.
IL-12	Heterodímero formado por 2 cadenas de 35 y 40 kDa.	Macrófagos, linfocitos B y líneas celulares B linfoblastoides.	Linfocitos T NK LTh1	Induce producción de IFN- γ Coestimulador de la proliferación. Induce producción de IFN- γ Aumenta la actividad NK y ADCC. Estimula la proliferación y diferenciación.	Estimulación de la producción de IFN- por células de bazo.
IL-13	17 kDa	Linfocitos T activados	Linfocitos B	Promueve la proliferación en combinación con anti-Ig o anti-CD40. Estimula la secreción de IgM, IgE e IgG4. Aumenta la expresión de CD23. Prolonga la sobrevida. Aumenta la expresión de MHC-II y CD23.	Proliferación de células B humanas co-estimuladas con anti-IgM o anti-CD40
IL-14	60 kDa	Linfocitos T y tumores de células B.	Monocitos Linfocitos B activados	Estimula la proliferación. Inhibe la síntesis de Ig.	Proliferación de linfocitos B activados con <i>Staphylococcus aureus</i> .



IL-15	14-15 kDa	Monocitos y células epiteliales. El mRNA es encontrado en una amplia variedad de tipos celulares.	Linfocitos T LAK	Proliferación de CTL. Generación de linfocitos T citotóxicos específicos. Estimulación de la proliferación.	Proliferación de linfocitos T activados.
IL-16	16-17 kDa	Linfocitos T	Linfocitos T CD4+ Monocitos Eosinófilos activados	Quimiotaxis. Aumento expresión de IL-2R y MHC-II. Quimiotaxis Quimiotaxis	Quimiotaxis de linfocitos T CD4+.
IL-17	15 kDa	LT activador	Estroma de médula ósea, células endoteliales y fibroblastos	Induce producción de IL-6, IL-8, G-CSF y PGE2	
GM-CSF	22 kDa	Linfocitos T, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales	Progenitores hematopoyéticos Granulocitos Monocitos Endoteliales Eritrocitos Megacariocitos Linfocitos T	Proliferación y sobrevida Diferenciación y activación Diferenciación y activación Proliferación Proliferación Proliferación Proliferación	No existe un bioensayo específico. La formación de colonias en agar blando con líneas celulares provee una estimación de la actividad.
G-CSF	21 kDa	Macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, estroma de médula ósea.	Precursores de neutrófilos. Progenitores hematopoyéticos Cél. Endoteliales	Proliferación, diferenciación y activación. Estimular la proliferación, en sinergia con IL-3 Proliferación y migración.	Formación de colonias en agar blando a partir de médula ósea.
M-CSF	45-90 kDa	Múltiple incluyendo linfocitos, monocitos, fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, mioblastos y osteoblastos.	Progenitores de macrófagos y macrófagos	Factor de sobrevida, proliferación, diferenciación y activación.	Formación de colonias en agar blando a partir de médula ósea.



SCF (kit ligand)	28-36 kDa	Estroma de médula ósea, hígado, cerebro, riñón, pulmón, placenta, fibroblastos, oocitos, testículos.	Mastocitos Progenitores hematopoyéticos Gónadas Precursores mieloides y linfoides	Proliferación Desarrollo Desarrollo Desarrollo	Actúa en sinergia con factores estimuladores de colonias en ensayos realizados en agar blando a partir de células de la médula ósea.
IFN- α	16-27 kDa	Linfocitos, monocitos y macrófagos	Múltiples tipos celulares	Resistencia a virus Inhibición de la proliferación Aumento de MHC-I	Inhibición del efecto citopático de EMCV, VSV o SFV en líneas celulares epiteliales o en la línea celular L929 de ratón. Inhibición de la proliferación en DAUDI.
IFN- β	20-26 kDa	Fibroblastos y células epiteliales	Múltiples tipos celulares	Resistencia a virus Inhibición de la proliferación Aumento de MHC-I	Inhibición del efecto citopático de EMCV, VSV o SFV en líneas celulares epiteliales o en la línea celular L929 de ratón. Inhibición de la proliferación en DAUDI.
IFN- γ	20-25 kDa	Linfocitos T y NK	Linfocitos T y B, macrófagos y NK. Endoteliales Fibroblastos Múltiples tipos celulares	Activación, proliferación y diferenciación Proliferación Proliferación Resistencia a virus, inhibición de la proliferación, aumento de MHC-I y MHC-II.	Inhibición del efecto citopático de EMCV, VSV o SFV en líneas celulares epiteliales o en la línea celular L929 de ratón. Inhibición de la proliferación en DAUDI.
TNF- α	52 kDa	Monocitos y macrófagos activados, muchos otros tipos celulares incluyendo linfocitos T, B y fibroblastos	Múltiples tipos celulares	Mediador de respuestas inflamatorias e inmunes. Regula la proliferación y diferenciación. Citotóxico para células tumorales.	Citotoxicidad en la línea celular de ratón.L929.



TNF- β (Linfotaxina)	25 kDa	Linfocitos T y B activados	Múltiples tipos celulares	Mediador de respuestas inflamatorias e inmunes. Regula la proliferación y diferenciación. Citotóxico para células tumorales.	Citotoxicidad en la línea celular de ratón L929.
EGF	6 kD	Células ectodérmicas, monocitos, riñón, glándulas duodenales	Células epiteliales	Estimula proliferación	Proliferación de la línea de carcinoma A431
MIP-1 ^a	8 kDa	Linfocitos T y B, células de Langerhan, neutrófilos y macrófagos	Linfocitos B, T, NK y eosinófilos Células troncales	Quimiotaxis Inhibición de la proliferación	Quimiotaxis para eosinófilos
MIP-1a	7.8 kDa	Linfocitos T, B y macrófagos	Leucocitos Células mieloides	Quimiotaxis Estimulación de la proliferación	Antagoniza los efectos de MIP-1a. Aumenta la formación de colonias hematopoyéticas junto con GM-CSF.
MCP-1	8-18 kDa	Monocitos, linfocitos T fibroblastos, células endoteliales, músculo liso y keratinocitos.	Monocitos Basófilos	Quimiotaxis y activación Activación	Quimiotaxis para monocitos o basófilos.
TGF-	25 kDa	Plaquetas y la mayor parte de las células nucleadas	Múltiples tipos celulares	Inhibición de la proliferación	Inhibición del crecimiento de la línea celular MV-1-Lu.



que la forma activa u oligomérica de las citoquinas induce la oligomerización del receptor, es decir, pone en contacto o aproxima las diferentes subunidades que conforman el receptor funcional. Este reordenamiento en la membrana celular produce la activación de proteínas que se encuentran en forma latente en el citoplasma, desencadenando una cascada de reacciones que lleva a los efectos que se les conoce a las citoquinas.

Las citoquinas son **pleiotrópicas** y **redundantes** lo que quiere decir que una citoquina puede ejercer una actividad funcional sobre varios tipos celulares y que una determinada función puede ser realizada por diferentes citoquinas, respectivamente. Las citoquinas en general son producidas por una gran variedad de células, como es el caso de la IL-1 la cual es producida por todas las células nucleadas. Por otra parte, los linfocitos T y los macrófagos son las células que producen la mayor diversidad de citoquinas, aunque casi cualquier célula es capaz de producir citoquinas ante determinados estímulos.

La producción de una citoquina desencadena variadas reacciones. Induce la secreción de al menos otra citoquina, puede suprimir la actividad de otras citoquinas o bien puede inducir una cascada de citoquinas. La cantidad de citoquina producida tiene relación con la actividad biológica de ella misma. A menudo, las citoquinas actúan en sinergia o en forma antagónica. Por otra parte, una citoquina puede inducir la expresión de su propio receptor en la célula que la está secretando o en células vecinas, o bien puede inducir la expresión de un receptor para otra citoquina. Las propiedades de las citoquinas demuestran que existe una red de interacciones celulares muy compleja y difícil de estudiar en los organismos vivos. Por esta razón, y a pesar de tener una enorme cantidad de conocimientos acerca de una citoquina particular, su utilización terapéutica es hoy en día muy limitada.

3. RECEPTORES DE LAS CITOQUINAS Y MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

3.1. Receptores de citoquinas

La comprensión del mecanismo de acción de las citoquinas ha avanzado gracias al conocimiento que se ha adquirido de los receptores de éstas, los cuales son responsables de transmitir la señal

extracelular enviada por el ligando hacia el interior de la célula. La tabla 11-3 muestra las características de los receptores para las principales citoquinas, así como las tirosinas kinasas que se activan por efecto de la unión del ligando al receptor, y los estimuladores y activadores de la transcripción asociados a esta reacción.

Los receptores para las citoquinas son proteínas de transmembrana altamente específicos, siendo en su mayor parte, específicos para una especie (figura 11-1). Es sorprendente el hecho de que jamás se haya podido demostrar que una citoquina determinada sea capaz de inhibir la unión de otra citoquina a su receptor. La especificidad de especie que se le atribuye a las citoquinas podría explicarse a nivel de unión a su receptor.

La interacción entre la citoquina y su receptor es de gran afinidad, con constantes de disociación cercanas a 10^{-11} M/L. Las células pueden presentar en su superficie receptores para varias citoquinas siendo su número muy bajo, entre 100 a 1.000 receptores por célula. Sin embargo se necesita que sólo una fracción de los receptores sea ocupada para ejercer una máxima actividad biológica. El receptor funcional de una citoquina está, generalmente, formado por la subunidad que une la citoquina y una o más subunidades diferentes más bien relacionadas con la transducción de la señal. Los receptores de las citoquinas han sido clasificados en familias de acuerdo a homologías estructurales, a la presencia de ciertos dominios conservados, o a homologías funcionales. A estas superfamilias pertenecen también proteínas que no son, necesariamente, receptores para citoquinas:

Familia de receptores hematopoyéticos. La familia más numerosa es la de los receptores hematopoyéticos o receptores de tipo I, que contienen en su secuencia primaria de aminoácidos el motivo WSXWS en la región extracelular además de 2 dominios extracelulares con cisteínas conservadas. Esta familia incluye las cadenas β y γ de IL-2R, IL-4R, las cadenas α y β de IL-3R, las cadenas α y β de IL-5R, IL-6R, gp130, IL-9R, IL-12R, G-CSFR ("Granulocyte Colony Stimulating Factor Receptor"), GM-CSFR ("Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor"), CNTFR, LIFR, EpoR ("Erythropoietin Receptor"), PRLR ("Prolactin Receptor") y GHR ("Growth Hormone Receptor"). La señalización a través de este tipo de receptores no está bien definida aunque se han descrito la fosforilación



Tabla 11-3. Receptores, tirosinas kinasa y proteínas STATs activadas por las citoquinas

Citoquina	Receptor	JAKs acopladas a los diferentes receptores	STATs implicadas en la transducción de la señal
IL-1- α IL-1-b	2 receptores Tipo I: 80 kDa (CDw121a) Tipo II: 60 kDa (CDw121b)		
IL-2	Complejo formado de 3 cadenas. Cadena- α : 55 kDa (CD25, Tac) Cadena- β : 75 kDa (CD122) Cadena- γ : 64 kDa (conocida como γ c)	JAK1, JAK3	STAT3, STATX
IL-3	Complejo formado de 2 cadenas. Cadena- α : 60-70 kDa CD123) Cadena- β : 110-140 kDa (KH97 en humanos, AIC2A o AIC2B en ratón)	JAK2	STAT5
IL-4	Complejo formado de al menos 2 cadenas. Cadena- α : 140 kDa (CD124) Cadena- γ : 64 kDa (conocida como γ c)	JAK1, JAK3	IL4-STAT
IL-5	Complejo formado de 2 cadenas. Cadena- α : 60 kDa (CD125) Cadena- β : 110-140 kDa (KH97 en humanos, AIC2A o AIC2B en ratón)	JAK2	STAT5
IL-6	Complejo formado de 2 cadenas. Cadena- α : 80 kDa (CD126) Cadena- β : 130 kDa (gp130)	JAK1, JAK2, TYK2	STAT1 α (IL-6), STAT3
IL-7	Complejo formado de al menos 2 cadenas. Cadena- α : 68 kDa (CD127) Cadena- γ : 64 kDa (conocida como γ c)		
IL-9	Una sola cadena de 64 kDa Es probable que esté asociada a la cadena-g de 64 kD de IL-2R conocida como γ c.	JAK1, JAK2, TYK2	STAT1 α , STATX
IL-10	Una sola cadena de 90-110 kDa.	TYK2, JAK1	STAT1 α , STAT3
IL-11	Una sola cadena de 90-151 kDa.		
IL-12	Una sola cadena de 180 kDa. Probablemente esta cadena esté asociada a una componente relacionada a gp130.	TYK2, JAK2	STAT4, STAT3
IL-13	Desconocido aún, pero probablemente comparta alguna componente con IL-4R.		
IL-14	Receptor formado por una sola cadena. Peso molecular desconocido.		
IL-15	Complejo formado de 3 cadenas. Cadena- α : desconocida, pero no es Tac. Cadena- β : 75 kDa (CD122) Cadena- γ : 64 kDa (conocida como γ c)	JAK1, JAK3	?



IL-16	Desconocido aún.		
GM-CSF	Complejo formado de 2 cadenas. Cadena- α : 80 kDa (CDw116) Cadena- β : 110-140 kDa (KH97 en humanos, AIC2A o AIC2B en ratón)	JAK2	STAT5
G-CSF	Una sola cadena de 150 kDa. El receptor humano tiene homología con la cadena gp130 del IL-6R.	JAK1	STAT3
M-CSF	Una sola cadena de 150-165 kDa (CD115). El receptor es idéntico al proto-oncogen c-fms. Receptor tiene actividad tirosina kinasa.	?	STAT1 α , STATX
SCF (c-kit ligand)	Formado de 1 cadena de 145-150 kDa (CD117). Conocido como c-kit. El receptor está estructuralmente relacionado al proto-oncogen c-fms Receptor tiene actividad tirosina kinasa.		
IFN- α/β	IFN- α/β R de 102 kDa que liga IFN- β e IFN- α .	JAK1, TYK2	STAT1 α , STAT1 β , STAT2
IFN- γ	Complejo formado de 2 cadenas IFN-gR de 90 kDa (CDw119) Cadena accesoria llamada AF-1 o cadena- β de IFN- γ R.	JAK2, JAK1	STAT1 α , STAT1 β , STAT3
TNF- α	Existen 2 receptores Tipo I de 55 kDa (CD120a) Tipo II de 75 kDa (CD120b) Ambos receptores ligan TNF- α y TNF- β .		
TNF- β LT	Mismo receptor que para TNF- α . Tipo I de 55 kDa (CD120 α) Tipo II de 75 kDa (CD120 β) Ambos receptores ligan TNF- α y TNF- β .		
EGF	Una sola cadena de 170 kDa. Receptor tiene actividad tirosina kinasa.	JAK1	STAT1 α , STAT3
TGF- β	Existen 3 receptores Tipo I, 53-68 kDa Tipo II, 65 kDa Tipo III, 250-350 kDa Tipo I y II tienen actividad tirosina kinasa		

en tirosinas y activación de varias proteínas celulares en respuesta a las citoquinas. Estos receptores no tienen actividad tirosina kinasa intrínseca por lo tanto se deben asociar directa o indirectamente con otras proteínas tirosina kinasas, las Janus kinasas (JAK), las cuales activan proteínas citoplasmáticas estimuladoras y

activadoras de la transcripción llamadas STATs (STAT1, STAT2, etc). Una vez que se produce la fosforilación de una o más STATs, éstas pueden formar dímeros u oligómeros para enseguida translocarse al núcleo de la célula y activar directa o indirectamente la transcripción. Otros substratos incluyen PI-3K, Raf-1 y src kinasas.

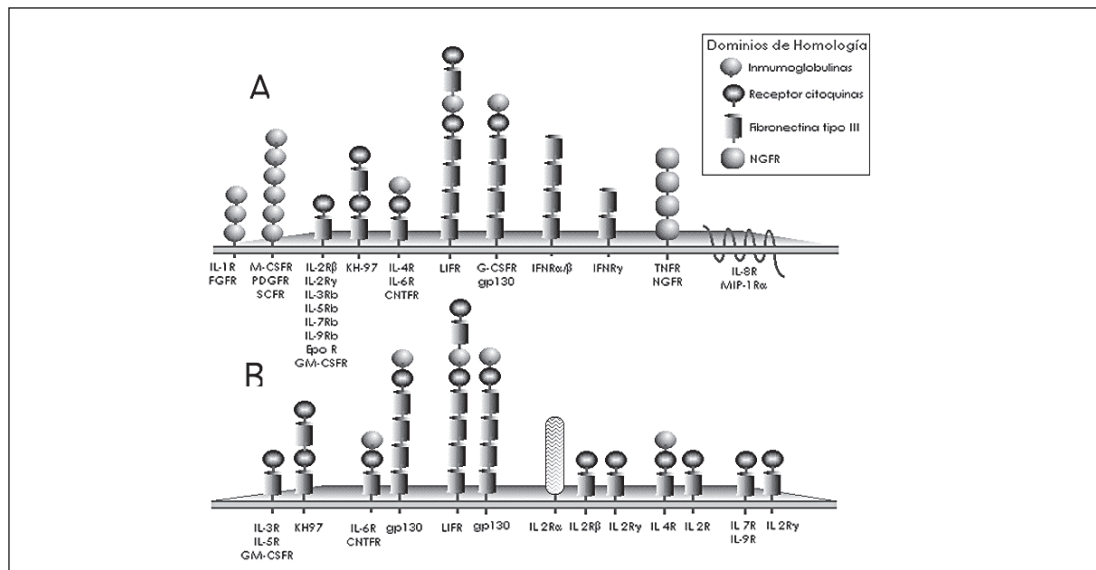


Figura 11-1. Receptores de citoquinas. Estos receptores son proteínas de transmembrana altamente específicos. (A) Se representa esquemáticamente algunos receptores de citoquinas, indicando en cada caso los diferentes tipos de dominios que presentan. (B) Estos receptores a menudo se asocian con una segunda proteína que les confiere funcionalidad. En algunos casos esta segunda proteína es compartida por varios receptores.

Familia de los receptores del tipo interferón.

Una familia propia de los receptores de las citoquinas es la familia de los receptores del tipo interferón (IFN) o de tipo II, entre los cuales se cuentan $\text{IFN}\alpha/\beta\text{R}$, $\text{IFN}\gamma\text{R}$ e IL-10R . La transducción de la señal por estos receptores involucra la fosforilación y activación de la familia de las kinasas JAK al igual que los de la familia de tipo I. Estos mecanismos han sido descritos con bastante precisión para los interferones, no así para IL-10 .

Superfamilia de las inmunoglobulinas. Otra familia de receptores es aquella que contiene dominios extracelulares del tipo de las inmunoglobulinas, a la cual pertenecen además varias proteínas que tienen un rol fundamental en la respuesta inmune y que no son receptores para citoquinas. Esta familia es caracterizada por una unidad estructural de alrededor de 100 aminoácidos con un puente disulfuro que le confiere un plegamiento característico de los dominios de las inmunoglobulinas. Los receptores de las citoquinas pueden contener uno o más de estos dominios. Entre los receptores para las citoquinas que pertenecen a esta familia se encuentran IL-1R , IL-6R , FGFR (“Fibroblast Growth Factor Receptor”), PDGFR (“Platelet Derived Growth Factor Receptor”), M-CSFR (“Macrophage Colony Stimulating Factor Recep-

tor”) y c-kit , también denominado SCFR (“Stem Cell Growth Factor Receptor”).

Familia con actividad tirosina kinasa intrínseca.

La familia de los receptores con actividad tirosina kinasa intrínseca la constituye EGFR (“Epidermal Growth Factor Receptor”), PDGFR , c-kit , M-CSFR y FGFR . El mecanismo de transducción de señal para estos receptores involucra la oligomerización inducida por la unión de la citoquina. Esta oligomerización produce autofosforilación del receptor, lo que a su vez lleva a la unión de otras proteínas que contienen dominios SH-2 (dominios src homólogos que se unen a tirosina fosforilada) y que están involucradas en la cascada de señales.

Receptores tipo TNF. Una última familia de receptores la constituyen los receptores del tipo TNF (“Tumor Necrosis Factor”), entre los cuales se cuentan NGFR (“Nerve Growth Factor Receptor”), TNFR-I (p55), TNFR-II (p75). Otras proteínas como Fas y CD40 (la proteína Fas juega un rol en la inducción de la apoptosis y CD40 está involucrado en la activación de los linfocitos B mediante contacto directo con el linfocito T) pertenecen a esta familia de receptores. Los miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de tres o cuatro motivos (dominios) de alrededor de 40 aminoácidos con predominancia



de cisteínas en la parte extracelular de la molécula. Los mecanismos de transducción de señales de esta familia llevan a la activación de la expresión génica o a la apoptosis. Estos dos mecanismos son mediados por adaptadores moleculares.

Tal como se ha mencionado, en numerosos casos los receptores de las citoquinas están formados por dos o tres subunidades, una de las cuales tiene por función unir la citoquina y las otras subunidades están encargadas de transmitir la señal hacia el interior de la célula. El receptor funcional y de alta afinidad lo constituye el complejo formado por las diferentes subunidades. En algunos casos la subunidad transductora de la señal puede ser compartida por los receptores de varias citoquinas como es el caso de la cadena γ del receptor de IL-2 que se une al receptor de IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15. Otro ejemplo es la cadena β de GM-CSF que se une al receptor de IL-3 e IL-5, y la subunidad gp130 que es compartida por IL-6R, CNTFR, LIFR ("Leukaemia Inhibitory Factor Receptor") y OSMR ("Oncostatin M Receptor"). Si consideramos además que la subunidad que comparten estos diferentes receptores es la proteína transductora de la señal, esto permitiría explicar por qué diferentes citoquinas son capaces de ejercer una misma función, es decir la "redundancia" de las citoquinas.

3.2. Transducción de señales

Por otra parte, últimamente se han descubierto formas solubles de muchos de los receptores de las citoquinas. Existen varias hipótesis respecto a la función de estos receptores solubles. Primero, los receptores solubles serían producidos por ruptura enzimática con lo cual impedirían que la citoquina pudiese efectuar su acción sobre la célula blanco. También los receptores solubles podrían encontrarse en el espacio extracelular y como tal competirían por la citoquina disponible actuando entonces como factores de regulación negativo. Sin embargo, los receptores solubles que se encontrarían en el espacio extracelular podrían tener como función estabilizar la citoquina en el lugar, en cuyo caso estarían más bien teniendo un efecto positivo sobre la acción de ésta. Una última hipótesis discutida en la literatura es que los receptores solubles se podrían ligar a proteínas de la superficie de una célula que normalmente no tiene receptor para la citoquina y de esta manera hacerla sensible a ésta.

La familia de receptores de las quimioquinas

será discutida más adelante separadamente ya que tiene características especiales que la distinguen de todas las citoquinas ya mencionadas.

Los mecanismos de transducción de señales de los receptores de tipo I y II han sido extensivamente estudiados y se ha demostrado que involucran las JAK kinasas y las proteínas STATs. Se ha demostrado directamente que la unión de una citoquina a su receptor induce la transcripción de genes específicos a través de la activación de las STATs. En la tabla 10-3 se muestran las kinasas y las STATs activadas por cada citoquina. Se observa que citoquinas que comparten la subunidad transductora de la señal, como es el caso de la IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15 para la cadena γ , esto lleva a que se activen en todos estos casos las mismas JAKs kinasas (JAK-1 y JAK-3), sin embargo existen diferencias en cuanto a las STATs que son activadas en cada caso. Al parecer son las STATs las que le dan la especificidad a las citoquinas. En este mismo sentido cabe notar que casi únicamente los ratones "knock out" para las subunidades comunes a varias citoquinas, las JAK kinasas o bien las STATs son indispensables haciendo la mutación letal.

4. PRINCIPALES ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LAS CITOQUINAS

Las citoquinas participan principalmente en la **respuesta inmune innata** y la **reacción inflamatoria**, en la **respuesta inmune específica** o **adquirida** y en la **hematopoyesis**. Estas actividades se manifiestan en la proliferación y diferenciación celular, la inducción de la síntesis de proteínas o de mRNA, su participación en la activación celular, su papel como factores quimiotácticos y también su participación en fenómenos como la apoptosis.

4.1. Inmunidad innata

Un organismo puede ser infectado por numerosos tipos de patógenos, para lo cual se requieren diferentes medios para su eliminación, además de diversos mecanismos efectores. Las células implicadas en la inmunidad innata o natural son capaces de desarrollar diferentes funciones y de discriminar en función del patógeno qué tipo de función efectora debe ser activada.

Por el contrario, las células de la inmunidad específica, los linfocitos, no presentan esta



especialización sino después de la etapa de activación. Los linfocitos vírgenes son, en este sentido, células pluripotentes, que pueden diferenciarse hacia distintos linajes dependiendo de las señales que provengan del medio ambiente. Estas señales son inducidas por el patógeno sobre las células efectoras de la inmunidad natural. Cada tipo de célula efectora una vez activada producirá diferentes citoquinas dependiendo de la naturaleza del patógeno. Estas citoquinas producidas tempranamente en la infección, determinan finalmente el tipo de respuesta del sistema inmune específico. Por lo tanto la inmunidad innata y específica están integradas en la respuesta inmune.

Dentro de la respuesta inmune innata consideraremos el efecto de las citoquinas en forma separada en la respuesta a patógenos de origen viral, recordando que la respuesta establecida y la producción de citoquinas tendrán consecuencias en la respuesta inmune específica así como en la hematopoyesis. Este último tópico, será tratado separadamente aunque está directamente involucrado en la respuesta inmune en su totalidad.

4.1.1. Inmunidad antiviral

Existen dos tipos de respuestas a la infección por un virus. En primer lugar se estimula la producción de interferones de tipo I, es decir $\text{INF-}\alpha$ o $\text{INF-}\beta$, los cuales tienen como función inhibir la replicación viral. Por otra parte, la infección viral provoca la activación de las células NK las cuales son capaces de matar una amplia variedad de células infectadas por virus. Los IFNs de tipo I aumentan además la actividad lítica de las células NK, las cuales pueden matar en forma más eficaz las células infectadas.

Existen al menos 20 genes para interferones de tipo α los cuales están localizados en una misma región en el cromosoma 21 en humanos. Las preparaciones naturales de $\text{INF-}\alpha$ comprenden una mezcla de éstos. Los macrófagos son las mejores células productoras de $\text{INF-}\alpha$ y por esto se lo llama interferón leucocitario. El $\text{INF-}\beta$ consiste de un único producto génico, localizado en la misma región cromosómica del $\text{INF-}\alpha$. Estos dos tipos de interferones presentan muy poca homología estructural, sin embargo se unen al mismo receptor celular.

Los interferones inducen diversos efectos sobre las células. Primero, inhiben la replicación del RNA o DNA viral mediante la síntesis de varias

enzimas, entre las cuales la 2'-5'oligoadenil sintetasa es la mejor estudiada. Esta acción de los interferones es paracrina, es decir, su acción se lleva a cabo en las células vecinas que no han sido infectadas. Este efecto es conocido como la inducción del estado antiviral en el cual la proliferación celular es inhibida. Los interferones de tipo I aumentan la expresión de las moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC clase I) e inhiben la expresión de las moléculas MHC clase II. Ya que los linfocitos citotóxicos (LTC) reconocen los antígenos en función de las moléculas MHC clase I, la acción de este tipo de interferón favorece el desarrollo de una respuesta inmune específica celular de tipo Th1.

4.1.2. Citoquinas e inflamación

La inflamación es una respuesta fisiológica normal al daño, ya sea mecánico o infeccioso. En las primeras etapas se encuentra localizada, pero luego puede desarrollarse una respuesta sistémica. Las principales alteraciones observadas son: coagulación, exudación plasmática, activación del sistema del complemento, diapedesis y migración leucocitaria, activación de células mononucleares y polimorfonucleares y producción de mediadores solubles, entre ellos citoquinas.

Todos los procesos inflamatorios, ya sean de origen inmune u otro, llevan consigo la activación de macrófagos residentes y la infiltración de leucocitos desde la sangre. La activación induce cambios en las células entre los cuales se incluyen la producción de citoquinas. Determinadas citoquinas originan directa o indirectamente la cascada de eventos que genera otros mediadores esenciales en la respuesta inflamatoria.

De las numerosas citoquinas presentes en el sitio de la inflamación, dos de ellas, IL-1 y $\text{TNF-}\alpha$ ("Tumor Necrosis Factor- α "), juegan un papel fundamental. Algunas de sus acciones sobre diversos tipos celulares son: la producción de mediadores lipídicos, enzimas proteolíticas y radicales libres, todos elementos involucrados en el daño observado. IL-1 y $\text{TNF-}\alpha$ ejercen su actividad citotóxica sobre tejidos como el endotelio vascular, el cartílago, los huesos, músculos y las células de los islotes de Langerhans. Otras citoquinas, tales como el $\text{INF-}\gamma$, IL-3 o GM-CSF, que pueden ser producidas por otras células presentes o atraídas al sitio de la inflamación, las cuales actúan amplificando la respuesta inflamatoria y aumentando la producción



de IL-1 y TNF- α por los macrófagos.

Las citoquinas producidas en el sitio de la inflamación participan directamente en el reclutamiento de leucocitos en el foco inflamatorio. Este efecto es mediado por la producción de quimioquinas, tales como IL-8 y MCP-1 ("Monocyte Chemoattractant Protein"). Además, en células endoteliales, IL-1, TNF- α e IFN- γ , inducen la expresión de moléculas de adhesión tales como ICAM-1 ("Intercellular Adhesion Molecule 1") y VCAM ("Vascular Cell Adhesion Molecule") participando de esta manera directamente en la adherencia de células sanguíneas. Por otra parte, IL-1, TNF- α e IL-8 alteran la permeabilidad vascular y permiten una extravasación de proteínas plasmáticas.

La IL-6, muy abundante en los procesos inflamatorios, induce la producción de las proteínas de fase aguda en los hepatocitos y la respuesta febril junto a IL-1 y TNF- α . Lo mismo ocurre con IL-11 y LIF. La reacción inflamatoria es inhibida por varias citoquinas antiinflamatorias, entre las cuales se encuentran TGF- β ("Transforming Growth Factor beta"), IL-4 e IL-10 que inhiben la producción de IL-1 y de TNF- α . Los glucocorticoides tienen igualmente esta capacidad y son producidos por una cascada de eventos iniciada por IL-1, TNF- α e IL-6 a través del sistema o eje neuro-endocrino. La noción de red de citoquinas se ilustra perfectamente con la participación de estos mediadores en la reacción inflamatoria.

Las prostaglandinas inducidas por IL-1 y TNF- α causan muchos de los efectos observados en la inflamación. Diversos tipos celulares pueden producir prostaglandinas (siendo PGE-2 la más importante) en respuesta a IL-1 y TNF- α . Otro mediador lipídico que se produce en la inflamación es el factor activador de plaquetas (PAF) que junto con las prostaglandinas aumentan la permeabilidad vascular inducida por IL-1.

La producción de radicales libres, principalmente óxido nítrico (NO), es altamente eficiente en la eliminación de microorganismos. Sin embargo, el estrés oxidativo provocado por los radicales libres, daña numerosas células. La producción de NO es inducida fuertemente a través de IL-1 y TNF- α en células endoteliales, monocitos/macrófagos y fibroblastos.

En resumen, IL-1 y TNF- α tienen tanto efectos beneficiosos como dañinos para el organismo. Entre estos últimos tenemos las lesiones vasculares, la degradación del cartílago,

osteólisis, proteólisis y citotoxicidad sobre células β de los islotes de Langerhans. También ejercen un fuerte efecto en el sistema nervioso central, induciendo fiebre, somnolencia y la producción de glucocorticoides.

4.2. Citoquinas y respuesta inmune

Las citoquinas regulan una gran variedad de respuestas inmunes, estimulando o inhibiendo el crecimiento y la diferenciación de las células que componen el sistema inmune. Las citoquinas seleccionan el tipo de respuesta inmune y también los mecanismos efectores. Las respuestas inmunes mediadas por células involucran la activación de macrófagos, linfocitos T "helper" (CD4+) y linfocitos T citotóxicos (CD8+). Los linfocitos T, B y los macrófagos responden a la estimulación antigénica produciendo una variedad de citoquinas las cuales pueden estimular o inhibir células efectoras de la respuesta inmune. Los linfocitos B se activan y producen inmunoglobulinas dependiendo de las señales que reciben de las células Th. Los linfocitos B pueden producir distintas clases de inmunoglobulinas con diferentes afinidades dependiendo de las citoquinas que ellos encuentren. La activación de los linfocitos T y B lleva al desarrollo de la memoria inmunológica T y B, lo que le da al sistema inmune la capacidad de responder de manera más rápida y eficaz frente a un estímulo posterior. Se establece así una red de complejas interacciones que determina la respuesta global frente a un estímulo.

4.2.1. Citoquinas y diferenciación de células linfoides

En un estado temprano del desarrollo en el timo, algunas citoquinas entre las cuales se incluyen SCF ("Stem Cell Factor"), IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7 y TNF- α , pueden jugar un papel importante en la diferenciación de los linfocitos T. Las células que conforman el estroma tímico interactúan con los timocitos en los diferentes estados de desarrollo y regulan la producción de citoquinas de todo el sistema. La combinación de SCF, IL-3, IL-6 e IL-7 mantienen el crecimiento de las células troncales hematopoyéticas provenientes de la médula ósea. Los precursores tímicos linfoides expresan el receptor para SCF (CD117), y la expresión de CD117 se correlaciona negativamente con la



iniciación del reordenamiento de la cadena β del TCR. La respuesta proliferativa temprana de los timocitos a SCF se ve aumentada por la presencia de IL-7, citoquina que es producida por las células que conforman el estroma. IL-1 e IL-7, así como TNF- α , están involucradas en la maduración de los precursores tempranos de los timocitos CD3-CD4-CD8- hacia el estado de células pro-T que luego pueden dar origen a linfocitos T funcionalmente competentes. IL-2 induce el receptor de alta afinidad para IL-2 en forma autocrina en los timocitos y regula la fase proliferativa temprana permitiendo el pasaje de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. IL-2 participa además en la posterior diferenciación de las células T. El estudio de los receptores para las citoquinas en los timocitos, demostró que los receptores para IL-1, IL-2 e IL-4 están regulados en el desarrollo y que su expresión está coordinada con la producción de IL-1 por las células estromales y la producción de IL-2 e IL-4 por los timocitos.

Finalmente, las citoquinas influyen también el reordenamiento del receptor de los linfocitos T (TCR).

4.2.2. Células Th1 y Th2

Polarización de las células T "helper"

Los linfocitos T maduros producen citoquinas en respuesta a una estimulación antigénica. La producción de citoquinas por los linfocitos T activados depende de las señales que recibe del microambiente constituido por las células presentadoras de antígeno (CPA) y células accesorias de la respuesta inmune. En ratón y humanos, estudios realizados con clones de células Th (CD4+) han demostrado la existencia de al menos 2 subpoblaciones de células Th: Th1 y Th2. Estas subpoblaciones difieren en el espectro de citoquinas que ellas secretan una vez que son activadas: Los linfocitos **LTh1** secretan IL-2, IFN- γ , TNF- β y los **Th2** secretan IL-4, IL-5, IL-10. Se ha demostrado además que las células T CD8+ y algunas células T $\gamma\delta$ tienen patrones de secreción de citoquinas similares a Th1 y Th2, aunque no secretan IL-2.

La polarización de los linfocitos T se debe a una secreción temprana de citoquinas por células que participan probablemente en la inmunidad natural, como son macrófagos, células NK y en algunos casos incluso células epiteliales. La

secreción de citoquinas por estas células accesorias depende de la naturaleza del antígeno, de la vía de introducción del antígeno así como de la concentración del antígeno. IL-12, IFN- γ e IL-4 juegan un papel crítico en la diferenciación hacia una u otra subpoblación de linfocito Th. Hasta hace poco se pensaba que los macrófagos, las células T NK1.1+ y los mastocitos eran los responsables de la producción temprana de estas citoquinas. Sin embargo, eosinófilos, neutrófilos, células epiteliales, células dendríticas y keranocitos producen y pueden guardar grandes cantidades de éstas y otras citoquinas en función del estímulo que ellas reciben.

No se conocen aún marcadores de superficie específicos de Th1 o Th2, aunque la molécula CD30 es un buen candidato para las células Th2. Las células Th1 y Th2 tienen diferentes requerimientos para la proliferación y activación. Las células Th1 usan IL-2 como factor de crecimiento autocrino y casi no responden a IL-4. Las células Th2 usan IL-4 como factor de crecimiento autocrino pero también proliferan en respuesta a IL-2. Las células Th2 pueden ser activadas en ausencia de CPA por anticuerpos dirigidos contra TCR/CD3, pero necesitan IL-1 como coestímulo para proliferar. La IL-1 regula positivamente la producción de IL-4, así como la expresión del IL-2R. Se desconoce si aumenta la expresión del IL-4R. Aparentemente IL-4 aumenta la expresión del IL-1R. Se puede concluir de esto último que IL-1 e IL-4 son interdependientes. Las células Th1 no requieren IL-1 como coestímulo para su proliferación y no expresan el receptor para esta citoquina.

Las células Th1 y Th2 regulan mutuamente su actividad a través de la producción de citoquinas inhibitorias de la proliferación de una u otra subpoblación. IFN- γ e IL-4 son antagónicas en el desarrollo de células Th2 o Th1, respectivamente. Es así como, IFN- γ inhibe la proliferación de Th2, mientras que IL-10 inhibe la proliferación de Th1 mediante la inhibición de la producción de IFN- γ . Esta regulación puede ocurrir también a nivel de las células efectoras activadas por estas subpoblaciones. Por ejemplo, en la producción de diferentes isotipos de inmunoglobulinas, IL-4 induce la producción de IgE, mientras que IFN- γ induce la producción de IgG2a. De manera general Th1 regula negativamente la producción de anticuerpos inducida por las células Th2 en las células B.



Precusores de las células Th1 y Th2

Las células Th1 y Th2 derivan de una población Th0, capaz de secretar ambos patrones de citoquinas. Th0 puede representar un progenitor no comprometido con la capacidad de diferenciarse hacia una u otra población dependiendo de las señales que reciba del microambiente. Es posible postular que existen células T precomprometidas capaces de secretar ambos patrones de citoquinas, antes de desarrollarse en una célula comprometida hacia un determinado linaje T. Si esto fuera cierto, la activación policlonal de células T debería llevar a la producción del conjunto completo de citoquinas, pero en realidad sólo se encuentran grandes cantidades de IL-2. Esto implica que la célula T virgen, solamente es capaz de producir IL-2. En otros estudios en los cuales se activan las células T con formol miristato (PMA) y ionóforo de Ca, se demostró la producción de IL-2 e IL-4. La identidad de Th0 no está aún establecida.

Función de las células Th1 y Th2 *in vivo*

La activación de las células Th por interacción con un ligando, lleva a la célula Th en reposo a diferenciarse hacia algún subgrupo funcional caracterizado por el espectro de citoquinas que secretan. Las células Th1 secretan IL-2 e IFN- γ y activan los macrófagos y reacciones de hipersensibilidad retardada. Las células Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-10, las cuales son importantes para la producción de IgE, y suprimen la inmunidad mediada por células. Se ha postulado una tercera subpoblación de linfocitos Th, **Th3**, la cual secretaría principalmente TGF- β . En este último tiempo parece haberse encontrado finalmente las células T supresoras postuladas hace muchos años, actualmente llamadas **células T reguladoras**. Esta subpoblación tiene la característica de coexpresar CD4 y CD25 en forma endógena, y de secretar principalmente IL-10, una citoquina reconocidamente inhibitoria. Se mencionan aquí por su importancia aunque la caracterización es aún muy reciente. Las citoquinas que produce cada subpoblación actúan como factores de crecimiento autocrino.

No se sabe aún con certeza si estas poblaciones se desarrollan *in vivo*. Actualmente existen evidencias indirectas de estas subpoblaciones ya que estos estudios han sido

realizados en células activadas o en determinadas patologías. Algunas respuestas inmunes parecen ser dominadas por una u otra subpoblación, resultados inferidos a partir del espectro de citoquinas que se produce en una patología particular. Por ejemplo, la inmunización con un antígeno en adjuvante de Freund completo, lleva a respuestas de tipo DTH (hipersensibilidad de tipo retardada) e involucran IFN- γ y anticuerpos, pero no del tipo IgE. El mismo antígeno adsorbido en alúmina provoca la producción de IgE y poca DTH. La infección de ratones con ciertos tipos de parásitos (Helmínticos) produce gran cantidad de IgE, eosinofilia y una reducida cantidad de IL-2 e IFN- γ . Por lo tanto se produce una respuesta selectiva de tipo Th2. La infección con bacterias activa una respuesta dominante de tipo Th1, con altos niveles de IgG2a.

Diferentes cepas de ratones pueden activar selectivamente una u otra respuesta contra un mismo antígeno. Ratones Balb/c infectados con *Leishmania mayor*, producen una enfermedad fatal la cual está dominada por altos niveles de IL-4. Este efecto se puede revertir si se les inyecta anticuerpos anti-IL-4 o transfiriendo células Th1. Sin embargo, C57Bl/6 produce una respuesta de tipo Th1 y elimina la infección. En general, agentes infecciosos intracelulares expanden células Th1, mientras que antígenos exógenos expanden respuestas de tipo Th2. No se sabe cuáles son los factores que activan una respuesta de tipo Th1 o Th2, pero estos hechos involucran además componentes genéticos.

Otro rol funcional asignado a las células Th1 y Th2 es su participación en el cambio de clase de inmunoglobulinas secretada por los linfocitos B. Esto último es importante, ya que el cambio de isotipo lleva a un cambio en la función efectora del anticuerpo producido, sin cambiar su especificidad por el antígeno. Las células Th1 regulan principalmente la producción de IgG2a por los linfocitos B, mientras que las células Th2 regulan la producción de IgE. Ambos tipos de células Th son capaces de regular la producción de IgM y de IgG3. Los linfocitos Th1 son células pobremente ayudadoras para los linfocitos B. Esto en parte debido a la producción de IFN- γ que inhibe la estimulación producida por IL-4, en particular para la producción de IgE. Estas células presentan también actividad citotóxica contra los linfocitos B presentadores de antígeno, de allí que aparezcan como células supresoras de un determinado isotipo de inmunoglobulina.



Subpoblaciones de linfocitos Th humanos

Los estudios realizados *in vitro* con clones de linfocitos T activados, no han permitido demostrar la existencia de patrones de secreción bien definidos. Los linfocitos Th humanos se parecen más a los linfocitos Th0 murinos. Clones de células T derivados de dadores reactivos a alergenitos o inmunizados con toxina tetánica, han demostrado la presencia de clones específicos para alergenitos selectivamente enriquecidos en células capaces de producir IL-4. La inmunización con toxina tetánica produce preferencialmente IL-2 e IFN- γ . Esto demuestra que la inmunización *in vivo* activa selectivamente subpoblaciones similares a las encontradas en el ratón. No ha sido posible actualmente diferenciar estas respuestas *in vitro* pero los estudios realizados *in vivo* permiten postular la existencia de estas subpoblaciones celulares en humanos.

4.2.3. Activación de linfocitos B

Los linfocitos B en reposo pueden ser activados de manera independiente o dependiente de los linfocitos T. En cualquiera de los casos, la presencia de determinadas citoquinas es indispensable. Las citoquinas tienen dos funciones principales en las respuestas mediadas por inmunoglobulinas: participan en las fases proliferativas y de diferenciación de los linfocitos B y promueven selectivamente el cambio de clase de las inmunoglobulinas ("switch" isotípico).

Numerosas citoquinas pueden estimular la proliferación de los linfocitos B. De las citoquinas producidas por los linfocitos Th, IL-2, IL-4 e IL-5 participan en la proliferación y además pueden actuar en sinergia para llevar a cabo este efecto. La IL-6, que es producida por varios tipos celulares participa en la proliferación de los linfocitos B ya diferenciados productores de anticuerpos (plasmocitos). IL-1, IL-10 y TNF estimulan su crecimiento *in vitro*. La redundancia de las citoquinas involucradas en la proliferación de los linfocitos B explica en parte por qué al bloquear la producción de una determinada citoquina, esto no tiene efecto en la producción de anticuerpos.

Las citoquinas participan directamente en la secreción de anticuerpos en respuesta a un antígeno. En el ratón ha sido demostrado que IL-4 e IL-5 participan en esta función. En humanos se ha podido demostrar que IL-2 e IL-6 aumentan la producción de anticuerpos. Probablemente todas estas citoquinas participan en ambos sistemas en

la producción de anticuerpos, sólo que el resultado está reflejando diferentes condiciones experimentales.

La función más específica de las citoquinas sobre los linfocitos B es su participación en el cambio de isotipo de la inmunoglobulina secretada. Los ejemplos más claros de esta función de las citoquinas son IL-4, la cual es absolutamente necesaria para la producción de IgE e IFN- γ que está implicado en la producción de IgG2a. TGF- β en conjunto con IL-5 participan en el cambio de isotipo a IgA.

La afinidad de las inmunoglobulinas secretadas por los linfocitos B depende también de las citoquinas presentes en el sitio donde se está llevando a cabo la reacción.

4.2.4. Respuesta inmune específica mediada por células

Los linfocitos T CD4+ y CD8+ activados secretan un grupo de citoquinas que sirven para activar células efectoras de la respuesta inmune no específica o natural. Estas citoquinas comprenden el interferón inmune o IFN- γ , TNF- β o linfoxina, IL-10, IL-5 e IL-12. Todas estas citoquinas producen la activación de numerosos tipos celulares entre los cuales los principales son macrófagos, células NK, linfocitos T y B, células endoteliales, neutrófilos y eosinófilos.

El IFN- γ es producido por los linfocitos T CD4+ del tipo Th1, T CD8+ y células NK. La producción de IFN- γ es producida como consecuencia inmediata de la activación de la respuesta inmune específica y es estimulada por IL-2 e IL-12. IFN- γ es el más potente activador de los macrófagos para matar microorganismos fagocitados. También activa macrófagos para matar células tumorales.

El IFN- γ actúa a nivel de la fase de reconocimiento en la respuesta inmune, mediante la estimulación de la síntesis de moléculas MHC de clase I y la inducción de la síntesis de moléculas MHC de clase II en numerosos tipos celulares que normalmente no las expresan. Por lo tanto, el IFN- γ es capaz de activar tanto células T CD4+ como T CD8+. Como ya se señaló, el IFN- γ promueve la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia el fenotipo Th1 e inhibe la proliferación de células Th2. La maduración de los linfocitos T CD8+ hacia LTc requiere de la presencia de IFN- γ . Como se vio anteriormente, el IFN- γ actúa sobre los linfocitos B estimulando el cambio de isotipo de



las inmunoglobulinas hacia IgG2a e Ig3, al mismo tiempo que inhibe el cambio a IgG1 e IgE. El IFN- γ estimula la actividad citotóxica de las células NK y activa los neutrófilos, aunque de manera menos eficaz que TNF- α o LT. El IFN- γ puede sinergizar la actividad de estas últimas citoquinas.

El IFN- γ estimula la síntesis de numerosas otras proteínas, entre otras, moléculas de adhesión en células endoteliales vasculares, lo que facilita la extravasación de linfocitos T CD4⁺. Todas estas acciones del IFN- γ conllevan a respuestas del tipo Th1 y estimulan la reacción inflamatoria.

La **linfotoxina (TNF- β)** es una citoquina que tiene un cierto grado de homología con TNF- α , pero a diferencia de TNF- α , es sintetizada exclusivamente por linfocitos T. La linfotoxina se une al mismo receptor que TNF- α , regulando en consecuencia los mismos tipos de reacciones. TNF- β es un potente activador de los neutrófilos, y por lo tanto se encuentra implicada en la reacción inflamatoria, y contribuye además a la lisis mediada por LTc de las células blanco. La linfotoxina, al igual que el IFN- γ , activa las células endoteliales aumentando la adhesión de leucocitos y la producción de citoquinas.

La **IL-10** es una citoquina que tiene más bien efectos inhibitorios sobre la respuesta inmune. Esta es producida por las células Th2 y varios otros tipos celulares. Las actividades más importantes de la IL-10 son la inhibición de las funciones accesorias del macrófago y la producción de citoquinas por éste. Estos efectos llevan a una inhibición de la reacción inflamatoria mediada por linfocitos T y a la estimulación de los linfocitos B. Un hecho sorprendente es que el virus Epstein-Barr posee en su genoma un gen homólogo a IL-10, lo cual podría significar que este virus adquirió este gen con el objeto de evadir la respuesta inmune.

La **IL-5** es una citoquina producida por linfocitos Th2 y mastocitos activados. Su principal acción es la de estimular la proliferación y diferenciación de eosinófilos de tal manera que ellos sean capaces de eliminar células infectadas con un determinado parásito. La IL-5 actúa en sinergia con IL-2 e IL-4 para estimular el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos B.

La **IL-12** tiene gran importancia en la respuesta inmune por las numerosas actividades biológicas en las cuales participa. El efecto global de la IL-12 está en la respuesta inmune mediada por células, debido a los efectos que tiene sobre las células NK y los linfocitos T. La IL-12 es el más potente estimulador de las células NK,

induciendo además la producción de IFN- γ por estas células. Para llevar a cabo estos efectos, la IL-12 puede actuar además en sinergia con IL-2 produciendo las denominadas células LAK ("Lymphokine Activated Killer Cells"). La diferenciación de las células Th1 es dependiente de la presencia de IL-12, la cual inhibe la proliferación de células de tipo Th2. Finalmente, la IL-12 estimula la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ a células T citotóxicas.

4.3. Citoquinas y hematopoyesis

Las células de la sangre que ayudan a mantener la funcionalidad del organismo, tienen una vida media limitada. Por lo tanto, estas células terminales deben ser reemplazadas. La producción de las células sanguíneas es un proceso dinámico finamente regulado a nivel celular e intracelular. La regulación involucra por una parte las células de la sangre y células accesorias, y por otra parte, las células que responden a la acción de las citoquinas. Entre las células accesorias, las cuales producen diferentes citoquinas, están linfocitos, monocitos, macrófagos, granulocitos, células NK, fibroblastos, células endoteliales, adipocitos, miocitos y células del estroma en general. Las células sobre las cuales van a actuar las citoquinas dependerán de la presencia en su superficie del receptor adecuado para la citoquina producida por la célula accesoria.

Actualmente se conocen más de 40 citoquinas, que tienen efecto sobre la hematopoyesis. Estas citoquinas tienen efectos estimulantes o supresores. Muchas de las citoquinas tienen actividad pleiotrópica, más que efectos específicos. A su vez, las citoquinas pueden ejercer un efecto directo o indirecto en la hematopoyesis.

Entre las acciones directas tenemos los efectos sobre las células troncales ("stem cells") y progenitoras de las células de la sangre. Las células troncales son células multipotenciales con capacidad de autorregenerarse. Dentro del compartimiento troncal existe una jerarquía. Las células más inmaduras tienen más capacidad de autorrenovarse y una mayor capacidad de proliferación mientras que las células más maduras tienen una capacidad limitada de autorrenovarse y son menos proliferativas, pero con mayor capacidad para diferenciarse.

Las células progenitoras hematopoyéticas pueden detectarse en ensayos de proliferación en



medio semisólido, por su capacidad formadora de colonias. Las células troncales se diferencian en una variedad de células, entre las cuales tenemos las CFU-GEMM (unidades formadoras de colonias granuloides, eritroides, mieloides y mielomonocíticas) y células con un linaje más restringido tales como CFU-GM (colonias mixtas granulocítica monocítica), CFU-G (granulocítica), CFU-M (monocítica), BFU-E (eritroides tempranas), CFU-E (eritroides más maduras) y BFU-MK (megacariocíticas) (ver capítulo 3). Este tipo de ensayo ha permitido definir solamente los progenitores mieloides. Los progenitores de las células linfoides han sido definidos mediante marcadores de superficie principalmente.

Las células troncales y progenitoras son muy escasas en la sangre, con frecuencias menores que 1/10.000; por lo tanto ha sido difícil demostrar un efecto directo de las citoquinas sobre estas células. Esto ha implicado tener que enriquecer o purificar una determinada población para un estudio posterior. Estas mismas técnicas se han aplicado en los trasplantes de médula ósea donde las células troncales juegan un papel fundamental.

Durante la ontogenia las células troncales se encuentran primero en el saco vitelino, luego en el hígado fetal, más tarde en el bazo fetal y finalmente en la médula ósea. Al nacimiento, la sangre que se encuentra en el cordón umbilical y la placenta tiene una alta concentración de células troncales. En el caso de los trasplantes de médula ósea, el número de células troncales que se trasplantan es muy importante, por lo tanto gracias a estos conocimientos se ha podido desarrollar la tecnología adecuada para realizar trasplantes alogénicos en casos de compatibilidad HLA, utilizando como fuente de células troncales la sangre de cordón umbilical. Debido al número de células troncales, este tipo de trasplante ha sido posible sólo en niños.

En adultos, la mayor fuente de células troncales es la médula ósea y ésta es la fuente usada de rutina en los trasplantes autólogos y alogénicos. La sangre también es una fuente de células progenitoras, pero antes de recolectar las células troncales es necesario movilizarlas hacia la periferia usando factores de crecimiento tales como GM-CSF, G-CSF, IL-3 o combinaciones de ellos. Sin embargo las citoquinas no sólo cumplen una función en los trasplantes sino también en la estimulación y supresión de la hematopoyesis en una situación determinada.

Finalmente, los factores de crecimiento

hematopoyético contribuyen a mantener un amplio rango de funciones fisiológicas. Por ejemplo, en conjunto con un antígeno específico presentado por la CPA, la IL-2 contribuye a la proliferación de linfocitos T y B, la cual en conjunto con IL-1 promueve la producción de células NK a partir de progenitores hematopoyéticos. La IL-2 e IFN- α promueven la maduración de los linfocitos B y actúan directamente en la estimulación de la producción de IFN- γ por los macrófagos y células NK, e igualmente aumentan la capacidad citotóxica de los macrófagos.

4.3.1. Factores estimuladores de colonias

Las citoquinas que estimulan la hematopoyesis son también responsables del desarrollo, mantención y activación funcional de las células efectoras de la respuesta inmune. Los linfocitos cumplen un papel fundamental en la respuesta inmune, pero son células tales como granulocitos, eosinófilos y otros que participan activamente en la primera línea de respuesta frente a la agresión causada por un agente patógeno o una agresión mecánica. Las principales citoquinas que estimulan la hematopoyesis son los diferentes "factores estimuladores de colonia", denominados por CSF antecedido por la inicial del tipo de células progenitoras sobre la cual actúa. Entre estos tenemos GM-CSF, G-CSF, M-CSF. Otras citoquinas como IL-3, IL-7, IL-12 y "c-kit ligand" o (SCF) tienen una función esencial en la hematopoyesis. Las acciones de estas citoquinas son influenciadas por otras citoquinas, algunas de las cuales como TNF- α , LT, IFN- γ y TGF- β , inhiben el crecimiento de los progenitores hematopoyéticos.

Las citoquinas que tienen un efecto estimulador directo en la proliferación de las células progenitoras mieloides son IL-3, GM-CSF, G-CSF, M-CSF e IL-5. La eritropoyetina (Epo) actúa sobre los progenitores eritroides. La IL-3 y el GM-CSF son citoquinas que actúan sobre los progenitores más tempranos, mientras que el G-CSF, M-CSF, Epo e IL-5 actúan sobre progenitores de linaje más restringido.

Todas estas citoquinas, a excepción de IL-5, han sido usadas en estudios clínicos en humanos y ellas han acelerado la recuperación de la hematopoyesis en una variedad de patologías. Sus efectos son dosis dependientes y su toxicidad es mínima.

Los factores estimuladores de colonias actúan en forma aditiva a sinérgica cuando se usan en



combinación. Esto ha llevado a producir citoquinas recombinantes a partir de proteínas de fusión entre diferentes citoquinas. Una de estas citoquinas, PIXY321, producida por la fusión de GM-CSF e IL-3 por técnicas de biología molecular, es 10 veces más activa que la combinación de las 2 citoquinas. Las razones de esta sinergia se desconocen.

Algunos de estos factores de crecimiento interactúan con componentes de la matrix extracelular para contribuir a la función de los progenitores o células efectoras.

El **GM-CSF** es producido por linfocitos T, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales. Esta citoquina es un factor de supervivencia y crecimiento para progenitores hematopoyéticos, así como para precursores más maduros tales como eritrocitos, linfocitos T, megacariocitos, e igualmente para células endoteliales. Esta citoquina es además un factor de diferenciación y activación para granulocitos y monocitos. Por otra parte, GM-CSF junto con G-CSF, IL-5 y M-CSF inducen la proliferación y diferenciación de precursores de neutrófilos, eosinófilos y monocitos respectivamente.

Es interesante notar que el receptor de GM-CSF, que es un complejo formado por una cadena α de baja afinidad unida a una cadena β , comparte esta última cadena con los receptores para la IL-3 e IL-5. Esta propiedad de los receptores podría explicar, en parte, que estas citoquinas posean funciones similares.

El **G-CSF** es producido por macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y células que conforman el estroma de la médula ósea. Este es un factor de crecimiento, diferenciación y activación de neutrófilos y sus precursores. Sinergiza con IL-3 para estimular el crecimiento de progenitores hematopoyéticos, y causa proliferación y migración de células endoteliales. El receptor de G-CSF está compuesto de una sola molécula con una estructura híbrida que contiene un dominio Ig, un dominio hematopoyetina y 3 dominios FNIII. Existen formas solubles del receptor.

El **M-CSF** es un factor de crecimiento, diferenciación y activación para macrófagos y sus células progenitoras. Este es producido por múltiples fuentes, incluyendo linfocitos monocitos, fibroblastos, células endoteliales, mioblastos y osteoblastos. Esta citoquina puede ser producida como una molécula soluble o una molécula de membrana.

4.3.2. Otras citoquinas estimuladoras de la hematopoyesis

Varias citoquinas que no tienen un efecto directo sobre las células troncales o progenitoras, pueden aumentar el efecto proliferativo de los factores estimuladores de colonias en combinación con ellos. Entre estas citoquinas tenemos: SCF, IL-1, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, LIF, MIP-1 α ("Macrophage Inflammatory Protein-1 α "), MIP-1 β ("Macrophage Inflammatory Protein-1 β ") y MIP-2 ("Macrophage Inflammatory Protein-2").

De todas estas citoquinas la que tiene el efecto más notable es **SCF**. Esta citoquina está presente de manera soluble o ligada a la membrana celular debido al procesamiento alternativo del mRNA. SCF soluble aumenta el número y el tamaño de CFU-GEMM, BFU-E, CFU-GM, CFU-G derivadas por estimulación con Epo o Epo más IL-3, GM-CSF o G-CSF. SCF actúa en sinergia con los factores estimuladores de colonias e IL-7. En estudios en animales, SCF ha sido asociado con aumento de la hematopoyesis (aumento de células troncales y progenitoras) en la médula ósea y movilización de células troncales hacia la sangre. El receptor para SCF es el proto-oncogen, c-kit, de ahí que SCF sea también conocido como "c-kit ligand", (ligando para c-kit) el cual está expresado en todos los progenitores hematopoyéticos excepto en precursores del linaje B. C-kit es una glicoproteína de membrana que consta de 5 dominios tipo inmunoglobulina y un dominio tirosina kinasa intracelular. El receptor funcional es probablemente un homodímero al igual que el SCF funcional.

La **IL-7** es producida por células estromales de la médula ósea y del timo. Ésta actúa como un factor de crecimiento para los progenitores de los linfocitos B y T, aunque también estimula el crecimiento de linfocitos T maduros.

La **IL-9** es una citoquina que aumenta la proliferación de los linfocitos T y de precursores eritroides aunque su función principal es estimular a los mastocitos. Esta citoquina es producida principalmente por linfocitos Th2 activados.

La **IL-11** es secretada por líneas celulares obtenidas de células estromales de médula ósea y actúa sobre células troncales multipotenciales y progenitores comprometidos hacia macrófagos y megacariocitos.

En un estudio reciente hecho *in vivo* en ratones, se demostró la capacidad de IL-12 para movilizar progenitores hematopoyéticos hacia la



sangre periférica, efecto que se produce en sinergia con otras citoquinas. La IL-12 es producida por macrófagos y linfocitos B. Esta citoquina aumenta la respuesta inmune mediada por células, mientras que suprime la respuesta humoral. Los numerosos efectos estimulatorios hacen pensar de que IL-12 podría ser beneficiosa en el tratamiento de neoplasias.

4.3.3. Citoquinas supresoras

Las citoquinas involucradas como moléculas supresoras de la hematopoyesis son: lactoferrina, la subunidad H de ferritina, las prostaglandinas E1 y E2, TNF- α , TNF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , inhibina y algunos miembros de la familia de las quimioquinas.

5. QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas corresponden a un grupo de pequeñas proteínas básicas (8-14 kDa), secretadas y estructuralmente relacionadas que fueron inicialmente descritas como moléculas inducidas por la inflamación y capaces de atraer monocitos, neutrófilos y linfocitos T activados. Posteriores investigaciones han mostrado que las quimioquinas cumplen un importante papel en la coordinación del tráfico linfocitario a través de todo el cuerpo durante la vigilancia inmune y en la dirección de complejos movimientos celulares durante el desarrollo y diferenciación de los linfocitos. Las quimioquinas también tienen efectos sobre células del sistema nervioso y el endotelio donde ejercen efectos angiogénicos. Dos propiedades generales caracterizan a estas moléculas: no son especie-específicas y son promiscuas en el uso de sus receptores. No obstante, también existen quimioquinas muy específicas. Hasta ahora se han descrito más de 50 quimioquinas y en algunos casos la misma molécula ha sido reportada con nombres diferentes contribuyendo a crear una cierta confusión en este campo. Por lo tanto, recientemente se ha planteado una nueva clasificación sistemática de las quimioquinas (tabla 11-3). Las quimioquinas se clasifican en cuatro familias de acuerdo al número y espaciamiento de los aminoácidos cisteínas localizados cerca de su extremo amino-terminal. La **familia CC** agrupa a las quimioquinas cuyas dos cisteínas se encuentran adyacentes, la **familia C** presenta una sola cisteína y las **familias CXC** y

CX₃C corresponden a quimioquinas cuyas cisteínas se encuentran separadas por uno o tres aminoácidos, respectivamente. Las quimioquinas actúan a través de su interacción con receptores que poseen siete dominios de transmembrana acoplados a la familia de proteínas G heterotriméricas y la transducción de la señal de quimiotaxis es mediada por la subunidad Gi sensible a la toxina de Pertussis. Los receptores de quimioquinas se denominan de la misma manera que los ligandos seguidos por la letra R y un número (CCR1-9, CXCR1-5, XCR1, etc). Según la nueva nomenclatura propuesta, las quimioquinas se designan con una letra L seguida por un número correspondiente al número del gen que codifica para esa quimioquina (tabla 11-3).

Probablemente la mayoría, si no todas, las quimioquinas se han originado por duplicación génica a partir de un gen ancestral. De hecho, los genes de muchas quimioquinas se encuentran agrupados en ciertas regiones cromosómicas. Un gran número de genes de quimioquinas CC humanas que tienen efectos sobre monocitos se encuentran agrupados en la región 17q11.2, mientras que los genes de quimioquinas CXC que actúan principalmente sobre neutrófilos se localizan en la región cromosómica 4q12-13. No obstante, recientemente se ha descrito que algunas quimioquinas CXC específicas para linfocitos T (CXCL9, CXCL10 y CXCL11) forman una nueva mini-agrupación génica separada de la principal agrupación 4q12-13. Esta diversificación reflejaría un cierto grado de especialización funcional desarrollado a través de la evolución. La duplicación génica de las quimioquinas explicaría su conservación entre las especies, la redundancia de sus funciones y la promiscuidad con que se unen a sus receptores. Es posible que esta multiplicidad de funciones haya surgido en respuesta a la necesidad de producir una gran cantidad de factores quimiotácticos que aseguraran el reclutamiento de diferentes tipos de leucocitos al sitio de la inflamación.

5.1. Quimioquinas en la diferenciación linfocitaria

En los órganos linfoides primarios (médula ósea para linfocitos B y el timo para linfocitos T) ocurre la diferenciación y maduración de los linfocitos a partir de una célula progenitora multipotencial (ver capítulos 3 y 13). Recientes estudios han mostrado que las células progenitoras



Tabla 11-3. Clasificación de las quimioquinas y sus receptores

Nombre sistemático	Ligando humano	Ligando murino	Receptores
Familia C			
XCL1	Linfotactina/SCM-1 α /ATAC	Linfotactina	XCR1
XCL2	SCM-1 β	desconocido	XCR1
Familia CX3C			
CX3CL1	Fractalquina	Neurotactina	CX3CR1
Familia CC			
CCL1	I-309	TCA-3, P500	CCR8
CCL2	MCP-1/MCAF	JE	CCR2
CCL3	MIP-1 α /LD78 α	MIP-1 α	CCR1, CCR5
CCL4	MIP-1 β	MIP-1 β	CCR5
CCL5	RANTES	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
CCL6	desconocido	C10, MRP-1	desconocido
CCL7	MCP-3	MARC	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP-2	MCP-2	CCR3
CCL9/10	desconocido	MRP-2, CCF18, MIP-1 γ	desconocido
CCL11	Eotaxina	Eotaxina	CCR3
CCL12	desconocido	MCP-5	CCR2
CCL13	MCP-4	Desconocido	CCR2, CCR3
CCL14	HCC-1	Desconocido	CCR1
CCL15	HCC-2/Lkn-1/MIP-1 γ	Desconocido	CCR1, CCR3
CCL16	HCC-4/LEC	LCC-1	CCR1
CCL17	TARC	TARC	CCR4
CCL18	DC-CK1/PARC AMAC-1	Desconocido	desconocido
CCL19	MIP-3 β /ELC/exodus-3	MIP-3 β /ELC/exodus-3	CCR7
CCL20	MIP-3 α /LARC/exodus-1	MIP-3 α /LARC/exodus-1	CCR6
CCL21	6Cquina/SLC/exodus-2	6Cquina/SLC/exodus-2/TCA-4	CCR7
CCL22	MDC/STCP-1	ABCD-1	CCR4
CCL23	MPIF-1	Desconocido	CCR1
CCL24	MPIF-2/Eotaxina-2	Desconocido	CCR3
CCL25	TECK	TECK	CCR9
CCL26	Eotaxina-3	Desconocido	CCR3
CCL27	CTACK/ILC	ALP/CTACK/ILC	CCR10
Familia CXC			
CXCL1	GRO α /MGSA- α	GRO/KC	CXCR2, CXCR1
CXCL2	GRO β /MGSA- β	GRO/KC	CXCR2
CXCL3	GRO γ /MGSA- γ	GRO/KC	CXCR2
CXCL4	PF4	PF4	Desconocido
CXCL5	ENA-78	LIX	CXCR2
CXCL6	GCP-2	Cka-3	CXCR1, CXCR2
CXCL7	NAP-2	Desconocido	CXCR2
CXCL8	IL-8	Desconocido	CXCR1, CXCR2
CXCL9	Mig	Mig	CXCR3
CXCL10	IP-10	IP-10	CXCR3
CXCL11	I-TAC	Desconocido	CXCR3
CXCL12	SDF-1 α / β	SDF-1	CXCR4
CXCL13	BLC/BCA-1	BLC/BCA-1	CXCR5
CXCL14	BRAK/bolequina	BRAK	Desconocido
CXCL15	Desconocido	Lungquina	Desconocido



hematopoyéticas (CPH) humanas expresan el receptor CXCR4 y que en experimentos *in vitro* son capaces de migrar y de inducir la expresión de moléculas de adhesión en respuesta a la quimioquina CXCL12. Esta quimioquina se ha detectado tempranamente en el hígado fetal murino durante la colonización de las CPH (día embrionario 10.5-12.5) y decae abruptamente cuando estas células migran desde el hígado hacia la médula ósea (día embrionario 14.5). A su vez, en la microvasculatura y en las células estromales de la médula ósea es posible detectar CXCL12. Experimentos genéticos han mostrado que ratones que no expresan el gen de CXCL12 o el receptor CXCR4 (CXCR4^{-/-}) mueren perinatalmente y presentan una mielopoyesis y linfopoyesis de células B reducida en el hígado fetal y prácticamente ausente en la médula ósea. Estos resultados sugieren que CXCL12 es el único ligando de CXCR4 y son un ejemplo de especificidad funcional de las quimioquinas. Una vez que las células B han terminado su proceso de maduración en la médula ósea, ellas abandonan este órgano y salen a la circulación periférica. Estudios *in vitro* han mostrado que a partir del estado de diferenciación descrito como de células B inmaduras, éstas comienzan a perder su capacidad de respuesta a CXCL12 lo que ha sido interpretado como una estrategia para escapar al efecto de retención de esta quimioquina y poder así emigrar de la médula ósea.

Por otra parte, la maduración de los timocitos implica la migración de estas células a través de distintos subcompartimentos tímicos que comienza en la región más externa de la corteza y culmina en la médula tímica. Diversos estudios han mostrado la expresión diferencial de ciertas quimioquinas y la respuesta también diferencial de los timocitos a lo largo de este proceso. Hasta ahora, en la región cortical sólo se han identificado las quimioquinas CXCL12 y CCL25. La detección de CXCL12 se correlaciona con la alta expresión de su receptor CXCR4 en timocitos doble positivos (CD4⁺/CD8⁺), si bien su acción puede estar sobrepuesta con otros factores ya que el desarrollo de células T ocurre normalmente en los ratones CXCR4^{-/-}. CCL25 es detectada en células dendríticas y epiteliales tímicas en la corteza, en la médula e incluso en el timo fetal lo que sugiere que podría participar en el reclutamiento de células progenitoras tímicas. Sin embargo, estudios *in vitro* han mostrado que la neutralización de CCL25 no influye sobre el poblamiento tímico. Por otro

lado, el receptor de esta quimioquina, CCR9, es expresado por timocitos doble negativos y doble positivos pero cuando estos linfocitos maduran y se transforman en linfocitos T simple positivos pierden la expresión de CCR9 y adquieren CCR7 además de L-selectina. En contraste a la corteza tímica, varias quimioquinas han sido detectadas en la médula incluyendo a CCL22, CCL17, CCL19, CCL21, CCL11 y CXCL16. La participación de CCL22 y CCL17 es consistente con la expresión del receptor de estos ligandos, CCR4, en timocitos que han sobrevivido al proceso de selección positiva y que transitan hacia la médula tímica. En este mismo estado de maduración los linfocitos T expresan el receptor CCR7 y muestran una aumentada capacidad de responder a sus ligandos CCL19 y CCL21. El patrón de expresión de estas dos últimas quimioquinas y de su receptor, sugiere que ellos están implicados en la organización celular tímica atrayendo a los linfocitos T hacia las vías de salida del timo.

5.2. Quimioquinas en la recirculación de los linfocitos a través de los órganos linfoides secundarios

Una vez que los linfocitos B y T maduros son liberados a la circulación, ellos viajan constantemente a través de los órganos linfoides secundarios (OLS) en búsqueda de antígeno. Para que esto ocurra, los linfocitos deben interactuar con las células endoteliales columnares (HEV) de las vénulas post-capilares ubicadas dentro del OLS y luego transmigrar hacia su interior (ver capítulo 12). La sospecha que las quimioquinas podrían participar en este proceso provino de resultados que mostraron que la toxina de Pertussis, un inhibidor de proteínas G, bloqueaba la adhesión de leucocitos al endotelio. Estudios posteriores demostraron que las quimioquinas median la activación de las integrinas hacia un estado conformacional de mayor afinidad, evento crucial en la obtención de una adhesión más firme entre linfocito y endotelio. La quimioquina CCL21 es detectada con gran intensidad por HEVs de los nódulos linfáticos y de las placas de Peyer y su importancia en el "homing" de linfocitos a OLS está basada en el estudio de ratones *plt*. Debido a una mutación espontánea aún desconocida, las HEVs de estos ratones no pueden expresar el gen de CCL21 y sus nódulos linfáticos y placas de Peyer muestran un reducido número de células



T. Además, la adhesión a HEVs y el "homing" de linfocitos T a los OLS puede ser restaurado después de que estos ratones *plt* son inyectados subcutáneamente con CCL21. Se ha determinado que el receptor de esta quimioquina corresponde a CCR7 el cual es expresado por linfocitos T vírgenes. Consecuentemente, los ratones CCR7-/- presentan el mismo fenotipo que los ratones *plt*, es decir, deficiente número de linfocitos T en los nódulos linfáticos. En el modelo murino existen tres quimioquinas capaces de unir a CCR7: dos isoformas de CCL21, las cuales sólo difieren en un sólo aminoácido (serina por leucina en la posición 65) y CCL19, pero solamente la isoforma CCL21/serina no es expresada en los ratones *plt*. Esto significa que a pesar de la presencia de los otros ligandos para CCR7 (CCL21/leucina y CCL19) únicamente CCL21/serina puede mediar la migración de linfocitos T a los nódulos linfáticos. Una posible explicación para este resultado es que los otros dos ligandos no sean expresados en el lugar más apropiado para llevar a cabo la extravasación o que cada ligando transduzca diferentes señales a través del mismo receptor. En este caso, CCL21/serina correspondería a otro ejemplo de especificidad de las quimioquinas. Otra interesante observación rescatada de los ratones *plt* es que la recirculación de linfocitos B a los órganos linfoides secundarios no se ve afectado, lo que significaría que la adhesión de las células B a las HEVs no depende de CCL21. Esto es corroborado por el hecho de que en ratones normales las células B se adhieren a una región de las HEVs en la cual no ha sido detectada CCL21 y a la cual no se adhieren los linfocitos T. Por lo tanto, la expresión topológica diferencial de quimioquinas podría ser el inicio de la segregación de linfocitos hacia las zonas B y T de los OLS, proceso en el cual participan otras quimioquinas. Por otra parte, se ha mostrado que las células B de ratones impedidos de expresar el receptor CXCR5 son incapaces de migrar desde la zona rica en células T hacia la zona folicular B en el bazo y en las placas de Peyer. En amígdalas inflamadas este receptor es expresado por una población particular de linfocitos T de ayuda que asisten a las células B en la producción de anticuerpos. El ligando para este receptor, CXCL13, ha sido detectado en el manto folicular y en las HEVs foliculares pero no en la zona T. Por lo tanto, en el folículo del OLS, la quimioquina CXCL13 podría facilitar la interacción de células B-T necesaria para una eficiente respuesta inmune.

Los ratones deficientes en la expresión de CXCR5 como de CCR7 presentan una severa desorganización de los OLS, lo que significa que las quimioquinas son fundamentales en el desarrollo y mantención de microambientes localizados dentro de los tejidos linfoides (zonas B y T).

5.3. Quimioquinas en el "homing" de los linfocitos a sitios efectores periféricos

A diferencia de los linfocitos T vírgenes que migran azarosamente a través de todo el cuerpo, los linfocitos T de memoria/efectores presentan una migración preferencial y selectiva hacia los sitios efectores periféricos, proceso conocido como "homing". Estudios recientes han demostrado que las quimioquinas podrían jugar un papel importante en el "homing" de los linfocitos a tejidos tales como la piel (tejido cutáneo) e intestino (tejido mucoso). Las células T de memoria cutáneas se caracterizan por la expresión de un antígeno llamado CLA, mientras que los linfocitos de memoria que migran preferencialmente al tejido intestinal expresan la integrina $\alpha 4\beta 7$ como marcador específico. Se ha determinado que el receptor de quimioquina CCR4 es expresado en altos niveles en linfocitos T CLA+ pero está prácticamente ausente en linfocitos T $\alpha 4\beta 7$. A su vez, el ligando de CCR4, la quimioquina CCL17, ha sido detectada en células endoteliales de vénulas de la piel inflamada, pero no en vénulas de la lámina propia de la mucosa intestinal. Otra quimioquina, llamada CCL27 también es capaz de promover la migración de linfocitos T de memoria a la piel a través de su interacción con el receptor CCR10, el cual es expresado por las células de Langerhans, melanocitos, fibroblastos y células endoteliales de la microvasculatura dermal. Por otro lado, el receptor CCR9 es expresado específicamente por linfocitos T de memoria $\alpha 4\beta 7^{\text{hi}}$ con homing preferencial hacia el tejido intestinal y no por los linfocitos T de memoria cutáneos. Consecuentemente, tan sólo los linfocitos T $\alpha 4\beta 7^{\text{hi}}$ responden a la quimioquina CCL25, ligando de CCR9, aunque solamente se ha podido detectar la expresión del mRNA de CCL25 en el intestino.

5.4. Quimioquinas y enfermedades

Las quimioquinas pueden ser divididas en dos categorías. La primera corresponde a las



quimioquinas constitutivas u homeostáticas responsables del tráfico linfocitario basal y de la mantención y estructuración de los órganos linfoides. La segunda categoría está integrada por las **quimioquinas inducibles o inflamatorias** que son expresadas en respuesta a un estímulo o estrés fisiológico. Esta inducción puede significar un aumento en el nivel de expresión del mRNA de una quimioquina de hasta 300 veces en pocas horas de activación. Sin embargo, una alta expresión de quimioquinas puede ser la causa de una descontrolada activación celular y provocar un daño tisular o enfermedad. De hecho, existe una estrecha relación entre la expresión de ciertas quimioquinas y enfermedades asociadas con la infiltración de leucocitos. En seres humanos la relación más irrefutable se encuentra en el **síndrome de inmunodeficiencia adquirida** (SIDA), mientras que para otras patologías la asociación ha sido inferida de modelos animales.

En el SIDA se ha demostrado que el VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) requiere de CD4 y los receptores de las quimioquinas CXCR4 y CCR5 para infectar una célula. Este hallazgo provino de la identificación de una delección de 32 nucleótidos en el receptor de quimioquina CCR5 que protege contra el SIDA a individuos homocigotos y frena la progresión de la enfermedad en personas heterocigotas. Los receptores CCR5 y CXCR4 definen diferentes poblaciones de células T (de memoria y vírgenes, respectivamente) lo que probablemente esté relacionado con los diferentes tropismos celulares del virus (macrófagos y células T) y con su utilización en diferentes estados de la enfermedad (CCR5 en estados tempranos y CXCR4 en estados tardíos).

Otra enfermedad relacionada con la expresión de ciertas quimioquinas es la **esclerosis múltiple** (EM). Esta es una enfermedad autoinmune, neuroinflamatoria crónica y recurrente, en la cual el reconocimiento de un autoantígeno presente en las fibras nerviosas recluta a linfocitos T y macrófagos hacia el sistema nervioso central. Esta enfermedad tiene períodos de remisión lo que implica la existencia de mecanismos inmunes de regulación. El modelo animal para estudiar la EM es la Encefalomiелitis Alérgica Experimental (EAE), la cual puede ser inducida en ratones mediante la inmunización con antígenos derivados de la mielina. Utilizando este modelo se ha encontrado una correlación entre las lesiones inflamatorias provocadas por esta enfermedad y

la detección de las quimioquinas CCL5, CCL3, CCL4, CXCL10 y CCL2. La utilización de anticuerpos neutralizantes anti-CCL3 sugiere que el desarrollo de lesiones inflamatorias agudas está asociado a CCL3, mientras que CCL2 participaría en la reincidencia de la enfermedad. A pesar de algunos resultados discrepantes obtenidos con ratones knock out para la expresión de estas quimioquinas y de sus receptores, pareciera ser que CCL2, su receptor CCR2 y, en menor extensión CCL3 y CCR1, participarían activamente en el desarrollo de esta enfermedad. En humanos se ha encontrado que el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EM en estado de reincidencia o de ataque activo contiene grandes cantidades de CCL3, CXCL10, CXCL9 y CCL5. El análisis de las células T presentes en el líquido cefalorraquídeo demostró que estas expresaban CXCR3 y CCR5. Asimismo, se han detectado CCL2, CCL7, CCL8, CXCL10 y CXCL9 dentro de las lesiones activas de cerebros autopsiados de pacientes con EM. Consistente con estos resultados se encontró que macrófagos, microglia y linfocitos T activados expresaban los receptores CCR2 y CCR5, mientras que los astrocitos reactivos presentaban CCR3 y CCR5.

Una creciente serie de evidencias ha demostrado que la formación de **placas ateroscleróticas** son el resultado de una respuesta inflamatoria al daño arterial producido por la hipercolesterolemia o la hipertensión. Utilizando modelos experimentales de esta enfermedad, se ha observado que ratones CCL2^{-/-} presentan 65-85% menos acumulación de lípidos en las arterias que el ratón que expresa CCL2. Similares resultados fueron obtenidos al utilizar ratones con una deficiencia en la expresión del receptor de CCL2 (CCR2). En todos los casos, se observó una disminución en el contenido de macrófagos de la pared arterial. Esto sugiere que bajo condiciones de hipercolesterolemia, CCL2 podría participar en la quimioatracción de monocitos que expresen CCR2 hacia los sitios de formación de la placa aterosclerótica. En concordancia con estos resultados, en un modelo de ratón con hipertensión inducida experimentalmente se observó que CCR2 es requerido para la infiltración de macrófagos hacia la pared arterial. La extrapolación de estos hallazgos a los seres humanos está fundamentalmente basada en la detección de las quimioquinas CCL2, CCL5, CCL3 y CCL11 en las placas ateroscleróticas de pacientes que sufren de esta enfermedad.



En la **artritis reumatoide**s se ha encontrado una variedad de quimioquinas que incluyen a CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8 y CXCL10 en el fluido sinovial de las articulaciones comprometidas. Estas quimioquinas han sido detectadas en células sinoviales y en los leucocitos infiltrantes. A su vez, en las células infiltrantes se ha detectado la presencia de los receptores CCR2, CCR5, CXCR2 y CXCR3. Al igual que en el SIDA se ha asociado la presencia del alelo de CCR5 que posee una delección de 32 nucleótidos con una progresión menos severa de la artritis.

En el desarrollo del **cáncer** las quimioquinas podrían cumplir varias funciones potenciadoras. En primer lugar, se ha observado que las propias células tumorales pueden secretar factores quimiotácticos de leucocitos, particularmente CCL2, los cuales pueden representar una importante fuente de factores angiogénicos. De hecho, en cáncer de mama se ha correlacionado el grado de infiltración de los macrófagos con la vascularidad del tejido invadido. En segundo lugar, las mismas quimioquinas pueden actuar como factores de crecimiento para las células tumorales. Así por ejemplo, CXCL1 estimula la proliferación de líneas celulares pancreáticas y de melanoma mientras que CXCL8 tiene el mismo efecto sobre células tumorales de pulmón. Por otro lado, la presencia de leucocitos asociados al tumor podría reflejar el intento fallido del sistema inmune por eliminar el cáncer. Siguiendo esta idea se han desarrollado varios trabajos con CCL2, CCL5, CCL1, CCL20, CCL21, CXCL10 y XCL1 con la finalidad de utilizarlas en la generación de una respuesta inmune antitumoral más potente. Finalmente, las quimioquinas podrían participar en la metástasis del tumor. Varios tipos celulares malignos expresan receptores de quimioquinas lo que les permitiría, una vez alcanzada la circulación, migrar en respuesta a sus ligandos presentes en células de otros órganos o tejidos.

5.5. Quimioquinas y terapia

Debido a la importante función que las quimioquinas cumplen en diversos aspectos de la respuesta inmune y a su participación en graves patologías, varios estudios se han orientado a la búsqueda de antagonistas de quimioquinas con potenciales aplicaciones terapéuticas. La delección de los primeros ocho aminoácidos de CCL5 o de CCL2 origina proteínas incapaces de producir quimiotaxis. Asimismo, la extensión de la región

amino-terminal mediante la retención de la metionina inicial de CCL5 recombinante (**Met-RANTES**) o la adición química del radical aminoxipentano a la serina amino-terminal de CCL5 (**AOP-RANTES**) genera dos potentes antagonistas de esta quimioquina. También ha resultado interesante el empleo de un inhibidor viral de quimioquinas de la familia CC (vCCI) utilizado por los Poxvirus para evadir la respuesta inmune. Los efectos de estos antagonistas han sido probados *in vitro* o en modelos animales de experimentación para algunas enfermedades relacionadas con la expresión de quimioquinas.

Se ha mostrado que **Met-RANTES** reduce la extensión y severidad de la artritis reumatoidea. Además, este antagonista es capaz de inhibir la liberación de radicales libres de eosinófilos activados por quimioquinas, por lo que potencialmente podría ser usado en enfermedades asociadas a una infiltración de este tipo de leucocitos, tal como el asma alérgica. Adicionalmente, en este tipo de patologías podría emplearse el inhibidor viral de quimioquinas vCCI, el cual provoca una notable mejoría de la función pulmonar y una disminución de la inflamación de la vía aérea y del parénquima pulmonar en modelos de ratón con asma inducida por alérgeno. Por otra parte, **AOP-RANTES** ha resultado ser un potente inhibidor de la infección de células mononucleares de sangre periférica por VIH-1 y de la replicación de este virus en macrófagos. En el caso de los antagonistas de CCL2, basados en la delección de aminoácidos de su región amino terminal, se ha determinado que éstos son capaces de retrasar la aparición de la artritis o de reducir sus síntomas en modelos de ratones MRL-*lpr*. La transfección *in vivo* del cDNA de uno de los antagonistas de CCL2 (7ND) ha sido usado como terapia génica contra la aterosclerosis suprimiendo el reclutamiento de monocitos hacia los vasos sanguíneos coronarios. Finalmente, se ha observado que inhibidores de la biosíntesis del colesterol utilizados ampliamente como drogas en la prevención de enfermedades cardiovasculares también inhiben la producción de CCL2. Esto significa que parte de los efectos benéficos de estas drogas también provienen de su acción anti-inflamatoria y que los inhibidores de quimioquinas representan innovadoras herramientas farmacológicas para la prevención de enfermedades cardiovasculares.



LECTURAS SUGERIDAS

Aggarwal, B.B. and Puri, R.K., Eds., **Human cytokines: their role in disease and therapy**, Blackwell Science, 1995.

Ansel, K.M., and Cyster, J.G., "Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development", *Curr. Opin. Immunol.* 13: 172-179. 2001.

Callard, R. and Gearing, A., Eds., **The cytokine Factsbook**, Academic Press Limited, 1994.

Campbell, J., and Butcher, E., "Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing", *Curr. Opin. Immunol.*, 12: 336-341. 2000

Gerard, C., and Rollins, B., "Chemokines and disease", *Nature Immunology* 2: 108-115. 2001.

Karnitz L. and Abraham R., "Cytokine receptor signaling mechanism", *Curr. Op. Immunol.* 7:320-326, 1995.

Moser, B., and Loetscher, P., "Lymphocyte traffic control by chemokines", *Nature Immunology* 2: 123-128. 2001.

Nicola, N.A., Ed., **Guidebook to cytokines and their receptors**, Oxford University Press, 1994.

Nicholson LB. and Kuchroo V., "Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease", *Curr. Op. Immunol.* 8:837-842, 1996.

Theze, J., Ed., **The cytokine network and immune functions**, Oxford University Press, 1999.

Zlotnik, A., and Yoshie, O., "Chemokines: A new classification system and their role in immunity", *Immunity* 12: 121-127. 2000.



Capítulo 12

RECEPTORES DE ADHESIÓN, “HOMING” Y ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS

Jorge Rodrigo Mora S. y Mario Rosemblatt S.

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">1. Introducción2. Modelo general de adhesión leucocitaria3. Receptores de adhesión y sus ligandos<ul style="list-style-type: none">3.1. Receptores de adhesión de la familia de las integrinas3.2. Receptores de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas (SFIg)3.3. Moléculas de adhesión de la familia de las selectinas4. Interacciones linfocito-endotelio<ul style="list-style-type: none">4.1. Tráfico linfocitario a través del endotelio inflamado | <ul style="list-style-type: none">4.2. Tráfico linfocitario a través del endotelio columnar (HEV)4.3. Tráfico linfocitario hacia la piel5. Regulación del posicionamiento ("homing") de linfocitos6. Receptores de adhesión en la diferenciación y activación linfocitaria<ul style="list-style-type: none">6.1. Receptores de adhesión y diferenciación temprana en la médula ósea6.2. Receptores de adhesión y diferenciación en el microambiente de los OLS |
|--|--|





RESUMEN

Para que ocurra una respuesta inmune específica, los linfocitos deben dejar la circulación atravesando el endotelio de los órganos linfoides secundarios e ingresar a los órganos linfoides secundarios: ganglios linfáticos periféricos, placas de Peyer (mucosa intestinal), y bazo. Por otro lado, en el sistema inmune la regulación de la maduración y proliferación de los linfocitos a células efectoras depende del sitio anatómico en el cual se localizan las células, y por tanto de las interacciones que se establecen entre éstas y su microambiente. Este diálogo entre linfocitos y estroma está regulado por la presencia, en la membrana, de linfocitos y de células estromales de receptores y contrarreceptores específicos de adhesión y por la disponibilidad local de citoquinas y quimioquinas.

En este capítulo se describen las diferentes familias de receptores de adhesión y sus contrarreceptores y se presenta información sobre la participación de estos receptores en los diferentes mecanismos y procesos involucrados en la respuesta inmune, tanto normal como patológica. Se discute el papel de estos receptores así como de sus contrarreceptores en la iniciación y la duración de la respuesta inmune, así como también sobre su participación en la actividad efectora, recirculación y posicionamiento o “homing” específico de los linfocitos en los diferentes tejidos. Se presenta la información reciente que sustenta la idea de que los linfocitos vírgenes y de memoria/efectores tienen vías de “homing” diferentes y específicas para determinados tejidos, lo cual contribuye a hacer más eficiente y específica una respuesta inmune. Se discute la evidencia reciente en el contexto de que el “homing” tejido-específico de un linfocito sea una característica que probablemente perdure en el tiempo, dando fundamento a la idea de considerarlo como parte de la memoria inmunológica.

1. INTRODUCCIÓN

Los linfocitos son células esencialmente migratorias. Estudios clásicos que datan desde los años 60 indicaron que los linfocitos circulan entre la sangre y la linfa de forma constante. Nuestro sistema inmune se caracteriza por generar una gran variedad en la especificidad linfocitaria, que en un adulto se estima entre 25-100 millones de clones distintos. Sin embargo, el número de estos linfocitos capaces de reconocer un antígeno individual es muy limitado (algunos miles como máximo), lo cual genera un desafío importante, el cual ha sido ilustrado en la siguiente analogía: Imaginen balones de 150 m de diámetro circunnavegando la tierra (comparable al volumen de un linfocito en reposo [125 femtolitros] en un adulto [75 litros]), que deban detectar dentro de horas estructuras mucho más pequeñas que se originan súbitamente en cualquier parte de nuestro planeta y que son solamente reconocibles por contacto directo. Este problema logístico se soluciona en

parte por la existencia de tejidos especializados conocidos como **órganos linfoides secundarios (OLS)**, los cuales están encargados por un lado de “concentrar” los antígenos provenientes desde tejidos no linfoides (también llamados “terciarios”), y por otro de permitir la entrada preferencial de linfocitos vírgenes, incrementando con ello tremendamente la probabilidad de que un linfocito dado encuentre su antígeno específico en lo que se conoce como respuesta inmune primaria, que es aquella donde un linfocito virgen es activado por primera vez.

Por otro lado, las células dendríticas (DC), células presentadoras especializadas en presentar antígenos a linfocitos T naïve (vírgenes), se encargan de captar antígenos en los tejidos periféricos (mediante macropinocitosis, fagocitosis, y endocitosis mediada por receptor), procesarlos y presentarlos en el contexto de MHC-I (fenómeno conocido como “crosspriming”) o MHC-II, y finalmente transportarlos a los OLS para presentárselos a linfocitos T (LT). Por otro



lado los linfocitos B, que reconocen antígenos en su forma nativa (sin necesidad de ser procesados ni presentados), también son activados y se diferencian en los OLS. Después de su activación inicial en los OLS, los linfocitos ya transformados en células efectoras y/o de memoria deben dispersarse y viajar a aquellos sitios del organismo (generalmente tejidos terciarios como la piel o lámina propia de la mucosa intestinal) donde deben eliminar al antígeno invasor y actuar como vigías frente a futuras invasiones, en lo que se denomina respuesta inmune secundaria.

La respuesta inmune (RI) secundaria presenta varias características distintivas: (i) Existe desde su inicio un número enormemente mayor de linfocitos específicos capaces de reconocer al antígeno, comparados con la RI primaria. (ii) La respuesta de cada linfocito es intrínsecamente más rápida, ya que se requiere un contacto de mucho menor duración con la célula presentadora de antígeno (en el caso de LT), y a su vez no se requiere de señales co-estimuladoras tan exigentes como en la activación inicial. Esto a su vez posibilita que células no especializadas funcionen como células presentadoras de antígenos. (iii) No se requiere que esta respuesta ocurra en OLS, de hecho la RI secundaria habitualmente se produce en tejidos terciarios. (iv) Generalmente es una RI polarizada, ya sea de tipo T helper-1 o tipo T helper-2, lo cual determina que sea predominantemente celular o humoral y a su vez que esté dominada por linfocitos B que producen un determinado isotipo de inmunoglobulina y por último. (v) Actualmente se ha determinado que en una RI secundaria los linfocitos presentan predilección para migrar preferentemente a aquellos tejidos asociados al OLS donde se produjo la RI primaria, fenómeno que se conoce como “homing” tejido-específico. Incluso, se ha postulado que el “homing” tejido-específico sería una característica adicional de lo que se conoce como memoria inmunológica, característica que se ha transformado en la base de las terapias actuales de vacunación.

Tanto para que pueda ocurrir una RI primaria como secundaria, los linfocitos deben entrar a los tejidos donde se producirán estas respuestas (ya sea OLS o tejidos terciarios, respectivamente). El paso de los linfocitos desde la sangre al tejido ocurre en las vénulas postcapilares, el llamado endotelio columnar o “High Endothelial Venules” (HEV) (excepto en bazo, pulmones, e hígado), no en arteriolas ni capilares (con lo cual se minimiza el riesgo de interferir con el intercam-

bio de gases y perfusión del tejido). Una etapa crítica para que los linfocitos puedan atravesar las vénulas postcapilares es la adhesión de estos linfocitos al endotelio de estos vasos. Esta es una etapa finamente regulada, que sucede en una serie de pasos secuenciales y que depende de la interacción entre múltiples receptores de adhesión presentes en la membrana de los linfocitos y sus respectivos ligandos desplegados por las células endoteliales. En este capítulo se hará referencia a las diferentes familias de receptores de adhesión y se describirán los mecanismos adhesivos que regulan la migración de los linfocitos a los tejidos.

2. MODELO GENERAL DE ADHESIÓN LEUCOCITARIA

El modelo actual de cómo los linfocitos se adhieren al endotelio de un vaso sanguíneo es extrapolable a la adhesión de los leucocitos en general (incluyendo por ej. neutrófilos). El “modelo de adhesión de múltiples pasos” fue originalmente propuesto en 1991 y consta al menos de cuatro etapas, separadas temporal y mecanísticamente: (a) frenado y rotación (“tethering” y “rolling”), (b) activación de integrinas, (c) adhesión firme (“sticking”) y (d) trans migración (diapédesis). Cada una de estas etapas secuenciales es esencial para que ocurra la trans migración del leucocito y depende de moléculas genéricamente llamadas “moléculas de adhesión”. Estas moléculas se pueden agrupar estructuralmente en diferentes familias, las cuales se describirán en detalle más adelante y se mencionarán en este momento en el contexto del modelo de adhesión de múltiples pasos. Aunque, en general, estas etapas son comunes para todos los leucocitos, el proceso se describirá considerando los linfocitos T (a menos que se indique otra cosa), por ser en ellos donde los fenómenos de adhesión han sido estudiados más en detalle.

La primera etapa en la cascada de adhesión se conoce como “**tethering**” y consiste en el frenado (“agarre”) al endotelio venular. Esta etapa se considera generalmente en conjunto con la etapa inmediatamente siguiente conocida como “**rolling**”, donde los linfocitos ruedan adheridos laxamente sobre el endotelio vascular. Tanto el “**tethering**” como el “**rolling**” dependen fundamentalmente de moléculas conocidas como selectinas: L-selectina en los linfocitos y E- o P-selectina en el endotelio vascular, aunque en de-



terminadas circunstancias pueden también participar integrinas del tipo $\alpha_4\beta_7$ o $\alpha_4\beta_1$. En cuanto a la distribución de selectinas, L-selectina se encuentra en todos los leucocitos, aunque en los linfocitos su expresión está restringida especialmente a linfocitos vírgenes. E- y P-selectinas se encuentran principalmente en endotelios inflamados, aunque en la piel se expresan débilmente en forma constitutiva. Una característica importante de las moléculas que participan en el "tethering" y "rolling" de los linfocitos es el estar predominantemente localizadas en estructuras conocidas como microvellosidades linfocitarias. Esta distribución es importante funcionalmente, como se ha demostrado en experimentos en los cuales se ha reemplazado la porción de transmembrana e intracelular de L-selectina para localizarla predominantemente en zonas del linfocito diferentes de las microvellosidades, con lo cual se reduce importantemente su capacidad de mediar el "tethering" y "rolling" (aún manteniendo su capacidad de unir sus ligandos). Interesantemente, las integrinas α_4 , que son también capaces de mediar "rolling", se localizan igualmente en las microvellosidades del linfocito, no así otras integrinas como LFA-1 que no median "rolling". Se piensa que esta localización dejaría estas moléculas estratégicamente posicionadas para un primer contacto eficiente con el endotelio. Los ligandos para selectinas (tanto en el endotelio como en el linfocito) son glicoproteínas del tipo sialil-Lewis-X, y que comparten en común el ser fucosiladas, sialiladas y sulfatadas. Estos ligandos se encuentran expresados en forma constitutiva en el endotelio de los ganglios linfáticos constituyendo lo que se denomina Peripheral Node Addressin (PNAd) (ligandos para L-selectina), y también se encuentran en linfocitos como ligandos para P y E-selectina, aunque la expresión de estos ligandos en linfocitos estaría restringida a algunos subtipos funcionales, que serán descritos más adelante. La importancia de la etapa de "rolling" queda ilustrada en experimentos en los cuales luego de bloquear ya sea L-selectina o sus ligandos (PNAd), se bloquea casi el 100% de la adhesión a HEV de ganglios linfáticos. Adicionalmente, en humanos se ha descrito una enfermedad conocida como LAD-2 ("Leukocyte Adhesion Deficiency-2") en la cual existe una mutación en una enzima clave involucrada en la síntesis de ligandos para selectinas (una fucosiltransferasa). Estos pacientes presentan una importante inmunodeficiencia

secundaria al defecto de adhesión leucocitaria.

La etapa siguiente conocida como **activación**, está fundamentalmente mediada por quimioquinas presentes en el endotelio y los receptores de quimioquinas presentes en los linfocitos. Respecto a las quimioquinas presentes en los endotelios, actualmente no es claro en qué medida el endotelio de los diferentes tejidos participa directamente en la producción de estas quimioquinas. Sin embargo, sí es claro que el endotelio es capaz de presentar algunas quimioquinas producidas en el estroma del tejido o que vienen desde sitios distantes (como la piel). Se ha demostrado que estas quimioquinas (ej. IL-8 y ELC) pueden ser transportadas transcelularmente y presentadas por proteoglicanos en la superficie apical del endotelio a los linfocitos. De cualquier manera, el resultado final es que un linfocito que está en la etapa de "rolling", encuentra a estas quimioquinas en el endotelio, y a través de sus receptores de quimioquinas gatilla una cascada de transducción de señales dependiente de proteína G, la que finalmente lleva al aumento de la adhesión mediada por integrinas (lo que se denomina en general como activación). Esta activación de las integrinas estaría dada por al menos dos mecanismos: (i) Aumento en la afinidad intrínseca del dímero de integrina, producido por un cambio en la estructura terciaria y cuaternaria del dímero, y (ii) un aumento en la avidéz, dado fundamentalmente por un acercamiento de las integrinas entre sí en la membrana del linfocito. Esta etapa de activación es independiente de la etapa precedente de "rolling", ya que en linfocitos en los cuales se ha bloqueado la activación mediada por quimioquinas por el tratamiento con toxina pertussis (inhibidor de proteína G) se bloquea también la adhesión firme ("sticking") sin afectar la capacidad de hacer "rolling". Estos linfocitos nunca logran adherirse y finalmente se sueltan y vuelven a la circulación. Este fenotipo, que puede lograrse experimentalmente, se encuentra presente en los ganglios linfáticos de animales que son naturalmente mutantes y que carecen de las quimioquinas ELC y SLC (ligandos para el receptor de quimioquina CCR7). En estos animales los linfocitos T son incapaces de adherirse firmemente a las vénulas de endotelio alto (HEV) de los ganglios linfáticos, aún cuando efectúan el rolling sin problema. El mismo fenotipo se observa en ratones "knockout" para CCR7. Por otro lado, el paso de activación puede ser sobrepasado



artificialmente si las integrinas se activan previamente usando ésteres de forbol (ej. PMA) o anticuerpos activadores de integrinas.

La etapa siguiente en la transvasación linfocitaria, ya enunciada anteriormente, se denomina **adhesión firme** o **sticking**, y depende totalmente de moléculas de adhesión heterodiméricas conocidas como integrinas, presentes en los linfocitos. Experimentos donde se han usado anticuerpos monoclonales bloqueadores de estas moléculas, han demostrado una abolición de la adhesión firme de los linfocitos (sin afectar el "rolling" de éstos). Por otro lado, en humanos existe una enfermedad en la cual los linfocitos son incapaces de adherirse firmemente al endotelio de los tejidos, produciendo una importante inmunodeficiencia que con el tiempo es letal. En esta enfermedad (afortunadamente rara), conocida como LAD-1 ("Leukocyte Adhesion Deficiency-1"), los pacientes presentan una mutación de la cadena de integrina $\beta 2$, con lo cual carecen de las integrinas que posee esta cadena, principalmente LFA-1, la cual es esencial en casi todos los fenómenos de adhesión estudiados. Los ligandos para las integrinas, moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (ej. ICAM-1 y -2, MAdCAM-1, VCAM-1), se encuentran presentes en el endotelio de los tejidos, ya sea en forma constitutiva (en los OLS y algunos tejidos extralinfoides) o en forma inducible en tejidos inflamados.

Por último, una etapa que hasta el día de hoy está muy pobremente caracterizada es la **transmigración linfocitaria** (y leucocitaria en general). Una dificultad para estudiar esta etapa en forma aislada es el hecho de que además de ser dependiente de las etapas anteriores, es probable que requiera también de las mismas moléculas que participan en las etapas previas (ej. quimioquinas). Por otro lado, se debe tener en cuenta que para que un linfocito pueda acceder finalmente al tejido, debe ser capaz de disociar (al menos transitoriamente) las uniones entre las células endoteliales, luego la membrana basal endotelial, y finalmente abrirse paso entre los elementos de matriz extracelular. Cada una de estas etapas adicionales podría, en teoría, estar regulada y requerir nuevos elementos tanto del linfocito (ej. metaloproteasas) como del tejido, por lo cual decir meramente "transmigración" puede demostrar ser a la larga una sobresimplificación de este fenómeno.

En la sección siguiente se profundizará en la

descripción de las moléculas de adhesión que ya se enunciaron en el contexto de la cascada de adhesión, para lo cual se han agrupado de acuerdo a características estructurales en diferentes familias.

3. RECEPTORES DE ADHESIÓN Y SUS LIGANDOS

Tres grandes familias de receptores de adhesión ejercen su acción reguladora en el sistema inmune, receptores de la **Familia de las Integrinas**, receptores pertenecientes a la **Superfamilia de las Inmunoglobulinas (SFIg)** y receptores de la **Familia de las Selectinas**. Más recientemente se ha incorporado la creciente **Familia de las Quimioquinas** y sus **Receptores**. Si bien es cierto, las quimioquinas y sus receptores no participan como pares de adhesión ligando-receptor clásicos, como se discutió previamente, se sabe que su papel es fundamental en la cascada de adhesión, y adicionalmente y como se discutirá más adelante, actualmente se acepta cada vez más que tienen un papel muy importante en la regulación de especificidad fina del "homing" tejido-específico de las células inmunes (y también dentro del microambiente del tejido linfóide). Sin embargo, dado que las quimioquinas y sus receptores son descritos en detalle en el capítulo 11, sólo se mencionarán aquí en el contexto de la cascada de adhesión, así como también aquellas involucradas en el "homing" tejido-específico de los linfocitos. Otros receptores de adhesión, o sus ligandos que no pertenecen a ninguna de estas familias serán presentadas desde un aspecto funcional durante este capítulo. Los receptores de adhesión se expresan en la membrana de los linfocitos u otras células inmunes mientras que sus contrarreceptores o ligandos se encuentran, fundamentalmente, en células no inmunes, tales como células endoteliales, células accesorias (células dendríticas, células dendríticas foliculares, monocitos, etc.), en otros linfocitos o en la matriz extracelular. En este capítulo, se nombrará como **receptor de adhesión** a las moléculas que se encuentran en la superficie de los linfocitos u otras células inmunes (células NK, etc.) y como **ligando** a aquellas moléculas que interactúan con el receptor y que se localizan en la célula a la cual se une el linfocito, aunque en muchos casos moléculas de la misma familia deban considerarse como receptor de adhesión cuando se encuentra en el linfocito o como ligando si se encuentra en otra célula.

3.1. Receptores de adhesión de la familia de las integrinas

Las integrinas son moléculas heterodiméricas de transmembrana que se unen a diferentes ligandos extracelulares y transmiten señales al interior de la célula a través del citoesqueleto. Las integrinas están constituidas por dos cadenas polipeptídicas, α y β , unidas en forma no covalente (figura 12-1), cuyos extremos aminoterminales forman una estructura globular que contribuye a la asociación no covalente entre ambas cadenas y también a la unión con su ligando. Esta unión al ligando es dependiente de cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}), y su participación es esencial para la actividad de las integrinas. Originalmente, las integrinas fueron clasificadas en tres subfamilias, de acuerdo a la cadena β_1 , en las cuales cada una de las tres cadenas β se asociaba con diferentes cadenas α , generando diferentes heterodímeros. Recientemente la familia de las Integrinas se ha visto expandida por el descubrimiento de nuevas cadenas β y por el hecho que una misma cadena α pueden asociarse con más de una cadena β . Actualmente se conocen 15 cadenas α y 7 cadenas β . La asociación entre las distintas cadenas α y β imparten al heterodímero su especificidad frente al ligando, dándose que diferentes combinaciones α - β pueden actuar como receptor para un mismo ligando. Por ejemplo, la cadena β_1 puede combinarse con varias cadenas α , dos de las cuales, α_4 y α_5 imparten al heterodímero la capacidad de unir

fibronectina. Por otro lado, la cadena α_v correspondiente al clásico receptor para vitronectina $\alpha_5\beta_3$ puede también formar combinaciones con las cadenas $\beta_1, \beta_5, \beta_6$, y β_8 , adquiriendo diferentes especificidades de unión. Actualmente se han descrito más de 20 diferentes combinaciones α - β .

Los receptores de la familia de las integrinas β_1 conocida también como VLA ("Very Late Antigen") comparten la cadena común β_1 (CD29) y se encuentran ampliamente distribuidas tanto en linfocitos B como T. Al menos 9 diferentes cadenas α han sido identificadas en asociación con β_1 . Estas integrinas β_1 tienen como ligandos una serie de proteínas de la matriz extracelular (MEC) tales como fibronectina (fn), colágeno (col), vitronectina (vn), y laminina (lm). Entre las integrinas expresadas por los linfocitos, la integrina $\alpha_5\beta_1$ (VLA-5) tiene como ligando el tripéptido RGD (Arg, Gly, Asp) de la fn. Por otro lado, la integrina $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) la más abundante en linfocitos, tiene como ligandos un péptido de la región CS-1 de la fn, además de VCAM-1 ("Vascular Cell Adhesion Molecule-1"), una molécula que se expresa en la superficie de las células endoteliales en tejido inflamado y en el endotelio de los órganos linfoides secundarios (ver moléculas de adhesión de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas más adelante).

Cuatro diferentes cadenas α (CD11) se asocian con la cadena β_2 (CD18) formando una subfamilia (tabla 12-1). Los linfocitos circulantes expresan fundamentalmente la molécula LFA-1 ("Lymphocyte Function Associated Molecule-1")

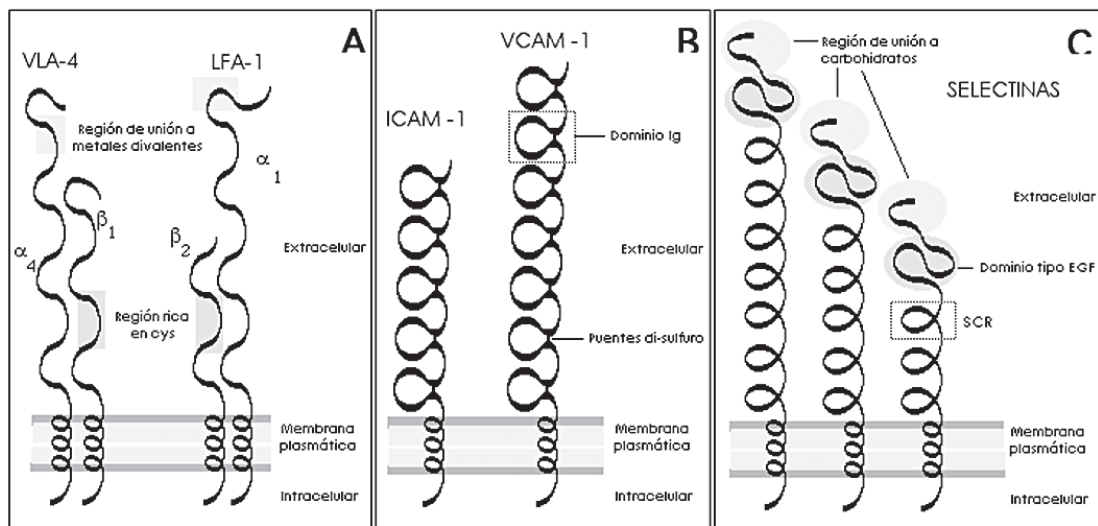


Figura 12-1. Moléculas de adhesión celular. Se muestra esquemáticamente la estructura de las moléculas de adhesión. (A) Familia de las Integrinas, (B) Superfamilia de las Inmunoglobulinas y (C) Familia de las Selectinas.



o $\alpha_1\beta_2$ formada por la combinación de CD11a con CD18. Esta integrina juega un papel central en el proceso de trans migración linfocitaria y ha sido también directamente involucrada en la actividad de los LT citotóxicos (CD8+) así como también en la actividad de células T "helper" y células "natural killer" (NK). Las otras moléculas de la familia β_2 (CD11b, CD11c, CD11d) se expresan principalmente en monocitos, neutrófilos y células NK. Desde el punto de vista de la recirculación linfocitaria, dos de los principales ligandos de la integrina CD11aCD18 (LFA-1) son CD54 (ICAM-1, "Intercelular Adhesion Molecule-1") y CD102 (ICAM-2) receptores de adhesión pertenecientes a la Superfamilia de las Inmunoglobulinas (ver más adelante).

Otro receptor de adhesión perteneciente a la familia de las Integrinas, que cumple un rol de importancia en la migración y alojamiento de los linfocitos en placas de Peyer y tejido mucoso es la molécula $\alpha_4\beta_7$, una molécula que comparte la misma cadena $\alpha+$ presente en $\alpha_4\beta_1$. El principal ligando para $\alpha_4\beta_7$ corresponde a MAdCAM-1 ("Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1"), una glicoproteína presente en las células endoteliales del tejido mucoso, aunque $\alpha_4\beta_7$ también se liga (luego de la activación linfocitaria) a fn y VCAM-1 (ver tabla 12-1).

3.2. Receptores de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas (SFIg)

Los receptores de esta familia comparten el llamado "dominio de inmunoglobulina", compuesto de 90-100 residuos de aminoácidos dispuestos en dos láminas formadas por cadenas de estructura β anti-paralelas estabilizadas por enlaces disulfuro (capítulo 6). Las moléculas pertenecientes a este grupo pueden dividirse en dos categorías; aquellas involucradas en la interacción de los linfocitos con el antígeno (ej. Inmunoglobulinas y receptores de células T, (TCR) o con células presentadoras de antígeno (moléculas MHC-I y MHC-II, CD4, CD8) y aquellas que participan en fenómenos adhesivos más generales, tales como CD2, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), CD106 (VCAM-1) y MAdCAM-1. Aquellas involucradas en el reconocimiento de antígenos se expresan fundamentalmente en linfocitos, mientras que aquellas que actúan en fenómenos de adhesión más generales se expresan en el endotelio –a excepción de CD2 que se encuentra en linfocitos.

Central en los procesos de migración

transendotelial de los linfocitos, así como en la interacción de éstos con otras células durante la respuesta inmune es la molécula CD54 (ICAM-1). Esta molécula, presente en el endotelio se induce durante los procesos inflamatorios y se une, a través de su primer dominio inmunoglobulina amino terminal, a la integrina CD11 a CD18 (LFA-1) presente en linfocitos, que como se mencionó cumple un rol muy importante en la etapa de adhesión firme o "sticking" de los leucocitos.

Otra molécula de esta familia, CD102 (ICAM-2) se expresa en forma constitutiva en el endotelio y en algunas células presentadoras de antígeno, y participaría en los procesos iniciales de trans migración y activación linfocitaria.

Un miembro más reciente de este grupo de receptores de adhesión es CD106 (VCAM-1). CD106 existe en dos formas en la membrana, una dominante que contiene 7 dominios Ig, y otra que surge del procesamiento del mRNA generando una molécula con 6 dominios Ig. Esta molécula no se expresa en el endotelio vascular normal y es inducida por citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, IFN- γ o TNF- α , participando así en el proceso de trans migración linfocitaria durante la inflamación. Datos más recientes indican que VCAM-1 se expresaría en forma constitutiva en el endotelio columnar (HEV, "High Endothelial Venules") de los órganos linfoides, y participaría en el ingreso de los linfocitos a estos órganos durante los procesos normales de vigilancia y respuesta inmune. Por otro lado, CD106 ha sido implicada en los procesos de diferenciación temprana de linfocitos B a partir de precursores hematopoyéticos en la médula ósea, así como también en las etapas finales de diferenciación de linfocitos B en los folículos secundarios. El ligando para VCAM-1 es $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4).

Un miembro más reciente de esta familia de receptores de adhesión es MAdCAM-1, el ligando más importante de $\alpha_4\beta_7$. Esta molécula se expresa tanto en HEV de placas de Peyer como de ganglio mesentérico, y también en vénulas postcapilares de la lámina propia de mucosa intestinal. Se han descrito dos formas funcionales de MAdCAM-1, una que está presente en placas de Peyer y que tiene capacidad de unir tanto $\alpha_4\beta_7$ como L-selectina, y otra que se encuentra en lámina propia con capacidad de unir sólo $\alpha_4\beta_7$. MAdCAM-1 actúa como "domicilina de mucosa" ("mucosal addressin"), es decir, participa en la adhesión de linfocitos efectores o de memoria con "homing" hacia mucosa intestinal (ver más



Tabla 12-1. Receptores de adhesión y sus ligandos.

Molécula de adhesión	Distribución	Ligando	Papel en la adhesión
Selectinas			
*Todas unen estructuras tipo Sialil-Lewis ^x			
L-Selectina (CD62L)	Todos los leucocitos, excepto subgrupos de linfocitos efectores/de memoria	PNAd, PSGL-1, MAdCAM-1, E-Selectina	“Homing” a ganglios linfáticos y placas de Peyer
E-Selectina (CD62E)	Células endoteliales	PSGL-1, ESL-1 (E-Selectin Ligand-1), CLA	“Homing” de linfocitos efectores y de memoria a la piel y sitios de inflamación
P-Selectina (CD62P)	Células endoteliales, plaquetas	PSGL-1, CD24, PNAd	“Homing” de LT Th1 a sitios de inflamación, adhesión de plaquetas a HEV
Ligandos de Selectinas			
Sialil-Lewis ^x (sCD15)	Células mieloides, algunos LT Th1, HEV	Todas las Selectinas	Depende de la molécula que lo exprese
PSGL-1 (CD162)	Todos los leucocitos	Ligando esencial para E-Selectina, también une P- y L-Selectina	“Homing” de LT Th1 a sitios de inflamación, une plaquetas activadas
PNAd	HEV en ganglios linfáticos, sitios de inflamación crónica	L-Selectina y P-Selectina en plaquetas activadas	“Homing” de LT vírgenes y LT de memoria centrales a ganglios linfáticos
CLA (HECA-452)	LT con “homing” a piel, células dendríticas, granulocitos	E-Selectina	“Homing” de linfocitos efectores /de memoria a la piel
Integrinas+β₂			
α _L β ₂ (LFA-1, CD11aCD18)	Todos los leucocitos	ICAM-1, 2, 3, 4, y 5	“Homing” de todos los linfocitos a los ganglios linfáticos, placas de Peyer, la mayoría de los sitios de inflamación
α _M β ₂ (Mac-1, CD11bCD18)	Células mieloides, algunos LT activados	ICAM-1, Factor X, fibrinógeno, C3bi	Desconocido
α _X β ₂ (p150,95, CD11cCD18)	Células dendríticas	Fibrinógeno, C3bi	Desconocido
α _D β ₂ (CD11dCD18)	Monocitos, macrófagos, eosinófilos	VCAM-1, ICAM-1 y -3	Desconocido
Integrinas+α₄			
α ₄ β ₁ (VLA-4)	La mayoría de los leucocitos, excepto neutrófilos	VCAM-1, fibronectina, integrinas α ₄	“Homing” de linfocitos efectores y de memoria a tejidos inflamados
α ₄ β ₇ (LPAM-1)	Linfocitos, células NK, mastocitos, basófilos, monocitos	MAdCAM-1, fibronectina, débil a VCAM-1	“Homing” de linfocitos a tejidos mucosos intestinales
Superfamilia de las Inmunoglobulinas			
ICAM-1 (CD54)	Mayoría de los tipos celulares	integrinas α _L β ₂ , α _M β ₂ , y fibrinógeno	Ligando crítico para integrinas β ₂
ICAM-2 (CD102)	Células endoteliales, plaquetas	integrina α _L β ₂	Desconocido
VCAM-1 (CD106)	Células endoteliales, estroma de médula ósea, células foliculares dendríticas	Integrinas α ₄ β ₁ , α ₄ β ₇ , y α _D β ₂	“Homing” de linfocitos efectores/de memoria a tejidos inflamados
MAdCAM-1	HEV de placas de Peyer, lámina propia, bazo, glándula mamaria lactante	Integrina α ₄ β ₇ , L-Selectina	“Homing” de linfocitos a tejidos mucosos intestinales



adelante), aunque la forma con capacidad de unir L-selectina participa también en la adhesión de linfocitos vírgenes a HEV de placas de Peyer.

3.3. Moléculas de adhesión de la familia de las selectinas

La familia de las selectinas está formada sólo por tres proteínas caracterizadas por poseer un dominio amino-terminal similar al de una lectina tipo-C, y por lo tanto capaz de ligar carbohidratos (ver figura 12-1), aunque de manera Ca^{2+} -dependiente. Dos de estas receptores, E-selectina (CD62E) y P-selectina (CD62P) se expresan en células endoteliales, mientras que el tercer miembro de la familia, L-selectina (CD62L) se expresa en leucocitos, a excepción de linfocitos de memoria/efectores (para distinguirlos de los linfocitos de memoria centrales que serían CD62L⁺). Además de poseer un dominio N-terminal de tipo C-lectina que aporta la especificidad a cada selectina, estas moléculas se caracterizan por poseer, inmediatamente a continuación de este dominio, una secuencia similar al factor de crecimiento epidermal (EGF, "Epidermal Growth Factor") seguido por un número variable de dominios SCR ("Short Consensus Repeats") análogos a los encontrados en las proteínas reguladoras del complemento (2 en L-selectina, 6 en E-selectina y 9 en P-selectina) seguido por una secuencia de transmembrana y una cola citoplasmática.

E-selectina (CD62E) se induce fuertemente en las células endoteliales durante la inflamación. Durante los procesos de inflamación crónica E-selectina se expresa en forma permanente en la piel donde es reconocida por un ligando sialilado (tipo SLe^x) denominado en linfocitos T como CLA ("Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen"), el cual se expresa preferentemente en una subpoblación de LT que migran a piel. Se sabe que CLA es a su vez una modificación postraducciona de otra proteína más general llamada PSGL-1 ("P-Selectin Glycoprotein Ligand-1"), la cual puede ser modificada además para formar ligandos para P-selectina.

P-selectina fue inicialmente caracterizada en plaquetas demostrándose posteriormente su presencia en células endoteliales. Tanto en plaquetas como en células endoteliales, P-selectina se acumula en gránulos (gránulos α en las plaquetas y cuerpos de Weibel-Palade en las células endoteliales) desde donde se moviliza a la membrana celular durante el proceso de activación. El

principal ligando para P-selectina es una estructura del tipo SLe^x que se forma por modificación postraducciona sobre PSGL-1 y probablemente otras glicoproteínas. Cabe destacar que para la formación de ligandos tanto para P- como para E-Selectina participan unas enzimas denominadas fucosiltransferasas, en particular la Fuc-IV y la Fuc-VII. La expresión de estas enzimas es modulada por citoquinas (en particular IL-12 y IL-4), que a su vez regulan la presencia o no de ligandos para estas selectinas en los linfocitos.

L-selectina, originalmente designada como un receptor de migración y posicionamiento de linfocitos ha sido más recientemente detectada en prácticamente todos los leucocitos. Sin embargo, y como veremos más adelante, esta molécula está expresada diferencialmente en diferentes subpoblaciones de LT, otorgándoles a su vez propiedades migratorias o de "homing" diferenciales. Dos ligandos tipo mucina (que poseen carbohidratos sulfatados, sialilados y fucosilados) parecen ser ligandos para L-selectina; GlyCAM-1 ("Glycosilation-dependent Cell Adhesion Molecule-1") y CD34, los cuales son sintetizados por las HEV de los ganglios linfáticos periféricos (donde colectivamente se denominan PNAd: "Peripheral Node Addressins"). Más recientemente se ha demostrado que además de $\alpha_4\beta_7$, la forma de MAdCAM-1 presente en HEV de placas de Peyer también actúa como receptor de L-Selectina.

Un listado de los receptores de adhesión descritos en el sistema inmune y sus ligandos se resume en la tabla 12-2.

4. INTERACCIONES LINFOCITO-ENDOTELIO

Estudios que datan de más de 30 años han demostrado que los linfocitos tienen normalmente la capacidad de migrar entre la sangre y la linfa, y pasar desde la sangre a los OLS tales como ganglios linfáticos periféricos (axilares, inguinales), ganglios mesentéricos, placas de Peyer, etc. transvasando a través del endotelio especializado de estos órganos. Este endotelio, denominado endotelio columnar alto (HEV: "High Endotelial Venules"), está formado por células endoteliales de morfología columnar, altamente especializadas en el tráfico linfocitario, lo cual se logra probablemente en parte por la expresión constitutiva de ligandos para L-selectina (ej. PNAd, MAdCAM) y para integrinas (ej. ICAM-



Tabla 12-2. Características de los linfocitos T vírgenes, de memoria centrales y de memoria efectores.

	LT vírgenes	LT de memoria centrales	LT de memoria efectores
Fenotipo	CD45RA ⁺ / CD44 ^{LOW}	CD45RO ⁺ / CD44 ^{HIGH}	CD45RO ⁺ / CD44 ^{HIGH}
Moléculas de adhesión	L-Selectina ^{HIGH} - LFA-1 ⁺	L-Selectina ^{HIGH} - LFA-1 ⁺	L-selectina ^{NEG} $\alpha 4\beta 7$ +o+CLA LFA-1 ⁺
Receptores de quimioquina	CCR7 ⁺ Sin especificidad tisular	CCR7 ⁺ Sin especificidad tisular	CCR7 ^{NEG} CCR9, CCR4, CCR6 o CCR10
Respuesta funcional al Ag	Expansión clonal (requiere <i>priming</i> por CD)	Proliferación rápida Dan origen a LT efectores de memoria	Proliferación rápida Actividad efectora inmediata (citoquinas o CTL)
Respuesta de citoquinas al Ag	IL-2 (retardada) IL-4	IL-2 (rápida), sin IFN- γ ni	IL-2, IFN- γ , IL-4
Divisiones inducida por el Ag	Ninguna	Varias	Muchas
Tejidos blanco de <i>homing</i>	OLS, médula ósea	OLS (ganglios, placas de Peyer)	Tejidos terciarios (piel, mucosa intestinal)

1, MAdCAM). El concepto actual es que el fenotipo “HEV” de estas vénulas sería dinámico (y reversible) y probablemente generado por el microambiente del OLS (entre otras cosas por la salida de elementos solubles vía linfáticos).

Por otro lado, se sabe que los linfocitos son capaces de atravesar el endotelio vascular plano de los diferentes tejidos (no linfoides) sólo en casos donde existan procesos de inflamación, aunque en el caso de algunos tejidos terciarios como la lámina propia del intestino parece existir expresión constitutiva de moléculas de "homing" como MAdCAM-1 y probablemente la quimioquina TECK (ver más adelante). La comprensión de los procesos de tráfico y de extravasación linfocitarios se ha visto incrementada en los últimos años gracias al avance en el conocimiento de los receptores de adhesión y por los estudios de las estructuras moleculares presentes en el endotelio que permiten el tráfico transepitelial. Uno de los conceptos importantes que ha surgido de esta nueva información es que existen vías migratorias diferentes para los linfocitos vírgenes versus los linfocitos efectores/de memoria. Este aspecto del tráfico linfocitario se verá más adelante en el punto 4 (regulación del posicionamiento o "homing" de los linfocitos). Un segundo aspecto que ha surgido de investigaciones recientes es el papel central que juegan algunas citoquinas y quimioquinas en la transvasación linfocitaria en la inflamación.

Finalmente, dentro de los resultados importantes que han emergido en los últimos años se encuentra el descubrimiento de que existen marcadas diferencias en la dotación de receptores y ligandos de adhesión en los diferentes endotelios. Primeramente, el endotelio plano normal (no inflamado) de los órganos no linfoides no presenta en su superficie luminal ligandos que permitan la extravasación linfocitaria de manera importante. Estos ligandos se inducen durante el proceso inflamatorio. Por otro lado, el epitelio columnar de los OLS presenta diferentes receptores y ligandos de adhesión dependiendo del sitio anatómico donde éste se encuentre. Así, dependiendo de sus estructuras adhesivas encontramos al menos tres grandes correlaciones; (i) HEV de los ganglios linfáticos periféricos; (ii) HEV de los ganglios mesentéricos, placas de Peyer y vénulas postcapilares de lámina propia intestinal y (iii) vénulas postcapilares de la piel. Cada uno de estos endotelios posee ligandos adhesivos propios que le permiten **seleccionar** subpoblaciones linfocitarias específicas. Algunos autores han postulado además la existencia de estructuras adhesivas propias en otros sitios tales como el pulmón y el tejido sinovial, aunque aún es controversial si existen en realidad vías de migración eficientes y específicas para esos tejidos.

A continuación se revisarán los mecanismos



involucrados en el tráfico en cada uno de estos endotelios y de las estructuras adhesivas implicadas.

4.1. Tráfico linfocitario a través del endotelio inflamado

En personas que sufren de LAD-1 ("Leukocyte Adhesion Deficiency-1"), enfermedad en la cual los pacientes muestran una especial susceptibilidad frente a infecciones bacterianas recurrentes, los leucocitos son incapaces de atravesar el endotelio y acumularse en los sitios de inflamación. Estudios de adhesión realizados *in vitro* con leucocitos de estos pacientes demostraron que éstos son incapaces de adherirse a monocapas de células endoteliales. Estos datos constituyeron las primeras evidencias de que los receptores de adhesión son requeridos en el proceso de transvasación leucocitaria *in vivo*. Una serie de estudios en estos pacientes demostró una deficiencia en la expresión de la cadena $\alpha\beta 2+$ (CD18) de las integrinas, implicando a esta integrina en el mecanismo de migración de los leucocitos desde el lumen vascular a los tejidos durante los procesos inflamatorios. Estudios más recientes han involucrado a varios otros receptores de adhesión en la transvasación, demostrando además la complejidad de este proceso.

Una de las primeras señales de inflamación es la captura de linfocitos y leucocitos por el endotelio (figura 12-2). Una serie de trabajos que incluyen elegantes estudios de microscopía intravital han ayudado a caracterizar una secuencia de interacciones adhesivas involucradas en la migración de los leucocitos desde la sangre a los sitios de inflamación. Bajo condiciones normales de flujo, la interacción de los leucocitos con el endotelio es un fenómeno enteramente al azar observándose que los leucocitos ruedan ("rolling") a lo largo del vaso sanguíneo. En las cercanías de un sitio donde haya ocurrido un daño vascular o un proceso inflamatorio, la producción de citoquinas y otros mediadores de la inflamación inducen una disminución de la velocidad del flujo leucocitario observándose el **aplanamiento** de los leucocitos sobre el endotelio y su **firme adhesión** a éste. Posteriormente, algunos de los leucocitos se "arrastran" por el endotelio buscando un sitio por el cual atravesarlo, pasando finalmente por entre las células endoteliales (diapédesis). Una vez que los leucocitos se encuentran en el tejido subendotelial, éstos continúan su migración hacia

el sitio de la inflamación. Todos estos procesos, desde la interacción al azar de los leucocitos con el endotelio hasta la migración final de éstos al sitio de inflamación están regulados por interacciones mediadas por moléculas de adhesión. Una serie de estudios con anticuerpos específicos indican que el rodar de los leucocitos sobre el endotelio luego de una lesión del tejido, está mediado por múltiples interacciones de baja afinidad. Estos contactos involucran predominantemente la interacción entre selectinas y sus respectivos ligandos tipo Sialil L-X. Así, en esta etapa se han demostrado la interacción de L-Selectina presente en los leucocitos con sus ligandos en el endotelio (GlyCAM-1 y CD34) así como la de P-Selectina (constitutiva en el endotelio) y E-Selectina (inducida en el endotelio por acción de citoquinas pro-inflamatorias) con sus correspondientes estructuras sialiladas y fucosiladas expuestas en la membrana del leucocito (SLe^x). De este modo, el "rolling" de los leucocitos sobre el endotelio está fuertemente regulado por las selectinas que actuarían en forma coordinada. Estudios más recientes han implicado, además de las selectinas, la acción de integrinas en el "rolling" de los leucocitos sobre el endotelio. Ciertas líneas celulares linfoides usan $\alpha 4\beta 7$ para rodar sobre VCAM-1 o sobre MAdCAM-1 en el endotelio de las mucosas como se enunció anteriormente.

En una segunda fase del proceso de transmigración leucocitaria se produce un aumento en la fuerza de la adhesión lo que lleva a una adhesión firme de los leucocitos al endotelio y su detención sobre éste ("sticking"). En este proceso de adhesión firme participan receptores de adhesión de la familia de las integrinas en los leucocitos y de la SFIg en el endotelio. La participación de estos receptores de adhesión ocurre luego de un proceso de activación de las integrinas (por cambios conformacionales en el heterodímero), o por mecanismos que actúan para modular la afección de las integrinas presentes en los leucocitos, así como también por un aumento en la expresión de novo de receptores de la SFIg. Entre éstos encontramos la acción de ciertas quimioquinas (IL-8 o MIP-1 β), citoquinas como IL-5, o quimioattractantes como C5a producidos localmente en el sitio de la inflamación). Por otro lado, el entrecruzamiento de ciertas proteínas en la superficie de los linfocitos tales como CD2, CD3, CD44 así como de las selectinas E y P del endotelio por sus respectivos ligandos inducen un

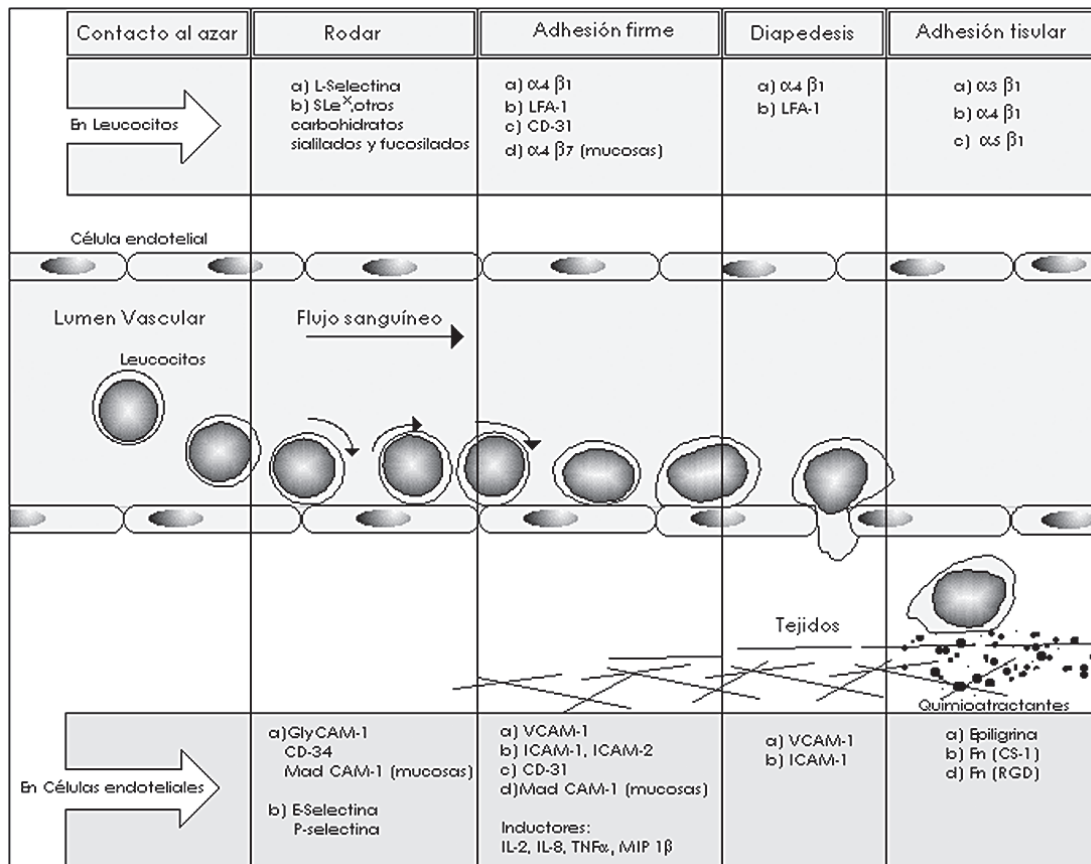


Figura 12-2. Modelo de las interacciones adhesivas que actúan en la migración transendotelial. Los leucocitos toman contacto al azar con el endotelio sobre el cual ruedan ("rolling"). En las cercanías del sitio en que ocurre un proceso inflamatorio disminuyen la velocidad, sufriendo aplanamiento y adhesión firme al endotelio. Posteriormente los leucocitos salen del vaso sanguíneo, pasando entre las células endoteliales (diapedesis) y llegan al sitio de inflamación. Obsérvese la participación de distintas moléculas de adhesión por parte de los leucocitos y células endoteliales, en las diferentes etapas del proceso.

aumento en la avidéz de las integrinas β_2 , en especial CD11aCD18 (LFA-1). Así también, la adhesión de LT al endotelio mediante CD31 (PECAM-1) una molécula de adhesión de la SFI presente tanto en el endotelio como en leucocitos (que promueve la adhesión a través de interacciones homotípicas CD31-CD31) aumenta la actividad funcional de las integrinas β_1 . Por otro lado, moléculas tales como TNF- 1β , IFN- γ e IL-1 inducen en el endotelio la expresión de VCAM-1 y de ICAM-1, ligandos de las integrinas linfocitarias $\alpha 4 \beta 1$ y CD11aCD18 (LFA-1), respectivamente. El resultado final de la inducción de nuevas moléculas de adhesión o del aumento de la afinidad y avidéz de receptores preexistentes originan nuevas interacciones adhesivas entre integrinas y moléculas de la SFIg con sus respectivos ligandos provocando la adhesión firme de los leucocitos al endotelio. Luego de este proceso de adhesión firme, la gran mayoría de los

leucocitos adheridos al endotelio comienzan a arrastrarse sobre la superficie de éste mediante un proceso que requiere la modulación cíclica de la actividad de las integrinas y sus ligandos. Algunos leucocitos logran introducirse en las uniones entre las células endoteliales para pasar por diapedesis al espacio extravascular. Este fenómeno de trans migración está fuertemente regulado por la acción de quimioattractantes como IL-8 y citoquinas como IL-1 y TNF- α producidos localmente. Dado que la adhesión es un requisito de la diapedesis, los estudios dirigidos a identificar los receptores involucrados en el proceso de diapedesis se han visto complicados por la dificultad de distinguir entre la participación de los receptores de adhesión en la adhesión propiamente tal o en la trans migración. Sin embargo, los resultados obtenidos a la fecha involucran la participación de ICAM-1 y su receptor CD11aCD18 (LFA-1) y del par VCAM-



1/ $\alpha 4\beta 1$ en el fenómeno de migración transendotelial de los leucocitos.

Una vez que los linfocitos han atravesado la pared vascular, deben adherirse a las células del epitelio o a los elementos de la matriz extracelular. La evidencia experimental sugiere que la activación de los LT *in vivo* produce un aumento de la avidéz de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2++$ por largos períodos, lo que permitiría la mantención de los LT activados en el microambiente local del sitio de la inflamación. Moléculas de la matriz extracelular tales como fibronectina y trombospodina jugarían a través de su interacción con $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$ un rol central en este fenómeno. Un efecto similar tendría la interacción entre la integrina $\alpha 3\beta 1$ con epiligrina, una molécula de la membrana basal de los epitelios. Aquellos linfocitos que hayan disminuido la afinidad/avidéz de sus integrinas u otros receptores de adhesión abandonarían el sitio de la inflamación para volver a la circulación vía linfáticos.

4.2. Tráfico linfocitario a través del endotelio columnar (HEV)

En los ganglios u otros órganos linfoides secundarios tales como en las placas de Peyer, amígdalas, etc. el endotelio venular se encuentra formado por un tipo específico de célula endotelial, la célula endotelial columnar (HEV: "High Endothelial Venules"). Estas células expresan receptores de adhesión diferentes que las células endoteliales planas de la vasculatura periférica y están especializadas en la migración de los linfocitos hacia el interior de los órganos linfoides secundarios. Aproximadamente un 25% de los linfocitos que circulan por el endotelio columnar lo atraviesan para entrar al OLS, comparado con el bajo número de linfocitos que atraviesan el endotelio vascular normal. Esto se debe a que las HEV expresan vías de adhesión en forma constitutiva, mientras que en el endotelio normal estas vías de adhesión sólo se activan durante la inflamación. Los mecanismos adhesivos que actúan en las HEV son diferentes y dependiendo del órgano en cuestión, ya que diferentes receptores de adhesión se expresan en los ganglios periféricos comparadas por ejemplo con aquellas expresadas por las HEV de placas de Peyer, ganglios mesentéricos, u otras mucosas. En el bazo, por otro lado, la entrada de los linfocitos no ocurre a través del endotelio sino que se efectúa, fundamentalmente, por la

descarga directa de éstos a los sinusoides en la llamada circulación abierta.

Endotelio Columnar Ganglionar. En los ganglios periféricos se han encontrado dos ligandos específicos para L-Selectina denominados domicilinas ("addressins"); GlyCAM-1 ("Glycosylation-dependant Cell Adhesion Molecule-1") y CD34. Ambos ligandos son mucinas que portan cadenas laterales de carbohidratos que requieren estar sialiladas, y sulfatadas para unir L-Selectina. Estos ligandos, que se expresan en mayor abundancia en el endotelio de los ganglios periféricos que en cualquier otro órgano, permitirían la recirculación de linfocitos vírgenes (L-selectina+), así como también de un subgrupo de linfocitos de memoria (centrales) CD62L+ hacia estos ganglios. ICAM-1, presente en las HEV también ha sido involucrado en la recirculación de linfocitos a los ganglios periféricos ya que anticuerpos contra esta molécula bloquean la migración de los linfocitos desde la sangre a los ganglios. Puesto que CD11aCD18 (LFA-1), el ligando de ICAM-1 presente en los linfocitos, se encuentra normalmente en un estado inactivo, éste debe ser activado previamente para que se una a su receptor, lo cual está dado por las quimioquinas SLC y/o ELC, las cuales se unen al receptor CCR7, el que se encuentra expresado específicamente en LT vírgenes y de memoria centrales. El papel e importancia crucial de las quimioquinas en la cascada de adhesión ya se ilustró al inicio de este capítulo, pero baste recordar que se ha demostrado que la presencia tanto de CCR7 como de sus ligandos son esenciales para permitir la adhesión firme del linfocito T. Para ilustrar aún más la importancia del modelo secuencial de múltiples pasos, esta cascada permite explicar por qué por ejemplo los neutrófilos (que no poseen CCR7) son incapaces de adherir y transmigrar en ganglios periféricos (aún cuando expresan L-selectina). Aunque el entrecruzamiento del TCR es capaz de producir activación de las integrinas, se sabe que en el endotelio esto ocurre por una vía independiente de la estimulación del LT por su antígeno ya que los linfocitos vírgenes que entran a los ganglios como parte del proceso de vigilancia inmune normal no se encuentran necesariamente activados. Estudios recientes en endotelio aislado de amígdala humana indican que VCAM-1 se expresaría en forma constitutiva en este endotelio, sugiriendo la participación del par VCAM-1/ $\alpha 4\beta 1$ en la entrada de los linfocitos a este órgano.



Endotelio columnar de placas de Peyer.

Estudios de bloqueo de la adhesión con anticuerpos específicos permitieron la identificación de una nueva molécula de adhesión llamada MAdCAM-1 ("Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1"), la cual es virtualmente específica del endotelio de mucosa intestinal. MAdCAM-1 se expresa principalmente en el endotelio de placas de Peyer, en el endotelio de la lámina propia del intestino, y en las vénulas de la glándula mamaria. Esta molécula, que presenta dominios tipo Ig y tipo mucina, tiene dos receptores descritos. Uno de ellos es una molécula de la familia de las integrinas que presenta la cadena $\alpha 4$ ligada a la cadena $\beta 7$. El otro es L-Selectina, aunque como se mencionó, L-selectina sólo se une a la forma de MAdCAM presente en placas de Peyer. Experimentos de adhesión han demostrado que células portadoras de $\alpha 4\beta 7$ pero no $\alpha 4\beta 1$ son capaces de adherirse a HEV de placas de Peyer o a MAdCAM-1 directamente. Por otro lado, y de acuerdo con el modelo secuencial de múltiples pasos, recientemente se ha descrito que el receptor de quimioquina CCR9 está presente preferentemente en LT efectoras y/o de memoria de lámina propia y también en linfocitos intraepiteliales (IEL) de intestino delgado. Interesantemente, su expresión está fundamentalmente restringida a LT $\alpha 4\beta 7^+$, por lo que se ha planteado que éste sería el receptor de quimioquina encargado específicamente de activar la adhesión mediada por esta integrina en la mucosa del intestino delgado. Adicionalmente, el único ligando descrito para CCR9, la quimioquina TECK (CCL25) se ha descrito en endotelio de lámina propia.

En resumen, la presencia o ausencia de ciertos receptores de adhesión en los linfocitos, o de determinados ligandos en el endotelio columnar de diferentes órganos linfoides definirían las subpoblaciones de linfocitos que migrarían a los diferentes órganos. Así, a los ganglios periféricos migran linfocitos con un fenotipo L-Selectina⁺/XCR7⁺/LFA⁺, mientras que los linfocitos que migran a placas de Peyer y lámina propia intestinal tendrían un fenotipo L-selectina^{low}/XCR9⁺/ $\alpha 4\beta 7^+$.

4.3. Tráfico linfocitario hacia la piel

Estudios recientes han demostrado que el endotelio de la piel expresa E- y P-Selectina de manera inducible y también constitutiva (aunque

débil). E-Selectina se induce preferencialmente en las vénulas de la piel durante los estados de hipersensibilidad de tipo retardada y durante las inflamaciones crónicas de la piel, proporcionando uno de los elementos centrales que influencia el paso de linfocitos T a la piel. En humanos, estudios efectuados en linfocitos localizados en la piel, han demostrado que éstos expresan un carbohidrato específico denominado "Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen" (CLA). Esta molécula, la cual, como se mencionó, es una modificación postraducciona de PSGL-1, parece encontrarse exclusivamente en linfocitos T de tipo memoria/efector en la dermis y está ausente en otras subpoblaciones linfocitarias provenientes de otros epitelios. CLA aparece como el principal ligando de E-Selectina en esos tejidos. Dado que E-Selectina se expresa también en otros tejidos además de la piel, se ha sugerido que la interacción CLA/E-Selectina no sería suficiente para explicar la exquisita segregación de los linfocitos CLA⁺ en la piel. A este respecto, y al igual que para otros tejidos, se ha planteado recientemente que un elemento de especificidad adicional (y probablemente determinante), sería el grupo de receptores de quimioquina que estaría presente en LT CLA⁺. En particular, se ha planteado que CCR4, y más recientemente CCR10 y CCR6 tendrían un papel importante en la determinación de especificidad migratoria fina de LT a piel, donde además se han identificado las quimioquinas y/o ligandos para estos receptores (MDC/TARC, CTACK, y MIP3 α , respectivamente). Sin embargo, hasta el momento esto último es controversial, ya que se ha identificado que por ejemplo CCR4 se encuentra también en LT CLA negativos y que se expresa además en linfocitos Th2, por lo cual su especificidad en relación a "homing" a piel es, a la fecha, cuestionable.

5. REGULACIÓN DEL POSICIONAMIENTO ("HOMING") DE LINFOCITOS

¿Qué determina que un linfocito virgen adquiera después de activarse un potencial de "homing" tejido-específico?. Para ilustrar la importancia de esta pregunta, vale la pena recordar que los LT vírgenes pueden migrar indistintamente por todos los OLS (ganglios periféricos, mesentérico y placas de Peyer), pero que sólo después de activarse y pasar a ser LT de memoria y/o efectoras adquieren preferencia para migrar a



determinados tejidos y no otros, fenómeno que se ha denominado "homing" o posicionamiento tejido-específico (ej. aquellos con "homing" a mucosa intestinal no migran a piel y viceversa). Es importante mencionar que el hecho de que los linfocitos presenten restricción y especificidad en cuanto al "homing" a determinados tejidos es determinante para el desarrollo o no de una respuesta inmune adecuada, especialmente si se considera que aquellos linfocitos que presentan "homing" tejido-específico son los llamados efectores y/o de memoria, y que justamente son los que están encargados de proteger más eficientemente frente a un segundo encuentro con el antígeno. Adicionalmente, en modelos animales de algunas enfermedades autoinmunes intestinales (ej. enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa) se ha demostrado que el bloqueo de una de las moléculas implicadas en el "homing" a mucosa intestinal ($\alpha_4\beta_7$) tendría la capacidad de disminuir importantemente la severidad de la enfermedad. Esto tiene la ventaja de que al posibilitarse la respuesta inmune en otros tejidos, no sería necesario inmunosuprimir a los pacientes (como lo hacen las terapias inmunosupresoras estándar en uso actualmente). Sin embargo, la meta más ambiciosa final sería poder bloquear el "homing" a un tejido sólo de aquellos clones implicados en la respuesta patológica, dejando la posibilidad de que otros clones no patogénicos puedan responder a otros antígenos en ese tejido, es decir, en el fondo un modo de establecer tolerancia específica por esta vía.

Volviendo a la pregunta inicial de qué determina el "homing" tejido-específico en un linfocito al activarse y pasar a ser linfocito efector y/o de memoria, partiremos mencionando que existen al menos cuatro teorías conceptualmente diferentes que intentan explicar este mismo fenómeno. Aunque algunas de ellas tienen mayor o menor aceptación, todas están basadas en algunos hechos comunes. Se ha demostrado que si se reinfunde en un animal linfocitos tomados desde un tejido, éstos preferentemente migrarán al tejido desde donde fueron aislados (en este sentido presentan "homing" por el tejido de origen) y que linfocitos efectores/de memoria tomados desde piel o mucosa intestinal, presentan preferentemente receptores de "homing" específicos para piel o mucosa intestinal respectivamente. A continuación se discutirá brevemente las diferentes teorías que intentan dar cuenta de los hechos descritos anteriormente, para

lo cual se mencionará antecedentes que permiten apoyarlas como también algunas de sus debilidades.

a) La teoría actualmente más aceptada es aquella que propone que el sitio de entrada del antígeno determinaría de algún modo el fenotipo de "homing" de un linfocito. A este respecto, existen dos trabajos que muestran (en humanos) que un antígeno que entra por vía oral produce un significativo mayor número de clones que expresan la molécula de migración específica a la mucosa intestinal $\alpha_4\beta_7$ y que son, al mismo tiempo, específicos contra el antígeno, comparados con el mismo antígeno inoculado por vía parenteral (lo cual de hecho produce clones específicos contra el antígeno, pero que son $\alpha_4\beta_7$ -negativos). Estos trabajos tienen el valor de haber sido hechos en humanos, pero al mismo tiempo presentan el problema de haber usado antígenos complejos (con muchos potenciales epítopos); cabe así la posibilidad de inducir la respuesta de diferentes clones T y por tanto cabría la posibilidad de que no sea la misma especificidad de linfocito la que se expande preferentemente al inmunizar por una u otra vía, con lo cual existe la posibilidad de que en un caso se expandan clones predeterminados para ser $\alpha_4\beta_7$ -positivos y en el otro, clones predeterminados para ser $\alpha_4\beta_7$ -negativos. Al mismo tiempo, el hecho de administrar el antígeno por una u otra vía no garantiza que la activación se producirá sólo localmente en el tejido de entrada (de hecho, se ha demostrado que un antígeno que entre por vía oral puede activar también linfocitos en el bazo). Aunque esta es una hipótesis teleológicamente atractiva, puesto que "tiene sentido fisiológico" que un linfocito vuelva donde encontró por vez primera su antígeno, es bueno ser cautelosos al interpretar los datos que la sustentan.

b) Otra hipótesis sostiene que la dotación de receptores de "homing" estaría fuertemente asociada al fenotipo Th1 o Th2 de un linfocito. En lo concreto, se ha demostrado que células cultivadas en condiciones de polarización Th1, pero no Th2, adquieren expresión de ligandos para P y E-selectinas y por lo tanto capacidad de "homing" a piel y otros tejidos inflamados. Tratando de conciliar este modelo con el anterior, cabe destacar que en mucosa intestinal se ha descrito una desviación del equilibrio de linfocitos hacia Th2, lo cual está de acuerdo con el hecho de que los linfocitos activados en ese microambiente no expresarían ligandos para P/E-selectinas. Sin



embargo, otro trabajo logró demostrar que *in vivo* no existiría una asociación predominante entre el ligando de E-selectina CLA ("homing" a piel) con el fenotipo Th1 o Th2, lo que sugiere que si bien es cierto que bajo condiciones *in vitro* sería posible encontrar una asociación con un fenotipo o molécula de "homing", esta asociación no necesariamente ocurre *in vivo*.

c) Otros autores han propuesto que el hecho de encontrar linfocitos con un fenotipo predominante en un tejido dependería de diferencias en la tasa de proliferación y/o apoptosis de estas células en el tejido, es decir, linfocitos activados en un tejido determinado tendrían una mejor posibilidad de sobrevivir y/o proliferar en ese mismo tejido. De esta manera, los partidarios de esta hipótesis sostienen que la acumulación de linfocitos en un tejido determinado no dependería de la entrada preferencial de estas células al tejido (es decir no dependería de mayor adhesión de esos linfocitos al endotelio), sino que de una mayor o menor proliferación y/o apoptosis de estas células en el tejido. Sin embargo, los datos que sustentan esta hipótesis podrían también ser explicados en el contexto de una preferencia en el "homing" en vez que en diferencias de proliferación y/o apoptosis.

d) Finalmente, una hipótesis que ha sido planteada recientemente es que sería el tejido en sí el que seleccionaría los linfocitos con el fenotipo de "homing" "adecuado". Hasta el momento no existen datos que apoyen directamente esta hipótesis, aunque a decir verdad tampoco existe evidencia formal que permita descartarla totalmente. Sin embargo, los autores de esta hipótesis sostienen que a la luz de los datos actuales no se puede excluir que el hecho de encontrar linfocitos preferentemente con un determinado fenotipo de "homing" en un tejido podría ser el resultado de un evento inicial estocástico donde los linfocitos al activarse adquieran una dotación de receptores de *homing* al azar, y que sea el tejido en sí (con su dotación específica de addressins) el que seleccione aquellos linfocitos con la dotación de receptores adecuada o necesaria para entrar. De este modo, por ej. si el antígeno entra por vía mucosa, esto favorecería la proliferación y supervivencia de aquellos linfocitos $\alpha_4\beta_7^+$ que pudieron entrar al tejido mucoso, pero no de aquellos $\alpha_4\beta_7^-$ que no ingresaron, lo cual a su vez contribuiría aún más a la selección "adecuada" y proliferación de determinados clones. Con esto, el resultado final

sería el mismo, es decir, sólo se encontrarían en un tejido linfocitos con un determinado fenotipo de "homing" pero no otro, sin que necesariamente exista un evento "instructivo" inicial en este fenotipo. Aunque esta es una hipótesis altamente provocativa, como se mencionó anteriormente no existen evidencias que la apoyen directamente.

De todas las hipótesis enunciadas anteriormente, la más aceptada actualmente es que el sitio de entrada del antígeno, es decir el tejido donde el linfocito encontraría su antígeno, jugaría un rol determinante en la inducción de "homing" tejido-específico. La mayor popularidad de esta hipótesis se debe probablemente a que pensado desde un punto de vista funcional es más "atractivo" fisiológicamente pensar que el potencial de "homing" pueda ser instruido por el microambiente del tejido donde es presentado el antígeno, de manera tal que el linfocito predominantemente regrese al sitio donde es más probable que vuelva a encontrar el antígeno, y al mismo tiempo donde realmente se necesita esta respuesta inmune, disminuyendo por otro lado la probabilidad de daño en tejidos donde esta respuesta no se necesita. Desde hace más de 10 años que se piensa que el potencial de "homing" tejido-específico de un linfocito podría ser instruido por el "microambiente" del tejido en el cual este linfocito es activado. Sin embargo, actualmente es completamente desconocido qué elementos en el tejido serían los encargados de determinar esta propiedad en los linfocitos. Poder contestar esta pregunta no sólo es importante desde el punto de vista mecanístico, sino porque además daría la posibilidad de poder modular la respuesta inmune en forma más específica.

En nuestro laboratorio hemos abordado esta pregunta planteando como hipótesis que los elementos que determinarían el "homing" dentro de un tejido serían las DC presentadoras de antígeno. Esta hipótesis se basa, entre otras cosas, en el hecho de que para que un linfocito adquiera un potencial de "homing" tejido-específico debe en primer lugar ser activado, y que actualmente se acepta que las únicas células presentadoras de antígeno capaces de activar eficientemente linfocitos T vírgenes son las DC. Dado lo anterior, estas células serían al menos elementos necesarios en este proceso. Los resultados de nuestro laboratorio están plenamente de acuerdo con nuestra hipótesis ya que muestran que comparadas con DC de ganglios linfáticos periféricos (PLN) o bazo las DC derivadas de placas de Peyer son



capaces de inducir una significativa mayor expresión de la integrina de "homing" a mucosa+ $\alpha_4\beta_7$ en linfocitos T y una clara respuesta a la quimioquina TECK, que como se discutió anteriormente son las dos moléculas que han sido postuladas como receptores de "homing" para mucosa intestinal. En acuerdo con estos resultados hemos logrado demostrar además que estas diferencias fenotípicas se traducen efectivamente en una diferencia funcional *in vivo*, ya que linfocitos activados con CD de placas de Peyer migran significativamente más a placas de Peyer y dramáticamente mejor a lámina propia del intestino comparados con aquellos activados con CD de PLN. Finalmente, en nuestros ensayos hemos encontrado que la mayor expresión de+ $\alpha_4\beta_7$ +inducida por CD de placas de Peyer no se asocia a una mayor o menor producción de IFN- γ , lo que nos ha llevado a pensar que el fenotipo de "homing" no necesariamente se correlaciona con una u otra respuesta T "helper".

En su conjunto, nuestros resultados destacan una forma completamente nueva en la cual CD pueden "educar" a LT.

Un concepto propuesto recientemente es que, en general, existirían diferentes subpoblaciones de LT, a saber: LT naïve, LT de memoria centrales, y

LT de memoria efectores. Esta clasificación está basada en la expresión diferencial de las isoformas CD45RA y CD45RO y de las moléculas de "homing" L-selectina y CCR7, así como también por características funcionales diferenciales. Esto ha planteado un nuevo paradigma para estudios subsecuentes, por lo cual creemos importante mencionar las propiedades generales de estas subpoblaciones descritas (tabla 12-3).

La existencia de subpoblaciones de LT de **memoria efectores** se correlacionaría con lo que actualmente conocemos en relación a "homing" de LT a tejidos terciarios, tejidos en los cuales se encuentran predominantemente LT con fenotipo CD44^{HIGH} / CD45RO / L-Selectina^{NEG} / y con dotación de moléculas de "homing" específicas para el tejido analizado (ej. $\alpha_4\beta_7$ / CCR9 para mucosa intestinal y CLA para piel). Por otro lado, la funcionalidad de los putativos LT de **memoria centrales** sería mantener un pool de LT de memoria (con rápida respuesta al antígeno) que mantenga la capacidad de acceder a OLS en el caso que el antígeno (o uno relacionado) entre por una vía diferente a aquella que utilizó la primera vez. A su vez, frente a una segunda estimulación antigénica, estos LT de memoria centrales darían origen a LT de memoria efectores, los cuales per se tendrían

Tabla 12-3. Características de los LT naïve, de memoria central y memoria efector

Fenotipo	LT Naïve	LT de memoria central	LT de memoria efector
	CD45RA ⁺ /CD44 ^{Low}	CD45RO ⁺ / CD44 ^{High}	CD45RO ⁺ / CD44 ^{High}
Moléculas de adhesión	L-Selectina ^{High} $\alpha_4\beta_7$ +/-/+CLA- LFA-1 ⁺	L-Selectina ^{High} $\alpha_4\beta_7$ +/-/+CLA- LFA-1 ⁺	L-Selectina ^{Neg} $\alpha_4\beta_7$ +/-/+CLA ^{+/-} LFA-1 ⁺
Receptores de quimioquina	CCR7 ⁺ Sin especificidad tisular	CCR7 ⁺ Sin especificidad tisular	CCR7 ⁻ CCR9 ^{+/-} +/- CCR4 ^{+/-} CCR6 ^{+/-} / CCR10 ^{+/-}
Respuesta funcional al Ag	Expansión clonal (requiere "priming" por CD)	Proliferación rápida Dan origen a LT efectores de memoria	Proliferación rápida Actividad efectora inmediata (citoquinas o CTL)
Respuesta de citoquinas al Ag	IL-2 (retardada)	IL-2 (rápida), sin IFN- γ ni IL-4	IL-2, IFN- γ , IL-4
Divisiones inducidas por el Ag	Ninguna	Varias	Muchas
Tejidos blanco de "homing"	OLS, médula ósea	OLS (ganglios, placas de Peyer)	Tejidos terciarios (piel, mucosa intestinal, otros?)



un compromiso más restringido para circular por ciertos tejidos terciarios y no otros (pero no por OLS). Es importante mencionar, que aunque esta subdivisión de los LT de memoria es atractiva y permite explicar algunos fenómenos, su funcionalidad *in vivo* en términos de migración diferencial de estas diferentes subpoblaciones aún no ha sido demostrada. Por otro lado, esto se ha descrito hasta el momento en humanos, y no es conocido actualmente si existe un ejemplo murino para estos diferentes subtipos de LT. Tampoco se conoce qué factores determinan que durante una estimulación antigénica determinados LT progresen hasta el estadio de LT de **memoria centrales** y otros hasta LT de **memoria efectores**.

A modo de resumen, y tomando en cuenta esta última subdivisión mencionada, los linfocitos LT podrían ser clasificados de acuerdo a su potencial de "homing" como se indica en la tabla 12-4.

involucradas aún no se han definido con certeza.

6. RECEPTORES DE ADHESIÓN EN LA DIFERENCIACIÓN Y ACTIVACIÓN LINFOCITARIA

6.1. Receptores de adhesión y diferenciación temprana en la médula ósea

Aunque son escasos los estudios que ligan la participación de moléculas de adhesión y sus ligandos en la diferenciación de linfocitos B en la médula ósea, algunos resultados en conjunto con datos de experimentos realizados *in vivo* con anticuerpos versus receptores de adhesión en primates, demuestran en forma clara la importancia de los receptores de adhesión y sus ligandos en la linfopoyesis temprana.

Tabla 12-4. Potencial de "homing" de los linfocitos T según su estado de diferenciación.

	"Tethering"/"Rolling"		Activación		"Sticking"	
	LT	Endotelio	LT	Endotelio	LT	Endotelio
LT naïve y LT de memoria centrales						
Migración a OLS Sin restricción	L-selectin	PNAd (GlyCAM-1, CD34) / MAdCAM-1	CCR7	SLC /ELC	LFA-1	ICAM-1
LT de memoria efectores						
Migración a mucosa intestino delgado	$\alpha_4\beta_7$	MAdCAM-1	CCR9?	TECK?	$\alpha_4\beta_7$ LFA-1? ICAM-1?	MAdCAM-1
Migración a piel	CLA / Otros ligandos de P/E-selectina?	E / P-selectinas	CCR4? CCR6? CCR10?	MDC /TARC? MIP3 CTACK?	LFA-1 $\alpha_4\beta_1$?	ICAM-1 VCAM-1?

En relación a "homing" tejido-específico de linfocitos a otros territorios, al día de hoy se piensa que, en efecto, existirían otras vías de migración. A este respecto, cabe mencionar que se han postulado vías de "homing" específico a pulmón, articulaciones, mucosa de intestino grueso, médula ósea, y eventualmente sistema nervioso central, aunque su especificidad y las moléculas

Las células estromales de la médula ósea, en conjunto con receptores de la matriz extracelular (MEC) proporcionan el microambiente necesario para la linfopoyesis y la hematopoyesis en general. Algunas de las células que conforman el complejo estroma medular proporcionan las citoquinas requeridas para la diferenciación de los linfocitos B en la médula, mientras que otras



señales necesarias para esta diferenciación provienen de la interacción directa entre las células estromales y los precursores linfocitarios. *In vivo*, la interacción entre los precursores linfoides y el microambiente medular es compleja; durante las primeras etapas de diferenciación los precursores deben permanecer en ciertas zonas cercanas a la periferia de la médula para moverse luego hacia el centro donde su interacción con células reticulares y macrófagos de la médula promueve la diferenciación. Finalmente las células pasan al seno central de la médula, en donde su interacción con las células endoteliales permite a los linfocitos maduros salir finalmente a la circulación como linfocitos B vírgenes. Estos procesos e interacciones requieren de la participación de receptores de adhesión y sus respectivos ligandos, de manera que estas moléculas juegan un papel central en la regulación de la linfopoyesis. Algunas de las interacciones que han sido reconocidas en este proceso incluyen contactos entre la integrina $\alpha 4 \beta 1$ + (VLA-4) presente en los precursores linfoides y su ligando VCAM-1 presente en células del estroma medular o con fibronectina presente en la MEC. Anticuerpos anti-VLA-4 o contra VCAM-1 bloquean la adhesión de progenitores de líneas celulares B a cultivos de médula ósea e inhiben la diferenciación de células B en cultivos de médula ósea de larga duración. Un receptor de adhesión presente en los linfocitos y que no pertenece a ninguna de las familias antes mencionadas es CD44. Esta molécula, que tiene como ligando al ácido hialurónico, es una proteína de membrana que como resultado de un proceso de "splicing" alternativo de su mRNA presenta múltiples isoformas en la membrana celular (una de las cuales está presente en los linfocitos efectores y de memoria). CD44 participa en varias etapas durante la linfopoyesis así como en la recirculación linfocitaria. Los progenitores B presentan altos niveles de CD44 en su membrana, niveles que disminuyen durante la maduración para volver a aumentar en el linfocito B maduro. Anticuerpos anti-CD44 bloquean la interacción entre los precursores B y líneas celulares derivadas de la médula ósea e interesadamente son capaces de inhibir la diferenciación de linfocitos B en cultivos de médula ósea.

Por otro lado, y aunque no cabe duda de la participación de receptores de adhesión en la diferenciación de linfocitos T en el timo, la contribución de moléculas de adhesión específicas en este proceso es menos clara, debido

fundamentalmente a la insuficiencia de los modelos experimentales con que se cuenta para estudiar las interacciones celulares en el timo. La participación de receptores de adhesión en las interacciones entre las células T maduras y células accesorias o con los linfocitos B durante la ayuda inmune se discutirá más adelante.

6.2. Receptores de adhesión y diferenciación en el microambiente de los OLS

Los receptores de adhesión participan también en las etapas finales de la diferenciación de los linfocitos B activados en el microambiente de los OLS. Estas interacciones incluyen entre otras: (i) contactos que ocurren en las zonas T del OLS entre linfocitos T específicos para un cierto antígeno y las DC interdigitantes (DC-I), que a su vez son un subgrupo de las CD y (ii) interacciones en el centro germinal entre los linfocitos B activados con las DC foliculares (DC-F) y los LT específicos para el mismo antígeno.

Las DC-I se encuentran en la zona T de los OLS y en otros órganos no linfoides tales como corazón, pulmones, riñones, etc. Estas células presentan una alta expresión de antígenos MHC clase II y como se discutió son centrales en la iniciación de la activación de LT, actuando como células presentadoras de antígeno y entregando además una segunda señal coestimuladora a los LT (ej. CD80, CD86, CD2-Ligando), señal que depende de la interacción íntima entre el LT y la DC-I. Las DC-I expresan además numerosos receptores de adhesión, incluyendo CD11aCD18 (LFA-1), ICAM-1, ICAM-2 y CD44. Experimentos realizados con anticuerpos contra diferentes receptores de adhesión o sus ligandos bloquean la respuesta de LT estimulada por DC-I. Estos resultados sugieren que la interacción funcional entre las DC-I y los LT requiere de interacciones entre los pares adhesivos ICAM-1/LFA-1, y ICAM-2/LFA-1. En particular, se sabe que la interacción ICAM-1/LFA-1 es esencial para la respuesta CD8 CTL, ya sea primaria o secundaria.

Por otro lado, las DC-F actúan como un importante sistema para atrapar antígeno en el tejido linfoide ya que ellas ligan complejos antígeno-anticuerpo en forma altamente eficiente en los denominados **icosomas**. Se postula que la interacción de los linfocitos B con los complejos icosomas presentes en la superficie de las DC-F y con los LT específicos para el mismo antígeno (previamente activados en la zona T por las DC-



I), conjuntamente con la producción local de citoquinas en el centro germinal, jugarían un papel central en mecanismos tan importantes como salvar a los LB de la apoptosis, en la inducción de la síntesis de anticuerpos, en los cambios de clase de inmunoglobulina, en la llamada **maduración de afinidad** de los LB, y probablemente en la mantención de LB de memoria. Aunque el detalle de los mecanismos moleculares involucrados en estos procesos se desconoce, existe evidencia de que los receptores de adhesión tendrían un papel central en estos importantes fenómenos. Recientemente se ha demostrado la presencia de VCAM-1 e ICAM-1 en DC-F. Experimentos con anticuerpos contra estas moléculas o contra los respectivos receptores de adhesión $\alpha 4\beta 1$ y CD11aCD18 (LFA-1) presentes en los LB, han permitido establecer la participación de estos pares adhesivos en las interacciones celulares en el centro germinal. En relación al "homing" de los LB en el microambiente de los folículos linfoides, se ha demostrado que el receptor de quimioquina CXCR5 presente en LB, al igual que su ligando BLC (CXCL13) producida específicamente por DC-F en el folículo de los OLS (excepto en ganglios periféricos, donde se piensa que este rol es cumplido por MIP-3 α o MIP-3 α) son requeridos para la localización del LB en los folículos linfoides. También se ha implicado al par SDF-1 y a su receptor CXCR4 (CXCL12) en el "homing" microambiental de LB, aunque su rol ha sido menos documentado. En los centros germinales, aquellos LB que no son seleccionados por el antígeno para transformarse en células de memoria (ya sea porque no responden al antígeno o porque pierden afinidad por éste en el proceso de maduración de afinidad) son eliminados a través de un proceso de apoptosis. Estudios de inhibición de la adhesión con anticuerpos específicos sugieren que la adhesión de los LB a las DC-F vía los pares adhesivos ICAM-1/LFA-1 y VCAM-1/ $\alpha 4\beta 1$ es necesaria para salvar a los LB de la apoptosis, contribuyendo en conjunto con el antígeno a la selección de los linfocitos B.

La información presentada en este capítulo muestra claramente la importancia de la participación de los receptores de adhesión en los diferentes mecanismos y procesos involucrados en la respuesta inmune tanto normal como patológica. Es evidente que estos múltiples receptores y ligandos proporcionan señales que controlan, conjuntamente con los receptores específicos para el antígeno, la especificidad, la iniciación y la

duración de la respuesta inmune, así como también la actividad efectora, recirculación y posicionamiento o "homing" específico de los linfocitos en los diferentes tejidos. Asimismo, cada vez es más claro que los linfocitos, tienen vías de "homing" específicas para determinados tejidos, lo cual contribuye a hacer más eficiente y específica una respuesta inmune. De esta manera, el "homing" tejido-específico sería el equivalente a dotar a los linfocitos efectores y de memoria de una clave para entrar al tejido donde es más probable que vuelvan a encontrar su antígeno, y al mismo tiempo al bloquear la entrada a otros tejidos, se disminuyen las posibilidades de que estos linfocitos ya "armados" puedan producir daño al organismo (en la forma de hipersensibilidad o autoinmunidad). Finalmente, el hecho de que el "homing" tejido-específico de un linfocito sea una característica que probablemente perdure en el tiempo, daría fundamento a la idea de considerarlo como parte de la memoria inmunológica.

LECTURAS SUGERIDAS

Bradley, L., Watson, S., "Lymphocyte migration into tissue", *Curr Opin In Immunol* 8: 312-320, 1996.

Cinamon, G.; Grabovsky, V.; Winter, E.; Franitza, S.; Feigelson, P.; Shamri, R.; Dwir, O.; Alon, R., "Novel chemokine functions in lymphocyte migration through vascular endothelium under shear flow", *J Leukoc Biol* 69 (6) 860-6, 2001.

Dunon, D.; Piali, L.; Imhof, B.A., "To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm", *Curr Opin cell Biol* 8(5):714-23, 1996.

Moser, B., Loetscher, P., "Lymphocyte traffic control by chemokines", *Nature Immunol* 2(2):123-8, 2001.

Taub, D.D., "Chemokine-leukocyte interactions. The voodoo that they do so well", *Cytokine Growth factor Rev.* 7(4): 355-76, 1996.

Worthylake, R.A., Burridge, K., "Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery", *Curr Opin Cell Biol* 13(5):569-577, 2001.





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 13

ONTOGENIA Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS B Y T

Rodrigo Naves P. y Mario Rosemblatt S.

- 1. Introducción**
- 2. Regulación génica de la diferenciación linfocitaria**
- 3. Diferenciación y maduración de linfocitos B**
 - 3.1. Etapa antígeno-independiente
 - 3.2. Etapa antígeno-dependiente
- 4. Diferenciación y maduración de linfocitos T**
 - 4.1. Migración de los precursores de linfocitos T
 - 4.2. Diferenciación
 - 4.3. Selección tímica





RESUMEN

La producción de células B o T maduras y funcionales involucra la conversión de una célula troncal pluripotente, cuyo fenotipo está fundamentalmente definido por la expresión de la molécula CD34, en una célula comprometida con uno de varios linajes. Este proceso está sometido a un estricto programa de regulación génica en el cual diversos genes son activados o reprimidos mediante la acción concertada de factores de transcripción. Involucra también la diferenciación y proliferación de estas células en un microambiente apropiado. Los precursores linfoides más inmaduros no están plenamente identificados, aunque existe una serie de marcadores que han permitido adjudicar un cierto fenotipo a este precursor. La evidencia experimental indica que existiría una célula progenitora linfoide común para linfocitos B y T. Las señales de proliferación y diferenciación para cada tipo celular estarían dadas por el microambiente particular - interacciones celulares y los factores solubles- en el cual madura cada uno de estos tipos celulares, el timo para las células T, y la médula ósea y los órganos linfoides secundarios (OLS) para las células B. Aunque aún se desconoce muchas de estas señales.

En la diferenciación de los linfocitos B encontramos una etapa antígeno independiente que ocurre en la médula ósea y una etapa antígeno dependiente que ocurre fundamentalmente en los OLS. Los linfocitos B que emigran de la médula ósea (linfocitos B virgen) expresan simultáneamente receptor para antígeno tipo IgM e IgD. Luego de su encuentro y selección por el antígeno en los OLS los linfocitos B sufren un cambio de clase de inmunoglobulinas y, a través de un proceso de mutaciones, un aumento en su afinidad por el antígeno. Estos cambios de afinidad se llevan a cabo con una mantención fiel de la especificidad por el antígeno. Los procesos de diferenciación tanto en la médula ósea como en los centros germinales de los OLS están regulados por las interacciones celulares y por citoquinas producidas localmente.

La producción de linfocitos T maduros ocurre fundamentalmente en el timo. Los progenitores hematopoyéticos generados en la médula ósea migran al timo donde pasan por un activo proceso de diferenciación y proliferación. Los precursores T que llegan al timo no muestran ninguno de los marcadores típicos de los linfocitos T maduros, son CD4-CD8- (dobles negativos) y TCR-. A partir de estas células se producen timocitos dobles positivos (CD4+CD8+) que expresan a su vez el TCR maduro. Finalmente estas células dobles positivas terminan generando la población madura de linfocitos circulantes T "helper" (LTh) CD4+ y linfocitos T citotóxicos (TLc) CD8+. Los timocitos dobles positivos pasan por una doble selección antes de transformarse en simples positivos y salir a la circulación; una selección positiva que permite generar linfocitos T maduros que reconocen antígeno en función de su propio MHC (eliminandose los linfocitos T que no reconocen a su propio MHC) y una selección negativa que elimina los linfocitos T autorreactivos (que reconocen antígenos propios).

1. INTRODUCCIÓN

Los estudios de los procesos de diferenciación de linfocitos B y T han sido, tal vez, una de las áreas más estudiadas de la inmunología en la última década. Aunque esta área no ha estado libre de controversias y muchas de las cuales aún persisten, sus resultados han sido espectaculares y han sentado las bases de numerosos procesos en otras facetas de la biología celular y molecular.

En este capítulo se abordarán los principales mecanismos que llevan a la maduración de los linfocitos hacia células efectoras capaces de montar una respuesta inmune adaptable afectiva y se discutirá a nivel celular y molecular cómo esta respuesta llega a ser eficaz contra patógenos, evitando el reconocimiento de los antígenos propios. Los mecanismos de diferenciación deben asegurar que el repertorio, tanto de linfocitos B como T se genere en forma continua de manera de poder



reconocer los antígenos foráneos manteniendo la eficacia de la respuesta inmune. Estos mecanismos llevan en última instancia a la expresión, en la superficie de los linfocitos, de receptores específicos para antígeno y de moléculas co-estimuladoras que aseguran la respuesta inmune. Por otro lado, muchos de estos linfocitos se transforman en células de memoria que persisten durante largo tiempo. En este capítulo se discutirán estos mecanismos y se definirán las etapas que llevan a la generación de células inmunocompetentes.

2. REGULACIÓN GÉNICA DE LA DIFERENCIACIÓN LINFOCITARIA

La maduración de linfocitos implica la progresión secuencial de una célula troncal pluripotente a través de estados intermedios de diferenciación para llegar finalmente a una célula absolutamente funcional. Se ha observado que las células progenitoras troncales expresan bajos niveles de los genes específicos de los diferentes linajes celulares que ellas son capaces de originar. Esto ha llevado a proponer que una vez que la célula troncal se compromete en la diferenciación de un linaje celular particular ocurriría la consolidación de la expresión génica específica de ese linaje y la represión de los genes que participan en la diferenciación de los restantes linajes.

En base a estudios de expresión génica diferencial y al análisis de ratones deficientes en la expresión de genes específicos se ha podido establecer la participación jerárquica y combinatorial de nuevos factores de transcripción implicados en la diferenciación de los estados más tempranos de las células linfoides (figura 13-1). Por ejemplo, los factores de transcripción PU.1 e Ikaros participan en la diferenciación de la célula troncal hematopoyética al estado de célula progenitora linfoide. PU.1 participa en la regulación de la expresión del receptor de IL-7 que es requerido en la etapa de proliferación de la célula progenitora linfoide. Ratones deficientes en la expresión de PU.1 mueren a las pocas horas o días de haber nacido y exhiben ausencia de células linfoides y mieloides lo que pone de manifiesto su importancia en la generación de una célula progenitora común para ambos linajes. Por su parte, Ikaros es capaz de interactuar con los factores de transcripción Aiolos y Helios y participa en la especificación, diferenciación y homeostasis linfocitaria. Un defecto en la expresión de Ikaros impide el desarrollo de células precursoras tempranas.

Diversas evidencias han demostrado que la activación del programa de expresión génica específica de las células B en el siguiente estado de diferenciación (pre-pro-B) está controlado por la acción coordinada y cooperativa de los factores de transcripción codificados por el gen E2A (E12 y E47) y por el factor de células B temprano EBF. Estos factores regulan la expresión y el rearreglo de los genes de *IgH* e *Igk* y son requeridos para la adecuada expresión de los genes activadores de las enzimas de recombinación (*Rags*). Dentro de los genes regulados por E2A y EBF se encuentra el gen que codifica para el factor transcripcional Pax-5 el cual actúa en el siguiente estado de diferenciación conocido como pro-B. Se ha observado que células pro-B impedidas de expresar Pax-5 presentan un fenotipo de células comprometidas en el linaje de células B pero continúan expresando varios genes relacionados con otros linajes celulares. Este resultado sumado al hecho de que Pax-5 puede actuar como un activador transcripcional cuando es expresado en bajas concentraciones y como un represor a altas concentraciones, han llevado a proponer que la inducción de expresión de Pax-5 llevaría a la represión de los genes asociados con los otros linajes celulares.

En el caso de la maduración de los linfocitos T una serie de decisiones deben ser tomadas a lo largo del proceso de diferenciación. En primer lugar la célula progenitora linfoide puede seguir por la vía de maduración que conduce hacia el linaje de las células B o T. Luego, el linfocito T puede diferenciarse en células que expresan un TCR $\alpha\beta$ o un TCR $\gamma\delta$ y después, en el caso de los linfocitos TCR $\alpha\beta$, la elección debe ser tomada entre seguir hacia el linaje CD4⁺ o CD8⁺. Señales proporcionadas a través del pre-TCR, el TCR, factores solubles e interacciones celulares son determinantes en el destino final de los linfocitos T en la diferenciación. Al igual que en la maduración de las células B, el programa de diferenciación de las células T está sometido a un estricto control transcripcional. Entre los factores de transcripción que participan en estos procesos, las proteínas Notch cumplen un destacado papel de regulación. Las proteínas Notch corresponden a una familia de receptores de membrana que regulan procesos de diferenciación neuronal y epidermal. Trabajos publicados recientemente han mostrado que la inactivación inducible del gen Notch-1 en ratones recién nacidos o en células troncales de médula ósea conducen a un bloqueo temprano del

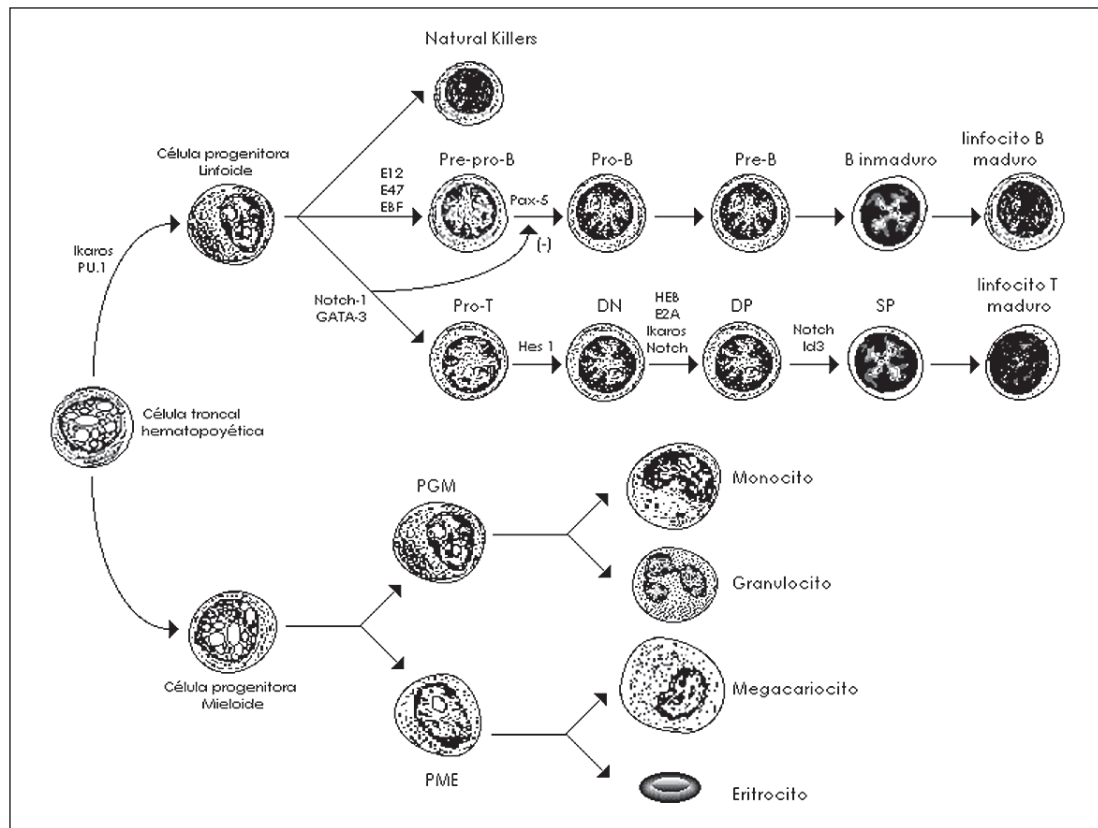


Figura 13-1. Regulación transcripcional de la diferenciación linfocitaria. La diferenciación de una célula troncal hematopoyética en una célula progenitora linfóide o en una célula progenitora mieloide es capaz de dar origen a todas las células sanguíneas maduras. La activación de los factores de transcripción Ikaros y PU.1 es clave en la etapa de diferenciación hacia una CPL. La posterior maduración de esta célula en un linfocito B o T dependerá de la acción concertada de otros factores transcripcionales, los cuales activarán o reprimirán la actividad de diversos genes involucrados en el programa de diferenciación específico de cada linaje celular. Algunos de ellos, tales como Ikaros, E2A (E47 y E12) y Notch participan en varias etapas de la maduración de linfocitos B y T. Abreviaturas utilizadas: DN, doble negativo; DP, doble positivo; SP, simple positivo; PGM, progenitor granulocito/macrófago; PME, progenitor megacariocito/eritrocito.

proceso de diferenciación de las células T sin afectar el desarrollo de los linfocitos B o de algún otro linaje hematopoyético. La observación más interesante fue que las células del timo de estos ratones expresaban marcadores del linaje de células B y que fenotípicamente se asemejaban a células B inmaduras. Por otro lado, estudios complementarios mostraron que ratones irradiados trasplantados con células troncales de médula ósea, que expresan constitutivamente la forma activa de Notch-1 (dominio intracelular) dieron origen a una población de células que expresaron marcadores del linaje de células T. Lo destacado de este experimento es que el desarrollo de los linfocitos T se llevó a cabo en la médula ósea, independiente de la influencia del ambiente tímico y que la diferenciación de las células B fue abortado en el temprano estado pre-pro-B. Sin embargo, la diferen-

ciación del linaje de células mieloides no fue afectada. A nivel molecular, se ha mostrado que la vía de transducción de señales de Notch es capaz de interferir con la actividad de la proteína E47 codificada por el gen E2A lo que explicaría la represión del programa de diferenciación de las células B. También hay evidencias que muestran que Notch-1 participaría en la determinación del linaje de linfocitos T que expresan un TCR $\alpha\beta$ o un TCR $\gamma\delta$, así como también en la diferenciación hacia CD4⁺ versus CD8⁺. Todos estos resultados demuestran que Notch es esencial en la determinación del destino de las células T. Ya que se ha encontrado que el ligando de Notch está presente tanto en la médula ósea como en el timo. La pregunta que aún queda por responder es cómo se controla la vía de transducción de señales de Notch para que sólo se active en el timo. La respuesta



tendría que especular la participación de factores adicionales específicos de estos ambientes celulares, que regulan la capacidad de las células progenitoras para responder a los ligandos de Notch.

En base a todos los recientes antecedentes que hemos descrito se ha propuesto un modelo de diferenciación de células linfoides basado en la actividad diferencial de diversos factores transcripcionales (figura 13-1). Según este modelo, en la médula ósea las células progenitoras linfoides serían refractarias a la estimulación del ligando de Notch-1 debido a la ausencia de un estímulo adicional apropiado, lo que las conduciría a través de la diferenciación de células B. En estados tempranos de esta maduración la acción coordinada de los factores E2A y EBF activaría la expresión del programa de diferenciación génica de las células B entre los cuales se encuentra Pax-5. A su vez, la sobreexpresión de Pax-5 reprimiría la expresión de los genes específicos de los otros linajes celulares. Por su parte, la célula progenitora linfoide que migra desde la médula ósea hacia el timo, encontraría en este microambiente las señales necesarias para activar la vía de transducción de señales de Notch. A su vez, Notch inhibiría la función del factor de transcripción codificado por el gen E2A bloqueando así el programa de diferenciación de células B en el timo.

3. DIFERENCIACIÓN Y MADURACIÓN DE LINFOCITOS B

El proceso de maduración de los linfocitos B involucra dos etapas generales claves; una etapa antígeno-independiente, que ocurre en la médula ósea y una etapa antígeno-dependiente que ocurre, fundamentalmente, en los OLS, lugar en el cual los linfocitos B específicos para un determinado antígeno, toman contacto con éste.

3.1 Etapa antígeno-independiente

En los mamíferos, células troncales hematopoyéticas pluripotentes provenientes del hígado fetal colonizan la médula ósea reclutadas por la acción de la quimioquina CXCL12 secretada por las células del estroma medular. Estas células troncales tienen la capacidad de renovarse permanentemente y de dar origen a la totalidad de las células sanguíneas maduras (linfoides y

mieloides). Recientemente, se ha identificado una célula progenitora (linfoide) capaz de diferenciarse específicamente hacia el linaje de las células linfoides (células B, T y NK). Esta célula progenitora linfoide correspondería al estado más temprano de diferenciación linfocitaria, que se caracteriza por una alta actividad mitótica. Estudios de mutación génica y el análisis de inmunodeficiencias primarias (ver capítulo 30), han evidenciado el requerimiento de interleuquina-7 (IL-7) en esta etapa de alta proliferación. Posteriormente, y debido a la activación de un programa genético específico las células progenitoras linfoides son conducidas hacia la diferenciación del linaje B. La clasificación de los siguientes estados de diferenciación de las células B está definido, principalmente, por el rearrreglo de los genes de cadena liviana y pesada de las inmunoglobulinas y por la ausencia o presencia de marcadores de superficie celular. Las células en el estado pro-B no producen inmunoglobulinas y se distinguen por la expresión de los marcadores CD19, CD43 y B220. En el siguiente estado de diferenciación, denominado pre-B, ocurre la recombinación de los genes V-D-J de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (ver capítulo 6) y la síntesis y expresión citoplasmática de la cadena pesada (H) μ . Sin embargo, estas células no expresan inmunoglobulinas en su membrana, ya que aún no sintetizan la cadena liviana (L), y por lo tanto son incapaces de reconocer o responder a antígeno. Posteriormente, algunas de las cadenas H se asocian a una "cadena L de reemplazo", molécula estructuralmente similar a la cadena L normal pero que no posee la región variable de ésta. La combinación de la cadena H con la cadena L de reemplazo constituyen el receptor de células pre-B (pre-BCR), el que regularía la síntesis ulterior de las cadenas L y la consiguiente maduración de los linfocitos B. En la etapa siguiente de maduración (linfocitos B inmaduros) ocurre la recombinación de los genes VJ de las cadenas livianas y por tanto la síntesis de las cadenas livianas (κ o λ) las cuales se asocian con la cadena pesada+ μ para generar una molécula de IgM en el citoplasma. Estos linfocitos B no pueden generar nuevas regiones variables (de cadenas L o H) en la médula ósea y se les considera funcionalmente inmaduros. De hecho, su encuentro con antígenos propios puede llevarlos a un estado anérgico (inactivación funcional) o de muerte celular más que a una activación. Sin embargo, esta es una importante etapa de selección negativa

de linfocitos B autorreactivos que eventualmente podrían ocasionar enfermedades autoinmunes. Posteriormente, los linfocitos B son capaces de co-expresar moléculas de IgM y de IgD en la membrana celular, las cuales pueden actuar como receptores específicos para antígeno. En esta etapa los linfocitos adquieren competencia funcional y son denominados células B maduras (figura 13-2). Además de la regulación génica mediada por diversos factores de transcripción y de IL-7, se conoce que proteínas tirosina quinasa de la familia Src y ciertos procesos adhesivos entre los linfocitos B en desarrollo y los elementos del estroma de la médula ósea (ver capítulo 12) actúan como factores inductores de la diferenciación de células B.

Los linfocitos B virgen que expresan en su

días o semanas. La capacidad del sistema inmune de producir inmunoglobulinas de diferentes especificidades y combatir infecciones está determinada por la posterior diferenciación de los linfocitos B virgen en los órganos linfoides secundarios, lugar donde se produce el cambio de clase de inmunoglobulinas y la maduración de la afinidad. Estos cambios se producen con una fiel mantención de la especificidad por antígeno. En este sentido es importante hacer notar dos características importantes del proceso de diferenciación de los linfocitos B que aseguran la mantención de la especificidad antigénica: (a) la llamada "exclusión alélica" fenómeno que permite que aunque cada individuo heterocigoto recibe dos alelos de los genes para inmunoglobulina (uno de cada padre)

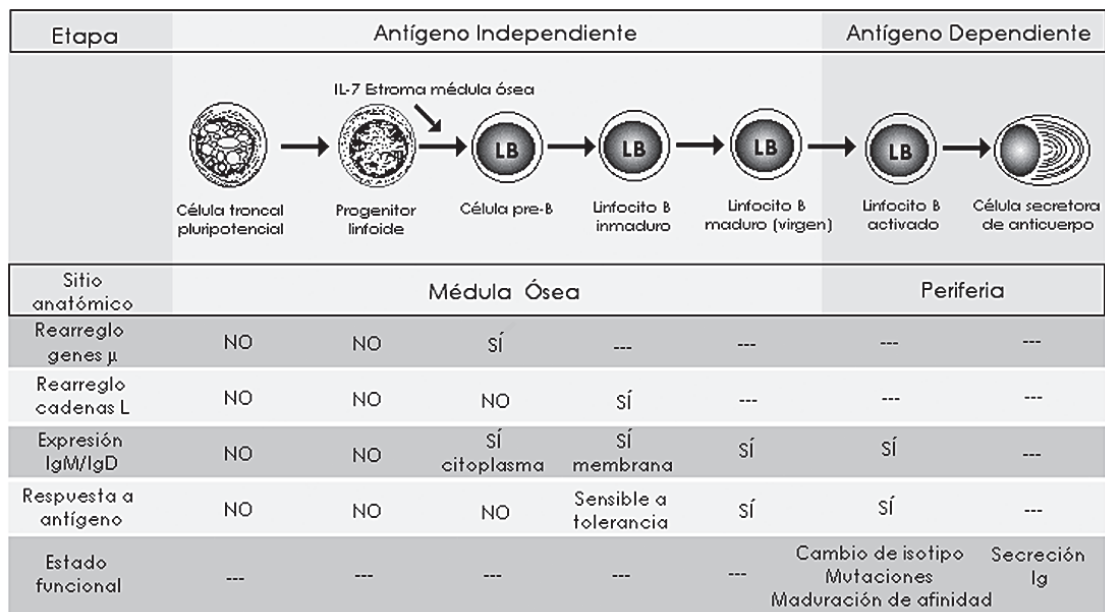


Figura 13-2. Etapas en la maduración de los linfocitos B.

membrana receptores específicos para un determinado antígeno, salen de la médula ósea y entran en la circulación periférica. Estudios *in vitro* han mostrado que a partir del estado de células B inmaduras los linfocitos experimentarían una disminución en su respuesta a la quimioquina CXCL12 lo que les permitiría escapar a la acción reclutadora de este factor y abandonar la médula ósea. En la periferia, los linfocitos B vírgenes migran a los órganos linfoides secundarios donde completarán su proceso de diferenciación. Estas células B virgen expresan, simultáneamente, IgM e IgD de la misma especificidad en su membrana y de no encontrar antígeno mueren en unos pocos

sólo uno logra expresarse en cada linfocito y (b) la denominada "exclusión del isotipo de cadena liviana" que regula la expresión de las cadenas L de manera que cada linfocito B produce ya sea cadenas κ o λ pero nunca las dos.

3.2 Etapa antígeno-dependiente

En las etapas siguientes de la diferenciación de los linfocitos B participan como elementos centrales el antígeno y los linfocito T de ayuda (Th). Ciertos antígenos, fundamentalmente antígenos no proteicos tales como los polisacáridos y lípidos, no requieren de la ayuda de los LTR. Estos antígenos,

son llamados Timo-independientes. Por otro lado, los linfocitos B que reconocen antígenos Timo-dependientes sí requieren de la colaboración de los linfocitos Th. Estos antígenos son encontrados por los linfocitos en los diferentes OLS: en el bazo para los antígenos introducidos por la vía sanguínea, en los ganglios para los antígenos colectados por la linfa, en las Placas de Peyer y tejido mucoso para antígenos ingeridos o inhalados y en la piel. Es así que la respuesta humoral a antígenos T-dependientes propiamente tal comienza en las zonas T de los OLS donde los linfocitos B antígeno-específico toman contacto con los LTh capaces de reconocer el mismo antígeno. Los linfocitos B migran posteriormente a los folículos donde entran en contacto con elementos celulares del estroma llegando a formar los Centros Germinales (CG), zona de alta proliferación celular. Los linfocitos B de los CG presentan una muy baja expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, de manera que aquellos linfocitos B que no son rescatados por las Células Foliculares Dendríticas (CFD) a través de antígeno y de otras interacciones adhesivas mueren, pasando a otro compartimento donde son destruidos por los macrófagos de cuerpos tangibles que se encuentran en gran número en la zona B de los OLS.

Con el fin de revisar estas etapas del desarrollo del linfocito B un poco más en detalle se considerará los eventos que ocurren en un ganglio linfático como ejemplo de los mecanismos que llevan a la diferenciación final y a la proliferación de los linfocitos B maduros (figura 13-3).

Los linfocitos B (al igual que los linfocitos T) entran al ganglio a través del epitelio columnar que tapiza las vénulas post capilares de los OLS (ver capítulo 12) donde entran en contacto breve con los linfocitos T de ayuda, migrando posteriormente a los folículos linfoides para formar allí, luego de un proceso de diferenciación y de una activa proliferación, los CG. En el folículo, los linfocitos B entran en contacto con las CFD. Estas células están especializadas en retener y presentar al linfocito B, antígeno sin procesar y en forma nativa (formando un complejo con el anticuerpo, conocido como icosoma). Esta interacción involucra, además del antígeno y el respectivo receptor (IgM/IgD) por parte del linfocito B, una serie de moléculas de adhesión y sus respectivos ligandos. Estas interacciones tienen como resultado la producción de citoquinas que inducen en el linfocito B nuevos procesos de diferenciación con cambios en la clase de inmunoglobulina y activa proliferación. Como resultado de estos cambios se generan los CG, los cuales poseen una estructura fina que contiene una zona oscura de centroblastos en activa proliferación y una zona clara que contiene los llamados centrocitos, células no proliferantes. Esta zona clara contiene además la más alta densidad de CFD y una pequeña proporción de linfocitos T, probablemente antígeno-específicos. Es en estos CG donde se generan los linfocitos B de memoria y donde ocurren las hipermutaciones de las regiones V de las inmunoglobulinas. Estas mutaciones son consideradas necesarias para la llamada maduración de

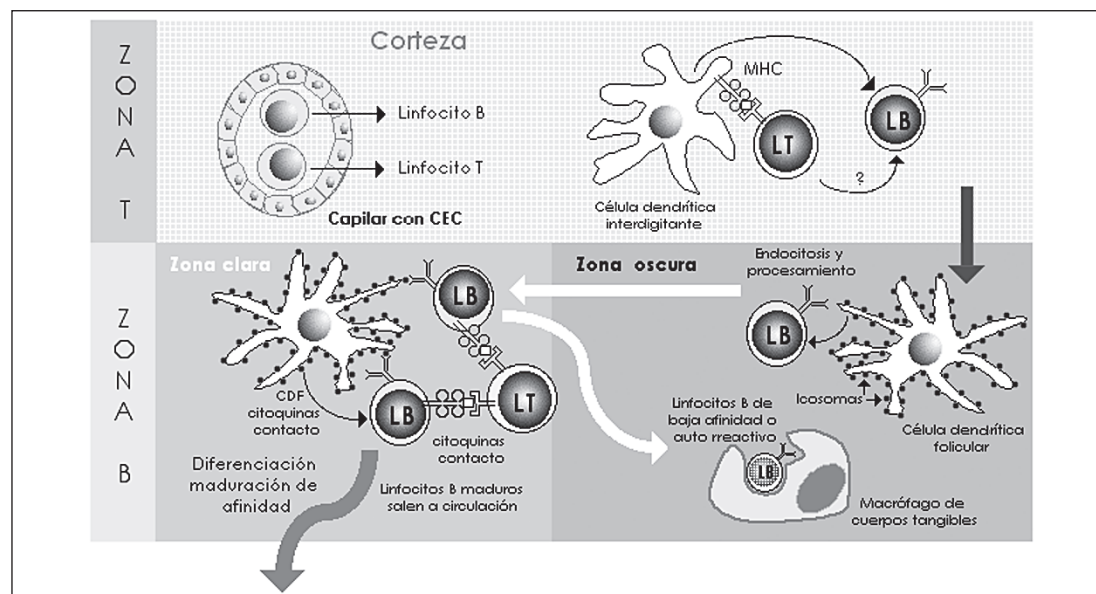


Figura 13-3. Etapas que marcan el desarrollo final de los linfocitos B en un ganglio linfático periférico.



la afinidad de los anticuerpos séricos las cuales pueden llevar a cambios de afinidad pero también a cambios de especificidad. Los procesos que regulan este fenómeno deben asegurar la selección de los mutantes de alta afinidad y la eliminación de los mutantes de baja afinidad así como también de los linfocitos B autorreactivos que pudieran resultar del proceso de hipermutaciones. La maduración de la respuesta inmune humoral favorece el aumento de la afinidad, ya que aquellos linfocitos cuya afinidad disminuye a causa de las mutaciones, deberán competir por antígeno, presentado en la superficie de las CFD, con aquellos de más alta afinidad.

Las señales y mecanismos que median los procesos finales de migración, de diferenciación, de proliferación y de mutación de los linfocitos B dentro del CG son en gran parte desconocidos, aunque los indicios experimentales involucran claramente la participación de moléculas de adhesión y citoquinas. Por ejemplo, la administración *in vivo* de anticuerpos capaces de bloquear la interacción entre CD40 con su ligando CD40L o entre las moléculas coestimuladoras CD28 (B7) con CTLA-4 bloquean las reacciones de los CG. Mucho queda por investigar en esta importante área de la respuesta inmune humoral, especialmente en lo que respecta al posible papel de las citoquinas en las etapas finales de diferenciación y proliferación. Hasta ahora, tanto IL-2 como IL-10 han sido involucradas en la ayuda proporcionada por los linfocitos T y en la "decisión" final de los linfocitos B de tomar el camino de un linfocito B de memoria o de una célula plasmática productora de anticuerpos.

4. DIFERENCIACIÓN Y MADURACIÓN DE LINFOCITOS T

Es generalmente aceptado que los linfocitos T se originan en la médula ósea a partir de un precursor capaz de migrar al timo, el principal órgano donde se lleva a cabo la diferenciación de los linfocitos T. Este proceso de maduración de los linfocitos T en el timo (denominados timocitos en oposición a los linfocitos T maduros que se encuentran en circulación), y la generación del repertorio de receptores de LT puede dividirse en tres etapas íntimamente relacionadas: (a) la migración de los progenitores de la médula ósea al timo, (b) la diferenciación de estas células progenitoras y (c) un proceso de selección. Estos

procesos deben generar un repertorio de linfocitos T maduros que cumpla dos requisitos fundamentales: primero que reconozca antígeno en función del propio MHC (restricción MHC) y segundo que estos linfocitos T no reconozcan antígenos propios (tolerancia).

4.1. Migración de los precursores de linfocitos T

Se desconoce la naturaleza exacta de la célula precursora que da origen a los linfocitos T. En humanos, una putativa célula precursora de la línea T ha sido identificada en base a la expresión de la molécula de superficie CD34. Esta molécula se expresa en las células troncales pluripotentes de la médula ósea que dan origen no sólo a los linfocitos T sino que también a los linfocitos B, a las células dendríticas y a células endoteliales de la vasculatura. Estas células CD34+ de la médula ósea (o del hígado fetal) se transforman, al ser colocadas en un microambiente tímico en cultivo, en linfocitos T, desconociéndose sin embargo los mecanismos que llevarían a los progenitores T de la médula ósea a migrar al timo *in vivo*. Se postula, sin embargo, que estos precursores expresarían en su superficie receptores de adhesión que se ligarían selectivamente al endotelio tímico permitiendo su entrada al interior del órgano. Uno de estos receptores podría ser la misma molécula CD34 ya que existen evidencias que esta molécula interactuaría con la L-Selectina, una molécula de adhesión presente en los linfocitos.

Una vez en el timo los precursores de los linfocitos T mantienen una alta capacidad proliferativa. Alrededor de 1 a 10 células precursoras pueden repoblar un timo al ser implantadas en éste y estudios *in vitro* han demostrado que una sola célula progenitora es capaz de generar alrededor de 10^5 linfocitos T maduros en un período de 10 a 15 días, con TCRs de una amplia gama de especificidades distintas. Por otro lado, estudios efectuados con timos irradiados han demostrado que a pesar de la alta capacidad de división de los precursores, éstos, una vez en el timo pierden su capacidad de autorrenovación, y deben ser constantemente reemplazados por nuevas células progenitoras a partir de la médula ósea.

4.2. Diferenciación

Los estudios de la ontogenia y diferenciación de los linfocitos T se han realizado fundamentalmente usando como modelo el ratón. En este ani-



mal, los primeros precursores T se detectan en el timo en el día 11 de gestación (correspondiente aproximadamente a la semana 7-8 en humanos) ubicándose en la zona cortical de éste. A medida que los timocitos migran hacia zonas más internas de la corteza éstos van avanzando en su proceso de diferenciación. En estados finales de maduración los linfocitos T pasan desde la corteza hacia la médula y finalmente salen del timo a la periferia a través de las vías linfáticas o venas. El ambiente tímico representado por las interacciones físicas que se establecen entre los timocitos y los diferentes tipos celulares que allí se encuentran (células epiteliales, dendríticas y macrófagos) y los factores solubles que son liberados al medio externo son claves en los procesos de maduración y selección. Una serie de trabajos sugieren que el patrón diferencial de expresión de ciertas quimioquinas y de sus receptores, en particular CXCL12, CCL17, CCL19, CCL21, CCL22 y CCL25, estaría relacionado con la migración de los timocitos a través de los diferentes subcompartimentos tímicos. Entre las diferentes citoquinas que las células estromales tímicas secretan, se ha identificado a IL-7 como un modulador directo de la supervivencia, diferenciación, transcripción y rearrreglo génico del TCR. Además, la diferenciación de linfocitos T está sometida a un estricto control de expresión génica mediada por factores transcripcionales tales como GATA-3, E12, E47, HEB, NF-kB, Ikaros y Notch.

Dos marcadores de superficie presentes en las células T han sido de gran utilidad en proporcionar información sobre los procesos de diferenciación de los linfocitos T, éstos son las moléculas CD4 y CD8. En base a la expresión de estos dos marcadores, la población de linfocitos T en un individuo adulto puede ser dividida en cuatro grupos: los linfocitos T dobles negativos (CD4⁻CD8⁻), los dobles positivos (CD4⁺CD8⁺) que representan poblaciones más o menos inmaduras de linfocitos T y los simples positivos (CD4⁺CD8⁻ y CD4⁻CD8⁺) que corresponden a las poblaciones más maduras de linfocitos T. En los estudios de los procesos y mecanismos que conducen a la formación de la población de linfocitos T maduros, los principales esfuerzos han estado dirigidos a definir los mecanismos que llevan a la generación, a partir de un precursor único, de las dos principales subpoblaciones de linfocitos T maduros, los linfocitos Th que presentan el fenotipo CD4⁺CD8⁻ y los linfocitos T citotóxicos (Tc) cuyo fenotipo es CD4⁻CD8⁺, y a explicar la elimina-

ción durante el proceso de diferenciación, de aquellos clones de linfocitos T autorreactivos capaces de reconocer antígenos propios.

Las primeras células del linaje T que aparecen en el timo se detectan en la corteza tímica externa y no expresan los marcadores CD4, CD8, TCR ni CD3, un marcador común de células T. Este estado de maduración es conocido como pro-T y los timocitos son denominados dobles negativos. Estas células, que representan aproximadamente el 5% de los timocitos expresan CD44 (una glicoproteína adhesiva de membrana), Thy-1 (en el ratón) y HSA (antígeno estable al calor). En este momento de la diferenciación (día 13 a 14 de gestación), los genes del TCR se encuentran aún en la configuración germinal. En el siguiente estado de maduración conocido como pre-T, se inicia la recombinación y expresión de los genes de la cadena β del TCR (día 15 de gestación) la cual se asocia con una proteína invariante llamada p α y con las proteínas del complejo CD3 ($\gamma, +\delta, +\epsilon + \psi, +\zeta$) para dar origen al receptor de células pre-T o pre-TCR. Este complejo proteico es capaz de transducir señales a través de la vía de proteínas tirosina quinasa Src y su actividad es esencial para la continuación hacia los posteriores estados de maduración. Aproximadamente, el 80% de estas células dobles negativas pasan por una etapa en la cual expresan transitoriamente la molécula CD8 (y el HSA) para dar origen, posteriormente, a un precursor CD4⁺CD8⁺ doble positivo (ver figura 13-3). Estas células dobles positivas se encuentran en una etapa activa de rearrreglo de los genes que codifican para la cadena α del receptor de las células T sin que logre detectarse expresión del TCR en el citoplasma o en la membrana (día 17 de gestación). Los primeros rearrreglos génicos y la aparición del TCR $\alpha\beta$ completo ocurren en forma coordinada con la expresión de los otros marcadores del linaje T, esto es CD4, CD8 y CD3 (ver más adelante). En este estado de células dobles positivas el TCR es completamente funcional y puede responder a antígeno lo que permite que los linfocitos sean sometidos a los eventos de selección positiva y negativa. El 20% restante de las células dobles negativas probablemente nunca expresan CD4 o CD8 pero sí expresan un TCR con las cadenas $\gamma\delta$. Estas células son los primeros linfocitos T que maduran en el timo y representan células que se diferenciarían por una vía independiente de los linfocitos T $\alpha\beta$. Aunque las células $\gamma\delta$ expresan un TCR funcional 2 días antes que las células $\alpha\beta$ la expresión



de las cadenas $\alpha\beta$ rápidamente sobrepasa la expresión de $\gamma\delta$ de manera que al momento del nacimiento los ratones tienen un repertorio de linfocitos T con un 90% de células cuyo TCR es fundamentalmente del tipo $\alpha\beta$. Posteriormente, los timocitos migran hacia la región tímica medular donde se diferenciarán en dos poblaciones distintas de células simples positivas; los LTh con fenotipo CD4+ CD8- (restringidos por MHC clase II) y los LTc con un fenotipo CD4- CD8+ (restringidos por MHC clase I). Estos dos tipos celulares expresan en su membrana altos niveles de TCR $\alpha\beta$ y son células totalmente competentes capaces de migrar fuera del timo. El curso temporal del proceso de maduración de los linfocitos T se muestra en la figura 13-3.

4.3. Selección tímica

En el timo ocurren dos importantes eventos de selección que son centrales en la generación del repertorio de linfocitos T maduros circulantes. Uno de estos procesos permite la generación de autotolerancia eliminando o silenciando aquellos linfocitos T que poseen una alta afinidad por antígenos propios (Selección Negativa). El otro proceso de selección deriva en la generación de linfocitos T maduros con un TCR capaz de reconocer el MHC (Complejo Principal de Histocompatibilidad) propio asegurando que la respuesta inmune sea restrin-

gida por MHC (Selección Positiva). Estos eventos de selección, que llevan a la producción de linfocitos T "efectivos" ocurren en el timo luego de la expresión del TCR, CD4 y CD8 y antes que estas células salgan a la periferia (figura 13-3).

a) Selección Positiva. En este proceso el microambiente tímico, elemento central en la llamada educación tímica, interacciona con los timocitos en desarrollo de manera de permitir la sobrevida sólo de aquellas células que expongan en su superficie un TCR capaz de interactuar con un péptido presentado por su propio MHC (figura 13-4). De esta manera aquellos linfocitos T que no presenten afinidad por su propio MHC mueren en el timo. En esta etapa de selección todos aquellos linfocitos T que por azar en el reordenamiento de sus genes del TCR generaron un receptor que no está restringido por el MHC propio son eliminados, ya que, posteriormente, ellos serán incapaces de interactuar con las células presentadoras de antígeno (CPA) y reconocer antígeno. Dado que los linfocitos T no sufren el proceso de hipermutación somática que les permita cambiar la afinidad o especificidad antigénica de su receptor, como ocurre con los linfocitos B, el proceso de selección positiva permite asegurar la mantención de una población de linfocitos T cuyos TCR pueden actuar en forma efectiva durante la respuesta inmune.

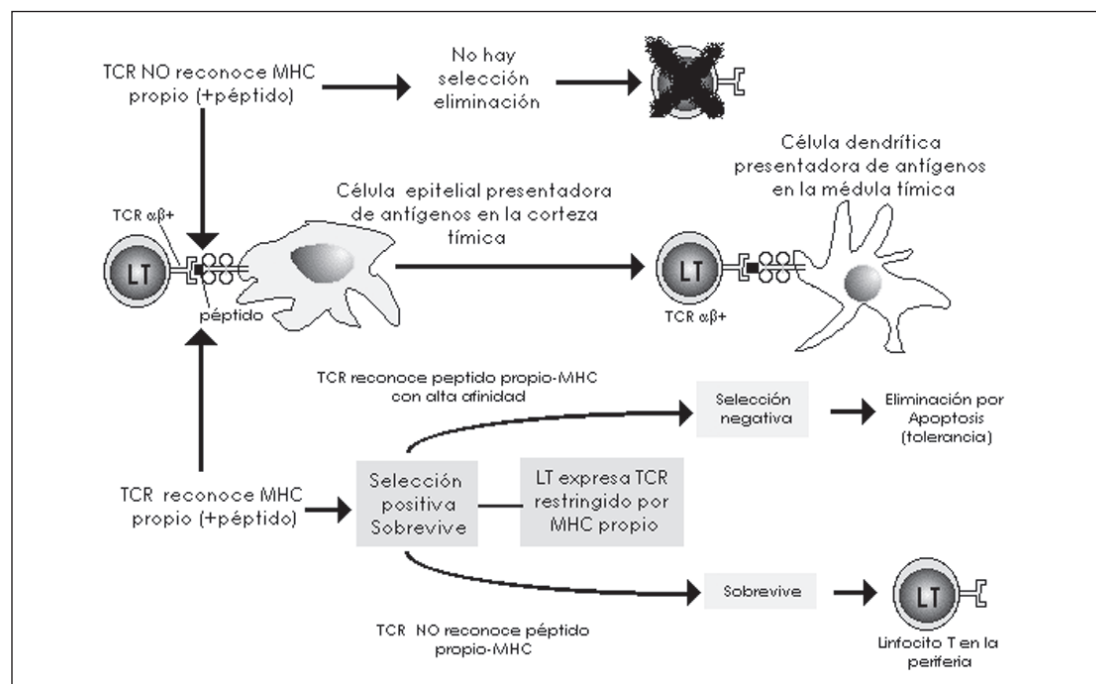


Figura 13-4. Selección positiva y negativa. Etapas en la diferenciación de los linfocitos T en el timo



Utilizando como modelo ratones transgénicos para un TCR que reconoce a antígeno en el contexto de determinados MHC de clase I y de clase II, se determinó la presencia de linfocitos T en la periferia solamente si el ratón expresaba el MHC homólogo con aquel reconocido por el TCR transgénico. Estos experimentos, conjuntamente con otros de la misma índole, lograron clarificar el papel central del haplotipo de las células de la corteza tímica en la selección positiva de los linfocitos T. Estos experimentos lograron demostrar también que la mayoría de los timocitos producidos en el timo no son capaces de reconocer antígeno en el contexto del MHC apropiado, no logran su estado final de maduración, y son eliminados por apoptosis. Pero no sólo el haplotipo MHC de las células de la corteza tímica juega un papel importante en la selección positiva, el péptido contenido en el bolsillo del MHC también participa como elemento de selección. Experimentos de mutación de la molécula de MHC que alteran la unión del péptido al bolsillo reducen en forma significativa la selección positiva. Los resultados de éstos y otros experimentos indican que existen ciertas combinaciones de péptido-MHC particularmente efectivas en la selección positiva, probablemente debido a un reconocimiento directo del péptido por el TCR. La evidencia experimental parece indicar entonces que la gran mayoría de los timocitos CD4⁺ CD8⁺ sufren un proceso de muerte programada en el timo y que la selección positiva los rescataría de la apoptosis. Este rescate estaría mediado por señales generadas por el TCR al enganchar al MHC del haplotipo correcto y que contiene a su vez un complemento de péptidos adecuados.

Resultados experimentales demuestran además que la generación, a partir de los timocitos CD4⁺ CD8⁺ (dobles positivos), de los linfocitos T simples positivos, (CD4⁺CD8⁻ o CD4⁻CD8⁺), sería un proceso al azar a través del cual un timocito perdería en forma estocástica la expresión de uno u otro co-receptor (CD4 o CD8) sin la influencia de la especificidad del TCR. En otras palabras, si por azar un timocito termina con una combinación apropiada de CD4 y TCR restringido por el MHC clase II entonces ese timocito será estimulado y rescatado de la apoptosis mediante la selección positiva. Igualmente un timocito que por azar terminó con la molécula CD8 en su superficie, será rescatado si tiene la combinación apropiada de TCR restringido por MHC de clase I.

b) Selección Negativa. El proceso de Selección Positiva recientemente descrito, genera una población de linfocitos T cuya única restricción es la de reconocer antígeno en función de su propio MHC. Es concebible entonces que dentro de esta población existan clones de linfocitos T capaces de reconocer antígeno propios generados y presentados en el estroma tímico. Esto resultaría en un importante número de linfocitos T capaces de generar autoinmunidad. Sin embargo, esto no es la situación normal sino más bien la excepción. Actualmente se sabe que la autotolerancia, es decir la incapacidad del sistema inmune de reaccionar contra antígenos propios se debe principalmente (aunque no únicamente) a la eliminación o silenciamiento, durante la diferenciación de las células T en el timo, de los clones autorreactivos. Este proceso de delección física o de eliminación funcional (anergia) de clones autorreactivos en el timo se conoce como Selección Negativa. Este proceso funciona de tal forma que solamente aquellos linfocitos T que posean un TCR capaz de reconocer un péptido extraño presentado por un MHC propio serán finalmente seleccionados para salir a la periferia como linfocito T maduro. La eliminación de los clones T autorreactivos ocurre en la etapa en la cual los timocitos CD4⁺CD8⁺TCR⁺ se unen a un péptido propio presentado por moléculas MHC propios de las células dendríticas presentes en el timo. La eliminación de los timocitos autorreactivos ocurre aparentemente por mecanismos de muerte celular programada causada, en este caso, por la activación de los timocitos provocada por los autoantígenos. La evidencia experimental indica que las señales intracelulares que se generan a través del TCR en un linfocito inmaduro en el timo serían diferentes de las generadas en un linfocito T maduro, de manera tal que en un caso causan apoptosis mientras que en el otro causarían activación y generación de una respuesta inmune.

LECTURAS SUGERIDAS

Akashi, K.; Reya, T.; Dalma-Weiszhausz, D. and Weissman, I.L., "Lymphoid precursors", *Curr. Opin. Immunol.* 12: 144-150, 2000.

Ansel, K.M. and Cyster, J.G., "Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development", *Curr. Opin. Immunol.* 13: 172-179, 2001.



Busslinger, M.; Nutt, S.L. and Rolink, A.G., “Lineage commitment in lymphopoiesis”, *Curr. Opin. Immunol.* 12: 151-158, 2000.

Deftos, M., and Bevan, M., “Notch signaling in T cell development”, *Curr. Opin. Immunol.* 12: 166-172, 2000.

Kee, B.L. and Murre, C., “Transcriptional factor regulation of B lineage commitment”, *Curr. Opin. Immunol.* 13: 180-185, 2001.

Osborne, B., “Transcriptional control of T cell development”, *Curr. Opin. Immunol.* 12: 301-306, 2000.





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 14

REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Ulises Vergara C., Claudio Zúñiga M. e Iván Palomo G.

- 1. Introducción**
- 2. Regulación de la respuesta inespecífica**
- 3. Regulación de la respuesta inmune específica**
 - 3.1. Mecanismos inmunológicos y no inmunológicos de regulación
 - 3.2. Deleción y anergia clonal. Tolerancia inmunológica
 - 3.3. Activación de linfocitos T supresores
 - 3.4. Regulación mediante linfocitos Th1 y Th2
 - 3.5. Regulación idiotípica o red idiotipo-anti-idiotipo
 - 3.6. Regulación "feedback" por anticuerpos y complejos inmunes
 - 3.7. Regulación por Prostaglandinas
 - 3.7.1. Prostaglandina E2 (PGE₂).
 - 3.7.2. Prostaglandina 15-d PGJ₂





RESUMEN

El repertorio linfocitario disponible para la activación por distintos antígenos, la autotolerancia y el desarrollo de una respuesta inmune específica, están controlados por diversos mecanismos de regulación tanto inmunológicos como no inmunológicos. Los mecanismos no inmunológicos de regulación implican relaciones recíprocas entre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-6 y $TNF\alpha$. Citoquinas, hormonas como ACTH, prolactina, progesterona y hormonas tiroideas, neurotransmisores como acetilcolina, catecolaminas y endorfinas y mediadores biológicos como histamina, serotonina y bradiquinina, parecen integrados en un poderoso circuito inmunorregulador o red immuno-neuro-endocrina.

Los mecanismos inmunológicos de regulación del sistema inmune implican la disponibilidad del antígeno mismo, la interacción entre distintas células inmunocompetentes, la activación de diversas subpoblaciones linfocitarias con liberación de una combinación particular de mediadores solubles como citoquinas, leucotrienos y prostaglandinas, la regulación idiótípica (red idiotipo-anti-idiotipo) y la regulación o "feedback" por anticuerpos y complejos inmunes. Estos mecanismos inmunológicos de regulación del sistema inmune pueden operar tanto a nivel central como periférico y pueden controlar la recirculación y "homing" de las distintas subpoblaciones linfocitarias, el procesamiento y la presentación de antígenos y la activación, proliferación y diferenciación de las distintas células inmunocompetentes.

1. INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune es esencialmente destructiva y orientada a la neutralización y eliminación, tanto de agentes infecciosos y de células y moléculas extrañas, como detritus y productos moleculares de células propias y de células envejecidas, transformadas o tumorales. Esto implica, necesariamente, la existencia de un sofisticado mecanismo de regulación que permita responder, agresivamente, contra lo extraño, al tiempo que se acepta, tolera o no se reacciona contra las células propias, que estén envejecidas, alteradas o transformadas y expresen marcadores ACAMP ("Apoptosis Cell Associated Molecular Pattern").

En el presente capítulo se describen distintos mecanismos de regulación tanto de la respuesta inmune inespecífica como de la respuesta específica.

2. REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INESPECÍFICA

Además de las barreras físicas a la infección, los individuos están provistos de mecanismos

inespecíficos de protección como el sistema del complemento y la actividad fagocítica y destructiva de neutrófilos y macrófagos. La estrategia de la respuesta inmune inespecífica, a diferencia de la respuesta adquirida, no es reconocer un gran número de epítomos sino más bien unas pocas moléculas PAMP ("Pathogen-Associated Molecular Patterns"), altamente conservadas y compartidas por un gran número de microorganismos. Estos patrones moleculares son reconocidos por receptores PRR ("Pattern-Recognition Receptor") expresados en distintas células del Sistema Innato. Los ejemplos más conocidos de PAMPs son lipopolisacáridos (LPS), péptidoglicanos, ácido lipoteicoico, mananos, DNA bacteriano y RNA de doble hebra. La mayoría de estas moléculas son expresadas sólo por microorganismos, lo que implica una muy baja probabilidad de respuesta autoinmune por reacción cruzada con patrones moleculares de los agentes infecciosos. El reconocimiento de moléculas PAMPs por receptores PRR en las células del hospedero, inducirán cambios que serán muy importantes en el desarrollo tanto de la respuesta innata como de la respuesta adquirida. Así, macrófagos activados iniciarán la síntesis de las



llamadas “citoquinas de alarma” (IL-1, IL-6, IL-12, TNF), la producción de interferones (IFN) α y β , con la consiguiente inhibición de la replicación viral y la activación de células NK. La activación de hepatocitos por IL-6 inducirá la síntesis de proteínas de fase aguda PCR y MBP (Proteína C Reactiva y “Mannose Binding Protein”, respectivamente), con el consiguiente reclutamiento y activación del sistema del complemento por la ruta de las lectinas. Además las diversas citoquinas van a regular o determinar la calidad de la respuesta inmune específica induciendo la expresión de moléculas de presentación antigénica, de señales accesorias de coestimulación CD28, CD80, CD86, CD40, CD40L) y la polarización hacia una respuesta inmune de tipo Th1 o Th2.

La síntesis de IL-12 resulta fundamental en la desviación hacia una respuesta Th1 y es regulada por un mecanismo de “feedback” positivo, mediado por IFN γ o por un mecanismo de “feedback” negativo mediado por IL-10. Por otro lado, se ha descrito que la unión del receptor CR3 del sistema del complemento, con anticuerpos o partículas unidas a iC3b, inhiben la síntesis de IL-12 en monocitos/macrófagos humanos y de ratón. Lo anterior, sumado al hecho que CR2 participa en la activación de linfocitos B, implica que el sistema del complemento no sólo es un mecanismo efector sino que puede también actuar como elemento regulador positivo de la respuesta humoral y regulador negativo de la respuesta celular.

Una vez activados, los mecanismos efectores inespecíficos pueden actuar agresivamente, no sólo sobre el agente infeccioso invasor, sino también sobre células propias y deben, por lo tanto, ponerse en marcha mecanismos de regulación que eviten el daño tisular.

2.1. Regulación del sistema del complemento.

La activación del sistema del complemento es regulada a través de una rápida degradación o inactivación de algunos de sus componentes mediante proteínas reguladoras unidas a membrana o solubles en el plasma. (Ver capítulo 18):

- Inhibidor de C1 (C1 Inh).
- Factor de aceleración del decaimiento (DAF o CD55) de las convertasas de C3 y C5.
- Asociación del factor I y diversos cofactores (factor H, C4bp, MCP o CD46 y CDR1 o CD35) para la disociación o degradación de C4b y/o C3b.

- Carboxipeptidasa N que actúa como inhibidor de las anafilotoxinas C3a, C4a y C5a.
- Inhibidores del complejo de ataque a la membrana (“Membrane Attack Complex”) como la proteína S o vitronectina, SP40, el factor de restricción homólogo (HRF) y CD59 o MIRL (“Membrane Inhibitor of Reactive Lysis”).

2.2. Regulación de la acción de células NK

En un individuo inmunocompetente normal, una alta y prolongada respuesta NK puede conducir a una respuesta autoinmune puesto que las células NK son capaces de lisar células autólogas normales (precursores de linfocitos B, timocitos y células de la médula ósea) o suprimir la proliferación de células troncales eritroides. Ratones atímicos y ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID), aun cuando son incapaces de generar una respuesta T específica al virus de la coriomeningitis linfocítica (LMCV), presentan una respuesta NK más elevada y más prolongada (14 días) que los ratones normales, en los cuales la activación NK no se prolonga más allá de los 3 a 4 días. Se ha sugerido que la actividad citotóxica de las células NK sería negativamente regulada por interleuquina-4 (IL-4) y factor de crecimiento beta (TGF- β “Transforming growth factor beta”), sintetizado por linfocitos T CD8+ y T CD4+ del tipo Th2 (ver punto 3.4 y capítulo 11).

3. REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA

El desarrollo de una respuesta inmune celular y/o humoral requiere el reconocimiento antigénico por el receptor de linfocitos T (TCR) o linfocitos B (BCR), respectivamente. Por otro lado, la mantención de la respuesta inmune en el tiempo requiere la presencia continua del antígeno, pero su sola administración y la existencia de clones linfocitarios específicos no aseguran el desarrollo de una respuesta inmune dado que la naturaleza, forma fisicoquímica, dosis y vía de administración del antígeno son factores importantes para estimular o inhibir la activación de linfocitos T y/o B específicos. Así, polisacáridos bacterianos inducen una respuesta IgM mientras los antígenos proteicos inducen tanto una respuesta inmune humoral, como una respuesta celular. Por otra parte, antígenos administrados por vía sub-



cutánea, intramuscular o intradérmica inducen respuesta inmune, mientras los antígenos administrados por vía oral o vía intravenosa inducen tolerancia, fundamentalmente mediante supresión y anergia de clones linfocitarios. Dosis bajas del antígeno inducen supresión mientras las dosis altas favorecen la anergia. Ratones inoculados primaria y secundariamente con extracto de médula espinal en coadyuvante completo de Freund, desarrollan Encefalitis Alérgica Experimental (EAE), lo que no ocurre en ratones inoculados con el extracto medular luego de una administración primaria por vía oral, de proteína básica de mielina (MBP). Los ratones que desarrollan encefalitis ponen en marcha una respuesta celular T CD4 específica para MBP, caracterizada por la secreción de IFN- γ , mientras los ratones que no manifiestan la enfermedad desarrollan una respuesta T CD8 caracterizada por la producción de TGF- β e IL-4.

Las citoquinas están involucradas en la regulación cualitativa y cuantitativa de la respuesta inmune dado que participan en el control de una serie de eventos asociados a la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos, con la consiguiente adquisición de diversas funciones efectoras o la apoptosis de las distintas subpoblaciones linfocitarias (ver capítulo 11). Estos mediadores son liberados por, virtualmente, todas las células involucradas en la respuesta inmune como linfocitos T, linfocitos B, células NK, macrófagos, granulocitos y células dendríticas, así como células derivadas del endoderma (células del epitelio tímico), ectoderma (queratinocitos) o mesénquima (células endoteliales). Las interacciones mutuas entre las diversas citoquinas y la modulación de sus receptores determinan la intensidad de la respuesta inflamatoria y el curso de la respuesta inmune específica al determinar si la exposición a un antígeno determinado conducirá a tolerancia o al desarrollo de una respuesta inmune celular y/o humoral. Tanto inmunidad como tolerancia son fenómenos específicos que pueden tener consecuencias catastróficas para el individuo si no operan mecanismos que permitan regular el desarrollo de la respuesta inmune. Así, con no poca frecuencia, las consecuencias patológicas de una enfermedad infecciosa no son resultado directo de la acción del agente infeccioso, sino de una respuesta inmune normal o muchas veces aberrante contra el patógeno.

Un antígeno extraño induce generalmente una respuesta que conduce a la diferenciación de cé-

lulas efectoras derivadas de linfocitos B o linfocitos T y la síntesis de anticuerpos y/o citoquinas, con la consiguiente eliminación del antígeno y generación de memoria inmunológica. Un antígeno propio, en cambio, puede inducir un fenómeno denominado "ignorancia" o estimular una respuesta negativa que conduce a la eliminación (delección), supresión o inactivación (anergia) de clones autorreactivos específicos. El reconocimiento antigénico y señales accesorias de coestimulación y citoquinas desempeñan un rol fundamental, tanto en la delección o anergia de los clones linfocitarios autorreactivos, como en la expansión clonal y la diferenciación que conducen al desarrollo de una respuesta inmune efectora y a la eliminación del antígeno, al tiempo que se generan células de memoria para responder a un nuevo encuentro con el antígeno.

La eliminación del antígeno se convierte entonces en un importante mecanismo accesorio para regular el curso de la respuesta inmune, puesto que las células efectoras y los productos de la activación linfocitaria (anticuerpos, citoquinas), son por lo general de corta vida media.

3.1. Mecanismos inmunológicos y no inmunológicos de regulación

En general, la regulación del sistema inmune incluye tanto mecanismos inmunológicos como no inmunológicos.

Los **mecanismos no inmunológicos** implican relaciones recíprocas entre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF α (ver capítulo 15). Citoquinas, hormonas (ACTH, prolactina, progesterona, hormonas tiroideas), neurotransmisores (acetilcolina, catecolaminas, endorfinas) y mediadores biológicos como histamina, serotonina y bradiquinina parecen integrados en un poderoso circuito inmunorregulador denominado red immuno-neuro-endocrina.

La activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, por las citoquinas inflamatorias IL-1, IL-6 y TNF α , resulta en la producción de hormona liberadora de corticotrofina (CRF) por neuronas paraventriculares del hipotálamo y la secreción de hormona corticotrófica (ACTH) por la hipófisis. ACTH actúa sobre el sistema nervioso simpático, con la secreción de epinefrina y norepinefrina, y sobre la corteza suprarrenal estimulando la síntesis y secreción de glucocorticoides que tienen efecto antiinflamatorio, inhibiendo la síntesis de



citoquinas, al tiempo que aumentan la expresión de receptores para estas citoquinas. Los glucocorticoides tienen un efecto inmunosupresor sobre linfocitos B, linfocitos T y células NK (disminuyendo la producción de anticuerpos, la síntesis y secreción de citoquinas y la actividad citotóxica de linfocitos T y células NK).

Los **mecanismos inmunológicos** de regulación de la respuesta inmune pueden operar a nivel central en los órganos linfoides primarios (médula ósea y timo) o a nivel periférico en los órganos linfoides secundarios o en los distintos órganos y tejidos. Durante el reordenamiento génico y la diferenciación celular que conducen a la generación de linfocitos B (en la médula ósea) o de linfocitos T (en el timo) se producen tanto linfocitos capaces de reconocer antígenos extraños como linfocitos contra lo propio. Deben, por lo tanto, ponerse en marcha mecanismos de regulación que permitan la expansión de los linfocitos contra lo extraño y la eliminación (delección) o la inactivación (anergia) de los clones linfocitarios autorreactivos.

A nivel periférico el desarrollo de una respuesta inmune efectiva requiere el reconocimiento de antígenos por el receptor linfocitario, señales accesorias de coestimulación (principalmente las interacciones CD80/CD86/CD28 y CD40/CD40L) y el efecto regulador de diversas citoquinas a través de receptores específicos. Una respuesta inmune efectiva requiere entonces la interacción entre distintas células inmunocompetentes y los mecanismos de regulación de esta respuesta pueden operar tanto a nivel de la recirculación y "homing" de las distintas células, como a nivel del procesamiento y presentación de antígenos y la activación, proliferación o diferenciación de los clones linfocitarios específicos. A nivel de la recirculación y "homing" de las distintas subpoblaciones celulares, los mecanismos de regulación operan a través de la expresión de receptores específicos en el endotelio vascular de los ganglios linfáticos o en distintos tejidos no linfoides y la expresión de ligandos específicos expresados en las distintas subpoblaciones celulares inmunocompetentes. Un ejemplo clásico, es la molécula PSLG-1, receptor de P-Selectina (CD62P), expresada sólo en linfocitos Th1 lo que permite a estas células migrar preferencialmente a ciertos tejidos (por ejemplo a piel inflamada).

En general, los mecanismos de regulación de la respuesta inmune a nivel periférico implican la interacción entre distintas subpoblaciones celulares

(linfocitos B, linfocitos T y células NK; macrófagos y células dendríticas para la presentación antigénica y células accesorias como neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos), la secreción de mediadores solubles (citoquinas, leucotrienos y prostaglandinas), la activación de linfocitos T supresores, la regulación idiotípica (red idiotipo-anti-idiotipo) y el "feedback" por anticuerpos.

3.2. Delección y anergia clonal. Tolerancia inmunológica

Durante la diferenciación de linfocitos T en el timo, se ponen en marcha una serie de eventos que aseguran la exclusión alélica del receptor $T\alpha\beta$ y la selección de linfocitos T capaces de reconocer fragmentos peptídicos en asociación con moléculas MHC de clase I o de clase II en la superficie de células del epitelio tímico o de células dendríticas (selección positiva) al tiempo que se eliminan (delección) o inactivan (anergia) aquellos linfocitos autorreactivos que reconocen con alta avidez y afinidad los antígenos propios (selección negativa) (ver capítulo 13). La afinidad del receptor TCR, del correceptor CD4 o CD8, de las moléculas MHC y de otras moléculas de adhesión, así como la concentración del péptido, parecen fundamentales para determinar la avidez de la interacción entre el linfocito T y la célula presentadora del antígeno. Experimentos utilizando ratones transgénicos han permitido demostrar que existe una correlación entre la especificidad del receptor TCR por moléculas de MHC de clase I o de clase II y el desarrollo o maduración de linfocitos CD8 o CD4, respectivamente. Además ratones mutantes deficientes en la expresión de moléculas MHC de clase I debido al "knock out" del gen de la $\beta 2$ microglobulina o del gen TAP, no contienen células CD8, mientras ratones deficientes en moléculas de clase II contienen muy pocos linfocitos CD4. Así y de acuerdo con el modelo instructivo de diferenciación, la unión coordinada de la molécula MHC de clase I con el receptor TCR y con el correceptor CD8, inhibe la expresión de CD4 en los linfocitos T doble positivos (CD4⁺ y CD8⁺) originando linfocitos citotóxicos T CD8⁺, mientras la unión coordinada de la molécula de clase II con TCR y el correceptor CD4 inhibe la expresión de CD8 para dar origen a linfocitos Th CD4. En contraposición a este modelo instructivo se ha planteado un modelo estocástico de diferenciación que postula que la inhibición en la expresión de CD4 o CD8 es al



azar e independiente de la especificidad de TCR por la molécula MHC de clase I o de clase II, de manera que sólo aquellos linfocitos doble positivos en los que TCR y el correceptor reconocen la misma molécula MHC podrán diferenciarse en linfocitos T CD4 o linfocitos T CD8.

Eventos de selección positiva y negativa ocurren también durante la diferenciación de linfocitos B en la médula ósea para la expansión de los clones linfocitarios B maduros (que expresan IgM e IgD) capaces de reconocer antígenos extraños al tiempo que se eliminan aquellos clones inmaduros (sólo expresan IgM) que unen con avidez antígenos propios multiméricos o multivalentes de superficie o se inactivan aquellos que unen antígenos solubles oligovalentes (ver capítulo 13). Aun cuando linfocitos T y linfocitos B utilizan distintos genes para generar el receptor antigénico y presentan requerimientos estructurales y funcionales distintos para reconocer el antígeno, los mecanismos generales de diferenciación en el órgano linfoide primario son similares y en ambos casos se produce delección o anergia de los clones linfocitarios autorreactivos. Los individuos resultan así, específica y naturalmente tolerantes a sus propios antígenos.

Ahora bien, la tolerancia producida por la delección o anergia clonal, puede ocurrir tanto a nivel central como a nivel periférico (dependiendo de si el autoantígeno se expresa en los órganos linfoides primarios o en la periferia) y es el resultado del reconocimiento antigénico en condiciones tales que la unión al receptor linfocitario no conduce a la activación celular sino más bien a su eliminación o inactivación debido a la ausencia de las señales adecuadas de coestimulación o a la puesta en marcha de un programa de muerte celular o apoptosis. Durante el desarrollo de una respuesta humoral y luego del "switching" isotípico (o cambio isotípico de la cadena pesada de la inmunoglobulina) e hipermutación somática del receptor BCR en el centro germinal, sólo aquellos linfocitos B que han desarrollado un receptor con alta afinidad por el antígeno serán positivamente seleccionados para continuar su diferenciación en células plasmáticas o en células memoria, mientras el resto muere por apoptosis.

Por último es importante señalar que la tolerancia no sólo puede ser inducida contra lo propio por delección o anergia de clones linfocitarios autorreactivos, sino también contra lo extraño mediante diversos mecanismos de supresión de la

respuesta inmune celular y/o humoral. Así, las células presentadoras de antígeno, y linfocitos T y linfocitos B específicos, pueden ser destruidos por citotoxicidad directa mediada por linfocitos T citotóxicos o células NK, por citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) o funcionalmente inactivados por acción de mediadores solubles como prostaglandinas y diversas citoquinas. Además es posible encontrar, tanto a nivel periférico como a nivel central, linfocitos con una muy baja densidad de su receptor o una escasa afinidad del mismo, de manera tal que cuando se encuentran con el antígeno, simplemente no se activan o lo ignoran completamente (ignorancia antigénica).

3.3. Activación de linfocitos T supresores

Durante el desarrollo de una respuesta inmune pueden muchas veces activarse distintas subpoblaciones de linfocitos T reguladores que inhiben linfocitos T o linfocitos B específicos para el antígeno, y actúan por lo tanto como linfocitos T supresores. La forma como se activan estos linfocitos T supresores y los mecanismos utilizados para inhibir el desarrollo de una respuesta inmune celular y/o humoral no están aún definidos y son todavía materia de controversia, pero sí está claro que la mayoría de estas células T supresoras son linfocitos T CD8⁺ y sólo una pequeña fracción corresponden a linfocitos T CD4⁺.

Los linfocitos T supresores pueden inhibir el desarrollo de una respuesta inmune mediante 3 mecanismos distintos. El primero implica citolisis por contacto directo con liberación de perforina y granzimas A y B, que activan la cascada de las caspasas y conducen a la apoptosis de la célula blanco (linfocitos T, linfocitos B específicos o cualquier célula que presente antígenos a estos linfocitos). El segundo se basa en la expresión aumentada de FasL (CD95L), que inicia la muerte programada por agregación de Fas (CD95) y activación de vía de las caspasas en la célula blanco. Finalmente, el tercer mecanismo implica la secreción de citoquinas citotóxicas como TNF α y linfotoxina TNF β . Los linfocitos T supresores (CD4 o CD8), pueden secretar además citoquinas que inhiben la respuesta inmune, como ocurre con TGF- β (que inhibe la activación y proliferación de células NK y linfocitos T y), con IFN γ (que inhibe linfocitos Th2 y el "switching" isotípico hacia IgE en linfocitos estimulados por IL-4) y con IL-4 e IL-10 (que inhiben linfocitos Th1 y la activación de macrófagos).

3.4. Regulación mediante linfocitos Th1 y Th2

Los linfocitos T "helper" (Th) cumplen un rol fundamental en el desarrollo y la regulación, tanto de la respuesta inmune celular, como de la respuesta humoral. Luego del reconocimiento antigénico y la estimulación por IFN γ o por IL-4, los linfocitos T CD4 $^{+}$ pueden diferenciarse en linfocitos Th1 o linfocitos Th2, respectivamente. Los linfocitos Th1 secretan predominantemente IL-2, IFN γ y linfoxina (TNF- β) que activan macrófagos y son los principales efectores de la inmunidad celular contra patógenos intracelulares y de las reacciones de hipersensibilidad retardada. Los linfocitos Th2 en cambio, secretan principalmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (tabla 14-1) y son los inductores de los altos niveles de IgG e IgE, de la eosinofilia, de la citotoxicidad mediada por eosinófilos y de la activación de mastocitos.

Tabla 14-1. Citoquinas producidas por distintas subpoblaciones de linfocitos T.

CITOQUINA	Th1	Th2	T CD8
IFN γ	++	-	++
IL-2	++	-	+/-
TNF β	++	-	+
TNF α	++	+	++
GM-CSF	++	+	++
IL-3	++	++	+
IL-4	-	++	-
IL-5	-	++	-
IL-6	-	++	-
IL-10	-	++	-
IL-13	-	++	-

La inducción de una respuesta Th1 y la producción de IL-2 e IFN γ inhibirá el desarrollo de una respuesta Th2, mientras la activación de linfocitos Th2 y la secreción de IL-4 e IL-10 inhibirá el desarrollo de una respuesta Th1. Sin embargo, tanto linfocitos Th1 como linfocitos Th2 colaboran en el desarrollo de la respuesta humoral y promueven el "switching" a diferentes subclases de IgG: en el ratón Th2 promueve el cambio a IgG1 e IgE y Th1 promueve el cambio a IgG2a.

El desarrollo de una respuesta Th1 o Th2 es fundamental en la evolución de diversas enferme-

dades infecciosas por bacterias, virus, hongos o parásitos y la producción de IL-12 o de IL-4, luego de la estimulación inicial del sistema inmune, parece un evento crucial en la diferenciación de linfocitos Th1 o Th2 a partir de T CD4 $^{+}$ precursores (linfocitos Thp) que sólo secretan IL-2. Luego de la estimulación inicial por el antígeno, macrófagos y células dentríticas secretan IL-12, activando células NK y promoviendo la producción IFN γ . Altos niveles de esta citoquina, producidos por células NK y/o linfocitos T, actúan sobre linfocitos Thp favoreciendo la diferenciación hacia Th1, al tiempo que inhiben la producción de citoquinas que favorecen la diferenciación de Th2 (IL-4, IL-10) (figura 14-1). El efecto beneficioso de la respuesta Th1 es, al menos en parte, mediada por la secreción de IFN γ que tiene efecto antiviral directo, promueve la citotoxicidad de células NK y linfocitos T citotóxicos (LTc) y activa la capacidad destructiva de macrófagos estimulando la producción de radicales superóxidos, óxido nítrico y proteasas.

La fuente inicial de IL-4 para la diferenciación de linfocitos Th2 no está claramente definida, pero la evidencia experimental sugiere que linfocitos T $\alpha\beta$ ABNK1.1 (células TNK), linfocitos T- $\gamma\delta$ y mastocitos y basófilos son capaces de secretar esta citoquina.

El desarrollo de una respuesta con exclusión de la otra (Th1 versus Th2), parece tener efectos importantes en la susceptibilidad o resistencia a diversas infecciones y la supresión de las funciones efectoras que se observa en infecciones crónicas, es a menudo el resultado de la producción diferencial de citoquinas en etapas tempranas de la misma. En ratones, la inducción de una respuesta Th1 tiene un efecto protector contra el parásito *Leishmania major*, lo que no ocurre contra el parásito *Trichuris muris*, donde la respuesta protectora es de tipo humoral y por lo tanto activada por Th2. Por otro lado, la infección experimental con *Leishmania major* induce una respuesta protectora de tipo Th1 en los ratones de la cepa resistente CBA/J, mientras los ratones de la cepa susceptible Balb/c desarrollan una respuesta Th2 y mueren rápidamente durante la infección. Estos resultados sugieren que el desarrollo de una respuesta Th1 o Th2 es de alguna manera dependiente del repertorio genético del individuo y la inoculación de IL-12 en los ratones susceptibles Balb/c inhibe el desarrollo de una respuesta Th2 y los ratones se hacen resistentes a la infección experimental con *Leishmania major*.

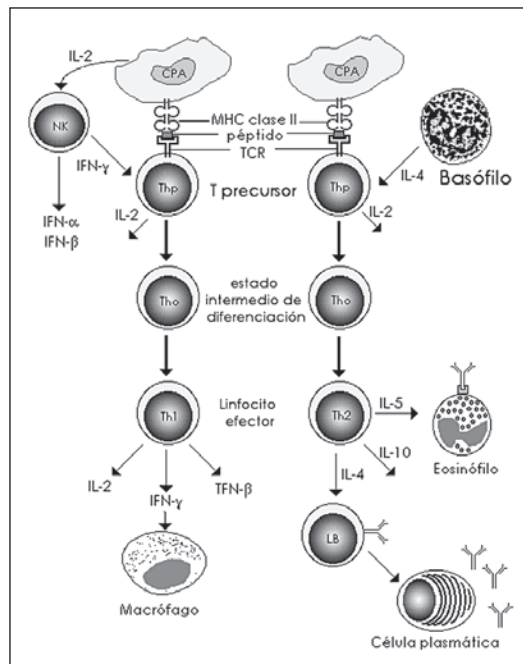


Figura 14-1. Diferenciación de linfocitos Th1 y Th2. (A) Macrófagos y células dendríticas (CPA) procesan y presentan antígenos en el contexto de moléculas MHC de clase II a linfocitos T precusores (Thp) y secretan IL-12 activando células NK y produciendo IFN γ que favorece la diferenciación de linfocitos Th1 a partir de los linfocitos Thp que sólo secretan IL-2. Los linfocitos efectores Th1 secretan predominantemente IL-2, IFN γ y TNF β con efecto antiviral directo (IFN γ) y activación de una respuesta celular mediada por linfocitos T citotóxicos y macrófagos activados. (B) La presentación antigénica en el contexto de moléculas MHC de clase II a linfocitos Thp y la estimulación por IL-4 (producida por linfocitos CD4 NK 1.1+, linfocitos T $\gamma\delta$ o mastocitos) favorecen la diferenciación hacia linfocitos Th2 que estimulan la respuesta inmune humoral promoviendo la síntesis y secreción de IgE y eosinofilia.

En general las infecciones parasitarias se asocian con frecuencia a la estimulación de una de las subpoblaciones Th1 o Th2. Así una respuesta Th2 con elevados niveles de IgE y una marcada eosinofilia es característica de las infecciones por helmintos como *Toxocara*, *Filaria* y *Schistosoma*. De manera similar las infecciones por protozoos como *Toxoplasma*, *Trypanosoma* y *Plasmodium* están asociadas a inmunidad celular y fenómenos de hipersensibilidad retardada que son activados por una respuesta Th1.

La regulación de la respuesta Th1 por IL-10 es fundamental para evitar los efectos nocivos de una respuesta celular aberrante. Así, ratones normales son resistentes y sobreviven a la infección con *Toxoplasma gondii*, mientras ratones genéticamente manipulados para hacerlos defi-

cientes en IL-10 (pero producen altos niveles de IL-12 e IFN γ) mueren por daño tisular caracterizado por infiltrado celular y necrosis, y no por una infección descontrolada.

Ahora bien, puesto que la respuesta inmune contra diversas enfermedades infecciosas parece estar determinada por la particular combinación de citoquinas secretada por los linfocitos Th, se ha sugerido que la incapacidad para controlar la evolución de una enfermedad infecciosa es muchas veces el resultado de una respuesta inmune inapropiada o aberrante y no de una respuesta insuficiente. Así una respuesta inflamatoria Th1 que tiene indiscutibles efectos beneficiosos en el control de diversos microorganismos, es tremendamente nociva si se pone en marcha contra antígenos propios y, en muchos casos de enfermedades autoinmunes órgano-específicas, la activación de una respuesta inmune Th1 desempeña un rol fundamental en la patogénesis de la enfermedad. Así ocurre en la tiroiditis autoinmune, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Crohn, la artritis reumatoide y la diabetes mellitus tipo I, de manera que cualquier intento de inhibición de la respuesta Th1 o la administración de citoquinas como IL-4 e IL-10 que inhiben la respuesta Th1, puede tener enorme impacto en la prevención o tratamiento de estas enfermedades. Por el contrario, en cuadros atópicos (como la fiebre de heno, el asma bronquial y la dermatitis atópica) y en el lupus eritematoso sistémico (LES) en los que una respuesta humoral dependiente de linfocitos Th2 parece estar involucrada en la inmunopatogénesis de la enfermedad, el tratamiento debe estar orientado a la inhibición de esa respuesta Th2. Se describe una subpoblación de LT CD4+ denominados Tr1 o Th3, que sintetizan IL-10, TGF- β y pequeñas cantidades de IFN γ pero no IL-4. Se ha estudiado el papel regulador de estas células en el epitelio intestinal; es probable que estén involucradas en la regulación de la respuesta inmune frente a la flora intestinal normal y por otro lado, alteraciones en relación a estas células podrían estar involucradas en patologías como la Enfermedad de Crohn, donde existe una respuesta celular exagerada.

3.5. Regulación idiotípica o red idiotipo-anti-idiotipo

El desarrollo de respuesta inmune contra un antígeno conduce a la proliferación o expansión de clones linfocitarios T o B antígeno específicos



y a la síntesis y secreción de anticuerpos específicos. El receptor de estos linfocitos (TCR o BCR) y los anticuerpos sintetizados pueden luego activar linfocitos capaces de reconocer determinantes antigénicos o idiotopos de la porción variable del receptor linfocitario o del anticuerpo antígeno-específico (figura 14-2), poniendo en marcha un mecanismo de control idiotípico o red idiotipo-anti-idiotipo que regulará la activación de los clones linfocitarios antígeno-específicos y determinará la evolución de la respuesta contra el antígeno original.

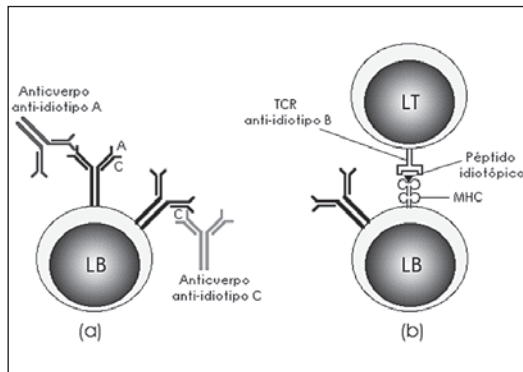


Figura 14-2. Regulación idiotípica. La red idiotipo-anti-idiotipo incluye tanto: (A) linfocitos B o anticuerpos que reconocen idiotopos en el receptor de un linfocito T o de un linfocito B como (B) linfocitos T cuyo receptor reconoce péptidos idiotópicos de un receptor T o de una inmunoglobulina presentados en el contexto de una molécula MHC, por una célula presentadora de antígeno o por un linfocito B que procesa su propio receptor BCR.

Durante el reordenamiento génico y la diferenciación celular que ocurren en el timo o en la médula ósea, para la generación de las distintas poblaciones linfocitarias, existe una muy baja probabilidad de originar linfocitos con la misma secuencia y especificidad en su receptor TCR o BCR, pero sí pueden generarse linfocitos cuyo receptor reconoce o tiene especificidad por la región variable del receptor de otro linfocito T o linfocito B. La secuencia aminoacídica de la región variable del receptor linfocitario constituye, por lo tanto, una estructura única y señala la individualidad de cada linfocito T o linfocito B y las diferencias que existen entre los determinantes antigénicos o idiotopos de los distintos receptores, tienden a concentrarse en las regiones hipervariables de los mismos. Además los anticuerpos anti-idiotópicos, que reconocen idiotopos de un receptor linfocitario o de una molécula de inmunoglobulina, pueden separarse en los que reconocen idiotopos ubica-

dos en el sitio de combinación del receptor (son por lo tanto "imágenes internas" o similares al epítipo antigénico original) y aquéllos que reconocen idiotopos ubicados por fuera del sitio de combinación, en el dominio variable del receptor linfocitario.

Los receptores antigénicos de los linfocitos T (TCR), de los linfocitos B (BCR) o las moléculas de inmunoglobulina se encuentran en niveles muy bajos durante el periodo neonatal y serían por lo tanto, incapaces de poner en marcha mecanismos de tolerancia a la estructura idiotópica propia del dominio variable del receptor linfocitario. En el repertorio linfocitario de un individuo pueden, por lo tanto, encontrarse linfocitos T y/o linfocitos B, capaces de reconocer idiotopos y de originar una respuesta anti-idiotípica contra todos los idiotopos de ese receptor. De esta manera la regulación idiotípica del sistema inmune controlaría el repertorio linfocitario disponible para activación por un antígeno y, en último término, estaría involucrada en el desarrollo de inmunidad o de tolerancia a diversos antígenos. El aislamiento de anticuerpos neonatales, de baja afinidad y elevada multirreactividad con diversos antígenos e idiotipos linfocitarios, que se producen de manera natural en ausencia de estimulación antigénica evidente, y la existencia en el suero normal humano de anticuerpos anti-idiotópicos de clase IgG que reaccionan o reconocen anticuerpos naturales parecen apoyar la participación de la red idiotipo-anti-idiotipo en el control del repertorio linfocitario.

Los idiotopos son entonces estructuras únicas de la porción variable de un receptor linfocitario o de un anticuerpo. El conjunto o la suma de todos los idiotopos de un receptor linfocitario particular constituye el idiotipo de ese receptor o de esa molécula de inmunoglobulina. En consecuencia una respuesta anti-idiotípica estará dirigida contra todos los idiotopos de un receptor linfocitario o de una molécula de anticuerpo e incluirá a todos y cada uno de los linfocitos T y linfocitos B anti-idiotópicos que han sido específicamente activados.

3.6. Regulación o "feedback" por anticuerpos y complejos inmunes

La administración pasiva de anticuerpos específicos contra un antígeno puede regular la respuesta inmune estimulando o inhibiendo el desa-



rrollo de la respuesta humoral y/o celular dependiendo del isotipo de los anticuerpos administrados. La administración pasiva de IgM por ejemplo, puede estimular la síntesis de anticuerpos contra el antígeno favoreciendo el procesamiento y presentación del antígeno por fagocitos profesionales que incorporan los complejos antígeno-anticuerpo por la vía de receptores Fc, o poniendo en marcha un mecanismo de regulación idiotípica que amplifica la respuesta contra el antígeno. La administración pasiva de anticuerpos IgG en cambio, tiende a inhibir el desarrollo de la respuesta inmune debido probablemente a:

- a) La neutralización de epítomos específicos y la eliminación del antígeno, lo que evidentemente conduce a la remoción del estímulo antigénico necesario para activar diversas subpoblaciones linfocitarias.
- b) La activación de un mecanismo de regulación idiotípica que inhibe el desarrollo de la respuesta inmune.
- c) La unión de complejos inmunes que contienen antígenos multidentinantes inhibirá la activación de los linfocitos B antígeno-específicos debido a que la doble señal de reconocimiento generada por la unión simultánea del antígeno al receptor linfocitario por una parte y la unión del dominio Fc del anticuerpo a receptores Fc por la otra, impide la generación de segundos mensajeros indispensables para la activación linfocitaria (figura 14-3).

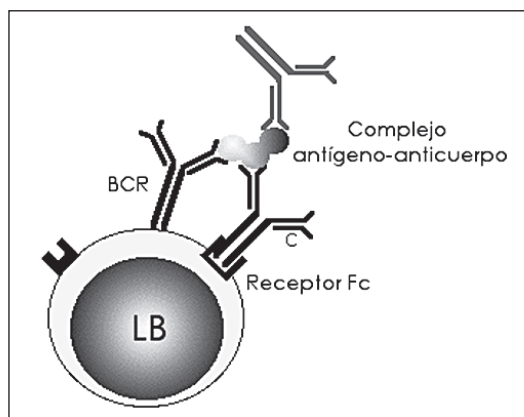


Figura 14-3. Regulación o "feedback" por anticuerpos o complejos inmunes. La doble señal de reconocimiento generada por la unión simultánea al receptor linfocitario y a receptores Fc, de complejos inmunes formados en fase fluida, impide la generación de segundos mensajeros indispensables para la activación linfocitaria. Mientras el antígeno multiepitópico del complejo se une al receptor linfocitario, el dominio Fc de anticuerpos del mismo complejo se une a un receptor Fc, inactivando al linfocito B.

- d) La unión, la región Fc de los anticuerpos que forman parte de complejos inmunes al receptor Fc de linfocitos T, promueve la puesta en marcha de mecanismos de supresión de la respuesta inmune.

En clínica la administración de inmunoglobulina intravenosa representa un tratamiento de primera línea en pacientes con inmunodeficiencia humoral y es un agente inmunomodulador alternativo o complementario en pacientes con desórdenes inflamatorios sistémicos y enfermedades autoinmunes (tabla 14-2), en los cuales suprime, previene o retarda las manifestaciones clínicas. Los efectos de la administración de inmunoglobulina intravenosa se manifiestan a distintos niveles y a través de distintos mecanismos de acción como el bloqueo de receptores Fc en macrófagos esplénicos, la neutralización de autoanticuerpos circulantes, inhibición del daño mediado por complemento y la modulación de la síntesis y secreción de citoquinas inflamatorias (tabla 14-3).

Tabla 14-2. Enfermedades autoinmunes y cuadros inflamatorios sistémicos en los que se ha mostrado efecto benéfico de inmunoglobulina intravenosa.

Púrpura trombocitopénico idiopático
Neutropenias autoinmunes
Anemias hemolíticas autoinmunes
Eritroblastopenia autoinmune
Enfermedad de von Willebrand
Síndrome de Kawasaki
Dermatomiositis
Lupus eritematoso sistémico
Artritis reumatoide
Polimiositis
Síndrome de Guillain-Barré
Miastenia gravis
Esclerosis múltiple
Diabetes mellitus insulino dependiente
Colitis ulcerativa
Enfermedad de Crohn



Tabla 14-3. Mecanismos de acción de la inmunoglobulina intravenosa

Bloqueo de receptores Fc en macrófagos esplénicos
Unión de fragmentos C3b y C4b e inhibición del daño por complemento
Modulación de la síntesis y secreción de citoquinas inflamatorias (IL-1, IFN γ , TNF).
Neutralización anti-idiotípica de autoanticuerpos circulantes
Modificación de la solubilidad, clearance y propiedades inflamatorias de los complejos inmunes
Neutralización de superantígenos y toxinas (Síndrome de Kawasaki)
Regulación idiotípica de linfocitos B y linfocitos T

3.7. Regulación por Prostaglandinas

Las prostaglandinas son pequeñas moléculas lipídicas que regulan numerosos procesos orgánicos, incluyendo función renal, agregación plaquetaria, liberación de neurotransmisores y modulación de la respuesta inmune. En respuesta a un estímulo inflamatorio, la producción de prostaglandinas se inicia con la Fosfolipasa A2 que libera ácido araquidónico desde los fosfolípidos de membrana. El ácido araquidónico es luego transformado en endoperóxidos cíclicos (PGH₂) por acción de la Cicloxigenasa (Cox-1 y Cox-2). La Cox-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos y actúa en procesos de regulación mucosa; Cox-2, en cambio, es una enzima inducible involucrada en los procesos de regulación de la inflamación. Prostaglandina sintetasas específicas transforman PGH₂ en distintas prostaglandinas (PGL₂, PGF₂ α , PGD₂ y PGE₂) que, una vez liberadas de las células, actúan cerca de su sitio de producción uniéndose a receptores de membrana específicos. De la PGD₂ deriva la molécula 15-d PGJ₂ que es producida por diversas células.

3.7.1. Prostaglandina E₂ (PGE₂)

La PGE₂ es producida por diversas células (incluyendo fibroblastos y macrófagos) y ejerce su acción uniéndose a uno o varios de los receptores: EP₁ EP₂ EP₃ EP₄.

En **linfocitos T**, la PGE₂ inhibe la proliferación de linfocitos T “helper” y T citotóxicos y aún cuando el mecanismo de acción no está bien establecido, se ha sugerido que inhibiría la liberación de Ca²⁺ intracelular y la actividad de la tirosina kinasa p59. Por otra parte, se ha demos-

trado que la PGE₂ induce la apoptosis en células T inmaduras (doble positivas TCD4⁺/CD8⁺) y en células T maduras inactivas, pero inhibe la apoptosis de células T maduras y activadas. En este último caso se ha observado que disminuye la expresión del mRNA que codifica FAS-L (“FAS ligand”). La PGE₂ favorece además la producción de IL2, IL-5 e IL-10 (respuesta Th2), probablemente mediada por AMPc, e inhibe la producción de IFN γ e IL-2 (respuesta Th1).

En los **linfocitos B**, la PGE₂ induce apoptosis de las células inmaduras, pero no en las células maduras. Por otra parte, en linfocitos B estimulados con LPS e IL-4, la PGE₂ estimula la producción de la IgG₁ e IgE, en desmedro de la producción de IgG₃ e IgM, mediante un mecanismo dependiente de AMPc

En **células presentadoras de antígeno** (CPA) de tejidos periféricos, la PGE₂ activa CPA profesionales (células dendríticas, macrófagos), pero una vez que éstas han migrado a los órganos linfoides secundarios, su maduración y por tanto su capacidad de presentar antígenos, son inhibidas por PGE₂. También se ha observado que en macrófagos, la PGE₂ inhibe la síntesis de TNF α , IL-1 β , IL-8 e IL12.

3.7.2. Prostaglandina 15-d PGJ₂

Esta prostaglandina es producida por diversas células (mastocitos, células T, plaquetas y macrófagos alveolares) y deriva de la PGD₂. Se desconoce su mecanismo de ingreso a las células, pero probablemente lo hace a través de un mecanismo activo o por una molécula transportadora aniónica.

En linfocitos T y linfocitos B la prostaglandina 15-d PGJ₂ inhibe la proliferación



celular e induce apoptosis. En neutrófilos, esta prostaglandina inhibe la producción de radicales libre de oxígeno y en macrófagos se ha descrito que inhibe la producción de sintetasa de óxido nítrico (NOS), de $\text{TNF}\alpha$ y de $\text{IL-1}\beta$, mediante un mecanismo que involucra la inhibición de diversas quinasas.

LECTURAS SUGERIDAS

Aste-Amezaga, M., et al., "Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10", *The Journal of Immunology*, 160: 5936-5944, 1998.

Cobbold, S. and Waldmann, H. "Infectious Tolerance", *Current Opinion in Immunology*, 10:518-524, 1998.

Finkelman, F., et al., "The role of IL-13 in helminth-induced inflammation and protective immunity against nematode infections", *Current Opinion in Immunology*, 11:420-426, 1999.

Groux, H. and Powrie, F., "Regulatory T cells and inflammatory bowel disease", *Immunology Today*, 10: 442-445, 1999.

Kalinski, P., et al., "T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal", *Immunology Today*, 12:561-567, 1999.

Medzhitov, R. and Janeway Jr., C., "Innate Immunity", *The New England Journal of Medicine*, 343:338-344, 2000.

Noben-Trauth, N., et al., "Conventional, naive CD4^+ T cells provide an initial source of IL-4 during Th2 differentiation", *The Journal of Immunology*, 165: 3620-3625, 2000.

Sarah, G., et al., "Prostaglandins as modulators of immunity", *Trends in Immunology*, 23(3):143-150, 2002.

Von Andrian, U. and Mackay, C., "T-cell function and migration", *The New England Journal of Medicine*, 343:1020-1033, 2000.





Capítulo 15

NEUROINMUNOLOGÍA

Hugo Folch V., Miguel Barría M. y Patricio Esquivel S.

- 1. Introducción**
- 2. Interacciones entre el sistema nervioso central, sistema endocrino y sistema inmune**
 - 2.1. Inervación de los órganos linfoides
 - 2.2. Existencia de un eje Sistema nervioso central-hipófisis-sistema inmune
 - 2.3. El SNC tiene "conocimiento" de la entrada de antígeno al organismo y responde a él
 - 2.4. El sistema inmune produce hormonas
 - 2.5. El sistema inmune tiene receptores para hormonas y neuropéptidos
 - 2.6. Otras señales derivadas del sistema inmune tienen efecto en el sistema neuroendocrino
- 3. Resultante de la interacción del sistema nervioso, sistema endocrino y el sistema inmune: evidencias en el organismo vivo que demuestran su efecto en la respuesta inmune**
 - 3.1. Efecto del "stress" en la respuesta inmune
 - 3.2. Depresión e inmunidad
 - 3.3. Efecto de los factores sociales en la respuesta inmune
 - 3.4. Las drogas psicoactivas alteran el funcionamiento del sistema linfoides
 - 3.5. Las hormonas sexuales modulan la respuesta autoinmune
- 4. Algunos casos en que el sistema inmune origina cambios o trastornos en el sistema nervioso**
 - 4.1. Efecto de los anticuerpos a nivel del sistema nervioso
 - 4.2. Efecto de complejos antígeno-anticuerpo en el sistema nervioso central
 - 4.3. Rol patogénico de linfocitos T, macrófagos y citoquinas en el tejido nervioso





RESUMEN

El funcionamiento del sistema inmunológico depende de múltiples factores que regulan cada uno de los eventos, tanto celulares como moleculares, que se ponen en marcha en el momento de la entrada del antígeno. Los factores que condicionan la respuesta inmune pueden clasificarse en intrínsecos, los que se originan en el propio sistema inmune, y en factores extrínsecos que provienen del medio interno del organismo, alguno de los cuales se encuentran condicionados por el entorno en que el individuo desarrolla su actividad. De los factores reguladores externos al sistema inmune, el sistema neuroendocrino juega un papel preponderante.

El sistema neuroendocrino influye sobre el sistema inmune directamente mediante la innervación de los órganos linfoides, los productos del eje hipotálamo-hipofisiario y otras hormonas o neuropéptidos, para los cuales los linfocitos tienen receptores específicos. Por otro lado, los linfocitos producen hormonas y neuropéptidos, que junto con las citoquinas que induce el estímulo antigénico, pueden ser percibidos por el sistema nervioso central y modificar su actividad.

La demostración de la interacción de los sistemas neuroendocrinos e inmunológico, permiten explicar el efecto inmunodepresor producido por circunstancias que inducen "stress", factores sociales adversos, consumo de drogas psicoactivas o las hormonas sexuales, entre otras.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune puede ser considerado como un órgano sensorial capaz de reconocer estímulos no cognoscitivos como bacterias, virus y tumores, mientras que el sistema nervioso central reconoce estímulos cognoscitivos clásicos: químicos, físicos y emocionales. Los sistemas inmune, nervioso central y neuroendocrino interactúan a través de la liberación de citoquinas y hormonas con un circuito de retroalimentación. En este circuito la vía aferente está representada por el sistema inmune que informa al sistema nervioso central y estimula el eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal a través de la liberación de productos de linfocitos activados.

La respuesta inmune, elemento efector elaborado específicamente frente a un antígeno, depende de una gran cantidad de factores, que pueden englobarse en aquellos dependientes del medio interno del organismo y aquellos dependientes del medio externo. Entre los factores del medio externo cabe destacar temperatura ambiental, radiación solar, ciclos estacionales, ciclo día-noche, etc. Entre los factores del medio interno destacan, por un lado, los elementos propios del sistema inmune como linfocitos T, linfocitos B, moléculas de ad-

hesión expresadas en su superficie, citoquinas y anticuerpos y por otro, elementos ajenos al sistema inmune, pero que condicionan el medio interno en el cual se desarrolla la respuesta inmune: citoquinas secretadas por células que no pertenecen al sistema inmune, temperatura, nutrientes, pH, vitaminas, hormonas y neuropéptidos; elementos éstos que, a su vez, sufren la influencia de factores ajenos al individuo (figura 15-1).

Esta visión integradora del sistema inmune, lo hace aparecer como interdependiente del resto del organismo, contrapuesta con la posición sostenida hasta no hace mucho tiempo, en que se consideraba al sistema inmune prácticamente como autónomo. Probablemente uno de los avances más significativos del último tiempo, haya sido el poner en evidencia la interdependencia del sistema nervioso central (SNC), sistema endocrino y sistema inmune, que establecen una red interactiva que regula y condiciona fuertemente la respuesta inmune. Este aspecto queda demostrado por la existencia de receptores en la membrana de linfocitos para neurotransmisores y hormonas, se sabe que los linfocitos producen hormonas y que existen células del sistema neuroendocrino que producen citoquinas que hasta hace poco eran atribuidos sólo al sistema linfóide (figura 15-2).

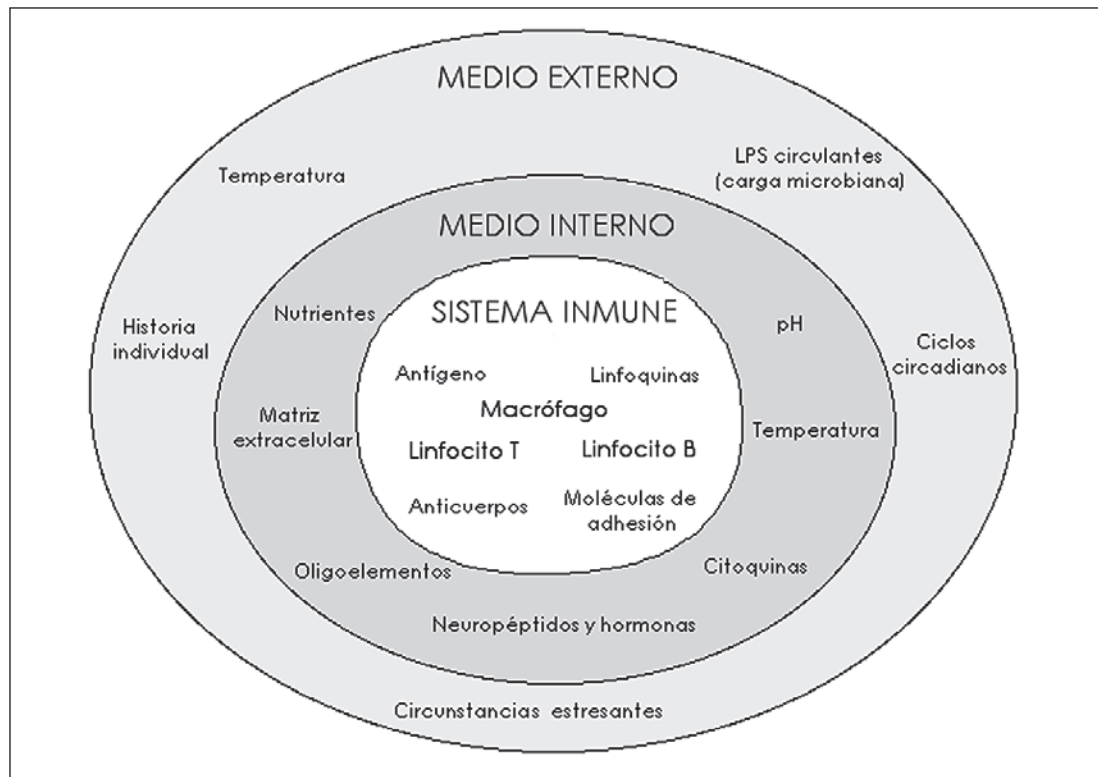


Figura 15-1. Algunos de los aspectos más relevantes que condicionan el accionar de células B, T y macrófagos. Éstos se encuentran divididos en 3 categorías: (a) los factores reguladores que provienen del propio sistema inmune, (b) factores externos al sistema linfóide, provenientes del medio interno del organismo y (c) elementos externos al individuo que juegan un rol en la respuesta inmune actuando sobre el sistema linfóide o el medio interno.

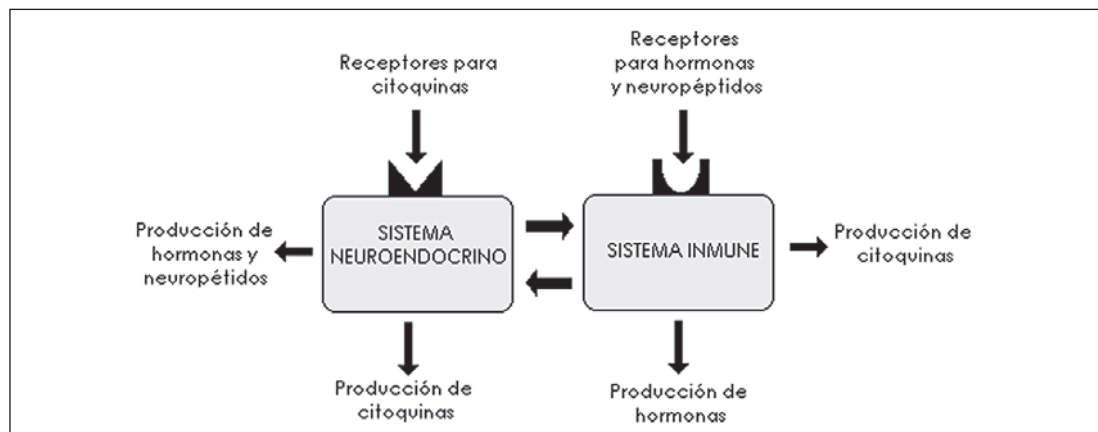


Figura 15-2. Interacción entre el sistema neuroendocrino y el sistema inmune. El esquema muestra cómo además de las funciones propias cada uno de estos dos sistemas homeostáticos pueden producir linfocinas, hormonas y neuropéptidos y que las células de ambos, tienen receptores para estos factores de regulación.

2. INTERACCIONES ENTRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL, SISTEMA ENDOCRINO Y SISTEMA INMUNE

El sistema inmune está constantemente interactuando con el sistema neuroendocrino lo

que asegura que las respuestas inmunes e inflamatoria estén en armonía con otras funciones del organismo. Estos sistemas usan similares ligandos y receptores para establecer una comunicación fisiológica intra e intersistema, lo que juega un papel relevante en la homeostasis. Así,





no sólo las hormonas clásicas pueden ser producidas por células del sistema inmune, sino que una variedad de citoquinas (originalmente descritas como producidas por monocitos y linfocitos) son sintetizadas y liberadas por una variedad de glándulas endocrinas y tejido nervioso. Además, receptores específicos para estas moléculas pueden encontrarse en los sistemas inmune y neuroendocrino. A continuación se desarrollará brevemente algunos expuestos de esta interacción:

2.1 Inervación de los órganos linfoides

Los órganos del sistema inmune están conformados por un estroma de células y fibras organizadas en una red tridimensional, que da soporte a las diferentes poblaciones celulares directamente involucradas en la respuesta inmune. Las células del sistema inmune son en su mayoría móviles, dispuestas en compartimentos y sujetas a súbita proliferación o extensos procesos de muerte programada producto de la estimulación antigénica. En la cinética de estos procesos la inervación del estroma juega un papel importante: el análisis de los neurotransmisores que contienen los axones de un área en particular de tejido linfoide, ha permitido demostrar en sus terminaciones norepinefrina, neuropéptido Y, sustancia P, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina y el péptido intestinal vasoactivo. Todas estas sustancias son vasoactivas y como tales pueden modificar el flujo sanguíneo local, influyendo de esta forma en el tráfico celular. Por otra parte, también se ha descrito una acción directa de estas sustancias de origen nervioso sobre los linfocitos, derivado del hecho de que estas células tienen receptores específicos para la mayoría de dichos productos. Su acción sobre la célula linfoide se traduce en la elevación de los niveles intracelulares de segundos mensajeros, lo que con seguridad contribuye a la estimulación linfocitaria y a la generación de una respuesta inmune compartimentalizada. Esto último se deriva de la diferente inervación que es posible observar en áreas T, áreas B o zonas de interacción celular T-B como la zona marginal del bazo.

2.2 Existencia de un eje Sistema nervioso central-hipófisis-sistema inmune

La literatura provee múltiples evidencias sobre la existencia de circuitos reguladores que se originan en el SNC y lo conectan con la hipófisis,

que mediante sus productos de secreción puede actuar directamente sobre las células del sistema inmune o activar a glándulas periféricas del sistema endocrino como tiroides, suprarrenales o gónadas, cuyos productos hormonales a su vez pueden actuar sobre el sistema linfoide. La estrategia más usada para poner en evidencia la existencia de este eje regulatorio es la lesión selectiva en determinadas áreas del SNC o de la hipófisis. Al respecto se ha demostrado que la destrucción selectiva del hipotálamo anterior reduce la celularidad del timo y bazo, deprime la respuesta proliferativa de las células T a mitógenos, disminuye la actividad NK (de células "natural killer"), induce una baja en la producción de anticuerpos e inhibe el "shock" anafiláctico. Se puede concluir así, de estos experimentos, que el hipotálamo anterior tiene la capacidad de influir la respuesta inmune tanto celular como humoral. La hipofisectomía, a su vez, produce una baja en la celularidad de la médula ósea, una discreta anemia y una involución tímica. En animales que presentan hipófisis hipofuncional, el bazo y los nódulos linfáticos se presentan atrofiados. En general los reportes coinciden en que la hipofisectomía reduce la respuesta inmune celular y humoral.

Por otra parte, experimentos de diferenciación de células T *in vitro* han demostrado que cocultivos de explantes hipotalámicos (región medio basal), con hipófisis y timo representan un eje de acción que culmina con la diferenciación de células de médula ósea en células Thy1⁺. Este efecto opera a través del lóbulo anterior de la hipófisis y es dependiente de la presencia de hipotálamo, lo que indica la producción por parte de esta estructura nerviosa de factores reguladores que actuarían sobre hipófisis la cual a su vez liberaría factores que actuando sobre timo inducen a sus células para liberar hormonas tímicas, responsables finales de la diferenciación de células T. En el eje de diferenciación de células T descrito antes (hipotálamo-hipófisis-timo) se ha demostrado que la hipófisis participa liberando prolactina (PRL) e IL-6 que serían, al menos parcialmente, responsables de la liberación de hormonas tímicas en esta glándula linfoide.

Estudios *in vivo*, demuestran que la administración de extractos hipotalámicos provenientes de animales jóvenes, restauran los niveles de timulina circulante en animales viejos, en los cuales esta hormona es inexistente. Además, estos animales viejos que presentan una respuesta inmune T dependiente disminuida, cuando reciben extractos



hipotalámicos provenientes de ratones jóvenes, presentan una respuesta T de niveles tan altos como los detectados en el animal joven. Esto indicaría que el "envejecimiento" del sistema inmune sería más bien responsabilidad del hipotálamo como elemento regulador central.

Se sabe que la hipófisis libera una serie de hormonas bien conocidas, cuya secreción se encuentra bajo la influencia de factores hipotalámicos. De las hormonas hipofisiarias conocidas, PRL y hormona del crecimiento (GH) parecen jugar papeles importantes en la estimulación de la función inmune. Por otra parte, la hormona adreno-corticotrofina (ACTH) también aparece involucrada, jugando generalmente un papel inhibitorio de la respuesta inmune, ya que estimula la secreción de glucocorticoides (ver tabla 15-1).

Adicionalmente, se ha demostrado que la secreción hipofisiaria de otros factores de crecimiento e interleuquinas, también tienen influencia en el desarrollo de la respuesta inmune (figura 15-3).

2.3 El SNC tiene "conocimiento" de la entrada de antígeno al organismo y responde a él

Se sabe que el proceso de inmunización induce, a nivel del SNC, por un aumento de las descargas eléctricas en regiones discretas del hipotálamo. Esto probablemente, es derivado de

su estimulación vía linfoquinas que, mediante la interacción con su receptor neuronal son capaces de activar las células del sistema nervioso, directa o indirectamente, generando un efecto estimulador de cascada en un sistema de neuronas interconectadas. Al respecto, existen evidencias que el lipopolisacárido bacteriano induce la liberación de interleuquinas en estructuras del sistema nervioso y de la hipófisis, siendo esa una señal importante de entrada de antígenos bacterianos al organismo.

2.4 El sistema inmune produce hormonas

Antiguos experimentos de Pierpaoli, demostraron que ratones enanos hipo-hipofisiarios podían mejorar en parte sus severos trastornos endocrinos, si eran transfundidos con linfocitos singeneicos de animales normales, dando pie para pensar que las células inmunes eran capaces de producir algunas hormonas. Más tarde pudo ser demostrado que leucocitos periféricos de animales infectados con virus o bacterias producen ACTH y endorfinas, idénticas a las producidas en la adenohipófisis. Igual cosa se ha demostrado para linfocitos T estimulados con superantígeno estafilocócicos, los que producen tirotrófina (TSH), GH y gonadotrofina coriónica (GC). Adicionalmente, en líneas celulares tanto

Tabla 15-1. Modulación de la respuesta inmune por hormonas hipofisiarias

Hormona	Efecto Modulador
Corticotropina	Síntesis de anticuerpos Producción de IFN- γ Crecimiento de células B.
Endorfinas	Síntesis de anticuerpos. Actividad de células NK.
Tirotropina	Aumenta síntesis de anticuerpos. Comitogénico con ConA.
Hormona del crecimiento (GH)	Células T citotóxicas. Aumenta respuesta inmune.
Hormona luteinizantes (LH) y Hormona folículo estimulante (FSH)	Producción de citoquinas.
Prolactina (PRL)	Aumenta respuesta inmune. Induce receptores a IL-2

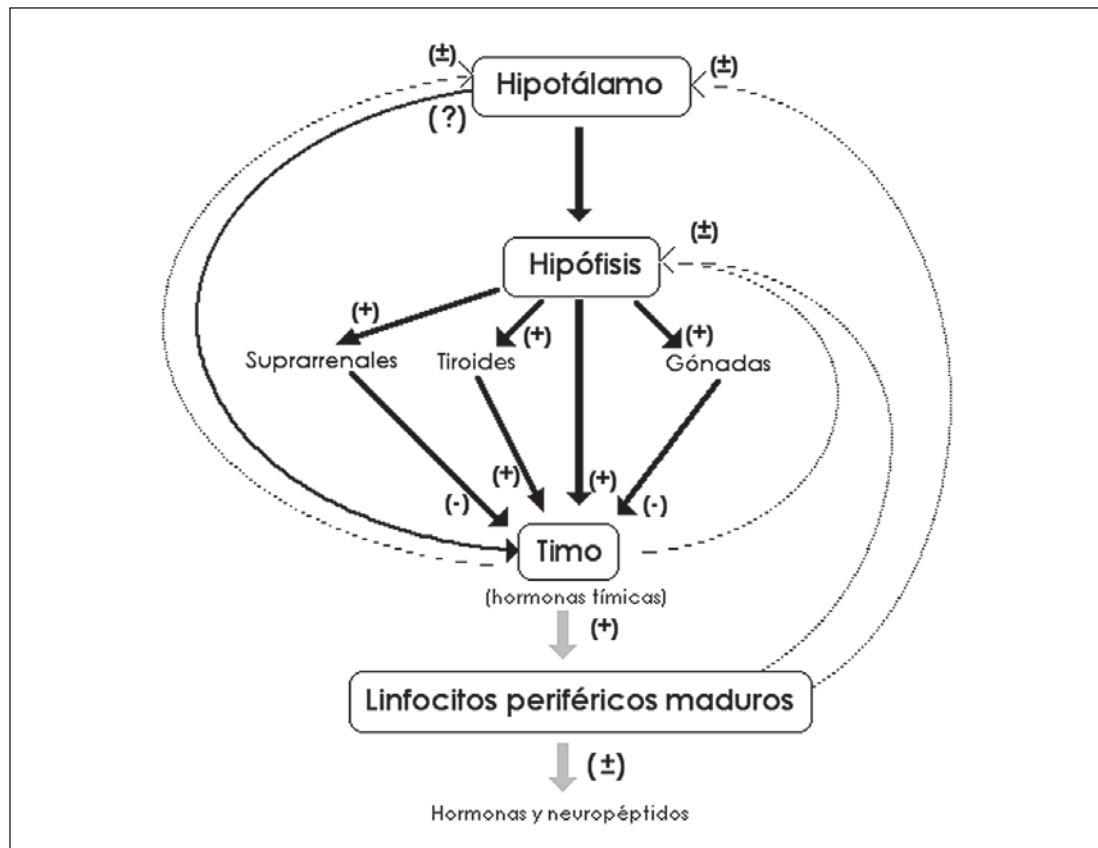


Figura 15-3. Esquema de interacciones positivas (+), negativas (-) o de ambos tipos (±) que ocurren entre hipotálamo-hipófisis y glándulas endocrinas, hipotálamo, hipófisis y glándulas endocrinas con el timo, acción de las hormonas tímicas sobre los linfocitos periféricos, efecto de hormonas provenientes de las diferentes glándulas endocrinas y de neuropéptidos ya sea origen central o provenientes de terminaciones nerviosas periféricas, sobre los linfocitos maduros y posible acción de productos de linfocitos sobre estructuras nerviosas y endocrinas.

B como T se ha demostrado la presencia de mRNA para la mayoría de las hormonas conocidas. También se ha demostrado que las células nodrizas del timo, son capaces de producir oxitocina y vasopresina, pudiendo así, postularse para el sistema inmune una función en la modulación del sistema endocrino y más aún su fortificación directa en el "concierto endocrino" del organismo.

2.5 El sistema inmune tiene receptores para hormonas y neuropéptidos

La real comunicación de hormonas y neuropéptidos con las células linfoides, necesita de la demostración de receptores para estas sustancias. Así, las primeras evidencias de la existencia de receptores opioides en la membrana de los linfocitos, surgieron de la demostración del efecto inmuno-modulador que posee la morfina y

la metenkephalina sobre la función T. En efecto, receptores opioides de alta afinidad han sido identificados en líneas celulares linfoides de diferente origen.

En la tabla 15-2 se presenta un resumen de los receptores para algunas hormonas y neuropéptidos en células linfoides.

2.6 Otras señales derivadas del sistema inmune con efecto en el sistema neuroendocrino

El estudio de elementos del sistema inmune que pueden afectar el sistema nervioso, sirviendo de comunicadores entre ambos sistemas, se ha centrado en las citoquinas, elementos clásicos de comunicación dentro del sistema inmune. Al respecto se sabe que IL-1 aumenta los niveles de ACTH y corticosterona en el torrente sanguíneo de ratas y ratones, actuando directamente sobre la hipófisis y paralelamente estimulando



la producción de factor liberador de corticotrofina (CRF) en el hipotálamo. Adicionalmente, IL-1 induce una hipofunción de la glándula tiroides. Por otro lado, IL-6 y TNF (Factor de necrosis tumoral) aumentan los niveles de ACTH y junto con INF- γ se ha demostrado afectan los mecanismos reguladores del sueño a nivel del SNC. En la tabla 15-3 se presenta el efecto de diferentes citoquinas en

el sistema neuroendocrino.

LH, Hormona luteinizante

Otros mensajeros inmunológicos potenciales son serotonina e histamina producidos en grandes cantidades en determinados procesos inmunes. Fuera de los mediadores señalados existen múltiples otras sustancias generadas en el sistema inmune, candidatos a ejercer funciones parecidas y cuyo efecto específico espera ser demostrado.

Tabla 15-2. Receptores para hormonas y neuropéptidos en células linfoides

Péptido	Células que presentan receptores
Corticotropina	Linfocitos T y B
Enkefalinas	Linfocitos T y B
Endorfinas	Linfocitos T y B
Tirotropina	Linfocitos T
Hormona del Crecimiento	Linfocitos T
Prolactina	Linfocitos T, B y macrófagos
Oxitocina	Timocitos
VIP	Linfocitos T
Somatostatina	Linfocitos T y B
Sustancia P	Linfocitos T

Tabla 15-3. Efecto de citoquinas en el sistema neuroendocrino

Hormonas Neuroendocrinas					
Citoquina	ACTH	TSH	PRL	GH	LH
IL-1	E	I	E	E	I
IL-2	E	E	E	I	I
IL-6	E	I	O	I	O
IFN- γ	E	I	O	I	Nd
TNF	E	I	E	E	Nd

E, Estimula; I, Inhibición; O, Sin efecto; Nd, No determinado.

ACTH, Hormona adrenocorticotrofina; TSH, Tirotrofina; PRL, Prolactina; GH, Hormona del crecimiento;



3. RESULTANTE DE LA INTERACCIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO, SISTEMA ENDOCRINO Y EL SISTEMA INMUNE: EVIDENCIAS EN EL ORGANISMO VIVO QUE DEMUESTRAN SU EFECTO EN LA RESPUESTA INMUNE

Al considerar al organismo como un todo, y mediante la evaluación de parámetros inmunológicos se hace evidente los efectos que los sistemas nervioso y endocrino tienen sobre el sistema linfóide. Sobresalen al respecto los efectos del "stress", de factores sociales, de drogas psicoactivas y de las hormonas sexuales.

3.1 Efecto del "stress" en la respuesta inmune

En el hombre es conocido el efecto depresor que, sobre el sistema inmune, tienen los cambios en las relaciones interpersonales de los individuos. Ejemplos clásicos en este aspecto son el fallecimiento de uno de los cónyuges o el divorcio. El efecto del "stress" crónico, como el de una familia que cuida a alguno de sus miembros afectados de demencia, o individuos que sufren diversos grados de depresión, también es detectado por el sistema inmune cuyos parámetros generales, en estos casos, están bajo la mediana de una población normal. Los individuos bajo condiciones estresantes presentan, en general, un mayor riesgo a contraer enfermedades virales y representan un grupo de riesgo en relación a la ocurrencia de neoplasias. Los hallazgos más recurrentes en estos casos son una pobre respuesta blastogénica de los linfocitos periféricos, alteración de la relación de los linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ y una baja notable en el número de las células NK.

En animales, el efecto depresor del "stress" en el sistema inmune ha sido probado mediante un aumento de la morbilidad y mortalidad por neoplasias inducidas o trasplantadas.

Los animales sometidos a "stress" presentan, igual que en el hombre, alteraciones importantes en la respuesta de sus linfocitos a mitógenos, una marcada disminución del número relativo de las células NK en los órganos linfoides periféricos y alteraciones en las células macrofágicas, que demuestran una menor capacidad fagocítica y una baja capacidad germicida intracelular.

Los efectos descritos tienden a explicarse, a menudo, por el efecto estimulador que tiene el "stress" sobre el eje hipotálamo-pituitaria-glándula suprarrenal y al aumento de los corticoides

plasmáticos que se produce por esta vía. Sin embargo, reconociendo su importancia, parece ser que los efectos inmunológicos del "stress" no obedecen sólo a esa causa, ya que cuidadosos estudios en animales adrenalectomizados con la correspondiente terapia de reemplazo, han dado resultados controversiales.

3.2 Depresión e inmunidad

La depresión mayor es un cuadro de bastante frecuencia. Está estrechamente asociado al stress considerándose como una respuesta exagerada a él desde el punto de vista biológico y clínico. La depresión se acompaña de cambios neuroendocrinos, particular y notoriamente un aumento en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis adrenal. Por otra parte las manifestaciones de la depresión incluyen cambios en las funciones vegetativas tales como sueño, apetito y otras. Dado que hay muchas evidencias que las citoquinas están involucradas en la mayoría de estas características de la depresión, es altamente probable su participación independiente del papel de otros neurotransmisores.

3.3 Efecto de los factores sociales en la respuesta inmune

En la especie humana se correlacionan positivamente con una buena respuesta inmune: una buena calidad de vida, un entorno social agradable y una familia bien avenida. Esta correlación positiva aumenta si a esta condición se adiciona un buen estatus socio-económico y un alto nivel de educación.

Estudios en roedores demuestran, por otra parte, que el tamaño del grupo, su composición y grado de hacinamiento influyen en forma importante en la respuesta inmune. También el aislamiento o la privación del contacto materno en los primeros días de vida inducen cambios medibles en la maduración del sistema inmune. Más aún, animales mantenidos en un grupo cerrado muestran diferencias en sus parámetros inmunológicos de acuerdo a la jerarquía social que ocupan en la colonia.

Como corolario de esto, se puede suponer que los factores sociales que rodean a cada individuo influyen en su resistencia a las enfermedades infecciosas, crecimiento de neoplasias y enfermedades autoinmunes, aún cuando este punto requiere mayor investigación.



3.4 Las drogas psicoactivas alteran el funcionamiento del sistema linfoide

Es conocido que los opiáceos, la cocaína y la marihuana además de su efecto estimulador para el SNC, ejercen un efecto depresor de diversos parámetros inmunológicos. En general, los fumadores crónicos de marihuana al igual que los animales de experimentación que recibieron 9-tetrahidrocannabinol, uno de sus principios psicoactivos más potentes, demuestran importantes alteraciones en el sistema macrofágico, una reducida respuesta blastogénica de los linfocitos T y B, un bajo porcentaje de células NK y baja producción de IL-2 e IFN γ . Los efectos de la cocaína parecen ser aún más pronunciados.

3.5 Las hormonas sexuales modulan la respuesta autoinmune

El hecho que para la mayoría de las enfermedades autoinmunes, el género más afectado sea el femenino, tanto en el hombre como en los animales de experimentación, permite suponer que las hormonas sexuales juegan un papel importante en la patogénesis de estas enfermedades. Esta noción se refuerza cuando se constata que el embarazo o el climaterio cambia a menudo en las mujeres el curso de la enfermedad autoinmune. En animales experimentales la gonadectomía o la administración de esteroides gonadales permite demostrar claramente el papel inmuno-regulador de estos compuestos, el que puede ser ejercido directamente sobre las diversas subpoblaciones linfocitarias o a través del efecto modulador que estas sustancias tienen sobre la glándula tímica.

4. ALGUNOS CASOS EN QUE EL SISTEMA INMUNE ORIGINA CAMBIOS O TRASTORNOS EN EL SISTEMA NERVIOSO

Por último, pero no menos importante para la vida de los individuos, es posible afirmar que una respuesta inmune persistente como la que se da en las enfermedades autoinmunes o en las infecciones virales crónicas pueden alterar profundamente el funcionamiento del SNC, causando cambios en el comportamiento de hombres y animales, estados de letargo y aún demencia.

Los agentes desencadenantes de estos cuadros neurológicos parecen ser fundamentalmente tres: anticuerpos que dan reacción cruzada con estructuras del cerebro, complejos inmunes y pro-

ductos de la respuesta inmune celular:

4.1 Efecto de los anticuerpos a nivel del sistema nervioso

Los anticuerpos unidos a receptores de membrana de la célula nerviosa pueden bloquear, estimular o alterar la función de estas estructuras. Pueden, más aún, inducir lisis celular a través de la activación de la cascada del complemento, y junto con esto mediante la acción de sus sub-productos moleculares puede amplificar y diversificar los efectos de la noxa primaria. Adicionalmente los anticuerpos dirigidos contra estructuras intracelulares pueden bloquear el transporte axonal y causar otros trastornos en las células nerviosas.

4.2 Efecto de complejos antígeno-anticuerpo en el sistema nervioso central

El depósito de complejos inmunes a nivel de vasos sanguíneos cerebrales, plexo coroideo y neuronas, al activar la cascada del complemento altera la barrera hemato-encefálica y los productos bioactivos del complemento, al igual que en el caso anterior, pueden producir inflamación y daño tisular local.

4.3 Rol patogénico de linfocitos T, macrófagos y citoquinas en el tejido nervioso

La inmunidad celular, que a menudo tiene como blanco componentes de la mielina o directamente constituyentes de las células neuronales, pueden generar infiltrados linfocitarios y/o monocíticos con una alta producción local de citoquinas, que en suma producen destrucción o alteración del tejido nervioso circundante.

LECTURAS SUGERIDAS

Adder, R, Felten, D. and Cohen, N. (Eds.) **Psychoneuroimmunology**, second edition, Academic Press Inc., 1991.

“Immune-neuroendocrinology, special issue”, *Immunol Today*, 15: 503-552, 1994.

Goetzl, E., Adelman, D.C. and Sreedharan, S.P. “Neuroimmunology”. *Advances in Immunology* 48: 161-184, 1990.



Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 16

INMUNIDAD DE MUCOSAS

Ulises Vergara C. e Iván Palomo G.

-
- 1. Introducción**
 - 2. Sistema inmune de mucosas**
 - 2.1. Organización estructural
 - 2.2. Transporte y presentación de antígenos
 - 3. Funciones efectoras de la inmunidad de mucosas**
 - 3.1. Respuesta inmune de anticuerpos
 - 3.2. Respuesta inmune celular
 - 4. Inmunización a través de mucosas**
 - 4.1. Uso de adyuvantes
 - 5. Tolerancia inducida a través de mucosas**





RESUMEN

El compartimiento más conocido del sistema inmune es el sistémico, sin embargo el compartimiento epitelial que agrupa los tejidos linfoides asociados a la piel, mucosas y glándulas secretoras, tiene también gran importancia.

El tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) se ubica en mucosas de los tractos gastrointestinal, genitourinario y respiratorio. En los tractos intestinal y respiratorio son muy importantes las células M, especializadas en el transporte de antígenos desde el epitelio que tapiza los folículos linfocitarios, a los sitios de inducción de la respuesta inmune. Allí se encuentran células dendríticas, que capturan y procesan los antígenos para ser presentados a los linfocitos T (LT).

La respuesta inmune de mucosas puede ser de tipo humoral y/o celular. En el primer caso tiene una fundamental participación la IgA de secreción. La inmunidad celular, por su parte, junto con participar en la eliminación de microorganismos a través de LT específicos, proporciona señales accesorias de coestimulación para la diferenciación de linfocitos B.

En este capítulo, además, se describe las características que tiene la inmunización a través de mucosas y las diferencias que ésta presenta respecto de la inmunización vía sistémica.

1. INTRODUCCIÓN

Desde un punto de vista estructural, el sistema inmune puede separarse en dos compartimientos distintos y finamente regulados: (i) el **compartimiento sistémico**, que incluye a la médula ósea, bazo y ganglios linfáticos y (ii) el **compartimiento epitelial**, que incluye tejido linfoide asociado a la piel, las superficies mucosas y glándulas secretoras (glándulas lagrimales, glándulas salivales y glándulas mamarias).

Cada compartimiento incluye tanto células asociadas a la respuesta inmune humoral, como aquellas asociadas a la respuesta inmune celular. Sin embargo la naturaleza y propiedades de la respuesta inmune son distintas en cada compartimiento. Así, la inmunización a través de las mucosas resulta frecuentemente en la estimulación tanto de una respuesta a nivel de mucosas, como de una respuesta sistémica. La inmunización parenteral, en cambio, sólo induce una respuesta sistémica, sin activación del sistema inmune asociado a mucosas. Los anticuerpos asociados al compartimiento sistémico son principalmente de isotipo IgG, cuya función se asocia, generalmente, a la neutralización de agentes patógenos en el torrente circulatorio. Los anticuerpos asociados al compartimiento epitelial, son por el contrario, pri-

mariaamente de isotipo IgA, que previenen la entrada de agentes patógenos a través de mucosas. La respuesta inmune sistémica puede eliminar de manera muy efectiva las infecciones sistémicas, pero generalmente falla en la protección de las superficies mucosas. Así, el desarrollo de una activa respuesta inmune local, es esencial para la prevención de la mayoría de las enfermedades infecciosas.

Las mucosas del tracto respiratorio y gastrointestinal están continuamente expuestas a una gran variedad de antígenos y macromoléculas, pero un número muy limitado de ellas entran al organismo y causan enfermedad.

Las barreras epiteliales representan la primera línea de defensa contra el ambiente externo, rico en potenciales patógenos. Sin embargo, el tejido linfoide asociado a distintos epitelios difiere en su organización celular y en las estrategias utilizadas en la captura y presentación de antígenos, no sólo para proporcionar resistencia a distintos agentes infecciosos, sino también para distinguir entre agentes dañinos y sustancias inocuas. Esto es particularmente importante en el tracto digestivo, donde respuestas no deseadas contra antígenos alimentarios o contra la flora intestinal, puede conducir a alergias alimentarias, inflamación y otros problemas.



Aun cuando la producción de anticuerpos poliméricos (particularmente IgA) constituye un componente claramente importante del sistema inmune de mucosas, la respuesta IgE está también asociada a la exposición a antígenos a través de las mucosas (alergenos). Alergias alimentarias y asma son ejemplos comunes de reacciones mediadas por IgE en las mucosas. Además, existe una subpoblación de linfocitos que residen en los epitelios (linfocitos intraepiteliales) y pueden constituir la primera línea de defensa contra infecciones en las mucosas, cumpliendo tanto funciones efectoras citotóxicas como funciones reguladoras de la respuesta inmune. Las células citotóxicas son particularmente importantes en la protección contra infecciones virales que son comunes en las superficies mucosas.

Por último, la incorporación oral de antígenos puede inducir una tolerancia periférica antígeno-específica, conocida como tolerancia oral. Esta tolerancia oral prevendría las alergias alimentarias y las reacciones inflamatorias contra antígenos inocuos derivados de la microflora normal y puede tener un enorme potencial en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y de enfermedades inflamatorias.

2. SISTEMA INMUNE DE MUCOSAS

El sistema inmune de mucosas puede ser morfológica y funcionalmente separado en dos tipos de estructuras: (i) tejido estructuralmente organizado en la forma de **tejido linfoide asociado a mucosas** (MALT: “Mucosal-Associated Lymphoid Tissue”) y (ii) tejido linfoide difuso que consiste de linfocitos intraepiteliales y células presentadoras de antígeno, localizados en la lámina propia del tejido mucoso. El tejido MALT representa las **áreas linfoides aferentes o inductivas**, donde se produce el encuentro con los antígenos, su captura y procesamiento por células presentadoras (células dendríticas subepiteliales y macrófagos) y, una posterior y adecuada presentación a linfocitos T y B, para el desarrollo de una respuesta inmune efectiva. Por su parte, las regiones de tejido difuso representan las **áreas linfoides eferentes** donde los antígenos entran en contacto con células efectoras diferenciadas, anticuerpos y/o células citotóxicas. El desarrollo, tanto del tejido linfoide estructuralmente organizado, como del tejido linfoide difuso, es altamente antígeno dependiente, de manera tal que están

marcadamente reducidos en animales de laboratorio mantenidos en un ambiente libre de gérmenes y expandidos en condiciones de elevada estimulación antigénica.

2.1. Organización estructural

El tejido linfoide MALT incluye una colección de linfocitos y células accesorias ubicadas en el epitelio y lámina propia de las mucosas asociadas a los tractos gastrointestinal, genitourinario y respiratorio. En el tracto gastrointestinal el tejido linfoide (GALT: “Gut Associated Lymphoid Tissue”), incluye las placas de Peyer, apéndice y nódulos linfoides aislados. En el tracto respiratorio, el tejido linfoide incluye el tejido linfoide asociado a nasofaringe que está constituido por amígdalas palatinas y adenoides (NALT: “Nasopharyngeal-Associated Lymphoid Tissue”) y el tejido linfoide asociado al árbol bronquial (BALT: “Bronchus-Associated Lymphoid Tissue”).

En el tracto intestinal, la barrera epitelial está formada por una capa única de células epiteliales que contiene fundamentalmente enterocitos y células globosas o caliciformes productoras de mucus. Las células epiteliales están selladas por uniones estrechas, en la región apical de sus membranas. El tejido linfoide asociado a la mucosa se ubica a lo largo del tracto gastrointestinal y contiene folículos linfocitarios distribuidos individualmente o en forma de grupos que constituyen estructuras organizadas como las placas de Peyer y el apéndice. El epitelio que tapiza los folículos linfocitarios recibe el nombre de epitelio asociado al folículo (FAE: “Follicle-Associated Epithelium”) y se distingue del epitelio de otros sitios del intestino, por la presencia de células M especializadas en el transporte de antígenos, a los sitios de inducción de respuesta inmune en las mucosas (figura 16-1). Estas células pueden ocupar hasta el 10% del epitelio FAE en las placas de Peyer de humanos y ratones y hasta el 50% en conejos. Los enterocitos pueden también realizar transcitosis de macromoléculas y probablemente de partículas inertes, pero este transporte parece muy poco eficiente en la estimulación de una respuesta inmune, debido a que se realiza en sitios alejados del tejido linfoide MALT.

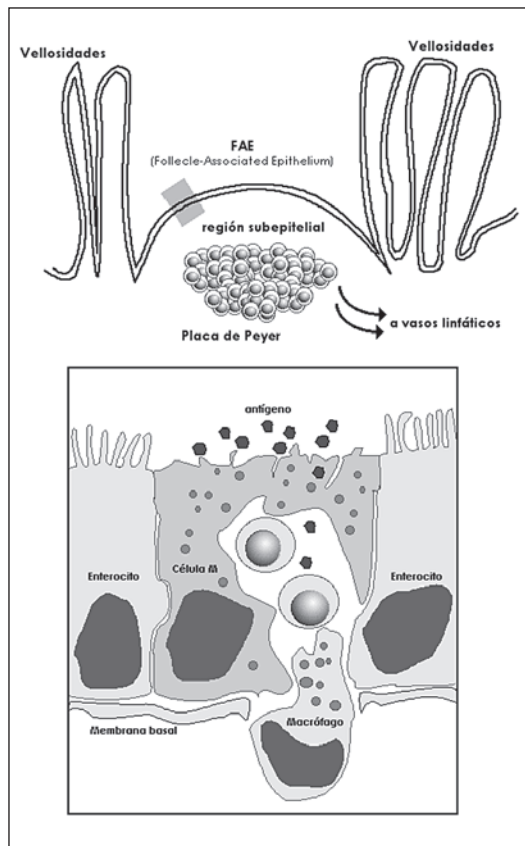


Figura 16-1. La estructura general del tejido linfoide asociado a mucosas es representada por el esquema de una sección transversal de placa de Peyer. El epitelio asociado al tejido linfoide (FAE) tapiza los folículos linfocitarios (placas de Peyer) y se distingue del epitelio de otras regiones del intestino, por la presencia de células, especializadas en el transporte de antígenos. La parte inferior de la figura, muestra un esquema ampliado del epitelio FAE ("Follicle-Associated Epithelium") con células M que presentan un número reducido de microvellosidades irregulares en su región apical y una profunda invaginación basolateral o bolsillo intraepitelial que contiene linfocitos T, linfocitos B y eventualmente, macrófagos o células dendríticas.

Las placas de Peyer, linfonódulos y apéndice son los mayores sitios de inducción de una respuesta inmune contra antígenos gastrointestinales y microorganismos. Las placas de Peyer y otros linfonódulos se encuentran a todo lo largo del tracto gastrointestinal, y en un gran número en colon y recto; existen aproximadamente 15 placas de Peyer o linfonódulos por cm^2 en el colon y 25 por cm^2 en el recto. Sin embargo, este número no es estable, dado que existe una reducción de hasta el 50% en el número de placas de Peyer de los 20 a los 50 años de edad.

Las placas de Peyer contienen todos los ele-

mentos celulares necesarios para inducir y regular una respuesta inmune, pero organizados de manera tal que facilitan el desarrollo de inmunidad. Existen áreas de linfocitos B (folículos B) que están rodeadas por linfocitos T. Aunque los centros germinales contienen linfocitos B en activa división, existen relativamente pocas células plasmáticas en comparación con sitios similares de ganglios linfáticos y bazo. El área entre los folículos y el epitelio de la mucosa intestinal es rica en linfocitos B, linfocitos T, macrófagos y células dendríticas que están estratégicamente ubicados para responder a los distintos antígenos, bacterias o partículas transportadas a través del epitelio mucoso especializado ubicado por encima de las placas de Peyer.

En el tracto gastrointestinal, linfocitos activados en el tejido linfoide GALT y, probablemente células presentadoras de antígeno, pueden además migrar a los ganglios mesentéricos que drenan las placas de Peyer, con la consiguiente expansión de la respuesta inmune puesto que diferentes células efectoras pueden ahora migrar a superficies mucosas y otros tejidos. Células efectoras tal como células productoras de IgA, linfocitos T "helper" (LTh), linfocitos T citotóxicos, linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ y otras poblaciones celulares migrarán a la lámina propia submucosa y al epitelio de la mucosa intestinal. La región submucosa conocida como lámina propia, es el sitio más importante de producción de anticuerpos en las superficies mucosas y, se ha estimado que alrededor del 80% de las células productoras de anticuerpos están localizadas en esta región de las mucosas (figura 16-2).

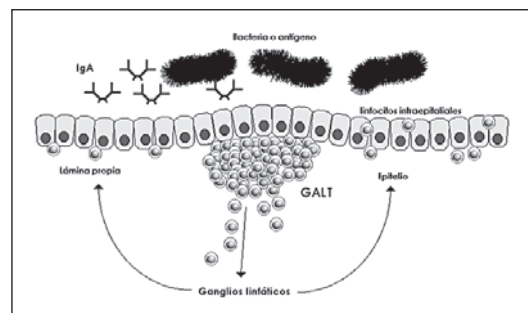


Figura 16-2. Representación esquemática de la respuesta inmune, en el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal. Antígenos o bacterias son transportados a las placas de Peyer por transcitosis a través de células epiteliales especializadas (células M). Células dendríticas capturan estos antígenos para su procesamiento y presentación a linfocitos foliculares. Linfocitos activados y eventualmente células presentadoras de antígeno migran luego a los ganglios linfáticos que drenan las placas de Peyer y, después de expansión y maduración, clones linfocitarios migrarán a la lámina propia (linfocitos B comprometidos en la producción de IgA) o al epitelio de la mucosa intestinal (linfocitos T citotóxicos).



2.2. Transporte y presentación de antígenos

La forma como los antígenos son adquiridos, procesados y presentados por células profesionales, es fundamental para la inducción de inmunidad a nivel de epitelios y a nivel sistémico.

El tejido linfoide asociado a mucosas es morfológicamente distinto del tejido linfoide sistémico y recibe antígenos a través de los diversos epitelios, más que de la circulación linfática o sanguínea.

El epitelio estratificado de la cavidad oral, amígdalas, faringe, esófago, uretra y vagina carece de uniones estrechas, pero la íntima asociación entre las células epiteliales y las glicoproteínas de la matriz intercelular, determinan que los epitelios sean impermeables a la mayoría de los antígenos, agentes infecciosos y vacunas. Proteínas o macromoléculas no pueden difundir pasivamente a través de estos epitelios estratificados. Por lo tanto, los antígenos son obtenidos por células dendríticas que migran y se prolongan hasta el límite exterior del epitelio para capturar antígenos y luego presentarlos en el tejido linfoide local o en un tejido linfoide distante.

En el tracto gastrointestinal, la inducción de una respuesta inmune requiere que antígenos, bacterias o partículas sean transportadas desde el lumen del epitelio hacia las placas de Peyer. La superficie mucosa del intestino está cubierta por una capa única y continua de células epiteliales selladas por uniones estrechas, y cubiertas por un fuerte glicocalix formado por una capa de glicoproteínas ancladas a las membranas celulares. Se agregan además mucinas, enzimas digestivas, lactoferrina, lisozima, péptidos antimicrobianos e IgA secretora, como mecanismos adicionales de protección de las superficies mucosas, formando una formidable barrera contra potenciales patógenos y antígenos.

En los epitelios simples del tracto intestinal y del tracto bronquial, en los cuales los espacios intercelulares están sellados por uniones estrechas, existen sin embargo, células epiteliales especializadas (células M) que por transporte transepitelial desde el lumen, entregan macromoléculas, partículas y microorganismos, directamente al tejido linfoide asociado a la mucosa. Luego de entrar al tejido MALT, los antígenos son rápidamente capturados y procesados por células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas subepiteliales y macrófagos, para su presentación a linfocitos T y B. Luego de la estimulación

antigénica, los linfocitos B proliferan y diferencian en células comprometidas en la síntesis y secreción de IgA, IgM e IgE.

Las **células M** se caracterizan por la presencia de microvellosidades cortas, pequeñas vesículas citoplasmáticas y la existencia de un gran dominio membranoso endocítico para la incorporación de macromoléculas, partículas y agentes patógenos. Sin embargo, las células M son altamente selectivas y no permiten la entrada de todos los antígenos o microorganismos. Así, sólo patógenos y toxinas bacterianas que pueden estimular los mecanismos de transporte intracelular, pueden atravesar el epitelio intestinal vía células M, para su captura, procesamiento y presentación por células dendríticas y macrófagos alojados en los bolsillos intraepiteliales. La cara basolateral de las células M está profundamente invaginada formando un gran bolsillo intraepitelial a través del cual se entregan por transcitosis macromoléculas y partículas. Estos bolsillos intraepiteliales pueden contener linfocitos B, linfocitos T y eventualmente macrófagos o células dendríticas (figura 16-1). De esta manera el transporte de antígenos solubles y partículas a través de las células M, constituye el primer paso en la inducción de una respuesta inmune en las mucosas del tracto bronquial y del tracto intestinal. Las células M son además, capaces de sintetizar IL-1 y, se ha sugerido que pueden proporcionar señales accesorias de coestimulación para la activación de linfocitos T y linfocitos B, en el tejido linfoide asociado a la mucosa.

Las **Células dendríticas** ubicadas en la región subepitelial o domo de las placas de Peyer, son probablemente las células más importantes en el procesamiento y presentación de los antígenos transportados a través del epitelio y en la regulación de la respuesta inmune humoral y celular que pondrá en marcha en el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal. Las células dendríticas están fundamentalmente posicionadas para capturar y procesar antígenos solubles transportados por las células M, mientras antígenos particulados y bacterias serán fagocitados y procesados por los macrófagos alojados en las invaginaciones de las células M. Antígenos ya degradados serán luego liberados por los macrófagos, para su captura y presentación por las células dendríticas subepiteliales. Se produce así una colaboración entre células dendríticas y macrófagos para la inducción de una respuesta inmune protectora: los macrófagos inducirían fundamentalmente una res-



puesta Th1 con la consiguiente activación de linfocitos T citotóxicos, mientras las células dendríticas serían responsables de la inducción de una respuesta Th2 con la consiguiente activación de linfocitos B y un “switching” isotípico (cambio de clase) preferencial hacia anticuerpos IgA (ver capítulos 6 y 14).

3. FUNCIONES EFECTORAS DE LA INMUNIDAD DE MUCOSAS

Luego de la estimulación antigénica en los sitios de inducción, células efectoras antígeno específicas, abandonan el tejido MALT vía vasos linfáticos aferentes y alcanzan la circulación sanguínea vía conducto torácico. Desde ahí se diseminan hacia los sitios efectores de respuesta inmune, en la lámina propia y el epitelio de mucosas de los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario (figura 16-2).

Las células efectoras incluyen células plasmáticas productoras de IgA, células productoras de IgM y, eventualmente células comprometidas en la síntesis y secreción de IgE. Se agregan linfocitos efectores $T\alpha\beta$ de colaboración y T citotóxicos, además de linfocitos $T\gamma\delta$ y otras células. En adultos, alrededor del 80% de los linfocitos B activados, se localizan en la lámina propia. Los otros linfocitos residen en el epitelio y se les conoce como linfocitos intraepiteliales, que cumplen tanto funciones efectoras, como funciones inmunorreguladoras.

3.1. Respuesta inmune de anticuerpos

Una característica fundamental de la inmunidad de mucosas es la producción local de IgA, que constituye más del 80% de los anticuerpos en los tejidos mucosos, en los cuales son inducidos, transportados y regulados por mecanismos distintos de aquéllos que caracterizan a la inmunidad sistémica.

La **IgA de secreción** es de primaria importancia en la defensa inmunológica y actúa no sólo en la resistencia a agentes patógenos restringidos a mucosas, sino también contra microorganismos que producen infecciones sistémicas, a pesar que inicialmente colonizan superficies mucosas (especialmente en los tractos respiratorio o gastrointestinal).

La IgA de secreción corresponde a un homodímero unido por una **cadena J**; el denomi-

nado **componente secretor** la protege de la acción de proteasas en las secreciones (ver capítulo 6).

Luego de la activación por el antígeno, los linfocitos B proliferan y hacen “switching” isotípico a células comprometidas en la producción de IgA, las cuales eventualmente abandonan el tejido linfoide asociado a la mucosa y migran al sitio inicial de inducción de la respuesta inmune para su diferenciación final en células plasmáticas secretoras de IgA (figura 16-3). Así, linfocitos B, comprometidos en la secreción de IgA, migrarán desde el tejido linfoide nasofaríngeo, al tracto digestivo alto, mientras el tracto genitourinario recibe preferentemente células productoras de IgA desde el tracto digestivo bajo. El tracto gastrointestinal recibe en cambio células desde GALT.

La migración preferencial hacia las mucosas, de linfocitos estimulados en el tejido linfoide asociado al epitelio, se asocia claramente a la expresión de moléculas de adhesión específicas en los linfocitos y, de sus respectivos ligandos en células endoteliales de vasos sanguíneos de tejido mucoso y/o en células epiteliales de la mucosa.

La principal función de la IgA secretada es mantener la integridad de las barreras mucosas de potenciales agentes infecciosos o tóxicos. En el lumen, la IgA secretada puede neutralizar virus, toxinas bacterianas, enzimas y prevenir la entrada de virus, la adherencia microbiana y la absorción de antígenos.

Durante su transporte a través de las células epiteliales de las mucosas, los dímeros de IgA pueden unir antígenos intracelulares e inhibir el ensamblaje de algunas partículas virales.

En la lámina propia, la IgA dimérica elimina antígenos que cruzan la barrera epitelial, uniéndose a ellos y transportándolos a lumen o vía hepatocitos hacia el conducto biliar. Además, como consecuencia de su resistencia a la proteólisis y alta avidez por el mucus, la IgA secretada retiene sus capacidades de unión y transporte en las secreciones mucosas.

Aunque la secreción de IgA es un componente importante de la inmunidad de mucosas, la respuesta mediadas por **IgE** está también asociada con la exposición transmucosal a antígenos (alergenos). Alergias alimentarias y asma, son ejemplos comunes de reacciones mediadas por IgE, luego de la exposición a antígenos en las superficies mucosas. Respuestas IgE específicas, son también importantes en la defensa contra enfermedades parasitarias.

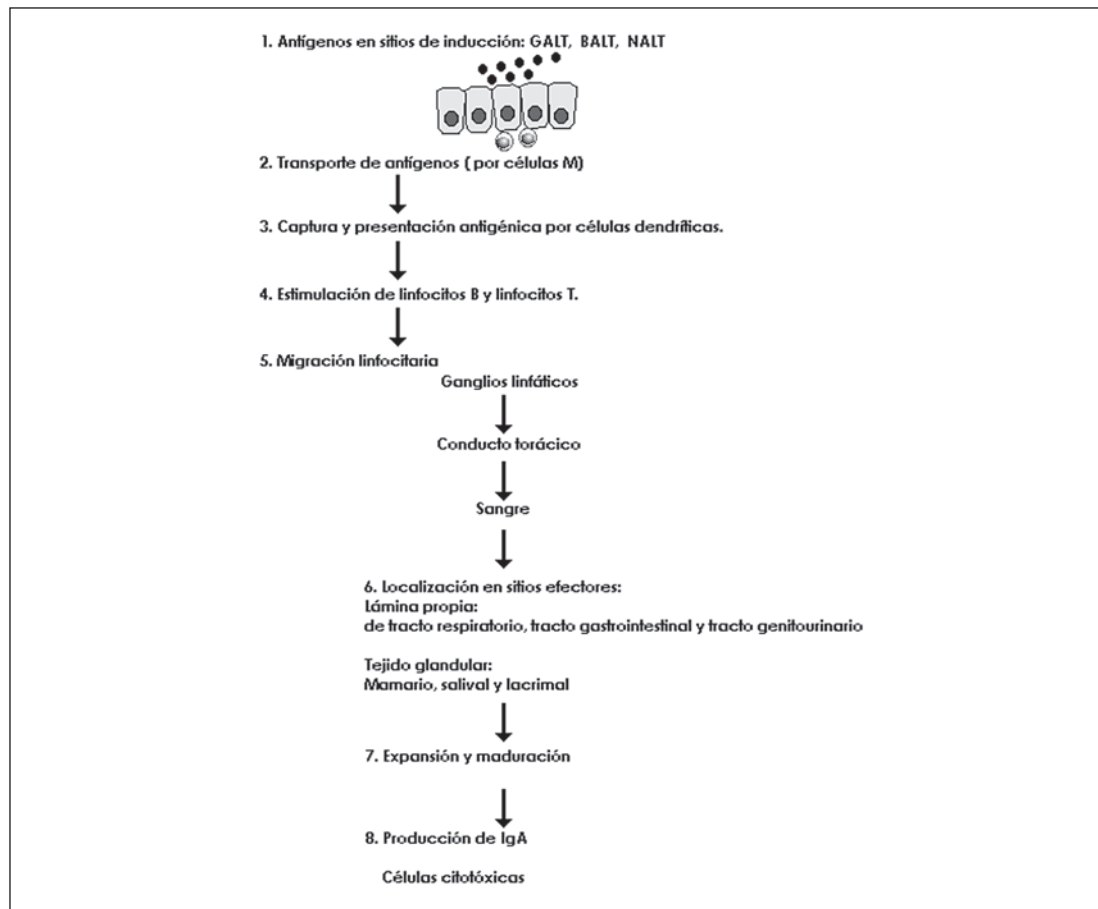


Figura 16-3. Movilización de linfocitos desde sitios de inducción de la respuesta inmune en los tejidos inmunes MALT a los sitios efectores de la respuesta inmune. Luego de la estimulación antigénica en los sitios de inducción de una respuesta inmune en las mucosas (GALT, BAT, NALT), linfocitos activados células abandonan el tejido linfoide vía vasos linfáticos aferentes, para alcanzar la circulación sanguínea a través del conducto torácico. Vía sistémica, los distintos clones linfocitarios pueden ahora diseminarse a los distintos sitios efectores de la respuesta inmune (epitelio y lámina propia de mucosas y glándulas excretoras).

3.2. Respuesta inmune celular

La inducción de una respuesta inmune efectiva a nivel de mucosas, requiere la activación de linfocitos T específicos, los cuales no sólo contribuyen a la eliminación de infecciones, sino también proporcionan las señales accesorias de coestimulación para la diferenciación de linfocitos B, en células productoras de IgA o IgE y la secreción de citoquinas y quimioquinas esenciales en el desarrollo de la respuesta inmune.

Linfocitos Th. Los LTh son mediadores cruciales en la inducción de una respuesta inmune humoral y/o celular a nivel de mucosas y su polarización hacia linfocitos Th1 o Th2 está influenciada por citoquinas, quimioquinas y otras moléculas expre-

sadas por células dendríticas y/o macrófagos. Linfocitos Th1, linfocitos Th2 o una combinación de ambos, parecen importantes en la mantención de la respuesta IgA secretada. La respuesta Th2 es importante para la diferenciación terminal de los linfocitos B y citoquinas como interferón gamma (IFN- γ) producida por linfocitos Th1, parece inducir la expresión del receptor de Ig poliméricas, requerido para el transporte de IgA en las mucosas. La inducción de una respuesta Th1 es esencial en la protección contra patógenos intracelulares. La respuesta Th2 en cambio, parece más importante en la protección de patógenos como *Helicobacter pylori* y de parásitos helmintos y en el control de enfermedades inmunomediadas como los desórdenes autoinmunes órgano-específicos y la enfermedad de Crohn.





La subpoblación **Th2** proporciona señales accesorias de coestimulación para la activación de linfocitos B y el cambio de clase hacia anticuerpos de isotipos IgA e IgE, mediante la expresión de moléculas de adhesión y la secreción de citoquinas como IL-4, IL-5, IL-6 IL-10 e IL-13. Aunque las citoquinas Th2 desempeñan un rol importante en la diferenciación de linfocitos B comprometidos en la producción de IgA, el factor transformante beta (TGF- β), producido por LTh1 y otras células, es fundamental en el “switching” IgA. Desafortunadamente, TGF- β también suprime la proliferación de linfocitos y así, ratones deficientes en este factor, mueren como consecuencia de una masiva enfermedad linfoproliferativa dentro de las primeras 4 semanas de vida.

La subpoblación **Th1** en cambio, se caracteriza por la secreción de IL-12, linfotoxina, factor estimulador de colonias granulocito-monocito (GM-CSF) e IFN- γ y determina la inmunidad celular regulando la función de macrófagos y células T citotóxicas, que resultan particularmente importantes en el control de agentes patógenos intracelulares que penetran las mucosas. Los linfocitos Th1 estimulan además el “switching” isotípico hacia subclases de IgG, que caracteriza la respuesta sistémica inducida como consecuencia secundaria de la activación del sistema inmune asociado a mucosas.

Luego de su transporte a través de células M, bacterias intracelulares que afectan la mucosa del tracto intestinal (como Salmonella), penetran en las placas de Peyer para infectar y sobrevivir en los macrófagos. Macrófagos infectados producirán IL-12 que promueve el desarrollo de una respuesta Th1 con la consiguiente producción de linfotoxina e IFN- γ que determinan la activación de los macrófagos infectados y de linfocitos T citotóxicos.

Linfocitos Tc. En la mucosa del tracto intestinal, cerca del 80% de los linfocitos intraepiteliales pertenecen a la subpoblación $T\alpha\beta$ CD8+, en contraste a lo que ocurre en la lámina propia, donde la mayoría de los linfocitos T residentes pertenecen a la subpoblación $T\alpha\beta$ CD4+.

Los linfocitos T de la subpoblación $T\gamma\delta$, pueden alcanzar hasta el 50% de los linfocitos intraepiteliales en algunas cepas de ratones; pero en humanos los linfocitos $T\gamma\delta$ pueden constituir sólo cerca del 13% de los linfocitos intraepiteliales

4. INMUNIZACIÓN A TRAVÉS DE MUCOSAS

La estimulación adecuada del sistema inmune asociado a la mucosa es un requisito indispensable para el desarrollo de una protección efectiva de las superficies mucosas contra la colonización e invasión por diferentes agentes patógenos.

La eficacia con la cual los antígenos administrados por vía oral son transportados a través del epitelio intestinal depende de la sobrevivencia de las moléculas en el ambiente hostil del tracto gastrointestinal. El acceso a la membrana de las células epiteliales es inhibido por la capa de mucus, por el empaquetamiento apretado de las microvellosidades y por el glicocalix celular. Todas estas estructuras en conjunto retienen diversas enzimas y crean un ambiente altamente degradativo en la región apical de las células epiteliales y se hace, por lo tanto, indispensable que los antígenos persistan en el lumen intestinal el tiempo necesario para un eficiente contacto con las células epiteliales y su posterior transporte hacia el tejido MALT.

Como consecuencia de lo anterior, el desarrollo de un sistema exitoso de inmunización a través de las mucosas debe cumplir una serie de requerimientos: (i) el sistema debe ser resistente al ambiente enzimático y hostil del tracto gastrointestinal y debe ser capaz de guiar los antígenos a través de la capa mucosa hasta los sitios de inducción que contienen células presentadoras de antígeno para el desarrollo de una respuesta inmune efectiva y no de tolerancia, (ii) la respuesta debe inducir inmunidad local en la mucosa (y en algunos casos en sitios efectores de mucosas distantes), además del desarrollo de una fuerte inmunidad sistémica y (iii) debe activar mecanismos efectores que incluyan la producción de citoquinas y el desarrollo de una respuesta local (anticuerpos IgA) y sistémica (IgG) y de una respuesta Th1 que incluya la activación de linfocitos T citotóxicos para la protección contra agentes infecciosos intracelulares.

Se han desarrollado así, diversas estrategias para prolongar la permanencia en el intestino de drogas y vacunas administradas por vía oral. Se han utilizado, por ejemplo, bioadhesinas como lectinas y adhesinas bacterianas que se unen al mucus intestinal (muco-adhesinas) o a la región apical de las células del epitelio intestinal. De manera similar se han desarrollado partículas sintéticas como liposomas, ISCOMs (“Immune



Stimulating Complex”) y micropartículas del copolímero poli-DL-lactide-co-glycolide, y diversos vehículos recombinantes vivos, de origen viral (Vaccinia, Herpes, Adenovirus, Poxvirus) o bacteriano (Salmonella), destinados a la protección de los antígenos recombinantes extraños, del ambiente hostil intraluminal del intestino. Además la conjugación de antígenos con ligandos como lectinas, adhesinas microbianas o anticuerpos, que se unen a receptores de membrana de las células M, constituyen una excelente estrategia para facilitar el transporte de antígenos a través del epitelio.

4.1. Uso de adyuvantes

Los antígenos administrados a través de las mucosas, son generalmente poco inmuno-

génicos y requieren, por lo tanto, adyuvantes que al ser coadministrados con los antígenos, estimularán el desarrollo de una respuesta inmune protectora.

Los adyuvantes pueden aumentar la vida biológica o inmunogénica de los distintos antígenos, facilitar su transporte y captura a través de los epitelios, estimular la producción de citoquinas y el desarrollo de una respuesta Th1 y/o Th2.

En la tabla 16-1 se muestra algunos adyuvantes que se han usado con éxito en diferentes modelos experimentales y utilizando distintas vías de inmunización a través de mucosas.

Tabla 16-1. Adyuvantes que, coadministrados en el antígeno, estimulan el sistema inmune asociado a mucosas

Adyuvante	Modelo experimental	Ruta de inmunización	Antígeno utilizado
Toxinas bacterianas*	Ratón	Oral o intranasal	Virus papiloma humano
	Ratón	Intranasal	Proteína de <i>H. influenzae</i>
	Ratón	Oral	Ureasa recombinante de <i>H. pylori</i>
	Ratón	Intranasal	Péptido sintético de Virus Respiratorio Sincicial
IL-12	Ratón	Intranasal	Vacuna influenza Toxina tetánica
Muramyl dipéptido	Ratón	Oral, intranasal	Rotavirus y Virus Sendai
	Rata	Intraintestinal	Porina de <i>N. gonorrhoeae</i>
CpG oligonucleótidos	Ratón	Intranasal	Ag superficie Hepatitis B
Avridina	Ratón	Oral	Virus influenza muertos
	Rata	Intraintestinal	Toxina del cólera
Monofosforil-Lípido A	Ratón	Intraintestinal	Ovoalbúmina
	Rata	Intraintestinal	Toxina del cólera
Alúmina	Ratón	Intranasal	Toxoide tetánico
MF59	Ratón	Intranasal	Subunidad de vacuna virus influenza
	Ratón	Intranasal	Proteína envoltura Virus Respiratorio Sincicial

* Toxina del cólera producida por *V. cholerae* y Tóxina lábil al calor producida por *E. coli*. ISCOM, “Immune Stimulating Complex”.



5. TOLERANCIA INDUCIDA A TRAVÉS DE MUCOSAS

La infección con patógenos que afectan las mucosas conduce generalmente al desarrollo de una activa respuesta inmune protectora. Sin embargo, la administración oral de antígenos solubles puede conducir al fenómeno llamado **tolerancia oral**, que se caracteriza por la ausencia de respuesta inmune periférica, luego de la inoculación sistémica del mismo antígeno.

La tolerancia oral parece afectar tanto a la inmunidad humoral como a la inmunidad celular, pero el tipo de respuesta tolerada parece depender de la naturaleza del antígeno y de su forma de ingestión. Así, la respuesta celular y la respuesta humoral mediada por IgE se hacen fácilmente tolerantes con bajas dosis de antígeno. La tolerancia de tipo IgM o IgG ocurre en cambio, con altas dosis de antígeno.

La tolerancia oral puede producirse por delección de clones linfocitarios, anergia clonal o debido a una activa supresión de la respuesta inmune producida por factores liberados por linfocitos T (Ej.: TGF- β). La tolerancia oral, mediada por anergia o delección clonal, se produce fundamentalmente a altas dosis de antígeno. La ingestión de bajas dosis de antígeno, conduce en cambio a tolerancia mediada por subpoblaciones linfocitarias T CD4⁺ y T CD8⁺ que suprimen activamente el desarrollo de una respuesta inmune o de una respuesta inflamatoria.

Aun cuando la tolerancia puede constituir una dificultad en el desarrollo de vacunas que se administren por vía oral, la habilidad de la tolerancia oral para prevenir reacciones adversas puede utilizarse para tratar diferentes enfermedades inmunológicas y/o inflamatorias, incluyendo enfermedades autoinmunes y el rechazo al trasplante de tejidos.

LECTURAS SUGERIDAS

Brandtzaeg, P., et al., "Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments?", *Immunol. Today* 20: 141-151, 1999.

Brandtzaeg, P., Farstad, I.N., Haraldsen, G., "Regional specialization in the mucosal immune system: primed do not always home along the same track", *Immunol Today* 20: 267-277, 1999.

Chen, H., "Recent advances in mucosal vaccine development", *J. Controll. Rel.* 67: 117-128, 2000.

Hoyne, G. F., et al., "Immunological tolerance to inhaled antigens", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162: 5169-5174, 2000.

Jepson, M.A., Clark, M.A. "Studying M cells in Peyer's patches of the intestine", *Int. Rev. Cytol.* 167: 91-159, 1998.

Kaiserlian, D., Etchart, N., "Entry sites for oral vaccines and drugs: a role for M cells, enterocytes and dendritic cells?", *Semin. Immunol.* 11: 217-224, 1999.

Kraehenbuhl, J.P., Neutra, M.R., "Epithelial M cells: Differentiation and function". *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16: 301-332, 2000.

McCluskie, M.J., Davis, H.L. "Mucosal immunization with DNA vaccines", *Microbes and Infection* 1: 685-698, 1999.

Reseigno, M., Borrow, P. "The host-pathogen interaction: New Themes from Dendritic Cell Biology", *Cell* 106: 267-270, 2001.

Strobel, S., Mowat, A.M., "Immune response to dietary antigens: oral tolerance". *Immunol. Today* 19: 173-181, 1998.

Vasquez-Torres, A., Fang, F.C., "Cellular routes of invasion by enteropathogens" *Curr. Opin. Immunol.* 3: 54-59, 2000.





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Roseblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 17

INMUNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Mónica Imarai B. y Juana Villegas M.

- 1. Introducción**
- 2. El sistema inmune asociado a la mucosa reproductiva**
 - 2.1. El sistema inmune asociado a la mucosa reproductiva de la hembra
 - 2.2. El sistema inmune asociado a la mucosa reproductiva del macho
- 3. Inducción de la respuesta inmune en la mucosa reproductiva**
 - 3.1. Inducción de la respuesta inmune en la mucosa reproductiva de la hembra
 - 3.2. Respuesta inmune a las infecciones en la mucosa reproductiva de la mujer
- 4. El sistema inmune local en el embarazo**
 - 4.1. La Interfase materno fetal
 - 4.2. Expresión de MHC en las células trofoblásticas
 - 4.3. Las células NK de la decidua
 - 4.4. Los linfocitos T de la decidua
 - 4.5. Citoquinas en la preñez
- 5. Factores inmunológicos que afectan la fertilidad**
 - 5.1. Aborto espontáneo recurrente de causa inexplicada
 - 5.2. Anticuerpos antiespermáticos





RESUMEN

El sistema inmune asociado a la mucosa reproductiva de los mamíferos constituye la primera línea de defensa frente a infecciones que afectan al tracto reproductor. Las células inmunocompetentes presentes en la mucosa reproductiva del macho y de la hembra (incluido el ser humano), están constituidas por linfocitos T y B, macrófagos, células dendríticas, y en el útero, por células pertenecientes al linaje de las células NK. Los microorganismos patógenos infectan a través de los epitelios y pueden alcanzar las células del estroma, en donde células presentadoras como los macrófagos y células dendríticas inducen la respuesta inmune. Algunos de los epitelios que expresan MHC clase II podrían también presentar antígenos al sistema inmune. La inmunidad humoral mediada por IgA e IgG juega un papel fundamental en la protección a la infección por algunos microorganismos como *N. gonorrhoeae*, mientras que para microorganismos de infección intracelular como Chlamydias y virus Herpes, la inmunidad mediada por células (Th1), tiene una función importante en la eliminación del patógeno. En los mamíferos, la capacidad del sistema inmune local de reconocer y eliminar elementos inmunológicamente extraños debe regularse para evitar el rechazo del feto durante el embarazo o preñez. Algunos mecanismos parecen estar relacionados con la ausencia de MHC clase II y clase I polimórficos en el tejido fetal que se encuentra en contacto con las células inmunocompetentes maternas (trofoblasto). Además, la presencia de MHC clase I no polimórficos en el trofoblasto, podría mantener señales inhibitorias para la población NK de la decidua, que son las células inmunocompetentes más abundantes durante la preñez. Por otro lado, la desviación de la respuesta inmune hacia la activación de células Th2 y la presencia de citoquinas inmunosupresoras también contribuyen a mantener una relación de tolerancia al feto. Alteraciones de esta condición de inmunotolerancia podrían generar algunas patologías del embarazo en la mujer como el aborto espontáneo recurrente y tanto en mujeres como en hombres, infertilidad mediada por anticuerpos antiespermáticos.

1. INTRODUCCIÓN

Dos de las más interesantes áreas del conocimiento en el campo de la Inmunología de la Reproducción son la respuesta inmune a las infecciones del tejido reproductivo y la inmunobiología del embarazo o preñez. La problemática de las infecciones por diversos microorganismos patógenos que producen enfermedades de transmisión sexual, entre las que se incluye el SIDA, ha motivado el desarrollo de la investigación destinada a caracterizar el sistema inmune local asociado a la mucosa reproductiva, conocer los mecanismos de inducción de respuesta inmune local y los mecanismos de inmunidad frente a las infecciones. Por otro lado, se ha desarrollado un creciente interés en entender cómo opera el sistema inmune durante el embarazo y los complejos me-

canismos de regulación que llevan a la madre a tolerar al feto, en la creencia de que este conocimiento permitirá desarrollar exitosas terapias de tratamiento para la infertilidad. En este capítulo se describe el sistema inmune local asociado a la mucosa reproductiva del macho y de la hembra y la inducción de respuesta inmune frente a algunos microorganismos. Además, se analiza las características del sistema inmune local de la madre durante el embarazo y la posible regulación relacionada con los tejidos fetales. Por último, se describe algunos aspectos del sistema inmune local que se asocian a infertilidad.

2. EL SISTEMA INMUNE ASOCIADO A LA MUCOSA REPRODUCTIVA

2.1. El sistema inmune asociado a la mucosa reproductiva de la hembra

En la hembra de especies como el ratón, la rata y en la especie humana, los leucocitos son componentes normales de la mucosa del oviducto, útero y vagina. Los leucocitos son linfocitos T del fenotipo CD4+ y CD8+, macrófagos y granulocitos, y se encuentran dispersos en el estroma de la mucosa. También se encuentran linfocitos distribuidos en el tejido epitelial. Los leucocitos propios de la mucosa reproductiva también residen en los ganglios linfáticos regionales que drenan estos órganos, pudiendo recircular a otros tejidos mucosos (ver capítulo 16).

En la mujer, el tejido linfoide del útero tiene características que dependen del ciclo menstrual. En el estrato basal del endometrio, que no presenta variación con el ciclo, la población leucocitaria corresponde principalmente a linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y ocasionalmente células “natural killer” (NK). Los leucocitos se encuentran en agregados, generalmente adyacentes a las glándulas y dispersos en el estroma, con excepción de los linfocitos B que sólo se encuentran en

los agregados leucocitarios. En el estrato funcional del endometrio, los leucocitos son linfocitos T, macrófagos y linfocitos granulares grandes (LGL: CD56+ CD16-). Estas células LGL son una población característica del endometrio y pertenecen al linaje de las células NK. Por su parte, los linfocitos B, células plasmáticas y células NK convencionales, son muy escasos en este tejido y los granulocitos polimorfonucleares sólo aparecen durante la menstruación. En esta zona del endometrio, la proporción y distribución de los leucocitos varía según la fase del ciclo (figura 17-1). En la fase proliferativa y secretora temprana, los leucocitos constituyen el 10% de las células totales del estroma y se encuentran más bien dispersos en el tejido, mientras que en la fase secretora tardía, éstos constituyen más del 20% de las células estromales y se encuentran agregadas, adyacentes a las glándulas y vasos sanguíneos. Este incremento se debe en gran parte al aumento de LGL y a un pequeño aumento en el número de macrófagos. Los linfocitos T, dispersos en el estroma, epitelio glandular y superficial del endometrio, no varían durante las fases del ciclo menstrual.

Tal como ocurre en la mucosa gastrointestinal y respiratoria, el sistema inmune local del tracto reproductor responde frente a los antígenos

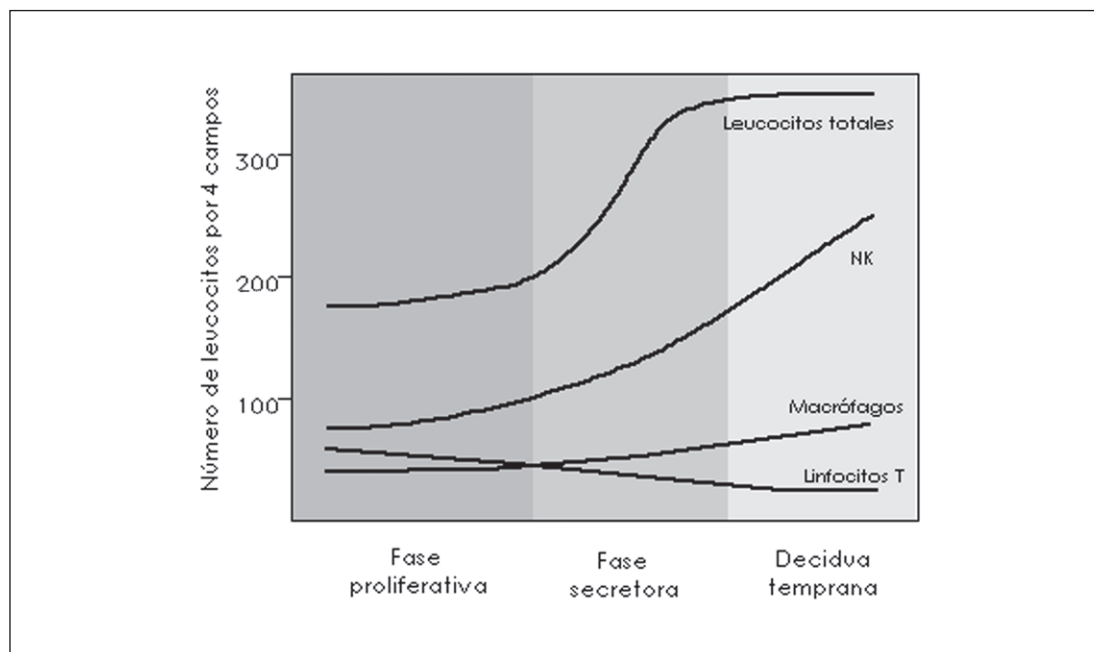


Figura 17-1 Variación de las poblaciones leucocitarias en el estrato funcional del endometrio durante las fases del ciclo menstrual y embarazo temprano. La población leucocitaria del endometrio aumenta en la fase secretora del ciclo menstrual. Los leucocitos que aumentan son los linfocitos granulares grandes (LGL) y, en menor magnitud, los macrófagos.



secretando inmunoglobulinas a la superficie mucosa. En estos sitios, la primera línea de defensa frente a las infecciones son las inmunoglobulinas. En la mucosa reproductiva de la mujer, las inmunoglobulinas están presentes en el fluido oviductal, secreción uterina, moco cervical, fluido cervico-vaginal y fluido vaginal. Las inmunoglobulinas secretadas son del isotipo IgG e IgA y, en menor proporción, IgM. La IgG es transferida desde el suero por difusión intercelular, endocitosis de fase fluida y otros mecanismos que en conjunto se denominan transudación. La IgA se produce localmente en las células plasmáticas del estroma de la mucosa reproductiva y se une al receptor de inmunoglobulinas poliméricas presente en la cara basal del epitelio de estos órganos. El complejo IgA-receptor es transportado en vesículas a través del epitelio y la inmunoglobulina es liberada en el lumen unida a un polipéptido derivado de la proteólisis del receptor. Este polipéptido se denomina componente secretor y permanece unido a la IgA. Esta forma de inmunoglobulina se denomina IgA secretada (IgAs) (ver capítulo 6).

La presencia de células plasmáticas productoras de IgA y del receptor de inmunoglobulinas poliméricas (receptor Igp), no es uniforme en los diferentes órganos del tracto reproductor de la mujer, existiendo además importantes diferencias entre especies (tabla 17-1). En el oviducto, endocervix y vagina de la mujer existen numerosas células plasmáticas productoras de IgA, pero el receptor Igp sólo se encuentra en el epitelio columnar simple del oviducto y endocervix y no existe en los epitelios estratificados de la vagina y ectocervix. Esto indica que los órganos que pro-

ducen y secretan IgA en la mucosa reproductiva de la mujer son principalmente el oviducto y el endocervix. En el útero, las células plasmáticas productoras de IgA son más bien escasas por lo que en este órgano la IgA debe ser transportada desde el suero. Una excepción notoria a la generalidad de las especies es la que se observa en el útero del ratón, donde el estroma uterino contiene numerosas células plasmáticas productoras de IgA, lo que asociado a la presencia del receptor en el epitelio indica que esta inmunoglobulina se produce localmente. No se conoce el significado fisiológico de estas diferencias entre especies.

Aparte de las inmunoglobulinas, en los órganos reproductivos de la hembra se produce una gran variedad de citoquinas (ver capítulo 11). Las citoquinas tienen la función de promover la proliferación celular y recambio del tejido, de establecer comunicación entre las células y entre los sistemas reproductivo e inmune y de regular la respuesta inmune local. Todas estas funciones son necesarias en el tracto reproductor. En el útero de la mujer se sintetizan en abundancia Factor estimulador de colonias 1 (CSF-1), Factor de crecimiento epidermal (EGF), Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Factor de necrosis tumoral α (TNF- α), Factor transformador de crecimiento α (TGF- α), Interleuquina 1 (IL-1), Interleuquina 2 (IL-2), Interferón γ (IFN γ) y Factor transformador de crecimiento β (TGF- β). Algunas de las funciones propuestas para estas citoquinas son el reclutamiento de macrófagos, estimulación o inhibición de la proliferación, angiogénesis, diferenciación trofoblástica, desarrollo del miometrio, función en la implantación y menstruación, etc. Algunos de los genes que codifican para estas

Tabla 17-1. Células plasmáticas (CP) secretoras de IgA y componente secretor (CS), en el tracto reproductor de la mujer

Especie	Oviducto		Útero		Cervix		Vagina	
	CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS
Humana	+	+	-	+	++	+/-	+	Trazas
Ratón	+	ND	++	+	+/-	+	+/-	+
Rata	ND	ND	-	+	-	+	-	+
Equina	+	-	+	+	+	-	+	-

ND: no determinado

Tabla adaptada de Parr MB, Parr EL (1997)



citoquinas contienen sitios de respuesta a estrógenos, indicando que en los órganos reproductivos existe una relación de regulación muy estrecha entre los niveles de hormonas esteroidales sexuales y las citoquinas producidas localmente. Los niveles de estradiol y/o progesterona regulan la síntesis uterina de CSF-1, EGF, FGF, TNF α , TGF α , IL-6 e IFN γ .

2.2. El sistema inmune asociado a la mucosa reproductiva del macho

El tejido mucoso del epidídimo, de glándulas accesorias (próstata, vesícula seminal y glándula bulbo-uretral) y de la uretra del hombre, contiene también las células efectoras y presentadoras del sistema inmune, tales como macrófagos, linfocitos T CD4 $^{+}$ y linfocitos T CD8 $^{+}$. Además, la uretra contiene gran número de células plasmáticas productoras de IgA indicando que este órgano, que es puerta de entrada para infecciones por diversos microorganismos, tiene gran actividad en la respuesta inmune local.

La secreción prostática y líquido seminal contienen inmunoglobulinas del isotipo IgG e IgA. También puede detectarse pequeñas cantidades de IgM en el fluido prostático. La presencia de componente secretor asociado a la IgA indica que este isotipo de inmunoglobulina es de origen local. La uretra masculina también contribuye a la producción local de inmunoglobulinas ya que, además de las células plasmáticas productoras de IgA, contiene el receptor Igp, presente además en el tejido epitelial.

Varias citoquinas son sintetizadas en el testículo y glándulas accesorias. Algunas como CSF-1, IFN- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , TNF α y TGF β podrían tener funciones de regulación de la respuesta inmune local de la mucosa reproductiva masculina. Sin embargo, esto sólo se ha demostrado en el caso de CSF-1, porque los ratones deficientes en CSF-1 “knock-out”, presentan ausencia o extremada disminución de macrófagos en el tejido reproductivo.

3. INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA MUCOSA REPRODUCTIVA

La inducción de la respuesta inmune en las mucosas del sistema reproductor se conoce mucho mejor en el tracto reproductor de la mujer y de las hembras de algunas especies de animales

de experimentación. Por lo tanto, en esta sección sólo se describe la respuesta inmune local en el tracto reproductor femenino.

3.1. Inducción de la respuesta inmune en la mucosa reproductiva de la hembra

Una etapa crítica en la inducción de la respuesta inmune es la incorporación y presentación de antígenos. En el tracto reproductor femenino, el antígeno se incorpora a la mucosa a través del epitelio donde aparentemente no existen células especializadas para ello, como son las células M del intestino delgado. Donde mejor se ha descrito este proceso es en el ratón. La incorporación del antígeno al epitelio en la vagina y cervix del ratón es dependiente de los niveles de estradiol y progesterona, de manera que ésta ocurre en mayor magnitud en diestro y preñez temprana. Las proteínas presentes en el útero del ratón y rata, son endocitadas en el epitelio en períodos prostacionales, incluyendo preñez temprana y también en sitios inyectados con progesterona. Durante el estro y después de la administración de estradiol no se produce incorporación de proteínas al epitelio. Las células epiteliales del cervix, útero y oviducto de varias otras especies, incluyendo el humano, también endocitan proteínas, partículas y bacterias. En estos casos, no está claramente definida la influencia de las hormonas esteroidales sexuales en el proceso.

Una vez que el antígeno ha ingresado al estroma de la mucosa, las células presentadoras de antígenos que infiltran el tejido (células de Langerhans, células dendríticas y macrófagos), pueden a su vez incorporar, procesar y presentar el antígeno a los linfocitos de la mucosa o de los ganglios regionales, induciendo la respuesta inmune local. Se ha postulado que las células epiteliales también pueden procesar y presentar antígenos. El epitelio uterino y oviductal de la mujer y hembras de otras especies, contienen en su superficie moléculas MHC de clase II y moléculas coestimuladoras como ICAM-1 e ICAM-2 (ICAM: Molécula de adhesión intercelular). Sin embargo, hasta la fecha no hay evidencias directas que demuestren que estas células epiteliales induzcan efectivamente activación de linfocitos T frente a un antígeno específico.

Los estudios realizados en la mujer y en animales de experimentación revelan que después de la inmunización local con proteínas y microorganismos, se puede inducir secreción de inmunoglo-



bulinas específicas (IgA e IgG), en la mucosa reproductiva. Esto indica que en este tejido mucoso existen todos los elementos para la presentación y reconocimiento del antígeno. Cuando la inmunización se realiza vía sistémica se produce una baja o nula respuesta en la mucosa, mientras que la inmunización en otros tejidos mucosos como el rectal y la cavidad peritoneal, produce incluso mejores niveles de respuesta en la mucosa reproductiva. Esto se debe a que existe un sistema inmune mucoso común, en el que las células inmunocompetentes circulan y colonizan todos los tejidos mucosos (ver capítulo 16).

La inducción de respuesta inmune celular mediada por los linfocitos “helper” tipo Th1 (ver capítulos 11 y 14) también ocurre en la mucosa reproductiva de la mujer y de animales de experimentación. Los linfocitos Th1 estimulan la activación de macrófagos, linfocitos citotóxicos y producción de anticuerpos que activan el complemento. Estos mecanismos efectores son los más importantes en la eliminación y resistencia a la infección por microorganismos intracelulares.

3.2. Respuesta inmune a las infecciones en la mucosa reproductiva de la mujer

Los microorganismos que producen infecciones de transmisión sexual, como *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, virus *Herpes simplex 2* y otros virus que producen infecciones sistémicas como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), hepatitis B y hepatitis C, infectan la mucosa del tracto reproductor del hombre, de la mujer y de animales de experimentación. La infección involucra unión, invasión, replicación y transporte de los patógenos al tejido subepitelial, donde normalmente inducen respuesta inmune local. En esta sección, se describe a modo de ejemplo algunas características de la respuesta inmune local, que se produce frente a los tres microorganismos que infectan con mayor frecuencia el tracto reproductor de la mujer: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y virus *Herpes simplex 2*. En el hombre la respuesta inmune a la infección ha sido mucho menos estudiada y no se describe en esta sección.

Chlamydia trachomatis infecta el cuello uterino de la mujer y ocasionalmente asciende al endometrio y la trompa de Fallopio. La persistencia de la infección puede llegar a producir salpingitis e infertilidad. La respuesta inmune a la infección es de tipo humoral, sistémica y local, y

de tipo celular, mediada por linfocitos Th1 y por linfocitos T CD8+. En la respuesta de tipo humoral, se producen anticuerpos contra la proteína principal de membrana externa. Las inmunoglobulinas específicas son secretadas y se detectan en el moco cervical de la mujer. Estos anticuerpos neutralizan la infección de células en cultivo o la infección de animales de experimentación, además, la presencia de estos anticuerpos en las secreciones se correlaciona con un menor número de Chlamydias recuperadas desde el cuello uterino. Esta correlación no se produce con las inmunoglobulinas IgG e IgM específicas presentes en el suero, sugiriendo que son los anticuerpos producidos localmente, presentes en las secreciones del tracto reproductor, los que están involucrados en la eliminación del patógeno. Respecto a la respuesta inmune celular, se ha demostrado que tanto en la mujer como en el ratón, siendo los linfocitos Th1 los mediadores más importantes en la eliminación y resistencia a la infección por Chlamydias. Los linfocitos Th1 estimulan la activación de macrófagos, linfocitos citotóxicos y producción de anticuerpos que activan el complemento. Además, estos linfocitos producen IFN- γ que tiene efectos citotóxicos en las células infectadas por Chlamydias. Se ha encontrado que animales deficientes en IFN- γ o que no expresan el receptor para IFN- γ , eliminan más lentamente a la bacteria. Los linfocitos T citotóxicos CD8+ también reconocen células infectadas por Chlamydias. Sin embargo, ratones deficientes en estos linfocitos controlan la infección por Chlamydias, indicando que la deficiencia es compensada por la respuesta celular mediada por macrófagos y por la producción de inmunoglobulinas específicas en el tracto reproductivo del ratón.

Neisseria gonorrhoeae infecta la mucosa del cuello uterino y de la trompa de Fallopio de la mujer. En este caso se ha caracterizado muy bien la respuesta inmune humoral pero no se sabe si la respuesta inmune celular juega un papel importante en la protección. En la mujer, las infecciones por esta bacteria inducen anticuerpos de los isotipos IgA e IgG, detectables en la secreción cervico-vaginal. La IgA es producida localmente por las células plasmáticas que invaden el estroma del endocervix y las trompas de Fallopio cuando se produce la infección. El mecanismo efector de las inmunoglobulinas es diferente según el isotipo y las características de la mucosa reproductiva. IgA e IgG pueden activar el complemento presente en



la secreción cervical que durante la infección por *N. gonorrhoeae* se encuentra activado y unido a la bacteria. La opsonización mediada por IgG promueve la fagocitosis por neutrófilos, mientras que, IgA funciona principalmente neutralizando una variedad de moléculas y de esta manera inhibiendo la unión de la bacteria a los epitelios y la infección. Además, los complejos inmunes formados por IgA y antígeno estimulan la producción de secreción mucosa, lo que contribuye a impedir el acceso del patógeno desde el canal cervical a la cavidad uterina.

El virus *Herpes simplex* 2 infecta la mucosa oral y reproductiva del ser humano. Después de la infección primaria se localiza en los ganglios sensoriales desde donde puede reinfectar la mucosa. Como respuesta a la infección por virus *Herpes simplex* 2 se producen IgG e IgA séricas que reconocen glicoproteínas de la envoltura y cápside viral. En las secreciones cervicales, se observa una respuesta IgG, IgA e IgM de especificidad similar a la de las inmunoglobulinas séricas. El papel que estas inmunoglobulinas juegan en protección no está claro, sin embargo, estos anticuerpos diluidos pueden bloquear *in vitro* la infección de células epiteliales, indicando que *in vivo* se encuentran en concentración suficiente como para proteger de la infección. La concentración de IgA producida localmente se ha correlacionado con la disminución de partículas virales recuperadas del tracto reproductor de la mujer, sugiriendo que esta inmunoglobulina estaría involucrada en la eliminación del virus. La infección de la mucosa reproductiva por virus *Herpes simplex* 2 produce estimulación de linfocitos T CD4⁺ Th1 y de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) en la mujer y en ratones. Estos linfocitos se encuentran en las lesiones y en los nódulos linfáticos regionales y transferidos a animales no inmunes, producen protección de la infección.

4. EL SISTEMA INMUNE LOCAL EN EL EMBARAZO

La respuesta inmune en la mucosa reproductiva de la hembra de los mamíferos, ha debido adaptarse para tolerar al feto y a los espermatozoides, que de otra manera serían rechazados al igual que los trasplantes alogeneicos (ver capítulo 37). A continuación se describe el sistema inmune de la mujer durante el embarazo, destacando aquellas características que pueden explicar la

inducción de tolerancia inmune al feto.

4.1. La interfase materno fetal

Una característica fundamental de la preñez de los mamíferos es la formación de la placenta, el órgano que permite la interrelación entre la madre y el feto en desarrollo. El desarrollo de la placenta involucra una serie de eventos conocidos como implantación. Durante este proceso el blastocisto se adhiere, penetra e invade el endometrio (decidua) y las células del trofoblasto del embrión se diferencian para formar la placenta. En la mujer este proceso es particularmente invasivo ya que las células trofoblásticas infiltran incluso el miometrio.

Desde el punto de vista anatómico en la mujer embarazada se pueden establecer tres zonas de interfase materno-fetal (figura 17-2). En estas zonas es donde el tejido inmune de la madre puede reconocer los antígenos fetales de origen paterno. Una de estas zonas de interfase corresponde a las vellosidades placentarias, donde las células del sinciotrofoblasto de origen fetal están en contacto directo con la sangre materna. Otra zona de interfase la constituyen las arterias espirales del endometrio y miometrio, donde el endotelio materno es reemplazado por células fetales derivadas del trofoblasto, denominadas citotrofoblastos extravellosidades. Estos citotrofoblastos están en contacto directo con el tejido endometrial. La tercera zona de interfase es la zona de la membrana coriónica que se encuentra en contacto con la decidua.

4.2. Expresión de MHC en las células trofoblásticas

Las células trofoblásticas que están en contacto directo con las células inmunocompetentes de la decidua no expresan los genes del MHC de clase II, aún después de la estimulación con IFN- γ . Tampoco expresan dos de los principales genes polimórficos del MHC de clase I, HLA-A y HLA-B. Sin embargo, las células trofoblásticas expresan HLA-G, un gen MHC de clase I conocido como no-clásico (ver capítulo 8). Varias características de la proteína HLA-G sugieren que su función está relacionada con la tolerancia materno-fetal. Primero, esta proteína se encuentra casi exclusivamente en el citotrofoblasto extravellosidades y en la membrana coriónica. Además del timo, no existe evidencia concluyente de que esta

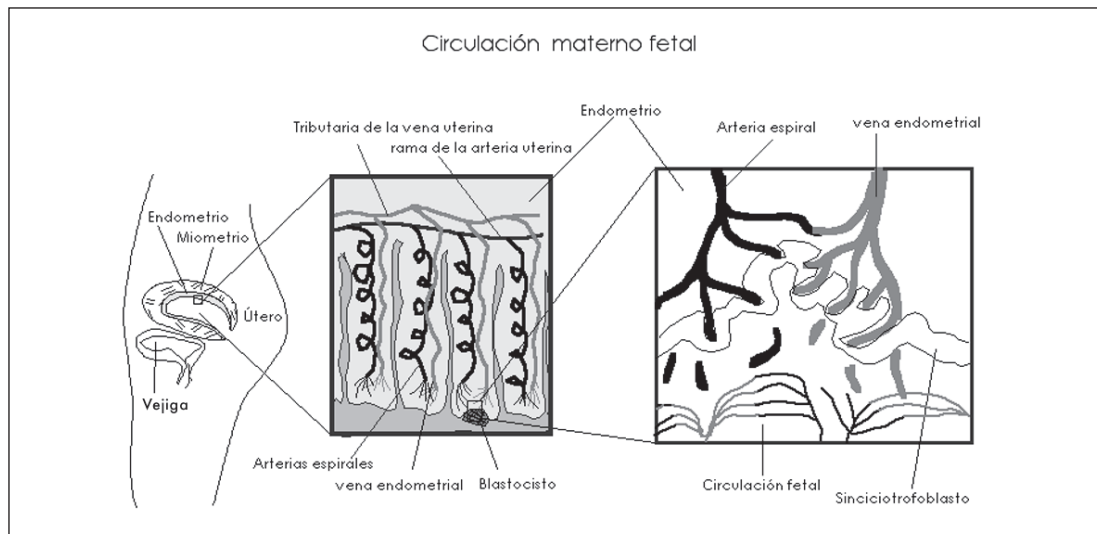


Figura 17-2 Zonas de interfase materno-fetal en la placenta. Se distingue al menos dos zonas de interacción materno-fetal: a) los sinciotrofoblastos y la sangre materna de los espacios intervellosidades y b) los citotrofoblastos extravellosidades y tejido linfoide del endometrio. En estas zonas de interacción, el sistema inmune de la madre puede ser estimulado por los antígenos fetales de origen paterno.

proteína se exprese en otros tejidos. Segundo, a diferencia de MHC-I clásico, el gen HLA-G casi no presenta polimorfismo, es decir, tiene muy pocas variantes alélicas. Esto implica que durante la preñez, la proteína trofoblástica heredada de los genes paternos será idéntica o levemente diferente a la proteína materna y por lo tanto, estas moléculas no inducirán respuesta alogeneica de rechazo. Tercero, una característica propia del gen HLA-G es que el mRNA sufre “splicing” alternativo y se genera una forma soluble que también podría tener funciones reguladoras sobre el sistema inmune materno.

Las células trofoblásticas expresan otros dos genes MHC de clase I, HLA-E y HLA-C. El gen HLA-E codifica también para una proteína de clase I no clásico, que une un grupo de péptidos muy restringido. Se postula que su función sería inhibir el ataque al trofoblasto por parte de las células NK. HLA-C es un gen MHC de clase I clásico pero se expresa en niveles mucho más bajos que HLA-A y HLA-B en tejidos normales y su función es desconocida.

4.3. Las células NK de la decidua

Las células NK de la decidua (LGL: CD56+, CD16-), difieren fenotípicamente de las encontradas en la periferia (CD56+, CD16+). En el ratón las células NK corresponden a las células GMG

(células granulares de la glándula metrial). A partir de la fase lutea del ciclo menstrual y en la primera etapa del embarazo, las células NK aumentan en número hasta llegar a ser las más abundantes en la decidua. Tanto en la mujer como en el ratón, estas células disminuyen notablemente al término de la preñez. Las células NK se encuentran en estrecha relación anatómica con las células trofoblásticas, distribuidas especialmente alrededor de las arterias espirales, glándulas endometriales y junto a los trofoblastos que invaden el tejido materno.

Aunque la función de las células NK durante la preñez es desconocida, se sabe que estas células tienen actividad citolítica similar a las células NK de sangre periférica. Las células NK de la decidua expresan los receptores inhibitorios (KIR) por lo que se cree que su actividad lítica es inhibida en la interfase materno fetal por la presencia de los ligandos HLA-G y HLA-C (figura 17-3).

4.4. Los linfocitos T de la decidua

Los linfocitos T se encuentran dispersos en la decidua y no varían en número durante la preñez. En la mujer, los linfocitos T deciduales no proliferan en respuesta a las células trofoblásticas ni frente a linfocitos alogeneicos, indicando que los linfocitos T de la decidua se encuentran en un estado de anergia similar al encontrado en los

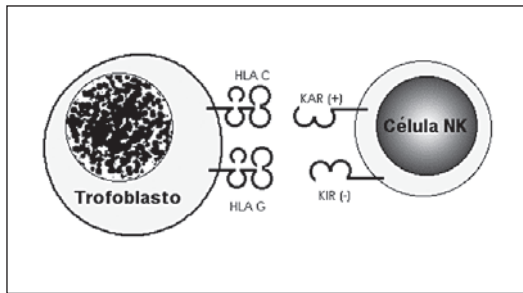


Figura 17-3 Expresión de MHC de clase I (HLA.G y HLA.C) en las células trofoblásticas. La actividad lítica de las células NK de la decidua que es estimulada por los receptores de activación KAR, puede permanecer inhibida por la unión del MHC del trofoblasto a los receptores KIR.

linfocitos de la mucosa intestinal. En ratones transgénicos existe tolerancia sistémica a los antígenos paternos, lo que se produce por una disminución transiente de los linfocitos específicos para las moléculas MHC paternas durante la preñez. También a nivel sistémico se produce desviación de la respuesta inmune hacia una respuesta humoral mediada por linfocitos Th2, evitando de esta manera el posible daño que una respuesta celular mediada por Th1 pudiera producir en la preñez.

4.5. Citoquinas en la preñez

Las citoquinas tienen una función importante durante la preñez y son producidas en tejidos fetales y la decidua. En estos tejidos se sintetizan citoquinas inflamatorias tales como IL-1, TNF α , IL-6 e IL-8; linfocinas tales como IFN- γ , IL-2 e IFN- α ; factores de crecimiento tales como el Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), Factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y factores inmunosupresores como TGF β 1, TGF β 2 e IL-10 (ver capítulo 11). Algunas citoquinas producidas por los tejidos embrionarios o maternos, tienen efectos regulatorios sobre la implantación, el desarrollo del embrión y de la placenta. Su efecto se produce a través de los receptores que se encuentran en los tejidos blanco. Por ejemplo, IL-11 se produce en las células del endometrio e induce diferenciación de las células del estroma a células deciduales favoreciendo de esta manera la implantación. Otras citoquinas como CSF-1, que se produce en el citotrofoblasto, promueven la invasión y diferenciación del

trofoblasto. Otras como IGF-1, TNF- α , IL-6 y CFS-1 promueven la síntesis y secreción de hormonas placentarias.

Varias de las citoquinas producidas en estos tejidos tienen además funciones inmunorregulatorias, así por ejemplo, IFN- γ estimula la respuesta inmune Th1 (inmunidad celular), IL-10 inhibe la respuesta inmune tipo Th1 y TGF β presenta actividad inmunosupresora. El equilibrio entre los niveles de tales citoquinas en el tracto reproductor, puede estar relacionado con la capacidad de discriminación del sistema inmune local, entre células inmunológicamente extrañas pero normales al individuo (tales como los espermatozoides y el embrión) y una variedad de microorganismos patógenos que infectan el tracto reproductor. De esta manera, el sistema inmune local puede ser capaz de iniciar una respuesta inmune de carácter y extensión apropiados al estímulo, es decir, una respuesta de tolerancia a los espermatozoides y al embrión y de rechazo a los microorganismos patógenos. Este es un campo de la inmunología de la reproducción de activa investigación.

5. FACTORES INMUNOLÓGICOS QUE AFECTAN LA FERTILIDAD

Dada la relevancia de la respuesta inmune en todos los procesos involucrados en la reproducción, no es raro que fallas a este nivel conduzcan a fallas en la fertilidad. En humanos existe una intensa investigación para conocer más exactamente los mecanismos subyacentes y poder desarrollar mejores terapias. A continuación, se describen como ejemplos de fallas de la fertilidad por causa de factores inmunológicos, la alteración en la implantación del embrión que conduce al aborto espontáneo recurrente y también, la producción de anticuerpos antiespermáticos, que pueden ser causa de falla en la fertilidad al dificultar la fecundación.

5.1. Aborto espontáneo recurrente de causa inexplicada

El aborto espontáneo recurrente de causa inexplicada se ha relacionado con la desregulación de varios aspectos de la respuesta inmune que se requieren para la implantación del embrión a pesar de que éste puede ser considerado como un aloinjerto, al portar los antígenos he-



redados del padre. La implantación es un proceso esencial para la reproducción humana en la que se produce invasión del endometrio materno por parte del concepto. Este hecho pone inevitablemente al *conceptus* en contacto con las células inmunocompetentes maternas y por ello, la interacción materno-fetal durante el período peri-implantacional es crucial para determinar el éxito o el fracaso del proceso reproductivo. ¿Cómo escapa normalmente el feto a la vigilancia por parte de las células NK endometriales que son el tipo linfocitario predominante en el sitio de implantación?. Una posible explicación surge del hallazgo de que mujeres y hombres de la misma edad poseen claras diferencias en la actividad de las células NK. Las mujeres tienen menor actividad de células NK que los hombres de su misma edad. Asimismo, el nivel de actividad de las células NK previo a la concepción, puede predecir el resultado del embarazo, ya que mujeres con alto nivel de actividad NK tienen mayor riesgo de aborto. Por otra parte, se ha postulado que la ausencia de las moléculas MHC polimórficas, HLA-A, HLA-B y de clase II, en la interfase con el tejido materno y a la presencia de moléculas MHC clase I HLA-G, con un bajo polimorfismo en el sinciotrofoblasto influyen positivamente en la supervivencia del injerto fetal. Sumados estos hechos, se plantea que es a través de estos determinantes no polimórficos, sumado a la ausencia de otras moléculas MHC, que se logra localmente la inhibición de la citotoxicidad por las células NK y de linfocitos T. De tal manera que tanto una perturbación en la expresión de HLA-G, como en el estado de activación de las células NK influye en la sensibilidad del trofoblasto a la lisis y en el equilibrio mantenido en el sitio de implantación.

La actividad de células NK es influenciada por numerosas citoquinas, entre ellas las citoquinas secretadas por los linfocitos Th1 que son capaces de activarlas se han encontrado asociadas con el aborto. Por otro lado, TGF- β sería una citoquina protectora del embarazo al disminuir el grado de activación de las células NK. Ya sea como resultado de una mayor activación o una reducción en la inmunosupresión, las células NK de pacientes abortadoras parecen estar sujetas a un ambiente proclive a la activación, reflejado en un nivel de actividad de células NK mayor que en embarazos normales. Recientemente se han acumulado evidencias del importante papel que desempeñan las citoquinas T “helper” en el rechazo del embarazo, el cual es mediado por el predominio de citoquinas

Th1 en el endometrio peri-implantacional, mientras que normalmente un predominio Th2 confiere protección. La falla del embarazo puede explicarse por varios mecanismos inmunológicos secundarios a cambios en las proporciones normales de los 2 grupos de citoquinas, sobre todo a nivel local en la interfase materno-fetal. Entre las citoquinas Th1, IL-12 sirve de estímulo para la diferenciación de células Th0 a Th1, las que por efecto de IFN- γ y TNF- β , culminan en el desarrollo de una respuesta citotóxica de rechazo del *conceptus*. El aumento anormal de citoquinas Th1 puede ser provocado por antígenos del trofoblasto, del espermatozoide, microbianos u otros, que estimulan a las células inflamatorias e inmunes maternas hacia el desarrollo de respuesta inmune celular.

El aborto recurrente de causa no explicada se ha asociado además, con la expresión de moléculas HLA-DR1 y con la presencia de autoanticuerpos órgano inespecíficos como anticardiolipinas y antinucleares. Esto puede deberse a la hipersecreción de TNF- α , dado que existe un desequilibrio de ligamiento entre HLA-DR1 y TNF- α .

5.2. Anticuerpos antiespermáticos

Anticuerpos con especificidad por el espermatozoide o alguno de sus componentes se pueden encontrar en diferentes secreciones corporales de hombres y mujeres, pero su significado como posible causante de alteraciones de la fertilidad es muy variable. El hallazgo de anticuerpos antiespermáticos en el suero no tiene relevancia en fertilidad, en cambio sí puede tenerla cuando están presentes en el tracto reproductivo (tabla 17-2). Dichos anticuerpos pueden desarrollarse en forma primaria sin una causa reconocible. En otros casos, los anticuerpos se desarrollan secundariamente a una alteración en los mecanismos normales de supresión de la respuesta inmune, ya que el espermatozoide es altamente inmunogénico tanto para la mujer como para el mismo hombre que lo produce. Esto sucede en el hombre porque los antígenos espermáticos aparecen durante la pubertad, es decir después que ya se ha establecido la tolerancia a los antígenos propios.

Actualmente se considera que dichos anticuerpos son una causa de reducción de la fertilidad, alterando la capacidad antiespermáticos fecundante del espermatozoide, inhibiendo interacciones gaméticas por aglutinación o por



Tabla 17-2. Hallazgo de anticuerpos antiespermáticos en secreciones humanas

Muestra	Isotipo de Ig	Relevancia en fertilidad
Suero (hombre)	IgG, IgM	Ninguna
Suero (mujer)	IgG, IgM	Ninguna
Moco cervical	IgG, IgA	Posible
Plasma seminal	IgG, IgA	Posible
Espermatozoide ^a	IgG, IgA	Posible

^a los anticuerpos aparecen adheridos a la superficie del espermatozoide
Referencia: Bohring C., Krause W., *Reproduktionsmedizin* 16: 3-7, 2000.

inmovilización del gameto masculino, o también, influenciando negativamente el desarrollo del embrión. Se ha sugerido que los anticuerpos unidos a la superficie espermática participan en citotoxicidad mediada por complemento o fagocitosis por macrófagos activados. Los antígenos, blancos de reacciones inmunológicas asociadas con infertilidad, son moléculas expresadas en la superficie, accesibles en el espermatozoide intacto para reaccionar con linfocitos o anticuerpos. Se ha intentado caracterizar los antígenos espermáticos relevantes en fertilidad, sin lograrlo completamente hasta ahora porque la especificidad de los anticuerpos antiespermáticos parece ser extremadamente heterogénea. Un ejemplo es el denominado antígeno de fertilización (FA-1), que fue caracterizado como una glicoproteína de 49 kDa presente en espermatozoides de varias especies de mamíferos. Se afirmó inicialmente que este antígeno era el blanco de anticuerpos presentes en el suero de hombres y mujeres infértiles, sin embargo, también lo sería para anticuerpos presentes en individuos fértiles, con lo que su relevancia para la reproducción permanece en discusión. Posteriormente se ha detectado una serie de antígenos de peso molecular entre 23 y 72 kDa, mediante electroforesis bidimensional y “Western-blot” con los anticuerpos presentes en el plasma seminal de hombres infértiles. Esto parece confirmar la heterogeneidad ya mencionada de la especificidad de los anticuerpos antiespermáticos.

Debido a que el espermatozoide no está presente en la etapa de desarrollo del individuo cuando se establece la tolerancia a los antígenos propios, es necesario su aislamiento del sistema inmune para evitar el reconocimiento y rechazo como células extrañas. La primera línea de defensa contra el desarrollo de una respuesta autoinmune

antiespermática es la barrera hemato-testicular constituida por las ajustadas uniones entre las células de Sertoli en el testículo, luego por el epitelio mucoso del tracto genital masculino, suplementado por una barrera inmunosupresora local de linfocitos T supresores abundantes en el tejido intersticial del testículo y en la submucosa del epidídimo. Las células de Sertoli también fagocitan y degradan espermatozoides y productos residuales de la espermatogénesis, evitando así el contacto con el sistema inmune. Por último, los factores inmunosupresores del plasma seminal protegen al espermatozoide incluso al encontrarse en el tracto genital femenino. Todo lo anterior explica que la formación de anticuerpos antiespermáticos se asocia en el hombre con la inflamación o infecciones del tracto genital, trauma o torsión testicular, lesión y/u obstrucción parcial de los conductos reproductivos masculinos, vasectomía y tumores. La pérdida de continuidad en la superficie mucosa de los conductos testiculares o eferentes permite el acceso de macrófagos al tracto reproductivo, los que engloban y degradan espermatozoides, para luego presentar antígenos al sistema inmune. Confirmando lo anterior, alrededor del 50% de los hombres vasectomizados presenta anticuerpos antiespermáticos en el suero y parece haber un control genético de la tendencia a formar estos anticuerpos ya que en el grupo de hombres vasectomizados que desarrollaron anticuerpos se encontró mayor frecuencia de HLA-A28 y Bw22.

En la mujer, el depósito de espermatozoides en el tracto genital puede conducir al desarrollo de anticuerpos antiespermáticos. En el caso de ruptura de las barreras mucosas, hay ingreso de antígenos espermáticos, los que son reconocidos por linfocitos B subepiteliales que desarrollan una



respuesta de anticuerpos con predominio de IgA. La aparición de estos anticuerpos también puede reflejar una falla de los factores supresores del plasma seminal. La presencia de anticuerpos antiespermáticos en el tracto genital femenino interfiere con la fecundación ya sea, porque impide la migración de los espermatozoides a través del moco cervical y con ello las interacciones gaméticas, o porque influye negativamente en el desarrollo del embrión.

LECTURAS SUGERIDAS

Anderson D., "Interaction between male genital tract infection, immunity and infertility" en Bronson R.A., Alexander N.J., Anderson D., Branch D.W. and Kutteh, W.H. (eds), **Reproductive Immunology**, Blackwell Science Inc., Cambridge, MA, pp. 383-417, 1997.

Bainbridge, DRJ., "Evolution of mammalian pregnancy in the presence of the maternal immune system", *Reviews of Reproduction*; 5, 67-74, 2000.

Bulmer, N.J., "Cellular constituents of human endometrium in the menstrual cycle and early pregnancy" en Bronson R.A., Alexander N.J., Anderson D., Branch D.W. and Kutteh W.H. (eds), **Reproductive Immunology**, Blackwell Science Inc., Cambridge, MA, pp. 212-239, 1997.

Cooper M.D., Moticka, E.J., "Mucosal immune response of the human female genital tract to sexually transmitted disease pathogens" en Bronson R.A., Alexander N.J., Anderson, D., Branch D.W. and Kutteh W.H. (eds), **Reproductive Immunology**, Blackwell Science Inc., Cambridge, MA, pp. 495-512, 1997.

Domagala, A., Kamieniczna, M., Kurpisz, M., "Sperm antigens recognized by antisperm antibodies present in sera of infertile adults and prepubertal boys with testicular failure". *Int. J. Androl.* 23: 150-155, 2000.

Heyborne, K., Silver, R.M., "Immunology of postimplantation pregnancy" en Bronson, R.A., Alexander N.J., Anderson, D., Branch, D.W. and Kutteh, W.H. (eds), **Reproductive Immunology**, Blackwell Science Inc., Cambridge, MA, pp. 383-417, 1997.

Lim, K.J.H., et al., "The role of T-helper cytokines in human reproduction". *Fertil. Steril*; 73: 136-142, 2000.

Naz, R.K., Menge, A.C., "Antisperm antibodies: origin, regulation, and sperm reactivity in human infertility". *Fertil. Steril.* 61: 1001-1013, 1994.

Parr, M.B., Parr. E.L., "Immunoglobulins in the female genital tract" en Bronson, R.A., Alexander, N.J., Anderson D., Branch, D.W. and Kutteh, W.H. (eds), **Reproductive Immunology**, Blackwell Science Inc., Cambridge, MA, pp. 275-308, 1997.

Somigliana, E., Viganò, P., Vignali, M., "Endometriosis and unexplained recurrent spontaneous abortion: pathological states resulting from aberrant modulation of natural killer cell function?", *Human Reprod. Update*; 5: 40-51, 1999.

Stagg, A.J., "Vaccines against Chlamydia approaches and progress", *Mol Med Today*; 4, 166-173, 1998.

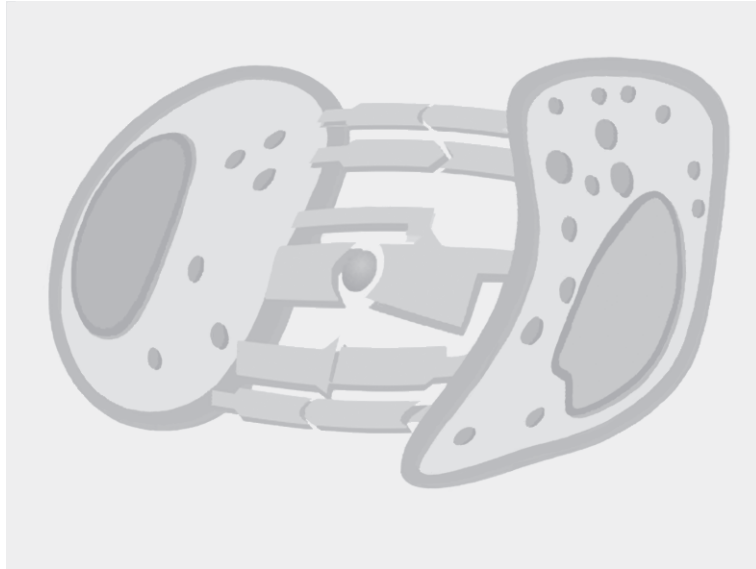




Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

SECCIÓN III

MECANISMOS EFECTORES DE LA RESPUESTA INMUNE







Capítulo 18

SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Arturo Ferreira V. y Julio Scharfstein

- 1. Introducción**
- 2. Generalidades sobre la activación y regulación del Sistema del Complemento**
 - 2.1. Generación de enlaces covalentes por parte de C3b y C4b, al reaccionar con estructuras de las superficies atacadas por el sistema.
 - 2.2. Las C3 y C5 convertasas de las rutas clásica y alterna son funcionalmente homólogas:
- 3. Ruta clásica: algunos detalles moleculares**
 - 3.1. Unión C1
 - 3.2. Activación de C4 y C2
 - 3.3. Convertasa de C3
 - 3.4. Convertasa de C5
 - 3.5. Mecanismos que confinan la activación del complemento a las membranas blanco ("target") o culpables
- 3.6. Ruta de las lectinas**
- 4. Ruta alterna: algunos detalles moleculares**
 - 4.1. Activación de la ruta alterna
 - 4.2. Papel de la properdina
- 5. Fase terminal: generación del complejo destructor de membranas**
 - 5.1. Generación de C5-8
 - 5.2. Polimerización de C9
 - 5.3. Efecto funcional de la inserción del MHC en las membranas
 - 5.4. Perspectivas futuras del estudio de la fase final de la activación del complemento
- 6. Algunos aspectos genéticos del Complemento**
- 7. Complemento y Enfermedad**





RESUMEN

El Complemento es un sistema extremadamente pleiotrópico conformado por alrededor de 40 proteínas, que interrelacionan en el sistema inmune múltiples funciones efectoras, frecuentemente mediadoras de mecanismos inflamatorios. Durante su activación se generan tres grupos de péptidos con funciones que, en condiciones fisiológicas, promueven la fagocitosis, la inflamación, la destrucción de membranas biológicas de agentes agresores y la estimulación tanto de mecanismos inmunes innatos, como adquiridos. La activación del sistema puede ocurrir a través de dos rutas, involucrando en la ruta clásica la presencia de complejos inmunes. La ruta alterna se activa por superficies biológicas con características bioquímicas particulares, en ausencia de anticuerpos. Una variante de la ruta clásica involucra ciertos carbohidratos y enzimas que generan directamente la convertasa clásica de C3, sin participación del componente C1, ni de anticuerpos. Estos mecanismos generan la convertasa de C3 que activa enzimáticamente al tercer componente C3, depositándolo sobre las membranas biológicas próximas al sitio de la activación. El tercer componente se une covalentemente a estas membranas por medio de enlaces hidroxiléster o amidoéster. Estos mecanismos de acción generan también convertasas de C5 (clásica y alterna) que activan enzimáticamente al quinto componente C5, continuando una serie de interacciones no enzimáticas, que involucra a los componentes C6-C9, culminando con el ensamblaje del MAC. Estos complejos son estructuras macromoleculares anfífilas, que se insertan en membranas biológicas agresoras, generando verdaderos tubos o canales que causan profundas alteraciones en las membranas, culminando con la lisis celular. La activación del sistema es controlada meticulosamente por proteínas presentes en la fase soluble y también unidas a membranas. Estas proteínas controladoras pueden mediar la degradación enzimática de componentes activos, particularmente C3b y C4b. También pueden impedir la generación de convertasas o desensamblar aquellas ya generadas. La regulación también puede ocurrir a nivel de la generación del MAC. Aunque la mayoría de los genes que codifican las proteínas del complemento se encuentran dispersos en el genoma, algunos de ellos se encuentran ligados en cromosomas definidos. Así, por ejemplo, los genes que codifican el segundo y cuarto componente de la ruta clásica (C2 y C4) y el factor B de la ruta alterna, se encuentran todos ligados en el centro del MHC, desconociéndose las implicancias funcionales de este ligamiento. En síntesis, el arte del sistema del complemento consiste en generar funciones opsonizantes y líticas concentradas sobre membranas agresoras culpables y no sobre membranas vecinas, propias, inocentes, favorecido esto por la función de las anafilotoxinas que facilitan el acceso al sitio de la agresión, de numerosos elementos inmunocomponentes. La marcación indeleble u opsonización de muchas superficies antigénicas por C3b y C4b, las “direcciona” hacia órganos linfoides, donde se inicia la respuesta inmune específica. La incorporación de C3b y C4b sobre complejos inmunes puede mediar la solubilización de éstos. La activación descontrolada del sistema puede generar una serie de patologías, al igual que la deficiencia de algunos componentes.

1. INTRODUCCIÓN

Si aceptamos que el sistema inmune existe porque existe la agresión exógena (virus, bacterias, hongos, parásitos en general) y endógena (células neoplásicas principalmente), entonces, la función principal de este sistema sería el reconocimiento y destrucción de estos agresores. De este encuentro, reconocimiento y destrucción, resulta

un estado de inmunidad que le permitirá al individuo reaccionar en forma más efectiva en la eventualidad probable de reencuentros futuros con el agente agresor.

En el proceso de reconocimiento participan, como componentes esenciales, células y anticuerpos. Entre las células, los linfocitos T citotóxicos (LTc) pueden reconocer y destruir células infectadas en forma autosuficiente. Los LTc



sintetizan complejos macromoleculares que, luego de contactar estrechamente con las células infectadas, los insertan en la membrana de éstas, destruyéndolas.

Por otra parte, las células B producen anticuerpos, altamente específicos, que les sirven como receptores integrales de membrana y como productos de exportación, o sea, como verdaderas sondas que reconocen al agente patógeno, incluso a gran distancia del punto de producción. Sin embargo, estas sondas, por sí solas, normalmente no pueden matar ni destruir a los organismos invasores. Excepcionalmente, los anticuerpos podrán ser suficientes si bloquean, por ejemplo, un ligando para un receptor celular presente en un parásito, cuyo ciclo biológico implica necesariamente una etapa intracelular. (En este capítulo, el término parásito será utilizado en un sentido amplio, refiriéndose a agentes agresores tales como bacterias, virus, hongos, protozoos, etc.). En otras palabras, los anticuerpos son moléculas cuya función principal es reconocer, pero, frecuentemente, el reconocimiento, aunque necesario, no es suficiente.

En este contexto, el Sistema del Complemento representa un mecanismo sérico auxiliar, eficiente de defensa innata. Es uno de los primeros sistemas de amplificación biológica cuyos mecanismos moleculares fueron descritos en detalle, sirviendo como ejemplo sofisticado y didáctico sobre mecanismos de regulación proteolítica. Debido a la gran versatilidad de las interacciones proteína-proteína, la investigación sobre su modo de activación y regulación ofrece ejemplos importantes sobre la relación entre estructura y función de proteínas, sobre la influencia de la variabilidad genética y sobre las consecuencias en clínica médica. Capaz de generar una gama de actividades biológicas, el sistema está formado por aproximadamente 40 moléculas, presentes en el plasma o sobre membranas biológicas, en todos los vertebrados estudiados hasta ahora. Tal como ocurre con los procesos de activación de las serino-proteasas responsables de la coagulación y de la hemostasis, la activación del sistema del complemento implica la activación sucesiva ("cascada") de precursores enzimáticos de serino proteasas plasmáticas. Las principales consecuencias biológicas de este proceso son:

a) Formación de un **Complejo Destructor (lítico)** de membrana, conocido también como "**Killer Complex**" o "**MAC**" ("Membrane Attack

Complex"). Este es un complejo macromolecular formado por la asociación de seis moléculas: C5b, C6, C7, C8 α , C8 β y C9. La generación de este complejo está orientada al ataque de membranas biológicas. Tiene propiedades físico-químicas anfífilas (hidrofóbicas e hidrofílicas) que le permiten insertarse en membranas biológicas fosfolipídicas que se encuentren en la proximidad inmediata al sitio de activación, alterando profundamente su estructura. Generan en ellas verdaderos forados que cambian drásticamente sus propiedades de permeabilidad. Una ilustración clásica y dramática de esto se logra al sensibilizar glóbulos rojos con anticuerpos específicos. Los glóbulos pueden incluso aglutinarse, pero estarán intactos. Al agregar suero fresco como fuente de complemento, las células se lisan. Si una de estas células se mira al microscopio electrónico se verá la membrana perforada por una multitud de orificios circulares, simétricos, equidistantes, provocados por el MAC.

b) **Oponización de antígenos por fragmentos C3b y C4b.** Estas "opsoninas" se unen covalentemente a la superficie de células invasoras cercanas al sitio de activación. Por sí solas no producen daño, pero si las células extrañas sensibilizadas con ellas, son detectadas por una célula fagocítica profesional, como el macrófago, serán fagocitadas muy eficientemente y luego destruidas intracelularmente. Estas células fagocíticas tienen receptores de superficie para estos fragmentos opsonizantes. Además de contribuir a la fagocitosis, estas opsoninas pueden contribuir a la focalización de antígenos hacia nódulos y ganglios linfáticos, donde hay una gran concentración de linfocitos B. Esto sucede porque, similar a lo que ocurre con los macrófagos, los linfocitos B también expresan receptores para los fragmentos de C3 y C4. Además, las células dendríticas foliculares también son portadoras de estos receptores. Esto otorga al sistema una importante función estimuladora de la respuesta inmune, si consideramos que, para ser inmunogénicos, los antígenos deben llegar a los órganos linfoides. Por otra parte, como los complejos inmunes pueden activar al sistema, una tercera función de estos fragmentos sería impedir formación de agregados de complejos inmunes insolubles en el organismo.

c) Un tercer grupo de productos generados se conoce como **anafilotoxinas**. Son fragmentos de



bajo peso molecular (alrededor de 5 kDa) que se generan a partir de C3, C4 y C5. Se llaman C3a, C4a y C5a. Han sido cristalizadas a homogeneidad. Inoculadas subcutáneamente, en cantidades de nanomoles, inducen una violenta reacción inflamatoria local con un gran edema. Su función principal es aumentar la permeabilidad capilar. Son agentes fundamentales en el fenómeno inflamatorio fisiológico que, frecuentemente, acompaña a muchas infecciones. Por el hecho de tener una potente actividad biológica, estos factores tienen vida media corta, siendo rápidamente destruidos por carboxi-peptidasas plasmáticas.

El nombre de anafilotoxinas es incorrecto (se conserva por razones históricas) ya que no son toxinas y no inducen shock anafiláctico, que es una reacción generalizada. Las anafilotoxinas inducen la liberación local de varios productos de las células mastoideas, siendo el más importante la histamina. Una reacción similar ocurre con los basófilos circulantes que tienen receptores para C3a y C5a. Los neutrófilos, en cambio, tienen receptores sólo para C5a, induciendo en ellos una fuerte actividad leucotóxica.

2. GENERALIDADES SOBRE ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.

El complemento puede activarse a través de dos rutas principales (clásica y alterna) presentadas, en forma muy resumida, en la figura 18-1. C3 ocupa una posición central en el sistema, siendo un objetivo principal de estas rutas el activarlo.

Ruta clásica: Requiere de la participación de complejos inmunes. Implica la activación de C1 a C9. Con una sola excepción, la secuencia de números refleja la secuencia de pasos en el proceso de activación. La excepción tiene orígenes históricos (C4 es activado antes que C2 y C3, pero C2 y C3 fueron descubiertos antes que C4).

En la ruta clásica, la participación de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} es esencial. En ausencia de estos iones la activación no ocurre. Así, si a un suero fresco se le agrega EDTA, (ácido etilendiaminotetraacético), suficiente para quelar todo el Ca^{2+} y Mg^{2+} y luego agregamos glóbulos rojos sensibilizados con anticuerpos, no habrá lisis. El Ca^{2+}

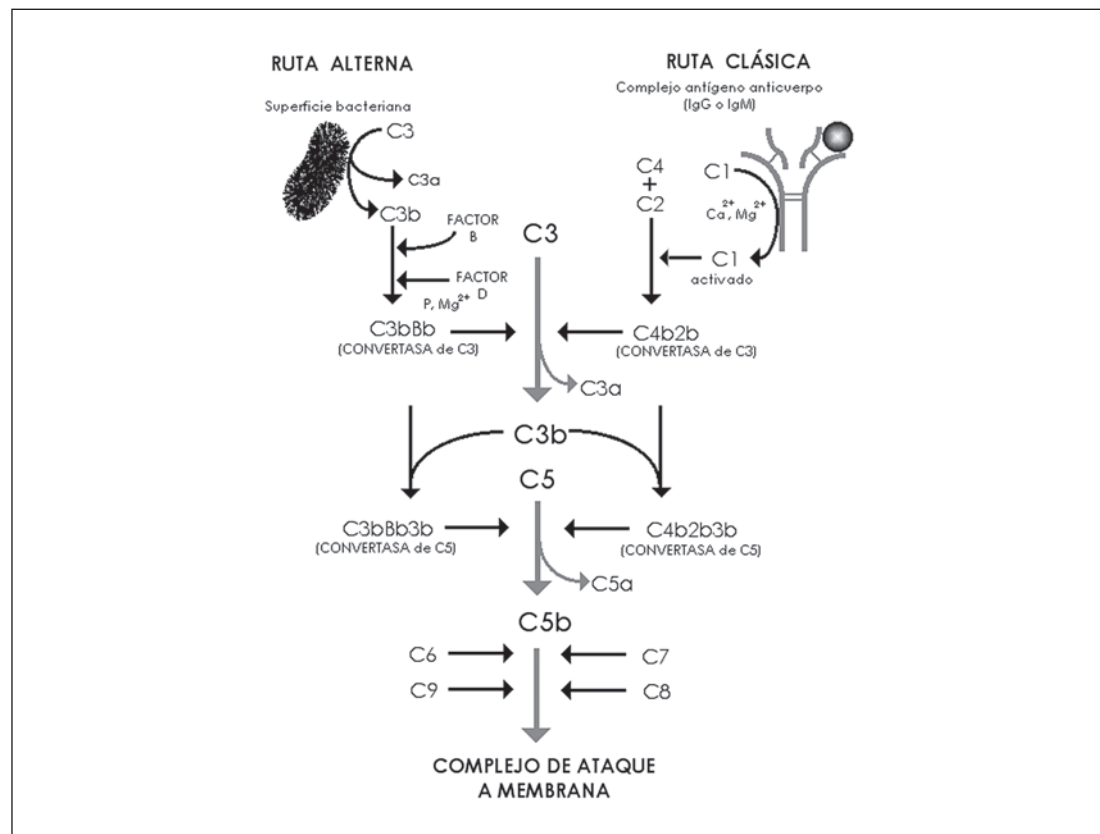


Figura 18-1. Resumen de las dos vías principales de activación del Sistema del Complemento



estabiliza a C1, formado por la asociación de 3 proteínas: C1q, C1r, C1s.

Como veremos más adelante, la manosa, carbohidrato presente en una variedad de agentes agresores exógenos, puede mediar la activación de la ruta clásica, prescindiendo de la participación de complejos inmunes y de C1, constituyendo así lo que se conoce como "bypass" de las lectinas.

Ruta alterna: Su objetivo también es activar a C3. No requiere la participación de C1, C2, C4, ni de complejos inmunes. Participan, en cambio, los factores B, D y properdina (P). Requiere de la participación de Mg^{2+} .

Regulación: El sistema del complemento, por su potencial destructor para el hospedero, debe ser cuidadosamente regulado. Este trabajo es realizado por varias proteínas que funcionan en diferentes puntos de la cascada. Estas proteínas están presentes en el suero o unidas a membranas biológicas. Las mejor caracterizadas son:

- En el suero:**
- a) Inhibidor de C1 (C1INH)
 - b) "C4 binding protein" (C4-bp) (Proteína ligante de C4)
 - c) Inactivador de C3b y C4b (I)
 - d) Factor H (H)
 - e) Proteína S
 - f) Inactivador de anafilotoxinas
 - g) SP40, 40
 - h) Properdina (P)

Como parte integral de membranas o actuando sobre ellas:

- a) CR1 : Receptor de C3b y C4b
- b) DAF: "Decay accelerating factor". (Factor acelerador del decaimiento, de convertasas).
- c) CR2: Receptor de C3d y C3dg, iC3b
- d) MCP: "Membrane Cofactor Protein" (Proteína cofactor de membrana)

I es el único factor regulador que posee actividad enzimática. Para inactivar irreversiblemente las enzimas C3 convertasas clásica y alterna, I depende críticamente de la interacción reversible de co-factores especializados (C4-bp, H y CR) con sus ligandos respectivos, C4b en la ruta clásica y C3b en la ruta alterna. MCP y DAF, aceleran el decaimiento de las enzimas convertasas clásica y alterna, ensambladas

en la superficie de la célula hospedadora.

Como se mencionó, la activación en cascada es siempre acompañada de la liberación de muchos péptidos biológicamente importantes. Como convención, los péptidos o fragmentos se designan con letras minúsculas. Por ejemplo, C3 puede generar varios fragmentos, no todos con funciones conocidas. Así, a partir de C3 se genera C3b, C3a, C3c, C3g, C3d, C3dg; de C4 se genera C4a, C4b, C4c, C4d; de C5: C5a, C5b; de B: Bb, Ba; de C2: C2a, C2b.

Los fragmentos **b** son de tamaño mayor que los **a**, sin excepción. (A pesar que esto ya fue resuelto en un taller de nomenclatura internacional, hace ya más de 15 años, algunos libros aún mantienen una excepción representada por C2, en que el fragmento mayor sería **a** y el menor **b**. En este texto usaremos lo convenido en ese taller).

En la literatura, con frecuencia, se puede encontrar una raya sobre un componente o enzima activada. Por ejemplo $\bar{C1}$, significa C1 activado. Algunas moléculas del complemento son muy interesantes, en cuanto a estructura, como es el caso de C1q y C4-bp. Estas moléculas, al igual que IgG e IgM, presentan al microscopio electrónico imágenes que parecen racionales si se piensa en sus funciones.

Las características generales de los componentes del complemento se resumen como sigue:

- a) C2, C3, C4, C5, B se fragmentan durante la activación generando C2a, C2b; C3a y C3b; C4a y C4b; C5a y C5b, Ba y Bb. C1r y C1s también se fragmentan pero los productos generados se designan simplemente como mayor y menor
- b) Todos los componentes son glicoproteínas
- c) La concentración sérica fluctúa entre 1-2 mg/ml (C3) y menos de 1 ug/ml (D)
- d) El peso molecular fluctúa entre 20 kDa (D) y 750 kDa (C1: q, r, s)
- e) N° de cadenas: 18 (C1q); 7 (C4-bp); 3 (C4; C8); 2 (C3, C5, C1r, C1s); 1 (C2, C6, C7, C9, B)
- f) Precursores (no funcionales) por proteólisis limitada se hacen funcionales en una reacción en cascada unidireccional (C1r, C1s, C4, C2, C3, C5, C3, B)
- g) La regulación ocurre en varios puntos de la cascada
- h) Durante la activación se generan mecanismos moleculares que concentran la acción lítica y opsonizante sobre membranas biológicas blanco ("culpables") y no sobre células vecinas inocentes
- i) Algunos componentes se preasocian estratégicamente en ausencia de estímulo



Los genes estructurales de estas proteínas están dispersos en el genoma. Curiosamente, sin embargo, los genes para C2, B y C4 se encuentran en un “cluster” en el centro del “Complejo Principal de Histocompatibilidad” (MHC), en todas las especies estudiadas hasta ahora. Hay otras curiosidades genéticas. El gen estructural de C3 en el ratón está en el cromosoma 17, ligado a *H-2*, pero a una gran distancia genética, 13 centimorgans, telomérico a la región D. En humanos, en cambio, el gen estructural de C3 está en el cromosoma 19, no ligado a *HLA*, complejo genético que se en-

cuentra en el cromosoma 6. Se desconoce la razón por la cual C2, B y C4 están siempre formando parte integral del MHC. C8 está formado por dos proteínas cuyos genes estructurales están, en humanos, en el cromosoma 1. Un gen codifica las cadenas alfa-gamma, que son secretadas como un precursor de una cadena. Otro gen codifica la cadena beta. Las tres cadenas se integran postsintéticamente para formar la molécula funcional de tres cadenas que conocemos como C8. Dos cadenas (alfa y gamma) están unidas covalentemente, la otra no. La tabla 18-1 resume estos datos.

Tabla 18-1. Característica generales de las proteínas del Sistema del Complemento

Componente	PM (kDa)	Cadenas Nº kDa	kDa	Cromosoma humano	Concentración (ug/ml suero)	Sustrato
C1q	462	18(6A+6B+6C)	A: 26.5 B: 26.5 C: 24	1 1 1	80	---
C1r	83	1	--	12	50	C1r, C1s
C1s	83	1	--	12	50	C4, C2
C4	205	3 (α, β, γ)	α : 97 β : 75 γ : 33	6	600	---
C2	102	1	--	6	20	C3, C5
C3	185	2 (α, β)	α : 110 β : 75	19	1300	---
D	24	1	--	X?	1	B
B	92	1	--	6	210	C3, C5
C5	190	2(α, β)	α : 115 β : 75	9	70	---
C6	120	1	--	1	55	---
C7	110	1	--	5	56	---
C8	150	3 (α, β, γ)	α : 64 β : 64 γ : 22	1 1 9	55	---
C9	71	1	--	5	59	---
C1 INH	110	1	--	11	200	---
C4-bp	500	7	55	1	250	---
I	88	2	α : 55 β : 30	4	35	C4b, C3b
S	83	1	--	17	505	---
P	220	4	56	20	5	---
H	150	1	--	1	560	---
CR1	205	1	--	1	--	---
DAF	73	1	--	1	--	---

*Se designa como sustrato sólo a aquellas moléculas que son degradadas proteolíticamente



De acuerdo a lo mencionado, muchas de las serino proteasas del sistema complemento circulan como precursores no funcionales (zimógenos). La activación del complemento puede ser definida entonces como una cascada de reacciones en que precursores enzimáticos no funcionales son activados por proteólisis limitada y específica en un proceso unidireccional e irreversible. Así, la proteína que en una etapa es sustrato, al sufrir la ruptura de un enlace peptídico se transforma en una enzima nueva, a veces alterando sutilmente su especificidad enzimática, lo que le permite actuar sobre un sustrato distinto. La consecuencia principal de esto es que un pequeño estímulo inicial puede ser amplificado tremendamente (efecto de cascada). Mecanismos de este tipo evidentemente requieren de un sistema de control riguroso, que opera en diversas etapas de la cascada.

Una característica muy interesante del sistema del complemento es que, incluso en ausencia de estímulo, muchas proteínas circulan en el plasma ya laxamente asociadas entre sí, listas para actuar, tal es el caso de:

- a) C1q, C1r, C1s (todos necesarios para la activación de C4 y C2).
- b) C4, C2, C4bp (C4 y C2 forman la convertasa clásica de C3. C4-bp es cofactor de I para inactivar a C4).
- c) C3, P, B (participan en la convertasa alterna de C3).
- d) C5, C6, C7, C8, C9 (Forman el "killer complex" o Complejo de Ataque de Membranas, MAC).

Se trata entonces de un conjunto de verdaderos organelos flotantes, dispersos en el plasma, listos para actuar. En general, varios de ellos copurifican, cuando se intenta aislarlos por

procedimientos bioquímicos estándares.

Las enzimas (convertasas de C3 y de C5) participan en la cascada, son complejas y se generan durante la activación:

- a) En la ruta clásica, la convertasa de C3 (C4b, C2b), generada por la acción secuencial de C1 sobre C4 y C2 (figura 18-2), actúa sobre C3 generando dos fragmentos, C3b y C3a.

El sitio enzimático activo de la C3 convertasa está localizado en el fragmento C2b. C2 y C4 circulan preasociados. C4 al liberar su fragmento C4a, por acción de C1s, cambia en su conformación terciaria y esto induce un cambio en la conformación de C2 el que, al igual que C4, expone un sitio susceptible de ser digerido por C1s. C4 se une covalentemente a estas membranas. A su vez, C2 sólo puede unirse a través de C4 a la membrana que está siendo atacada.

C2b, disociado de C4b, es prácticamente inactivo, debe combinarse con C4b para poder actuar sobre C3. Se cree que la función de C4b en la C3 convertasa es modular ("acomodar") al sustrato C3 en la posición adecuada para ser digerido por C2b. En otras palabras, C4b es un cofactor enzimático: es esencial para que la subunidad catalítica C2b pueda romper un enlace peptídico en C3.

La C3 convertasa genera muchos fragmentos C3b. La mayor parte de ellos pasa a la fase fluida, una proporción menor actúa como opsoninas y también para direccionar antígenos hacia órganos linfoides

- b) C5 convertasa clásica: Como paso posterior a la activación de C3 en la ruta clásica, ocurre la generación de la convertasa de C5 de la misma ruta (figura 18-3).

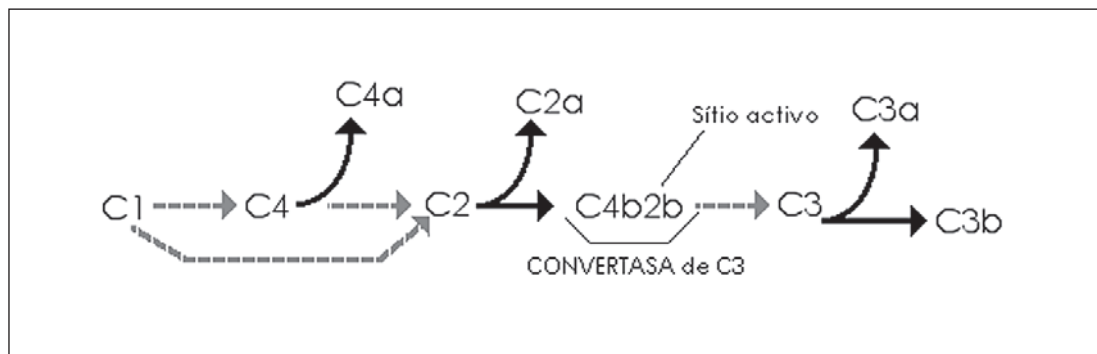


Figura 18-2. Esquema simplificado de la generación de la convertasa de C3.

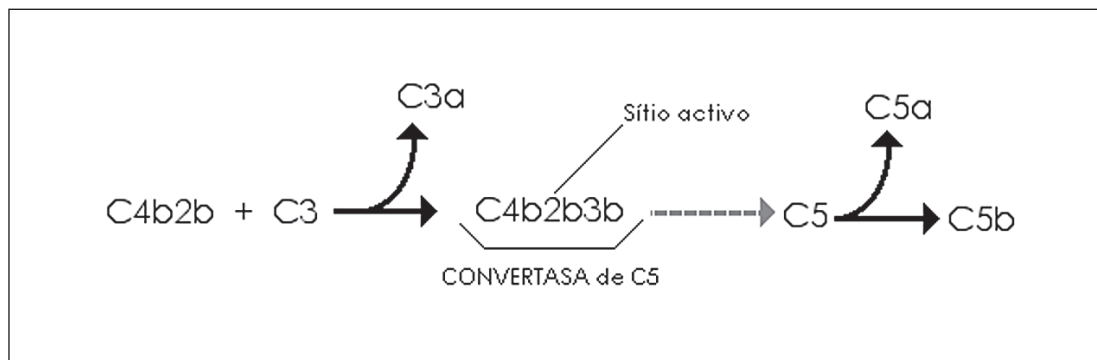


Figura 18-3. Esquema simplificado de la generación de la convertasa de C5.

Una proporción menor de los fragmentos C3b, generado por la convertasa respectiva, se asocian a la misma. Se produce así un cambio en la especificidad del sitio enzimático presente en C2b. El complejo tendrá ahora especificidad por C5, ya sea a través de la modulación de C2b por C3b (modulación de enzimática) o de la modulación de la molécula de C5 (modulación de sustrato), al contactar con C3b.

2.1. Generación de enlaces covalentes por parte de C3b y C4b, al reaccionar con estructuras de las superficies atacadas por el sistema

Uno de los aspectos más importantes y característicos del sistema del complemento es que, después de la activación, las moléculas de C3b y C4b tienen un tiempo muy corto (fracciones de segundo) para unirse covalentemente a la membrana atacada. Si no lo hacen, decaen. A nivel molecular, esto significa que el sitio de unión neoformado tiene vida corta. Este sitio es hidrofílico y aparece después de la fragmentación de las moléculas por C1s (C4) o por C4b,2b (C3).

En el centro de la cadena alfa de C3 y C4, se encuentra un enlace tioéster, formado por interacción del grupo carboxilo de un ácido glutámico y el grupo sulfhidrilo de una cisteína. (Este tipo de enlace también es compartido por la α 2-macroglobulina, un inhibidor de proteasas). La activación de estos enlaces es uno de los eventos más importantes en el plasma para la eliminación de agresores que activan al complemento. Se generan así enlaces covalentes de tipo hidroxiéster o amidoéster con grupos hidroxilos y aminos presentes en las superficies antigénicas agresoras. De esta manera, C3b y C4b, presentes en convertasas

o como opsoninas se unen indeleblemente a una variedad de agresores. Como puede predecirse, la formación de estos enlaces requiere proximidad entre C3 o C4 con células. La reacción puede ocurrir con estructurasceptoras presentes en diversos patógenos, aunque accidentalmente puede involucrar a membranas de células del hospedero. Es inespecífica, desde el punto de vista inmunológico. Esta proximidad, calculada en 40 nm desde la convertasa o desde C1s (lugares en que se genera C3b y C4b, respectivamente), es un elemento clave del sistema que centra la acción en las membranas atacadas y no sobre membranas vecinas inocentes.

En humanos existen dos isotipos de C4, codificados en el complejo *HLA*. Mientras el enlace tioéster del isotipo C4A reacciona directamente con nucleófilos aminos de la superficie atacada, el isotipo C4B es más complejo. Una vez activado (por digestión de su cadena α por C1s), la histidina en posición 1106 (ácido aspártico en C4A) ataca al enlace tioéster formando un intermediario acil-imidazol. El tiol liberado actúa luego como una base para catalizar la transferencia posterior del grupo acil a nucleófilos hidroxílicos, incluyendo el agua.

Es posible que estos mecanismos básicos también operen en otras especies. De hecho, en el ratón también existen dos isotipos de C4, codificados en el complejo *H2*.

Los vertebrados disponen así de un mecanismo defensivo de alta eficiencia que les permite unir covalentemente, C3b y C4b a la superficie atacada. Estos conceptos se resumen en la figura 18-4.

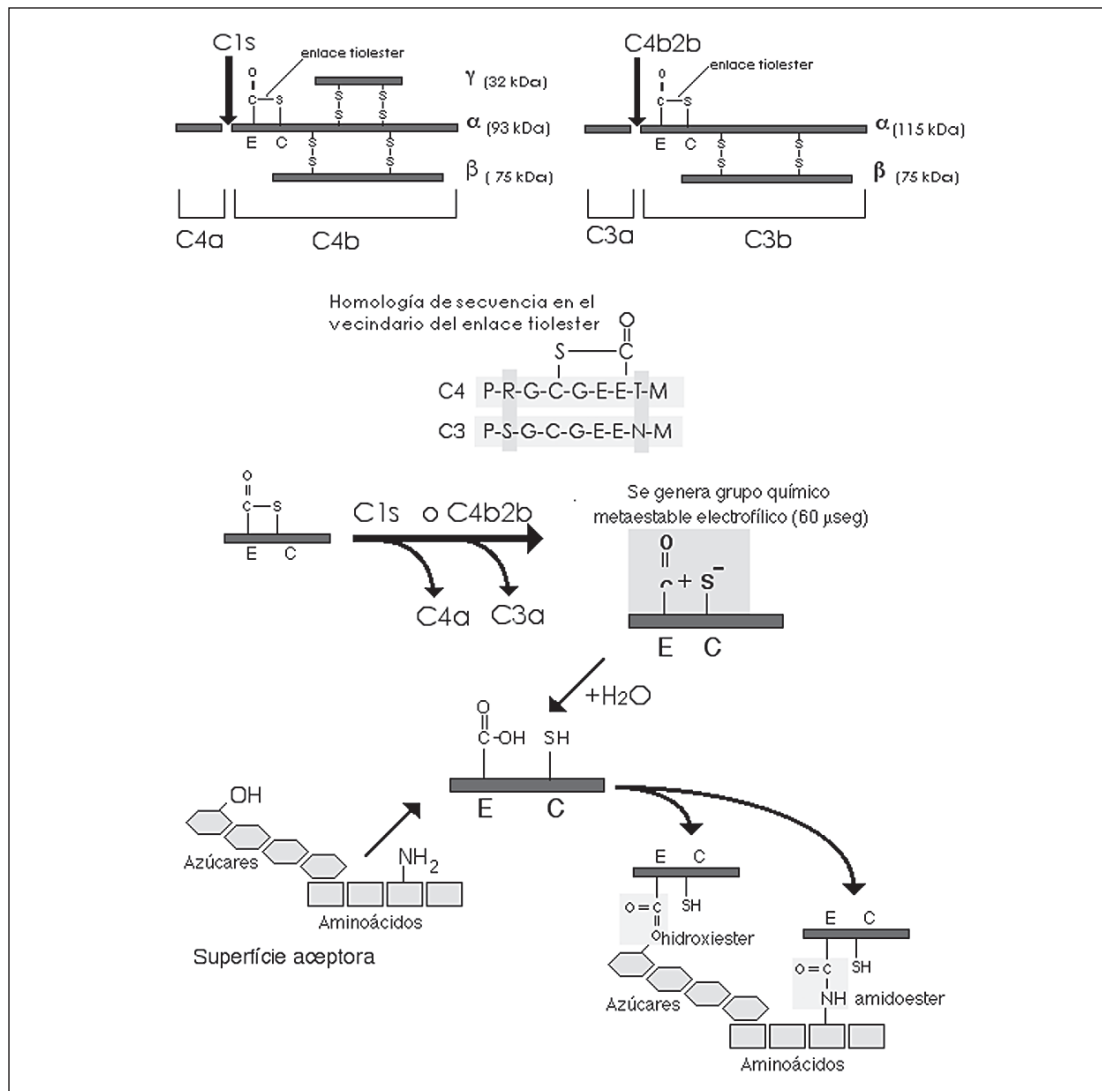


Figura 18-4. Generación de enlaces covalentes entre componentes activados y superficies receptoras.

En concordancia con lo anterior, C3 y C4 pueden ser inactivados por amonio o hidrazima (H₂NNH₂), que pueden atacar nucleofílicamente el enlace tioéster.

2.2. Las C3 y C5 convertasas de las rutas clásica y alterna son funcionalmente homólogas

Esta homología se basa en que ambos tipos de convertasas (clásica y alterna) generan productos idénticos (figura 18-5) y sus componentes tienen homología estructural y genética. Basado en estos resultados se puede proponer que:

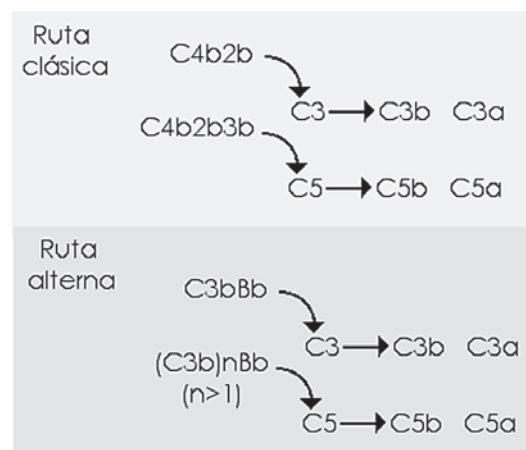


Figura 18-5. Resumen de los productos generados por las convertasas de C3 y C5 de las rutas clásica y alterna.



a) Es posible que C3 y C4 sean productos de genes duplicados ya que existe alta homología de secuencia primaria en los vecindarios de los enlaces tioéster en la cadena alfa de ambas moléculas. En otras palabras, la homología va más allá de la presencia del ácido glutámico y de la cisteína involucrados en el enlace.

b) En ambas convertasas de C3, C3b o C4b actúan como cofactores de las enzimas (C2b o Bb).

c) Es posible que tanto en las C3 convertasas como en las C5 convertasas de ambas rutas, las proenzimas (C2, B) sean productos de genes duplicados.

d) Las convertasas de C5 clásicas y alternas no difieren en lo fundamental. En la alterna, C4b es reemplazado por moléculas de C3b que, posiblemente, representan una duplicación génica de C4 o viceversa.

e) Los productos de la acción de las convertasas clásicas y alternas son los mismos.

3. RUTA CLÁSICA: ALGUNOS DETALLES MOLECULARES

3.1. Unión de C1

La presencia o generación de complejos antígeno-anticuerpo desencadena la cascada a través de la etapa de reconocimiento, que requiere la participación de C1. C1 está formado por las subunidades q, r, s. El reconocimiento mismo es efectuado por C1q. Al microscopio electrónico, C1q tiene una estructura con un notable parecido a un ramo de 6 tulipanes. La figura 18-6 resume estos conceptos.

Cada una de las seis unidades de C1q (cada tulipán) consta de una porción fibrilar y una porción globular, participando tres tipos de cadenas de peso aproximado a 25 kDa. C1q tiene entonces 18 cadenas, lo que da un peso total aproximado de 400 kDa. Las cadenas (A,B,C) son muy similares, pero no idénticas y probablemente representan el producto de tres genes duplicados (ligados en la cromosoma 1 en humanos). Los tulipanes están unidos en pares a través de sus cadenas C, por lo cual hay tres dímeros C-C y seis dímeros A-B. Todos unidos por puentes disulfuro.

La parte fibrilar tiene una estructura similar al colágeno por lo cual es sensible a la collagenasa. La parte globular es la responsable del reconocimiento de los complejos antígeno-anticuerpo. Esta

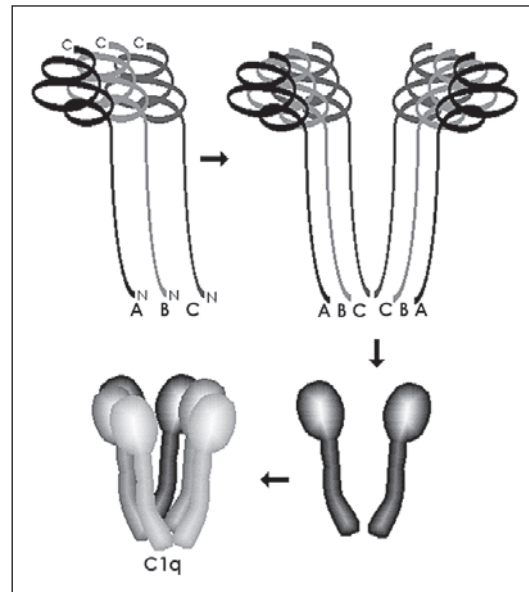


Figura 18-6. Estructura de C1q.

porción resiste la acción de collagenasas y conserva la capacidad de unirse a complejos antígeno anticuerpo aún después de tratada con la enzima.

C1r y C1s se unen a la porción fibrilar de C1q, en forma no covalente. Por su parte, C1q se une, en forma no covalente, a través de sus porciones globulares, a las moléculas de anticuerpo del complejo antígeno-anticuerpo. Específicamente, C1q se une al dominio CH2 de la porción Fc de la molécula de anticuerpo. Se une eficientemente a IgG1,2,3. Complejos inmunes formados por IgG4 no activan al complemento.

Las IgG no activan al complemento cuando están libres en el suero porque C1q debe formar un complejo con 2 moléculas de Ac cuyos fragmentos Fc deben estar a una distancia crítica de 30-40 nm. Se ha demostrado experimentalmente que el número de pares de moléculas de IgG adecuadas para unir C1q, aumenta exponencialmente cuando el número total de moléculas de IgG unidas aumenta linealmente. Ej: En un glóbulo rojo que tiene 1.000 moléculas de IgG unidas, sólo un 1% forma pares adecuados (problema estadístico que asume que los antígenos están distribuidos al azar en la superficie). Este 1% aumenta al 20% cuando se unen 2.000 moléculas de IgG por glóbulo rojo.

En la IgM los fragmentos Fc están a una distancia adecuada, ya que es un pentámero de monómeros de inmunoglobulina tetramérica. Sin embargo, no activa al complemento cuando se



encuentra libre en el suero. Se sabe también que una sola de estas moléculas es suficiente para lisar un glóbulo rojo (de allí que se dice que es hemolíticamente más eficiente que la IgG y que, incluso, se la llame hemolisina). La IgM, al reaccionar con antígenos sobre una membrana celular cambia su estructura plana a una forma tridimensional, semejante a un corchete, exponiendo el dominio CH3 que une la porción globular de C1q. Con antígenos solubles, o en ausencia de antígenos, tenderá a asumir la forma plana. La IgM es la molécula diseñada para mediar el ataque temprano de membranas biológicas por parte del complemento.

C1s y C1r son serino esterasas. Se unen no covalentemente a la porción fibrilar de C1q, en forma de dímeros de fórmula 2C1r: 2C1s, generando un tetrámero lineal (figura 18-7). Las moléculas de C1s están en los extremos de la cadena que tiene una longitud de 50 nm. La estructura y contenido aminoácido de ambas es parecido, lo que sugiere que se originaron por duplicación génica. Cada monómero tiene un peso de 83 kDa y está formado por una sola cadena polipeptídica. Al activarse, cada cadena se fragmenta y el sitio catalítico aparece en el fragmento menor. Este y el mayor permanecen unidos por un puente disulfuro, lo cual implica la existencia de al menos una cisteína en cada fragmento. Esto permite que la actividad enzimática se mantenga incorporada al complejo C1q-Ac-Ag.

Se desconoce el mecanismo exacto de la autoactivación de C1r que ocurre cuando la porción globular de C1q interactúa con los fragmentos Fc de los complejos inmunes. La explicación

más aceptada es que C1r, como muchos otros zimógenos, tendría una capacidad limitada de autoactivarse. Esta posibilidad se basa en la observación que C1r purificado forma dímeros en solución y que en estos dímeros se produce la autoactivación, o sea que cada miembro del par es capaz de activar al otro. Es posible entonces que cuando C1 se combina con los complejos inmunes, a través de la porción globular de C1q, las relaciones espaciales en el tetrámero 2(C1r:C1s) sean favorables para que se produzca la autoactivación de por lo menos una molécula de C1r, la que podría activar a la otra. Las dos moléculas de C1r activado estarían así en condiciones de activar a las dos moléculas de C1s. Evidentemente, este mecanismo implica una considerable flexibilidad dentro del tetrámero para que se realice la activación o autoactivación, considerando que las moléculas de C1r están en los extremos del mismo.

3.2. Activación de C4 y C2

Esta etapa cumple al menos 3 funciones, todas derivadas de la asociación covalente de C4b y C3b sobre la superficie activante:

- a) Se facilita la fagocitosis a través de la unión a los receptores para C3b y C4b presentes en la superficie de los fagocitos profesionales (CR1).
- b) Se genera C3 y C5 convertasas, utilizando C4 y C2, de modo que la activación pueda proseguir hasta la activación de C3 y C5.
- c) El depósito covalente de C3 y C5, direcciona los antígenos hacia órganos linfoides, facilitando así la inducción de la respuesta inmune específica.

La molécula de C4 no es una enzima sino que actúa como matriz o cofactor positivo para el ensamblaje de las C3 y C5 convertasas. Es una molécula extremadamente versátil. Tiene al menos siete dominios importantes y topográficamente diferentes que le permiten interactuar con:

- a) C1s de la ruta clásica, o MASP de la ruta de las lectinas, lo que determina su activación.
- b) Membranas biológicas atacadas (unión covalente).
- c) C2, para formar la convertasa de C3.
- d) CR1, de células fagocíticas, lo que le permite actuar como opsonina.

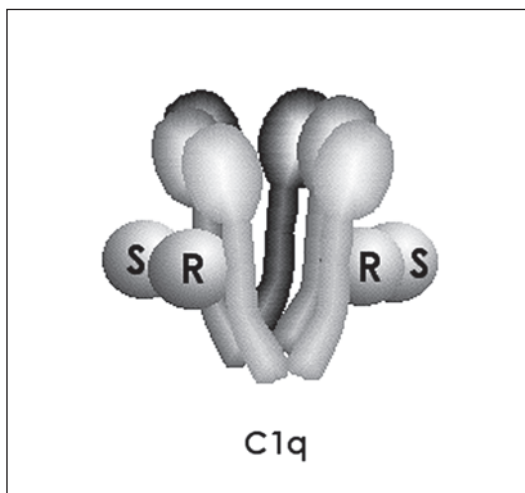


Figura 18-7. Unión de C1s y C1r a C1q.



- e) C4bp, lo que media su inactivación, cuando pasa a fase fluida.
- f) I, lo que media su inactivación en fase fluida, cuando es reconocido por C4bp.
- g) C3, requisito para la activación de éste por parte de C2b. Así, C3 puede actuar como opsonina, o formar parte de la convertasa de C5.

Una vez iniciada la activación de C4 y C2, la reacción puede ocurrir en muchos puntos de la membrana simultáneamente, alejándose en forma radial desde el punto en que se produjo la reacción Ag-Ac (figura 18-8).

La fragmentación de C4 en C4b + C4a es un punto de amplificación de la cascada. Así, por cada molécula de C1s activado se generan alrede-

presente en fase fluida, generando gran cantidad de C3b. C3 es digerido en su cadena alfa por el sitio catalítico presente en C2b del complejo C4b,2b (C3 convertasa). Esta etapa tiene al menos 3 funciones, derivadas también del depósito covalente de C3b sobre membranas biológicas:

- a) Facilitar la fagocitosis.
- b) Proporcionar un sitio de unión para C5, de manera tal que C5 es modulado y puede ser digerido por C2b presente en la nueva convertasa generada (convertasa de C5 o C4b,2b,3b).
- c) Direccionar antígenos hacia órganos linfoides, facilitando así la inducción de la respuesta inmune adquirida. Esta función sería compartida con

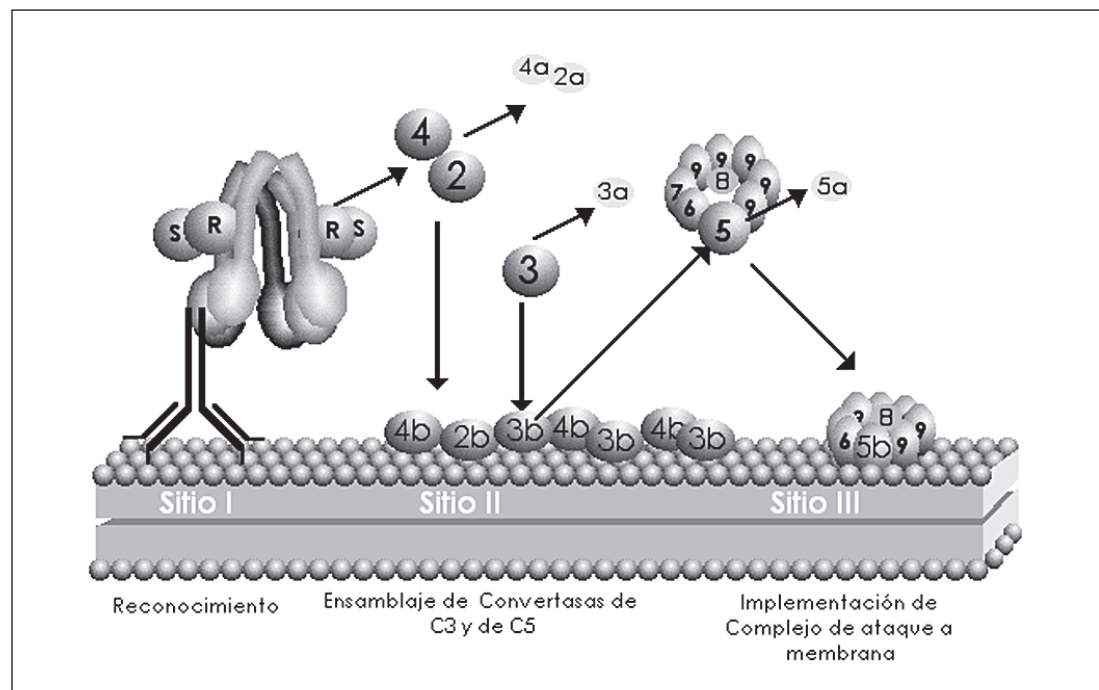


Figura 18-8. Esquema de la secuencia desde el reconocimiento antigénico hasta la implantación del Complejo de Ataque a Membrana.

dor de 30 moléculas de C4b que se unirán a la membrana, lo que representa no más del 5% del C4b generado por esa molécula de C1s.

¿Qué ocurre con los C4b que pasan a la fase fluida? Para evitar el ataque a membranas propias, inocentes, vecinas, es importante inactivarlos.

3.3. Convertasa de C3

Las moléculas de C3 convertasa generadas sobre la membrana biológica reaccionarán con C3,

C4, dado que el receptor CR1 de los linfocitos B es común para C3b y C4b. C3 es una molécula de 190 kDa, sintetizada como una sola cadena que es luego digerida a una cadena alfa de 115 kDa y una cadena beta de 75 kDa, que permanecen unidas por puentes disulfuro.

Hoy, existe considerable evidencia que los genes estructurales de C3 y C4 se originaron por duplicación. Esta aseveración se basa en que, aparte de la importante homología génica, son funcionalmente análogos: Se unen covalentemente



a las superficies celulares y son capaces de generar las C3 y C5 convertasas por acción de dos serino proteasas que también son análogas (C2b y Bb).

El 10-15% del total del C3b generado se une a las células. Es otro paso de amplificación ya que aproximadamente 200 moléculas de C3b se depositan sobre la célula por cada C3 convertasa. Al igual que en el caso de C4b, la gran cantidad de C3b que pasa a la fase fluida debe ser inactivada.

3.4. Convertasa de C5

La C5 convertasa fragmenta a C5 en C5a y C5b. Este es el último paso enzimático en la activación del complemento. C5 circula preasociado con C6-C7-C8-C9. Al generarse C5b, el complejo C5b-C9 cambia de hidrofílico a anfifílico, exponiendo sectores hidrofóbicos que le permiten insertarse en membranas biológicas.

C6, C7, C8 y C9 en el complejo destructor MAC se encuentran en proporciones estequiométricas definidas. C9 se polimeriza alrededor de un pilar formado por C5b-C8, formando una especie de tubo que se inserta en la membrana. Esta estrategia es similar a la usada por las células “T killer” o citotóxicas y NK que destruyen a la célula blanco insertando una estructura tubular (perforina) en sus membranas plasmáticas. Es un verdadero misil que las células T insertan en las membranas que ellas, con sus receptores específicos, reconocen como extrañas. Esta estructura tubular tiene una notoria similitud al MAC.

En la membrana celular atacada por la activación de la ruta clásica podemos distinguir tres tipos de sitios topográficamente definidos. El primero, donde se realiza el reconocimiento antigénico por los anticuerpos; el segundo, donde se generan las C3 y C5 convertasas y, el tercero, donde se inserta el MAC.

3.5. Mecanismos que confinan la activación del complemento a las membranas blanco (“target”) o culpables, en la ruta clásica.

- a) La activación de C1 requiere la unión de por lo menos un par de inmunoglobulinas a una distancia crítica o de una molécula de IgM unidas a la superficie antigénica.
- b) Sólo C2b, modulado por combinación con C4b unido a superficies antigénicas, puede formar las C3 y C5 convertasas.

- c) La corta vida de los sitios de unión de C3b y C4b restringe la unión de estas moléculas a un área circular de 40 nm de radio, cuyo centro está dado por la molécula de C1s o por la C3 convertasa.

Finalmente, en la figura 18-9 se muestran las etapas en que ocurre amplificación.

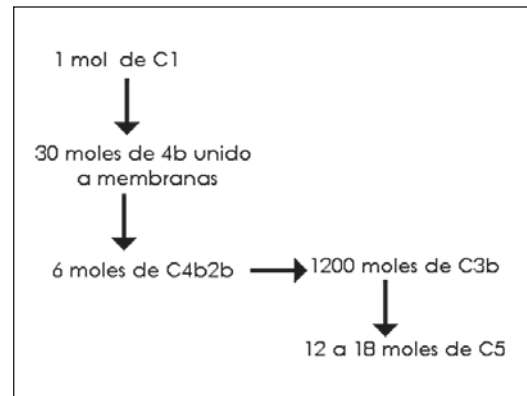


Figura 18-9. Etapas de amplificación en la activación del Sistema del Complemento.

3.6. Ruta de las lectinas

La ruta de las lectinas, descrita más recientemente, puede considerarse como un “bypass” de la ruta clásica. Al igual que la ruta alterna, se activa en forma independiente de anticuerpos. Cuando los macrófagos fagocitan bacterias u otros agentes agresores, son estimulados para secretar citoquinas como IL-1, IL-6 y TNF α . Éstas actúan sobre los hepatocitos, los que responden produciendo proteínas de fase aguda, entre las cuales se encuentra la lectina que une manosa (“mannose binding lectin” o MBL).

Siendo la manosa un componente principal de las glicoproteínas de la pared bacteriana (y probablemente de otros agresores), la MBL se une a las bacterias y otros patógenos, actuando, no sólo como una potente opsonina, sino también mediando la activación del complemento. Concretada esta unión, un complejo proenzimático, unido en forma dimérica a MBL (“MBL-associated serine protease” o MASP) se activa, actuando sobre C4 y C2, en una manera aparentemente idéntica a como lo hace C1s activado, presente en el complejo macromolecular C1q-C1r2-C1s2 (figura 18-10).

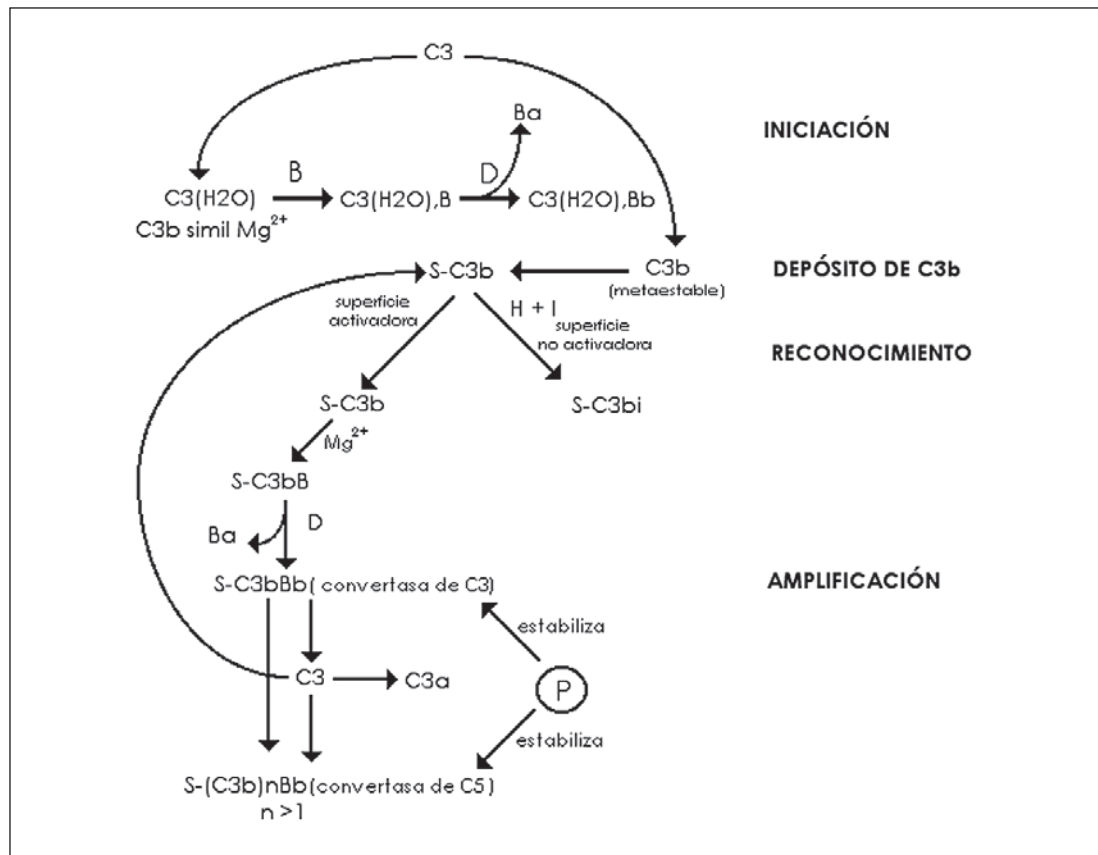


Figura 18-10. Ruta de las lectinas. La manosa de la superficie bacteriana se une a MBL (“mannose binding ligand”). La MASP2 (“MBL-associated serine protease”, forma dimérica), forma complejo con MBL (MBL - MASP2) que hidroliza a C2 y C4. Se muestra además la activación de la ruta clásica a través de un complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac).

Parece, entonces, que habría similitudes funcionales y estructurales importantes entre los complejos C1q-C1r2-C1s2 y MBL-MASP2. Así, MBL tiene similitudes estructurales importantes con C1q (de hecho, al microscopio electrónico, también presenta una estructura semejante a un ramillete de tulipanes) y, en MASP2, un monómero sería similar a C1r y, el otro, a C1s. La deficiencia de MBL ha sido asociada con susceptibilidad a un amplio rango de enfermedades bacterianas.

MBL también puede unirse a IgA polimérica, induciendo la activación del complemento, lo cual podría explicar mecanismos defensivos mediados por IgA, a nivel de mucosas.

4. ACTIVACIÓN DE LA RUTA ALTERNA

La ruta alterna proporciona al hospedador un mecanismo de defensa innata, muy efectivo. Este mecanismo se realiza en ausencia de anticuerpos

específicos, característica fundamental de esta ruta, al igual que la ruta de las lectinas. Difiere de la ruta clásica mediada por anticuerpos, en que proporciona una línea de defensa que está inmediatamente disponible pues no requiere de inmunización previa. Participan en ella seis proteínas plasmáticas: C3, B, D, H, I y P. De éstas, B, D y P participan exclusivamente en esta ruta. Las seis proteínas realizan una vigilancia continua que escapa un poco a los conceptos inmunológicos convencionales. Por ello, esta ruta y la de las lectinas corresponden esencialmente a mecanismos de inmunidad innata

¿Cómo ocurre la discriminación entre moléculas del hospedador y moléculas extrañas si no participan los anticuerpos?

Una de las consecuencias inevitables del inicio de los mecanismos de amplificación descritos, anteriormente, es la generación de una gran cantidad de moléculas C3b que se unen indiscriminadamente a células del organismo



agresor activador y a células del hospedador (no activadoras o inocentes o “bystanders”). En el hospedador existe una serie de proteínas reguladoras que inactivan rápidamente a las moléculas de C3b que atacan a sus propias células. Estas proteínas reguladoras están presentes en el plasma y también como proteínas integrales de las membranas celulares del hospedador.

Los organismos sensibles al ataque de la ruta alterna incluyen bacterias, hongos, virus, células tumorales inducidas por virus, otras líneas de células tumorales y eritrocitos humanos carentes de DAF (factor acelerador del decaimiento de convertasas).

El C3b que se deposita en estos tipos de partículas puede funcionar como opsonina o pasar a formar parte de C3 o C5 convertasas alternas. Las C3 convertasas neoformadas pueden generar más C3b que se deposita hasta que la superficie es saturada o hasta que se agota el stock de C3. La ruta alterna del complemento puede depositar hasta 2 millones de moléculas C3b en la superficie de un glóbulo rojo en un período menor de 5 min.

Las características principales de las proteínas que participan en la ruta alterna son las siguientes:

- B:** Contiene histidina, ácido aspártico y serina en posiciones homólogas con otras serino proteasas. Sin embargo, en el extremo amino terminal tiene 300 residuos adicionales con secuencia diferente a las de otras serino proteasas. Esta es también una característica de C2.
- D:** Circula en forma activa. Es una proteasa altamente específica, ya que su único sustrato conocido es B. Rompe un enlace Arg-Lys en B sólo cuando está unido a C3b, liberando el fragmento Bb. Juega un papel similar al de C1s de la ruta clásica. No se sabe si hay homología de secuencia primaria entre estas dos enzimas.
- H:** Cofactor regulador negativo. Se une a C3b y sólo en estas condiciones, la cadena alfa de éste se torna sensible a la digestión por I.
- I:** Serino proteasa que actúa como factor regulador negativo. Digiere las cadenas alfa de C3b y C4b. Requiere de los cofactores H, (sobre C3b), CR1 (sobre C3b y C4b, ambos unidos a membranas) y C4-bp (sobre C4b, en fase fluida), para ejercer su función enzimática.

P: Regulador positivo. Existe en dos formas, activa e inactiva. Se activa en presencia de C3b,Bb (C3b convertasa alterna) y estabiliza este complejo. También estabiliza a la C5 convertasa alterna, (C3b)n,Bb, (n>1)

4.1. Activación de la Ruta Alterna

Se desconoce el mecanismo exacto de generación de las primeras moléculas de C3b metaestables (enlace tioéster activado). Está claro que participan sólo las seis moléculas mencionadas. Los pasos más aceptados se ilustran en la figura 18-11.

Se distinguen cuatro etapas: Iniciación, Depósito de C3b, Reconocimiento y Amplificación.

a) **Iniciación.** En la Iniciación se generaría una forma de C3 alterado por hidrólisis de su enlace tioéster (sin proteólisis de la cadena alfa, como ocurre en la ruta clásica y en la ruta de las lectinas). Designaremos a este C3 como C3(H₂O). Se formaría muy lentamente en soluciones acuosas fisiológicas (0,005% del C3 disponible) o 50 - 100 ng/ml (cerca de la concentración de D). La concentración de C3 es 1 - 2 mg/ml en todas las especies vertebradas estudiadas.

En la ruta alterna, C3(H₂O), tendría todas las propiedades funcionales de C3b excepto que, por un período corto de tiempo, esta proteína sería resistente a la inactivación por H e I, dado que mantiene intacto el extremo amino terminal de su cadena alfa. C3(H₂O) forma un complejo con B nativo, en presencia de concentraciones fisiológicas de Mg²⁺. Esta propiedad aparece inmediatamente después de la hidrólisis del enlace tioéster.

El complejo C3(H₂O),B es activado por D formándose una C3 convertasa de fase fluida C3(H₂O), Bb. (Nótese que en esta enzima C3 no ha sido digerido proteolíticamente). Esta C3 convertasa de fase fluida es la primera enzima capaz de generar C3b metaestable. La enzima misma está confinada a la fase fluida (a diferencia de la ruta clásica y de las lectinas, donde la C3 convertasa, C4b, 2b, está confinada a la superficie de la célula atacada, unida covalentemente a través de C4b). El C3b metaestable generado puede difundir durante 60 μseg, hasta encontrar una superficie receptiva.

Nótese que la iniciación no necesita de partículas activantes, es espontánea, y estaría ocurriendo siempre. Se podría decir que la ruta alterna está siempre iniciada. Si continúa o no dependerá de la naturaleza de la superficie receptiva.

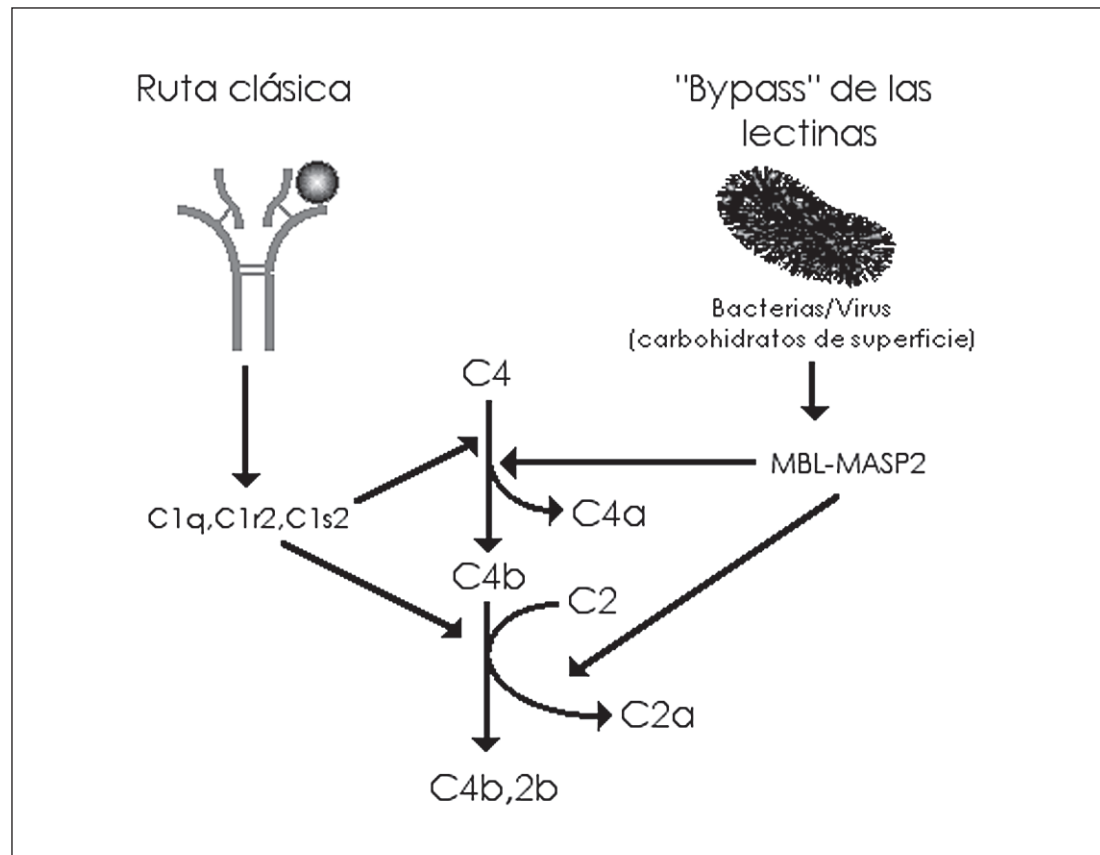


Figura 18-11. Activación de la Ruta Alterna. En este proceso se distinguen 4 etapas: Iniciación, Depósito de C3b, Reconocimiento y Amplificación.

b) Depósito de C3b. La habilidad del enlace tioéster del C3b metaestable para reaccionar con una amplia variedad de carbohidratos (grupos hidroxilos), proteínas (grupos aminos), capacita a esta ruta para depositar C3b sobre una amplia gama de microorganismos. Es muy posible entonces que el primer factor de resistencia del hospedero que encuentra un microorganismo invasor, es C3b, generado constantemente por C3(H₂O), Bb en fase fluida. C3b se unirá covalentemente a su superficie y lo hará apetecible para los fagocitos profesionales.

Una característica muy particular de la ruta alterna es que el depósito covalente de C3b parece continuo e indiscriminado tanto sobre las células del hospedador como sobre las de los organismos agresores. El hospedador resuelve este problema con moléculas reguladoras negativas que inactivan a C3b. Más adelante se verá cómo se resuelve este problema.

c) Reconocimiento. La discriminación entre

activadores y no activadores ocurre poco después del depósito inicial de C3b. Esta discriminación es el resultado de una capacidad diferencial de los factores reguladores para controlar el proceso de amplificación, dependiendo si se trata de una superficie activadora o no activadora. En general, C3b en fase fluida y C3b unido a superficies o membranas del hospedador (no activadores por definición) es rápidamente inactivado por H e I. En cambio, cuando C3b se une a partículas invasoras activantes, la C3 y C5 convertasas son protegidas de la destrucción mediada por las proteínas reguladoras de la fase fluida. Aparentemente, esto es determinado por la eficiencia con que el factor H pueda interactuar con el C3 unido a la superficie. Así, se ha determinado que C3b, unido a superficies activantes, no muestra afinidad por el factor H, mientras que su afinidad por el factor B y la properdina permanece inalterada. En otras palabras, la habilidad para distinguir entre superficies activadoras y no activadoras de la ruta alterna es un atributo de C3b o de H o de ambos y



este atributo es expresado o modulado por características bioquímicas de la superficie de la partícula.

Aún no está claro qué estructuras moleculares son reconocidas por la ruta alterna. Un aspecto común de todos los activadores es la presencia de carbohidratos, pero la gran variedad y complejidad de las estructuras glucosídicas hace difícil visualizar cuáles son los determinantes moleculares compartidos que son reconocidos. Un aspecto común a la mayoría de los activadores es la presencia de concentraciones muy bajas de ácido siálico. Es notorio el hecho que los glóbulos rojos de oveja, que activan muy mal la ruta alterna humana, se convierten en activadores eficientes si se elimina o modifica el ácido siálico de su superficie, por ej. con neuraminidasa. Es poco probable, sin embargo, que éste sea el único factor implicado. Es posible que el ácido siálico cumpla una función moduladora cuyo mecanismo no está definido.

d) Amplificación y Regulación La retroalimentación positiva, dependiente de C3b, es una característica exclusiva de la activación de la ruta alterna del complemento, o sea, la convertasa de C3 es capaz de generar muchas moléculas de C3b que tienen la capacidad potencial de generar nuevas convertasas de C3 y C5. Es importante señalar que D convierte B en Bb sólo cuando éste está unido a C3b. Este proceso es controlado por los factores H e I. Así, C3b depositado en una superficie activadora es relativamente resistente a la inactivación por H e I. Lo mismo ocurre con las convertasas de C3 que se generan sobre este tipo de superficie. Este balance entre amplificación y control permite a la ruta depositar C3b de la fase fluida al azar sobre partículas activantes y no activantes. Sin embargo, también le permite, amplificar sólo aquellas pocas moléculas que se han unido a superficies activantes.

La convertasa de C3 estabilizada, C3b, Bb, P, al actuar sobre C3, genera una gran cantidad de fragmentos C3b parte de los cuales, en presencia de Mg^{2+} , pueden combinarse con el factor B que se hace sensible a la acción de D. Se genera así la convertasa de C3 alterna que puede repetir el proceso.

En síntesis, el depósito de C3b sobre partículas activadoras tiene cuatro características importantes: a) Depende del tipo de partícula activante, b) Tiene un período de latencia, probablemente correspondiente a la etapa de reconoci-

miento, c) Aumenta exponencialmente, debido a la amplificación o retroalimentación y, d) Alcanza un plateau, correspondiente al agotamiento de componentes o de receptores de superficie.

La vida media de C3b,Bb (Mg^{2+}) es alrededor de 90 segundos. La presencia de concentraciones fisiológicas de H acelera la disociación del complejo, bajando la vida media a menos de 1 segundo.

4.2. Papel de la properdina

La properdina se une sólo a la convertasa de C3 o de C5 alterna que se encuentran unidas a membranas. Su participación comienza sólo después que se ha iniciado el proceso de amplificación. Así, C3b,Bb,P tiene una vida media dos logaritmos más larga que C3b,Bb. Este efecto condujo a algunos investigadores a creer que la ruta alterna no podía ser activada en ausencia de properdina.

5. FASE TERMINAL: GENERACIÓN DEL COMPLEJO DESTRUCTOR DE MEMBRANAS

En esta fase participan siete componentes del Sistema del Complemento (tabla 18-2).

El ensamblaje del MAC puede visualizarse en dos etapas: a) ensamblaje del complejo C5b-8 y b) polimerización de C9.

5.1. Generación de C5b-8

C5 no tiene enlace tioéster a pesar de tener homología de secuencia primaria con C4, C3 y alfa 2 M. Por lo tanto, no forma enlaces covalentes con membranas. El pilar C5b-8 se encuentra unido, por medio de C5b, a C3b de las convertasas de C5 clásica o alterna. A su vez, ese C3b se encuentra unido covalentemente a la superficie de la célula agresora.

Los componentes terminales del complemento son hidrofílicos en su estado no activado. Para expresar su función, consistente en destruir o alterar drásticamente las membranas externas de los organismos invasores, estos componentes deben sufrir una transición del estado hidrofílico o un estado anfífilico, para poder insertarse en la fase lipídica de las membranas. Esta transición es una característica que define a las proteínas terminales del complemento. Básicamente, implica una serie de interacciones proteína-proteína que



Tabla 18-2. Propiedades de las proteínas terminales del Complemento

Componente	Subunidades	Peso molecular (kDa)
C5	alfa	124
	(S-S) _n	
	beta	76
C6	1 cadena	120
C7	1 cadena	110
C8($\alpha\gamma$)	alfa	64
	(S-S) _n	
	gamma	22
C8(β)	beta	64
C9	1 cadena	73
S	1 cadena	80

S-S : Puente disulfuro.

se traducen en el ensamblaje de complejos macromoleculares heteropoliméricos que expresan simultáneamente dominios hidrofílicos e hidrofóbicos.

La activación proteolítica de C5 es realizada por cualquiera de las dos C5 convertasas. C5 se une a C3b de la C5 convertasa donde sufre modulación de sustrato y posterior acción proteolítica, ya sea por parte de las sub-unidades catalíticas C2b (clásica) o Bb (alterna). Como productos se libera C5a y el fragmento C5b permanece unido a la sub-unidad C3b de la C5 convertasa y modula a C6, para iniciar la formación de un pilar (formado por C5b a C8) sobre el cual se ordenará C9 para formar el túbulo. C5-C9 circulan preasociados laxamente, con características hidrofílicas.

C5b se une estequiométricamente con C6. El complejo C5b-6 permanece aún unido al C3b de la convertasa y modula a C7 produciéndose una transición irreversible de un complejo hidrofílico a un complejo anfifílico. Esta es la primera oportunidad en la activación del complemento en que se realiza la transición hidrofílica - anfifílica.

Considerando que C5b está unido al C3b de las convertasas, este complejo está muy próximo a la membrana por lo cual la inserción es muy eficiente y se acerca al 100%. Por otra parte, si la

superficie activante no es parte de una membrana fosfolipídica, como el caso de los complejos inmunes y las membranas de ciertos tipos de hongos, como el zimosan mismo, C5b-7 no tendrá dónde unirse y el complejo será liberado a la fase fluida. Este complejo es peligroso para el hospedador pues puede insertarse en membranas inocentes vecinas y generar el MAC. Esto es evitado por un conjunto de proteínas plasmáticas o inhibidores de C5b-7.

C8 se une al pilar heteropolimérico a través de su subunidad beta. C8 alfa-gama es necesario para iniciar la polimerización de C9. Por lo tanto, ambas unidades, la beta y la alfa-gamma son necesarias para que C8 exprese su función. Un defecto genético en cualquiera de los tres genes involucrados en la generación de las 3 cadenas de C8, resulta en la incapacidad de formar el MAC, con las consecuencias patológicas que corresponde (susceptibilidad aumentada a una serie de infecciones bacterianas). La porción alfa-gamma de C8 pasa a formar parte del dominio hidrofóbico del heteropolímero.

5.2. Polimerización de C9

C9 monomérico es hidrofílico, globular de 50-80Å de diámetro. Si se incubaba en forma pura a 37°C, en condiciones fisiológicas, se produce la



polimerización de aproximadamente 17 moléculas, generando un complejo tubular anfifílico (poli C9). La velocidad de polimerización es fuertemente aumentada *in vitro* si se incluye C5b-8.

Poli C9 tiene una estructura de 160\AA de largo, 100\AA de luz y está formado por 17 protómeros. Este túbulo tiene un dominio hidrofóbico localizado en la cara externa de uno de los extremos del homopolímero y un ensanchamiento en el otro extremo. El interior del túbulo parece ser hidrofílico. El diámetro de los túbulos en solución y el diámetro de las lesiones producidas por el complemento es similar, lo cual indica que esta estructura forma parte importante del MAC.

Si poli C9 es agregado a una suspensión de glóbulos rojos inducirá la lisis de éstos de manera similar a como lo hace el MAC. Esta lisis ocurrirá incluso si los glóbulos rojos y el poli C9 son de un mismo individuo. En condiciones fisiológicas. Esto no ocurre, pues el proceso de polimerización de C9 y su inserción a membranas biológicas requiere de la presencia tutelar de C5b-8, complejo que actúa como aceptor de C9.

La polimerización de C9 ocurre simultáneamente con el desplegamiento de los monómeros que, en su forma globular hidrofílica no activa, tienen un diámetro de 50\AA . Se genera así una forma alargada anfifílica de 160\AA de longitud.

El homopolímero tubular formado por C9 en solución es resistente a la disociación por SDS. La estabilidad del túbulo frente a SDS se explica por la generación de enlaces disulfuro entre los monómeros. Es probable que esta estabilidad bioquímica de poli C9 es un prerrequisito para que pueda cumplir su función citolítica en el MAC, resistiendo las defensas proteolíticas de las células atacadas.

En el MAC, el receptor de poli C9, esto es C5b-8, es detectado como un apéndice de 150\AA ubicado en la salida del túbulo. Este apéndice se disocia en presencia de SDS, mientras que la estructura tubular permanece intacta. La estructura tubular del MAC es diferente a la de poli-C9 ensamblado *in vitro*. El MAC está compuesto de una molécula de C6, una de C7, C8 alfa-gamma, C8 beta y 10-17 moléculas de C9. Se trata entonces de una estructura heteropolimérica. La figura 18-12 compara la estructura del MAC y de poli C9.

Es muy posible que C6, C7, C8 y C9 sean proteínas codificadas por genes duplicados pues muestran cierta homología de secuencia primaria y reactividad cruzada con algunos anticuerpos.

5.3. Efecto funcional de la inserción del MAC en las membranas

El MAC, insertado en la membrana, ocupa una área del $10.000 (\text{\AA})^2$. Si se insertan grandes números de este heteropolímero, por ej. sobre membranas bacterianas, la superficie total de la bacteria puede aumentar más de dos veces. Evidentemente, esta expansión dramática puede ser devastadora si consideramos sólo el efecto mecánico implicado. Si los atacados son glóbulos rojos, la inserción de sólo 800 MAC hará que estas células pierdan su forma bicóncava y adoptarán una forma esférica. Es muy posible que sólo el efecto mecánico de la inserción de los MACs provoque la muerte celular independientemente de otros efectos osmóticos o metabólicos que los canales puedan inducir. Entre estos otros efectos están:

1. Entrada de Ca^{2+} al ambiente intracelular con la activación indiscriminada de una variedad de rutas metabólicas.

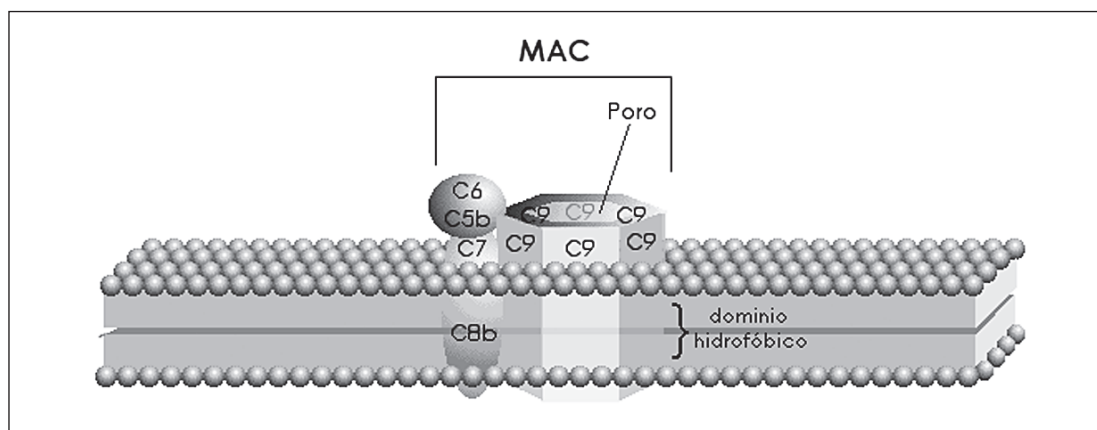


Figura 18-12. Complejo de ataque a membrana (MAC) comparado con poli C9.



2. Salida K^+ , entrada Na^+ . La célula activa una serie de mecanismos de bombeo compensatorio lo cual conduce a desembolso indiscriminado de ATP, con altos gastos de energía, sucesos que pueden acelerar la muerte celular.

Existen algunos tipos celulares que han desarrollado mecanismos de escape al ataque por MAC. Así, las bacterias *Neisseria gonorrhea*, *Salmonella minnesota*, ciertos tipos de *Escherichia coli*, y algunas líneas de células neoplásicas, activan el complemento, hasta la formación del MAC, pero, usando diferentes mecanismos, resisten la acción de este complejo.

5.4. Perspectivas futuras del estudio de la fase final de la activación del complemento

El descubrimiento de la polimerización de C9 como el mecanismo subyacente al daño de membranas biológicas mediado por el complemento hizo renacer el interés en el estudio de esta fase de la activación. Por otra parte, se ha descubierto que los linfocitos T citotóxicos y células NK pueden destruir células agresoras o extrañas, insertando en sus membranas proteínas citolíticas o perforinas. La perforinas polimerizan en el citoplasma de estas células en poliperforinas, en una manera muy similar a poli-C9. La reactividad inmunológica cruzada entre C9 y poliperforina, sugiere relaciones de homología entre los genes que los codifican.

Las imágenes al microscopio electrónico de lesiones producidas por células NK o células T citotóxicas y aquellas producidas por el complemento son muy similares.

Probablemente, los mecanismos moleculares de polimerización, cambios conformacionales, transición hidrofílica-anfifílica, inserción en membranas y formación de canales transmembranas, son similares para C9 y perforinas. Es muy probable entonces que C9 y las perforinas sean miembros de familias genéticamente relacionadas cuya función es la destrucción de las membranas de agentes invasores y, posiblemente, de células tumorales.

Evidentemente, existen diferencias importantes en las estrategias seguidas por las perforinas y por C9 para lograr la inserción del “misil” en las membranas extrañas, pero el resultado final sería el mismo: muerte celular. En el primer caso, el complejo macromolecular citotóxico es ensamblado intracelularmente para ser luego transferido a la célula blanco, que contacta a la célula citotóxica.

6. ALGUNOS ASPECTOS GENÉTICOS DEL COMPLEMENTO

C2, B y C4: Los genes que codifican C2, B y C4, sin excepción, se encuentran en el centro de los MHC de todas las especies vertebradas estudiadas. Son componentes especiales, porque participan en la formación de los 2 tipos de convertasas de C3 y de C5.

C3: El gen que codifica C3 se encuentra en el cromosoma 17 del ratón, a 13cM de la región D. En humanos se encuentra en el cromosoma 19, no ligado a HLA.

C4-bp, H, CR1 (CD35), CR2 (CD21), DAF (CD55), MCP (CD46): Constituyen un conjunto de proteínas reguladoras, que actúan ya sea en fase fluida (C4-bp, H o como moléculas integrales de membranas (CR1, CR2, DAF, MCP). Todas estas proteínas presentan propiedades estructurales similares y los genes que las codifican se encuentran ubicados en un solo cromosoma (1, en humanos y ratones). Con excepción de DAF, todos son cofactores de I, ya sea en fase fluida o en membranas, mediando así la degradación de moléculas de C3b o C4b que se hayan insertado accidentalmente en membranas propias o que hayan pasado a la fase fluida.

C8: Está formado por la asociación del producto de 3 genes. C8 alfa es codificado en el cromosoma humano 1 (se desconoce la ubicación del gen en el ratón). C8 beta es codificado en los cromosomas 1 y 4, mientras que C8 gamma es codificado en los cromosomas 9 y 2, en humanos y ratones, respectivamente. A nivel proteico, las cadenas alfa y gamma están unidas covalentemente, mientras que la cadena beta se asocia al dímero en forma no covalente. El dímero y el monómero se ubican en posiciones diferentes en el pilar molecular C5b – C9.

7. COMPLEMENTO Y ENFERMEDAD

El sistema del complemento ha evolucionado como un medio rápido para destruir agentes agresores, ya sea directamente lisándolos o, indirectamente, mediando la activación de células fagocíticas profesionales. El arte del sistema del complemento consiste en focalizar la acción lítica y opsonizante sobre membranas biológicas de agresores. Esta tarea no es trivial, considerando que las distancias entre membranas de células pro-



pías, “inocentes”, y células agresoras, “culpables”, son frecuentemente virtuales. Por lo tanto, el complemento puede, accidentalmente, mediar daño a tejidos propios.

Durante la activación del sistema se generan una serie de fragmentos flogísticos que en situaciones particulares pueden mediar inflamaciones severas.

Más conocidas son las consecuencias patológicas de las deficiencias en componentes del sistema. Así, las deficiencias de C3, genética o derivada de la acción de proteínas reguladoras, conduce a problemas de opsonización, que se manifiestan en susceptibilidad aumentada a una serie de infecciones. Las deficiencias parciales de MBL conducen a infecciones piogénicas que afectan principalmente a niños que ya han perdido la inmunidad pasiva materna. Las deficiencias asociadas con componentes del MAC se asocian con infecciones principalmente con *Neisseria*.

Deficiencias de C1q, C1r, C1s, C4 y C2: Se asocian con enfermedades tipo lupus eritematoso sistémico (SLE). La patogenia de estas enfermedades estaría asociada con la capacidad del complemento para solubilizar complejos inmunes.

La deficiencia del inhibidor de C1r y C1s (C1-INH) conduce a una activación descontrolada de las serino proteasas, lo que conduce a angioedema hereditario, enfermedad que afecta principalmente a mujeres.

Finalmente, la interacción de MBL con IgA polimérica podría explicar el depósito de proteínas del complemento en nefropatías mediada por IgA.

Morgan, B.P. and Harris, C.L., **Complement Regulatory Proteins**, Academic Press, N.Y, USA, 1999.

Morley, B.J. and Walport, M.J., **The Complement Facts Book**, Academic Press San Diego, USA, 2000.

Reid, K., “The Complement System a Major Effector Mechanism in Humoral Immunity”, *The Immunologist*, 3: 206-209, 1995.

Ross, G., **Immunobiology of the Complement System. An Introduction for Research and Clinical Medicine**, Academic Press, INC, 1986.

LECTURAS SUGERIDAS

Abbas, AK.; Lichtman, AH.; Pober J.S., **Cellular and Molecular Immunology**, Fourth Edition. W.B. Saunder Company. Pennsylvania, USA, 2000.

Janeway, Ch.A.; Travers, P.; Walport, M. and Shlomchik, M., **Immunobiology**, Fifth Edition, Garland Publishing, NY, USA, 2001.

Male, D.; Cooke A.; Owen, M.; Trowsdale, J. and Champion, B., “Complement”, *Advanced Immunology*, MOSBY, New York, USA, 1996.



Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 19

INMUNIDAD MEDIADA POR CÉLULAS

Luz Blanco P. y Javier Puente P.

-
- 1. Introducción**
 - 2. Citolisis mediada por linfocitos T**
 - 2.1. Mecanismo membranolítico
 - 2.2. Mecanismo dependiente de la interacción FasL-Fas
 - 3. Citolisis mediada por células NK**
 - 3.1. Citotoxicidad mediada por células NK
 - 3.2. Receptor FcγRIIIA (CD16)
 - 4. Métodos de estudio del proceso citolítico**
 - 5. Hipersensibilidad retardada (HR)**





RESUMEN

Los principales linfocitos citotóxicos son los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (LTc) pertenecientes a la respuesta inmunológica específica y las células NK, pertenecientes a la respuesta inmunológica innata. Los primeros, como una característica general de los LT, basan su especificidad en el reconocimiento del antígeno a través del TCR; las células NK, que son TCR⁻, poseen una amplia variedad de receptores de activación y de receptores de inhibición de la citotoxicidad para interactuar con la célula blanco, lo que apoya su falta de especificidad. Uno de los receptores de las células NK es el receptor para la porción Fc de las IgG (FcγRIII o CD16), el cual permite explicar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC). El mecanismo de citolisis es muy similar en ambos casos e implica las siguientes etapas: reconocimiento y unión de la célula sensible o célula blanco; activación de la célula citotóxica: transducción de señales y reorientación de los elementos del citoesqueleto hacia la zona de contacto con la célula blanco; secreción de los componentes de los gránulos, perforina y granzimas (enzimas proteolíticas de los gránulos) que van a provocar daño a la membrana de la célula blanco (mecanismo membranólítico) y además los componentes de los gránulos pueden ingresar a la célula blanco y activar el mecanismo de muerte celular programada o apoptosis de la célula blanco. La interacción FasL - Fas inicia el proceso de apoptosis que se caracteriza por la activación de enzimas proteolíticas (caspasas) y la posterior fragmentación del DNA. Ambos mecanismos participan simultáneamente en los linfocitos citotóxicos granulares, en cambio los linfocitos agranulares y otros subtipos minoritarios de LT, producirían lisis solamente a través del mecanismo de apoptosis. Finalmente, ocurre la lisis de la célula blanco y la apoptosis o el reciclamiento de la célula efectora, la cual puede transformarse en una célula de memoria en el caso de los LTc. Los monocito/macrófagos activados pueden ejercer la destrucción de microorganismos por fagocitosis y de células eucarióticas por citotoxicidad. Un mecanismo que refleja muy bien estas acciones es el de hipersensibilidad retardada, en el cual se logra la activación de los macrófagos a través de las citoquinas producidas por los LT CD4⁺ y CD8⁺ post contacto con la célula presentadora del antígeno, iniciándose un complejo proceso que culmina con la activación de los macrófagos.

1. INTRODUCCIÓN

La citotoxicidad mediada por células la ejercen principalmente los linfocitos T citotóxicos (LTc) y las células “natural killer” (NK) o agresoras naturales. Si bien ambos tipos celulares poseen una serie de propiedades comunes, existen importantes diferencias. Sólo las células NK, que forman parte de la inmunidad innata, poseen citotoxicidad espontánea y expresan constitutivamente las moléculas citotóxicas determinantes del proceso lítico; en cambio, las células T constituyentes de la inmunidad adquirida, requieren del proceso de selección por el antígeno y no expresan en reposo los genes de las moléculas citotóxicas; es decir, en este caso corresponden a genes inducibles. Las células sensibles a su acción o células blanco son fundamentalmente: cé-

lulas tumorales, células transformadas por virus, células infectadas con bacterias patógenas intracelulares; y además, también lisan bacterias y parásitos libres. La unión entre los linfocitos citotóxicos y las células blanco resulta en una interacción característica que culmina con la lisis de la célula blanco, proceso que será analizado en el presente capítulo.

La primera etapa del proceso citolítico es la **etapa de unión** entre la célula citotóxica y la célula blanco. La unión en el caso de los LTc, implica el reconocimiento del antígeno asociado al Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) de la célula blanco por el receptor T (TCR) y además participan numerosas moléculas de adhesión de la superficie de las células en contacto. En el caso de las células NK, células altamente heterogéneas, pueden participar en la interacción



con la célula blanco una gran variedad de receptores de activación e inhibición de la citotoxicidad y moléculas de adhesión; uno de éstos es el receptor para la porción Fc de las inmunoglobulinas G: FcγRIII (CD16), responsable de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC). Las células NK también son capaces de reconocer las moléculas MHC en la célula blanco, a través de receptores específicos, tanto de inhibición (en la mayoría de los casos) que genera una señal inhibitoria de la actividad lítica como también de activación de la citotoxicidad.

La etapa siguiente denominada **etapa de activación**, implica cambios importantes en ambos tipos celulares, en los linfocitos citotóxicos se inicia este proceso a través de la transducción de señales (ver capítulo 10); reordenamiento de los elementos del citoesqueleto y finalmente cambios en la expresión génica y cambios morfológicos. Esta unión conducente a la activación de los linfocitos citotóxicos, es también determinante para la célula blanco, pues genera en éstas la señal letal que marca el punto irreversible conducente a su muerte. Esta señal letal puede ocurrir por dos mecanismos: (a) La interacción de las moléculas de la superficie celular ligando de Fas o FasL y Fas ("FasL - Fas), puede iniciar el fenómeno de muerte celular programada o apoptosis de la célula blanco, el cual se caracteriza por la fragmentación inicial del DNA; FasL es inducido en las células citotóxicas post-contacto con la célula blanco. (b) A través de la secreción de componentes citotóxicos de los gránulos, constituidos por proteínas formadoras de poro (PFP o perforina) y enzimas proteolíticas, denominadas en general granzimas. Estos componentes provocan daño en la membrana de la célula blanco lo que culminará con la lisis celular (mecanismo membranolítico). Bajo estas circunstancias, las perforinas, granzimas y otros componentes de los gránulos pueden ingresar a la célula blanco y activar la vía de la apoptosis. Además, tanto los LTc como las células NK producen y secretan una serie de citoquinas que pueden participar directamente en el proceso lítico o bien, estimular a otras células del sistema inmune. Es importante señalar que la muerte de la célula blanco ocurre generalmente a través de mecanismos mixtos, membranolítico y mediado por la interacción FasL-Fas; sin embargo, existen subpoblaciones minoritarias de LTc y células NK sin gránulos en su citosol, capaces de provocar citólisis aparentemente mediada sólo por apoptosis. La **etapa de lisis** propiamente tal, es

independiente de la célula efectora, las que pueden reciclarse e iniciar nuevamente el proceso o quedar como una célula de memoria en el caso de los LTc. También, estas células efectoras activadas pueden sufrir apoptosis inducida por el contacto con la célula blanco y post-activación, proceso que experimentan tanto los LTc como las células NK. Por su parte, la célula blanco queda bajo la acción de los mecanismos intracelulares que gobiernan la apoptosis y bajo la acción lítica de las moléculas citotóxicas que culminarán con su muerte.

Finalmente, en este capítulo se analiza la acción efectora de los macrófagos en un tipo especial de hipersensibilidad, denominada **hipersensibilidad retardada** en que la interacción de células presentadoras de antígeno (CPA) con linfocitos T CD4 (Th1) provoca la generación de citoquinas y otros mediadores endógenos que permitirán la migración y activación de los macrófagos y otros leucocitos en una reacción localizada.

2. CITOLISIS MEDIADA POR LINFOCITOS T

El establecimiento de una respuesta inmune requiere la interacción concertada de linfocitos T y B activados por sus respectivos antígenos. El reconocimiento del antígeno específico por los receptores B o T de los linfocitos maduros, conduce a su proliferación y por lo tanto, a la expansión clonal. Parte de la población de linfocitos que ha reconocido a su respectivo antígeno se diferencia en células hiperreactivas al antígeno y de larga duración, denominadas células de memoria. Dentro de las células T existen diferentes subtipos, por lo que pueden ocurrir diferentes respuestas efectoras: tales como la producción de citoquinas a través de los linfocitos CD4⁺ o la generación de una actividad citotóxica, predominantemente mediada por los linfocitos T CD8⁺ (LTc). Estas células citotóxicas se encargan de lisar selectivamente células del individuo infectadas o transformadas por mecanismos citotóxicos dependientes del contacto célula-célula. Por lo tanto, la acción principal defensiva de las células citotóxicas es complementar la acción de los anticuerpos encargados fundamentalmente de reconocer antígenos foráneos en el organismo y activar mecanismos efectores para su destrucción.

Los LTc se caracterizan por el siguiente fenotipo básico: TCR⁺, CD3⁺, CD8⁺; en algunos casos pueden ser también CD4⁺. Algunos son pequeños agranulares, otros grandes y granulares,



lo que explica la existencia de los diversos mecanismos citolíticos. Originalmente se pensaba que la interacción del LTc con la célula blanco ocurría únicamente entre el complejo TCR-CD3 con el péptido presentado en conjunto con las moléculas de MHC clase I o II; sin embargo, la fuerza de esta interacción es muy débil y son numerosas las moléculas adicionales cuya participación es necesaria, tales como: CD2, CD8, CD28 y LFA-1 y en la célula blanco, B7, CD22, ICAM-1 o 2 y LFA-3. Entre las principales moléculas inducidas post-contacto con las células blanco se encuentra la proteína de superficie celular FasL, conocida también como Apo1L y CD95L. La contribución de estas moléculas no está limitada solamente a la unión intercelular, sino que también pueden generar señales coestimuladoras para los LTc que complementan la señal iniciada por la interacción entre los complejos TCR-CD3 y MHC-péptido. En esta etapa los LT interactúan con su célula presentadora o célula blanco, formando una estructura física y funcional importante o “sinapsis inmunológica”, la que permite una unión óptima entre los receptores y sus respectivos ligandos, y la liberación de los mediadores en forma localizada.

Como ya se ha analizado previamente, los LTc requieren presentación del antígeno, generalmente un péptido proveniente del medio intracelular unido al MHC tipo I (ver capítulo 9). En nuestro organismo existen alrededor de 10^{13} células nucleadas y sólo unos cientos de LTc vírgenes. Luego, es prácticamente imposible que cada LTc esté permanente vigilando esta enorme cantidad de células en búsqueda del antígeno contra el cual está predeterminado. De hecho, raramente se encuentran circulando LTc en los tejidos periféricos. Recientemente, se ha caracterizado a la célula capaz de realizar la vigilancia inmunológica en la periferia y de transportar a los órganos linfoides los antígenos desde ubicaciones distantes en el organismo. Esta es una célula presentadora derivada de la médula ósea, que internaliza proteínas foráneas (derivadas de virus o patógenos intracelulares) o directamente fagocita a las células infectadas, transformadas o los restos celulares y luego migra al órgano linfóide para presentar los antígenos así adquiridos; aún no está definido molecularmente cómo esta célula logra presentar antígenos exógenos en el contexto de moléculas MHC clase I, teóricamente destinado exclusivamente a la presentación de antígenos endógenos. En estudios realizados *in vitro* se ha demostrado que tanto macrófagos como células

dendríticas son capaces de presentar antígenos exógenos en el contexto de moléculas MHC clase I, por lo cual estas células son los principales candidatos para realizar la labor de “muestreo antigénico permanente”.

Las células T CD8⁺ que han reconocido a su antígeno se encuentran capacitadas para lisar a las células blanco y esta función efectora debe ser ejercida para que se generen LTc de memoria. La interacción de LTc con la célula blanco es fuertemente dependiente de Mg^{2+} , este requerimiento reside principalmente en la unión LFA-1 - ICAM-1; Ca^{2+} no puede reemplazar al Mg^{2+} aunque presenta un comportamiento sinérgico a concentraciones sub-óptimas de este último.

La figura 19-1 esquematiza el proceso citolítico general: (a) unión a la célula blanco (conjugación); (b) activación de la célula efectora (reconocimiento/transducción de señales); (c) generación de la señal letal en la célula blanco, que abarca a los mecanismos de muerte celular por mecanismos: membranolítico (exocitosis de gránulos) y/o a través de la interacción FasL – Fas que induce la muerte celular programada o apoptosis de la célula blanco y (d) separación y reciclamiento de la célula efectora y lisis propiamente tal de la célula blanco.

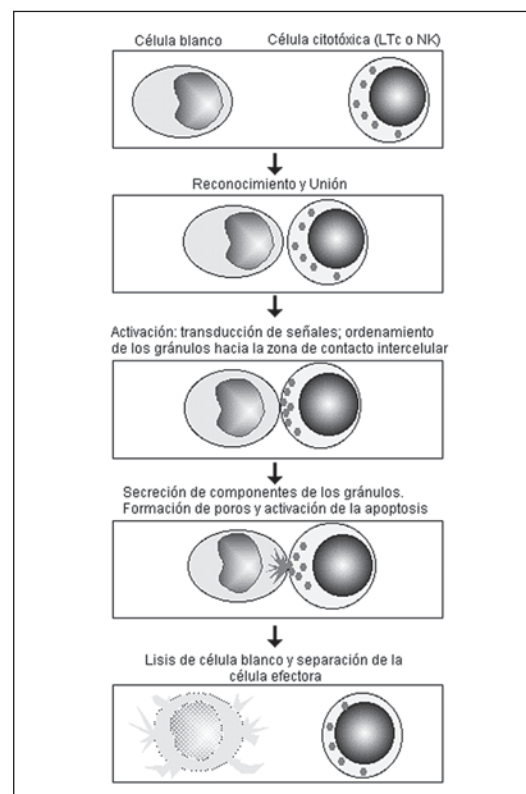


Figura 19-1. Diagrama representativo de las principales etapas de la citotoxicidad mediada por células T y NK.



En el programa de transducción de señales, durante la activación de los LT (ver capítulo 10) ocurren básicamente una serie de eventos de fosforilación/desfosforilación de proteínas, mediados por proteína quinasas PK y/o fosfatasas, la generación de segundos mensajeros inositol trifosfato (IP_3), diacilglicerol (DAG) y Ca^{2+} como señales positivas y otras mediadas ya sea por fosfatasas encargadas de la desfosforilación de las proteínas activadas (por fosforilación) o por mediadores que desarrollen su acción a través de AMP-cíclico, actúan como señales negativas. Este programa también ocurre en los LTc, por lo cual es conveniente tenerlo presente en el análisis del proceso de citotoxicidad. De particular importancia, es la participación de las isoenzimas de la PK-C en el proceso de exocitosis de los gránulos; este tipo de enzimas es estimulado por DAG y Ca^{2+} , y el proceso de exocitosis es imitado por ésteres de forbol e ionóforos de calcio. Los inhibidores de proteínas tirosina kinasas y de proteína kinasa C,

inhiben el proceso citolítico. Además, en general, aquellos mediadores endógenos (hormonas, neurotransmisores) o exógenos (fármacos) que actúan a través de influjos de Ca^{2+} , en los linfocitos citotóxicos estimulan la citotoxicidad y aquellos que producen aumento de AMPc se comportan como inhibidores.

Estudios realizados principalmente *in vitro* han demostrado que los LTc pueden quedar en un estado anérgico o tolerante al reconocer a su antígeno en ausencia de las moléculas coestimuladoras o cuando reconocen a un antígeno modificado respecto del original (con ciertos aminoácidos cambiados respecto del péptido antigénico).

La señal letal en la célula blanco, definida como el punto a partir del cual la célula blanco queda irreversiblemente programada para la lisis, se puede generar en base a cualquiera de los dos mecanismos: membranolítico o dependiente de la interacción FasL – Fas apoptótico, (figura 19-2)

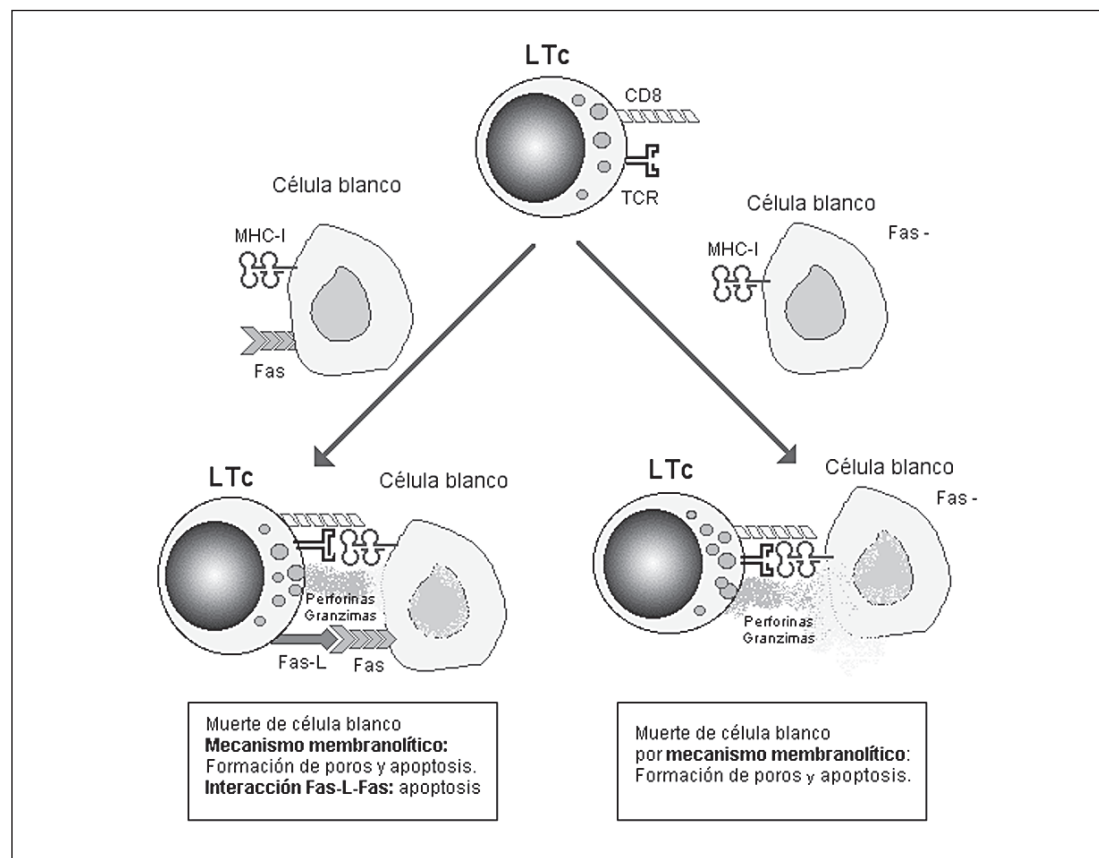


Figura 19-2. Representación esquemática de la citotoxicidad de los LTc $CD8^+$, frente a células blanco (CPA) Fas^+ y Fas^- . En el primer caso ocurren simultáneamente los dos mecanismos de citolisis: membranolítico e interacción FasL-Fas; FasL es inducido postcontacto con la CPA. En este tipo de lisis hay formación de poros y apoptosis. En el caso de células Fas^- , solamente ocurre el mecanismo membranolítico. En algunos casos ocurre sólo la interacción FasL – Fas: LT agranulares y otros sub-tipos minoritarios de LT, el mecanismo de lisis está basado solamente en esta interacción.



los que serán analizados en detalle a continuación:

2.1. Mecanismo membranolítico

Como su nombre lo indica, el mecanismo membranolítico implica la secreción, por parte de los LTc de diversos componentes contenidos en los gránulos (ej: perforina, granzimas y proteoglicanos) los que participan en la destrucción de la membrana celular y por tanto de la célula blanco. Un evento importante y previo a la secreción, es el reordenamiento de los elementos del citoesqueleto hacia la zona de contacto. Este reordenamiento ocurre únicamente en la célula efectora (en este caso LTc), no en la célula blanco favoreciendo la fusión de los gránulos con la membrana para la liberación de su contenido al exterior. Muy rápidamente, luego de la unión con la célula blanco, el centro organizador de microtúbulos (MTOC) de la célula efectora se orienta hacia la zona de contacto; es por esto que los agentes perturbadores de los microtúbulos son potentes inhibidores de la citolisis, enfatizando la importancia de esta etapa. La secreción de los gránulos, como ya se mencionó, es un proceso dependiente de Ca^{2+} .

La **perforina** o **proteína formadora de poro (PFP)**, inicialmente también denominada citolisina, se encuentra en los gránulos de secreción, es la principal proteína citotóxica y por lo tanto la candidata esencial para explicar la citotoxicidad mediada por los linfocitos. Es una proteína inducible en los LT, que se expresa con su función citotóxica a las 18-30 horas post-inducción; es decir, luego de la activación del TCR o bien por acción de citoquinas, tales como IL-2 o IL-7. La perforina (65 kDa) presenta homología estructural con los componentes C6-C9 del complemento. La PFP es secretada al medio intercelular donde se une a la membrana plasmática de la célula blanco y polimeriza a poliperforina, proceso que también depende de Ca^{2+} . La PFP se une a fosfolípidos de la membrana, especialmente a residuos de fosforil-colina. De esta forma, se generan lesiones similares a las observadas por acción del complemento, pero en este caso mediadas por un solo tipo de proteína. De hecho, la PFP en presencia de Ca^{2+} puede lisar directamente una gran variedad de células nucleadas, eritrocitos y vesículas lipídicas; sin embargo, también hay células resistentes a su acción. Recientemente, se ha descrito una enfermedad genética muy poco frecuente y fatal en humanos, denomi-

nada Linfohistiocitosis hemofagocítica en la cual se encuentra mutado el gen que codifica para perforina o PFP. Estos pacientes tienen descontrolada su respuesta inmune predominando los LTc y macrófagos activados y también altas concentraciones de IFN- γ y TNF- α en la sangre. En base a estos antecedentes, se ha propuesto una función adicional para esta proteína la cual sería esencial para el control de la respuesta inmune ya que permitiría la eliminación de las células activadas y/o de las células presentadoras de antígeno.

Las **granzimas** (enzimas de los gránulos) son también importantes en el proceso de lisis de la célula blanco. La mayor parte de éstas (más del 90% de las proteínas de los gránulos) presentan actividad de serina-proteasa y pueden ser divididas en dos grupos: granzimas B, C, D, E, F y G que son altamente homólogas entre sí (aproximadamente 60-90%) y granzima A que está menos relacionada (aproximadamente 54-62%). Si bien su actividad proteolítica las ajusta muy bien a la acción citotóxica de los LT, también se encuentran en los linfocitos CD4^+ no citotóxicos, por lo cual podrían tener otras funciones como por ejemplo la separación de la célula blanco de la célula efectora, permitiendo el reciclaje de esta última. A través del estudio acucioso de los poros formados por poliperforina, se pudo demostrar el paso de granzimas, especialmente de la granzima B, hacia la célula blanco y de esta forma pueden activar a las enzimas proteolíticas cisteína proteasas o caspasas que inician la cascada de reacciones bioquímicas conducentes a la apoptosis de la célula blanco. Se ha demostrado además, que la granzima B ingresa a la célula blanco a través de la interacción con receptores y una posterior endocitosis; es decir, por un mecanismo independiente de la formación de poros. En estas condiciones también puede iniciar la cascada de activación de las caspasas. Otros constituyentes de los gránulos son enzimas hidrolíticas como fosfatasa ácida, catepsina D y L-glucosidasa, las que también pueden activar la apoptosis de la célula blanco. Recientemente se ha descrito un nuevo componente de los gránulos, la proteína granulisina que tiene una muy limitada actividad lítica sobre diversas células. Pertenecen a las proteínas que unen lípidos activando a enzimas que degradan lípidos como glucosilceramidasa, con lo cual aumenta la concentración de ceramidas; las ceramidas son también activadoras de la cascada de caspasas. Mediante microscopía electrónica se ha demostrado que la



granulinsina provoca daño a la pared de bacterias tanto libres como intracelulares que infectan a células. Esta importante observación sugiere un nuevo papel a los LTc que les permite actuar directamente en la destrucción de patógenos libres e intracelulares. El mecanismo de acción de esta proteína es la separación de la membrana externa del citoplasma, con la consiguiente acumulación de líquido en el citoplasma, alteración de la permeabilidad de la membrana conducente a la lisis osmótica de la bacteria.

Los LTc sintetizan y almacenan en sus gránulos **proteoglicanos**, mayoritariamente condroitinsulfato A; estos compuestos también son secretados en el proceso citolítico y se les atribuye un papel protector de la célula efectora contra las moléculas citotóxicas, ya que los LTc no son destruidos en el proceso lítico. Además, al pH de los gránulos, estos proteoglicanos se unen a la PFP y granzimas evitando la degradación o inactivación de estos componentes mientras se encuentran almacenados.

Para explicar la citotoxicidad mediada por los linfocitos, se han postulado diversos mecanismos efectores alternativos, no necesariamente excluyentes entre sí. Los LTc activados también secretan una gran variedad de citoquinas, tales como: TNF α y β (linfotóxina) e IFN- γ . *In vitro* TNF- β presenta actividad citotóxica frente a una amplia variedad de células, aún cuando no se ha demostrado su participación directa en la acción de los LTc. Finalmente, también se ha postulado un papel citotóxico a la molécula de ATP; este nucleótido es efectivamente secretado al medio intercelular por los LTc activados y a través de receptores purinérgicos en la célula blanco gatilla la lisis y defragmentación del DNA en distintos tipos celulares. Los LTc son resistentes a esta acción aparentemente gracias a la presencia de una activa ecto-ATPasa.

El mecanismo membranólítico entonces implica la participación combinada de diversos agentes citotóxicos que permiten explicar el daño en la célula blanco: muerte celular por la lisis osmótica y por apoptosis.

2.2. Mecanismo dependiente de la interacción FasL-Fas

Los CTL agranulares y también los granulares presentan la posibilidad de lisar directamente a la célula blanco a partir solamente de la interacción de receptores y ligandos. Se ha demos-

trado que el bloqueo de la expresión de PFP no impide la activación ni la proliferación de las células T y además, en cepas de ratones deficientes en PFP se ha demostrado la existencia de un mecanismo citotóxico totalmente independiente de PFP. Esta actividad citotóxica ocurre a través de la interacción de FasL, presente en las células efectoras activadas, y el receptor Fas (Apo1, CD95) presente en las células blanco. El receptor Fas es una glicoproteína de 35 kDa, perteneciente a la superfamilia de receptores para TNF; se encuentra expresado en linfocitos maduros, en linfocitos transformados por infección viral (HTLV-1, HIV, EBV) y en diversos tejidos no linfoides. Los anticuerpos anti-Fas pueden inducir el proceso de apoptosis en las células que poseen estas moléculas; por lo que el conjunto de la información existente permite sugerir una directa correlación entre la presencia de Fas en la célula blanco y su probabilidad de sufrir apoptosis. La molécula FasL es una proteína transmembrana de 40 kDa, que aparece en los linfocitos activados; puede ser también liberada de la membrana por acción de una metaloproteínasa y de esta forma transformarse en CD95L soluble que actúa como una molécula efectora citotóxica.

La interacción LTc con la CPA respectiva, provoca la inducción de FasL en los primeros; si la CPA es Fas⁺ se producirá la interacción que inicia la cascada de activación de caspasas. El receptor Fas se encuentra asociado a la proteína adaptadora FADD (proteína con dominio de muerte asociada a Fas) y con la aspartil-proteasa, enzima convertidora de interleuquina-1- β (ICE), que es la enzima iniciadora de la cascada de activación de las cisteína proteasas o caspasas (cisteína-aspartasas) vía que permite la activación de nucleasas con el consiguiente daño al DNA y muerte celular por apoptosis. Algunas de las enzimas de esta vía participan también en otros procesos fisiológicos tales como la activación de citoquinas pro-inflamatorias. Las caspasas se encuentran como pro-enzimas, las que una vez activadas, por proteólisis limitada, pueden propagar esta acción mediante su actividad proteolítica sobre residuos específicos de ácido aspártico. La inducción del proceso de apoptosis provoca una elevación pre-lítica del Ca²⁺ intracelular lo que favorece la acción de las enzimas encargadas del desenrollamiento y fragmentación del DNA (topoisomerasas y endonucleasas) que son dependientes de Ca²⁺. En suma la apoptosis de la célula blanco se caracteriza por la condensación de la



cromatina, la formación de estructuras tipo burbuja en la membrana plasmática y la fragmentación del DNA. Posteriormente, ocurre estrechamiento celular, dilatación del retículo endoplásmico y finalmente fragmentación celular con la formación de fragmentos membranosos sellados denominados “cuerpos apoptóticos”, los cuales son eficientemente removidos por fagocitosis evitando de este modo la generación de una respuesta inflamatoria. Los LT activados que expresan simultáneamente Fas y FasL, pueden interactuar entre sí y autodestruirse, proceso que permite la disminución de la respuesta inmunológica. Como ya se ha mencionado, la apoptosis de la célula blanco puede ser inducida también por acción de la perforina y de algunas de las granzimas del mecanismo membranolítico. La tabla 19-1 resume las principales características de los LTc CD8⁺.

Los mecanismos efectores utilizados por los LTc CD8⁺ son también empleados por otras células del sistema inmunológico. Tanto las células NK, como algunos linfocitos T CD4⁺, expresan o pueden expresar luego de ser activados; perforina, granzimas y FasL, y por lo tanto ejercer funciones citotóxicas. En base a mutaciones de cada una de estas vías mediadoras de la lisis se ha comprobado que en el ratón, los LTc CD8⁺ ejercen citotoxicidad principalmente por exocitosis de los gránulos, mientras que los LTc CD4⁺, la ejercen principalmente por la interacción FasL – Fas. Un sub-tipo minoritario de LT, descritos principalmente en el ratón, se caracteriza por un fenotipo CD4⁺ o CD4⁻, CD8⁻ doble negativo (DN) y NK1.1+ marcador de células NK murinas, por lo que se han denominado linfocitos NKT. Este tipo de LT, que también se ha identificado en los seres humanos, expresa un TCR constituido por un restringi-

Tabla 19-1. Propiedades generales de las células citotóxicas

Linfocitos T citotóxicos

- **Receptores y co-receptores que interactúan con la célula blanco¹.**
 - TCR, CD8, CD28, CD95L²
- **Función citotóxica**
 - Mecanismo membranolítico: Muerte celular por lisis osmótica y apoptosis
 - Interacción FasL – Fas (CD95L – CD95): Muerte celular por apoptosis.

Células NK

- **Receptores y co-receptores que interactúan con la célula blanco**
 - Receptores de activación
NKp46, NKp44, NKp30, NKG2C/D, CD2, CD16, CD28, CD44, 2B4, CD95L²
 - Receptores de inhibición³
Superfamilia del tipo lectina C: NKG2A/B; Superfamilia inmunoglobulinas: KIR 2-DL1 (p58.1), KIR2-DL2/3 (P58.2); KIR 3-DL1 (p70). LIR-1.
- **Función citotóxica : Citotoxicidad natural y ADCC.**
 - Mecanismo membranolítico: Muerte celular por lisis osmótica y apoptosis
 - Interacción FasL – Fas (CD95L – CD95): Muerte celular por apoptosis.

¹ Se incluyen los receptores y co-receptores más representativos de la función citotóxica.
² CD95L es inducido post-contacto con la célula blanco.
³ Algunas sub-poblaciones de LT CD8⁺ también expresan receptores de inhibición de las familias de proteínas señaladas, actuando como inhibidores de la citotoxicidad y de la secreción de citoquinas. CD: Antígenos de grupo de diferenciación. KIR: Receptor de citotoxicidad del tipo inmunoglobulinas; LIR: receptor similar a inmunoglobulinas.



do conjunto de cadenas β y una cadena α invariante; reconocen a la molécula CD1 de la CPA, que son similares a las moléculas MHC-I, pero se encuentran localizadas en el genoma fuera de la región que codifica para las moléculas MHC-I. La molécula CD1 presenta componentes lipídicos bacterianos a las células NKT. Los linfocitos NKT están capacitados para expresar FasL y en respuesta a la IL-12 producen perforina y adquieren funciones citotóxicas frente a células tumorales.

La expresión constitutiva de FasL por algunos tipos celulares ha permitido explicar, al menos parcialmente, la existencia de áreas inmunológicas privilegiadas, definidas como aquellas áreas en que una alteración aun muy menor, puede provocar un daño irreversible. Tal es el caso del ojo, las células del parénquima y testículo, las células de Sertoli, ambos tipos celulares expresan FasL en forma constitutiva, lo que les permite eliminar células T y células tumorales que expresen Fas. En estas áreas se ha observado también un menor rechazo a los trasplantes de tejido.

Los LTc que han reconocido y destruido a una célula blanco pueden diferenciarse a células de memoria adquiriendo una hiper-reactividad contra el antígeno reconocido y pueden durar meses o años localizadas en los órganos linfoides secundarios, o pueden sufrir el proceso de apoptosis post-activación. Las señales que determinan el destino de estos LTc aún no están claramente definidas, pero en base a recientes estudios con ratones transgénicos se ha postulado la participación de PFP en el control de la expansión de los LTc y de IFN- γ en la regulación de la inmunodominancia y la fase de muerte de los LTc. Sin duda, en el desarrollo de vectores adecuados para vacunas que requieran la inducción de inmunidad celular es importante considerar que para obtener LTc de memoria deben cumplirse todas las etapas previamente descritas, es decir no basta con la sola presentación del antígeno, sino además se requiere que los LTc hayan desplegado su capacidad citotóxica en respuesta al antígeno reconocido.

3. CITOLISIS MEDIADA POR CÉLULAS NK

Las células NK, pertenecientes al sistema inmunológico innato, son una tercera población muy heterogénea de linfocitos, que se puede diferenciar de los linfocitos B, T y células

mielomonocíticas en base a su origen, fenotipo y funcionalidad. Proviene de la médula ósea y se encuentran en la sangre y tejidos linfáticos, especialmente el bazo. Una de las funciones más característica de las células NK es la citolisis ejercida sobre una gran variedad de células: células tumorales, células transformadas por virus, células infectadas por bacterias intracelulares y diversos microorganismos tales como bacterias, hongos y parásitos. Una segunda característica importante es la secreción de citoquinas, especialmente IFN- γ . Morfológicamente las células NK corresponden a linfocitos granulares grandes y su fenotipo más aceptado es: CD3⁺, TCR⁻, CD2⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD56⁺. Existen también subpoblaciones minoritarias agranulares. Las células NK pueden activarse a través del contacto con células sensibles o células blanco o por la acción de mediadores solubles, principalmente citoquinas.

La acción citolítica mediada por estas células, es mayoritariamente espontánea, es decir no requiere activación previa y no está restringida a la presencia del Complejo Principal de Histo-compatibilidad. Este concepto actualmente ha cambiado pues se ha descrito una gran variedad de receptores que reconocen a los complejos MHC clase I de la célula blanco pero este reconocimiento, a diferencia de lo que ocurre con los LTc, en las células NK genera principalmente una señal negativa, inhibiéndose la lisis de la célula blanco. Existe una amplia variedad de receptores de inhibición y de receptores de activación de la citotoxicidad; algunos de ellos tienen como ligandos moléculas de MHC-I. Una de las principales diferencias entre las células NK y los LTc radica en que la capacidad efectora de estos últimos depende finalmente del receptor TCR, en cambio, en el caso de las células NK, existe una variedad de receptores en la misma célula, algunos capaces de activar y otros capaces de inhibir su programa citolítico.

3.1. Citotoxicidad mediada por células NK

La citotoxicidad mediada por las células NK (CMC-NK) ocurre también en etapas; la primera es la etapa de reconocimiento y unión a la célula blanco. Esta etapa no es determinante en el proceso citolítico, ya que las células NK se unen con la misma afinidad tanto a células sensibles como a células resistentes. Sin embargo, cuando se unen a una célula sensible (célula blanco), o se estimu-



la alguno de los receptores activadores de la citolisis se produce la activación, es decir la serie de procesos bioquímicos que caracteriza a esta etapa, fosforilación de proteínas y enzimas, especialmente proteína quinasas y proteínas adaptadoras y la generación de los segundos mensajeros (ver Capítulo 9). La citotoxicidad es la función más reconocida de estas células, la que les confiere un amplio papel defensivo frente a enfermedades infecciosas y neoplásicas. La CMC-NK puede ser de dos tipos: a) Citotoxicidad natural; la ejercen sobre células tumorales, transformadas por virus, infectadas por bacterias patógenas intracelulares y sobre algunos tipos de células normales; se basa en el reconocimiento celular por mecanismos aún no del todo comprendidos, pero que es espontáneo y no requiere activación previa. Existe descrito hasta ahora un amplio repertorio de receptores de activación y de inhibición, que permiten explicar, en parte, la citotoxicidad natural. b) Citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), ha sido hasta ahora la más estudiada y es dependiente del receptor Fc de baja afinidad de IgG (FcγRIII o CD16); este receptor reconoce al fragmento Fc de los anticuerpos que recubren a la célula blanco. Los mecanismos de lisis celular son similares a los descritos para los LTc; membranólítico e interacción FasL – Fas, conducente a apoptosis de la célula blanco. En el mecanismo membranólítico participan, perforina, granzimas, un factor citotóxico de las células NK (NKCF), que corresponde a una proteína con actividad citotóxica y también la proteína granulisina con actividad lítica bacteriana. En el caso de la lisis por la interacción FasL – Fas; FasL es inducido y expresado en la superficie de las células NK postcontacto con la célula blanco.

El modelo de **citotoxicidad natural** más aceptado hasta ahora, implica la participación simultánea de receptores de activación e inhibición de las células NK en su interacción con la célula blanco. Los receptores de activación al ser activados ponen en marcha la maquinaria citotóxica de las células que implica una amplia fosforilación de proteínas y los receptores de inhibición al estar asociados a fosfatasa, se encargan de bloquear la activación. Bajo esas circunstancias (figura 19-3) en el balance global de la respuesta, prima la inhibición y no hay lisis de la célula blanco. Durante mucho tiempo se buscaron receptores de activación que permitieran explicar la citotoxicidad, sin embargo el mayor conocimiento de este fenómeno hasta ahora ha provenido del

estudio de los receptores de inhibición que en su gran mayoría reconocen a las moléculas MHC-I. Cuando disminuye o desaparece la expresión de estos complejos, como es el caso de la infección viral o la transformación tumoral, mecanismo que les permite evadir a la respuesta inmune específica, desaparece la señal de inhibición y ocurre la lisis de la célula blanco. En este principio se basa la actividad anti-viral y anti-neoplásica de las células NK. Se ha observado además, por análisis *in vitro*, que muchas células tumorales expresan tipos de MHC-I que las protegen de la lisis de las células NK al ser reconocidos por los receptores de inhibición de la citotoxicidad, mecanismo que aparece como una nueva posibilidad de evasión de la respuesta inmune.

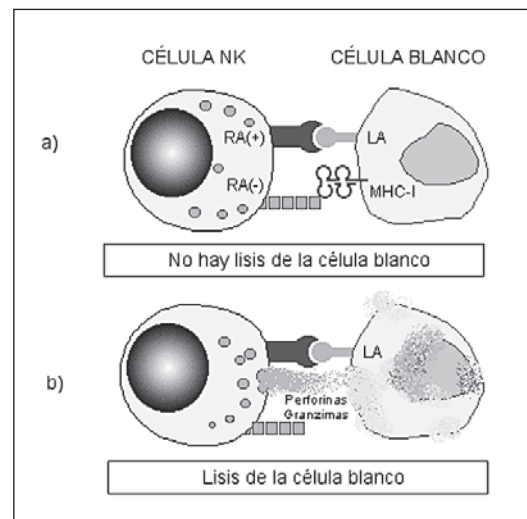


Figura 19-3. Activación de células NK. (a) La activación conjunta de receptores de activación y de inhibición de las células NK representa la situación en que no hay lisis de la célula blanco. (b) Si la célula blanco, pierde o disminuye la expresión del complejo MHC-I, y están simultáneamente presentes los receptores de activación adecuados, hay lisis de la célula blanco. En la activación de las células NK se induce la expresión de FasL; si la célula blanco expresa Fas puede ocurrir también lisis mediada por esta interacción. RA: Receptor de Activación; RI: Receptor de Inhibición. LA: Ligando Activador.

Existen dos grandes familias de receptores de inhibición que reconocen a las moléculas de MHC-I, la superfamilia de las lectinas del tipo C y la superfamilia de las inmunoglobulinas (tabla 19-1). Los representantes de las lectinas se encuentran localizados en el cromosoma 6 murino y 12 humano y los de la superfamilia de inmunoglobulinas humana en el cromosoma 19. Todos estos receptores poseen en su extremo



citoplasmático secuencias ITIM (dominio o motivo de inhibición basado en tirosina del inmunorreceptor). ¿Qué es lo que reconocen los receptores de inhibición en las moléculas MHC-I? Para poder responder esta pregunta nos referiremos en primer lugar a los receptores KIR (receptores de inhibición de células NK) que han sido los más estudiados. Estos receptores reconocen moléculas MHC-I de los tipos A, B, C y G, específicamente a regiones polimórficas de los dominios α_1 , aminoácidos 77 a 83. Si bien los péptidos presentados por estas moléculas pueden afectar la conformación de la molécula en el sitio de la interacción con los KIR, no hay ninguna evidencia hasta ahora, sobre una interacción directa entre el receptor y los péptidos antigénicos presentados. Por otra parte, la interacción KIR – MHC-I presenta una estequiometría 1:1 y una constante de disociación (K_d), del orden de 10^{-6} M; valor que se encuentra en el rango de otras interacciones célula – célula. La interacción de los receptores tipo lectina, con los complejos MHC-I, ocurre también a través del reconocimiento de secuencias de los dominios α_1 y α_2 . Las células NK expresan diversas combinaciones de receptores, incluyendo los receptores de inhibición, lo que refuerza el papel del conjunto heterogéneo de estas células en el reconocimiento celular y desarrollo de sus funciones. Los receptores de inhibición, descritos inicialmente en las células NK, se encuentran también en los LT, especialmente en los LT CD8⁺ de memoria. En este tipo de linfocitos se han descrito las mismas funciones; es decir inhibición de la citotoxicidad y de la secreción de citoquinas.

Los receptores de inhibición del tipo lectina, que carecen de las secuencias ITIM, receptores truncados, se comportan como receptores de activación al interactuar con sus respectivos ligandos; tal es el caso del receptor CD94-NKG2C, asociado a la sub-unidad DAP12, sub-unidad que posee secuencias ITAM (Dominio o motivo de activación basado en tirosinas del inmunorreceptor) en su extremo citoplasmático, y que reconoce a moléculas MHC-I y del receptor CD94-NKG2D, asociado a la sub-unidad DAP10, que posee secuencias SH2 en su extremo citoplasmático y que reconoce a la molécula MICA (molécula relacionada a MHC-I de tipo A), una proteína homóloga distante de las moléculas MHC-I inducible por estrés, que funciona como antígeno de los LT $\gamma\delta$ y que frecuentemente se encuentra expresada en las células epiteliales tumorales. Este último recep-

tor de las células NK presenta por lo tanto reconocimiento y activación por el contacto con células tumorales. La mayoría de los receptores de activación de las células NK actúan en forma independiente del reconocimiento de los MHC-I. Gran parte de estas moléculas se conocen desde hace tiempo: CD2, CD16, CD69, CD28 y el co-receptor 2B4, a los que se han sumado recientemente los denominados NCR: NKp46, NKp44 y NKp30. Estos últimos se encuentran asociados a sub-unidades que poseen secuencias ITAM, y todos activan la citotoxicidad; sin embargo no ha sido fácil encontrar sus respectivos ligandos en las células tumorales. Aparentemente existe un escape de la respuesta inmunológica innata, tal como existe escape de la respuesta inmunológica específica, en que la transformación tumoral impide la expresión de los ligandos correspondientes. Los ligandos conocidos son CD58 para CD2, IgG para CD16; el co-receptor 2B4, reconoce a CD48, pero su participación depende de la expresión de los NCR para ejercer su contribución a la citolisis.

Las células NK pueden ser activadas, a través del contacto directo con células blanco, no existiendo un solo tipo de receptores involucrado en la activación, lo que explicaría en parte la heterogeneidad e inespecificidad de su acción. El Fc γ RIIIA o CD16, ha sido uno de los más estudiados y merece un comentario particular pues da cuenta del proceso de **citólisis mediada por anticuerpos (ADCC)** (ver capítulo 10, figura 10-6).

3.2. Receptor Fc γ RIIIA (CD16)

Las células NK pueden lisar eficientemente a células tumorales o transformadas por virus si éstas se encuentran recubiertas u opsonizadas con anticuerpos IgG de determinadas subclases (IgG1 o IgG3 en humanos). Asociados a este receptor se encuentran las sub-unidades ζ y también se han descrito las sub-unidades CD3 γ y CD3 ϵ , aún cuando sin la expresión total del complejo CD3; existiendo por lo tanto una clara similitud entre el TCR y el receptor Fc γ RIIIA, lo cual, permite explicar la similitud en el mecanismo de activación de las células NK y linfocitos T. Las células NK sólo expresan el receptor de baja afinidad para IgG (Fc γ RIIIA). La activación de este receptor, que no posee actividad enzimática, a través de células opsonizadas por anticuerpos o anticuerpos anti-CD16 resulta en la ya descrita fosforilación/



desfosforilación principalmente en tirosina de diversas proteínas y la posterior producción de las citoquinas IFN- γ y del factor estimulador de colonias de granulocito-macrófagos (GM-CSF). La ADCC corresponde entonces al tipo de mecanismo efector en el que las células citotóxicas carecen de especificidad por el antígeno, reconociendo a través del receptor Fc la molécula de anticuerpo que actúa como puente entre ambos tipos celulares. La tabla 19-1 resume las principales características de las células NK.

La generación de IFN- γ es de particular importancia en los mecanismos defensivos contra la infección, pues existe una extraordinaria coordinación entre la respuesta de los monocito-macrófagos y las células NK, especialmente cuando éstos se encuentran infectados con bacterias patógenas intracelulares. El macrófago en su respuesta inicial al agente infeccioso (bacterias, parásitos, toxinas) es capaz de producir una serie de citoquinas (TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-15 e IL-18) que al interactuar con las células NK las estimulan para la producción de IFN- γ , esta citoquina es capaz de activar al macrófago, estado en el que adquiere mecanismos altamente eficientes contra los microorganismos patógenos. Si bien, obviamente, esta no es la única vía de generación de IFN- γ , es importante en la defensa anti-infecciosa temprana y representa otra de las propiedades inherentes de las células NK. Las citoquinas liberadas por el macrófago y las células NK en este proceso también activan a los LT CD4⁺ y CD8⁺, es decir, participan los mecanismos de la inmunidad innata y de la inmunidad adquirida en conjunto.

La persistente acción estimuladora de algunas de las citoquinas provoca inactivación y muerte de las células NK; así el efecto conjunto *in vitro* de IL-12 e IL-15 o IL-2 e IL-12 por ejemplo, provoca este efecto en las células NK que nos permite dar una respuesta a la situación fundamental de eliminación de las células citotóxicas una vez activadas para evitar su acción sobre las células normales. El solo contacto de las células NK con células sensibles y su posterior activación, son también señales de inactivación y muerte para las células citotóxicas; este efecto se ha denominado activación que induce muerte celular (AIMC) y también lo experimentan los LT. En este caso, la repetida estimulación antigénica sumada a la acción de citoquinas como IL-2 y a la inducción de la expresión de FasL favorecerá su autoeliminación.

Finalmente nos referiremos muy brevemente a las principales citoquinas moduladoras de la actividad citolítica de las células NK. Entre estas citoquinas estimuladoras se encuentran: IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- α y los diferentes tipos de interferón. De éstas, la más estudiada, del punto de vista terapéutico ha sido la IL-2 pues además de producir la estimulación de la citolisis es capaz, a largo plazo y bajo determinadas condiciones *in vitro*, de generar una nueva estirpe celular denominada **células LAK** ("células citotóxicas estimuladas por linfoquinas") que además de ser muy heterogéneas, se caracterizan por ampliar la especificidad y la agresividad de la citotoxicidad. Las células LAK se han utilizado como terapia anti-neoplásica desde mediados de la década de los 80. Recientemente se les han incorporado genes de citoquinas estimuladoras como TNF- α o IL-2, para optimizar su acción terapéutica. Entre las citoquinas inhibitorias de las células NK están los factores de crecimiento TGF- β (factor de crecimiento transformante β) y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas).

4. MÉTODOS DE ESTUDIO DEL PROCESO CITOLÍTICO

Si bien el análisis de este tipo de metodologías escapa a los objetivos de este capítulo, se hará una breve mención de éstos para complementar la comprensión de los dos tipos de mecanismos involucrados en la lisis celular.

Para medir la lisis de una célula se pueden utilizar colorantes vitales, los cuales son excluidos de una célula no dañada; o también se puede medir la liberación de enzimas citosólicas al medio como índice de daño, tales como: láctico deshidrogenasa. Sin embargo, uno de los métodos más ampliamente utilizado es la incorporación de sales de Cr radiactivas (Na₂⁵¹CrO₄). En este caso las células (blanco) captan inespecíficamente el Cr⁺⁶ y lo reducen Cr⁺³, este catión se une a las macromoléculas intracelulares, principalmente a las proteínas. Si la célula blanco radiomarcada sufre daño por acción de las células citotóxicas, se libera el Cr⁺³ al medio lo que se utiliza para calcular un índice de citotoxicidad. Este método no discrimina entre necrosis y apoptosis; sin embargo, mediante el uso de inhibidores de la apoptosis, como agentes secuestradores de Ca²⁺ intracelular, sí se puede cuantificar la contribución de cada uno de estos mecanismos en la lisis final de la célula blanco.



Para la determinación de apoptosis existen diversas metodologías, generalmente orientadas al análisis de la fragmentación del DNA; esto principalmente se logra usando precursores radiactivos (^{125}I -timidina) que se incorporan al DNA de la célula blanco y posteriormente durante la apoptosis se liberan como señal de fragmentación ocurrida. Los métodos más utilizados actualmente son el análisis directo de los fragmentos de DNA producidos mediante electroforesis en geles de agarosa y el análisis del DNA mediante microscopía o citometría de flujo. También es posible la detección de las enzimas proteolíticas caspasas activadas intracelulares de las células blanco, como índice de apoptosis, para lo cual se utilizan análogos de sustrato de estas enzimas, unidos a fluorocromos, como rodamina, utilizando citometría de flujo para su detección.

5. HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA (HR)

Los linfocitos T, especialmente CD4^+ , participan en este particular tipo de reacción, en que producto de la interacción entre la CPA y LT CD4^+ , se secretan diversas citoquinas que producen a su vez múltiples efectos. Algunas de estas citoquinas activan a las células endoteliales de las vénulas para reclutar leucocitos en el sitio y otras se encargan de activar a los monocitos para transformarlos en macrófagos que puedan eliminar a los antígenos. Es decir, el mecanismo efector final en la HR es el efecto citotóxico mediado por los macrófagos activados. Este mecanismo participa en la eliminación de los patógenos intracelulares, tales como: *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium tuberculosis*; estos microorganismos no pueden ser eliminados por los monocitos en reposo y requieren de las citoquinas activadoras derivadas de los LT y células NK para activarse. Este mismo tipo de mecanismo puede ser iniciado por otro tipo de antígenos inocuos, tales como: antígenos proteicos solubles o haptenos químicos. En este caso, sin la participación de microorganismos patógenos, la activación de los macrófagos puede generar daño tisular en el sitio de la reacción, de aquí deriva el término de “hipersensibilidad”.

Los modelos animales para el estudio de HR son por ejemplo cobaya inmunizada, a la cual se le aplican pinceladas del antígeno o bien inyecciones intradérmicas de éste, observándose entre

las 24 a 48 hrs. una reacción típica localizada en la piel de enrojecimiento y edema. La HR también ocurre en los seres humanos, como por ejemplo debido a la administración intradérmica del derivado proteico purificado (PPD), del *Mycobacterium tuberculosis*, a individuos que han padecido de tuberculosis o que han sido vacunados contra esta enfermedad, provocará en ellos la reacción de HR. El mecanismo involucrado en el inicio de la HR experimental es a través del contacto entre el antígeno extraño y LT CD4^+ y CD8^+ específicos, lográndose de este modo la activación, expansión y proliferación de los LT específicos. La siguiente etapa implica nuevamente el contacto entre el antígeno y los LT a nivel periférico local donde se produce como resultado la secreción de las citoquinas $\text{TNF-}\alpha$ y $\text{TNF-}\beta$, IL-2 e IFN- γ . Las CPA que inician la HR, pueden ser también células endoteliales venosas que activan a los LT; estas células tienen una activa participación en diversos procesos fisiopatológicos: pueden interactuar con otras células y también producir mediadores, especialmente de la inflamación.

El encuentro con el antígeno provoca la diferenciación de las células T CD4^+ a células del tipo Th1, que se caracterizan por la secreción de las citoquinas. El IFN- γ es un potente activador de los macrófagos, aumenta la capacidad fagocítica e induce la expresión de moléculas de MHC-II. La IL-2 es un estimulador de las células T, que en este caso puede actuar en forma autocrina y además estimular a células T no específicas para el antígeno. El $\text{TNF-}\alpha$ y β o linfotóxina son dos citoquinas que ejercen su acción preferentemente sobre las células endoteliales, las cuales producen (a) mediadores de la inflamación como prostaciclina, óxido nítrico (NO) que aumentan el flujo sanguíneo local aumentando la llegada de los leucocitos al sitio de la inflamación; (b) quimioquinas, que son péptidos relativamente pequeños con potente actividad quimioattractante y de activación de los leucocitos; un ejemplo de quimioquina es la IL-8; (c) aumento de la expresión de moléculas de adhesión que favorecen la migración y diapedesis de leucocitos hacia el sitio de la HR. La IL-12 producida por los macrófagos también provoca la diferenciación a Th1, de modo que es importante su participación en el mecanismo general. En su conjunto entonces, los cambios producidos por estos mediadores explican: la vasodilatación, la adhesión de leucocitos y el aumento de la permeabilidad vascular. El papel efector final lo cumplen los macrófagos activa-



dos que han migrado y que presentan una mayor capacidad de producción de metabolitos reactivos del oxígeno, NO y enzimas lisosomales; aumento de la expresión de moléculas MHC y del co-estimulador B7 y un aumento también en su capacidad productora de citoquinas. Por ello pueden ejercer diversas funciones, tales como: destrucción de microorganismos por fagocitosis, secreción a su vez de potentes mediadores de la inflamación, citoquinas y factores de crecimiento e inclusive pueden adquirir citotoxicidad contra células tumorales. Morfológicamente, la HR se caracteriza por acumulación de células mononucleares en el tejido subcutáneo y dermis. Esta acumulación es notable en venas y vénulas produciéndose permeabilidad microvascular, pérdida de proteínas plasmáticas, edema y depósito de fibrina, estas serían las causas del proceso de induración característico de las lesiones en la piel observadas en esta reacción.

Más tardíamente en la HR, especialmente si no se ha logrado eliminar a las células infectadas se forman los denominados granulomas. Éstos consisten en un acúmulo de células y materiales de desecho rodeados por macrófagos que han calcificado formando, como última medida de seguridad, una barrera física de contención para impedir la diseminación del patógeno. En este fenómeno resulta muy importante la participación de la IL-12 y Eta-1 u osteopontina (citoquina de activación temprana de los linfocitos). La Eta-1 es requerida tempranamente para aumentar y potenciar la secreción de IL-12, la producen los LT en el sitio de la infección y tiene también un papel en el reclutamiento de los monocitos y en la posterior inhibición de la IL-10, citoquina inhibitoria de la formación de los granulomas.

Los agentes más estudiados que activan directamente a los monocitos y otras células importantes del sistema inmunológico, son la endotoxina bacteriana conocida como lipopolisacárido (LPS) y las lipoproteínas bacterianas; estas moléculas interactúan con receptores en el monocito tales como: CD14 en el caso del LPS y los recientemente caracterizados del tipo Toll (TLR), que reconocen tanto el LPS como las lipoproteínas bacterianas. La descripción de los TLR, que en su región extracelular son homólogos a la proteína Toll de *Drosophila*, ha llenado un importante vacío en el mecanismo de acción del LPS, pues corresponde a una molécula transmembrana. CD14 es una proteína anclada en la superficie externa de la membrana plasmática. Dentro de la amplia

familia descrita de receptores TLR, los TLR2 y TLR4 reconocen a componentes bacterianos; TLR4 a LPS y TLR2 a componentes de bacterias Gram positivas. La activación de estos receptores (CD14 y TLR) desencadena una serie de eventos (especialmente de fosforilación de proteínas) que comunican la superficie celular del monocito con el núcleo y que permiten explicar molecularmente los importantes cambios morfológicos experimentados durante la diferenciación a macrófago activado y la expresión de las diferentes citoquinas y otros productos secretados, que serán capaces de actuar en estrecha coordinación con diversos tipos celulares. Por su parte, las células NK también poseen receptores TLR no así CD14, lo cual explicaría su capacidad de responder al LPS en ausencia de CD14.

LECTURAS SUGERIDAS

Kägi, D., Lederman, B., Bürki, K., Zinkernagel, R. & Hengartner, H., "Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo". *Annu Rev Immunol.* 14, 207-232 (1996).

Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M. & Moretta, L. "Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity". *Immunology Today*, 21, 228-234 (2000).

Trapani, J., Davis, J., Sutton, V.R. & Smyth, M., "Proapoptotic functions of cytotoxic granule constituents in vitro and in vivo". *Curr Opin Immunol.* 12, 323-329 (2000).





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 20

RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR IgE

Arnoldo Quezada L. y Edgardo Carrasco C.

-
1. **Introducción**
 2. **Características de la IgE**
 3. **Mastocitos y Basófilos**
 4. **Receptores para IgE y liberación de mediadores**
 5. **Regulación de la síntesis de IgE**
 6. **Rol biológico de la respuesta mediada por IgE**
 7. **Aplicaciones biomédicas**





RESUMEN

La respuesta inmune mediada por IgE se refiere a la unión de un antígeno con su IgE específica que ocurre en la superficie de mastocitos o basófilos y determina la liberación de numerosos mediadores inflamatorios con acción biológica sobre vasos sanguíneos, glándulas secretorias, terminaciones nerviosas y músculo liso. Se describen las características de la IgE, de los mastocitos y basófilos, enfatizando la presencia de receptores para IgE en estas células y la liberación de mediadores. En la regulación de la síntesis de IgE se describen las células involucradas, destacando las subpoblaciones de LTh y las citoquinas que participan en los mecanismos de promoción e inhibición. En relación al rol biológico se señalan las enfermedades que cursan con altos niveles séricos de IgE, y la participación de éstas en enfermedades alérgicas y parasitarias.

Finalmente, se comenta las aplicaciones biomédicas de la respuesta mediada por IgE.

1. INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune mediada por inmunoglobulina E (IgE), como su nombre lo indica se refiere a la unión de un antígeno con su IgE específica en la superficie de un mastocito o basófilo que determina la liberación de numerosos mediadores inflamatorios con acción biológica sobre vasos sanguíneos, glándulas secretorias, terminaciones nerviosas y músculo liso. La serie de eventos que supone esta reacción presenta varias particularidades que se describirán en este capítulo.

Las primeras observaciones que facilitaron la identificación de este tipo de reacción se atribuyen a Prausnitz y Küstner quienes al inyectar un extracto antigénico de pescado en la piel de sujetos “alérgicos” indujeron una reacción cutánea de roncha y eritema. Si inyectaban suero de sujetos alérgicos al pescado en la piel de sujetos sanos, y los inoculaban con el antígeno, podían transferir pasivamente esta reacción local.

Basados en estas observaciones se otorgó la denominación de “reaginas” a los anticuerpos presentes en el suero de enfermos alérgicos, susceptibles de ser detectados en la piel, con la propiedad adicional de ser transferidos mediante suero a sujetos sanos.

En los últimos años de la década del sesenta, Johansson e Ishizaka en forma independiente lograron identificar a la IgE como responsable de esta actividad reagínica.

2. CARACTERÍSTICAS DE LA IgE

La estructura molecular de la IgE es semejante a las otras clases de inmunoglobulinas en cuanto a la presencia de dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas (ver capítulo 6). Sin embargo, su peso molecular es 190 kDa y las cadenas pesadas ϵ (épsilon) poseen cinco dominios. No actúa como opsonina, ni activa el complemento, pero tiene una alta citofilia y posee dos sitios de unión a las células cebadas o mastocitos, basófilos y otras células (células de Langerhans, macrófagos, linfocitos, eosinófilos y plaquetas). La zona de unión a dos tipos de receptores celulares ($Fc\epsilon RI$ y $Fc\epsilon RII$) se encuentran en los dominios C2 y C3 de la cadena pesada, en el segmento Fc de la inmunoglobulina.

La cantidad de IgE sérica normalmente es muy baja, 0,003% del total de inmunoglobulinas, y aumenta apreciablemente en las enfermedades atópicas. Existe IgE total o libre sérica e IgE unida a los receptores de mastocitos y basófilos.

3. MASTOCITOS Y BASÓFILOS

Los mastocitos o células cebadas se originan en la médula ósea, a partir de células progenitoras que migran a los tejidos y se diferencian *in situ*. Se encuentran distribuidos principal y abundantemente en la piel, mucosa intestinal y mucosa respi-



ratoria (nasal y bronquial), alrededor de arteriolas y en conexión con fibras nerviosas sensitivas. Su tamaño varía entre 10 y 15 μm , poseen un solo núcleo redondeado u oval excéntrico y gránulos citoplasmáticos de 0.1 a 0.4 μm de diámetro, en número de 50 a 200 por célula, que contienen histamina y otros mediadores. Estos mediadores producen aumento de permeabilidad vascular, contracción del músculo liso, hipersecreción mucosa y estimulación de terminaciones nerviosas. Los gránulos citoplasmáticos electrodensos se encuentran unidos a la membrana celular, se tiñen con azul de toluidina y dan un color rojo metacromático o violeta. La superficie celular presenta numerosas proyecciones de la membrana. El contenido de histamina de los gránulos del mastocito es 5 veces mayor que en los basófilos.

Se han identificado subtipos de mastocitos: existe una población dependiente de linfocitos T que predomina en pulmones y mucosa gastrointestinal y contienen triptasa (una proteasa neutra que se encuentra en los gránulos citoplasmáticos), y otra población denominada TC (del tejido conectivo intersticial), que predomina en la piel y en la submucosa gastrointestinal, que contienen triptasa, quimasa y heparina.

Los **basófilos** (ver capítulo 3) comparten muchas de las características de los mastocitos, pero también muestran claras diferencias. Se originan en la médula ósea, como los otros polimorfonucleares y son elementos predominantemente circulantes, constituyendo el 0.5 a 1% de la fórmula leucocitaria granulocítica del hemograma normal. Miden 5 a 7 μm y poseen un núcleo bilobular o multilobulado, con cromatina densa en la periferia.

La superficie celular es lisa y con cortos pseudopodios irregulares. Contienen gránulos citoplasmáticos con histamina y presentan acúmulos electrodensos de glucógeno que no se encuentran en los mastocitos.

Si bien comparten con los mastocitos la particularidad de presentar receptores de membrana de alta afinidad para la IgE, la importancia de los basófilos en la inmunidad y en la hipersensibilidad está aún por definirse, aunque se sabe que participan en la fase tardía de la hipersensibilidad inmediata.

A diferencia de mastocitos, tienen moléculas de adhesión (Mac-1 y LFA-1) que les permite migrar del torrente sanguíneo a los sitios de inflamación alérgica, atraídos por receptores de moléculas de adhesión del endotelio vascular.

4. RECEPTORES PARA IgE Y LIBERACIÓN DE MEDIADORES

Los mastocitos y basófilos poseen en su membrana celular receptores de alta afinidad para la IgE (Fc ϵ RI) (figura 20-1). Estos receptores tienen una estructura tetramérica conformada por una cadena α , una cadena β y dos cadenas γ idénticas. El sitio de unión se ubica en la porción terminal de la cadena α del receptor que se une a una porción de 76 aminoácidos ubicada en segmentos de los dominios C2 y C3 de la cadena ϵ de la IgE (segmento Fc). Otras células (eosinófilos, plaquetas, monocitos/macrófagos, linfocitos B y linfocitos T) poseen receptores de menor afinidad (Fc ϵ RII).

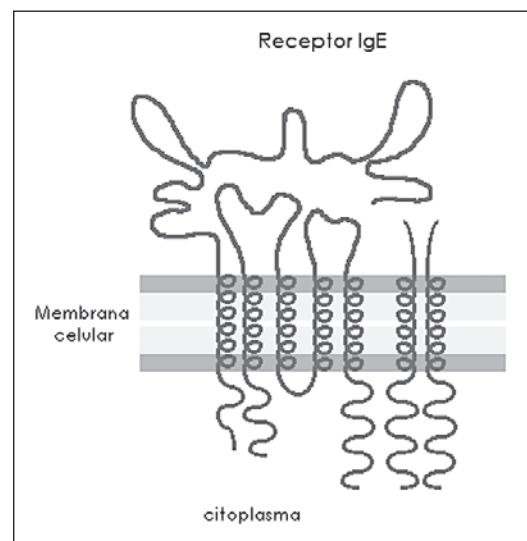


Figura 20-1. Estructura del receptor de IgE.

La unión de la IgE con el receptor de alta afinidad desencadena la degranulación de mastocitos y basófilos cuando dos moléculas de IgE se unen a un antígeno (Ag) multivalente. Las cadenas β y γ de los receptores son proteínas de membrana que aparentemente participan en la transducción de señales y activación de mastocitos y basófilos. La interacción Ag + IgE específica + Fc ϵ RI en la superficie de estas células induce la liberación de mediadores inflamatorios preformados (histamina, proteasas, proteoglicanos y factores quimiotácticos de eosinófilos y polimorfonucleares) y la generación posterior de productos tales como leucotrienos C4, D4 y E4, prostaglandina D2 y factor activador de plaquetas (PAF) (figura 20-2).

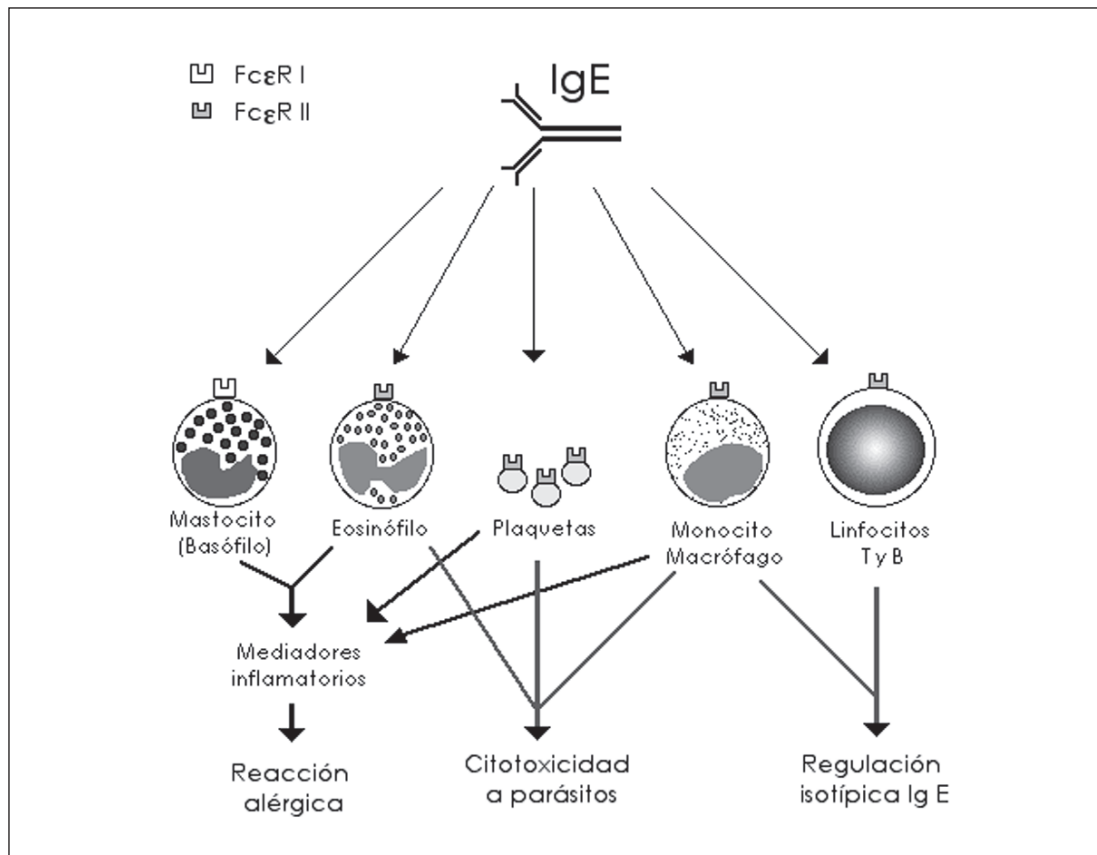


Figura 20-2. Papel de la IgE en la respuesta inmune.

En la reacción de la IgE con su antígeno específico sobre mastocitos se ha descrito una fase inmediata o precoz que se inicia a los 5-10 minutos, dura 1 a 2 horas, y es responsabilidad de histamina, leucotrienos y prostaglandina D2 (figura 20-3). Como consecuencia de ella hay contracción del músculo liso, vasodilatación y aumento de la secreción de mucus. Sin mediar un nuevo estímulo antigénico, a las 3 a 6 horas se produce una fase tardía, que dura 24-48 horas, caracterizada por un fuerte influjo tisular de células inflamatorias provenientes de la circulación: eosinófilos, macrófagos, basófilos y linfocitos T.

En la fase inmediata participan moléculas de adhesión de tipo ICAM-1 del endotelio vascular, y LFA-1 y MAC-1 de los leucocitos, que detienen a las células inflamatorias, las hacen rodar sobre el endotelio, y facilitan su migración transendotelial (ver capítulo 12).

En la fase tardía participan interleuquinas liberadas desde los mastocitos y desde las otras células inflamatorias, especialmente eosinófilos,

basófilos, macrófagos y linfocitos Th2, con lo cual se amplifica enormemente la inflamación. Por tal motivo se ha denominado también a esta fase como inflamatoria, y está relacionada con la perpetuación o mantención de la reacción alérgica, y el estado de hiperreactividad que caracteriza a alguna de sus manifestaciones clínicas (rinitis y asma alérgicas).

Las dos etapas en la reacción de hipersensibilidad inmediata han sido demostradas tanto en la piel, como en la nariz y bronquios, cuando se hace una provocación con el antígeno específico.

También se ha demostrado la expresión de un receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI) en las células de Langerhans de la piel. En enfermos con dermatitis atópica, estudios *in vitro* revelaron que las células de Langerhans que tienen unida IgE son capaces de captar ácaros del polvo de habitación (Dermatofagoide) para su presentación antigénica; en cambio en ausencia de IgE unida a las células de Langerhans no era posible estimular células T específicas contra este tipo de artró-

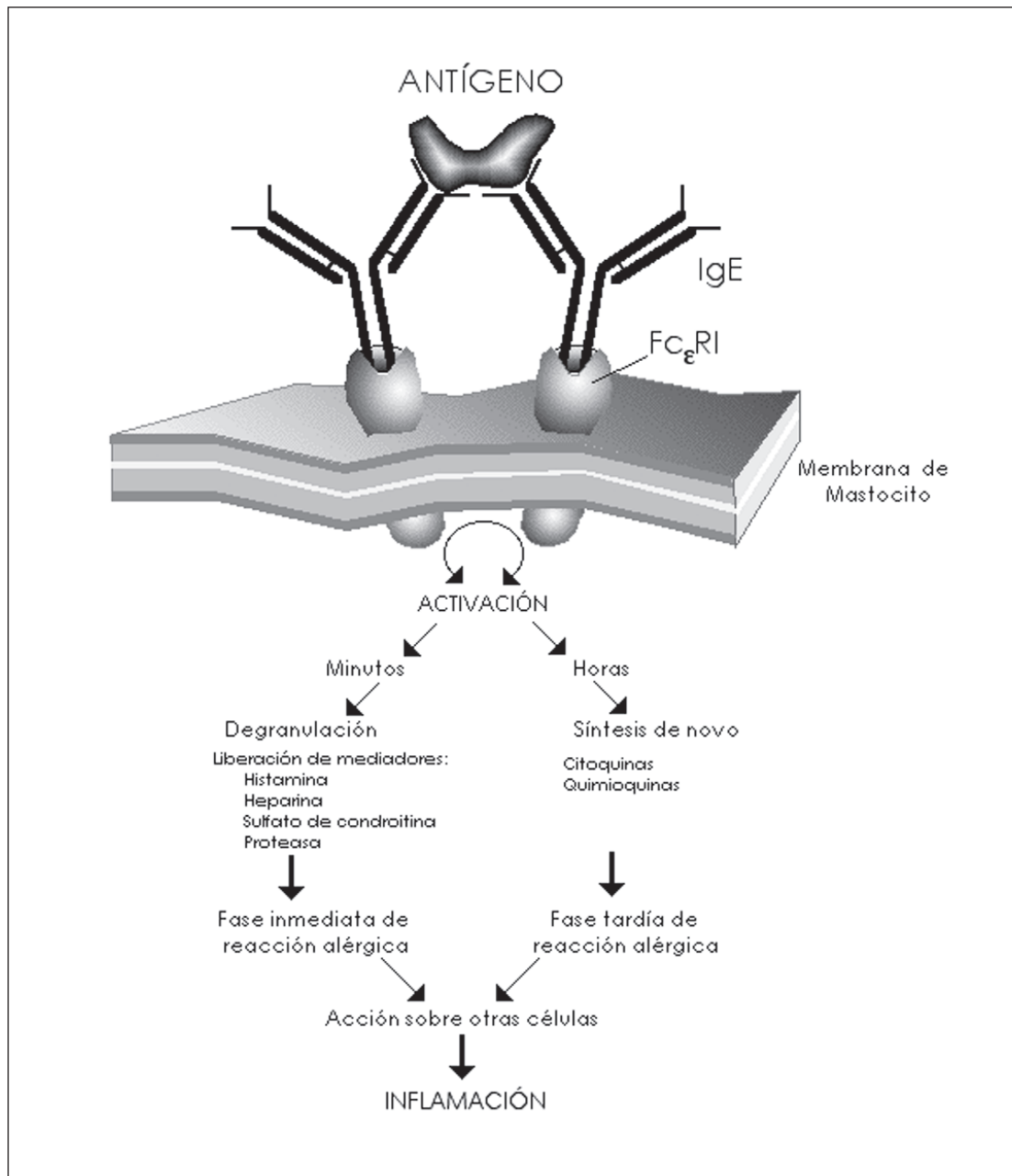


Figura 20-3. Activación de mastocitos y basófilos. Etapas de la reacción de hipersensibilidad inmediata. Cuando dos moléculas de IgE contiguas son ocupadas por un antígeno polivalente, se produce activación de los receptores de IgE de alta afinidad, que dan lugar a estimulación del mastocito, con generación de una fase inmediata y otra tardía de la reacción de hipersensibilidad.

podós. Estos antecedentes inducen a pensar que la presencia de IgE en la superficie de células presentadoras de antígeno facilita el procesamiento antigénico y ayuda a explicar las reacciones alérgicas que se desencadenan por contacto con alérgenos a nivel de la piel.

Los receptores de baja afinidad para IgE (FcεRII o CD23) se encuentran presentes en va-

rios tipos celulares, principalmente linfocitos B, macrófagos, linfocitos T activados, plaquetas y eosinófilos. Se desconoce su función en forma definitiva. En enfermedades alérgicas se observa una mayor expresión del receptor FcεRII en los cuatro primeros tipos celulares enumerados, indicando que hay un aumento de la síntesis de IL-4 que participa en la regulación de la expresión de



este receptor. Además es posible que el $Fc\epsilon RII$ participe en la regulación de la síntesis de IgE, en la endocitosis de complejos antígeno-anticuerpo (IgE) y en la liberación de mediadores inflamatorios a partir de macrófagos, eosinófilos y plaquetas, consecutiva a la interacción entre alérgeno y su IgE específica unida a estas células.

5. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE IgE

Los mecanismos celulares y moleculares que participan en la regulación de la síntesis de IgE han sido materia de mucho interés. En la etapa de inducción se requieren dos señales: la primera es isotipo-específica y es dependiente de IL-4 liberada por los linfocitos T “helper” (LTh), y la segunda debe ser proporcionada por el contacto físico entre el linfocito B y el linfocito T inductor, o por activadores de los linfocitos B que actúan en forma sinérgica con la IL-4 para inducir la síntesis de IgE. El papel de los linfocitos T en la síntesis de IgE por los linfocitos B es fundamental.

Inicialmente, se demostró en ratones la existencia de subpoblaciones de LTh con diferentes patrones funcionales y secreciones de citoquinas. Los Th1 producen IL-2, $IFN\gamma$ y linfoxina y participan en la inmunidad celular e hipersensibilidad retardada. Los Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y serían responsables de la síntesis de IgE por los linfocitos B y la proliferación y diferenciación de los eosinófilos.

Estudios en humanos han identificado en individuos atópicos subpoblaciones de LT con características similares a los Th2, en cuanto a sus propiedades funcionales y a su capacidad de producir citoquinas en forma diferencial. Un área de gran interés para los investigadores es poder establecer los mecanismos que regulan la diferenciación de los precursores T (Th0) hacia las subpoblaciones Th1 o Th2. Entre los factores involucrados en este proceso se han definido a la naturaleza del antígeno, su vía de administración, las citoquinas presentes en el medio tisular en el momento de la diferenciación, las características genéticas del huésped y las células presentadoras de antígeno.

Numerosas investigaciones han revelado posteriormente que las subpoblaciones de linfocitos T juegan un rol importante en la respuesta de IgE. Las células Th1 que secretan $IFN\gamma$ e IL-2 actúan como supresoras, en cambio las Th2 que secretan

IL-4, IL-5 e IL-13 actúan como estimuladoras. Además del contacto directo de linfocitos y de la presencia de IL-4 participan moléculas de adhesión celular en la inducción de síntesis de IgE, especialmente B7-1 en la célula presentadora y CD28 en el linfocito Th2.

La célula presentadora de antígeno, que puede ser una célula dendrítica, un macrófago o un linfocito B, posee una IgE específica de superficie que capta el antígeno correspondiente, lo internaliza y lo procesa, de manera que lo presenta en su superficie en forma de péptidos asociados a moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, HLA) de clase II que interactúan con el receptor TCR del LTh2 inductor. Como consecuencia de esta interacción se produce la activación de LTh2 con liberación de IL-4 e IL-13 que activan al linfocito B para secretar IgE específicas. Además de la acción de IL-4, para completar la activación del LB, se requiere del estímulo del receptor CD40 del LB por su ligando CD40L expresado en la superficie del LT activado (contacto físico del LT y LB). Además de estas dos vías T dependientes, es posible inducir síntesis de IgE por vía T independiente, mediante activadores directos del LB tales como virus de Epstein-Barr, hidrocortisona y anticuerpos monoclonales anti-CD40, pero siempre se requiere de la acción de la IL-4 (figura 20-4).

Se ha demostrado que varias citoquinas pueden modular la síntesis de IgE. Además de IL-4, inducen la síntesis de IgE las IL-5, IL-6 y $TNF\alpha$, y en cambio actúan como inhibidores $IFN\gamma$, $IFN\alpha$, IL-12, IL-18, $TNF\beta$, $TGF\beta$, IL-8, PGE2, PAF y los neuropéptidos VIP y somatostatina.

En individuos atópicos los mastocitos pueden producir IL-4 y de esta manera facilitan la síntesis de IgE cuando un sujeto se expone a su alérgeno específico. Además, la IL-4 producida por mastocitos condiciona una expansión de las células Th2 en individuos alérgicos. Estas células Th2 como ya vimos son estimuladas por células presentadoras de antígeno que poseen en su superficie IgE para el alérgeno inductor, y al activarse liberan más IL-4 y facilitan la síntesis de IgE específica por el linfocito B. Por otro lado, la IL-4 inhibe la producción de $IFN\gamma$ y la diferenciación de células Th1.

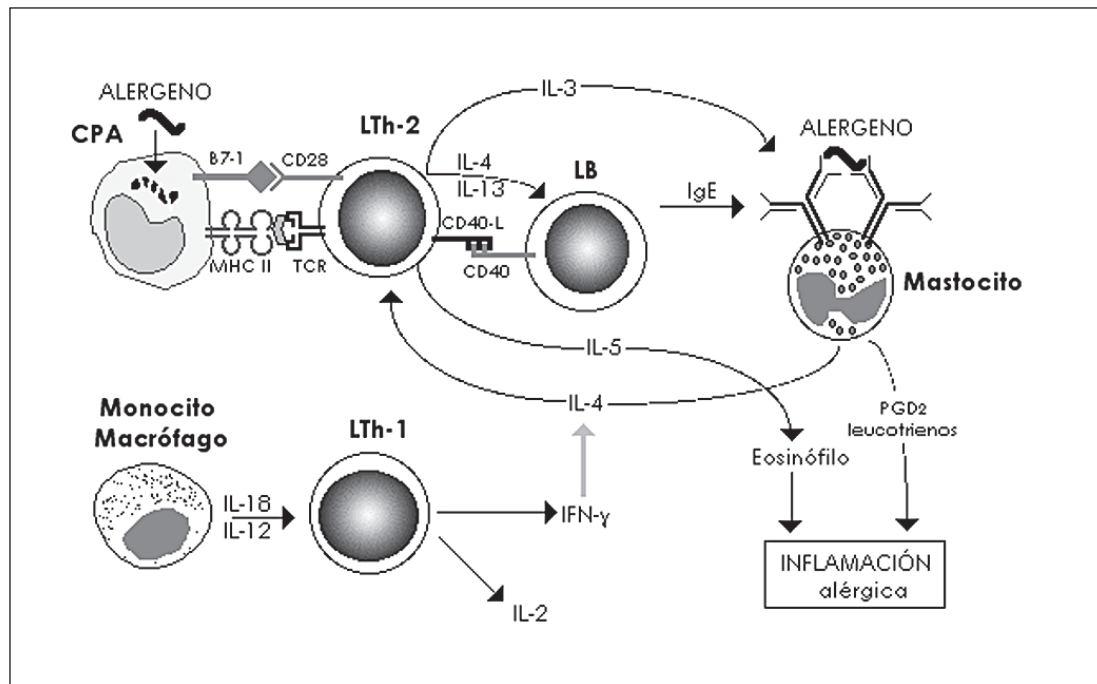


Figura 20-4. Mecanismo involucrado en la reacción de hipersensibilidad inmediata y su regulación. Representación esquemática del proceso iniciado por el procesamiento del antígeno por la célula presentadora de antígenos (CPA), exposición del epítopo alérgico unido a antígenos HLA-II, y estímulo del receptor TCR del linfocito Th2. En la activación del linfocito B para sintetizar IgE específicas, se requiere la participación de IL-4 e IL-13 liberadas por el LTh2, y la interacción de la molécula CD40 del LB con su ligando CD40L del linfocito Th2. Dos IgE fijas en la superficie de los mastocitos, al unirse por una molécula antigénica dan lugar a la liberación de los mediadores de la reacción de hipersensibilidad inmediata. Este mecanismo es regulado por el linfocito Th1, a través de la secreción de IFN γ y el sistema monocito-macrofágico por liberación de IL-12 e IL-18.

6. ROL BIOLÓGICO DE LA RESPUESTA MEDIADA POR IgE

En condiciones normales, los niveles de IgE en el suero alcanzan valores muy bajos comparados con las otras inmunoglobulinas (aproximadamente 0.05 mg/dL). Estos niveles se elevan en forma significativa en varias enfermedades, particularmente en las condiciones llamadas “alérgicas”, tales como Rinitis alérgica, Asma bronquial, Dermatitis atópica y Aspergilosis broncopulmonar alérgica. También se encuentra aumentada en enfermedades parasitarias, en algunas inmunodeficiencias primarias como el Síndrome de Hiper-IgE, la Ataxia telangectasia y el Síndrome de Wiscott-Aldrich; en la Reacción de injerto contra huésped y en el Mieloma múltiple IgE, caracterizado por proliferación de plasmocitos con producción de IgE monoclonal.

En las enfermedades alérgicas es posible detectar anticuerpos IgE dirigidos contra antígenos ambientales (pólenes, ácaros, epitelios animales, hongos), venenos de insectos, alimentos, fármacos

y diversos compuestos químicos. Se considera a esta IgE como la responsable, por su unión a receptores de alta afinidad en las células cebadas, de la ulterior degranulación de éstas al contactar con el antígeno específico. La inflamación mediada por IgE es responsable de la llamada alergia atópica causante de rinitis, asma y dermatitis, y también de reacciones generalizadas como urticaria y anafilaxia.

Se ha postulado además, que por la capacidad de producir vasodilatación rápida, la IgE podría tener una función facilitadora en la inflamación mediada por complejos inmunes y en la inflamación mediada por células, al permitir una vía de entrada rápida de factores solubles y de células circulantes hacia los tejidos.

Es difícil aceptar la existencia de mecanismos que participen solamente en reacciones de daño tisular. Así, se han acumulado evidencias de la participación de la IgE en la protección contra la infestación por parásitos helmínticos y se han identificado anticuerpos de clase IgE relacionados con la inmunidad protectora contra parásitos.



En la esquistosomiasis, la equinococosis, la triquinosis, la ascariasis y la toxocariasis existen anticuerpos de clase IgE que pueden participar en reacciones de citotoxicidad celular mediada por eosinófilos contra huevos, larvas y gusanos. Además, anticuerpos IgE pueden desencadenar reacciones anafilácticas, por ejemplo, ante la ruptura de un quiste hidatídico, o por la picadura de abejas. En modelos animales y en enfermos humanos se ha demostrado que el incremento notable de la síntesis de IgE frente a una infestación parasitaria se produce contra antígenos del parásito y además en forma de IgE no específica, traduciendo una alteración en la regulación de la síntesis normal de IgE. Existen controversias si este aumento de IgE no específica es también un mecanismo protector o por el contrario, es un fenómeno inducido por el parásito para evadir los efectos de la IgE específica.

7. APLICACIONES BIOMÉDICAS

La determinación de IgE sérica y de anticuerpos IgE específicos, ya sea directamente en el suero, o indirectamente a través de las pruebas cutáneas, son útiles en el diagnóstico de enfermedades alérgicas, parasitarias e inmunodeficiencias.

El mejor conocimiento de la regulación de la síntesis de IgE y de la respuesta mediada por IgE permitirá el desarrollo de fármacos o factores terapéuticos útiles en el tratamiento de enfermedades en que se involucra este tipo de reacción inmunitaria. La inmunoterapia con alérgenos produce una acción terapéutica favorable, desviando la reacción mediada por el linfocito Th2 a linfocito Th1. El IFN γ producido por linfocitos Th1 y las IL-12 e IL-18 generados por macrófagos bloquean la acción de los LTh2 y sus linfoquinas, con lo cual el LB no sintetiza IgE. Otra aplicación es el uso de anticuerpos monoclonales para suprimir la IgE, procedimiento que se está usando con éxito en el tratamiento de rinitis y asma alérgicas.

Finalmente, la información más completa sobre los antígenos parasitarios y su capacidad para inducir anticuerpos protectivos IgE, permitirá el desarrollo de vacunas para la prevención y el control de las enfermedades parasitarias.

LECTURAS SUGERIDAS

Busse, W., Calhoun, W., Sedgwick, J., "Mechanism of airway inflammation in asthma", *Am Rev Respir Dis*, 147:520-4, 1993.

Capron, A., Capron, M., Grangette, C., Dessaint, J., "IgE and inflammatory cells", *Ciba Foundation Symposium*, 147:153-70, 1989.

Hagan, P., "IgE and protective immunity to helminth infections", *Parasite Immunol*, 15:1-4, 1993.

Hamawy, M., Mergenhagen, S., Siraganian, R., "Adhesion molecules as regulators of mast-cell and basophil function", *Immunol Today*, 15:62-6, 1994.

Janeway, CH. Travers, P., Walport, M., Capra, D., **Immunobiology**, Ed. Masson, 2000.

Leung, D., "Mechanisms of the human allergic response: clinical implications", *Ped Clin N Amer*, 41:727-43, 1994.

Pritchard, D. "Immunity to helminths: is too much IgE parasite-rather than host-protective?", *Parasite Immunol.*, 15:5-9, 1993.

Romagnani, S., "Induction of TH1 and TH2 responses: a key rol for the natural immune response?", *Immunol Today*, 13:379-81, 1992.

Schwartz, L., "Mast cells: function and contents", *Curr Opin Immunol*, 6:91-7, 1994.

Stites, D., Terr, AI., **Basic and Clinical Immunology**, Ed. Appleton & Lange, USA, 1994.

Wasserman, S., "Mast cells and airway inflammation in asthma", *Am J Respir Crit Care Med*, 150:539-41, 1994.

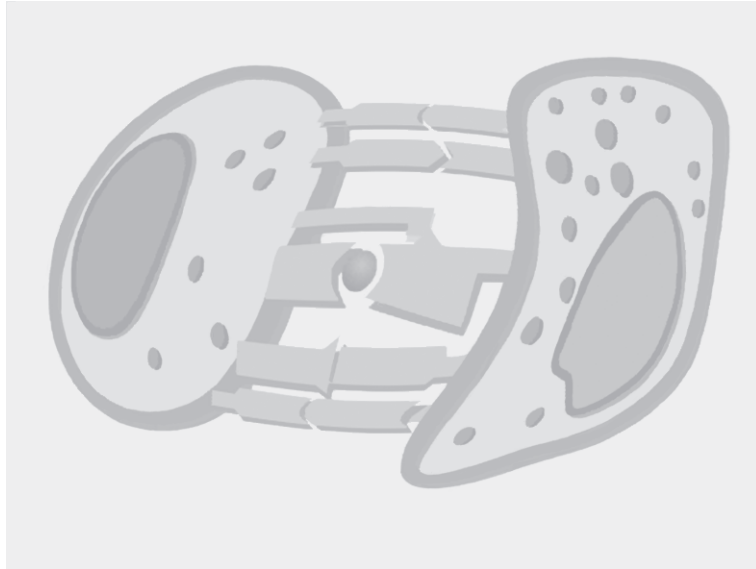




Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Roseblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

SECCIÓN IV

INMUNOLOGÍA CLÍNICA







Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 21

HIPERSENSIBILIDAD

Arnoldo Quezada L. y Ximena Norambuena R.

1. Introducción
2. Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad
3. Hipersensibilidad inmediata mediada por IgE (tipo I)
4. Hipersensibilidad citotóxica (tipo II)
5. Hipersensibilidad mediada por complejos inmunes (tipo III)
6. Hipersensibilidad retardada mediada por células (tipo IV)





RESUMEN

La hipersensibilidad puede definirse como una condición adquirida de reaccionar inmunológicamente a una sustancia antigénica de manera tal que esta respuesta inmune causa una alteración patológica o expresión clínica de daño tisular en el huésped. Aunque existen ciertas discrepancias, la clasificación actualmente más aceptada de las reacciones de hipersensibilidad corresponde a Gell y Coombs quienes describieron cuatro tipos de respuesta de daño inmunológico. Se señala las principales características que tipifican a las reacciones mediadas por IgE, las reacciones citotóxicas, las reacciones mediadas por complejos inmunes y las reacciones de hipersensibilidad mediada por células. Se enfatiza en los fenómenos biológicos que las caracterizan y se da ejemplos de situaciones clínicas y enfermedades producidas por cada tipo de reacción.

1. INTRODUCCIÓN

La necesidad de comprender la inmunopatogenia de algunas enfermedades humanas y los principios básicos de la respuesta inmune relacionados con diferentes expresiones patológicas han permitido profundizar en el conocimiento del sistema inmune y su relación fisiopatológica con los múltiples factores del medio ambiente.

El rol fisiológico de la respuesta inmune es, en términos muy generales, la protección del individuo frente a la agresión de agentes nocivos. Las enfermedades del sistema inmune comprenden varios tipos: a) las inmunodeficiencias: incapacidad o falta de respuesta; b) la hipersensibilidad, respuesta no protectora que causa daño; c) la autoinmunidad: respuesta dirigida contra las estructuras propias; y d) neoplasias del sistema inmune.

En 1906 von Piquet reconoció que los antígenos eran capaces de inducir cambios en los individuos inmunizados, señalando que la capacidad de respuesta frente a agentes extraños era independiente del resultado. Si esta respuesta resultaba protectora para el huésped se denominaba inmunidad, en cambio si ésta era una reacción adversa para el sujeto la llamaba hipersensibilidad. La **hipersensibilidad** podría definirse como la condición adquirida de reaccionar inmunológicamente a una sustancia antigénica de manera tal que esta respuesta inmune causa una

alteración patológica o expresión clínica de daño tisular en el huésped.

En las reacciones de hipersensibilidad, los mecanismos inmunes están funcionando dentro de los marcos habituales, pero provocan diferente daño tisular dependiendo de la interacción de los elementos humorales y celulares involucrados.

Desde fines del siglo XVIII ya los investigadores biomédicos se esforzaban por controlar y mejorar el tratamiento de las enfermedades infectocontagiosas, principal problema de salud y causa significativa de la mortalidad de esa época. Así, la inmunología surgió unida a la microbiología y gracias a los trabajos científicos y descubrimientos de destacados personajes como Jenner, Pasteur y von Behring se perfeccionó el método de vacunación o “profilaxis” al introducir pequeñas dosis de microorganismos con virulencia atenuada o de material antigénico para prevenir la enfermedad infecciosa correspondiente en los sujetos inyectados (ver capítulo 2).

Por otra parte, las evidencias experimentales de Erlich al describir el “horror autotóxico”, planteaban que el sistema destinado a proteger a los individuos era incapaz de reaccionar contra sus propias estructuras. Tales planteamientos retrasaron la interpretación de los fenómenos de autoagresión.

Las primeras evidencias de resultados adversos a un procedimiento de inmunización con fines protectores son atribuidas a Richet y Portier, quienes inyectaron a sus perros con extractos de



una anémoma en un intento por protegerlos contra el “veneno” de estas actinias y observaron, en algunos animales, una aparente protección, en cambio frente a inyecciones sucesivas otros perros presentaban una reacción dramática que en la mayoría de los casos, determinaba la muerte. Denominaron a este fenómeno “antifilaxis” o “anafilaxis” como término opuesto a profilaxis.

Junto a los procedimientos de vacunación, se desarrolló la seroterapia como método preventivo y terapéutico. Prausnitz y Küstner demostraron en esa época que el suero de pacientes “alérgicos” era capaz de transferir en forma pasiva la reacción cutánea a individuos “no alérgicos”. Esta reactividad podría ser detectada en la piel y dieron el nombre de “reaginas” a estas sustancias involucradas en la producción de reacciones de daño.

En 1925 Coca y Cooke, señalaron la predisposición especial de algunos sujetos, que denominaron “atópicos” para formar reaginas, con lo cual se obtuvieron las primeras observaciones sobre el control genético en la respuesta inmune de este tipo.

2. CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD

Las reacciones de hipersensibilidad requieren de una etapa de sensibilización para la formación de anticuerpos y/o linfocitos T sensibilizados a un agente inductor específico. Éste, llámese alérgeno o antígeno, produce un espectro de respuestas en la persona sensibilizada, cada vez que se exponga al agente o que éste persista en el organismo sin ser neutralizado. Debe considerarse que la respuesta en el huésped será diferente si esta relación es crónica o es recurrente.

En la actualidad las reacciones de hipersensibilidad se pueden clasificar según diferentes criterios:

- a) Tipo de mecanismo inmunológico involucrado
 - **Humorales:** mediadas por anticuerpos
 - **Celulares** : mediadas por linfocitos T sensibilizados
- b) Tiempo entre la exposición al antígeno o alérgeno y la expresión de la respuesta
 - **Inmediatas:** unos pocos minutos
 - **Mediadas** : algunas horas
 - **Retardadas:** entre 48 a 72 horas

- c) Ubicación del compromiso
 - **Localizadas** : afectan a un solo órgano (piel, mucosa nasal, bronquial, etc.)
 - **Generalizadas:** si presentan manifestaciones generales (hipotensión, fiebre, etc.)
- d) Naturaleza de la sensibilización
 - **Reacciones de hipersensibilidad propiamente tal:** si está dirigida contra antígenos externos
 - **Fenómenos de autoinmunidad:** si está dirigida contra antígenos propios
- e) Mecanismo fisiopatológico. Una de las clasificaciones vigentes más aceptada es la propuesta por Gell y Coombs que las divide en cuatro categorías de reacciones de hipersensibilidad:
 - **Tipo I.** Es la denominada **reacción anafiláctica o hipersensibilidad inmediata**. El alérgeno o antígeno reacciona con la IgE unida a las células tisulares denominadas mastocitos y los basófilos circulantes induciendo degranulación y activación celular que determina la liberación de mediadores activos de la inflamación.
 - **Tipo II.** Llamada también **hipersensibilidad citotóxica**, en la cual un anticuerpo específico reacciona con componentes de la superficie celular produciéndose opsonización, citotoxicidad y activación del complemento con el consiguiente daño celular y tisular.
 - **Tipo III.** Reacciones **mediadas por complejos inmunes**. Se produce por formación de complejos inmunes que activan el sistema de Complemento, inducen agregación plaquetaria, activación de leucocitos polimorfonucleares y liberación de enzimas proteolíticas que causan microtrombos, vasculitis y necrosis.
 - **Tipo IV.** Hipersensibilidad **retardada o celular** en la cual los linfocitos T que se han sensibilizado y frente al estímulo antigénico liberan citoquinas que inducen infiltración y transformación principalmente de células mononucleares. Se produce sin la participación de anticuerpos.

3. HIPERSENSIBILIDAD INMEDIATA MEDIADA POR IgE (TIPO I)

Las reacciones de hipersensibilidad en que participa este tipo de respuesta se llaman también anafilácticas, reagínicas o inmediatas. Las características de la respuesta inmune mediada por IgE y mastocitos/basófilos fueron descritas en el capítulo 20. Brevemente, luego de una exposición previa con el antígeno (fase de sensibilización), los mastocitos tisulares y los basófilos a nivel sanguíneo que tienen IgE específica unida a los receptores celulares, en un nuevo contacto con el antígeno liberan mediadores químicos contenidos en los gránulos del citoplasma y producen una reacción inflamatoria tisular local provocando edema, broncoespasmo, vasodilatación o anafilaxia (figura 21-1). Estos mediadores químicos son los que participan en las manifestaciones clínicas agudas de rinitis alérgica, asma, urticaria y anafilaxia.

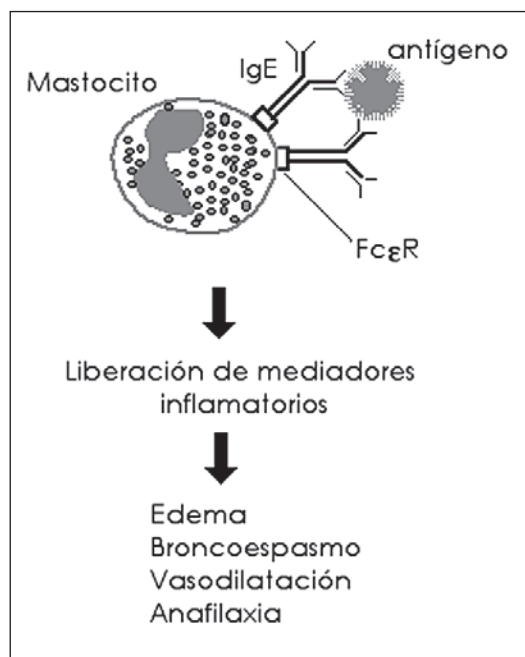


Figura 21-1. Representación de hipersensibilidad de tipo I o inmediata

Los modelos utilizados para su estudio han demostrado que en animales previamente inmunizados o sensibilizados con un antígeno proteico, es posible desencadenar a los pocos minutos de la provocación con el antígeno una reacción caracterizada por dificultad respiratoria marcada, asfixia, convulsiones, shock y muerte. En la

autopsia de los animales así tratados, es posible evidenciar hiperdistensión pulmonar secundaria a broncoconstricción y signos de dilatación vascular generalizada. Las alteraciones descritas corresponden a la denominada anafilaxia generalizada en su forma más grave, el shock anafiláctico, cuyas manifestaciones varían en las diferentes especies.

En el hombre, la anafilaxia generalizada se presenta con prurito intenso, erupción urticarial, eritema, vómitos, cólicos intestinales, deposiciones líquidas, dificultad respiratoria, edema laríngeo, obstrucción bronquial e hipotensión arterial. La broncoconstricción y la vasodilatación que son causales de muerte pueden ser contrarrestadas con la administración de adrenalina. Este cuadro grave puede presentarse en reacciones adversas a drogas como penicilina y procaína y por picaduras de insectos en sujetos sensibilizados. En clínica humana son más frecuentes las reacciones localizadas en las vías respiratorias (rinitis alérgica, asma bronquial alérgica) y en la piel (urticaria).

La descripción clásica incluida en la clasificación de Gell y Coombs como reacción inmediata comprende los fenómenos que ocurren a los 15 a 30 minutos de la interacción del alérgeno con la IgE específica unida al receptor de alta afinidad en la membrana del mastocito, que determina la degranulación y liberación de mediadores de la fase inmediata.

La activación del mastocito también incrementa la síntesis de mediadores de la respuesta inflamatoria generados en el metabolismo del ácido araquidónico tales como prostaglandina A_2 , tromboxano y leucotrienos los que amplifican la respuesta tisular. Además participan linfocitos Th_2 que generan citoquinas características de la fase tardía como componente de la misma reacción (IL-4, IL-5, IL-10). En esta fase tardía se produce infiltración celular por eosinófilos, linfocitos y macrófagos, responsables de inflamación local iniciada por la interacción del alérgeno y la IgE. La persistencia de la hiperreactividad bronquial en el asma y de la hiperreactividad nasal en la rinitis alérgica es atribuida a la infiltración celular típica de la fase tardía. Estos conocimientos han permitido un tratamiento más racional de estas enfermedades que requieren fármacos antagonistas de los mediadores (antihistamínicos) o fármacos que reviertan los efectos de los mediadores sobre los receptores celulares (broncodilatadores) en la fase aguda combinados con uso prolongado de medicación antiinflamatoria (corticoides) para tratar la fase tardía



de infiltración celular responsable de la mantención de la hiperreactividad.

Los mecanismos desencadenados además producen en los tejidos locales un aumento en la permeabilidad capilar con el ingreso de moléculas biológicamente activas, anticuerpos séricos y células circulantes en los órganos blancos.

Además, la degranulación de mastocitos puede ser provocada sin la interacción antígeno-anticuerpo, por fármacos como morfina, codeína entre otras, por anafilotoxinas derivadas del sistema complemento y por acción de mediadores químicos de los linfocitos T.

4. HIPERSENSIBILIDAD CITOTÓXICA (TIPO II)

Este tipo de lesión mediada inmunológicamente se caracteriza por la presencia de anticuerpos dirigidos contra antígenos celulares o tisulares. En la actualidad, su importancia es menos significativa, ya que la presencia de tales anticuerpos es menos fundamental que la participación de complejos inmunes en las lesiones de los tejidos.

Pueden existir diferentes mecanismos

efectores en este tipo de reacción:

- El anticuerpo se une a los antígenos en las células o tejidos y activa la vía clásica del sistema del complemento produciendo citolisis y muerte celular. Ej: algunas reacciones hemolíticas.
- El anticuerpo citotóxico se une al antígeno celular o tisular y expone los fragmentos Fc que son reconocidos por células fagocíticas las cuales pueden destruir a la célula recubierta de anticuerpos o liberar enzimas o componentes que lesionan un tejido, en el caso de antígenos unidos a membranas basales. Ej: Síndrome de Goodpasture.
- Los anticuerpos unidos a su antígeno tisular actúan como mediadores de la llamada reacción citotóxica celular dependiente de anticuerpo (ADCC), en la cual las células efectoras pueden ser linfocitos, macrófagos o células NK. En esta situación, la célula efectora guiada por el anticuerpo citotóxico libera componentes que dañan el tejido donde se encuentra el antígeno (figura 21-2).

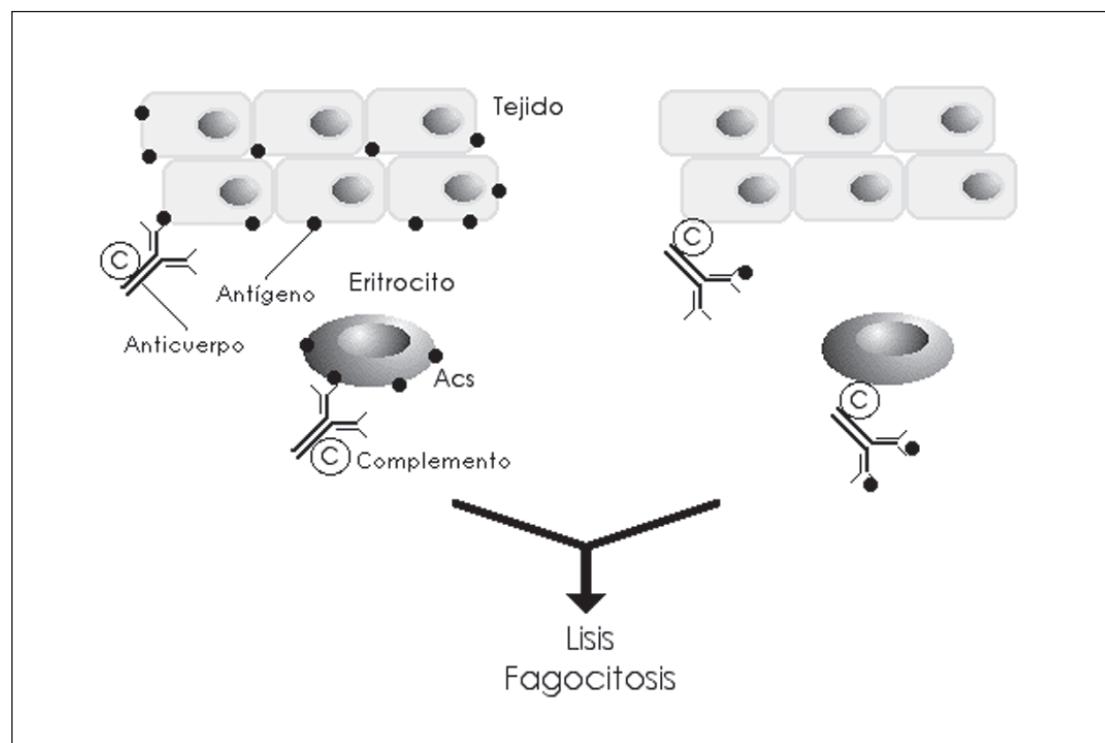


Figura 21-2. Representación de hipersensibilidad de tipo II o citotóxica.



El modelo experimental mejor conocido en que se ha estudiado este tipo de reacción es la llamada nefritis nefrotóxica que se produce en animales inyectados con suero que contenga anticuerpos contra la membrana basal del glomérulo. Estos anticuerpos son en su mayoría de tipo Ig G y pueden fijar complemento. En clínica humana, en el síndrome de Goodpasture que se manifiesta por hemorragia pulmonar, glomerulonefritis y anemia, es posible detectar anticuerpos circulantes antimembrana basal del capilar glomerular y pulmonar conjuntamente con depósitos lineales de inmunoglobulinas en las membranas basales del tejido renal y pulmonar mediante inmunofluorescencia.

Otras enfermedades en que participaría este mecanismo de daño citotóxico son: reacciones transfusionales, enfermedad hemolítica del recién nacido, anemia hemolítica autoinmune, citopenias por hipersensibilidad a drogas y rechazo hiperagudo de trasplantes, que se produce en sujetos receptores que tienen anticuerpos contra el tejido injertado.

5. HIPERSENSIBILIDAD MEDIADA POR COMPLEJOS INMUNES (TIPO III)

Corresponde al daño tisular provocado por la formación de complejos inmunes que no han sido eliminados oportunamente por el sistema fagocítico. Los anticuerpos que participan en este tipo de reacción son de diferente clase (isotipo) y su unión al antígeno puede ser reversible.

El anticuerpo habitualmente de clase IgM e IgG se une al antígeno y forma un complejo inmune que induce la activación del sistema complemento a partir de C1q (vía clásica). La activación del complemento genera anafilatoxinas y factores quimiotácticos cuya acción determina aumento de permeabilidad vascular y activación e infiltración de neutrófilos, que ingieren los complejos inmunes y liberan enzimas lisosómicas dañando las células y tejidos donde se encuentran depositados los complejos inmunes (figura 21-3).

El tipo de antígeno que participa en estas reacciones puede ser extrínseco o autoantígeno. Se manifestará como una enfermedad autoinmune cuando el antígeno corresponda a un autoantígeno o cuando presente reacción cruzada con un antígeno propio.

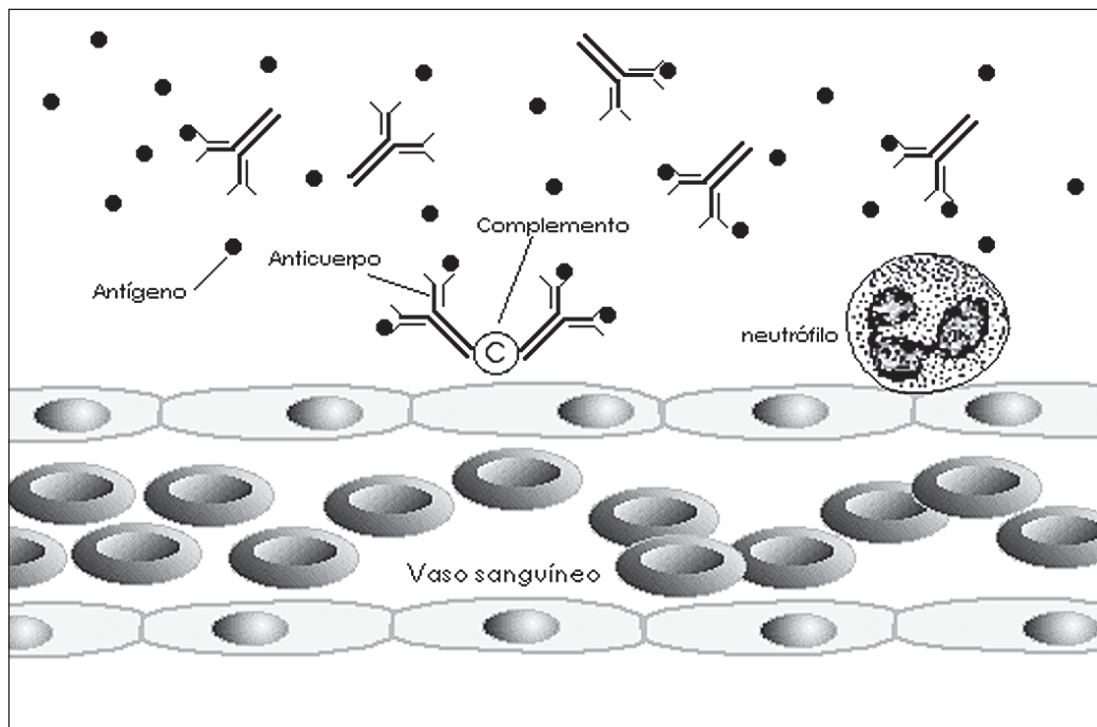


Figura 21-3. Representación de la hipersensibilidad de tipo III o por complejos inmunes.



Hay que considerar que no todos los complejos inmunes que constantemente se están formando desencadenan una respuesta nociva. Aquellos inmunocomplejos que sí son capaces de despertar respuesta de daño lo harán a través de la activación del complemento, de aminas vasoactivas que se liberan luego de la activación de los basófilos y de mastocitos.

Los inmunocomplejos se depositarán en tejidos u órganos determinados según el tamaño de los complejos inmunes, de factores hemodinámicos como áreas de turbulencias que ocasionan daño endotelial y también dependerá de la afinidad de unión del antígeno al anticuerpo.

Este grupo comprende dos tipos de reacciones por inmunocomplejos en que se produce daño tisular: el fenómeno de Arthus y la enfermedad del suero.

En el primer tipo se produce una precipitación de inmunocomplejos extravasculares con necrosis tisular local, con liberación de sustancias proteolíticas locales e infiltración neutrofílica en las paredes de los vasos. En las primeras horas aparece eritema y edema que aumentan progresivamente hasta tres a seis horas, para desaparecer en diez a doce horas. Las manifestaciones en esta fase son más agudas. Ejemplos de este subgrupo de reacciones se observan en las etapas agudas de las enfermedades pulmonares denominadas neumonitis por hipersensibilidad o alveolitis alérgicas extrínsecas que se producen en sujetos expuestos por vía inhalatoria a partículas orgánicas (esporas de hongos, proteínas aviarias, entre otras). Los enfermos así sensibilizados desarrollan síntomas generales como fiebre y escalofríos conjuntamente con disnea, tos, leucocitosis e infiltrados pulmonares, y tienen anticuerpos precipitantes en circulación, detectables mediante las pruebas específicas. La reacción se produce cuatro a seis horas después de la exposición al antígeno por vía inhalatoria, generando una intensa inflamación de la vía aérea y el tejido pulmonar que puede resolverse en 12 a 18 horas. La persistencia de las lesiones pulmonares con progresión a fenómenos de alveolitis y fibrosis parecen depender de la participación de otras células inflamatorias especialmente linfocitos, macrófagos y fibroblastos. Otros ejemplos son las reacciones post-inmunizaciones, reacciones a drogas e intolerancia insulínica.

En la enfermedad del suero la formación de inmunocomplejos ocurre en el compartimento intravascular y el depósito posterior se produce

en diferentes territorios tales como riñón, piel, articulaciones y vasos sanguíneos. La denominación de enfermedad del suero proviene de las observaciones hechas en las primeras décadas del siglo XX cuando se utilizaba principalmente suero de caballo como antisero para el tratamiento de la difteria, el tétanos u otras enfermedades infecciosas. Hasta un 50% de los enfermos tratados con este suero heterólogo presentaban fiebre, compromiso general, lesiones cutáneas urticariales y eritematosas, artralgias, linfadenopatías y esplenomegalia. Actualmente ocurren reacciones similares en casos de alergia a la penicilina y otras drogas y en enfermos trasplantados que reciben suero antilinfocitario como tratamiento o prevención del rechazo.

Existen numerosos ejemplos de enfermedades humanas en las cuales es posible encontrar complejos inmunes circulantes y depósitos en los tejidos, destacando la glomerulonefritis postestreptocócica, la endocarditis infecciosa, la infección por virus de hepatitis y enfermedades autoinmunitarias como artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico, especialmente en la nefritis lúpica.

6. HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA MEDIADA POR CÉLULAS (TIPO IV)

Se ha definido como hipersensibilidad tardía o retardada a las reacciones en que participan linfocitos T. A comienzos del presente siglo, von Pirquet denominó "alergia tuberculínica" a la respuesta cutánea positiva obtenida en sujetos infectados con bacilo tuberculoso, al estimular la piel con preparados del mycobacterium. En 1942, Landsteiner y Chase demostraron que era posible transferir en forma pasiva esta reacción tardía utilizando células inmunes y esto no ocurría con suero inmune.

Existen algunas dificultades para separar la inmunidad mediada por células y la hipersensibilidad retardada, ya que ambos términos describen el mismo fenómeno inmunológico, y se refieren a la respuesta inflamatoria mediada por linfocitos T que reaccionan con su antígeno específico, sin considerar si el resultado final es protector o nocivo para el individuo. En sentido más estricto las funciones efectoras del linfocito T se pueden definir como la citotoxicidad directa ejercida por linfocitos citotóxicos y la inmunidad mediada por células e hipersensibilidad tardía ejercida por LTH₁.



Las respuestas inflamatorias de este tipo son importantes en la eliminación de agentes infecciosos intracelulares, pero pueden dirigirse contra sustancias ambientales normalmente inocuas y causar enfermedad. Estas respuestas mediadas por células se expresan en 48 a 72 horas en el sujeto previamente sensibilizado y se caracterizan por el infiltrado inflamatorio predominantemente por células mononucleares, a diferencia de la hipersensibilidad mediada por anticuerpos que ocurre en minutos o algunas horas y presentan infiltrado de tipo polimorfonuclear.

El mecanismo de respuesta supone que LT inductores son activados por células presentadoras de antígeno, con liberación de citoquinas que expanden el clon de TH_1 los cuales secretan IL-2, $IFN\gamma$, $TNF\beta$, IL-3, GM-CSF, como principales mediadores activos que atraen y activan macrófagos, producen vasodilatación, depósitos de fibrina, formación de granulomas y destrucción tisular local (figura 21-4).

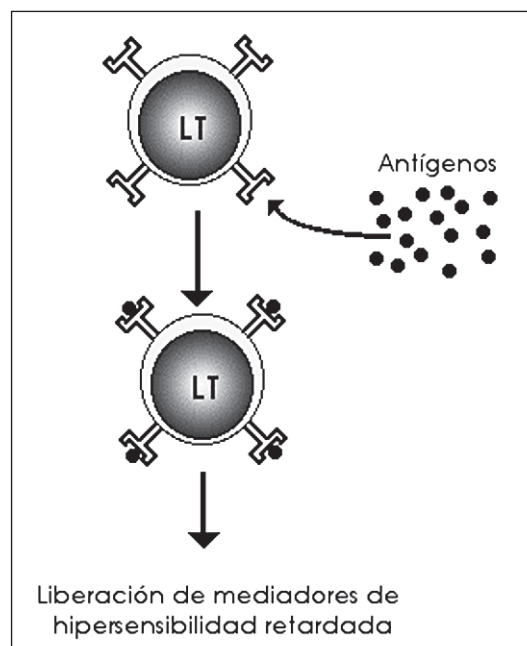


Figura 21-4. Representación de la hipersensibilidad de tipo IV o mediada por células.

Las características histopatológicas de las reacciones retardadas muestran infiltrados con predominio de linfocitos y monocitos, depósitos de fibrina, edema y destrucción tisular que en lesiones avanzadas origina la típica necrosis caseosa. El elemento típico es el granuloma constituido por acúmulos de linfocitos, neutrófilos escasos, célu-

las plasmáticas, células epiteloides y células gigantes multinucleadas. Su formación se interpreta como estimulación local persistente por antígenos de baja solubilidad y degradación que dan como resultado final esta respuesta local de células mononucleares transformadas. Aparece en procesos infecciosos, hipersensibilidad retardada a metales y partículas orgánicas y en sarcoidosis y otras enfermedades granulomatosas.

La inmunidad mediada por células y la hipersensibilidad retardada se pueden inducir por inmunizaciones y por contacto en la piel y mucosas con sustancias químicas sensibilizantes que muchas veces son haptenos que se unen a una proteína transportadora como en el caso de dermatitis por contacto. También se adquiere en forma natural en infecciones por patógenos intracelulares: virus, bacterias, hongos, protozoos y helmintos.

Así, se pueden describir cuatro tipos de reacciones en la hipersensibilidad retardada: a) la sensibilidad de contacto, b) la reacción tipo tuberculina, c) la reacción granulomatosa y d) la reacción de Jones Mote.

La reacción de **sensibilidad por contacto** es máxima a las 48 horas, es inducida por haptenos como el níquel que son capaces de atravesar las barreras cutáneo mucosas y se unen a las proteínas. Este complejo formado por hapteno y proteína transportadora es capaz de inducir la respuesta de linfocito T, con abundante infiltrado mononuclear en la epidermis tal como se ha observado en el eczema. La reacción de hipersensibilidad de **tipo tuberculina** se observa entre las 48 y 72 horas manifestándose con infiltración linfocítica mononuclear en la dermis. La **reacción granulomatosa** es la observada en la sarcoidosis y se produce por persistencia del antígeno en el macrófago favoreciendo la formación de células epiteloides y células gigantes multinucleadas. La **reacción de Jones Mote** es máxima a las 24 horas y se caracteriza por predominio de basófilos intralesionales.

Las pruebas cutáneas para hipersensibilidad retardada son útiles y sencillas para la evaluación general de la inmunocompetencia y en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Cuando se usan para diagnóstico, las pruebas positivas no necesariamente implican enfermedad y en la evaluación de la competencia inmunológica deben considerarse variables que pueden modificar sus resultados. La reactividad cutánea representa la capacidad individual de expresar la hipersensibilidad retardada a los antígenos inyectados y su

expresión depende de interacciones entre células linfoides y monocitarias. La anergia es la ausencia de reacción cutánea retardada a un grupo de antígenos habituales y bajo ciertas circunstancias puede considerarse como un estado de depresión de la inmunidad mediada por células. Existen numerosas condiciones clínicas relacionadas con anergia: inmunodeficiencias congénitas y adquiridas, infecciones y errores en el procedimiento técnico.

Las reacciones de hipersensibilidad tipo IV han demostrado ser parte de varias enfermedades autoinmunes organoespecíficas como la tiroiditis de Hashimoto y enfermedades del tejido conectivo como Polimiositis. También se observa en la Reacción Injerto contra Huésped y el Eritema nodoso.

Como se comentó anteriormente la clasificación de Gell y Coombs sigue siendo la más aceptada, sin embargo varios autores recientemente han propuesto modificaciones que ayudan a explicar las relaciones entre los mecanismos efectores, los elementos celulares y humorales involucrados, los efectos iniciales y la expresión final del daño tisular. Estas modificaciones incluyen subdivisiones de las reacciones clásicas que facilitan la comprensión de los avances en la interpretación de los mecanismos patogénicos de varias enfermedades inmunológicamente mediadas (tabla 21-1)

LECTURAS SUGERIDAS

Galli, S.J., Lantz, C.S., "Allergy" en Paul WE., **Fundamental Immunology**, 4ª ed., Philadelphia, Lippincott Raven, 1999, pp. 1127-1174.

Janeway C.A. Jr, Travers, P., **Immunobiology: The immune system in health and disease**, New York, Garland Publishing Inc., 1994.

Kay, A.B., "Allergy and allergic diseases" *N Engl J Med*, 344:30-37, 2001.

Quezada A., Gimpel, S., Miranda, D., Las Heras, J., Andreis, M., "Ultrastructural features of alveolar cells in experimental hypersensitivity pneumonitis", *Respiration* 51: 127-36, 1987.

Quezada, A., von Stowasser, V., Murray, G., Andreis, M., "Modelo experimental de neumonitis por hipersensibilidad en ratas", *Rev Med Chil* 111(4):389-396, 1983.

Terr, A., "Mecanismo de hipersensibilidad" en **Inmunología Básica y Clínica**, Editores: Stites y Terr. Manual Moderno México, capítulo 29, pp. 425-38, 1993.

Tabla 21-1. Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad de Gell y Coombs modificada

TIPO I		TIPO II		TIPO III	TIPO IV		
IgE		a	b	IgG	a 1	a 2	b
		Ig G			Th 1	Th 2	LT citotóxico
ANTIGENO	Antígeno soluble. Alergeno	Alergeno asociado a una célula o tejido	Receptores de superficie celular	Antígeno soluble	Antígeno soluble	Antígeno soluble	Antígeno asociado a una célula
MECANISMO EFECTOR	Activación de células cebadas	Complemento Células FcγR+ Fagocitos y NK	Señales alteradas por anticuerpo	Células FcγR+, complemento	Activación de macrófagos	Eosinófilos Basófilos	Citotoxicidad directa
EJEMPLO	Rinitis Alérgica Asma Anafilaxia	Alergia a penicilina Reacción transfusional Anemia Hemolítica AI*	Enfermedad de Graves Miastenia Gravis	Lupus Eritematoso Sist. Enfermedad del suero	Dermatitis de contacto Reacción tuberculínica	Inflamación alérgica crónica	Rechazo trasplante Diabetes Mellitus

*AI=Autoimmune



Capítulo 22

ANAFILAXIS

Patricia Díaz A.

- | | |
|---|--|
| 1. Introducción | 4. Causas de reacciones anafilactoideas |
| 2. Fisiopatología | 4.1. Aditivos |
| 2.1. Mastocitos | 4.2. Medios de contraste |
| 2.2. Degranulación de mastocitos y basófilos | 4.3. Ácido acetil salicílico (AAS) y anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) |
| 2.3. Participación de cascadas de la inflamación en la reacción anafiláctica y anafilactoidea | 5. Reacciones anafilácticas y anafilactoideas en pabellones quirúrgicos |
| 2.4. Alteraciones funcionales | 6. Signos y síntomas |
| 3. Causas de anafilaxis | 7. Laboratorio |
| 3.1. Fármacos | 8. Tratamiento |
| 3.2. Látex | |
| 3.3. Picaduras de himenópteros | |
| 3.4. Alimentos | |
| 3.5. Anafilaxis inducida por inmunoterapia | |
| 3.6. Anafilaxis inducida por ejercicio | |
| 3.7. Anafilaxis idiopática | |





RESUMEN

Las reacciones anafilácticas son un conjunto de manifestaciones clínicas producidas por la descarga masiva de mediadores de la inflamación desde los mastocitos. La liberación de mediadores puede ser derivada de la reacción antígeno-IgE unido a mastocito (anafilaxis) o por la descarga de mediadores no mediada por IgE (reacciones anafilactoideas). Las manifestaciones clínicas son las mismas en ambos casos e incluyen: urticaria, enrojecimiento de piel, obstrucción respiratoria, cólicos abdominales, diarrea, hipotensión y shock. Las causas son múltiples e incluyen todas aquellas condiciones capaces de desencadenar la activación de mastocitos en individuos sensibilizados y no sensibilizados. Es un cuadro clínico que puede ir de leve a severo, requiere tratamiento de emergencia y aquellos individuos a riesgo deben aprender a tomar medidas preventivas y de automanejo de primeros auxilios.

1. INTRODUCCIÓN

El término anafilaxis fue acuñado por Portier y Richet en 1902 cuando, al intentar inducir inmunidad, sensibilizaron a perros con veneno de anémona de mar. Estos animales en contactos posteriores con el veneno, hicieron reacciones anafilácticas fatales con pequeñas dosis del antígeno. Estos investigadores, llamaron anafilaxis o “sin protección” a esta reacción como opuesto al término profilaxis o “protección”.

Actualmente, anafilaxis se refiere a los signos y síntomas derivados de la reacción inmunológica de hipersensibilidad inmediata mediada por IgE, que produce una descarga masiva de mediadores de la inflamación desde los mastocitos y basófilos, alterando fundamentalmente vasos sanguíneos y músculo liso. Aunque en un sentido estricto podríamos incluir en la definición de **anafilaxis** las reacciones locales como los síntomas de rinitis alérgica al inhalar y depositarse un antígeno, este término se usa para la reacción generalizada, multiforme y alejada del sitio de entrada del alérgeno. Esta reacción es indistinguible desde el punto de vista clínico de la **reacción anafilactoidea**, en que la descarga de mediadores no es mediada por IgE.

2. FISIOPATOLOGÍA

2.1. Mastocitos

Los mastocitos humanos son un grupo heterogéneo, multifuncional de células con roles en diversas condiciones como alergia, infestación parasitaria, angiogénesis y remodelación tisular. Se originan de células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea, entran a la circulación como precursoras de células mononucleadas que expresan mRNA de “stem cell factor”(SCF) y receptores para SCF en su membrana. De la sangre migran a los tejidos donde bajo la influencia de los factores microambientales, se diferencian y maduran como mastocitos. Su origen es muy diferente a los basófilos que derivan de los precursores de granulocitos al igual que los eosinófilos y entran a la circulación cuando ya están maduros. Al mismo tiempo, los basófilos no migran hacia los tejidos en condiciones normales, esta migración se ha descrito en la fase tardía de la respuesta alérgica.

Los estudios inmunocitoquímicos han demostrado la presencia de dos fenotipos de mastocitos, dependiendo del contenido de proteasas neutrales: **mastocitos Mt** que contienen sólo triptasa y **mastocitos Mtc** que contienen triptasa y quimasa. Al comienzo se atribuyó su presencia a las diferentes localizaciones, mucosas y tejido conectivo. Actualmente, sabemos que la presencia de ellos depende más de la patología que del tipo de tejido así los Mt estarían relacio-



nados con el sistema inmune con un rol importante en la defensa y localizados preferentemente en las mucosas, están aumentados en número en áreas donde hay infiltración linfocitaria y en enfermedades alérgicas. En cambio los Mtc que se encuentran preferentemente en submucosas y tejido conectivo, no estarían relacionados con el sistema inmune y tendrían una función primaria en angiogénesis y remodelación tisular.

Las reacciones de hipersensibilidad inmediata se inician cuando las moléculas de alérgeno se unen a dos moléculas de IgE en la superficie celular del mastocito, entrecruzando sus regiones Fab (ver capítulo 20). Esto permite así el movimiento de los receptores Fc que inducen la activación de la membrana celular y los eventos citoplasmáticos que culminan en la liberación de mediadores preformados contenidos en los gránulos y la generación de nuevos productos como los eicosanoicos y citoquinas.

2.2. Degranulación de mastocitos y basófilos

Las manifestaciones clínicas de las reacciones anafilácticas y anafilactoideas se deben a la liberación de mediadores desde los mastocitos y basófilos a saber:

a) Mediadores preformados

Varias moléculas se encuentran preformadas en los mastocitos y basófilos (tabla 22-1).

La Histamina o B-imidazoletilamina, fue sintetizada en 1907 y denominada histamina o derivada de tejidos (del griego histos). Posteriormente, al inyectar histamina por vía endovenosa, fue posible reproducir los síntomas de animales sensibilizados, por lo que se consideró ser el mediador humoral de las reacciones alérgicas. La histamina es sintetizada en el aparato de Golgi de los mastocitos y basófilos, a partir de la decarboxilación de la histidina su aminoácido precursor. Una vez formada la histamina se une a los residuos ácidos de la cadena de glicosaminoglicano de la heparina u otro proteoglicano. La cantidad de histamina en mastocitos humanos aislados de pulmón, piel, tejido linfóide e intestino delgado es de 3-8 pg por célula. Niveles bajos de histamina son secretados en forma continua, pero se desconoce su estímulo, niveles más altos de secreción se produce cuando la célula es estimulada con antígenos, anti-IgE, concanavalina A, sustancia P, poliaminas, opiáceos, compuesto 48/80 y una variedad de citoquinas. Hay evidencias que sugieren que subpoblaciones de mastocitos difieren

Tabla 22-1. Mediadores preformados de mastocitos humanos

Tipo de mediador	Mediador	Función
Amina biogénica	Histamina	Contracción músculo liso y células Endoteliales
Proteasas neutrales	Triptasa Quimasa	Rompe C3 y C3a Activa fibroblastos Rompe neuropéptidos
Hidrolasas	B-hexosaminidasa B-glucoronidasa B-D-galactosidasa Arilsulfatasa	Hidrolisa carbohidratos complejos Hidrolisa carbohidratos complejos Hidrolisa carbohidratos complejos Hidrolisa sulfatos esterres aromáticos
Proteoglicanos	Heparina Condroitin sulfato	Anticoagulante Desconocida
Enzimas oxidativas	Superoxidismutasa Peroxidasa	Convierte O ₂ a H ₂ O ₂ Convierte H ₂ O ₂ a H ₂ O
Factores quimiotácticos	ECF-A NCF-A	Atrae y activa eosinófilo Atrae y activa neutrófilos

ECF-A, Factor quimiotáctico de eosinófilo; NCF-A, Factor quimiotáctico de neutrófilos



según el estímulo, tanto en la variedad como velocidad de liberación de los diferentes mediadores. La histamina extracelular es rápidamente metabolizada a través de dos vías enzimáticas, metilación (70%) y oxidación (30%). La metilación es catalizada por una enzima intracelular la N-metiltransferasa transformándola a N-metilhistamina que es excretada por el riñón. Parte de este producto metilado es oxidado por la monoaminooxidasa y excretada como ácido metilimidazol acético. También, la histamina puede ser directamente oxidada por la diaminoxidasa (histaminasa) y eliminada como ácido imidazol acético.

La histamina actúa en una gran variedad de tejidos mediante receptores específicos. Gracias al desarrollo de sustancias químicas que antagonizan en forma específica una variedad de efectos farmacológicos de la histamina, ha sido posible determinar tres subtipos de receptores: H1, H2 y H3. La ocupación de los receptores H1 de la histamina produce contractura de la musculatura lisa gastrointestinal y de la vía aérea. La inhalación de histamina es usada en clínica como test para determinar el grado de hiperreactividad bronquial no específica en el asma bronquial. La inyección intradérmica de histamina, causa una triple respuesta, (a) eritema local producto de la vasodilatación arteriolar mediada por receptores H1 y H2; (b) una respuesta algo más tardía con mayor enrojecimiento producido por neuropeptidos con acción vasodilatadora como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y (c) luego se forma una pápula que es consecuencia del edema que sigue a la contracción de las células endoteliales de las vénulas postcapilares y la exudación de plasma. La mayor parte de la formación de mácula y pápula es por respuesta de receptores H1, los receptores H2 juegan un rol secundario.

b) Mediadores neoformados

La degranulación de mastocitos y basófilos produce también la liberación de otros mediadores que activan otras vías de la inflamación, así la quinogenasa de mastocitos y la calicreína de basófilos puede activar el sistema quinina. La tripsina puede activar la calicreína, el sistema complemento y el fibrinógeno. El factor activador de plaquetas puede activar el sistema de coagulación y producir coagulación intravascular diseminada. Factores quimiotácticos atraen eosinófilos que

pueden intensificar y prolongar la inflamación. Por otro lado la heparina al inhibir la plasmina y calicreína, inhibe la coagulación. La quimasa es capaz de convertir la angiotensina I en angiotensina II y podría, teóricamente, aumentar la respuesta compensatoria a la hipotensión. En la tabla 22-2 se muestran mediadores neoformados.

Productos derivados del ácido araquidónico

Los productos derivados del ácido araquidónico no están preformados, se forman al activarse la célula. Ellos son prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y lipoxinas. Al activarse el mastocito mediante entrecruzamiento de los receptores para Fc de la IgE u otro estímulo, se activa la fosfolipasa (PLA2) mediante aumento de calcio y su fosforilación por una quinasa.

El ácido araquidónico es metabolizado por dos vías, mediante las enzimas ciclooxigenasa (COX) y lipoxigenasa formando prostaglandinas y leucotrienos respectivamente. La enzima COX se encuentra en dos formas, COX 1 que se encuentra en forma constitutiva en diferentes tipos de células. COX2 que es altamente inducible por la acción de citoquinas pro-inflamatorias, endotoxinas, ésteres del forbol (PMA), y factores de crecimiento. Tanto la enzima como su mRNA es reducido con los corticoides. La generación de prostanoides mediante COX2 en macrófagos, mastocitos y polimorfonucleares se asocia a inflamación, dolor y fiebre. Los mastocitos humanos y no los basófilos producen prostaglandina D2 (PGD₂) lo que ha servido para identificar su presencia en reacciones alérgicas ya que ambas células producen histamina.

El ácido araquidónico puede ser metabolizado por una variedad de lipoxigenasas, cuando es metabolizado por la 5-lipoxigenasa se producen los leucotrienos. Así el araquidonato es convertido a 5HPTE y luego a leucotrieno A₄. LTA₄ es convertido a dihidroxil leucotrieno LTB₄ y luego a cisteinil leucotrieno LTC₄. El rompimiento de glutamina y glicina produce los metabolitos LTD₄ y LTE₄, respectivamente.

Factor activador de plaquetas

El Factor activador de plaquetas (PAF) es un fosfolípido ligado a un grupo éter. El PAF es sintetizado por acción de la fosfolipasa A que hidrolisa 1-O alquil-2 acilgliceril-3 fosforilcolina para producir lisoPAF. Este metabolito es transformado a



Tabla 22-2. Mediadores generados durante la activación de mastocitos

Mediador	Función
LTC4, LTD4, LTE4	Contracción músculo liso Aumento secreción vía aérea Dilatación y aumento de permeabilidad vasos Disminuye la contractilidad miocárdica Contracción arterias coronarias y cerebrales
LTE4	Hiperreactividad vía aérea
LTB4	Quimiotaxis y activación neutrófilos Aumenta adherencia leucocitos a endotelio Aumenta función células NK
PGE2	Dilatación y aumento permeabilidad de vasos Broncodilatación
PGD2	Broncoconstricción
PGF2alfa	Broncoconstricción Constricción vasos pulmonares
TxA2	Broncoconstricción Aumenta adherencia leucocitos Aumento agregación y adherencia plaquetaria
PAF	Agregación plaquetaria Quimiotaxis y degranulación de eosinófilos y neutrófilos Aumenta permeabilidad vascular Broncoconstricción

PAF mediante la acetilación por una enzima acetiltransferasa. La producción de PAF fue descrita en un comienzo por activación de basófilos de conejos. Mastocitos humanos purificados de pulmón también producen PAF y en menor cantidad lisoPAF, que tiene menor actividad que PAF. En contraste con las plaquetas de conejo, las humanas son menos sensibles a la acción de PAF. Sin embargo, este mediador tiene acción importante en neutrófilos humanos, en los cuales ejerce una acción quimiotáctica, cambios estructurales, liberación de enzimas lisosomales y generación de radicales libres. Estas acciones también pueden ser producidas por la generación de LTB4. PAF también tiene acción quimiotáctica de eosinófilos tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que ha hecho especular que tendría un rol importante en la infiltración eosinofílica en alergias. La inhalación de PAF produce bronco-constricción en individuos asmáticos y no asmáticos. Sin embargo, potentes antagonistas de PAF no son capaces de inhibir la bronco-

constricción inducida por inhalación de alérgenos en individuos asmáticos sensibilizados. Por lo tanto es dudoso su rol en el asma bronquial pero en anafilaxis no ha sido descartado.

Citoquinas

Mastocitos purificados de pulmón humano incubados con SCF y anti-IgE expresan mRNA para diversas citoquinas como: IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, GM-CSF y TNF α (ver capítulo 11).

- **Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α):** se encuentra preformado en los gránulos de mastocitos. En mucosa nasal y bronquial se encuentra asociado a la subclase de mastocitos Mt y en mastocitos de piel se encuentra asociado a la subclase Mtc. En individuos con rinitis alérgica TNF es liberado junto con triptasa a los minutos de la provocación con alérgeno. Esto contrasta con las células clá-



sicas productoras de TNF como macrófagos y linfocitos que no guardan esta citoquina preformada y se libera después de su activación y transcripción y por lo tanto de manera mucha más lenta que de los mastocitos. La rápida liberación de TNF por mastocitos puede tener gran importancia en la inflamación alérgica, ya que TNF es crucial para la activación de NFkB, factor de transcripción que aumenta la expresión de mRNA de GM-CSF, IL-8, IL-6, E-Selectina, VCAM-1 e ICAM-1 en diversas células epiteliales y endoteliales.

- **Interleuquina-5 (IL-5):** es crucial para la maduración, activación y supervivencia de eosinófilos. La producción de IL-5 se inicia con la activación de mastocitos mediante entrecruzamiento de los receptores para IgE. Se produce sólo en la subclase MTt, mastocitos que están bajo control de células T y están aumentados en sitios de inflamación alérgica crónica.
- **Interleuquina-4 (IL-4):** es responsable del estímulo y mantención de la proliferación de linfocitos Th2 y de la síntesis de IgE por células B. Por técnicas inmunocitoquímicas se ha determinado la presencia de IL-4 en el 80% de mastocitos de la mucosa bronquial. Se encuentra en los gránulos de mastocitos Mt y Mtc.

2.3. Participación de cascadas de la inflamación en la reacción anafiláctica y anafilactoidea

Los diversos mediadores producidos por mastocitos y basófilos pueden activar un gran número de vías inflamatorias incluyendo: sistema de las quininas, sistema del complemento, sistema de la coagulación y fibrinólisis. La participación de estas cascadas proinflamatorias ha sido demostrada en individuos alérgicos sometidos a inmunoterapia controlada. Cuando el individuo sufre una reacción sólo urticarial, no experimenta cambios de sus niveles sanguíneos de histamina ni otros mediadores. Sin embargo, cuando estos pacientes han experimentado shock, se elevan significativamente los niveles de histamina en sangre periférica, la que se correlaciona con la severidad de la hipotensión y en algunos pacientes con episodios más severos se observa disminución de factores de la coagulación como factor V, factor VIII, fibrinógeno, quinínogeno, y de los componentes C3, C4 del complemento. La se-

veridad de la reacción anafiláctica se ha correlacionado con los niveles de la anafilatoxina C3a, indicando una participación de la cascada del complemento. Otros estudios han demostrado la participación del sistema calicreína en el desarrollo de angioedema durante una crisis de anafilaxis.

La participación de los sistemas de complemento, coagulación, y calicreína-quinina, puede ser consecuencia de la liberación de triptasa y quininogenasa de los mastocitos y calicreína desde los basófilos, sin embargo la hipoxia y el daño endotelial producido durante el shock pueden activar estos sistemas, como ha sido descrito en otros shock con hipotensión severa (cardiovascular, endotóxico).

Más recientemente en modelos experimentales animales, se ha demostrado la participación del óxido nítrico (NO) durante la anafilaxis. El NO es producido por el endotelio vascular en forma constitutiva, y su producción puede ser inducida en diferentes células como mastocitos, células del músculo liso y otras, por numerosos mediadores, incluyendo histamina, leucotrieno C4, bradiquinina y sustancia P. El NO causa relajación del músculo liso y aumenta la permeabilidad vascular produciendo hipotensión.

2.4. Alteraciones funcionales

La mayoría de los signos y síntomas de la reacción anafiláctica pueden ser explicados por la acción de los mediadores analizados anteriormente. Aunque cualquier órgano puede estar afectado, lo más frecuente es que haya compromiso de piel, tracto respiratorio, gastrointestinal y cardiovascular. Éstos pueden comprender: eritema cutáneo, prurito, sensación de calor que puede ir progresando hasta llegar a la urticaria generalizada y angioedema. Los signos y síntomas respiratorios incluyen estornudos, laringoespasma con estridor inspiratorio, broncoespasmo con sibilancias, y disnea. Algunos pacientes presentan náuseas, vómitos, diarrea y dolores abdominales. El compromiso cardiovascular se manifiesta por hipotensión acompañada de taquicardia y con menos frecuencia bradicardia y arritmias. La resistencia al flujo de la vía aérea y la caída de la PO₂ se puede atribuir al efecto contráctil directo de la histamina y otros mediadores que actúan sobre el músculo liso bronquial. También a la acción de la histamina puede deberse la aparición de urticaria, sensación de calor, angioedema y síntomas gastrointestinales. Los estudios sobre



hipotensión durante las reacciones anafilácticas y anafilactoideas, se han realizado cuando estos episodios han ocurrido durante anestesia o cateterización cardíaca. Esto ha permitido medir los fenómenos hemodinámicos, con lo cual se ha determinado que el evento inicial es la vasodilatación con pérdida masiva de líquido del intravascular y paso al extravascular, llegando hasta perder el 50% del volumen en 10 minutos. La caída de la presión arterial se correlaciona con elevación de histamina, triptasa y C3a. Como mecanismo compensatorio se liberan catecolaminas; norepinefrina y epinefrina; se activa el sistema angiotensina con conversión de angiotensina I a angiotensina II. La respuesta vasopresora compensatoria es variable, en algunos pacientes, la resistencia vascular periférica se eleva en forma anormal, mientras en otros cae a pesar de la masiva liberación de catecolaminas. Así, estos pacientes pueden estar en vasoconstricción máxima y no responden a agentes vasopresores, por lo tanto como la causa de hipotensión en el shock anafiláctico es la pérdida de líquido del espacio intravascular, la terapia de elección es el reemplazo de líquido y los expandedores de volumen.

3. CAUSAS DE ANAFILAXIS

Los alérgenos que han sido involucrados como agentes causales de anafilaxis son generalmente proteínas o fosfolípidos grandes. Sin embargo, moléculas pequeñas que actúen como haptenos uniéndose a proteínas del organismo pueden desencadenar reacciones alérgicas. La respuesta requiere de la exposición previa al antígeno y la síntesis de anticuerpo IgE. Sin embargo, la exposición al antígeno puede pasar inadvertida y presentarse una reacción anafiláctica frente a antígenos que se desconoce estar sensibilizados.

3.1. Fármacos. Los antibióticos son los fármacos que con más frecuencia producen reacciones alérgicas y entre ellos los betalactámicos y sulfas. Es más probable que se produzca una reacción anafiláctica cuando la vía de ingreso del antibiótico es inyectable. Se ha descrito reacciones anafilácticas a la primera inyección de penicilina, condición que es rara, indicando que la sensibilización puede ocurrir sin que el individuo esté consciente de haber recibido la droga. La alergia a drogas no es más frecuente en atópicos que en la población general pero sí lo es cuando hay antece-

denes familiares de alergia a drogas. La incidencia de alergia a penicilina es de alrededor de 2% de las personas en tratamiento y reacciones fatales de 1 en 32.000 inyecciones. Cuando un individuo ha sufrido una reacción alérgica a drogas la conducta futura es evitarla y sólo cuando esto no es posible, intentar un tratamiento desensibilizante.

3.2. Látex. Hasta 1980 esta reacción era poco frecuente, actualmente con el aumento del uso de látex ha aumentado su frecuencia y constituye un problema de salud pública para grupos de riesgo. Entre 8-17% de los trabajadores de la salud en USA, están sujetos a reacciones al látex. Entre los dadores de sangre se ha demostrado que alrededor de un 6% tiene IgE anti-látex lo que explica las reacciones alérgicas producidas con látex en individuos que desconocen estar en riesgo.

3.3. Picaduras de Himenópteros. Varios grupos de insectos que se caracterizan por tener lanceta por la cual inyectan el veneno están comprendidos en esta clasificación, a saber las *Apidae*, *Vespidae* y *Formicidae*. Los alérgenos contenidos en el veneno de los himenópteros son proteínas y muchos son enzimas. También contienen péptidos que no son alergénicos pero son responsables de las manifestaciones tóxicas. Además de las proteínas y péptidos contienen aminas vasoactivas como: histamina, 5-hidroxitriptamina, dopamina, norepinefrina y acetilcolina. Las reacciones reportadas por veneno de abeja varían entre un 0.4-3%. En USA alrededor de 25-50 personas mueren anualmente por picaduras de himenópteros, algunos de ellos sin tener antecedentes de reacción alérgica a insectos. La manera más rápida, simple y económica de identificar individuos sensibilizados, es el test cutáneo. La presencia de test cutáneo positivo a veneno de himenópteros, determina sensibilización previa, pero no predice la forma de reaccionar del individuo, y no discrimina entre aquellos individuos con reacción local de los con reacción sistémica. Niveles elevados de IgE se observan sólo en el 80% de los individuos con test cutáneo positivo. Además no hay correlación entre el nivel de IgE y el grado de sensibilización del individuo.

3.4. Alimentos. De los pacientes atendidos por anafilaxis en un servicio de urgencia, en un tercio la causa es una reacción alérgica a alimentos. Hay gran variedad de alimentos que pueden ser causa de sensibilización, pero los más frecuentes en pro-



ducir reacciones anafilácticas son: mariscos, clara de huevos, maní, nueces, castañas de cajú, soya, y pescados.

3.5. Anafilaxis inducida por inmunoterapia.

Durante el tratamiento con inmunoterapia con extractos alérgicos a pacientes con rinitis alérgica y asma bronquial alérgica, se pueden producir reacciones anafilácticas. Esto ha llevado a que en países como el Reino Unido su uso sea prohibido y en otros como USA, comités de expertos han dado pautas de recomendaciones de uso, poniendo especial cuidado en el manejo de pacientes asmáticos, ya que tienen más riesgo de hacer reacciones fatales.

3.6. Anafilaxis inducida por ejercicio. El síndrome de anafilaxis inducida por ejercicio fue descrito en una serie de individuos que presentaban prurito de piel, urticaria, angioedema, sibilancias e hipotensión en relación a ejercicio. En estos pacientes se ha demostrado degranulación de mastocitos y elevación de histamina aunque ésta no se correlaciona con los síntomas que presentan. Cerca del 70% de pacientes con este síndrome son atópicos. Hay una variante que es la anafilaxis inducida por ejercicio en relación a comidas. Se ha descrito en pacientes que han presentado anafilaxis con ejercicio cuando han ingerido mariscos entre 2 y 24 horas antes. En otros pacientes la sintomatología se habría manifestado después de la ingesta de apio y ellos presentaban un test cutáneo positivo a apio. En este subgrupo de pacientes, las manifestaciones de anafilaxis se presentan sólo cuando hay ingesta de determinados alimentos y ejercicio simultáneamente.

3.7. Anafilaxis idiopática. En alrededor de dos tercios de los pacientes que presentan una reacción anafiláctica no es posible determinar su causa. Afortunadamente estos casos son raramente fatales.

4. CAUSAS DE REACCIONES ANAFILACTOÍDEAS

4.1. Aditivos. Los aditivos en los alimentos cumplen diversas funciones como colorantes, saborizantes y preservantes. Hay cerca de 3000 sustancias permitidas de ser agregadas en alimentos. En general se usan en pequeñas cantidades y la gran mayoría no causa reacciones adversas.

Algunos de estos aditivos han sido causantes de reacciones sistémicas, en que no ha sido demostrada la IgE específica. Entre ellos los colorantes sintéticos (anhilinas) como la tartrazina, carmasina, amaranto, índigo y otros; los preservantes como los derivados de sulfitos que cumplen múltiples funciones, los benzoatos y parabene. Estos son los que con mayor frecuencia han sido señalados como agente causal de reacciones anafilactoídeas.

4.2. Medios de contraste. Las reacciones a medios de contraste utilizados en exámenes radiológicos han disminuido con la introducción de agentes de baja osmolaridad. Las reacciones con agentes hiperosmolares se estimaron en un 1%. En USA alrededor de 8 millones de personas reciben anualmente medios de contraste y de ellas alrededor de 2700 hacen reacciones severas y 500 mueren.

4.3. Ácido acetil salicílico (AAS) y anti-inflamatorios no esteroideos (AINE). La patogenia de la reacción inflamatoria inducida por AAS y AINE es debida a la unión inmediata de estos medicamentos con la cicloxigenasa COX-1 que previene la síntesis de prostaglandinas incluyendo PGE₂, permitiendo la metabolización del ácido araquidónico por la vía de la lipoxigenasa con la formación de leucotrienos. Se ha demostrado que las células mononucleares de los individuos sensibles a la aspirina tienen gran susceptibilidad por la inhibición de COX-1 con AAS comparados con los individuos que no reaccionan a estas drogas. Con la provocación oral con aspirina en individuos que reaccionan con rinorrea, se ha determinado aumento de histamina, LTC₄, triptasa y una disminución de PGE₂ en líquido de lavado nasal, indicando la participación de mastocitos. La sintomatología puede ser prevenida con el uso de antileucotrienos que inhiben sus receptores o su síntesis.

La incidencia reportada varía dependiendo de la población seleccionada para el estudio. Ésta va desde 2% en grupos de niños hasta 97% en adultos con asma y rinosinusitis o pólipos nasales. En un estudio de 51.979 pacientes que estaban ingiriendo estos medicamentos se reportó 35 casos de shock pero en un grupo de pacientes que habían presentado reacción anafiláctica sólo el 3% tenía como agente causal a la AAS.



5. REACCIONES ANAFILÁCTICAS Y ANAFILACTOÍDEAS EN PABELLONES QUIRÚRGICOS

Se desconoce la incidencia de estas reacciones en el acto operatorio. Hay múltiples agentes utilizados durante el acto operatorio que pueden causarlas, incluyendo el látex, ralajantes neuromusculares derivados de amonio terciario y cuaternario, sustitutos del plasma y la aplicación de otras drogas endovenosas como opioides, protaminas y otras. Hay estudios que muestran que las reacciones anafilácticas y anafilactoídeas durante la anestesia estarían aumentando. Las cifras varían entre 1 en 5.000 y 1 en 25.000 con una mortalidad de 3-4%. En el Reino Unido un 4.3% de las muertes en el acto operatorio se deberían a reacciones a drogas. Las reacciones a anestésicos como tiopental varían entre 1 en 15.000 a 1 en 30.000. Los expandedores de volumen se asocian a reacciones anafilactoídeas variando su incidencia entre 1 en 17.000 con hidroetilalmidón y 1 en 2.600 con gelatina.

6. SIGNOS Y SÍNTOMAS

En la tabla 22-3 se indica la frecuencia de aparición de signos y síntomas en reacciones anafilácticas. La serie comprende diversos estudios incluyendo 747 pacientes con episodios anafilácticos de diferente origen y a pesar de la diversidad de agentes causales, la frecuencia de signos y síntomas son similares, indicando que el mecanismo fisiopatológico es el mismo. La urti-

caria y el angioedema son las manifestaciones más comunes, seguidas de alteraciones respiratorias con obstrucción respiratoria alta, disnea y sibilancias y en un 33% mareos e hipotensión. Con menor frecuencia se dan las manifestaciones gastrointestinales incluyendo vómitos, diarrea y dolor abdominal. Se ha descrito colapso cardiovascular inmediato sin ser precedido por síntomas respiratorios o urticaria pero en un 30% precedidos por síntomas gastrointestinales y en el 85% había signos neurológicos de alteración de conciencia, temblor y espasmos musculares.

El comienzo de los síntomas se produce entre 5-30 minutos después de haber recibido el antígeno vía inyectable. Cuando el antígeno es ingerido los síntomas aparecen habitualmente alrededor de las 2 horas, pero también pueden aparecer mas tardíamente. Hay correlación entre la velocidad de aparición de los síntomas y la severidad del ataque. Un episodio puede desaparecer y reaparecer después de varias horas, es lo que se llama anafilaxis bifásica. Además los episodios pueden mantenerse y reaparecer después de varios días con múltiples recurrencias y largos intervalos asintomáticos.

La muerte por anafilaxis se debe a la obstrucción de la vía aérea y/o colapso cardiovascular. En estudios post mortem de pacientes con obstrucción respiratoria se observa pulmón hiperinflado y edema de las vías aéreas, la obstrucción de la vía aérea se debe a una combinación de espasmo muscular edema de la submucosa, y acumulación de secreciones en el lumen. También se observa infiltración celular especialmente de eosinófilos en vasos pulmonares, en la lámina propia del

Tabla 22-3. Signos y síntomas en reacciones anafilácticas

Signos y síntomas	Frecuencia (%)
Urticaria, Angioedema	88
Disnea, Sibilancias	47
Mareos, Hipotensión	33
Náuseas, Vómitos, Diarrea, Dolor abdominal	30
Enrojecimiento	46
Edema vía aérea alta	56
Dolor de cabeza	15
Rinitis	16
Dolor retroesternal	6



tracto gastrointestinal. Cuando predomina el colapso vascular es posible encontrar signos de isquemia miocárdica. Individuos que han muerto por una reacción anafiláctica bien documentada se ha demostrado niveles altos de triptasa. Es posible obtener IgE específica y niveles de triptasa en suero de cadáveres hasta 15 horas post mortem, esto permitiría en casos de muerte súbita, determinar si ésta ha ocurrido por una reacción anafiláctica.

7. LABORATORIO

El diagnóstico de anafilaxis es clínico. Sin embargo en algunas circunstancias cuando éste no es claro o se debe descartar otros diagnósticos, puede ser de utilidad la cuantificación de los niveles de histamina y de triptasa sérica y de histamina en orina, ya que indica que ha habido descarga de mediadores de mastocitos. La histamina plasmática se eleva a los 5-10 minutos y permanece elevada 30-60 minutos. No ayuda si el paciente es visto después de una hora de ocurrida la reacción. En este caso se puede cuantificar histamina o sus metabolitos en orina los que permanecen elevados por más tiempo. Los niveles de triptasa sérica aumentan entre una a una hora y media de ocurrido la reacción y permanecen elevados por alrededor de cinco horas. En algunas ocasiones es posible determinar el agente causal, especialmente cuando se trata de alimentos, medicamentos o látex mediante la presencia de IgE específica contra el antígeno sospechoso. Hay que considerar que la sospecha diagnóstica del agente etiológico se realiza mediante una detallada y acuciosa anamnesis y el laboratorio sirve para confirmar la sospecha. En alrededor de dos tercios de los casos de anafilaxis se desconoce el agente causal.

8. TRATAMIENTO

En el tratamiento de la anafilaxis hay que considerar dos aspectos: a) el tratamiento preventivo para reducir la incidencia de reacciones anafilácticas y anafilactoideas y b) el tratamiento del episodio agudo.

Medidas para reducir la incidencia de anafilaxia:

1. Anamnesis detallada de alergia a drogas, látex,

picaduras de insecto (abejas), alimentos etc.

2. Cuando es factible realizar IgE específica para antígeno sospechoso.
3. Evitar el alérgeno incluyendo aquellos que tengan reactividad cruzada.
4. Si se identifica el alérgeno causal de reacciones anafilácticas, se debe usar identificación (brazalete, medalla) que lo señale.
5. Enseñar al paciente a usar epinefrina inyectable para una emergencia (picadura de abeja).
6. Pacientes en riesgo deben evitar ser tratados con beta bloqueadores, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, y de la angiotensina II e inhibidores de la monoamino-oxidasa. Estas drogas disminuyen la efectividad de la epinefrina, e interfieren con la respuesta endógena compensatoria de la hipotensión.

Tratamiento del episodio agudo

El tratamiento del episodio agudo debe comenzar en el sitio donde ocurre, de inmediato acudir a un servicio de urgencia, y si no cede hospitalizar al paciente.

Es importante una rápida evaluación del paciente, ver la permeabilidad de la vía aérea, estado de conciencia, medición de presión arterial y pulso. Si no presenta obstrucción bronquial, colocar al paciente en posición supina y levantar los pies. Si la reacción anafiláctica fue por una inyección colocar torniquete en la zona proximal al sitio de inyección y remover cada 5 minutos mientras se realiza la terapia.

Tratamiento inmediato:

1. Epinefrina: dosis y vía según gravedad
Según evaluación
2. Oxígeno
3. Antagonistas H1 y H2
4. Corticoides
5. Broncodilatadores
6. Vasopresores
7. Infusión de líquidos endovenosos

Estas últimas medidas deben ser administradas en unidad de cuidados intensivos.

Es posible que la anafilaxis ocurra en episodios bifásicos, por lo que el paciente debe ser observado por lo menos 2 horas si el episodio agudo ha sido leve y al menos 24 horas si ha requerido hospitalización.



LECTURAS SUGERIDAS

Gordon J.R., Burd, P.R., Galli, S.J., “Mast cells as a source of multifunctional cytokines”, *Immunol Today*, 11: 458-464, 1990.

Lieberman, P., “Anaphylaxis and anaphylactoid reactions” in Middleton Jr., E., Reed, C.E., Ellis, E.F., Adkinson Jr., N.F., Yunginger, J.W., Busse W.W. editors, **Allergy: principles and practice**, 5 ed., St Louis Mo, Mosby, p. 1079, 1998.

Songzhu, An, Goetzl, E.J., “Lipid mediators of hypersensitivity and inflammation” in Middleton, Jr. E., Reed, C.E., Ellis, E.F., Adkinson Jr. N.F., Yunginger, J.W., Busse W.W. editors, **Allergy: principles and practice**, 5 ed., St Louis Mo, Mosby, p.168, 1998.

Stevens, R.L., Austen, K.F., “Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells”, *Immunol Today*, 10: 381-386, 1998.

Terr, A.I., “Anaphylaxis and Urticaria” in Stites, D.P., Terr, A.I. editors, **Basic and Clinical Immunology**, 7 ed., Singapur, Lange Medical Publication, p. 400, 1991.



Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 23

AUTOINMUNIDAD

Ana María Agar M. y María Angélica Marinovic M.

1. **Introducción**
2. **Formas clínicas y características comunes**
3. **HLA y enfermedades autoinmunes**
4. **Patogenia de las enfermedades autoinmunes**
5. **Autotolerancia**
 - 5.1. Falla de la tolerancia central del linfocito T
 - 5.2. Falla de la tolerancia periférica del linfocito T
 - 5.3. Falla de la tolerancia del linfocito B
6. **Citoquinas y enfermedades autoinmunes**
7. **Nuevos tratamientos**





RESUMEN

Una de las propiedades fundamentales del sistema inmune radica en la capacidad de discriminar entre antígenos propios y no propios. Es así, como los linfocitos maduros funcionalmente competentes son capaces de reconocer y responder a antígenos extraños, pero no pueden reconocer y/o responder a antígenos propios. A través de mecanismos de autotolerancia se impide la respuesta contra estructuras propias.

Cuando se pierde esta autotolerancia se producen reacciones inmunes contra los antígenos propios, reacciones denominadas de autoinmunidad y las patologías que ellas causan se denominan enfermedades autoinmunes.

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por la producción de anticuerpos y/o células T efectoras inmunes que son autorreactivas. Dado que las respuestas de células B en humanos requiere de células T inductoras, la producción de autoanticuerpos implica un desorden del control inmunorregulatorio de las células T. Existen varios factores asociados a la aparición de una enfermedad autoinmune, entre ellas la herencia juega un rol importante en el desarrollo de la autoinmunidad. Sin embargo, los patrones hereditarios de estas enfermedades son, a menudo, complejos. En la actualidad las bases genéticas de la autoinmunidad están enfocadas en los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad.

Se ha evidenciado la participación de diversas citoquinas dentro de los mecanismos efectores involucrados en las enfermedades autoinmunes. La inmunomodulación de estas sustancias tendría importancia en la intervención terapéutica de ellas.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las propiedades fundamentales del sistema inmune, radica en la capacidad de discriminar entre antígenos propios y no propios. Es así, como los linfocitos maduros funcionalmente competentes son capaces de reconocer y responder a antígenos extraños, pero no pueden reconocer y/o responder a antígenos propios.

El sistema inmune posee una enorme diversidad, y el repertorio de especificidades antigénicas expresadas por las poblaciones de células T y B incluyen muchas dirigidas contra autocomponentes, sin embargo a través de mecanismos de autotolerancia (no respuesta del sistema inmune a los antígenos propios) no se producen reacciones autoinmunes.

Cuando se pierde esta autotolerancia se producen reacciones inmunes contra los antígenos propios, reacciones denominadas de autoinmunidad y las patologías que ellas causan se denominan enfermedades autoinmunes.

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por la producción de anticuerpos y/o de células

efectoras inmunes que son autorreactivas. Dado que las respuestas de células B en humanos requieren de células T inductoras, la producción de autoanticuerpos implica un desorden del control inmunorregulatorio de las células T.

La presencia de autoanticuerpos no es indicadora de enfermedad autoinmunitaria, es así como títulos bajos de autoanticuerpos contra ciertas estructuras es un hecho, incluso, fisiológico.

2. FORMAS CLÍNICAS Y CARACTERÍSTICAS COMUNES

Las enfermedades asociadas con el fenómeno autoinmune tienden a distribuirse en un espectro que va desde las enfermedades órgano específicas, como la Tiroiditis de Hashimoto, en las cuales los anticuerpos y las lesiones destructivas están orientadas sólo contra un órgano del cuerpo, mientras en el otro polo se encuentra como ejemplo tipo, el Lupus eritematoso sistémico (LES), en el cual los anticuerpos están dirigidos contra antígenos ampliamente distribuidos en el organismo y las lesiones



nes características de la enfermedad son también ampliamente diseminadas (tabla 23-1).

Una serie de características en relación al antígeno, tipo de lesiones y sobreposición con otras enfermedades caracterizan a las enfermedades órgano específicas y órgano inespecíficas (tabla 23-2).

A pesar de que puedan afectar diversos órganos y además en forma muy distinta, las enfermedades autoinmunes poseen características comunes, entre las que figuran:

a) Inducción experimental: la mayoría de las en-

fermedades autoinmunes humanas se pueden reproducir en animales de experimentación, si bien los métodos de inducción varían para cada una de ellas.

b) Edad: su aparición es mucho más frecuente en las personas adultas, existiendo una correlación positiva entre la edad y la frecuencia de estas enfermedades. Es muy común también encontrar autoanticuerpos no patogénicos en personas de edad avanzada. Un 5% de mujeres de más de 50 años poseen títulos bajos a anticuerpos antinucleares.

c) Sexo: son más frecuentes en las mujeres. Así ocurre con la artritis reumatoidea, el LES, la miastenia gravis, la hepatitis crónica activa, la cirrosis biliar primaria y muchas otras. En los animales de experimentación se ha observado la existencia de una relación entre el nivel de estrógenos y presencia e intensidad de procesos autoinmunes.

d) Factores genéticos: existe una clara predisposición familiar a sufrir estas enfermedades. Es frecuente observar la presencia de diversos procesos autoinmunes en distintos miembros de una misma familia.

e) Patología linfocitaria: las enfermedades primarias del sistema inmunológico se acompañan con frecuencia de procesos autoinmunes. De esta manera, por ejemplo, se observa la aparición de anemias hemolíticas autoinmunes en la leucemia linfática crónica.

f) Factores ambientales: las infecciones virales y bacterianas se asocian con autoinmunidad, y los períodos pre-infecciosos, a menudo, preceden las manifestaciones clínicas de enfermedad autoinmune. En la mayoría de estos casos, el microorganismo no está presente en las lesiones y no es detectable en el individuo cuando la autoinmunidad se desarrolla. Es así como, las lesiones por autoinmunidad no se deben al agente infeccioso mismo, sino son producto de la respuesta inmune del huésped que pueden ser gatilladas o disreguladas por el microbio. Entre los muchos posibles efectos de las infecciones se encuentran la activación policlonal de linfocitos, la inflamación tisular local que lleva a un aumento en la expresión de coestimuladores, la alteración de autoantígenos creando neoantígenos que,

Tabla 23-1. Espectro de enfermedades autoinmunes

Órgano específicas	Enfermedad autoinmune Tiroiditis de Hashimoto Mixedema primario Tirotoxicosis Anemia Perniciosa Gastritis atrófica autoinmune Enfermedad de Addison Menopausia prematura(*) Diabetes juvenil Síndrome de Goopasture Miastenia Gravis Infertilidad masculina(*) Pénfigo vulgar Penfigoide Oftalmia del Simpático Uveitis Facogénica Esclerosis Múltiple Anemia hemolítica autoinmune Púrpura trombocitopénico inmune Leucopenia idiopática Cirrosis biliar primaria Hepatitis crónica activa con AgHBs Cirrosis criptogénica(*) Colitis ulcerosa Síndrome de Sjogren Artritis reumatoidea Dermatomiositis Esclerodermia Lupus eritematoso discoide Lupus eritematoso sistémico
Órgano inespecíficas	

(*) algunos casos



Tabla 23-2. Comparación entre las enfermedades órgano específicas y las órgano inespecíficas

	Enf. Órgano específicas	Enf. Órgano inespecíficas
Antígeno	Especialmente localizado al órgano dado	Ampliamente distribuido en el organismo
Lesiones	El antígeno en el órgano es blanco para el ataque inmunológico	Los complejos se depositan en forma sistémica particularmente en piel, riñón y articulaciones
Sobreposición	Con otras enfermedades órgano específicas	Con otras enfermedades órgano inespecíficas

parcialmente, presentan reacciones cruzadas y daño tisular que lleva a la liberación de antígenos anatómicamente secuestrados.

- g) Alteraciones anatómicas en los tejidos: tales como inflamación o trauma pueden llevar a la exposición de autoantígenos que habitualmente no están expuestos al sistema inmune. Tales antígenos secuestrados no habrían inducido autotolerancia. Al liberarse estos autoantígenos, pueden interactuar con linfocitos inmunocompetentes e inducir respuestas inmunes específicas. Entre los antígenos anatómicamente secuestrados se encuentran las proteínas intraoculares y el semen. La uveítis pos-traumática y la orquitis post-vasectomía, se cree que se deben a respuestas autoinmunes contra autoantígenos que son liberados de su localización normal.

La inflamación tisular puede también producir alteraciones estructurales en autoantígenos y la formación de nuevos determinantes capaces de inducir reacciones autoinmunes. La inflamación puede llevar a la activación macrofágica por citoquinas de producción local, y estas citoquinas estimulan la expresión de coestimuladores cuyo resultado final puede ser la pérdida de la tolerancia periférica.

3. HLA Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES

La herencia juega un rol importante en el

desarrollo de la autoinmunidad. Sin embargo los patrones hereditarios de estas enfermedades son, a menudo, complejos.

En la actualidad las bases genéticas de la autoinmunidad están enfocadas en los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, HLA en humanos).

El estudio de los HLA en grandes grupos de pacientes con varias enfermedades autoinmunes ha mostrado que algunos alelos de HLA aparecen con una mayor frecuencia en estos pacientes que en la población general. A partir de estos estudios ha sido posible determinar el riesgo relativo de desarrollar una enfermedad en individuos portadores de varios alelos de HLA (tabla 23-3). La asociación más fuerte se encuentra entre la Espondilitis anquilosante, una enfermedad inflamatoria y presumiblemente autoinmune de las articulaciones vertebrales, con el alelo B27 de los HLA clase I. Los individuos HLA B27 positivos tienen entre 90-100 veces más posibilidades de desarrollar la Espondilitis anquilosante que los individuos que carecen del antígeno B27. Se desconocen los mecanismos de esta enfermedad y las bases de la asociación con el haplotipo señalado.

Recientemente la investigación en enfermedades autoinmunes se ha enfocado fundamentalmente hacia los loci pleomórficos de HLA DR y HLA DQ (moléculas clase II). Esto debido a la participación de las moléculas MHC clase II en la selección y activación de las células T CD4⁺, y en consideración de que las células T CD4⁺ regulan tanto las respuestas humorales como celulares a antígenos proteicos.



Tabla 23-3. Ejemplos de enfermedades inmunológicas ligadas a HLA

Enfermedad	Alelo HLA	Riesgo relativo*
Artritis reumatoidea	DR4	6
Pénfigo vulgar	DR4	24
Hepatitis crónica activa	DR3	14
Síndrome Sjögren	DR3	10
Enfermedad celíaca	DR3	12
Espondilitis anquilosante	B27	90

* Posibilidad de desarrollar una enfermedad en individuos con un alelo particular en comparación con individuos que carecen de ese alelo.

4. PATOGENIA DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Existe un gran número de vías por las cuales se puede iniciar una reacción autoinmune. Sin embargo para la mayoría de las enfermedades autoinmunes existe un evento crítico común que es la activación de linfocitos T autorreactivos, los cuales promueven distintos mecanismos efectores responsables del daño (figura 23-1).

En la mayoría de las enfermedades autoinmunes existe una mezcla de las clásicas respuestas Th1 y Th2 en diversa proporción. Las subpoblaciones Th1 favorecen la respuesta inmune celular, la característica patogénica más prominente de las enfermedades órgano específicas (tiroiditis, diabetes mellitus insulino dependiente), con activación de macrófagos, linfocitos T citotóxicos y producción de citoquinas como TNF alfa y beta.

En cambio las subpoblaciones Th2 favorecen una respuesta humoral, característica de las enfermedades órgano inespecíficas (LES), en las cuales hay un efecto directo de los autoanticuerpos sobre la célula blanco, inducido por lisis mediada por complemento, fagocitosis, formación y depósito de complejos inmunes, y en menor medida citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Además existe un número de enfermedades autoinmunes mediadas por anticuerpos contra receptores de superficie celular, los cuales causan exceso de actividad o inhibición de la función del receptor.

Se desconoce los mecanismos etiológicos de las enfermedades autoinmunitarias, tampoco existe una opinión unánime en relación a las causas que

puedan ser más probables.

En condiciones normales el sistema inmunitario del huésped reúne una doble condición: a) desarrolla respuestas inmunitarias con un repertorio de especificidades tan amplio como la gran diversidad de sustancias extrañas a él y b) mantiene un estado de tolerancia para los componentes propios (autotolerancia) o un grado de respuesta imperceptible clínicamente.

Esta doble y contradictoria condición es un rasgo esencial del sistema inmunitario para que pueda actuar como un mecanismo clave en el mantenimiento de la integridad del huésped. Cuando se quiebra la autotolerancia ocurre autoinmunidad.

5. AUTOTOLERANCIA

En el año 1949 Burnett propuso la teoría de la selección clonal para explicar la autoinmunidad, él postulaba que los clones de linfocitos autorreactivos eran eliminados o delecionados durante su desarrollo para prevenir las reacciones autoinmunes. Actualmente sabemos que esto es parcialmente correcto.

La autoinmunidad resulta de la falla de los mecanismos normalmente responsables de mantener la autotolerancia.

La autoinmunidad puede resultar de alteraciones primarias de linfocitos T, B o ambos. Actualmente se le da un rol protagónico al linfocito T por 2 razones principales: (a) el linfocito T “helper” es el regulador de todas las respuestas inmunes a proteínas. (b) muchas enfermedades autoinmunes están genéticamente asociadas o unidas al MHC, y la función de las moléculas MHC

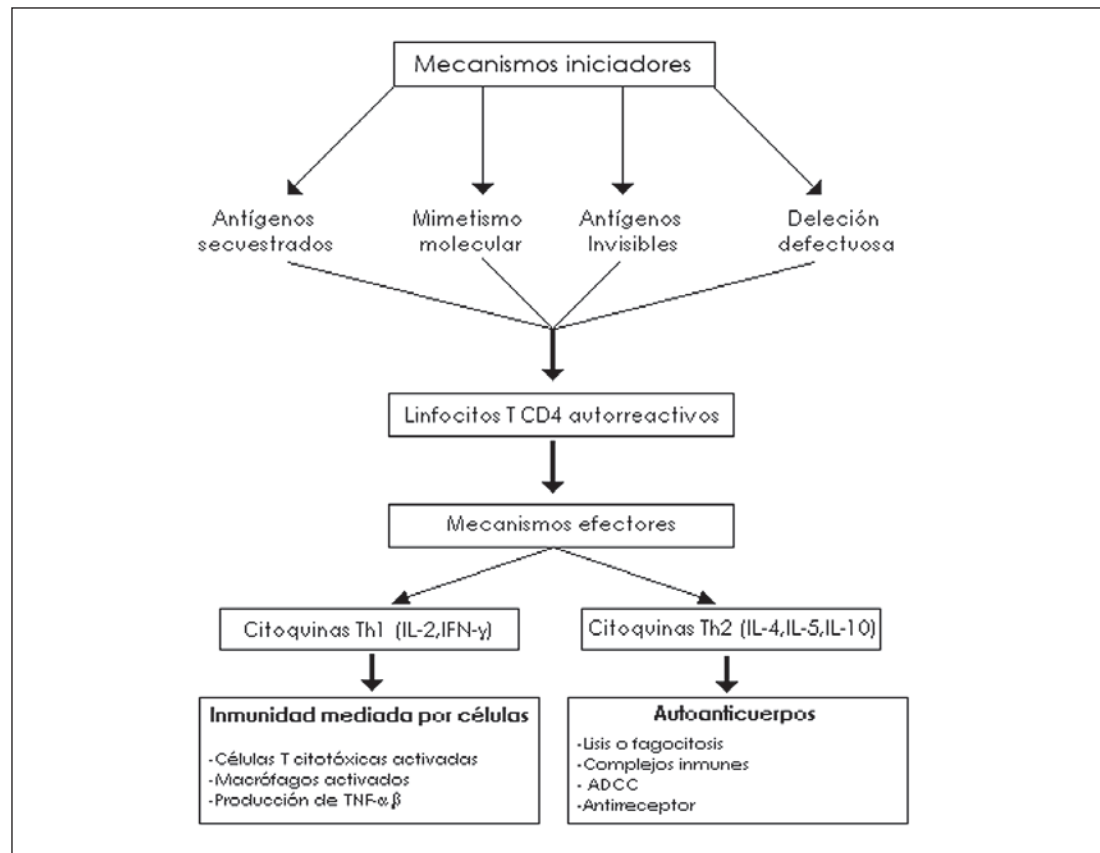


Figura 23-1. Mecanismos iniciadores y efectores de autoinmunidad. Los linfocitos T CD4 autorreactivos que han escapado de la selección negativa en el timo, pueden ser activados por diversos mecanismos. Estos linfocitos T a través de mecanismos efectores producirán citoquinas del tipo Th1 o Th2, lo cual se traducirá ya sea en la producción de una respuesta inmune mediada por células o la formación de autoanticuerpos.

es presentar péptidos antigénicos a la célula T. Por lo tanto se cree que la falla de la autotolerancia de linfocitos T es un mecanismo importante de enfermedad autoinmune .

5.1. Falla de la tolerancia central del linfocito T.

La tolerancia central es el mecanismo de selección negativa de los linfocitos T inmaduros autorreactivos que deleciona células que poseen receptores de alta afinidad para autoantígenos.

5.2. Falla de la tolerancia periférica del linfocito T.

La tolerancia periférica en linfocitos T maduros autorreactivos es mantenida por anergia, delección por apoptosis, supresión por células reguladoras. La autoinmunidad que resulta de la falla de cada uno de estos mecanismos ha sido demostrada en distintos estudios experimentales: (a) expresión aberrante de coestimuladores en tejidos puede resultar en quiebre de la anergia del

LT y reacción autoinmune tejido específica, (b) anergia del LT puede fallar debido a defectos en las moléculas que normalmente inactivan estas células, (c) mutaciones que interfieren con los mecanismos de apoptosis de linfocitos maduros, puede resultar en enfermedades autoinmunes, por ejemplo: mutaciones del ligando Fas, (d) defectos en la supresión mediada por LT: se ha postulado que algunos autoantígenos normalmente inducen LT reguladores que producen citoquinas inmunosupresoras que funcionan manteniendo la autotolerancia, lo cual se puede perder.

5.3. Falla de la tolerancia del linfocito B: Se cree que muchas enfermedades autoinmunes causadas por autoanticuerpos son debidas a falla en la tolerancia del linfocito B. Exposición de linfocitos B a activadores policlonales como lipopolisacáridos, pueden activar un gran número de estas células, incluyendo algunas que son específicas para



autoantígenos. Debe destacarse que en individuos normales, la falla para producir autoanticuerpos contra antígenos propios puede deberse a delección o anergia de LT colaboradores y no a tolerancia de linfocitos B. En estos casos, defectos en la mantención de tolerancia del LT puede resultar en producción de autoanticuerpos. Este mecanismo sería importante en la patogenia de varias enfermedades mediadas por anticuerpos, como por ejemplo: miastenia gravis o enfermedad de Graves.

Los antígenos propios pueden considerarse como antígenos T dependiente. Considerando a los antígenos T dependientes como conjuntos hapteno-portador y que los linfocitos B reconocen a la parte hapténica, mientras que los linfocitos T cooperadores reconocen al portador, la ruptura de la autotolerancia puede deberse a diferentes mecanismos:

a) Mecanismo de "bypass" de las células T colaboradoras tolerantes para el portador de los autoantígenos. Esta situación puede alcanzarse a través de varias vías:

- Reacción cruzada de una sustancia extraña con un antígeno propio de forma que el hapteno de ésta y el del extraño se parezcan, siendo reconocido por los linfocitos B dirigidos contra el antígeno propio, mientras el portador del antígeno extraño será reconocido por otros linfocitos T cooperadores no tolerados, que se activarán y ayudarán a los B a producir anticuerpos contra el antígeno propio.
- Drogas o fármacos se podrían unir a la parte portador de un antígeno propio, formándose un neo-antígeno que será reconocido por células T colaboradoras que ayudarán a las células B específicas para el hapteno del antígeno propio a producir anticuerpos contra éste, llegando a una situación similar a la anterior.
- Una droga o un virus, se podrían unir a la molécula presente en la membrana de una célula, si ésta posee moléculas clase II lo presentará a los linfocitos T colaboradores y éstos ayudarán a linfocitos B específicos para un autoantígeno (presente en la membrana de esta célula) a producir autoanticuerpos contra el mismo.

b) Estimulación persistente del huésped por un

determinado patógeno, dando lugar a una fuerte respuesta de anticuerpos cuyo idiotipo estimule la producción de anti-idiotipos que tengan reacción cruzada con autoantígenos.

c) Activación de las células B mediante ciertas sustancias, activadores policlonales de células B, capaces de activar inespecíficamente a los linfocitos B sin necesidad de colaboración de los linfocitos T. En estos casos se produciría una respuesta pluriespecífica dirigida contra muchas sustancias, entre las cuales se encontrarían las propias. Los lipopolisacáridos y endotoxinas se encuentran entre los activadores policlonales de células B más importantes.

d) Inducción de respuestas autoinmunitarias es especialmente aplicable a las endocrinopatías. Según esta hipótesis los linfocitos T "helper" no se habrían hecho tolerantes frente a estructuras muy concretas y selectivas de ciertas células, como por ejemplo proteínas y receptores presentes en la membrana, y el hecho de que normalmente no existiera una respuesta de anticuerpos sería debido a que estas células no expresan moléculas clase II, por lo tanto, los linfocitos T colaboradores no pueden reconocer a estas estructuras, no ayudando así a los linfocitos B a producir anticuerpos contra ellas.

Si estas estructuras en un momento dado expresan moléculas clase II, entonces podrían presentar adecuadamente estos antígenos de la membrana a los linfocitos T colaboradores que ayudarían a los linfocitos B a producir anticuerpos. La expresión ectópica de las moléculas clase II en células que normalmente no la expresan puede ser inducida por linfoquinas como los interferones (IFNs) y factor de necrosis tumoral (TNF). Es probable que ello no sea una condición suficiente, ya que se ha visto expresión ectópica de moléculas clase II, sin que exista una respuesta autoinmunitaria contra ellas, probablemente sea además necesario que los autoantígenos DR (o moléculas clase II) sean de un determinado tipo.

6. CITOQUINAS Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Las citoquinas son mediadores proteicos involucrados en virtualmente, todos los procesos biológicos: inmunidad, inflamación, diferenciación y proliferación celular. Debido a su importancia en inmunidad e inflamación no es sorprendente que estén involucrados en las enfermedades



autoinmunes. En el mecanismo de producción de las enfermedades autoinmunes se pueden distinguir 3 compartimientos: un aspecto inicial de inducción, la patogénesis y perpetuación (figura 23-2).

de que el TNF es la citoquina central de la artritis reumatoidea. Estos hallazgos sugieren que las reacciones Th1 predominan en la sinovitis reumatoidea, lo cual apoyaría el concepto de un

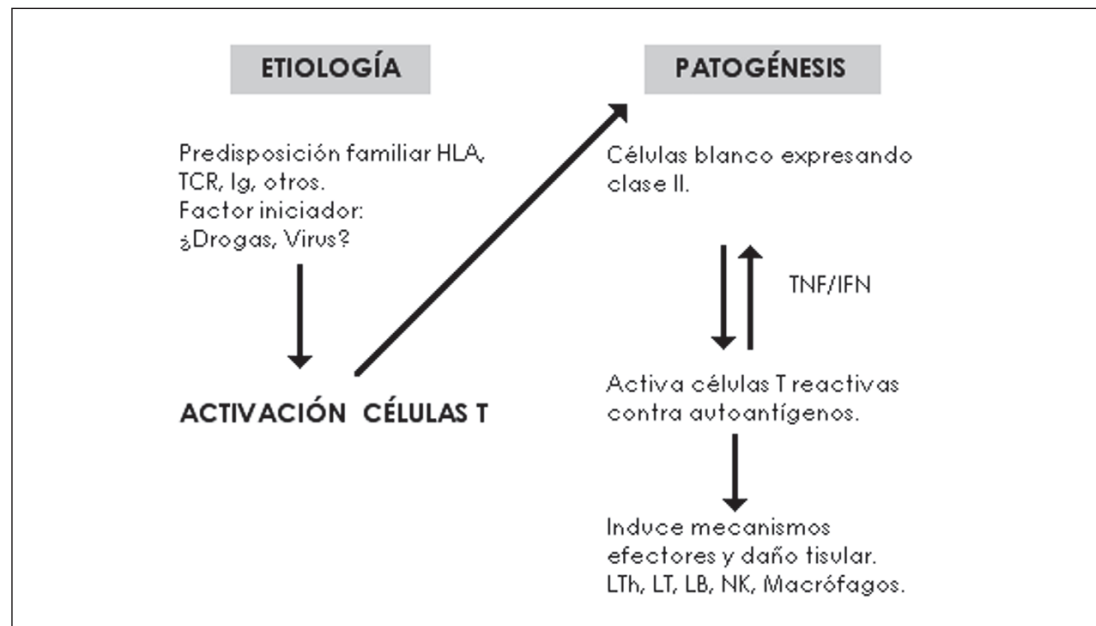


Figura 23-2. Mecanismos de producción de las enfermedades autoinmunes.

En relación al rol de las citoquinas en la inducción de enfermedades autoinmunes, las moléculas más íntimamente involucradas son los IFN. Entre los interferones destaca el IFN γ , el cual regula la presentación antigénica y la expresión de HLA clase II, características necesarias para la inducción inmune.

Ensayos terapéuticos con IFN alfa en pacientes con cáncer, mostraron que la infusión de altas dosis de IFN induce tiroiditis autoinmune. Resultados similares han sido reportados para la infusión de IL-2, pero con una menor frecuencia.

Un segundo aspecto en el cual las citoquinas son de importancia en las enfermedades autoinmunes, es en la fase efectora de la enfermedad. En líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea se han encontrado prácticamente todas las citoquinas (TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF y TGF- β) lo cual no es sorprendente dado que el tejido consiste en células T activadas, macrófagos, fibroblastos y endotelio. Sin embargo, al estudiar la regulación de la producción de citoquinas en las células sinoviales se observó que el TNF- alfa era la señal regulatoria principal de IL-1 a nivel articular, llevando al concepto actual

desbalance entre las células Th1 y Th2, y puesto que las citoquinas Th2 ejercen un efecto anti-inflamatorio. La predominancia de las células Th1 podría indicar su importancia pro-inflamatoria.

Todas estas investigaciones han permitido diseñar estrategias terapéuticas dirigidas contra citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 y TNF- α) utilizando anticuerpos monoclonales.

7. NUEVOS TRATAMIENTOS

Como regla general el tratamiento de las enfermedades autoinmunes está enfocado hacia dos objetivos, el primero es restablecer la función perdida, como por ejemplo la tiroiditis crónica con la administración de hormona tiroidea. El segundo objetivo de la terapia es disminuir la respuesta autoinmune patológica con el fin de deprimir la respuesta inmune en general, es así como se emplean antimetabolitos, corticoesteroides y drogas anti-inflamatorias las cuales son útiles en síndromes complejos, como LES y otras enfermedades del tejido conectivo.

Sin embargo esta terapia presenta efectos co-



laterales y el riesgo de efectuar una inmunosupresión excesiva. Basado en los mecanismos descritos, nuevos métodos de terapia más específicos pueden esperarse en el futuro.

Vacunas de células T. Experimentos en animales sugieren que clones inactivados de células T autorreactivas pudieran ser utilizadas como "vacunas" preventivas administrándolas al animal antes de que se genere una respuesta autoinmune.

Bloqueo de las moléculas MHC. Por otra parte la activación de la célula T puede ser prevenida bloqueando la unión del péptido autorreactivo a la molécula MHC de la célula presentadora de antígeno. Péptidos competitivos que unen el MHC pero fracasan en gatillar la proliferación de células T previniendo la respuesta inmune específica.

Bloqueo coestimulador. Con el fin de efectuar la activación, la célula T no sólo debe reconocer su determinante antigénico correspondiente a través de su TCR, sino que también debe recibir señales estimuladoras a través de co-receptores o mediadores solubles. Si las señales coestimuladoras no son recibidas, la célula T se hace inactiva o anérgica. Es así como el bloqueo de señales co-estimuladoras parece otra alternativa para obviar la respuesta autoinmune.

Cambio en balance Th1-Th2. Una cuarta posibilidad de tratar enfermedades autoinmunes, es cambiar el balance de células Th1 y Th2. La administración de citoquinas particulares o inhibidores de citoquinas tendrían este efecto.

Tolerancia oral. Los antígenos administrados oralmente pueden inducir un estado de no respuesta. La inducción de tolerancia oral está bajo investigación clínica para el tratamiento de varias enfermedades incluyendo la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes mellitus y uveitis.

Terapia génica. Actualmente se están diseñando estrategias de tratamiento en que se utiliza terapia génica.

Cada uno de los enfoques terapéuticos descritos tiene ventajas y desventajas. El objetivo final a largo plazo es suprimir la respuesta autoinmune patogénica sin disminuir la inmunidad protectora contra patógenos.

LECTURAS SUGERIDAS

Abbas A., **Cellular and Molecular Immunology**, 4ta Edición, Capítulo 10, pp. 208-230; Capítulo 18, pp. 416-423, WB Saunders, , 2000.

Janeway, Ch., Travers, P., Walport, M., **Immunobiology The Immune System in Health and Disease**, 4ta Edición, Capítulo 6, pp. 209-211, Capítulo 7, pp. 228-234; Capítulo 13, pp. 520-536, 1999.

Rose, N., "Autoimmune Diseases: Tracing the Shared Threads". *Hospital Practice*, Abril 15: pp. 147-154, 1997.

Theofilopoulos, A., "The basis of autoimmunity: Part I", *Immunology Today*, 16(2): 90-97, 1995.

Theofilopoulos, A., "The basis of autoimmunity: Part II", *Immunology Today*, 16(3): 150-57, 1995.



Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 24

ENFERMEDADES REUMÁTICAS

Sergio Jacobelli G. y Santiago Rivero D.

- 1. Introducción**
- 2. Artritis Reumatoídea**
 - 2.1. Patogenia
 - 2.1.1. Genética
 - 2.1.2. Infecciones
 - 2.1.3. Autoinmunidad
 - 2.2. Clínica y tratamiento
- 3. Lupus eritematoso sistémico**
 - 3.1. Etiopatogenia
 - 3.1.1. Factores genéticos
 - 3.1.2. Factores ambientales
 - 3.1.3. Disregulación del sistema inmune
 - 3.2. Clínica y tratamiento





RESUMEN

En los últimos años se han registrado importantes avances en la comprensión de la respuesta inmune y de algunos mecanismos operacionales en la autoinmunidad. Esto ha sido especialmente relevante en la relación entre inflamación y respuesta inmune. En efecto, la descripción de las redes de citoquinas involucradas en la respuesta inmune, ha permitido diseñar ahora, tratamientos altamente específicos para la Artritis Reumatoidea con resultados sorprendentes y alentadores para muchos enfermos. Sin embargo, estos tratamientos sólo detienen la enfermedad, la que reaparece al suspenderlos. Tanto para el Lupus como para la Artritis, necesitamos aún otro nivel de comprensión, que nos indique los antígenos iniciales y los mecanismos de control sobre los que pudiéramos actuar para prevenir el daño tisular y el desarrollo de la enfermedad.

1. INTRODUCCIÓN

La autoinmunidad sistémica se refiere a enfermedades autoinmunes en las cuales la autorreactividad, no está circunscrita a un sólo órgano o tejido. Esta definición incluye enfermedades como la Artritis Reumatoidea y el Lupus Eritematoso Sistémico. Sin embargo no es fácil presentar una definición satisfactoria, porque la demostración que la causa de la enfermedad es autoinmune es difícil, ya que requiere la replicación de la enfermedad por transferencia de anticuerpos o células, datos que son difíciles de generar. De este modo, la inferencia que una enfermedad es autoinmune, se hace por el hallazgo de autoanticuerpos, complemento y linfocitos T en las lesiones tisulares.

Estas enfermedades tienen algunas características comunes, que de algún modo tendrán que ser explicadas al dilucidar su patogenia. La primera, es su curso tan variable entre uno y otro enfermo, marcado por exacerbaciones y remisiones, a veces sin mediar tratamiento. Esto podría implicar potentes mecanismos de control para regular la respuesta autoinmune.

La segunda es la susceptibilidad aumentada del sexo femenino, hecho que se observa aún en los modelos animales experimentales. La influencia hormonal en la respuesta inmune no está suficientemente aclarada. Una tercera característica sorprendente, es la presentación ocasional de la sobreposición de manifestaciones clínicas de varias enfermedades autoinmunes en

un sólo enfermo, lo que no tiene una explicación adecuada.

En general estos enfermos, a pesar de tener un aumento en la producción de autoanticuerpos, no responden tan normalmente a antígenos exógenos, de ahí que los pacientes con Lupus y con Artritis Reumatoidea, sufren con mayor frecuencia de infecciones que los controles, lo que se acentúa con los tratamientos que reciben. La infección por inmunosupresión terapéutica es un lamentable efecto secundario de los tratamientos más comunmente usados en estas afecciones.

2. ARTRITIS REUMATOÍDEA

La Artritis Reumatoidea (AR) es una enfermedad crónica, sistémica, cuya expresión clínica más importante es articular, lo que lleva a grados variables de invalidez. Es la forma más común de artropatía inflamatoria, con una prevalencia estimada en Chile de 0,5% de la población adulta, afectando más frecuentemente a mujeres, con una proporción estimada de 3 a 4 es a 1. Desde el punto de vista patológico, el sitio primario de activación inmune está en la articulación. Los aspectos más característicos son la infiltración celular de la membrana sinovial con mononucleares, especialmente linfocitos T y macrófagos y la hiperplasia de las células de la íntima de la membrana sinovial.

Aunque la etiología de la AR es aún desconocida, parece cada vez más evidente que su



patogenia se caracteriza por la acción concertada de distintos tipos celulares, que a través de diferentes cascadas de señales, interactúan entre sí y finalmente llevan a la destrucción de la articulación. Si bien se considera a la AR una enfermedad articular, es importante señalar que también tiene una gran cantidad de manifestaciones extraarticulares, lo que pone de manifiesto su carácter sistémico capaz de producir daño en distintos órganos mayores. En realidad, uno de los misterios de esta enfermedad, es por qué la membrana sinovial es el principal órgano blanco. Parece clave para entender estos hechos, la comprensión del artrotropismo de los antígenos y de las células inflamatorias y el papel que juegan receptores específicos y gradientes quimiotácticas para localizar la inflamación en la articulación.

La idea que la AR es un proceso multifactorial que requiere una combinación de factores genéticos, ambientales e inmunológicos, ha ido adquiriendo mayor aceptación, aunque el conocimiento de la forma cómo estos factores se relacionan es aún incompleto.

2.1. Patogenia

2.1.1. Genética

La existencia de una predisposición genética a la AR deriva, fundamentalmente, de la alta concordancia que se observa en gemelos univitelinos. La prevalencia de esta enfermedad es de alrededor de 0,5-1% en la población general, siendo menor en algunas (0,1-0,3% en poblaciones china y africana) y mayor en otras (5% en indios Pima en Estados Unidos). En gemelos univitelinos estudiados en consultorios de la especialidad, la concordancia es de 30-50%, la que baja a 12% si se estudian enfermos en la comunidad, no en ambiente hospitalario. En gemelos bivitelinicos, la concordancia es de 2-5%, similar a la de los parientes de primer grado. Se ha estimado que alrededor de la mitad de la predisposición genética reside en el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), estando el resto en otros loci que actualmente están siendo activamente investigados. Varios productos proteicos codificados por los genes del MHC son responsables de la presentación de péptidos antigénicos a los linfocitos T (LT). En la década de los setenta, se describió la asociación del HLA DR4 con la AR. En enfermos caucásicos con AR seropositiva se encontró que el 60-70% eran HLA DR4 positivos comparado con el 30%

de los controles. La descripción de subtipos de DR4 permitió plantear una hipótesis general sobre esta asociación. Los genes DRB1*0401, DRB1*0404 y DRB1*0405 codifican los subtipos DR4 Dw4, Dw14 y Dw15 respectivamente, que se asocian con AR en poblaciones caucásica y japonesa, en tanto que en ciertas poblaciones nativas norteamericanas y en israelíes, la asociación se encontró con genes que codificaban HLA que no eran DR4 sino DR6 (DRB1*1402) o DR1 (DRB1*0101) Nomenclatura HLA, ver capítulo 41. Al conocerse la secuencia de aminoácidos (aa) y la estructura tridimensional de las moléculas del MHC, se pudo precisar que cada alelo DRB1 asociado con susceptibilidad a la AR porta la secuencia QKRAA o QRRAA del aminoácido 69 a 74 de la cadena DR β , en tanto que los alelos DR que no se asocian a la enfermedad tienen secuencias diferentes en esta región. (Q, glutamina; K, lisina; R, arginina; A, alanina). Esta secuencia de 5 aa se ha denominado el "epítipo compartido"(EC), destacando que la susceptibilidad para la AR estaría conferida por una pequeña "casete" de aa que se encuentran en distintos DR y no sólo en el DR4. Al considerar este epítipo, algunos estudios lo encuentran en hasta el 96% de los pacientes en algunas poblaciones, pero esto no es tan notorio en otras, como griegos, pakistaníes y población negra en Estados Unidos. En Chile un estudio encontró una prevalencia de este epítipo en 56% de los enfermos comparado con 34% en los controles.

En los últimos años ha comenzado a ser evidente que el EC podría ser más un marcador de gravedad de la enfermedad que de susceptibilidad. Un estudio demostró que los nódulos reumatoideos, signo de gravedad, se presentaron en el 100% de los pacientes que eran homocigotos para el EC, en tanto que los enfermos que sólo tenían un alelo que codificaba para el EC tenían nódulos en el 59%. Al mismo tiempo, los enfermos que tenían doble dosis tenían compromiso de órganos mayores en el 61% comparado con 11% de los enfermos con un sólo alelo. Estudios chilenos también han encontrado una asociación entre la aparición de erosiones óseas y la presencia del EC, especialmente en doble dosis. Estos datos sugieren que hay una relación "dosis-efecto" de los genes MHC, lo que implicaría que la mayor contribución de los genes del MHC a la AR es en la gravedad y no en la susceptibilidad. Esto no es aceptado universalmente, porque resultados de otros estudios



similares no han sido concluyentes, lo que se ha atribuido a la inclusión de enfermos con AR leve o transitoria y a variaciones relacionadas con el trasfondo étnico y racial.

Es un hecho conocido que en las mujeres con AR que tienen un embarazo en el curso de su enfermedad, su artritis entra en remisión en alrededor del 70% de los casos. Trabajos recientes han descrito que a mayor disparidad materno-fetal de los alelos de clase II, DR y DQ, mayores son las posibilidades de remisión, en tanto que la persistencia de la actividad artrítica a pesar del embarazo, se asoció con mayor identidad materno-fetal en estos alelos. Esto sugiere que la mejoría de la AR que experimentan las mujeres con el embarazo se debe a fenómenos inmunológicos específicos y no a una supresión inmunológica general del embarazo.

Hay una variedad de genes que se ubican en el sitio del MHC, pero que no están directamente involucrados en la presentación de antígenos. Estos genes que no son clase I ni clase II codifican un grupo heterogéneo de proteínas que se llaman colectivamente MHC clase III. Polimorfismo asociado con el gen del factor de necrosis tumoral α (TNF), con la proteína de "shock" térmico 70 y con el componente C4 del sistema del complemento, se han relacionado con la susceptibilidad a la AR. Otros genes fuera del MHC han presentado cierto grado de asociación con la AR, como alotipos específicos de IgG y el gen del receptor de la quimioquina CCR5. Recientemente ha habido un gran interés en la relación entre la AR y las alteraciones en el gen que codifica la lectina que une a la manosa (MBL).

En la actualidad debe considerarse como preliminares todas las asociaciones genéticas con la AR con excepción de la de los genes del MHC clase II.

2.1.2. Infecciones

A pesar de los grandes esfuerzos realizados, no existe aún evidencia convincente que demuestre una etiología infecciosa de la AR. Como el inicio de la AR no se agrupa en tiempo ni espacio, se ha planteado que un microorganismo ubicuo, posiblemente no patógeno, pudiera gatillar la AR en una persona con el apropiado trasfondo genético. Por otro lado, es posible que si existiera una infección, ésta pudiera agruparse en tiempo y espacio, pero no ser detectable por ser subclínica requiriendo períodos variables de latencia antes de la aparición de la inflamación articular. La idea prevalente es que la infección, si es importante en la AR, no necesariamente debe estar presente en las articulaciones, sino que puede ser un fenómeno inicial, que desencadena un proceso patológico, en un ambiente genético apropiado.

Modelos animales de artritis han sugerido la posibilidad que agentes bacterianos tengan un papel en la etiología o en la patogenia de esta enfermedad, aunque esto no ha podido ser comprobado fehacientemente en la enfermedad humana. El virus Epstein-Barr ha recibido especial atención, por ser un activador policlonal de linfocitos B, por estar presente con mayor frecuencia en enfermos con AR que en controles y por la homología de secuencias entre el EC y la glicoproteína Gp110 de este virus. Sin embargo, los datos de prevalencia son circunstanciales y la Gp110 es una de muchas xenoproteínas que contiene la secuencia QKRAA. Así por ejemplo, la proteína dnaj de la *E. Coli*, que es una proteína bacteriana de shock térmico, también tiene esta secuencia y pudiera representar una unión potencial entre las bacterias intestinales y la artritis crónica.

Tabla 24-1. Posibles causas infecciosas de la artritis reumatoídea

Potencial Agente Infeccioso	Mecanismo patológico
Micoplasma	Infección sinovial directa; superantígenos
Parvovirus B19	Infección sinovial directa
Retrovirus	Infección sinovial directa
Bacterias entéricas	Imitación molecular (QKRAA)
Mycobacterias	Imitación molecular (QKRAA)
Virus Epstein-Barr	Imitación molecular (QKRAA)
Membrana celular bacteriana	Activación de macrófagos





La hipótesis que una o más infecciones virales pueda servir de agente gatillante de la AR en un huésped susceptible es atractiva. Se ha planteado que esta infección debería ser con un agente similar a los lentivirus, los cuales tienen una expresión restringida dentro de las células y pueden permanecer ocultos a los mecanismos de defensa del huésped.

2.1.3. Autoinmunidad

a) Autoanticuerpos

En la membrana sinovial de la AR crónica, la infiltración de linfocitos de predominio células T CD4 (CD45RO positivo) puede organizarse como un nódulo linfático y se distribuye perivascular, en tanto que los escasos linfocitos B están en el centro de este cuerpo linfoide y las células plasmáticas migran fuera de él al diferenciarse. De este modo, el tejido sinovial es un órgano productor de anticuerpos en AR.

En la tabla 24-2 se indican los diferentes tipos de autoanticuerpos encontrados en la AR.

Tabla 24-2. Autoanticuerpos en Artritis Reumatoídea

Factor Reumatoideo
Antinucleares
Anticolágeno tipo II
Anticolágeno tipo IX
Anticardiolipina
Anticitoplasma de neutrófilos
Antikeratina
Antifactor perinuclear
Anticalpastatina

Los Factores Reumatoideos (FR) son autoanticuerpos que reconocen la región Fc de la IgG. El descubrimiento del FR ha sido un hito en el desarrollo de conceptos de autoinmunidad, aunque su papel en la patogenia de la AR es sólo parcialmente comprendido. Algunos datos avalan su importancia en esta enfermedad: (a) La mayoría de los enfermos con AR tienen títulos elevados de FR. (b) Los títulos altos de FR correlacionan con enfermedad más grave. (c) La producción de FR es abundante en la membrana sinovial y muestra evidencias de maduración de afinidad dirigida por antígeno. (d) El FR puede aumentar la formación de complejos inmunes. (e) La avidez del FR de la AR por la región Fc de la IgG es varias órdenes de

magnitud mayor que la del FR que se ve en la enfermedad de Waldenström o en la crioglobulinemia y (f) La evidencia disponible señala que el FR representa una vía importante para la amplificación de la enfermedad articular y para el desarrollo de complicaciones extra-articulares.

Los anticuerpos anticolágeno II (natural y denaturalizado), tienen un indudable interés potencial a juzgar por los datos obtenidos en modelos animales de artritis. La mayoría de los datos en humanos son consistentes con la hipótesis que la AR no es producida por el desarrollo de estos anticuerpos, sino que la respuesta inflamatoria es amplificada por ellos.

La calpastatina es un inhibidor natural de las calpainas, que son un subgrupo de cisteínas-proteasas. Anticuerpos anticalpastatina se encuentra en un 50% de los enfermos con AR, lo que ha hecho plantear que la neutralización de este inhibidor podría promover la sobreactivación de estas proteasas en el tejido sinovial.

Los anticuerpos antinucleares, los anticitoplasma de neutrófilos y los anticardiolipinas, no parecen tener un papel en la patogenia.

b) Inmunidad Celular

Habitualmente se ha considerado que los linfocitos T CD4⁺ son cruciales en la patogenia de la AR, considerando para ello la masiva infiltración de éstos en la membrana sinovial. En la tabla 24-3 se presentan algunas evidencias que refuerzan esta hipótesis.

Tabla 24-3. Evidencias a favor del papel de los Linfocitos T en la AR

- LT y CPA están presentes en gran cantidad en la membrana sinovial.
- LT sinoviales expresan marcadores de activación y de memoria.
- Parece existir cierto grado de oligoclonalidad en los linfocitos T sinoviales.
- Las citoquinas T, IFN- γ y la IL-17 presentes en la articulación reumatoídea, son mediadores de efectos biológicos relacionados con la inflamación y el daño articular.
- Citoquinas que promueven la activación T y la diferenciación Th1, como la IL-12 y la IL-15 están en la articulación en concentraciones significativas.

LT, linfocitos T; CPA, células presentadoras de antígeno



Por otro lado, los tratamientos dirigidos a disminuir la cantidad de LT, no siempre han sido exitosos, aunque hay que destacar que la linfopenia en sangre periférica no siempre se correlaciona con la realidad en la articulación.

Los LT sinoviales son en su mayoría de memoria (CD45RO+) que expresan un fenotipo curioso con marcadores de actividad tardía y reciente como por ejemplo, HLA clase II y CD69 y muy poca expresión de CD25 (receptor de IL-2) que aparece en forma intermedia en la activación. Las células T también expresan moléculas coestimuladoras que reciben y transducen señales durante la activación, tales como, CD28, CD2, LFA-1, CD6, CD60 y CD40. Por lo tanto, los LT no sólo son abundantes en la sinovial, sino que también expresan estructuras de superficie que facilitan las interacciones con ligandos en las CPA adyacentes.

Persisten sin embargo, algunas observaciones que no aclaran el papel de los LT. Así por ejemplo, no se ha podido demostrar que exista un autoantígeno específico, al cual respondan los linfocitos T, capaz de gatillar o perpetuar la AR. Esto es, no se ha podido demostrar que la AR sea una enfermedad autoinmune en su origen. Además, las citoquinas derivadas de LT son menos abundantes en la sinovial, que las producidas por otras células y las erosiones que aparecen en el curso de la enfermedad no siempre se correlacionan con el grado de inflamación clínica observable en los pacientes. Aunque la importancia relativa de distintos blancos antigénicos para las células T aún no es clara, se han hecho esfuerzos grandes para identificar clones de linfocitos patogénicos. Las diferencias en expansiones clonales encontradas en distintos enfermos, sugieren que la inflamación en curso puede reflejar respuestas a una diversidad de antígenos propios o extraños, que son procesados y presentados a los LT sinoviales por cualquiera de las diferentes CPA en la membrana sinovial.

La asociación del epítipo compartido con la AR, hizo pensar en el papel crucial de los LT en la patogenia, sin embargo no es claro el mecanismo de esta asociación que puede representar entre otras posibilidades, selección tímica particular, reactividad cruzada, desequilibrio de unión con otros genes o alteraciones en la transducción de señales.

Recientes publicaciones han señalado la existencia de una probable alteración en la homeostasis de la respuesta inmune en esta enfermedad.

Citoquinas en AR. Muchas citoquinas se han detectado en la membrana sinovial y en el líquido sinovial de enfermos con AR, algunas de ellas en concentraciones muy elevadas. La sorprendente respuesta obtenida con tratamientos dirigidos a prevenir el efecto de algunas de ellas, ha reforzado la idea del papel preponderante de las citoquinas en la inflamación y destrucción articular. En general se ha considerado la AR como una enfermedad Th1 cuya función se asocia con hipersensibilidad retardada y con respuestas celulares T citotóxicas. Los niveles de IFN- γ en la articulación, son sin embargo muy bajos, aunque los efectos atribuidos por lo menos en parte a esta citoquina, como la fuerte expresión de moléculas MHC en una variedad de tipos celulares, es evidente. También se encuentra IL-12, que favorece la activación hacia Th1. La IL-15 y la IL-18, fácilmente detectables en la sinovial reumatoídea, actúan probablemente en forma sinérgica con la IL-12 en promover la diferenciación hacia Th1. La IL-2 es apenas detectable y muy pocas células expresan el receptor de alta afinidad para esta citoquina.

Especialmente interesantes son el TNF α y la IL-1 β , ambas producidas por macrófagos-monocitos aunque también pueden ser sintetizadas por células T activadas. Estas citoquinas son muy abundantes en la sinovial lo que unido a su potente actividad biológica proinflamatoria, las ubica en un papel central en la patogenia de la inflamación y destrucción articular. La reciente introducción de tratamiento dirigido a bloquear la acción de estas citoquinas, ha sido un avance importante en el tratamiento de esta enfermedad. También están presentes en la sinovial, inhibidores o antagonistas fisiológicos de citoquinas y de metaloproteinasas, sin embargo su concentración es inferior a lo que se requiere para abrogar la respuesta inflamatoria.

e) Interacciones intercelulares

La unión de leucocitos circulantes al endotelio activado, vía moléculas de adhesión, es un requisito indispensable para el desarrollo de una inflamación crónica. La combinación de selectinas, integrinas y quimioquinas puede crear un ambiente único en la sinovial inflamada para atraer una gran diversidad de población leucocitaria. La respuesta de los LT son gatilladas por la interacción con las CPA (células dendríticas, macrófagos y LB). Así por ejemplo, células dendríticas activadas están presentes en la mem-



brana y en el líquido sinovial y se puede observar al microscopio, que interactúan con "nidos" de linfocitos. Recientemente se ha encontrado que los LT también interactúan con fibroblastos sinoviales. La relación de los macrófagos con los fibroblastos se realiza, principalmente, a través de citoquinas, pero es posible pensar que también hay interacción intercelular. Por otro lado, los fibroblastos entregan señales a los LB que previenen su apoptosis.

Esta variada interacción celular y la red de citoquinas presente, pudiera explicar el patrón inhabitual de diferenciación celular que se encuentra en la sinovial reumatoidea. En este sentido es notable el fenotipo único que exhiben los fibroblastos reumatoideos, con características de células transformadas, de crecimiento agresivo, que invaden tejidos vecinos y que acumulan mutaciones de genes que suprimen tumores como el p53. La dilucidación de si estas anomalías son enteramente secundarias a la inflamación crónica o si reflejan acontecimientos primarios relacionados con la etiología de la enfermedad es un objetivo actual central en la investigación sobre esta enfermedad.

2.2. Clínica y tratamiento

Clínicamente la AR se manifiesta con mayor frecuencia, como una artritis de comienzo insidioso que afecta especialmente las articulaciones de las manos y muñecas y que progresivamente va comprometiendo otras articulaciones. Más raramente, el comienzo puede ser como artritis aguda poliarticular. Finalmente también se encuentra un comienzo intermedio entre estas dos formas.

El tratamiento de esta enfermedad ha ido cambiando conceptualmente con el tiempo. De una etapa que consideró a la AR como una enfermedad relativamente benigna, en la cual había que tratar de usar sólo antiinflamatorios no esteroideos y sólo más adelante drogas que pudieran detener el curso de la enfermedad, a otra etapa, a partir de los setenta, en que los médicos conscientes de los estudios epidemiológicos que comenzaban a señalar el curso devastador que puede tener, comenzaron a aconsejar la introducción precoz de drogas potentes con el fin de detener el curso de la enfermedad, antes que aparecieran erosiones articulares. En la actualidad el uso de inmunosupresores, como el Metotrexato es usual en los primeros meses de hecho el diagnóstico. La reciente incorporación de medicamentos ahora generados a través de ingeniería genética, capaces de blo-

quear citoquinas específicas, abren un camino novedoso y aparentemente muy eficaz para controlar las manifestaciones de esta devastadora enfermedad.

3. LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad inflamatoria, de tipo autoinmune, de causa desconocida y que afecta con mayor frecuencia a las mujeres (relación 9:1).

3.1. Patogenia

En el LES el daño inflamatorio celular o tisular, está mediado por mecanismos inmunológicos, especialmente por autoanticuerpos y complejos inmunes, dirigidos contra antígenos propios.

Parece claro que el LES es una enfermedad multifactorial por lo que se deben considerar diversos aspectos en su etiopatogenia. Los factores principales que interactúan desarrollando la enfermedad, pueden agruparse en: Factores genéticos, Factores ambientales, Disregulación del sistema inmune e Inflamación y daño celular/tisular crónico (tabla 24-3).

Tabla 24-4. Principales factores que participan en la patagonia del LES

- Factores genéticos
 - Antecedentes familiares
 - Marcadores genéticos
 - Expresión clínica y marcadores genéticos
- Factores ambientales
 - Drogas
 - Luz ultravioleta
 - Infecciones
- Disregulación del sistema inmune
 - Pérdida de la tolerancia
 - Aumento en la expresión de autoantígenos
 - Alteraciones funcionales linfocitarias
 - Desbalance de citoquinas
 - Hormonas sexuales y eje neurohipotálamo hipofisiario
- Inflamación y daño celular/tisular



3.1.1. Factores genéticos

La susceptibilidad genética en el LES, parece indiscutible. Apoyan su papel preponderante varias observaciones bien conocidas y demostradas.

a) Estudios familiares. Los gemelos monocigotos tienen un alto grado de concordancia para la enfermedad (14-57%) y los parientes de pacientes con LES llegan a presentarla en un 5-12%.

b) Marcadores genéticos. Los pacientes con LES tienen mayor frecuencia de ciertos marcadores genéticos específicos, comparados con la población general. Éstos incluyen fenotipo HLA clase I (B-8) y clase II (DR-2, DR-3, DQW1). Las deficiencias genéticas de alguno de los componentes del sistema del complemento (C1, C2 y C4) se asocian fuertemente al desarrollo LES. También se han descrito trastornos genéticos para el receptor Fc, para el receptor de C1 y para genes promotores de distintas citoquinas (IL-1, IL-10).

Algunos modelos animales han demostrado gran importancia de trastornos de la apoptosis celular inducida por genes (FAS-L, ligando de FAS), y es probable que este trastorno intervenga también en el LES humano.

c) Expresión clínica y marcadores genéticos. Ciertos genes tipo HLA clase II se asocian con la producción de autoanticuerpos definidos que pueden influir en ciertas manifestaciones clínicas específicas: DR3, DR2 y DQ a Ac anti-DNA, DR7 a Ac-anti Sm, DR2 a Ac anti-P ribosomal, DR3 a Ac anti-Ro (SSA), DR4 y DR2 a Ac Anti-U1-RNP, y los Ac antifosfolípidos a DR4, DR7 y DR53.

Aunque el papel de la predisposición genética al desarrollo de esta enfermedad, parece importante y bien demostrado, se estima que el factor genético como única causa de LES no sería posible, y necesita de la interacción de otros factores que serán comentados. Está bien establecido que su influencia sería multigenética, y se ha calculado que entre 4 a 8 genes estarían comprometidos en la predisposición genética.

3.1.2. Factores ambientales. Su importancia en el desarrollo del LES no ha sido aún bien determinada, pero se estima que actuarían como desencadenantes de la enfermedad en aquellos sujetos genéticamente susceptibles. Se han descrito diversos factores ambientales importantes:

a) Drogas. Numerosas drogas y medicamentos pueden inducir el desarrollo de autoanticuerpos, algunos con capacidad patogénica, determinando un cuadro clínico de “LES inducidos por drogas”. Generalmente éste se manifiesta en pacientes que son genéticamente acetiladores lentos (condición que favorece el aumento de moléculas relacionadas a la respuesta inmune).

b) Luz ultravioleta (LUV). La LUV produce distintas alteraciones inmunológicas en la piel, que pueden favorecer o reactivar el LES. Altera la expresión de autoantígenos en los keratinocitos y los estimula a producir citoquinas inductoras de la producción de autoanticuerpos por linfocitos B (IL-3, IL-6, GM-CSF, TNF α). Activa a los macrófagos en el procesamiento de autoantígenos. Favorece el depósito de autoanticuerpos en la membrana basal dermoepidérmica, por alteración de su estructura.

c) Infecciones. Los microorganismos pueden activar el LES a través de infecciones. Es bien conocida la capacidad de producir anticuerpos de reactividad cruzada con autoantígenos, que tengan similitud estructural con antígenos microbianos. También, especialmente las bacterias producen superantígenos que pueden estimular en forma inespecífica a clones de linfocitos T y/o B autorreactivos, induciendo de esta forma respuestas autoinmunes.

3.1.3. Disregulación del sistema inmune. Constituye el factor crucial en el desarrollo del LES. Esta alteración permite el desconocimiento de los antígenos propios (pérdida de la tolerancia) y la producción de una respuesta inmune humoral y celular dirigida contra éstos, capaz de producir un daño patogénico sobre células y/o tejidos que pueden manifestarse clínicamente como una enfermedad potencialmente fatal. Se han reportado numerosas alteraciones inmunológicas en pacientes con LES, que podrían agruparse en distintos aspectos.

a) Pérdida de la tolerancia. Constituye el defecto más significativo en la patogenia del LES, y permite el desarrollo de una respuesta inmune contra distintos antígenos propios. Como se sabe, el timo a través de un proceso de selección, elimina o inactiva a aquellos clones capaces de reaccionar contra antígenos propios (Selección tímica negativa o Tolerancia central; ver capítulo 13). En



los pacientes con LES se describen disfunción tímica que rompe la tolerancia central, lo que permite la presencia de clones de linfocitos T autorreactivos, capaces de generar una respuesta autoinmune bajo estímulos adecuados.

La tolerancia periférica, que se realiza en el sistema inmune periférico, también está alterada. Se describe déficit de linfocitos T supresores (CD8+) y activación de clones autorreactivos periféricos de LT "helper" (LTh) (CD4+). Ambas situaciones favorecen el desarrollo de autoinmunidad patogénica. Se describen trastornos de la tolerancia B con prolongación de su vida media, tal vez por defectos en la apoptosis o deficiencias del complemento.

b) Autoantígenos. La expresión de los autoantígenos en pacientes con LES, está aumentada, probablemente como expresión de apoptosis celular exagerada, que permite el desarrollo aumentado de nucleosomas, que resultan del plegamiento nuclear de la célula en apoptosis y que contienen una alta expresión de autoantígenos nucleares (proteínas, histonas, DNA). Al respecto se han descrito alteraciones de genes de apoptosis en pacientes con LES y en modelos murinos. La generación de nucleosomas podría inducir la respuesta autoinmune inicial en el LES, expresada en autoanticuerpos antinucleosomas. La interacción de éstos con los autoantígenos nucleares permitiría la expresión de sectores antigénicos que naturalmente no se expresan (antígenos crípticos) y que aparecen en esta situación desencadenando respuestas autoinmunes sucesivas (expansión del repertorio autoinmune), responsable de la gran diversidad del autoanticuerpos antinucleares (por ejemplo anti-DNA nativo, anti-U1-RNP, anti-Sm, anti-Ro (SS-A), anti-La (SS-B)).

En ciertas circunstancias algunos autoantígenos podrían ser inmunogénicos, al ser procesados por células APC especiales, o en el contexto de distintas moléculas de adhesión, que induzcan respuestas T ó B autoinmunes.

c) Alteraciones funcionales linfocitarias. Se han descrito numerosas alteraciones inmunes en linfocitos T y B de pacientes con LES, sin embargo su papel en la patogenia de la enfermedad no se conoce. Así, se ha reportado: (i) disminución de linfocitos T citotóxicos y T supresores (normalmente frenan la respuesta inmune), aumento LTh, (ii) activación policlonal de LB en fases tem-

pranas de la enfermedad, (iii) disfunción del sistema de señales entre células inmunes, que se manifiestan en aumento de respuestas del calcio, hiperfosforilación de sustratos proteicos citosólicos y disminución del factor nuclear kappa B, y (iv) dependencia de la producción de citoquinas Th2 (favorecen la producción de anticuerpos).

El resultado final de éstas y otras numerosas alteraciones funcionales linfocitarias, se traduce en la producción descontrolada de una gran profusión y diversidad de autoanticuerpos, eje central de la patogenia del LES.

d) Desbalance de citoquinas. Los pacientes de LES tienen en general un desbalance de citoquinas con aumento de aquellas proinflamatorias y disminución de las inmunorreguladoras, creando el entorno favorable para el desarrollo de autoinmunidad.

Se ha descrito aumento de IL-4, IL-6 e IL-10; éstas inducen a que las células B autorreactivas se activen, proliferen y se diferencien hacia células B que producen un exceso de autoanticuerpos contra muchos antígenos nucleares. No relacionados directamente a hiperreactividad B, los linfocitos T lúpicos producen y responden menos a IL-2, producen menos IFN, IL-12, TGFβ, TNFα e IL-1. Estos últimos hallazgos no tienen aún un rol patogénico conocido.

e) Hormonas sexuales y eje neurohipotálamo hipofisiario. Es un hecho bien conocido, e independiente del grupo étnico, que el LES afecta preferencialmente a mujeres jóvenes, en periodo fértil, por lo que el papel de las hormonas femeninas en su patogenia, se ha planteado desde siempre. Aún hoy, no ha podido establecerse con certeza esta predilección por el sexo femenino hormonalmente activo. Sin embargo, hay ciertos elementos de la influencia de las hormonas sexuales en el sistema inmune que se conocen.

La administración de estrógenos a mujeres postmenopáusicas parece duplicar su riesgo a desarrollar LES. La hidroxilación del estradiol en posición C-16 es mayor en LES, tanto mujeres como hombres, lo que acarrea más metabolitos estrogénicos. Los estrógenos estimulan los timocitos, los linfocitos T CD8+ y CD4+, los linfocitos B, los macrófagos, la liberación de ciertas citoquinas proinflamatorias, y la expresión de moléculas HLA y de adhesión en células endoteliales. La suma de estos efectos favorece



las respuestas autoinmunes de tipo humoral. Además presenta un efecto favorecedor del cambio de clase, desde autoanticuerpos IgM a IgG; este último isotipo presentaría mayor poder patogénico.

Por otra parte se ha observado disminución de andrógenos en mujeres con LES, y también inadecuada producción de progesterona. También se describe en casi todos los pacientes con LES disminución en los niveles séricos de DHEA (Deshidroepiandrosterona) y de compuestos intermedarios de la síntesis de testosterona. En comparación a los estrógenos, los andrógenos tienen un efecto inmunosupresor.

La progesterona y la prolactina afectan también, al sistema inmune. La progesterona frena la proliferación T y aumenta el número de CD8+, y la hiperprolactinemia se ha asociado a exacerbaciones del LES. Algunos estudios demuestran disregulación del eje hipotálamo hipofisiario, con deficiente producción de cortisona asociado a hiperproducción de prolactina, estableciendo un balance favorable a una hiperreactividad inmune.

3.1.4. Inflamación y daño celular/tisular

La característica inmune, más destacada en el LES, es la gran profusión y diversidad de autoanticuerpos, los cuales inducen daño a través de mecanismos directos de interacción con su antígeno (alteraciones funcionales celulares), por activación del sistema del complemento (citólisis) y por linfocitotoxicidad dependiente de anticuerpos. Sin embargo, el mecanismo clásico de daño tisular en pacientes con LES, lo constituye sin duda, la formación de complejos autoinmunes y su depósito en la pared vascular (por ejemplo: glomerulonefritis lúpica, o vasculitis por complejos DNA anti DNA). Algunas manifestaciones clínicas son también producto de daño inmune por inmunidad celular o LT sensibilizados (por ejemplo: nefritis intersticial).

La generación de un anticuerpo como efecto de una respuesta inmune induce la producción de un segundo anticuerpo dirigido contra el idiotipo del anticuerpo inicial. Esta secuencia induce una red de idiotipo – anti-idiotipo que tiene efectos inmunorreguladores sobre la respuesta inmune inicial (ver capítulo 14). Esta red estaría defectuosa en LES, favoreciendo el desarrollo de múltiples autoanticuerpos y también aumento en la activación de LT CD4+.

Es importante destacar que además de la producción exagerada de complejos inmunes patogénicos en el LES, se han reportado (a) trastornos en la depuración (clearance) de éstos, mediados por disminución de receptores CR1, saturación de éstos y de los receptores Fc de IgG (FcγR), hipocomplementemia, y (b) disfunción de la fagocitosis del sistema fagocítico mononuclear. La combinación de ambos factores favorecería entonces el daño tisular mediado por complejos inmunes.

El LES es una enfermedad autoinmune, inflamatoria, crónica, por lo que los mecanismos patogénicos deben perpetuarse por tiempo prolongado. Para este objeto la respuesta autoinmune debe mantenerse. La pérdida de tolerancia persiste para ciertos autoantígenos, manteniéndose una activación permanente de clones linfocitarios autorreactivos. Los trastornos de la regulación inmune (disfunción de células T y B, red idiotipo-anti-idiotipo, desbalance de citoquinas) persisten. Los mecanismos de eliminación de complejos inmunes están superados. El resultado final es la persistencia de la autoinmunidad y su daño secundario a través del tiempo, planteando así las características clínicas de la enfermedad.

Como resumen general, se puede decir que la etiopatogenia del LES está sustentada en la susceptibilidad genética, factores ambientales y hormonales y en la disregulación inmune. Por lo tanto es multifactorial, cada uno de ellos interactuando con los otros. Probablemente la participación de cada uno de éstos sea variable en cada enfermo. El mejor conocimiento de su etiopatogenia permitirá desarrollar tratamientos más eficientes, más específicos y con menos efectos secundarios.

3.2. Clínica y tratamiento

El LES es una enfermedad inflamatoria que puede comprometer diferentes órganos. Sus manifestaciones clínicas más frecuentes son: síndrome febril y compromiso del estado general; lesiones eritemato papulares de la piel y rash malar, ambos fotosensibles; poliartralgias y poliartritis; alopecia; fenómeno de Raynaud; pleuro-pericarditis; anemia por enfermedad inflamatoria o hemolítica; leucopenia; linfopenia; trombopenia y púrpura trombopénico; y velocidad de eritrosedimentación elevada.

Es frecuente, y muy importante para el pronóstico, el compromiso renal, que puede manifes-



tarse por distintos tipos de glomerulonefritis. La más grave, y que puede llegar a insuficiencia renal, es la glomerulonefritis proliferativa difusa, caracterizada por depósito de complejos inmunes glomerulares e inflamación secundaria. Otra manifestación clínica potencialmente muy grave, es el compromiso del sistema nervioso central, con daño difuso o focal y eventualmente convulsiones.

Todas estas manifestaciones clínicas son muy variables entre distintos pacientes. El diagnóstico de LES se establece frente a la sospecha clínica, con las alteraciones inespecíficas del laboratorio general, y la presencia de distintos autoanticuerpos, especialmente anticuerpos antinucleares y anti DNA, que tienen mayor valor diagnóstico.

El LES no tiene una causa conocida por lo que no tiene un tratamiento específico. Está encaminado a combatir la inflamación en forma efectiva (corticoesteroides); o frenar los mecanismos inmunes que la originan (inmunosupresores). La insuficiencia renal y el compromiso neurológico son las causas más importantes de mortalidad ligadas a la enfermedad. Otra causa frecuente es la infección o la enfermedad vascular aterosclerótica, que están relacionadas al tratamiento agresivo y prolongado.

LECTURAS SUGERIDAS

Artritis reumatoídea

Cook, A.D.; Rowley, M.J.; Mackay, I.R. et al., "Antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis", *Arthritis Rheum*, 39:1720-1727, 1996.

Firestein, G.S., "Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis" In, Harris, R. and Sledge, Eds. **Kelley's Textbook of Rheumatology**, Philadelphia, Saunders, pp. 921-966, 2001.

Firestein, G.S., Zvaifler, N.J., "How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?", *Arthritis Rheum* 33:768-763, 1990.

Fox, D.A., "Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis", In Koopman W.J. ed. **Arthritis and Allied Conditions**, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1085-1102, 2000.

Seldin, M.F.; Amos, C.I.; Ward, R. et al., "The Genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis", *Arthritis Rheum* 42:1071-1079, 1999.

Silman, A.J.; MacGregor, A.J.; Thomson, W. et al., "Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study", *Br J Rheumatol*, 32:903-907, 1993.

Schmidt, D.; Goronzy, J.; Weyand, C.M., "CD4+ CD7- CD28- T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity", *J Clin Invest*, 97:2027-2037, 1996.

Wagner, U.G.; Koetz, K.; Weyand, C.M., et al., "Perturbation of the T cell repertoire in rheumatoid arthritis", *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:14447-14452, 1998.

Lupus Eritematoso Sistémico

Boumpas, D.T.; Fessler, B.J.; Austin, A.H.; Balow, J.; Klippel, J.; Lockshin, M.; "Systemic Lupus Erythematosus: Emerging Concepts", *Ann Int Med*, 123; 42-53, 1995.

Cooper, G.S.; Dooley, M.A.; Treadwell, E.L. et al., "Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus", *Arthritis Rheum*, 41: 1714, 1998.

Craft, J., Fatenejad, S., "Self antigens and epitope spreading in systemic autoimmunity", *Arthritis Rheum*, 40: 1374, 1997.

Elkon, K., "Autoantibodies in systemic lupus erythematosus", *Curr Opin Rheumatol*, 7: 384, 1995.

Hess, E.V., Farley, Y., "Etiology, environmental relationships, epidemiology, and genetics of systemic lupus erythematosus", *Curr Opin Rheumatol*, 7: 371-375, 1995.

Horwitz, D.A., Jacob, C.O., "The cytokine network in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and possible therapeutic implications", *Springer Semin Immunopathol*, 16: 181, 1994.



Lahita, R.G., “The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus”, *Curr Opin Rheumatol*, 11:352, 1999.

Mohan, C.; Adains, S.; Stanik, V.; Datta, SK., “Nucleosome: A Major immunogen for Pathogenic Autoantibody-inducing T Cells of Lupus”, *J Exp Med.*, 177; 1367-1381, 1993.

Mysler, E.; Bini, P.; Drappa, J.; Ramos, P.; Friedman, S.M.; Krammer, PH.; Elkon, K., “The opoptosis-1/Fas protein in human Systemic Lupus Erythematosus”, *J Clin Invest*, 93:1029-1034, 1994.

Reed, W., “Lymphocytes, Cytokines, inflammation, and immune trafficking”, *Curr Opin Rheumatol*, 6: 461-467, 1994.

Rivero, S.J.; Díaz-Jouanen, E.; Alarcón-Segovia, D., “Lymphopenia in Systemic Lupus Erythematosus”, *Arthritis Rheum*, 21: 295-305, 1978.

Schur, P.H., “Genetics of systemic lupus erythematosus”, *Lupus* 4:425, 1995.

Steinberg, A.D., “Systemic Lupus Erythematosus; Theories of Pathogenesis and approach to Therapy”, *Clin. Immunol Immunopathol.*, 72: 171-176, 1994.

Theofilopoulos, A.N., “The basis of autoimmunity: Part II Genetic predisposition”, *Immunol Today*, 16: 150-1, 59, 1995.

Theofilopoulos, A.N., “The basis of autoimmunity: Part I Mechanism of aberrant self-recognition”, *Immunol Today*, 16: 90-98, 1995.





Capítulo 25

SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO

Iván Palomo G., Antonio Cabral, Silvia Pierangeli y Ricardo Forastiero V.

- | | |
|---|--|
| 1. Introducción | 4. Manifestaciones clínicas |
| 2. Antígenos y anticuerpos | 4.1. Manifestaciones vaso-oclusivas |
| 2.1. Antígenos | 4.2. Manifestaciones hemocitopénicas |
| 2.2. Anticuerpos | 4.3. Otras manifestaciones |
| 3. Mecanismos de trombosis | 5. Laboratorio |
| 3.1. Biosíntesis de eicosanoides e isoeicosanoides | 5.1. Anticardiolipina por ELISA |
| 3.2. Sistema antitrombótico de la proteína C | 5.2. Anticoagulante Lúpico |
| 3.3. Vía del factor tisular | 5.3. Pruebas de laboratorio más específicas para el diagnóstico de SAF |
| 3.4. Sistema fibrinolítico | 5.4. ¿Qué pruebas de laboratorio se deben usar en el diagnóstico de SAF? |
| 3.5. Anexinas y activación celular | 6. Tratamiento |
| 3.6. Inmunidad celular y perfil de citoquinas | |
| 3.7. Asociación con factores genéticos de riesgo trombótico | |





RESUMEN

Los anticuerpos antifosfolípidos (aFL) son un grupo heterogéneo de anticuerpos que se encuentran en pacientes con enfermedades del tejido conectivo, infecciones y en asociación al uso de drogas. Su presencia se ha relacionado al Síndrome Antifosfolípido (SAF) que se caracteriza por presentar trombosis, abortos a repetición y trombocitopenia. La mayoría de los anticuerpos aFL patogénicos presentan especificidad para algunas proteínas con afinidad por fosfolípidos aniónicos, la más estudiada es la beta 2-glicoproteína I (β_2 GPI). Varios hallazgos se asocian a los mecanismos trombogénicos de los anticuerpos aFL, destacando los efectos inhibitorios sobre los inhibidores fisiológicos de la coagulación y los efectos que conducen a la activación celular. La pesquisa de los anticuerpos aFL se realiza por ELISA anticardiolipina (aCL) y por pruebas de coagulación (anticoagulante lúpico, AL), incorporándose más recientemente ensayos más específicos como el ELISA para anti- β_2 GPI. En el manejo del SAF se utiliza principalmente anticoagulación.

1. INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos aFL se conocen desde comienzos del siglo XX, primero se los pesquisó por el método de fijación de complemento, posteriormente, en los años cuarenta, a través de la prueba para serología de sífilis, luego, entre los años cincuenta y sesenta, con pruebas de coagulación. En los ochenta, Harris y colaboradores, mediante un radioinmunoanálisis que utilizaba cardiolipina en fase sólida, aumentaron significativamente la sensibilidad en la pesquisa de los anticuerpos aFL, llamados a partir de esa fecha aCL. Posteriormente se desarrolló un ELISA para detectar aCL.

Los anticuerpos aFL en asociación con las complicaciones clínicas definen al SAF primario o secundario a otras enfermedades o fármacos.

A partir de fines de los ochenta, los anticuerpos aFL han sido objeto de múltiples investigaciones tendientes a conocer sus especificidades, mecanismos de unión y su participación en la patogenia de las complicaciones.

En este capítulo se describirán los siguientes aspectos sobre el SAF: especificidad antigénica de los anticuerpos aFL, sus mecanismos patogénicos de trombosis, y algunos aspectos sobre los métodos de pesquisa en el laboratorio, manifestaciones clínicas y tratamiento.

2. ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS

Hasta antes de 1990 se pensaba que los anticuerpos aFL reconocían fosfolípidos aniónicos, lo que justifica su nombre. Actualmente se sabe que la mayoría de los anticuerpos aFL patogénicos tienen especificidad contra algunas proteínas con afinidad por FL con carga negativa; por esta razón también se les denomina Anticuerpos antifosfolípido-proteínas.

2.1. Antígenos

Entre las proteínas blanco de los anticuerpos aFL se destacan la β_2 GPI y protrombina (PT). Además se han descrito otras especificidades: proteína C, proteína S, anexina V, kininógeno de alto peso molecular, trombomodulina, etc. Dada la importancia de la β_2 GPI como blanco de los anticuerpos aFL, a continuación se describen algunos aspectos sobre su estructura y actividad biológica.

β_2 GPI. Es una proteína plasmática sintetizada en el hígado, que se une a moléculas con carga negativa, como FL aniónicos, heparina y lipoproteínas, y a plaquetas activadas. Se sabe que inhibe la vía intrínseca de la coagulación *in vitro*, la actividad protrombinasa de las plaquetas y la agregación plaquetaria inducida por ADP. Sin



embargo, la función de la β_2 GPI *in vivo* no es aún totalmente conocida. La β_2 GPI es una glicoproteína formada por una cadena polipeptídica de 326 aminoácidos (50 kDa). Presenta cinco dominios de aproximadamente 60 residuos. Los dominios I-IV presentan la estructura típica de los miembros de la superfamilia de proteínas de control del complemento (CCP) también llamados dominios “sushi”. El quinto dominio, que se encuentra hacia el extremo carboxilo, presenta 82 aminoácidos que incluyen dos cisteínas adicionales (figura 25-1). El gen que codifica para la β_2 GPI humana fue clonado y secuenciado.

Se han identificado los dominios de unión de la β_2 GPI a los FL aniónicos y a los anticuerpos aFL. Se ha demostrado que la CL se une a la

secuencia aminoacídica presente en el quinto dominio de la proteína ($C^{281}KNKEKKC^{288}$), secuencia con carga positiva debido a la presencia de cuatro lisinas (K) y que se encuentra en la superficie de la proteína. Se ha postulado que también participaría el primer dominio. Por otra parte, se ha establecido que el dominio de unión para los anticuerpos anti- β_2 GPI está principalmente en el cuarto dominio de la β_2 GPI, en un epítipo críptico que se expone cuando la proteína interactúa con los FL aniónicos (figura 25-2). Evidencia más reciente indica que el dominio I presenta el epítipo de una gran parte de los anticuerpos anti- β_2 GPI. Existen dos teorías que explican la interacción entre los anticuerpos anti- β_2 GPI y la β_2 GPI: (a) unión de los anticuerpos a epítipos crípticos expresados en la proteína como resultado de la interacción con FL y (b) unión de los anticuerpos a epítipos nativos de la proteína donde la interacción se produce sólo cuando hay alta densidad antigénica sobre superficies celulares o placas de ELISA. Actualmente el consenso general es la unión de acuerdo a la segunda teoría debido a la reconocida baja afinidad de estos anticuerpos.

Se han descrito cuatro polimorfismos genéticos en la β_2 GPI: en el segundo dominio ($Ser^{88}Asn$) y en el quinto dominio ($Val^{247}Leu$, $Cys^{306}Gly$, $Trp^{316}Ser$).

2.2. Anticuerpos

Los anticuerpos aFL pueden ser de clase IgG, IgM e IgA, teniendo mayor significación clínica el

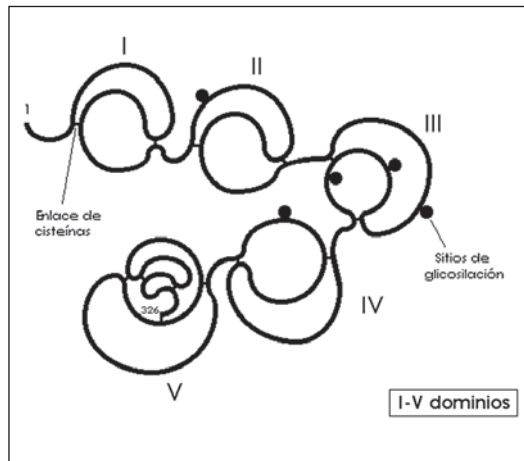


Figura 25-1. Estructura de la β_2 GPI. Esta glicoproteína posee cinco dominios (I-V) de aproximadamente 60 aminoácidos cada uno. \square , glicosilación; c, cisteína.

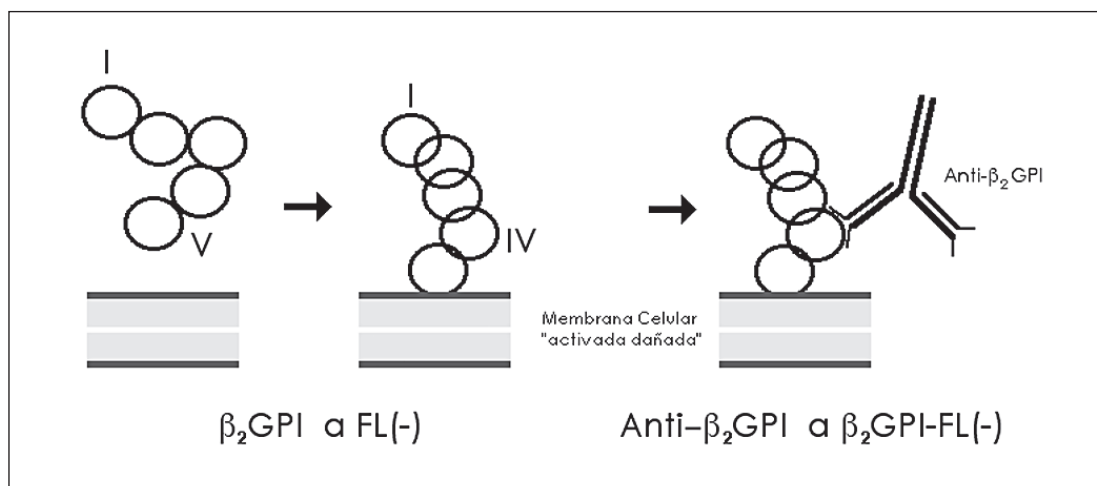


Figura 25-2. Modelo de unión de los anticuerpos anti- β_2 GPI a la β_2 GP. La interacción de la β_2 GPI a fosfolípidos aniónicos permite la exposición de un epítipo críptico en la β_2 GPI, región a la que se unen los anti- β_2 GPI.





isotipo IgG, seguido de IgM. Los anticuerpos aFL convencionales (aCL y AL) se asocian a trombosis venosa y arterial, y a abortos a repetición. Los anticuerpos aFL están presentes en el 1-3% de individuos normales, generalmente en títulos bajos. En cambio, alrededor de un 50% de los pacientes portadores de Lupus Eritematoso Sistémico (LES) presentan algún tipo de anticuerpos aFL. Las embarazadas normales presentan cifras iguales a la población general normal, en cambio alrededor del 20% de las pacientes que desarrollan abortos a repetición presentan aCL y/o AL.

Se han distinguido dos clases de aCL: aCL independientes de β_2 GPI y aCL dependientes de β_2 GPI. Los primeros se han encontrado principalmente en pacientes con enfermedades infecciosas; se unirían a CL en ausencia de β_2 GPI y no serían patogénicos. Los segundos en cambio, se encuentran en pacientes con enfermedades autoinmunes; se unen a β_2 GPI en presencia de CL y tendrían un rol patogénico.

Dos especificidades de los anticuerpos aFL han sido las más estudiadas, anticuerpos anti- β_2 GPI y anti-PT. Ambos se pueden pesquisar a través de ELISAs específicos. Los anticuerpos anti- β_2 GPI son evaluados además en el ELISA para aCL porque uno de los reactivos usados (suero fetal bovino) y el suero del paciente contiene β_2 GPI.

Anticuerpos anti- β_2 GPI. En el SAF la mayoría de los anticuerpos aFL se unen a β_2 GPI y el hallazgo de anticuerpos anti- β_2 GPI presenta alta especificidad para el SAF. Algunos anticuerpos anti- β_2 GPI presentan actividad AL. Fisiológicamente la unión de la β_2 GPI a los FL aniónicos es débil, en cambio en presencia de anticuerpos anti- β_2 GPI la unión de la β_2 GPI a los FL es más fuerte, compitiendo así con los factores de la coagulación.

Anticuerpos anti-PT. En el caso de los anticuerpos anti-PT la asociación con trombosis no es clara. Se sabe que la mayoría de los anti-PT presentan actividad AL y el mecanismo sería similar al descrito para los anticuerpos anti- β_2 GPI, en este caso interfiriendo con la formación del complejo protrombinasa.

3. MECANISMOS DE TROMBOSIS

La asociación de los anticuerpos aFL con las complicaciones tromboembólicas sugiere que

estos anticuerpos juegan un rol fundamental en la patogenia del SAF. Varios mecanismos (tabla 25-1) han sido propuestos teniendo en cuenta que los FL y las proteínas que unen fosfolípidos tienen un papel crucial en el mantenimiento de la hemostasia e intervienen en una gran variedad de funciones celulares. A continuación se presentan los hallazgos más relevantes en el campo de la fisiopatogenia del SAF:

Tabla 25.1. Sistemas involucrados en la patogenia del SAF

- Biosíntesis de eicosanoides e isoeicosanoides
- Sistema antitrombótico de la proteína C
- Vía del Factor Tisular
- Sistema Fibrinolítico
- Anexinas y Placenta
- Plaquetas y Monocitos
- Inmunidad celular y Citoquinas
- Combinación con Trombofilias hereditarias

3.1. Biosíntesis de eicosanoides e isoeicosanoides.

Estos componentes se sintetizan a partir del ácido araquidónico de las membranas celulares por vía enzimática (eicosanoides) o por acción de radicales libres (isoeicosanoides). Varios estudios *in vitro* demostraron que algunos anticuerpos aFL interferían con la producción de prostaciclina (PGI_2), eicosanoide producido por las células endoteliales (CE), inhibiendo la liberación de ácido araquidónico o la actividad de las enzimas involucradas. Estudios más recientes mostraron que las IgG de pacientes con SAF estimulan la síntesis de la ciclooxigenasa inducible sin afectar la expresión de la enzima constitutiva endotelial. La síntesis *in vitro* de tromboxano A_2 (TXA_2), eicosanoide de origen plaquetario, es incrementada en presencia de β_2 GPI y de anticuerpos aFL purificados de pacientes con SAF. Este efecto no se observó al utilizar anticuerpos aFL de pacientes con sífilis. La activación plaquetaria parece ser dependiente de la unión del fragmento Fc de las IgG al receptor celular $\text{Fc}\gamma\text{-RIIA}$. La biosíntesis de eicosanoides puede ser evaluada a través de la eliminación urinaria de sus metabolitos. En estudios *ex vivo* se encontró un desbalance en la relación $\text{TXA}_2/\text{PGI}_2$ con un incremento mayor del metabolito plaquetario indicando una alteración *in vivo* que podría tener relevancia en el desarrollo



de trombosis. El aumento del metabolito plaquetario se asoció a la presencia de anticuerpos aFL dependientes de β_2 GPI de isotipo IgG. Los isoeicosanoides reflejan los fenómenos de peroxidación lipídica *in vivo* y poseen acción vasoconstrictora y de activador plaquetario, postulándose que tendrían un rol importante en los eventos involucrados en el desarrollo de aterosclerosis y trombosis en las lesiones vasculares. En estudios recientes se halló un aumento en la excreción urinaria de los isoeicosanoides que se asociaba con el incremento plasmático de los marcadores de generación de trombina y de factor tisular (FT) soluble. Recientemente se encontró que los niveles urinarios de los metabolitos de eicosanoides e isoeicosanoides se correlacionan. Estos hallazgos apoyan la hipótesis que involucra a los fenómenos de estrés oxidativo e inflamación en el desarrollo del SAF.

3.2. Sistema antitrombótico de la proteína C.

Este mecanismo fisiológico de control de la hemostasia es uno de los más importantes, y varios estudios han evaluado la relación entre anticuerpos aFL y este sistema. En lo que respecta a la acción de los anticuerpos aFL sobre la activación de la proteína C (PC) mediada por trombomodulina hay resultados contradictorios, pero existe consenso general de que estos anticuerpos inhiben la función de la PC activada (APC). En particular, los anticuerpos aFL previenen la inactivación del factor Va por la APC sobre las superficies fosfolipídicas generando un estado adquirido de resistencia a la APC con el consecuente efecto protrombótico. Esto es evidente principalmente con los anticuerpos aFL dependientes de β_2 GPI. Otra de las alteraciones frecuentemente encontradas en este sistema es la reducción en los niveles plasmáticos de la proteína S (PS) libre (cofactor de la PC) en los pacientes con anticuerpos aFL. La β_2 GPI ejerce un efecto inhibitorio fisiológico en la unión PS-proteína de unión a C4b (C4bBP) que es reducido en presencia de anticuerpos aFL y se propone que los anticuerpos aFL aumentan la afinidad de la PS por C4bBP e inducen una reducción en los niveles de PS libre.

3.3. Vía del factor tisular. La estimulación inducida por los anticuerpos aFL sobre la actividad procoagulante de CE y monocitos es debida al aumento en la expresión de FT en las superficies celulares. Los anticuerpos aFL autoinmunes *in*

vitro no sólo aumentan la expresión del FT sino que además incrementan la síntesis proteica y el mRNA del mismo. La elevación simultánea *in vivo* en los niveles plasmáticos del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y de FT sugiere que los anticuerpos aFL promueven la liberación del VEGF, que a su vez induciría la expresión del FT con la consecuente activación de coagulación. Recientemente se demostró además que los anticuerpos aFL dependientes de β_2 GPI suprimen la actividad anti-factor Xa del inhibidor de la vía del factor tisular incrementando la generación de factor Xa por el FT.

3.4. Sistema fibrinolítico. Este sistema a través de la transformación del plasminógeno en plasmina disuelve el coágulo de fibrina. Diversos estudios han demostrado un incremento en los niveles plasmáticos del inhibidor (PAI-1) del activador tisular del plasminógeno (tPA). Una hipótesis muy reciente propone que el estado adquirido de hipofibrinólisis en este síndrome es causado por la unión de los anticuerpos anti-PT con el plasminógeno inhibiendo su activación. La β_2 GPI parece proteger al t-PA de la inhibición por el PAI-1 y este efecto es revertido en presencia de autoanticuerpos aFL que alteran esta función de la β_2 GPI.

3.5. Anexinas y activación celular. La anexina V tiene un rol importante al prevenir las reacciones de coagulación sobre la superficie placentaria. Algunos datos indican que los anticuerpos aFL reducen la concentración de anexina V sobre las superficies trofoblásticas placentarias y CE acelerando la activación de coagulación sobre las mismas por la mayor exposición de FL. La activación endotelial ha recibido mucha atención en estos años y la evidencia indica el cambio del fenotipo normal antitrombótico del endotelio a un fenotipo protrombótico por acción de los anticuerpos aFL dependientes de β_2 GPI. Además de lo ya mencionado (PGI_2 , FT, anexina V), otros estudios han demostrado un fenotipo proadhesivo y proinflamatorio al expresar varias moléculas de adhesión que conducen a la adhesión y posterior activación de leucocitos al endotelio. El aumento en plasma de estas moléculas de adhesión es muy frecuente en pacientes con autoanticuerpos aFL y se correlaciona con el aumento de los marcadores que indican actividad trombinica. Utilizando un modelo animal de microcirculación (músculo cremáster de ratones) se halló que los anticuerpos



aFL incrementan la adhesión de leucocitos al endotelio. Se demostró el rol fundamental de las moléculas de adhesión al no observar el efecto trombogénico en el modelo de trombosis y de activación endotelial por parte de los anticuerpos aFL cuando se usaron animales knock-out en las moléculas de adhesión. Recientemente se demostró la presencia de micropartículas endoteliales (EMP) en pacientes con autoanticuerpos aFL. La liberación de EMP en circulación podría diseminar las actividades procoagulantes y proadhesivas más allá del sitio de formación de las EMP y contribuir al estado protrombótico del SAF. Un trabajo reciente indica que la β_2 GPI y los anticuerpos aFL dependientes de β_2 GPI se acumulan en los endosomas tardíos de las CE induciendo un cambio en la movilización intracelular de proteínas que podría contribuir a la patogenia del SAF.

3.6. Inmunidad celular y perfil de citoquinas.

El rol de la inmunidad celular en el SAF está siendo recientemente evaluado. Sin embargo, los ensayos *in vitro* muestran datos contradictorios en si las células T CD4 específicas para β_2 GPI producen citoquinas del tipo Th1 o Th2. El cambio de fenotipo Th1 a Th2 podría tener implicancias clínicas ya que el tratamiento con anticuerpos específicos anti-idiotipo resultó ser efectivo atenuando las manifestaciones clínicas y serológicas del SAF experimental en ratones. Los resultados sugieren que las células Th2 tienen un rol importante en el desarrollo del SAF y que el cambio Th2 a Th1 se asocia con inducción de remisión del SAF. En un estudio reciente se halló que la respuesta inmune del tipo 2 caracteriza a los pacientes con SAF primario y que aquellos con anticuerpos aFL sin SAF, al igual que en los controles normales, predomina el patrón de citoquinas del tipo Th1. Estos hallazgos en pacientes con anticuerpos aFL indicarían que el cambio de fenotipo Th1 a Th2 también tendría un cierto rol en el desarrollo del SAF en humanos.

3.7. Asociación con factores genéticos de riesgo trombótico. Los eventos trombóticos son multifactoriales y existen algunos pocos estudios publicados sobre la prevalencia de factores genéticos de riesgo trombótico en pacientes con anticuerpos aFL. En una serie de 105 pacientes consecutivos con anticuerpos aFL se evaluaron el factor V Leiden, el polimorfismo del gen de la protrombina G20210G, la variante termolábil de la metilentetrahidrofolato reductasa y el genotipo

4G/4G en el promotor del PAI-1. Los datos indican que la combinación de factores genéticos se asocia al SAF y podría contribuir al estado protrombótico en algunos pacientes con anticuerpos aFL.

En resumen los mecanismos de trombosis o pérdidas fetales mediados por autoanticuerpos en el SAF pueden ser la consecuencia de dos tipos de interacciones: (a) la unión de los anticuerpos a los antígenos unidos a membranas altera la cinética de las reacciones dependientes de FL y (b) la unión de los anticuerpos a los antígenos unidos a los receptores de membranas celulares induce señales de transducción y activación celular.

4. CLÍNICA (Antonio R. Cabral)

Las manifestaciones clínicas asociadas a los anticuerpos aFL pueden agruparse en: (a) Vaso-occlusivas, (b) hemocitopénicas y, tal vez, (c) las que podrían deberse a la acción directa de los anticuerpos con tejidos ricos en fosfolípidos, v. gr., sistema nervioso central y trofoblasto.

4.1. Manifestaciones vaso-occlusivas

La manifestación clínica distintiva del SAF es la trombosis venosa y/o arterial, ambas suelen ser recurrentes; las oclusiones arteriales pueden tener vasculopatía con gran proliferación de la íntima y de la media como factor asociado. Otras manifestaciones son el livedo reticularis, úlceras en piernas asociadas a lesión proliferativa probablemente debida también a microtrombosis y pérdida fetal repetida. Cuando ésta ocurre en el tercer trimestre del embarazo, parece deberse a lesión trombótica y proliferativa de los vasos placentarios.

Otras manifestaciones que en series grandes de pacientes han probado tener asociación significativa con anticuerpos aFL son la hipertensión pulmonar y la mielitis transversa. Igualmente, la vasculitis, neuropatía periférica, convulsiones e isquemia cerebral transitoria son manifestaciones clínicas más frecuentes en pacientes con portadores de LES y anticuerpos aFL que en los seronegativos.

La prevalencia de infarto del miocardio (IM) en pacientes con SAF primario o secundario a LES varía del 4 al 7%, mientras que la de aCL en el suero de pacientes con IM, pero sin enfermedad autoinmune, oscila entre el 3 y 80%. Esta diferen-



cia quizá dependa del momento de la toma de la muestra, de algunas variaciones en la sensibilidad de los ensayos entre los diferentes laboratorios o de la selección de pacientes. Por otro lado, en una cohorte de 133 pacientes con IM o muerte cardiaca, anidada en un estudio prospectivo de 4081 hombres sanos, los aCL a títulos altos aumentaron el riesgo de desarrollar IM alrededor de 2 veces más que en los sujetos sanos sin aCL; tal riesgo fue independiente del tabaquismo, la tensión arterial sistólica y de los niveles séricos de lipoproteínas de alta y baja densidad.

Varios autores han mostrado que los pacientes con LES y aCL tienen mayor prevalencia de vegetaciones valvulares que los pacientes seronegativos. Igualmente, en un estudio ecocardiográfico de 55 pacientes con SAF hubo una prevalencia del 38% de vegetaciones valvulares, particularmente de las válvulas mitral y aórtica, y sólo del 4% en el mismo número de personas sanas.

Los pacientes con LES y AL o con aCL positivos tienen mayor frecuencia de microtrombos glomerulares, pero no de nefritis lúpica. En un grupo de 667 pacientes con LES, hubo asociación negativa de aCL séricos y síndrome nefrótico, quizá debida a la excreción urinaria de los aCL IgG. Además de los microtrombos glomerulares, los pacientes con SAF pueden tener lesiones tipo microangiopatía trombótica o proliferación mesangial.

Las trombosis hemorrágicas de las glándulas suprarrenales son alteraciones bien reconocidas en el SAF primario. Por ejemplo, de 38 casos con hipoadrenalismo asociado a aCL, 30 tuvieron SAF primario, en la mayoría (70%) de los cuales la insuficiencia suprarrenal fue de iniciación súbita. La obstrucción del flujo hepático secundaria a trombosis de venas suprahepáticas, síndrome de Budd-Chiari, es una manifestación clínica bien reconocida en los síndromes primario y secundario de anticuerpos aFL. En la actualidad se considera que el SAF primario es una de las principales causas de Budd-Chiari.

4.2. Manifestaciones hemocitopénicas

La trombocitopenia fue la primera manifestación hemocitopénica reconocida como parte del SAF. Algún tiempo después la anemia hemolítica autoinmune se asoció a anticuerpos aFL, particularmente al isotipo IgM, que reconocen a la fosfatidilcolina como blanco antigénico. La sin-

cronía de púrpura trombocitopénica con anemia hemolítica autoinmunes (síndrome de Evans) en pacientes con LES sucede casi siempre en presencia de anticuerpos aFL. Una asociación en la que se hace poco énfasis, pero que varios autores han informado su asociación con anticuerpos aFL en pacientes con lupus, es la neutropenia.

La tabla 25-2 muestra la frecuencia de algunas manifestaciones clínicas vaso-oclusivas y hemocitopénicas en el SAF primario y sus diferencias con el secundario a LES.

4.3. Otras manifestaciones

Algunas manifestaciones clínicas del SAF podrían deberse a la unión del anticuerpo a fosfolípidos presentes en el sistema nervioso central o en el trofoblasto. Éstas incluyen la mielitis transversa, desmielinización, la pérdida fetal durante el primer trimestre y, tal vez, algunos embarazos anembrionicos.

5. LABORATORIO

Los ensayos que detectan anticuerpos aFL tienen importancia porque ayudan al médico en el diagnóstico del SAF. Estos anticuerpos se pueden detectar mediante ensayos de fase sólida (aCL) o por medio de pruebas de hemostasia que detectan la prolongación de reacciones de la coagulación en las que los fosfolípidos aniónicos actúan como catalizadores, y que no pueden ser corregidas con plasma normal (AL).

El diagnóstico de SAF se basa en un título de moderado a alto de aCL y/o en una prueba positiva para AL (al menos en dos ocasiones distintas), en pacientes que presentan alguna de las manifestaciones clínicas propia del SAF (punto 4). El ELISA aCL, aunque ha probado ser una prueba de laboratorio altamente sensible, resulta positiva también en otras enfermedades que incluyen a saber: enfermedades del tejido conectivo, enfermedades infecciosas como la sífilis, fiebre Q y SIDA y en algunos síndromes inducidos por fármacos. Se sabe, sin embargo que los anticuerpos aFL son clínicamente significativos solamente cuando están presentes en pacientes con SAF y particularmente si los títulos son elevados; es así que se ha intentado modificar el ensayo en muchas oportunidades para hacerlo más específico para el diagnóstico de SAF.

A continuación se revisarán las diferentes téc-



Tabla 25-2. Frecuencia de algunas manifestaciones clínicas vaso-oclusivas y hemocitopénicas en el SAF primario y sus diferencias con el secundario a LES.

Manifestación clínica	SAF primario	SAF secundario a LES	p
VASO-OCCLUSIVAS			
Arteriales	18/41 (44%)	13/101 (13%)	0.0001*
Pérdida fetal repetida	20/25 (80%)	23/50 (46%)	0.01*
Livedo reticularis	14/44 (32%)	73/101 (72%)	0.00001*
Valvulopatía cardíaca	19/58 (37%)	29/56 (63%)	<0.005**
HEMOCITOPÉNICAS			
Anemia hemolítica	5/44 (12%)	28/101 (28%)	0.05*
	4/58 (7%)	12/56 (21%)	<0.05**
Neutropenia	0	6/56 (11%)	<0.05**
Trombocitopenia	13/45 (28%)	53/101 (53%)	0.01*

* Tomado de Cardiel H, Grupo Multicéntrico de la Ciudad de México: Síndrome de antifosfolípido primario (SAFP). Informe inicial de 51 pacientes. Grupo Multicéntrico de la Ciudad de México. *Rev Mex Reumatol* 1992; 7:4.

** Tomado de Vianna JL, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Font J, Cervera R, Lopez-Soto A, Tolosa C, Juliane F, Selva A, Ingelmo M, Hughes GRV: "Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: a European multicenter study of 114 patients". *Am J Med* 1994; 96:3-9.

nicas usadas para validar y mejorar la determinación de aCL, así como aspectos concernientes a la especificidad del ensayo. También se discutirán nuevas pruebas que han demostrado ser más específicas para el diagnóstico de SAF.

5.1. Anticardiolipina por ELISA

La asociación de una prueba aCL positiva con manifestaciones clínicas de SAF ocurre, principalmente, cuando los títulos de aCL son moderados o altos, particularmente si son del isotipo IgG, que es más prevalente que el IgM. Sin embargo, existen reportes de que la presencia de aCL de tipo IgA y IgM ocasionalmente también están asociados con manifestaciones clínicas de SAF.

Frecuentemente se encuentra que los resultados se expresan en rangos de positividad y además en unidades GPL y MPL. Se ha demostrado que la variación entre laboratorios es menor en estos casos.

La prueba aCL es sensible y se lo encuentra positivo en más del 80-90% de los pacientes con

SAF. El problema es que este ensayo es también positivo en otras enfermedades que no son SAF. Sin embargo, debido a que los pacientes con SAF generalmente tienen niveles altos de aCL, la mayor precisión en el diagnóstico se puede lograr usando puntos de corte más altos para el ensayo. También se han empezado a usar otros antígenos para cubrir las placas de ELISA que aumentan la especificidad de la prueba y serán descritos en el punto 5.3.

El primer ensayo de aCL fue un radioinmunoensayo. Muchos laboratorios adoptaron el ensayo de inmediato y esto acarrió la aparición de algunos problemas. Por ejemplo, con la técnica utilizada, interpretación de los resultados, etc. Para asegurar que la prueba presentaba valor diagnóstico para el SAF, sería entonces necesario identificar anticuerpos por isotipo y cuantificar los resultados. También se destacó la necesidad de establecer cuáles eran los métodos válidos así como procedimientos estandarizados para realizar esta determinación. Se llevó a cabo entonces, el primer taller internacional de estandarización



en 1986, seguido por otros dos talleres del mismo tipo.

Desde el momento que el ensayo se puso en marcha, se han hecho algunos cambios tendientes a: reducir la unión inespecífica, estandarizar la cuantificación de los resultados y los tiempos y temperaturas de incubación. Se recomendó, por ejemplo, el uso de suero fetal bovino en vez de gelatina en la solución de bloqueo y en el diluyente porque ello mejoraba la unión de los anticuerpos a los FL. Este fenómeno fue atribuido posteriormente a la presencia en el suero de β_2 GPI. También se enfatizó en la necesidad de estandarizar el procedimiento para obtener valores cuantitativos precisos, dada la importancia de esos valores en el diagnóstico apropiado de la enfermedad.

Estandarización del ensayo de aCL por ELISA

En el primer taller de estandarización de aCL, se discutieron y estudiaron los métodos que debían usarse para medir los títulos de aCL. Se establecieron unidades de medida, y se propuso el uso de seis calibradores para que los laboratorios en distintas partes del mundo pudieran realizar la determinación de aCL con mejor precisión. En el segundo taller se demostró que cuando los aCL se median en forma semicuantitativa, en vez de cuantitativa, era posible obtener mejor acuerdo (correlación o precisión) en los resultados obtenidos en distintos laboratorios. En el tercer y cuarto taller se discutieron temas controvertidos, particularmente con respecto a la especificidad del ensayo, los antígenos que estos anticuerpos reconocen y se analizaron y compararon equipos comerciales para la detección de aCL.

5.2. Anticoagulante Lúpico

El AL está presente en el SAF con menos frecuencia que aCL. Se sabe que el AL es una prueba más específica para la detección de anticuerpos aFL, ya que generalmente no se encuentra positiva en enfermedades que no sean el SAF. Este ensayo de AL mide la habilidad de los anticuerpos aFL de prolongar las reacciones de la coagulación dependientes de FL.

En publicaciones recientes, se ha demostrado que los anticuerpos aFL son heterogéneos y que los dos tipos de anticuerpos tal vez sean entidades distintas. Se sabe también que aunque la mayoría de los pacientes con SAF tienen positivas esas dos pruebas de laboratorio, aproximada-

mente un 10-16% de los pacientes con SAF son AL positivo y negativo para aCL y alrededor de un 25 % son solamente positivos para aCL.

5.3. Pruebas de laboratorio más específicas para el diagnóstico de SAF

Como se destacó anteriormente, uno de los mayores problemas del ensayo de ELISA para aCL es el número de falsos positivos que presenta, es decir una gran variedad de pacientes con enfermedades que no son SAF, particularmente de origen infeccioso tienen aCL positivos. Últimamente se han desarrollado modificaciones al ensayo de aCL. Éstas incluyen por ejemplo, cubrir las placas β_2 GPI, con fosfatidilserina o con una mezcla de fosfolípidos aniónicos (*AphL® ELISA Kit*) en vez de cardiolipina, y estas modificaciones han resultado en una mayor especificidad del ensayo.

Estudios publicados que utilizan β_2 GPI+como antígeno, particularmente cuando se cubren placas de poliestireno de “high binding” o oxidadas, han demostrado que el ensayo es relativamente específico para la detección de anticuerpos presentes en pacientes con SAF. Estudios publicados provenientes de distintos laboratorios indican que la sensibilidad del ensayo varía del 40 al 90%. La especificidad también varía entre los distintos grupos de investigadores, dependiendo de la selección de los sueros de los pacientes y de la técnica utilizada. Varios estudios han demostrado que el ensayo que utiliza la mezcla de fosfolípidos aniónicos es un método sensible y específico para la identificación de pacientes con SAF.

5.4. ¿Qué pruebas de laboratorio se deben usar en el diagnóstico de SAF?

La correcta y precisa identificación de pacientes con SAF es importante ya que estos pacientes deben someterse a tratamientos para prevenir la incidencia de trombosis a repetición, que incluyen anticoagulación de por vida, o debe decidirse si tratar o no a una mujer embarazada para prevenir la recurrencia de pérdidas fetales. Además, existen muchas otras causas de trombosis y más aún de pérdidas fetales. Es entonces importante realizar el diagnóstico de SAF con precisión. En general se acepta que el AL y el ensayo de aCL por ELISA se deben usar para confirmar el diagnóstico presuntivo de SAF.

En resumen, el diagnóstico de SAF se puede

confirmar en pacientes que presenten síntomas clínicos de SAF (trombosis arteriales y/o venosas y/o pérdidas fetales) y que tengan un título de medio a alto de aCL (particularmente IgG, más de 40 unidades GPL) y/o AL positivo. Sin embargo, hay situaciones en las que la confirmación del SAF puede obtenerse con uno de los ensayos más específicos que se discutieron en la sección anterior, el ELISA para anticuerpos anti- β_2 GPI o el *AphL® ELISA Kit*:

- Pacientes con trombosis venosas y/o arteriales o con pérdidas fetales que son positivos bajos IgG para aCL, o solamente positivos para IgM o IgA aCL.
- Pacientes que presentan manifestaciones clínicas no frecuentes en el SAF como por ejemplo trombocitopenia, tromboflebitis, aterosclerosis, pérdidas fetales en el primer trimestre, livedo reticularis, úlceras en las piernas, corea, lesiones cardíacas valvulares, en ausencia de manifestaciones clínicas primarias de SAF.

- Pacientes con manifestaciones clínicas de SAF pero con pruebas de AL y aCL negativas.

El algoritmo mostrado en la figura 25-3 muestra que primero se deben realizar las pruebas de aCL y de AL. Si estas pruebas (cualquiera de las dos) son negativas, se debe realizar una prueba más específica que pueden incluir el ensayo de anti- β_2 GPI o el *AphL® ELISA Kit*. Debido a que la sensibilidad del citado “kit” es similar a la del ensayo de aCL, aquel ensayo que usa la mezcla de FL puede remplazar al aCL y usarse en el primer nivel junto con el AL.

6. TRATAMIENTO (Antonio R. Cabral)

Además de su relevancia biológica, el conocimiento de que el SAF es parte del lupus eritematoso tiene gran importancia terapéutica, ya que las manifestaciones de éste, particularmente las vaso-oclusivas, requieren tratamiento antiagre-

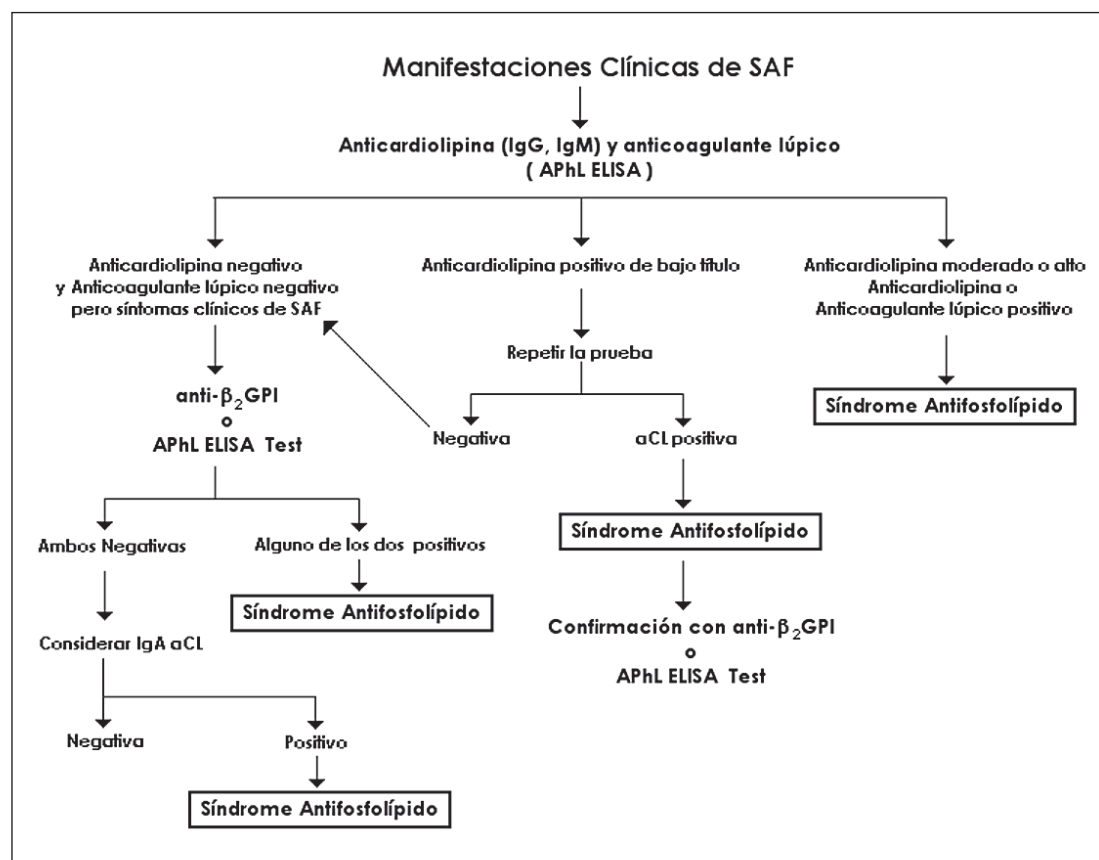


Figura 25-3. Algoritmo de la secuencia de diagnóstico de laboratorio en pacientes que presentan clínica de SAF. Tomado de: Harris EN, Pierangeli S. “Equivocal” Antiphospholipid Syndrome. *J Autoimmunity* 15: 81-5, 2000.



gante plaquetario y/o anticoagulante y no el corticoesteroideo o el inmunosupresor. Esta última noción deriva de que el bajar los niveles de anticuerpos aFL no tiene efecto positivo en las manifestaciones del síndrome. Por otra parte, para que tales niveles bajen se requieren dosis mayores de corticoesteroides e incluso de inmunosupresores a largo plazo, quizá mayor al que lo requieren las manifestaciones clínicas clásicas del lupus.

La pérdida fetal repetida se puede prevenir mediante la administración de aspirina a dosis de 65 a 100 mg/día. Para ello, la aspirina debe iniciarse temprano en el embarazo y, de preferencia, antes. La administración de heparina subcutánea durante el embarazo aumenta las probabilidades de tener productos vivos y puede disminuir la aparición de preeclampsia. Pese a su costo, se favorece el uso de heparina de bajo peso molecular dada la duración que deberá tener su administración. Otra forma de tratamiento que puede aumentar las probabilidades de éxito es la administración de gamaglobulina endovenosa. El alto costo, sin embargo, limita su uso a situaciones elitistas. Se ha propuesto a la prednisona para el tratamiento de la pérdida fetal, pero esta medida no confiere ventaja alguna; de hecho, su uso durante toda la gestación confiere mayor riesgo de daño que de beneficio.

Debido a que la exposición de fosfolípidos aniónicos en la superficie de las plaquetas activadas o agregadas parece tener un papel crucial en la patogenia de la trombocitopenia, se ha propuesto tratar ésta con aspirina a dosis bajas. Los resultados positivos de esta medida en pacientes con SAF primario no se han reproducido en los del secundario a LES, probablemente debido a los varios autoanticuerpos antiplaquetarios presentes en el suero de estos pacientes. En pacientes con LES el tratamiento de la trombocitopenia, como el de la anemia hemolítica, sí requiere corticoesteroides a dosis altas por tiempos variables y descensos lentos después de la recuperación, así como inmunosupresores u otras terapias como el danazol, la gamaglobulina endovenosa y, como medida extrema aunque no siempre efectiva, esplenectomía.

El tratamiento preventivo de la trombosis por SAF es aún muy imperfecto. Parece haber consenso, sin embargo, en que requiere anticoagulantes a dosis ajustadas para obtener una intensidad cercana al 3.0 de INR ("international normalization ratio"). Debe tomarse en cuenta que en presencia de anticoagulante lúpico, el INR quizá

no refleje el real estado de anticoagulación; por ello, se pueden determinar los niveles del factor X cromogénico y del tiempo de protrombina-proconvertina. La decisión de iniciar tratamiento anticoagulante debe considerar el hecho de que puede necesitarse a largo plazo y tal vez de por vida. La suspensión de los anticoagulantes pide mucha prudencia, debe hacerse gradualmente y evitar la administración de vitamina K, pues la suspensión repentina del tratamiento anticoagulante puede inducir hipercoagulabilidad generalizada grave.

LECTURAS SUGERIDAS

Alarcón-Segovia, D.; Delezé, M.; Oria, C.V.; Sánchez-Guerrero, J.; Gómez-Pacheco, L.; Cabiedes, J.; Fernández, L.; Ponce de León, S., "Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients", *Medicine* 1989; 68:353-365.

Alarcón-Segovia, D.; Pérez-Vázquez, M.E.; Villa, A.R.; Drenkard, C.; Cabiedes, J., "Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus", *Semin Arthritis Rheum* 1992; 21:275-286.

Alarcón-Segovia, D., "On the catastrophic adjective for the antiphospholipid syndrome", *Clin Exp Rheumatol* 1993; 11:587-588.

Amengual, O.; Atsumi, T.; Khamashta, M.; Hughes, G., "Clinical significance of anti-B2 glycoprotein I antibodies", *Ann Med Intern* 1996; 147: 15-17.

Asherson, R.A., "The catastrophic antiphospholipid syndrome" (Editorial), *J Rheumatol* 1992; 19:508-512.

Cabiedes, J.; Cabral, A.; Alarcón-Segovia, D., "Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus associate more strongly with anti- β_2 glycoprotein 1 than with antiphospholipid antibodies", *J Rheumatol* 1995; 22: 1899-1906.

Cabral, A.R.; Cabiedes J., Alarcón-Segovia, D., "Hemolytic anemia related to an IgM autoantibody to phosphatidylcholine that binds *in vitro* to stored and to bromelain-treated erythrocytes", *J Autoimmunity* 1990; 3:773-787.



Carreras, L.O., Forastiero R.R., "Pathogenic role of antiprotein-phospholipid antibodies", *Haemostasis* 1996; 26: 340-357.

Delezé, M.; Alarcón-Segovia, D.; Oria, C.V.; Sánchez-Guerrero, J.; Fernández-Domínguez, L.; Gómez-Pacheco, L.; Ponce de León, S., "Hemocytopenia in systemic lupus erythematosus. Relationship to antiphospholipid antibodies", *J Rheumatol* 1989; 16:926-930.

Derksen, R.H.; de Groot, P.G.; Nieuwenhuis, H.K.; Christiaens, G.C., "How to treat women with antiphospholipid antibodies in pregnancy?" *Ann Rheum Dis* 2001; 60:1-3.

Dunoyer-Geindre, S.; Kruithof, E.K.O.; de Rochemonteix, G.; Rosnoblet, C.; Gruenberg, J., Reber, G.; de Moerloose, P., "Localization of β_2 -glycoprotein I in late endosomes of human endothelial cells", *Thromb Haemost* 2001; 85: 903-907.

Forastiero, R.; Martinuzzo, M.; Adamczuk, Y.; Iglesias Varela, M.L.; Pombo, G.; Carreras, L.O., "The combination of thrombophilic genotypes is associated with definite antiphospholipid syndrome", *Haematologica* 2001; 86: 735-741.

Harris, E.N.; Gharavi, A.E.; Boey, M.L.; Patel, B.M.; Mackworth-Young, C.G.; Loizou, S.; Hughes, G.R., "Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus", *Lancet* 1983; 2: 1211-1214.

Harris, E.N.; Pierangeli, S.S., "A more specific ELISA assay for the detection of antiphospholipid", *Clin Immunol Newsletter* 1995; 15: 26-28.

Khamashta, M.A. (Editor), **Hughes Syndrome, Antiphospholipid Syndrome**, London, Springer, 2000.

Khamashta, M.A.; Cuadrado, M.J.; Mujic, F.; Taub, N.A.; Hunt, B.J., Hughes, G.R.V., "The management of thrombosis in the antiphospholipid syndrome", *N Engl J Med* 1995; 332:993-997.

Martinuzzo, M.; Forastiero, R.R.; Carreras, L.O., "Anti- β_2 glycoprotein I antibodies: detection and association with thrombosis", *Br J Haematol* 1995; 89: 397-402.

Matsuura, E.; Igarashi, Y.; Fujimoto, M.; Ichikawa, K.; Koike, T., "Anticardiolipin cofactors and differential diagnosis of autoimmune disease", *Lancet* 1990; 336: 177-178.

McNeil, H.P.; Simpson, R.J.; Chesterman, C.N.; Krilis, S., "Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid binding inhibitor of coagulation: β_2 glycoprotein 1 (apolipoprotein H)", *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1990; 87: 4120-4124.

Palomo, I.; Pereira, J.; Alarcón, M.; Vázquez, M., "Anticuerpos asociados a trombosis", *Rev. Chil. Cancerol. Hematol.* 2000; 10: 69-78.

Pierangeli, S.S.; Espínola, R.; Liu, X.; Harris, E.N., "Thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies are mediated by intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and P-selectin", *Circ Res* 2001; 88: 245-250.

Pierangeli, S.S.; Stewart, M.; Silva, L.K.; Harris, E.N., "Report of an anticardiolipin wet workshop during the VIIth International Symposium on antiphospholipid antibodies", *J Rheumatol* 1998; 25: 156-162.

Praticò, D.; Ferro, D.; Iuliano, L.; Rokach, J.; Conti, F.; Valesini, G.; Fitzgerald, G.A.; Violi, F., "Ongoing prothrombotic state in patients with antiphospholipid antibodies: a role for increased lipid peroxidation", *Blood* 1999; 93: 3401-3407.

Provenzale, J.M.; Ortel, T.L.; Nelson, R.C., "Adrenal hemorrhage in patients with primary antiphospholipid syndrome", *Imaging findings. A J R* 1995; 165:361-364.

Rand, J.H.; Wu, X.X.; Andree, H.A.M.; Lockwood, C.J.; Guller, S.; Scher, J.; Harpel, P.C., "Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome – a possible thrombogenic mechanism", *N Engl J Med* 1997; 337: 154-160.

Roubey, R., "Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: A new view of lupus anticoagulants and other antiphospholipid autoantibodies", *Blood* 1994; 84: 2854-2867.



Silveira, L.H.; Hubble, C.L.; Jara, L.J.; Saway, S.; Martínez, O.P.; Seleznick, M.J.; Angel, J.; Obrien, W.; Espinoza, L.R., “Prevention of anticardiolipin antibody-related pregnancy losses with prednisone and aspirin”, *Am J Med* 1992; 93:403-411.

Vianna, J.L.; Khamashta, M.A.; Ordi-Ros, J.; Font, J.; Cervera, R.; López-Soto, A.; Tolosa, C.; Juliane, F.; Selva, A.; Ingelmo, M.; Hughes, G.R.V., “Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: a European multicenter study of 114 patients”, *Am J Med* 1994; 96:3-9.

Williams, F.M.K.; Parmar, K.; Hughes G.R.V.; Hunt, B.J., “Systemic endothelial cell markers in primary antiphospholipid syndrome”, *Thromb Haemost* 2000; 84: 742-746.



Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 26

CITOPENIAS INMUNES

Iván Palomo G., Jaime Pereira G. y Marcela Vásquez R.

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">1. Introducción2. Anemias hemolíticas inmunes<ul style="list-style-type: none">2.1. Sistemas antigénicos de los glóbulos rojos2.2. Anemias hemolíticas inmunes<ul style="list-style-type: none">2.2.1. Anemias hemolíticas aloinmunes2.2.2. Anemias hemolíticas autoinmunes3. Trombocitopenias inmunes<ul style="list-style-type: none">3.1. Sistemas antigénicos de las plaquetas | <ul style="list-style-type: none">3.2. Trombocitopenias inmunes<ul style="list-style-type: none">3.2.1. Trombocitopenias aloinmunes3.2.2. Trombocitopenias autoinmunes4. Neutropenias inmunes<ul style="list-style-type: none">4.1. Sistemas antigénicos de los neutrófilos4.2. Neutropenias inmunes<ul style="list-style-type: none">4.2.1. Neutropenias aloinmunes4.2.2. Neutropenias autoinmunes |
|---|--|





RESUMEN

Las citopenias (anemia, trombocitopenia y leucopenia) pueden estar asociadas a mecanismos inmunes. En este capítulo se describen los antígenos más relevantes de los glóbulos rojos, plaquetas y neutrófilos y las citopenias mediadas por alo y autoanticuerpos en cada tipo celular. Se privilegia la información sobre fisiopatología más que sobre diagnóstico y tratamiento.

1. INTRODUCCIÓN

En general la disminución de los glóbulos rojos (anemias), de las plaquetas (trombocitopenia) y de los leucocitos (leucopenias) se asocian con dos mecanismos fisiopatológicos: Disminución de la producción en la médula ósea y aumento de la destrucción a nivel periférico. En este último caso los eritrocitos, plaquetas y granulocitos pueden ser el blanco de anticuerpos (alo o autoanticuerpos) que promueven su destrucción o remoción acelerada desde la circulación. En este capítulo se aborda la fisiopatología y se esboza el cuadro clínico, diagnóstico y tratamiento de cada una de las citopenias inmunes: Anemias hemolíticas inmunes, Trombocitopenias inmunes y Neutropenias inmunes.

2. ANEMIAS HEMOLÍTICAS INMUNES

Los glóbulos rojos son células anucleadas y biconcavas de, aproximadamente, 7,5 μm de diámetro; tienen como función fundamental el transporte de oxígeno a los tejidos. Presentan una sobrevida de alrededor de 120 días, periodo después del cual son retirados desde la circulación por el Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM).

En condiciones normales la masa de glóbulos rojos (hematíes o eritrocitos) circulante permanece constante gracias a los mecanismos de control, los cuales están finamente regulados para satisfacer los requerimientos corporales de oxígeno.

Anemia, es un término usado para denotar una condición asociada a la disminución del número de eritrocitos y como consecuencia de la hemoglobina disponible para el transporte de

oxígeno. Las anemias pueden ser clasificadas en tres grupos de acuerdo al mecanismo que induce la disminución de los eritrocitos: Anemias hipoproliferativas (disminución en la producción de hematíes), Anemias hemolíticas (destrucción aumentada de eritrocitos) y Anemias por hemorragias. En las Anemias Hemolíticas (AH), la destrucción puede ocurrir intravascularmente o en el bazo y desde el punto de vista fisiopatológico se les puede clasificar en dos grupos; AH intracorpúsculares que corresponde a alteraciones propias de los hematíes (membranopatías, enzimopatías y hemoglobinopatías) y AH extracorpúsculares, en las cuales los glóbulos rojos son normales y factores externos a la célula son los que inducen la hemólisis. Las AH extracorpúsculares se pueden clasificar en: no inmunes (destrucción mecánica, agentes infecciosos, componentes plasmáticos alterados y toxinas) e inmunes; en este último grupo participan anticuerpos antieritrocitarios (alo o autoanticuerpos) que provocan las denominadas Anemias Hemolíticas Inmunes (AHI).

2.1. Sistemas antigénicos de los glóbulos rojos

Se han descrito más de 250 antígenos eritrocitarios que se agrupan en 25 sistemas sanguíneos, 7 colecciones y 2 series. Los antígenos eritrocitarios residen en moléculas de diversa estructura y función. Alguno de ellos además de expresarse en glóbulos rojos lo hacen en tejidos no eritroides; en la mayoría de los casos el rol biológico sobre las células es desconocido. La bioquímica y la genética molecular han permitido establecer la estructura y genética de la mayoría de estos antígenos.



Los sistemas sanguíneos pueden ser divididos de acuerdo a la naturaleza bioquímica de los antígenos. También se les puede clasificar de acuerdo a la función del producto génico que da origen al antígeno, en cinco categorías (tabla 26-1). Recientemente se han incorporado algunos de los antígenos eritrocitarios a la nomenclatura CD ("cluster of differentiation").

Sistema ABO. El sistema ABO sigue siendo el más importante en la práctica transfusional, la

especificidad antigénica reside en estructuras oligosacáridas, producto de la acción de varias glicosiltransferasas que actúan secuencialmente sobre el tetrasacárido precursor o paraglobósido. La síntesis de estos antígenos requiere de la acción de enzimas codificadas por genes ubicados en los cromosomas 9 (ABO) y 19 (H).

En 1990 se dilucidaron las bases genéticas de los tres principales alelos del locus ABO. Los antígenos del sistema han sido identificados en glóbulos rojos, en secreciones y sobre la mem-

Tabla 26-1. Clasificación funcional de los productos génicos de sistemas sanguíneos

Función	Sistema (símbolo ISBT)*	Número de antígenos	Nomenclatura CD
Transporte o canales	Rh (RH)	51	CD240
	Kidd (JK)	3	
	Diego(DI)	18	CD233
	Colton (CO)	3	
	Kx (XK)	1	
Receptores	MNSs (MNS)	42	CD235
	P (P1)	1	
	Duffy (FY)	6	CD234
	Cromer (CROMER)	10	CD55
	Knops (KN)	5	
Adhesión	Lutheran (LU)	20	
	Xg (XG)	1	
	Landsteiner-Wiener (LW)	3	CD242
		2	
	Indian (IN)		CD44
Enzimas	ABO (ABO)	4	
	Kell (KEL)	26	CD238
	Lewis (LE)	6	CD174
	Yt (YT)	2	
	Hh (H)	1	CD173
Proteínas Estructurales	Gerbich (GE)	7	CD236
Otros	Scianna (SC)	3	
	Dombrock (DO)	5	
	Chido/Roger (CH/RG)	9	
	OK		
	Raph		

* ISBT = International Society of Blood Transfusion



brana de células epiteliales y endoteliales. Además, estructuras antigénicas similares han sido detectadas en diversos organismos tales como microorganismos y plantas. La estructura más detallada de los antígenos de este sistema sanguíneo se ha mostrado en el capítulo 5.

Sistema Rh. El sistema Rh es el más polimórfico e inmunogénico de los sistemas sanguíneos humanos y el segundo en importancia clínica. El sistema está compuesto por aproximadamente 50 antígenos, los cuales son codificados por 2 genes estrechamente unidos, ubicados en el cromosoma 1; uno de ellos codifica la proteína RhD que expresa el antígeno D y sus variantes, y el otro codifica la proteína RhCE que expresa los antígenos C, c, E, e y sus variantes. Las proteínas RhD y RhCE tienen pesos moleculares que fluctúan de 30 a 34 kDa (figura 26-1). Se ha descrito la glicoproteína Rh 50, llamada glicoproteína asociada al Rh (RhAG, CD241), codificada por un gen ubicado en el cromosoma 6 y que sería esencial para el ensamblaje de las proteínas Rh en la membrana eritrocitaria, así como para la inmunogenicidad. Existe además un grupo de "proteínas accesorias del Rh" conformadas por un grupo de otras glicoproteínas (glicoproteína LW, glicoforina B, banda 3, proteínas asociadas a integrinas y glicoproteína Duffy); por esta razón se considera al sistema Rh como un "complejo de proteínas Rh".

Las proteínas RhD y RhCE tienen un 92% de homología entre sí y una homología del 38,5% y 39,2% con la RhAG respectivamente, además ellas muestran una gran similitud en la topología, por ejemplo todas presentan 12 regiones transmembrana, sugiriendo que todas pertenecen a una misma familia de proteínas.

El antígeno D es el más importante del sistema. En la población blanca aproximadamente el 15% de los individuos son designados como Rh negativos por carecer de la proteína D en sus glóbulos rojos, y el 80% de ellos se aloinmunizan en respuesta al contacto con eritrocitos Rh positivos. Estos aloanticuerpos son usualmente del tipo IgG y pueden causar reacciones hemolíticas (ver punto 2.2.1).

Los demás sistemas sanguíneos cobran importancia clínica en la medida en que los anticuerpos desarrollados causen reacciones hemolíticas transfusionales o enfermedad hemolítica del recién nacido. La especificidad de los anticuerpos que más frecuentemente causan

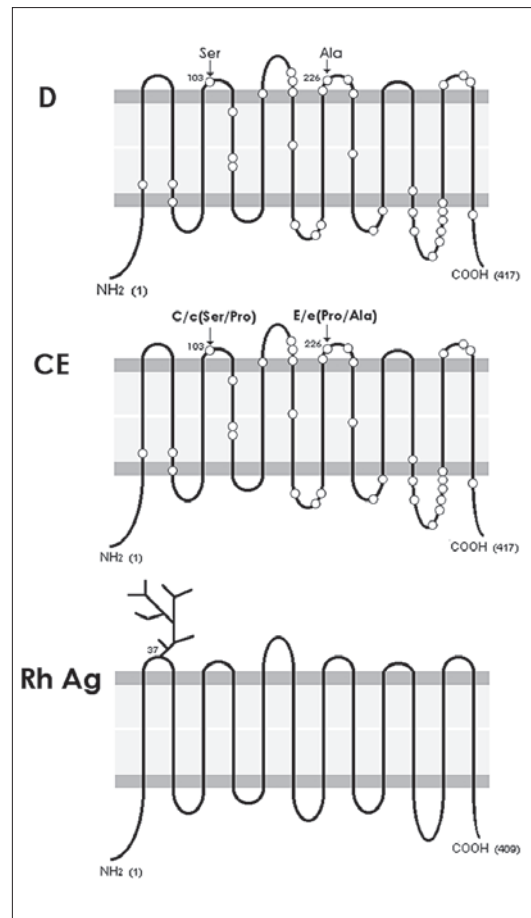


Figura 26-1. Topología de las proteínas RhD, RhCE y glicoproteína Rh50 (RhAG). Las proteínas del sistema Rh presentan doce regiones transmembrana. Los círculos indican los 35 aminoácidos diferentes entre la proteína D y la CE. En la proteína CE se indican los aminoácidos en posición 103 y 226 donde radica el polimorfismo C/c y E/e, respectivamente.

estos cuadros clínicos son para antígenos de los sistemas Kell, Duffy, Kidd y MNS.

2.2. Anemias Hemolíticas Inmunes (AHI)

Las Anemias Hemolíticas Inmunes (AHI) se pueden agrupar según participen alo o autoanticuerpos (tabla 26-2). Las Anemias Hemolíticas Aloinmunes, son producidas por anticuerpos que aparecen en una persona que se expone a antígenos encontrados en la misma especie, pero que no están presentes en sus propias células. Por su parte las Anemias Hemolíticas Autoinmunes se producen por alteraciones del sistema inmune que inducen la formación de autoanticuerpos (ver capítulo 23).



Tabla 26-2. Clasificación de la Anemias Hemolíticas Inmunes

Anemias hemolíticas aloinmunes
Enfermedad hemolítica del recién nacido
Reacción hemolítica transfusional
Anemias hemolíticas autoinmunes
Por anticuerpos calientes
Primaria
Secundaria
Síndromes linfoproliferativos
Mesenquimopatías
Infecciones virales
Enfermedades inmunológicas
Por anticuerpos fríos
Enfermedad de las aglutininas frías
Hemoglobinuria paroxística a frigori
Inducidas por drogas

2.2.1. Anemias Hemolíticas Aloinmunes

Dos son las AHI cuyo mecanismo está mediado por aloanticuerpos, la Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido (EHRN) y las Reacciones Hemolíticas Transfusionales.

a) Enfermedad hemolítica del recién nacido

La EHRN es una condición en la cual los glóbulos rojos del feto o del neonato son destruidos por anticuerpos maternos, dirigidos contra un antígeno presente en sus glóbulos rojos, el cual es heredado del padre. Solamente los anticuerpos IgG son transportados activamente a través de la placenta y por lo tanto capaces de sensibilizar los glóbulos rojos fetales que posteriormente son retirados por el sistema fagocítico mononuclear (SFM).

Los aloanticuerpos maternos pueden haberse generado por embarazos o transfusiones previas.

La incompatibilidad ABO es la causa más común de EHRN, la que usualmente es leve, mientras que el anti-D es el anticuerpo asociado con la mayoría de los casos de EHRN moderada a severa. Anticuerpos con otras especificidades también pueden causar esta enfermedad. Sin embargo, cuando la madre es ABO incompatible con el feto, disminuye la incidencia de inmunización frente

al antígeno D del sistema Rh, dado que los hematíes fetales Rh positivos, ABO incompatibles, serían rápidamente hemolisados en la circulación materna por acción de los anticuerpos naturales, antes que el antígeno D estimule al sistema inmune materno.

El neonato que sufre EHRN presenta anemia, ictericia y hepatoesplenomegalia; el grado de ictericia se correlaciona con la severidad de anemia.

El diagnóstico se basa en la detección prenatal de anticuerpos maternos mediante la prueba de antiglobulina indirecta (PAI) Estudios de ultrasonido (ecografías) y el nivel de bilirrubina en líquido amniótico pueden ayudar a predecir la severidad de la enfermedad y a orientar el manejo obstétrico de las embarazadas. En la etapa postnatal, el estudio de sangre de cordón permite detectar la anemia, reticulocitosis y presencia de eritroblastos; la prueba de antiglobulina directa (PAD) suele ser positiva.

El tratamiento en el período prenatal, si no es posible interrumpir el embarazo, es la transfusión intrauterina siempre que se cumplan determinadas condiciones. En el período postnatal, se utiliza la fototerapia si la hiperbilirrubinemia es leve y en casos más graves se recurre al recambio sanguíneo.

Para la prevención de la EHRN inducida por anti-D, existen protocolos de profilaxis bien establecidos que consisten en la inmunización pasiva de madres Rh negativas, con anticuerpos anti-D comerciales (Rho IgG), cuyo objetivo es prevenir que células Rh positivas del feto o recién nacido estimule la respuesta inmune materna y que los anticuerpos formados ocasionen problemas en embarazos futuros.

b) Reacción hemolítica transfusional

Una reacción hemolítica transfusional ocurre con posterioridad a la transfusión de glóbulos rojos portadores de antígenos extraños para el sistema inmune del receptor, frente a los cuales éste está aloinmunizado. De acuerdo al momento de aparición de los síntomas, éstas se clasifican como inmediatas o tardías.

Reacción hemolítica transfusional inmediata.

Este tipo de reacciones ocurre cuando los anticuerpos están presentes en el plasma del paciente en títulos altos. La causa más común de este tipo de reacción es la incompatibilidad ABO, la que ocasiona el 86% de las muertes por reaccio-



nes hemolíticas transfusionales. También pueden estar involucrados anticuerpos con especificidades anti-Kell, anti-Jk^a y anti-Fy^a.

Los anticuerpos que ocasionan estas reacciones son principalmente de clase IgM, ellos reaccionan con su antígeno específico activando el sistema del complemento (ver capítulo 18), la coagulación y el sistema de las cininas. La activación del complemento induce la formación del complejo de ataque a membrana (C5b6789) que provoca hemólisis intravascular en forma inmediata, con liberación de hemoglobina, estroma y enzimas eritrocitarias. Producto de la activación del complemento también se libera C3a y C5a que actúan como potentes anafilotoxinas, responsables de los síntomas de fiebre, escalofríos, hipotensión y shock. El estroma eritrocitario contiene sustancias tromboplásticas que activan la cascada de la coagulación induciendo Coagulación Intravascular Diseminada (CID). El complejo antígeno-anticuerpo formado, también activa el sistema de las cininas, liberando bradisinina, la que provoca hipotensión y liberación de catecolaminas que causan vasoconstricción en órganos tales como el riñón; esto sumado a la hipotensión y a la CID, inducen un cuadro de insuficiencia renal aguda.

Reacción hemolítica transfusional tardía. Las reacciones hemolíticas transfusionales tardías son más leves que las inmediatas. Se producen cuando el título de los aloanticuerpos presentes en el suero es bajo no siendo detectados por las pruebas pre-transfusionales, luego de la transfusión de sangre incompatible la respuesta anamnésica hace aumentar rápidamente los títulos del anticuerpo. Los glóbulos rojos transfundidos sufren hemólisis extravascular porque se sensibilizan con anticuerpos IgG o fracciones del complemento, siendo secuestrados por los macrófagos hepáticos o esplénicos. Los anticuerpos están dirigidos contra antígenos de los sistemas Kell, Rh (D, E y c), Duffy y Kidd. Este tipo de reacciones transfusionales se presenta con una incidencia de 1 en 3.200 transfusiones.

Los pacientes pueden presentar fiebre moderada con escalofríos, ictericia leve, eventualmente se puede presentar hemoglobinemia y hemoglobinuria.

Para el diagnóstico es necesario una muestra postransfusional en la cual se detectará anemia, hiperbilirrubinemia y una PAD positiva.

Debido a que este tipo de reacciones ocurre por una respuesta inmune secundaria, resulta de

gran importancia en su prevención, considerar el historial transfusional, de trasplantes y de embarazos del paciente.

2.2.2. Anemias Hemolíticas Autoinmunes

Una de las formas más usadas en la clasificación de las Anemias Hemolíticas Autoinmunes (AHAI) es de acuerdo a la temperatura en que actúan los anticuerpos involucrados; así se distinguen las AHAI por anticuerpos calientes y AHAI por anticuerpos fríos. Adicionalmente se incluyen en este grupo las AHAI inducidas por fármacos.

a) AHAI por anticuerpos calientes

El 70-75% de las anemias hemolíticas autoinmunes son provocadas por anticuerpos calientes; se presentan a cualquier edad y afectan con mayor frecuencia a las mujeres. De ellas aproximadamente el 30% son de origen idiopático y el 70% restante son secundarias a otras enfermedades, tales como síndromes linfoproliferativos, enfermedades autoinmunes e infecciones (tabla 26-2).

La destrucción eritrocitaria ocurre como consecuencia de la fagocitosis de los glóbulos rojos sensibilizados con autoanticuerpos IgG. Los responsables de la eritrofagocitosis son macrófagos (presentan receptores para Fc de IgG: FcγR), principalmente esplénicos; por ello la hemólisis es de tipo extravascular y como consecuencia se observa hiperbilirrubinemia.

La PAD suele ser positiva en la mayoría de los casos, confirmando la presencia de glóbulos rojos sensibilizados con IgG y en algunos casos, adicionalmente, con fracciones del complemento; la PAI puede ser positiva cuando hay una hemólisis activa.

En caso de existir una enfermedad asociada a la AHAI, el tratamiento de ésta puede revertir el proceso hemolítico. Además se requiere el uso de corticoesteroides, los que actúan inhibiendo la síntesis de anticuerpos y la fagocitosis de hematíes. La esplenectomía está indicada en casos de fracaso a otros tratamientos.

b) AHAI por anticuerpos fríos

Entre las AHAI por anticuerpos fríos se reconocen dos cuadros clínicos, Enfermedad de las aglutininas frías y Hemoglobinuria paroxística a frigori.



Enfermedad de las aglutininas frías. La enfermedad por aglutininas frías representa aproximadamente el 15% de las AHAI. Esta anemia puede ser idiopática o secundaria a infección por *Mycoplasma pneumoniae* o Virus de Epstein Barr (Mononucleosis infecciosa). La especificidad de estas crioaglutininas es anti-I en un 90% y anti-i en un 8%.

En su patogenia participan anticuerpos IgM, que a temperaturas entre 10 y 30°C se unen a los glóbulos rojos e inducen hemólisis (principalmente intravascular) mediada por complemento. Los episodios de hemólisis ocurren después de la exposición a temperaturas bajas que provocan la aglutinación de los glóbulos rojos con obstrucción de la circulación capilar que se manifiesta por una coloración azul o roja de las extremidades (fenómeno de Raynaud).

En el laboratorio es posible evidenciar aglutinación de los glóbulos rojos a temperatura ambiente, además se encuentra positiva la PAD, habitualmente por complemento (título del anticuerpo mayor a 1:1000 a 4°C).

En la enfermedad idiopática no hay tratamiento específico, salvo que el paciente se mantenga en ambiente temperado. Dado que casi la totalidad de la IgM se encuentra en circulación, en caso de ser necesario se realiza plasmaféresis. Cuando el cuadro hemolítico es secundario a otra enfermedad, generalmente cederá al ser tratada la patología de base.

Hemoglobinuria paroxística a frigori. Esta enfermedad cuya incidencia no supera el 2%, se produce por la unión a los eritrocitos, después de la exposición al frío, del autoanticuerpo de Donath-Landsteiner, una autohemolisina bifásica de clase IgG. Los hematíes sensibilizados fijan complemento, sistema que se activa al aumentar la temperatura en la circulación general, provocando hemólisis intravascular. La especificidad principal de los autoanticuerpos es anti-P, pero también se han descrito especificidades anti-i y anti-Pr.

Esta enfermedad puede tener una etiología idiopática y secundarios a infecciones virales en niños y a sífilis no tratada en adultos.

La prueba de Donath-Landsteiner es positiva y permite pesquisar la hemolisina bifásica. La PAD es positiva y la PAI puede serlo si se realiza a 4°C.

c) AHAI inducida por fármacos

Este tipo de anemias hemolíticas se produce

como consecuencia de una reacción autoinmune tras la administración de ciertos fármacos. Las AHAI inducidas por fármacos representan entre el 10-20% de las AHAI.

Existen tres mecanismos principales por los cuales las drogas pueden inducir la formación de los anticuerpos asociados a AHAI (figura 26-2).

Complejos inmunes. El fármaco se une a proteínas plasmáticas y estimula la formación de un anticuerpo anti-droga, el complejo inmune formado, se une inespecíficamente al glóbulo rojo u otras células por su región Fab conformando un complejo trimolecular (droga-anticuerpo-antígeno de membrana) capaz de activar el complemento con la consiguiente hemólisis intravascular. La droga interactuaría de forma no covalente con componentes de membrana generando un neoantígeno que estimularía al sistema inmune.

La primera droga que se relacionó con este mecanismo, también llamado "espectador inocente" fue estibofeno, posteriormente también se han descrito otros fármacos, entre ellos: quinidina, quinina, cefotaxima, clorambucil, clorpromacina, isoniácida, rifampicina, sulfonamidas y tiazidas.

En el laboratorio se puede encontrar la PAD positiva y la PAI negativa. En esta última situación la prueba puede ser positiva si se preincuba el suero del paciente y los hematíes, en presencia de la droga y complemento.

Adsorción de droga (hapteno). El fármaco o alguno de sus metabolitos se fija inespecíficamente a la superficie del eritrocito e induce la producción de anticuerpos IgG anti-droga, los cuales se unen a los glóbulos rojos cubiertos con la droga para posteriormente ser secuestrados por el SFM.

Este mecanismo se presenta en pacientes que han recibido altas dosis del fármaco. La droga más característica de este mecanismo es la penicilina; se ha descrito también en cefalosporinas y tetraciclinas.

Esta anemia cursa con la PAD positiva y la PAI negativa. Es posible confirmar la presencia del autoanticuerpo si los hematíes a emplear se sensibilizan con la droga, antes de hacerlos reaccionar con el suero del paciente.

Formación de autoanticuerpos. En este mecanismo la droga induce la formación de autoanticuerpos IgG que reconocen antígenos eritrocitarios (principalmente antígenos del sistema Rh), sin necesidad de que el fármaco esté uni-

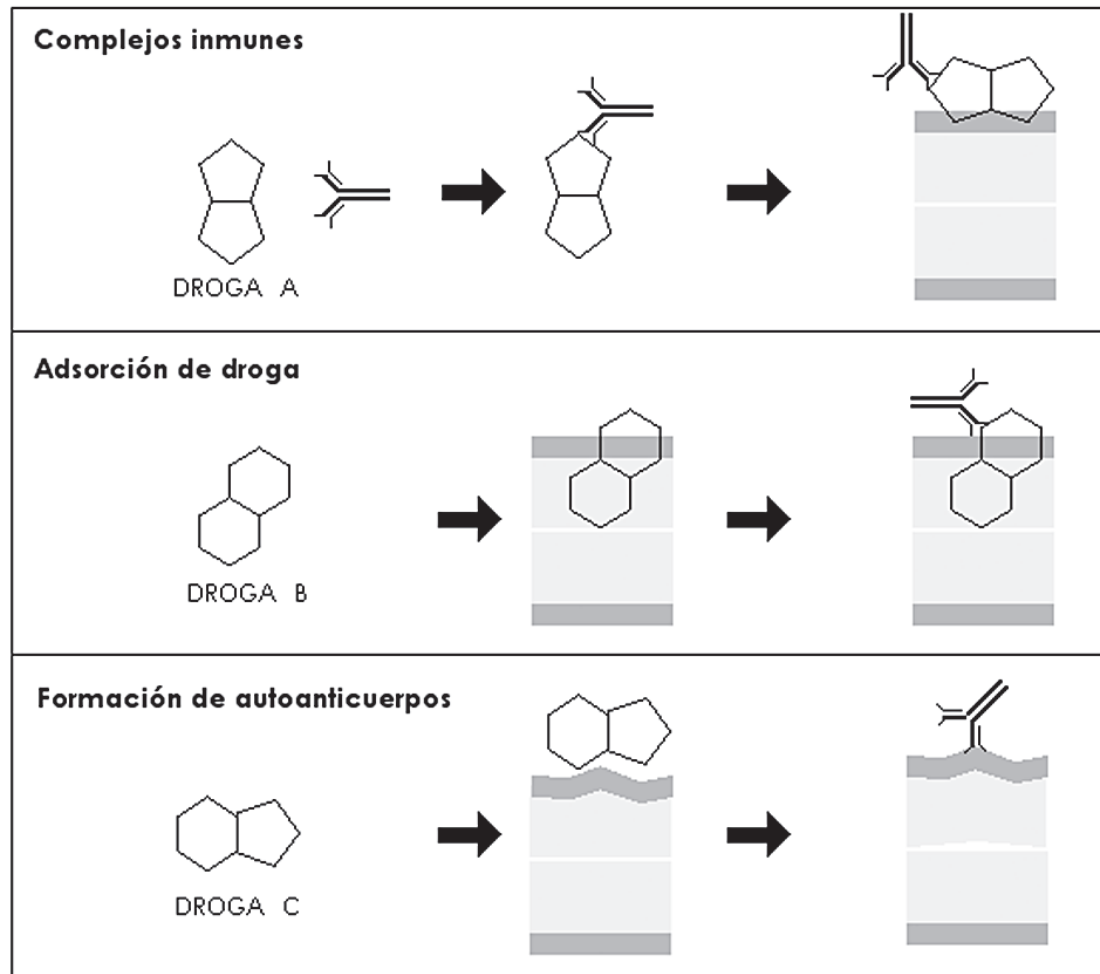


Figura 26-2. Mecanismos de las Anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI) inducidas por fármacos. Se han descrito tres mecanismos por los cuales los fármacos pueden inducir AHA: Tipo complejos inmunes, Adsorción de drogas (hapteno) y Formación de autoanticuerpos. Las drogas más representativas de cada mecanismo son estibofeno (droga a), penicilina (droga b) y alfa-metildopa (droga c), respectivamente.

do a los hematíes. La droga más representativa de este mecanismo es la alfa-metildopa, pero también se incluyen levodopa, procainamida y drogas antiinflamatorias no esteroideas.

En el laboratorio es posible encontrar la PAD y la PAI positivas.

3. TROMBOCITOPENIAS INMUNES

Desde 1950 se sabe que las plaquetas pueden ser destruidas por procesos de tipo inmunológico. Sin embargo, el progreso para entender la patogenia de las trombocitopenias inmunes se vio retardado por problemas metodológicos inherentes al estudio de la interacción plaquetas-

inmunoglobulinas. Avances en el estudio de laboratorio han llevado en los últimos 15 años a una explosión de información nueva acerca de estas patologías y al reconocimiento que las plaquetas pueden ser destruidas por aloanticuerpos, autoanticuerpos y probablemente complejos inmunes en diferentes situaciones patológicas.

Las plaquetas son elementos celulares anucleados que se originan por fragmentación del citoplasma de los megacariocitos en la médula ósea, desde donde pasan a la circulación y viven por 8 a 10 días antes de ser removidas por el SFM. Miden entre 1,5 a 3 μm de diámetro y en reposo presentan una forma discoide. Las plaquetas juegan un papel fundamental en las etapas iniciales del proceso hemostático (hemostasia primaria);



esta función la cumplen gracias a las propiedades de adhesión, agregación, secreción del contenido de sus gránulos y expresión de superficie procoagulante. La ocurrencia coordinada y regulada de estos procesos determina la formación del tapón plaquetario sobre el cual actúan los factores plasmáticos de la coagulación para formar el tapón hemostático o trombo.

3.1. Sistemas antigénicos de las plaquetas

La membrana plaquetaria presenta glicoproteínas (GP) que son fundamentales en los aspectos inmunológicos asociados a las plaquetas, ya sea como receptores inmunes específicos o como blancos altamente inmunogénicos. Estas glicoproteínas son a su vez receptores funcionales que participan en las reacciones de adhesión y agregación durante el proceso hemostático. En la tabla 26-3 se muestran las principales glicoproteínas y sus características.

agregación plaquetaria mediada por fibrinógeno.

El complejo heterodimérico **GPIIb-IIIa** (CD41-CD61), es la proteína más abundante de la superficie de las plaquetas, representando alrededor del 15% de la masa proteica de la membrana con alrededor de 40.000-50.000 copias expresadas por las plaquetas normales en reposo. Debido a que su activación la transforma en el receptor de fibrinógeno, su papel en la agregación plaquetaria es fundamental.

Además de las integrinas, las plaquetas poseen otro receptor glicoproteico de membrana, la **GPIb-IX** (CD42b.c-CD42a), que pertenece a la familia de "proteínas ricas en leucina". Este complejo constituye el receptor para el factor von Willebrand (FvW), considerado el mayor responsable de la unión de las plaquetas a la matriz extracelular. La GPIb-IX en la membrana plaquetaria forma un complejo con la GPV; cada plaqueta contiene 20.000-30.000 moléculas del complejo en su superficie.

Tabla 26-3. Características de las glicoproteínas de membrana de las plaquetas

Glicoproteína	Integrina	Peso molecular no reducido (kDa)	Función en las plaquetas
Ia/IIa	$\alpha_2\beta_1$	150/130	Receptor de colágeno
Ic/IIa	$\alpha_5\beta_1$	148/130	Receptor de fibronectina
Ic'/IIa	$\alpha_6\beta_1$	148/130	Receptor de laminina
IIb/IIIa	$\alpha_{IIb}\beta_3$	145/95	Receptor de fibrinógeno, vitronectina, Factor von Willebrand, fibronectina
Ib/IX		160/17	Receptor del factor von Willebrand
IV		85	Receptor de colágeno y trombospondina
V		82	Sustrato de trombina
VI		58	Principal receptor de colágeno

Al menos cinco glicoproteínas pertenecen a la familia de moléculas de adhesión Integrinas: el receptor de colágeno Ia-IIa, el receptor de fibronectina Ic-IIa, el receptor de laminina Ic'-IIa, el receptor de vitronectina VnR-IIIa y el receptor activación-dependiente IIb-IIIa, responsable de la

El complejo **GPIa-IIa** (CD49b-CD29), formado por cadenas únicas de 167 y 157 kDa, respectivamente, ha sido demostrado como uno de los receptores que median la interacción de las plaquetas con el colágeno, a través de la GPIa.

Las glicoproteínas de la membrana



plaquetaria han demostrado ser estructuras altamente polimórficas, por lo que aparte de ser importantes receptores fisiológicos, constituyen estructuras en las que residen sistemas antigénicos específicos.

Los **antígenos plaquetarios** pueden ser divididos en dos grupos: (a) Aloantígenos compartidos con otras células sanguíneas (Ej. Antígenos de los sistemas ABH, Lewis), y células de otros tejidos (moléculas HLA clase I; HLA: “Human Leukocyte Antigen”) y (b) Aloantígenos plaquetarios específicos.

Aloantígenos compartidos con otras células sanguíneas

Antígenos ABH, Lewis, 1 y P. Los antígenos de grupo sanguíneo A y B han sido demostrados en plaquetas, por serología convencional, por más de 50 años. Su importancia clínica se circunscribe a un efecto muy discreto sobre la recuperación de las plaquetas en el caso de transfusión de plaquetas ABO incompatibles. Se ha descrito también que la administración crónica de plaquetas ABO incompatibles se asocia a mayor tasa de refractariedad a la transfusión de plaquetas.

Antígenos HLA. Las plaquetas poseen moléculas HLA clase I, pero no clase II. Cerca del 73% del total de los antígenos HLA-A y B presentes en sangre total, están contenidos en las plaquetas. Éstas contienen 10.000-20.000 moléculas/célula, cifra inferior a la encontrada en linfocitos (>100.000/célula). Los antígenos HLA-C, generalmente se expresan débilmente. Estudios muestran que la mayor parte de los antígenos HLA clase I son sintetizados endógenamente y son constituyentes de la membrana; pero esto no excluye la posibilidad que una pequeña proporción de antígeno HLA sea adsorbida pasivamente por la superficie plaquetaria desde el plasma. Los antígenos HLA sobre la superficie de las plaquetas constituyen los blancos principales de los aloanticuerpos encontrados en pacientes politransfundidos, lo que se define como refractariedad inmune a la transfusión de plaquetas.

Aloantígenos plaquetarios específicos

Nomenclatura. Históricamente, a los antígenos

plaquetarios específicos se les asignó un nombre basado en aquel del paciente en el cual fue descrito por primera vez. A medida que aumentó el número de antisueros descritos, la confusión de nombres hizo necesario adoptar un sistema simplificado el cual fue propuesto por el ICSH/ISBT (International Committee for Standardization in Hematology/International Society of Blood Transfusion). En este sistema, a cada aloantígeno se le asignó un número HPA (“Human Platelet Antigen”) en orden cronológico de descripción. Cada sistema HPA representa un polimorfismo bialélico debido a una sustitución de un par de bases en el gen y como consecuencia una diferencia de un aminoácido en la proteína madura. La anotación “a” corresponde siempre al alelo de mayor frecuencia y la “w” representa una asignación provisoria hasta que se describan los dos alelos del sistema.

Características. La tabla 26-4 muestra los antígenos plaquetarios específicos descritos hasta ahora, su localización y base molecular. La GP más polimórfica es la GPIIIa, en la cual se han descrito al menos 8 antígenos diferentes.

La figura 26-3 muestra un esquema de las GPIIb-IIIa y la GPIb-IX, en las que se indica la ubicación aproximada de los HPA más importantes y los sectores donde se han ubicado autoantígenos.

3.2. Trombocitopenias inmunes

Las plaquetas pueden ser destruidas por mecanismos inmunes en los que pueden participar aloanticuerpos, autoanticuerpos, anticuerpos dependientes de droga y posiblemente complejos inmunes. El denominador común de todos estos procesos es una remoción acelerada de las plaquetas de la circulación y acortamiento de la supervivencia, que se traduce en una disminución del número de plaquetas circulantes (trombocitopenia) cuando sobrepasa la capacidad de la médula ósea de responder a la mayor demanda. En la tabla 26-5 se muestra los diferentes tipos de trombocitopenias inmunes, clasificadas según el tipo de anticuerpo responsable.



Tabla 26-4. Características de los aloantígenos plaquetarios específicos

Sistema	Alelos	Sinónimos	Localización	Base molecular	Frecuencia fenotípica (%)*
HPA-1	HPA-1a	Pl ^{A1} , Zw ^a	GPIIIa	Leu ₃₃ →Pro ₃₃	97.9
	HPA-1b	Pl ^{A2} , Zw ^b			28.8
HPA-2	HPA-2a	Ko ^b , Sib ^b	GPIb	Thre ₁₄₅ →Met ₁₄₅	99.3
	HPA-2b	Ko ^a , Sib ^a			14.6
HPA-3	HPA-3a	Lek ^a , Bak ^a	GPIIb	Ile ₈₄₃ →Ser ₈₄₃	80.9
	HPA-3b	Lek ^b , Bak ^b			69.8
HPA-4	HPA-4a	Pen ^a , Yuk ^b	GPIIIa	Arg ₁₄₃ →Glu ₁₄₃	> 99.9
	HPA-4b	Pen ^b , Yuk ^a			< 0.1
HPA-5	HPA-5a	Br ^b	GPIa	Gln ₅₀₅ →Lys ₅₀₅	99.0
	HPA-5b	Br ^a			19.7
HPA-6w	HPA-6bw	Ca ^a , Tu ^a	GPIIIa	Arg ₄₈₉ →Glu ₄₈₉	2.4
HPA-7w	HPA-7bw	Mo	GPIIIa	Pro ₄₀₇ →Ala ₄₀₇	0.2
HPA-8w	HPA-8bw	Sr ^a	GPIIIa	Arg ₆₃₆ →Glu ₆₃₆	< 0.01
HPA-9w	HPA-9bw	Max ^a	GPIIb	Val ₈₃₇ →Met ₈₃₇	0.6
“HPA-10”	HPA-10bw	La ^a	GPIIIa	Arg ₆₂ →Glu ₆₂	< 1.6
		Gro ^a	GPIIIa	Arg ₆₃₃ →His ₆₃₃	< 0.25
		Iy ^a	GPIb	Gly ₁₅ →Gln ₁₅	0.4
		Sit ^a	GPIa	Thre ₇₉₉ →Met ₇₉₉	0.25

*Frecuencia fenotípica de la población caucásica.

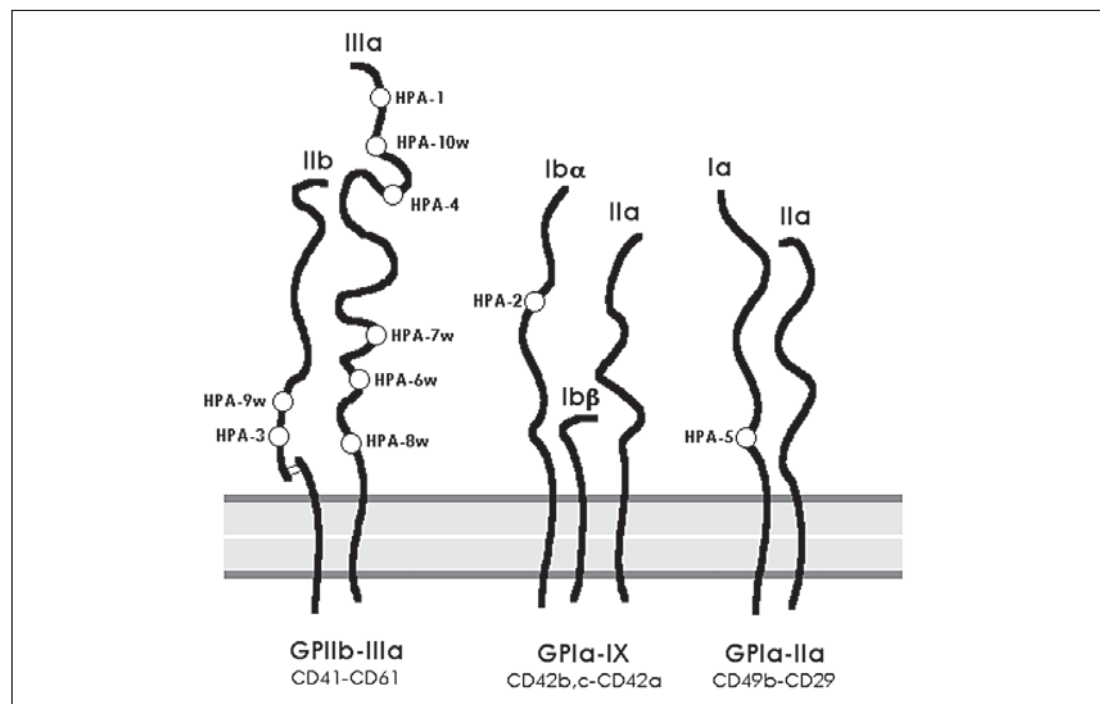


Figura 26.3. Esquema de las GPIIb-IIIa, GPIa-IX y GPIa-IIa. Se muestra los principales HPA (“Human Platelet Antigen”) y las regiones reconocidas como autoantígenos.



Tabla 26-5. Trombocitopenias inmunes

Trombocitopenias aloinmunes

Púrpura aloinmune neonatal
Púrpura post-transfusional

Trombocitopenias autoinmunes

Púrpura trombocitopénico inmune primario
Agudo
Crónico

Trombocitopenias inmunes secundarias
Enfermedades autoinmunes
Generalizadas (Ej. Lupus Eritematoso Sistémico)
Órgano específico (Ej. Tiroiditis)
Enfermedades linfoproliferativas
Leucemia linfática crónica
Linfomas
Mieloma múltiple
Tumores sólidos
Infección por HIV
Post-transplante de médula ósea
Infecciones virales
Fármacos

equimosis) y sangrado mucoso que se manifiesta en las primeras horas de vida. En la mayoría de los casos el PAIN es una enfermedad benigna autolimitada, que remite espontáneamente entre 2-15 días; sin embargo, en casos graves puede observarse hemorragia visceral e intracraneana. Esta última complicación se puede presentar en forma antenatal o perinatal en un 10 a 20% de los pacientes con PAIN, lo que puede causar daño neurológico e incluso la muerte.

Patogenia. El PAIN es causado por la transferencia materno-fetal de aloanticuerpos específicos para los aloantígenos plaquetarios HPA-1b, HPA-2a, HPA-3a, HPA-3b, HPA-4a, HP-A4b, HPA-5a, HPA-5b y los antígenos de baja frecuencia HPA-6w a HPA-10, Gro^a, Iy^a y Sit^a. Alrededor del 50% de los casos de PAIN en las poblaciones caucásicas son el resultado de una incompatibilidad en el sistema HPA-1; incompatibilidad que compromete el sistema HPA-5 es la segunda causa en estas poblaciones. A pesar que es muy frecuente encontrar anticuerpos anti-HLA en las embarazadas, su papel en la patogenia del PAIN es debatido y solamente 2 casos que pueden corresponder a PAIN secundario a anticuerpos anti-HLA-A2 han sido descritos.

Evaluación de laboratorio. En el diagnóstico biológico de las trombocitopenias inmunes en general, se utilizan pruebas comunes a toda trombocitopenia y métodos que permiten estudiar el carácter inmunológico de su patogenia:

a) Pruebas generales. El recuento de plaquetas, hemograma y mielograma se usa al iniciar la investigación diagnóstica de la mayoría de las trombocitopenias. El estudio de sobrevida plaquetaria, de uso excepcional en clínica, requiere marcar *in vitro* plaquetas del paciente con ⁵¹Cr o ¹¹¹In; permite estudiar la sobrevida plaquetaria y el o los órganos en que las plaquetas son secuestradas.

b) Estudio inmunológico. Entre los métodos inmunológicos más importantes para el estudio de las trombocitopenias inmunes están aquellos que permiten pesquisar anticuerpos antiplaquetarios sin estudio de especificidad (IgG asociada a plaquetas y anticuerpos antiplaquetarios circulantes) y los que sí permiten estudiar la especificidad de dichos anticuerpos. A continuación se describen los principios de los

3.2.1. Trombocitopenias aloinmunes

Los aloantígenos plaquetarios específicos y polimorfismos de las glicoproteínas de membrana juegan un papel clave en la patogenia de diferentes entidades clínicas como el Púrpura aloinmune neonatal, Púrpura postransfusional y Refractoriedad a la transfusión de plaquetas.

Púrpura aloinmune neonatal

El Púrpura aloinmune neonatal (PAIN) es una incompatibilidad feto-materna causada por aloinmunización de la madre a antígenos plaquetarios fetales. Su incidencia es de alrededor de 1:2.000 a 1:3.000 embarazos y a diferencia de la enfermedad hemolítica del recién nacido, puede presentarse hasta en un 30% de los casos durante el primer embarazo. El PAIN se presenta típicamente como una trombocitopenia aislada en un recién nacido (RN) aparentemente sano. En aquellos RN con trombocitopenia más profunda se puede encontrar sangrado cutáneo (petequias y



métodos más usados:

- **IgG asociada a plaquetas y anticuerpos antiplaquetarios circulantes.** El estudio inmunológico inicial tiene como objetivo demostrar IgG asociada a las plaquetas (PAIgG) o anticuerpos antiplaquetarios circulantes (AcAP). Para medir la PAIgG existe un gran número de técnicas que permiten cuantificar la IgG presente en la superficie plaquetaria, o la IgG total si las plaquetas son previamente solubilizadas. Para la determinación de la PAIgG de superficie, lo más frecuente es utilizar pruebas de unión directa de un anticuerpo anti-IgG humana marcado con radioisótopo enzima o fluoresceína; la cantidad de IgG asociada a las plaquetas es directamente proporcional a la cantidad de ligando marcado que permanece unido a las plaquetas. Para la pesquisa de AcAP se utilizan, los mismos métodos en forma indirecta.
- **Métodos para estudio de especificidad antigénica.** Estos métodos son capaces de identificar la glicoproteína plaquetaria específica a la que se une el anticuerpo, pero no cuantifica la cantidad de IgG unida. Se han descrito varios métodos: Western Blot ("Immunoblotting"), Inmunoprecipitación y las técnicas de ELISA con captura de antígeno. Estas últimas son los que se utilizan más ampliamente en el estudio de especificidad antigénica de las citopenias inmunes de distinta etiología.

En casos con sospecha clínica de PAIN el estudio inicial de laboratorio debe incluir la pesquisa de anticuerpos antiplaquetarios, idealmente usando plaquetas del padre del RN para incluir antígenos de baja frecuencia. El hallazgo de anticuerpos antiplaquetarios obliga a su identificación, para lo cual se utilizan paneles de plaquetas tipificadas en ensayos de ELISA con captura de antígenos. La incompatibilidad antigénica se demuestra mediante tipificación de los antígenos plaquetarios, lo que actualmente se hace mediante biología molecular.

Tratamiento. Al igual que en otras incompatibilidades materno-fetales en el PAIN, se debe proporcionar plaquetas antígeno-negativas de la madre o de donantes fenotipificados negativos. Las plaquetas usadas en la transfusión deben ser la-

vadas para liberarlas de anticuerpos que contiene el plasma. El uso de altas dosis de IgG endovenosa, puede servir como tratamiento de emergencia si no hay plaquetas disponibles. El tratamiento puede ser pre y/o postnatal; en el primer caso la transfusión de plaquetas es intrauterina.

Púrpura Post-transfusional

El Púrpura Post-transfusional (PPT) se caracteriza por trombocitopenia aguda, grave que ocurre aproximadamente 5-10 días después de una transfusión sanguínea. Su incidencia se desconoce, aunque es una condición muy poco frecuente. La transfusión que gatilla esta condición puede ser de cualquier hemocomponente y habitualmente se acompaña de una reacción transfusional febril. En el suero del paciente se encuentran potentes anticuerpos antiplaquetarios, sobre el 80% de los casos con especificidad anti-HPA-1a. La patogenia es desconocida pero se han propuesto tres teorías para explicar la destrucción de las plaquetas autólogas gatillada por la transfusión: (a) unión de antígeno "soluble" presente en el producto sanguíneo (b) unión de complejo inmune compuesto por aloantígeno/aloanticuerpo y (c) producción de autoanticuerpos por reactividad cruzada. Para el diagnóstico se debe demostrar el anticuerpo en el suero del paciente; el hallazgo de una trombocitopenia grave y anticuerpos antiplaquetarios específicos, especialmente anti-HPA-1a, hace muy probable el diagnóstico de PPT.

Refractariedad a la transfusión de plaquetas

La Refractariedad a la transfusión de plaquetas (RTP) se define como un aumento insuficiente e inesperado del recuento de plaquetas post-transfusional. En la mayoría de los casos la remoción prematura de las plaquetas transfundidas obedece a causas no inmunes tales como septicemia, hemorragia activa, uso de drogas, esplenomegalia y edad de las plaquetas transfundidas. Cuando la causa de la RTP es una aloinmunización, en la mayoría de los casos (>75%) los anticuerpos reaccionan con determinantes expresados por las moléculas HLA presentes sobre la superficie de las plaquetas. En estudios prospectivos no más del 10% de los casos de RTP ha sido el resultado de anticuerpos antiplaquetarios específicos. El diagnóstico de esta condición se basa en la demostración de estos anticuerpos en el suero del paciente (ver en punto 3.2.1: Evaluación de laboratorio).



3.2.2. Trombocitopenias autoinmunes

Púrpura trombocitopénico autoinmune primario

El Púrpura trombocitopénico autoinmune primario (PTI) es una de las causas más frecuentes de trombocitopenia aislada encontrada en la práctica médica. La enfermedad es causada por autoanticuerpos que se unen a estructuras de la membrana plaquetaria, acortando su supervivencia. La presentación clínica es muy variable desde casos agudos, muy sintomáticos a hallazgos incidentales de trombocitopenia asintomática. Debido a sus diferencias clínicas, de manejo y posiblemente fisiopatológicas, se discutirá en forma separada el PTI crónico del adulto, del PTI agudo, cuadro este último que se presenta, fundamentalmente, en niños.

a) PTI crónico del adulto

Cuadro clínico. El PTI del adulto se presenta más frecuentemente en mujeres entre la 3° y 4° década de la vida, aunque puede ocurrir a cualquier edad en hombres y mujeres. La manifestación clínica más característica es el púrpura, término que denota el sangrado de piel y mucosas.

Patogenia. En el PTI crónico las plaquetas son sensibilizadas por autoanticuerpos, predominantemente de clase IgG, con menor frecuencia IgM y ocasionalmente IgA. La destrucción plaquetaria por autoanticuerpos IgG es similar a la fagocitosis extravascular (esplénica) de glóbulos rojos, mediada por IgG. El bazo es también un importante productor de autoanticuerpos antiplaquetarios. A diferencia de las anemias hemolíticas autoinmunes, el mecanismo de acción de los autoanticuerpos de clase IgM es poco claro, así como la importancia relativa del complemento. Se ha asumido que la destrucción plaquetaria acelerada en el púrpura trombocitopénico autoinmune, se acompaña de un incremento compensatorio en la producción de plaquetas por los megacariocitos. Sin embargo, estudios cinéticos sugieren que también la producción de plaquetas puede estar disminuida, especialmente en los pacientes más afectados.

Evaluación de laboratorio. Las pruebas de laboratorio que se utiliza en el estudio de trombocitopenias autoinmunes son básicamente las mismas descritas en el punto 3.2.1. Brevemente, utilizan-

do técnicas de desarrollo relativamente reciente, en el plasma o plaquetas de los pacientes con PTI crónico se pueden encontrar anticuerpos de clase IgG o IgM dirigidos contra glicoproteínas de membrana entre las que se incluye: GPIIb/IIIa, GPIb/IX, GPIa/IIa, GPIV y otras. Estas técnicas se basan en el principio de “captura de antígeno” en la cual un anticuerpo monoclonal anti-GP es inmovilizado en una fase sólida al cual se agrega un lisado de las plaquetas en estudio o plaquetas normales sensibilizadas con el autoanticuerpo. Esto posibilita la captura del antígeno y cualquier inmunoglobulina (Ig) unida a éste, la que puede ser detectada por una anti-Ig adecuadamente marcada.

Tratamiento. El objetivo del tratamiento específico es restaurar el recuento de plaquetas, o al menos alcanzar niveles que aseguren una hemostasia adecuada. Esteroides, como prednisona oral, seguido de esplenectomía en caso de respuesta insatisfactoria a los esteroides, forma parte del manejo inicial estándar del PTI crónico, con el que se puede alcanzar tasa de remisión cercanas al 80%. En casos de refractariedad a la esplenectomía y esteroides, existe una serie de tratamientos considerados de segunda línea que incluyen: IgG endovenosa a altas dosis, IgG anti-D, danazol e inmunosupresores. Todos estos tratamientos son de alto costo o se acompañan de importantes efectos colaterales.

La transfusión de concentrados plaquetarios en las trombocitopenias inmunes, en general, debe ser excepcional, reservándose para casos de hemorragias por trombocitopenias graves, dado que el efecto sustitutivo es muy escaso por la rápida destrucción de las plaquetas transfundidas.

PTI secundario. En alrededor de un 40% de los casos de PTI crónico del adulto éste se asocia a otra enfermedad. Las patologías más frecuentemente asociadas a PTI son el Lupus Eritematoso Sistémico, enfermedades linfoproliferativas, infección por virus de la inmunodeficiencia humana, infecciones y más raramente otras condiciones como el hipertiroidismo, sarcoidosis, miastenia gravis, etc. La causa de la trombocitopenia se ha atribuido en estos casos a la acción de autoanticuerpos o complejos inmunes. La diferencia más importante con el PTI crónico primario se encuentra en el tratamiento, ya que en el PTI secundario el manejo de la enfermedad de base se acompaña de mejoría en el recuento de plaquetas.



b) PTI agudo del niño. El PTI en los niños es habitualmente una enfermedad autolimitada que se presenta comúnmente con una historia corta de sangrado mucocutáneo en niños de 2 a 10 años de edad, de cualquier sexo. La incidencia es de alrededor de 1 caso por 100.000 niños. Es muy frecuente el antecedente de una infección viral reciente o vacunación.

Patogenia. Debido al distinto curso clínico del PTI agudo del niño respecto del crónico, se han sugerido mecanismos patogénicos diferentes para los dos síndromes. Hasta ahora, los mecanismos propuestos para el PTI agudo son: (a) interferencia de un virus con la maduración de los megacariocitos, (b) reactividad cruzada de anticuerpos anti-virales con las plaquetas, (c) unión de complejos inmunes virus-antivirus a la superficie plaquetaria y (d) producción de un autoanticuerpo verdadero. De los mecanismos propuestos, el que tiene mayor base desde el punto de vista experimental, ha sido el que sostiene que en el PTI agudo existiría una producción de autoanticuerpos plaquetarios verdaderos. Es así como se ha demostrado producción de IgG por parte de linfocitos esplénicos de niños con PTI agudo, que se une en forma específica a plaquetas. Por otra parte, en el suero de niños portadores de PTI agudo, se han descrito anticuerpos que reconocen a la que parece ser la GPV de la membrana plaquetaria. Recientemente se ha demostrado que en un porcentaje alto de casos de PTI infantil, se encuentra un anticuerpo IgM con especificidad anti-GPIb.

Evaluación de laboratorio. El estudio de laboratorio del PTI del niño es esencialmente igual al descrito para el cuadro crónico del adulto; sin embargo, a pesar de que en la mayoría de los casos se encuentra PAIgG elevada y en un 30% de los casos, anticuerpos antiplaquetarios circulantes, los estudios de especificidad antigénica con ELISAs basados en captura de antígeno, son frecuentemente negativos.

Tratamiento. Sobre el 80% de los niños con PTI se recuperan en forma espontánea. La hemorragia intracraneana, su complicación más grave, se presenta en menos del 1% de los casos. En los casos en que está indicado el tratamiento, una combinación de esteroides y dosis altas de IgG endovenosa, parece acompañarse de los mejores resultados.

Aproximadamente un 10% de los niños que

se presentan como PTI agudo continúan con trombocitopenia después de los 6 meses de iniciado el cuadro, catalogándose en estos casos como un cuadro de PTI crónico similar al del adulto.

Trombocitopenias inmunes inducidas por fármacos. La aparición de trombocitopenia grave asociada al uso de algún fármaco, es una complicación reconocida desde hace más de 100 años. Muchas drogas (más de cien) han sido implicadas en la patogenia de la trombocitopenia inducida por fármacos, siendo la quinina y la quinidina las más frecuentemente reportadas y estudiadas. Los anticuerpos asociados con esta condición generalmente requieren la presencia de la droga soluble para reaccionar con estructuras de la membrana plaquetaria. Estudios recientes han documentado epítomos específicos para la unión de anticuerpos dependientes de droga en la GPIb-IX, GPIIb-IIIa y la molécula de adhesión celular de endotelio y plaquetas (PECAM-1). Ciertas drogas (penicilinas, cefalosporinas), se unen covalentemente a la membrana plaquetaria *in vivo* y estimulan la producción de anticuerpos dependientes de hapteno. En otro grupo de pacientes se forman verdaderos autoanticuerpos que se hacen independientes de la droga (metildopa). Aunque las drogas u otras moléculas pequeñas pueden conjugarse a proteínas *in vivo*, lo que puede inducir una respuesta inmune, existe muy escasa información que explique la perturbación del sistema inmune que lleva a la producción de autoanticuerpos dependientes de un fármaco. En cuanto al estudio de laboratorio, la demostración de los anticuerpos dependientes de droga se puede hacer utilizando las mismas técnicas de unión indirecta de una anti-Ig humana, usando plaquetas blanco normales y la droga apropiada presente en el medio de incubación. En muchos casos se puede demostrar las glicoproteínas contra las cuales están dirigidos los anticuerpos, mediante el uso de las técnicas de ELISA con captura de antígeno, en presencia o ausencia de la droga implicada. El tratamiento de la trombocitopenia inducida por fármacos en la gran mayoría de los casos se reduce a la suspensión de la droga responsable, lo que es seguido por una rápida normalización del recuento de plaquetas.

Trombocitopenia inducida por heparina

Aunque en estricto sentido la Trombocitopenia Inducida por Heparina (TIH) es el resul-



tado del uso de una droga, su patogenia única, cuadro clínico y frecuencia de presentación, hacen necesario considerarla en forma separada. La administración de heparina endovenosa o subcutánea es una causa reconocida de trombocitopenia. La frecuencia de esta complicación varía de 2 a 5% en diferentes estudios. En la TIH se ha descrito dos formas: (a) tipo I, por acción directa de la heparina sobre las plaquetas, que no es mediada inmunológicamente y que es habitualmente leve y (b) tipo II, o inmune, por acción de un autoanticuerpo antiplaquetario dependiente de heparina. Lo más importante de este cuadro es que los pacientes que presentan una trombocitopenia profunda asociada al uso de heparina, se complican paradójicamente de fenómenos de trombosis arterial y menos frecuentemente, venosa.

Patogenia. La TIH tipo II se asocia a la presencia de anticuerpos que están dirigidos contra el complejo formado entre la heparina y el factor plaquetario 4 (PF4), una proteína básica, encontrada normalmente en los gránulos alfa de las plaquetas. Los complejos inmunes formados entre el PF4, la heparina y el anticuerpo, son reconocidos por el receptor FcγRIIa de las plaquetas, lo que induce activación de las plaquetas, liberación del contenido de sus gránulos y agregación. Simultáneamente, los heparinoides presentes sobre la superficie de la célula endotelial unen PF4 y se forma el complejo con el anticuerpo, que resulta en daño de la célula endotelial que se transforma así en una superficie protrombótica.

Evaluación de laboratorio. El anticuerpo dependiente de heparina se puede demostrar mediante técnicas inmunológicas (ELISA) o funcionales. El ensayo de ELISA más ampliamente utilizado se basa en la fijación a la fase sólida de un complejo PF4:heparina, sobre el cual se agrega el suero en estudio. La unión de los anticuerpos al complejo se demuestra con anti-Ig humana marcada con enzima. Los ensayos funcionales se basan en la capacidad que tienen los anticuerpos dependientes de heparina de activar las plaquetas. Con este fin se ha utilizado la agregación plaquetaria en presencia del anticuerpo y heparina o la liberación de ¹⁴C-Serotonina en las mismas condiciones. Recientemente se han desarrollado técnicas de citometría de flujo que identifican las micropartículas liberadas desde las plaquetas durante el proceso de activación en presencia de heparina.

Tratamiento. El tratamiento de la TIH se circunscribe a la suspensión de la heparina. En casos seleccionados se pueden utilizar análogos a la heparina que no tienen reactividad cruzada con el anticuerpo.

4. NEUTROPENIAS INMUNES

Los neutrófilos al igual que los hematíes y plaquetas, se originan en la médula ósea a partir de una célula pluripotencial (ver capítulos 3 y 4). Los neutrófilos maduros (segmentados) representan el mayor porcentaje (55-65%) de leucocitos sanguíneos en los adultos. Tienen como función principal la fagocitosis y destrucción de agentes infecciosos, proceso que es independiente de la especificidad de la respuesta inmune. Después de permanecer alrededor de 8 horas en circulación pasan a los tejidos.

Se entiende por neutropenia la reducción del número absoluto de neutrófilos en la sangre, valor que puede ser calculado multiplicando el número total de leucocitos sanguíneos por el porcentaje de neutrófilos (segmentados y baciliformes) obtenido en el recuento diferencial. En general se considera que el límite normal bajo para niños y adultos es 1500 neutrófilos/μL. Se entiende por neutropenia leve, moderada y grave, 1000-1500, 500-1000 y <500 neutrófilos/μL, respectivamente; clasificación que se asocia con el riesgo de presentar infección grave. Los sitios más comunes de infección incluyen cavidad oral y mucosas, piel, y áreas perinatal y genital. Los clásicos signos de inflamación son menos evidentes en pacientes neutropénicos que en los individuos que presentan cifras normales o aumentadas de neutrófilos.

Existen varias causas de neutropenia: (i) Disminución de producción por insuficiencia medular global (ej. Aplasia y Leucemias), (ii) neutropenias congénitas (ej. Neutropenia cíclica), neutropenias adquiridas (ej. Por infecciones, de tipo nutricional, Síndrome de Felty, Hiperesplenismo, por activación del complemento y de **origen inmune**)

4.1. Sistemas antigénicos de los neutrófilos

Los neutrófilos presentan antígenos que comparten con otras células (ej. moléculas HLA) y antígenos específicos (tabla 24-6). La nomenclatura utilizada para identificar los antígenos específicos de los neutrófilos incluye una N (neutrófilo) seguida de una letra (A, B, C, etc.) que identifica



los diferentes sistemas antigénicos) y un número (1 ó 2) que representa el alelo.

El **sistema NA** se expresa en la glicoproteína FcγRIIIb (CD16) de 50-80 kDa. La glicoproteína, codificada en el cromosoma 1, posee dos dominios extracelulares del tipo inmunoglobulina y se une a los fosfolípidos de membrana a través de la molécula glicosilfosfatidilinositol (GPI). Existen alrededor de 20.000 moléculas/célula. El sistema NA es bialélico; los antígenos NA1 y NA2 se diferencian en cuatro aminoácidos (figura 26-4) ubicados en el dominio más distal de la membrana celular.

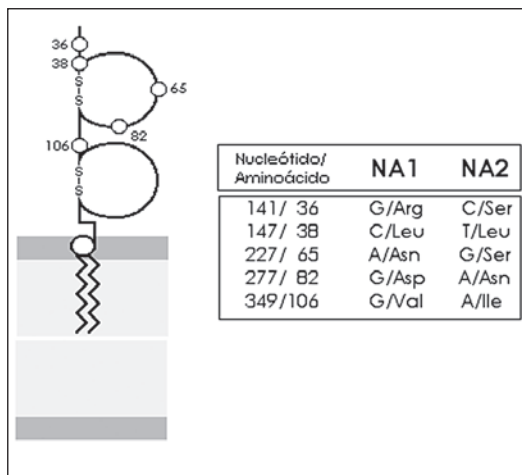


Figura 26-4. Estructura del receptor FcγRIIIb (CD16). En la figura se indica el polimorfismo que genera los antígenos NA1 y NA2.

El **sistema NB** también es bialélico; los antígenos NB1 y NB2 residen en una glicoproteína de 58-64 kDa -similar a FcγRIII- que también se une a la membrana de los neutrófilos a través de GPI.

De los **sistemas NC, ND y NE**, se tiene menos información que en relación a los sistemas NA y NB, y no se han encontrado alelos para los sistemas NC, ND y NE.

4.2. Neutropenias inmunes

En analogía a lo que ocurre con los eritrocitos y plaquetas, la destrucción inmune de los neutrófilos puede ser mediada por autoanticuerpos y aloanticuerpos (tabla 26-7).

4.2.1. Neutropenias aloinmunes

Al igual que la anemia y trombocitopenia aloinmune, la neutropenia aloinmune puede ser neonatal y postransfusional. La **Neutropenia neonatal aloinmune (NNA)**, es causada por una incompatibilidad feto-materna en que están involucrados sólo los neutrófilos. La incidencia estimada de NNA es similar a la que se presenta en el Púrpura aloinmune neonatal (PAN), aproximadamente 1-2 de cada 5000 recién nacidos vivos. Al igual que en la eritroblastosis, ocurriría una isosensibilización materna a antígenos heredados del padre y expresados en los neutrófilos del feto. Se han encontrado leucocitos fetales en la sangre materna, especialmente durante el primer trimestre y después del parto. La especifici-

Tabla 26-6. Sistemas antigénicos específicos de los neutrófilos

Sistema antigénico	Antígeno	Frecuencia antigénica*
NA	NA1	54
	NA2	93
	NA	nulo
NB	NB1	92
	NB2	—
NC	NC1	96
ND	ND1	96
NE	NE1	23

* Población de Estados Unidos



Tabla 26-7. Clasificación de las neutropenias inmunes

Neutropenias por aloanticuerpos

- Neutropenia neonatal aloinmune
- Neutropenia transfusional aloinmune

Neutropenias por autoanticuerpos

- Neutropenias autoinmunes primarias
 - Neutropenia inmune de la infancia
 - Neutropenia primaria crónica del adulto
- Neutropenias autoinmunes secundarias
 - Neutropenia secundaria a enfermedades
 - Neutropenia autoinmune inducida por drogas

dad más frecuentemente encontrada para los anticuerpos antineutrófilos ha sido anti-NA1 y anti-NA2.

A diferencia de la EHRN y en forma similar al PAN, la NNA puede presentarse en el primer hijo. La mayoría de los pacientes presenta infecciones leves.

La mayoría de las **Reacciones transfusionales febriles no hemolíticas**, se deben a la presencia de anticuerpos antineutrófilos en el receptor, el que reacciona contra leucocitos presentes en la sangre o hemoderivado transfundido. La aloinmunización por antígenos HLA y otros antígenos asociados a leucocitos -principalmente NA1 y NA2- se presentan en pacientes que reciben transfusiones de granulocitos y plaquetas; especialmente en los politransfundidos

Investigación serológica de los anticuerpos antineutrófilos

Los métodos para estudiar los anticuerpos antineutrófilos se pueden agrupar en: (i) Métodos para pesquisar inmunoglobulina unida a la superficie de los neutrófilos y (ii) Métodos que pesquistan el efecto de los anticuerpos antineutrófilos. En el primer caso granulocitos heterólogos se incuban con suero del paciente y control, y se cuantifica la unión de los anticuerpos antigranulocitos. Para esto se pueden usar varios métodos, como son la inmunofluorescencia, citometría de flujo, enzaiminmunoensayos, radioinmunoensayo y proteína A estafilocócica. En el segundo caso se ha usado aglutinación, opsonización y citotoxicidad.

4.2.2 Neutropenias autoinmunes

Al igual que en la anemia hemolítica inmune, la tolerancia inmunológica se puede perder principalmente por: (a) reacción inmune cruzada de un antígeno extraño con un antígeno propio y (b) disminución de la actividad supresora de las células T sobre un clon de células B (ver capítulo 23). Como en otras enfermedades autoinmunes, la proliferación de los linfocitos B es clonal.

En la neutropenia autoinmune, los anticuerpos están dirigidos con mayor frecuencia contra antígenos del sistema antigénico NA. La especificidad anti-NA1 se correlaciona con HLA-DR2. También se han detectado autoanticuerpos dirigidos contra el complejo glicoproteico de adhesión CD11b/CD18 y contra actina.

La fagocitosis -por macrófagos de médula ósea, bazo y otros órganos linfoides- de neutrófilos sensibilizados con autoanticuerpos, es un importante mecanismo de destrucción de neutrófilos en la neutropenia autoinmune. Si bien, a diferencia de los hematíes, los granulocitos resisten la acción lítica del complemento, este mecanismo es importante en la patogenia de la neutropenia, al aumentar el secuestro por parte de los macrófagos esplénicos. Los anticuerpos antineutrófilos, además pueden afectar la función de los neutrófilos.

Cuando el antígeno contra el cual está dirigido el autoanticuerpo, también está presente en las células mieloides más inmaduras, la granulopoyesis puede estar marcadamente afectada, lo que se traduce en una neutropenia habitualmente grave por falta de regeneración.

Neutropenias autoinmunes primarias

En los niños y adultos, la neutropenia aislada, producto de destrucción aumentada de neutrófilos, sin asociación a otra patología que pueda explicar el fenómeno, se considera primaria. Frecuentemente estos pacientes presentan anticuerpos anti-neutrófilos, generalmente IgG. La **Neutropenia inmune de la infancia** se presenta en niños de 3-30 meses, con un promedio de 8 meses. Generalmente los pacientes presentan fiebre e infecciones de piel, oído medio, vías respiratorias o vías urinarias. Al igual que en el PTI infantil, la neutropenia inmune de la infancia generalmente regresa en forma espontánea. La gran mayoría de los casos de **Neutropenia primaria crónica del adulto** se asocia a alteraciones inmunológicas o hematológicas. La mayoría de



los pacientes son mujeres y presentan celularidad normal o aumentada en la médula ósea.

Neutropenias autoinmunes secundarias

Esta es la forma más frecuente de neutropenia inmune en el adulto. La Neutropenia autoinmune secundaria se asocia a otras enfermedades (de tipo autoinmunes, malignas o inmunodeficiencias) y a drogas. En la patogenia de las **neutropenias secundarias a otras enfermedades** (ej. Lupus Eritematoso Sistémico, Linfomas) podrían participar complejos inmunes, activación del complemento y reacción cruzada de anticuerpos con los neutrófilos. En la **Neutropenia autoinmune inducida por drogas**, los fármacos que más frecuentemente asociados incluyen antibióticos, analgésicos-antiinflamatorios, antiarrítmicos, antimaláricos y antitiroideos.

En el estudio de laboratorio también utilizan las pruebas descritas en el punto 4.2.1.

El **tratamiento** dependerá del tipo particular de neutropenia y cuando corresponda de la enfermedad de base. La neutropenia inmune de la infancia remite espontáneamente. En otras neutropenias lo indicado es evitar las infecciones a repetición. Como en otras enfermedades hematológicas autoinmunes, también se han usado como tratamiento esplenectomía, corticoides e IgG intravenosa. Por otra parte, se han usado factores de crecimiento hematopoyético con el propósito de aumentar la proliferación y acelerar la diferenciación de las células progenitoras mieloides; los factores de crecimiento usados son el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) y el factor estimulador de colonia granulocítica (G-CSF).

LECTURAS SUGERIDAS

Palomo, I., Pereira, J., **Fisiopatología de las citopenias inmunes**, Editorial Universidad de Talca, 1995.

Anemias hemolíticas inmunes

Avent, N., Reid, M., "The Rh blood group system: a review", *Blood* 2000; 95:375-387.

Bergeron, D., Adams, S., "Autoimmun hemolytic anemias and drug-induced hemolytic anemias" en **Immunohematology principles and practice**, Eds. Quinley E., Chapter 16, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998.

Carton, J.; Bailly, P.; Le Van Kim, C.; Cherif-Zahar, B.; Matassi, Bertrand O.; Colin, Y., "Insights into the structure and function of membrane polypeptides carrying blood group antigens", *Vox Sang* 1998;74(Suppl.2):26-64.

Dacie, J., Lewis, S.M. and Waters, H., "Serological investigation of auto-immune and drug-induced immune haemolytic anaemias" en **Practice Haematology**, Eds. Dacie J., Lewis SM., Chapter 29, Seventh edition, Churchill Livingstone, London, 1991.

Foerster, J., "Alloimmune hemolytic anemias", en **Wintrobe's Clinical Hematology**, Eds. Lee, G., Bithell, T, Foerster, J. et al., Chapter 40, Nigth edition, Lee & Febiger, London, 1993.

Garratty, G., "Review: immune hemolytic anemia and/or positive direct antiglobulin test caused by drugs", *Immunohematology*, 1994;10:41-50.

Palomo, I., Pereira J., **Fisiopatología de las citopenias inmunes**, Editorial Universidad de Talca, 1995.

Sherry, C., "Acquired immune anemias of increased destruction" en **Clinical hematology principles, procedures, correlations**, Eds. Stiene-Martin, A., Lotspeich-Steininger, C., Koepke, J., Chapter 19, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1998.

Trombocitopenias inmunes

Aster, Rh., "Platelet-specific alloantigen systems: History, clinical significance and molecular biology" en Nance, ST., Ed., **Alloimmunity: 1993 and beyond**, Bethesda, MD: American Associations of Blood Banks, 1993.

Blanchette, V.S., Johnson, J., Rand, M., "The management of alloimmune neonatal thrombocytopenia", *Baillière's Clinical Haematology* 2000; 13: 365-390.



Bussel, J., Cines, D., "Immune thrombocytopenic purpura, neonatal alloimmune thrombocytopenia, and post-transfusion purpura" en **Hematology. Basic Principles and Practice**, Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J. and Silberstein, L.E., (Eds.) Churchill Livingstone, New York 1995, pp. 1849-1870.

Lucas, G.F., Metcalfe, P., "Platelet and granulocyte glycoprotein polymorphisms", *Transfus Med* 2000; 10: 157-174.

Nurden, A.T., "Human platelet membrane glycoproteins" en **Hemostasis and Thrombosis**, Edition III, Bloom, A.L., Forbes, C.D., Thomas, D., Tuddenham, E.G.D. eds. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1994, pp. 115-165.

Pereira, J., "Polymorphisms of platelet membrane glycoproteins: molecular biology, clinical associations and frequency of expression in chilean and indigenous populations", *Haemostasis* 1998; 28: 189-195.

Porcelijn, L., von dem Borne, A.E., "Immune-mediated thrombocytopenias: basic and immunological aspects", *Baillière's Clinical Haematology* 1998; 11: 331-341.

Sutor, A.H., Gaedicke, G., "Acute autoimmune thrombocytopenia", *Baillière's Clinical Haematology* 1998; 11: 381-389.

Neutropenias inmunes

Calhoun, D.A., Christensen, R.D., "Recent advances in the pathogenesis and treatment of nonimmune neutropenias in the neonate", *Curr Opin Hematol* 1998;5(1):37-41.

Dale, D.C., "Immune and idiopathic neutropenia", *Curr Opin Hematol* 1998;5(1):33-36

Haurie, C., Dale, D.C., Mackey, M.C., "Cyclical neutropenia and other periodic hematological disorders: a review of mechanisms and mathematical models", *Blood* 1998; 92(8):2629-2640.

Martino, R.; Muniz-Díaz, E.; Arilla, M, Ibanez; M., Altes; A, Guanyabens, C.; Madoz, P., "Combined autoimmune cytopenias", *Haematologica* 1995;80(4):305-310

McFarland, J.G., "Platelet and neutrophil alloantigen genotyping in clinical practice", *Transfus Clin Biol* 1998;5(1):13-21.

Raymond, W., "Neutropenia" en Lee, G.; Foerster, J.; Lukens, J.; Paraskevas, F.; Greer, J.; Rodgers, G., **Wintrobe's Clinical Hematology**, volume 1, chapter 73, Tenth edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1998.

Winkelstein, A., Kiss, J.E., "Immunohematologic disorders", *JAMA* 1997;278(22):1982-1992.





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 27

GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

Mireya Silva B. y Mauricio Oqueteaux T.

1. **Introducción**
2. **Estudio inmunológico de las gammapatías monoclonales**
 - 2.1. Pesquisa de una proteína monoclonal
 - 2.2. Identificación de una proteína monoclonal
 - 2.3. Cuantificación de inmunoglobulinas
 - 2.4. Viscosidad sérica
 - 2.5. Beta-2 microglobulina
 - 2.6. Proteína C reactiva
 - 2.7. Interleuquina-6
 - 2.8. Estudios inmunológicos en orina
3. **Gammapatía monoclonal de significado incierto**
 - 3.1. Aspectos generales
 - 3.2. Evolución de las MGUS en el tiempo
4. **Mieloma múltiple**
 - 4.1. Manifestaciones clínicas
 - 4.2. Pronóstico
5. **Variedades infrecuentes de mieloma múltiple y otras gammapatías**
 - 5.1. Mieloma "indolente"
 - 5.2. Leucemia de células plasmáticas
 - 5.3. Mieloma osteoesclerótico
 - 5.4. Plasmocitoma extramedular
 - 5.5. Plasmocitoma óseo solitario
 - 5.6. Macroglobulinemia de Waldenström (MW)
 - 5.7. Enfermedad de cadenas livianas
 - 5.8. Amiloidosis primaria
 - 5.9. Enfermedad por cadenas pesadas
6. **Diagnóstico diferencial entre MGUS y MM**
7. **Patogenia**
 - 7.1. Papel IL-6 y vía de la ciclina D1
 - 7.2. Genes supresores de tumores
 - 7.3. Apoptosis de células plasmáticas
 - 7.4. Papel del estroma en las discrasias de células plasmáticas
8. **Tratamiento**





RESUMEN

En este capítulo se analizan las Gammopatías monoclonales en relación con su concepto, estudio, clasificación, aspectos patogénicos y tratamiento.

Concepto: se refiere a la definición de estas patologías y la estructura molecular del componente o proteína monoclonal.

Clasificación: se las diferencia en (a) Mieloma Múltiple, (b) Gammopatías Monoclonales de Significado Incierto y (c) Variedades infrecuentes de Mieloma Múltiple y otras gammopatías. Se destacan de ellas sus principales manifestaciones clínicas.

Estudio: se analizan, desde el punto de vista inmunológico, los procedimientos más importantes que se utilizan para el diagnóstico de estas enfermedades.

Patogenia: el papel de IL-6 y vía de la Ciclina D1, los genes supresores, la apoptosis de Células Plasmáticas y la probable función del estroma son discutidos en este punto.

Tratamiento: se plantean, brevemente, alcances terapéuticos actuales

1. INTRODUCCIÓN

Las discrasias de células plasmáticas (CPs) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por una expansión de CPs monoclonales -es decir, con origen en un clon celular singular- en la médula ósea, y por la producción de una inmunoglobulina también monoclonal o componente M (CM). Las inmunoglobulinas monoclonales producidas por las CPs patológicas suelen migrar en la fracción gamma (γ) cuando son sometidas a una electroforesis, razón por la cual estas discrasias son también denominadas gammopatías monoclonales. En términos generales, las inmunoglobulinas monoclonales -al igual que las inmunoglobulinas normales- están constituidas por dos cadenas pesadas de igual clase y subclase (cadenas H) y dos cadenas livianas del mismo tipo (cadenas kappa, κ o lambda λ) (ver capítulo 6). Sin embargo, en algunas discrasias es posible detectar sólo un fragmento de la molécula de inmunoglobulina, como ocurre en la enfermedad por cadenas pesadas o livianas, con expresión exclusiva de las cadenas γ , α o μ en el primer caso y κ o λ en el segundo (también conocida como enfermedad de Bence-Jones). Así, salvo estas últimas excepciones, las inmunoglobulinas comprometidas en estas entidades son estructuralmente similares a su contrapartida normal, estando presentes en cantidades elevadas simplemente por el

gran número de CPs clonales que las originan. Desde el punto de vista funcional se ha logrado demostrar, en ensayos *in vitro*, actividad de anticuerpo contra distintos antígenos, principalmente de origen bacteriano y, más aún, contra proteínas autólogas (factores de coagulación, antígenos eritroides, proteínas del SNC, etc). Sin embargo, en la inmensa mayoría de los pacientes no se logra demostrar una actividad específica de la inmunoglobulina monoclonal.

Desde un punto de vista clínico, el hecho de tener su origen en un clon celular único -monoclonal no significa, necesariamente, que se trate de una neoplasia, si bien el concepto inverso es válido para todos los cánceres (es decir, todos ellos son de origen monoclonal), dado que existen diversos ejemplos de expansiones monoclonales que nunca llegan a constituir una neoplasia, al menos clínicamente evidente. El ejemplo más característico de expansión de CPs que permanece bajo control sin progresión hacia tumor de crecimiento continuo se denomina Gammopatía Monoclonal de Significado Incierto (MGUS, "Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance"), mientras que el ejemplo más genuino de proliferación de CPs que escapa a los mecanismos de control y desarrolla una enfermedad maligna lo constituye el Mieloma Múltiple (MM). La incidencia de las distintas gammopatías monoclonales está representada en la tabla 27-1.



Tabla 27-1. Incidencia y frecuencia relativa de las diferentes formas de Gammapatía Monoclonal

Gammapatía Monoclonal	Incidencia	Frecuencia Relativa
Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto	1 - 5%	65 - 70%
Mieloma Múltiple	3 - 5*	12 - 20%
Macroglobulinemia de Wäldeström	< 1*	1 - 4%
Enfermedad de Cadenas Livianas	< 1*	< 1%
Enfermedad de Cadenas Pesadas	< 1*	< 1%
Amiloidosis	< 1*	2%
Crioglobulinemia	< 1*	< 1%

* Resultados expresados como número de casos nuevos/100.000 habitantes por año

2. ESTUDIO INMUNOLÓGICO DE LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

Dado que el capítulo 40 se refiere a los métodos inmunoquímicos, aquí sólo se aplicará, resumidamente, un esquema operacional para el estudio de las GM (tabla 27-2).

2.1. Pesquisa de una proteína monoclonal

La proteína monoclonal se detecta por una imagen muy particular en el estudio electroforético de las proteínas séricas y/o urinarias, electroforesis que puede realizarse en soportes de acetato de celulosa o agarosa.

La imagen consiste en una fracción proteica concentrada, de mayor o menor intensidad dependiendo de su concentración y de límites muy netos con migración desde las globulinas α_2 hasta las globulinas γ . En el densitograma es característica la presencia de una curva aguzada, elevada y de base estrecha, en relación con el sitio de migración de la proteína monoclonal (figura 27-1).

El componente monoclonal corresponde al producto de la secreción de muchas células provenientes de un clon único de células plasmáticas. Son proteínas homogéneas, idénticas entre sí, lo que explica su migración puntual en la electroforesis de proteínas (EFP).

Mediante la EFP pueden diferenciarse los componentes monoclonales de los policlonales, correspondiendo estos últimos a respuestas inmunológicas fisiológicas a las estimulaciones antigénicas importantes como son las infecciones.

Tabla 27-2. Estudio inmunológico de las GM

En sangre (suero)

- Electroforesis de proteínas
- Inmunoelectroforesis de proteínas
- (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, κ , λ)
- Inmunofijación de inmunoglobulinas
- (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, κ , λ).
- Cuantificación de inmunoglobulinas
- Viscosidad sérica
- β_2 -microglobulina
- Proteína C reactiva (PCR)
- IL-6

En orina

- Proteinuria
- Proteinuria 24 hrs.
- Electroforesis de proteínas (orina concentrada)
- Inmunoelectroforesis de proteínas
- (cadenas livianas κ y λ = proteínas de Bence Jones)
- Inmunofijación de cadenas livianas de inmunoglobulinas

Los componentes policlonales constituyen el producto de la secreción de células plasmáticas de diferentes clones celulares y son, por lo tanto, proteínas heterogéneas entre sí, expresándose en

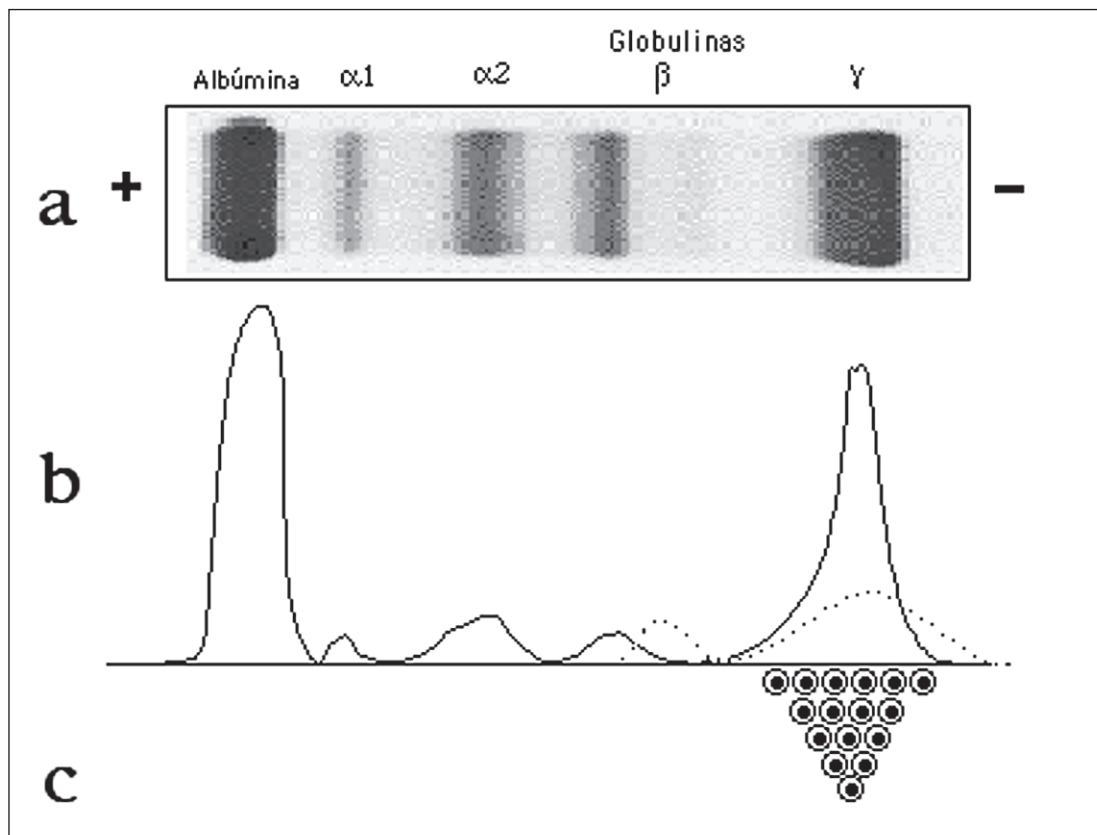


Figura 27-1. Patrón electroforético de proteínas séricas con presencia de componente M en región de la gammaglobulinas. (a) Trazado electroforético, (b) densitograma (c) Base celular que lo explica.

la EFP como fracciones aumentadas, pero en forma difusa y en el densitograma como curvas aumentadas pero amplias, suaves y de base ancha (figura 27-2).

Un hecho destacable es la asociación a una fracción monoclonal de una hipogamaglobulinemia. Este signo es orientador hacia una GM maligna.

En ocasiones existiendo una neoplasia monoclonal de células plasmáticas, el CM no aparece en la EFP séricas. Esta circunstancia puede observarse en la enfermedad de cadenas livianas, mieloma IgD, enfermedad de cadenas pesadas y en el mieloma no secretor, afección en la cual la proteína monoclonal, indetectable en sangre y orina, puede observarse e identificarse en el interior de los plasmocitos de la médula ósea por inmunofluorescencia directa.

Por el contrario, erróneamente, pueden considerarse como componentes monoclonales ciertos artefactos como por ejemplo la fibrina que aparece como una fracción concentrada entre las

globulinas β y γ; los complejos de hemoglobina-haptoglobina, propios de la hemólisis, en globulinas α2, e incluso el punto de aplicación de la muestra en el soporte de la EFP.

2.2. Identificación de una proteína monoclonal

Frente a la pesquisa de un CM electroforético o aún sin detectarlo claramente cuando se sospecha un mieloma múltiple, macroglobulinemia, amiloidosis u otras enfermedades relacionadas se debe realizar una inmunoelectroforesis o una inmunofijación de inmunoglobulinas séricas.

Inmunoelectroforesis. Esta técnica introducida por Grabar y Williams en 1953 es muy útil para la identificación de la proteína monoclonal, es decir la clase de cadena pesada y el tipo de cadena liviana de la inmunoglobulina comprometida.

Brevemente, consiste en una electroforesis sérica seguida de una inmunoprecipitación de las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglo-

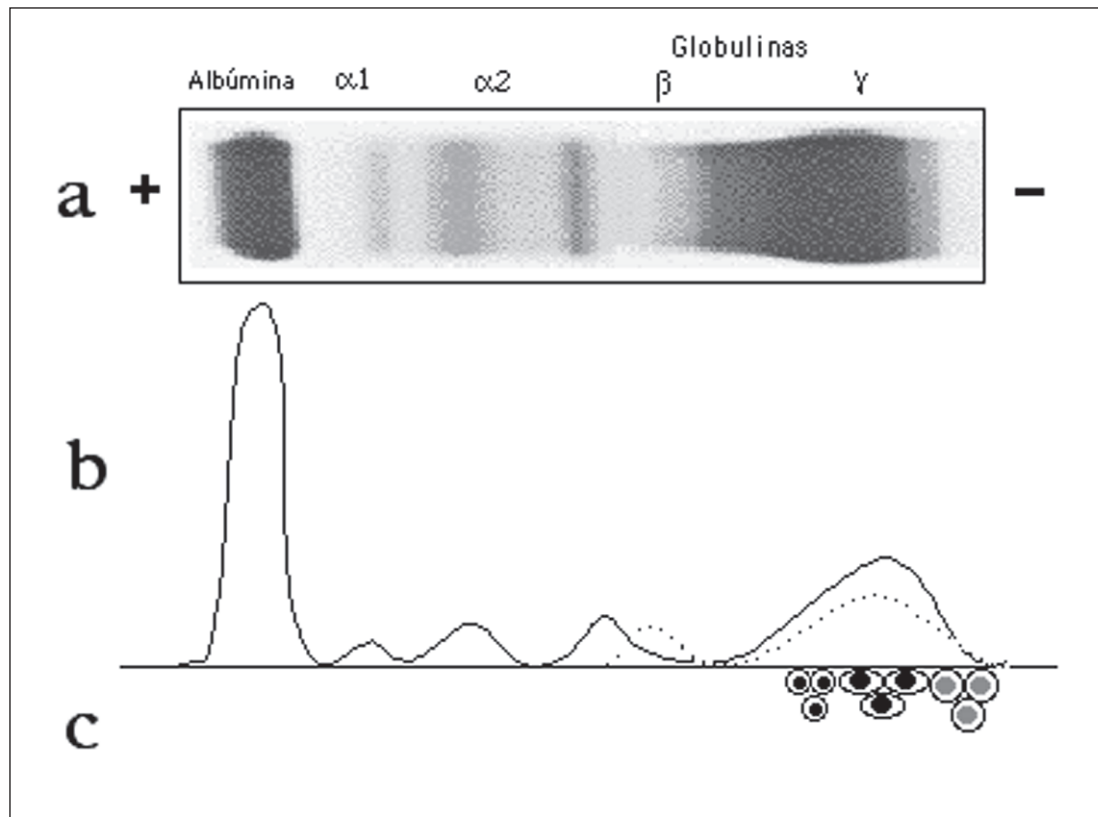


Figura 27-2. Patrón electroforético de un componente policlonal. (a) Trazado electroforético, (b) Densitograma, (c) Base celular que lo explica.

bulinas que contiene la muestra empleando antiseros poli, tri y monovalentes en geles de agarosa (figura 27-3).

Inmunofijación. Esta técnica, permite objetivar con bastante certeza la cadena pesada y liviana de la inmunoglobulina monoclonal del paciente, empleando al igual que la inmunolectroforesis, la muestra a investigar (en 6 diferentes posiciones) en placas de agarosa para obtener, por electroforesis, la separación de las proteínas de acuerdo con su carga neta. En la segunda etapa se aplican los anticuerpos monoespecíficos en 5 de los 6 trazados electroforéticos para que la fijación ocurra. El informe y por ende el diagnóstico se facilita puesto que el procedimiento permite comparar el nivel de migración del CM, si lo hay, con las líneas de precipitación de las cadenas monoclonales comprometidas (figura 27-4).

La inmunofijación puede realizarse en suero, orina, líquido cefalorraquídeo, etc. y posee una mayor sensibilidad y poder de resolución que la inmunolectroforesis.

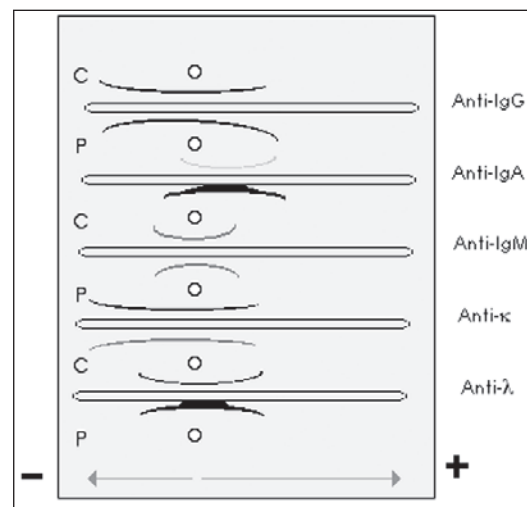


Figura 27-3. Patrón Inmunolectroforético de componente M formado por IgG (cadenas pesadas γ) y cadenas livianas κ . El esquema representa los arcos de inmunoprecipitación de las cadenas pesadas γ , α , μ y livianas κ y λ del suero de un sujeto control normal (C) en comparación con los de un paciente (P) portador de una Gammapatía Monoclonal IgG-k. En este último se aprecia deformación de los arcos de precipitación de la cadena pesada (γ) de la IgG y de la cadena liviana κ y disminución de la concentración de los arcos de IgA, IgM y λ lo que es habitual en las patologías avanzadas.

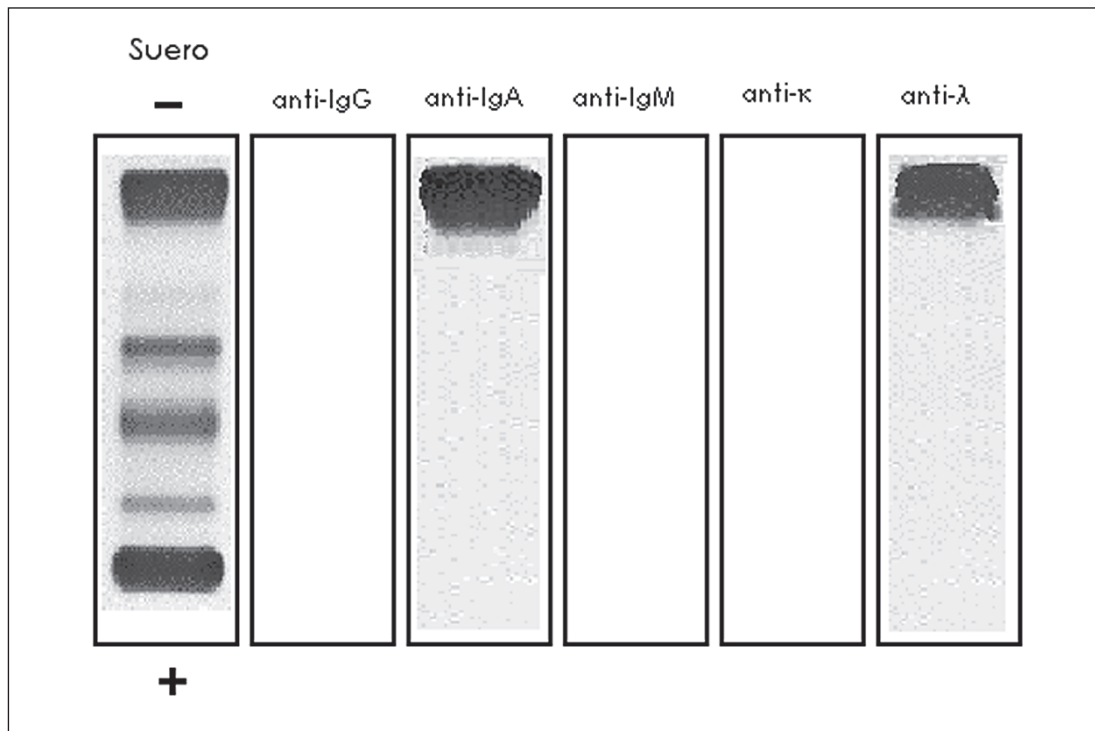


Figura 27-4. Inmunofijación de inmunoglobulinas. En los rectángulos del gel de agarosa se aplica suero del mismo paciente, cuyas proteínas son separadas por electroforesis de alta resolución (EF.AR). La aplicación de antisueros monoespecíficos (γ , α , μ , κ , λ) determina la precipitación del complejo Ag-Ac y la fijación, lineal, de las proteínas monoclonales en el mismo nivel en que se encuentra el componente monoclonal de la electroforesis de la placa. En este ejemplo, el paciente presenta una gammapatía monoclonal IgA- λ .

2.3. Cuantificación de inmunoglobulinas

La cuantificación o dosificación de inmunoglobulinas se realiza mediante técnicas de inmunodifusión radial y últimamente por nefelometría. Su medición permite establecer un índice pronóstico (enfermedad benigna o maligna), mantener un control evolutivo del tratamiento y detectar, precozmente el inicio de una inmunodeficiencia.

2.4. Viscosidad sérica

Los pacientes portadores de una GM pueden evolucionar con síntomas de hiperviscosidad, como se ha señalado.

La hiperviscosidad se define en base al aumento de la viscosidad relativa del suero sanguíneo comparada con el agua. El valor normal es de 1,8, es decir el suero sanguíneo es hasta 1,8 veces más viscoso que el agua. Las manifestaciones clínicas suelen aparecer con cifras de 5 a 6 y comúnmente esto ocurre cuando el CM corresponde a IgM, IgG₃ e IgA.

2.5. Beta-2 microglobulina

Esta proteína que forma parte de la estructura de las moléculas clase I del Sistema Principal de Histocompatibilidad (cadena liviana del heterodímero) se encuentra en la superficie de todas las células nucleadas.

Puede medirse en suero como en orina y sus niveles constituyen un factor pronóstico en los síndromes linfoproliferativos, particularmente en el MM. Los pacientes con niveles elevados tienen una sobrevida significativamente más corta que los portadores de GM con niveles normales. Las cifras elevadas se relacionan con activación y destrucción de linfocitos. Los valores normales son 1.15-2.03 mg/l.

Como se excreta por el túbulo renal puede aumentar en las insuficiencias del riñón.

2.6. Proteína C reactiva

La cuantificación de la PCR sérica es empleada comúnmente para objetivar la presencia de



un proceso inflamatorio, aunque inespecíficamente. Los niveles de esta proteína se elevan en los pacientes con GM particularmente en el MM.

La IL-6 estimula la producción de PCR y la medición de ésta, por lo tanto, indirectamente refleja los niveles de IL-6. El empleo de anticuerpos monoclonales anti-IL-6 disminuye la producción de PCR. Su valor normal es hasta 0.6 mg/dl.

2.7. Interleuquina-6

Se ha señalado que siendo la IL-6 un factor muy importante de crecimiento de la célula plasmática tumoral, un aumento del nivel sérico, constituye un índice de malignidad, severidad y, por ende, de mal pronóstico de las GM.

Ha sido comunicado que IL-6 sérica es indetectable en sujetos sanos o en GMSI, ($<1\text{pg/ml}$), a diferencia de los enfermos con GMM, en los cuales los niveles pueden ser de 20, 30 o más pg/ml.

2.8. Estudios inmunológicos en orina

Estos estudios inmunológicos deben realizarse en orina total de 24 horas, porque es importante conocer el total de la proteinuria diaria y porque para varias técnicas se requiere concentrar la orina 50, 100 ó 200 veces, para pesquisar concentraciones mínimas de las proteínas monoclonales excretadas.

La electroforesis de proteínas ha de hacerse con orina concentrada, particularmente cuando la proteinuria es pequeña, para destacar el CM urinario en el trazado electroforético, para lo cual se utilizan soportes de acetato de celulosa o agarosa.

La inmunoelectroforesis y/o inmunofijación de proteínas urinarias tienen por objeto identificar las proteínas de Bence Jones, que como se dijo corresponden a las cadenas livianas monoclonales κ o λ de las moléculas de inmunoglobulinas.

Las proteínas de Bence Jones pueden observarse durante la evolución de una GM típica y en la enfermedad de cadenas livianas en la cual hay una gran producción de cadenas livianas κ o λ monoclonales.

3. GAMMAPATÍA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCIERTO

3.1. Aspectos generales

MGUS es la alteración clonal más frecuente

de las CPs, presente entre un 1% y un 5% de la población mayor de 50 años y hasta en un 10% de los mayores de 80 años cuando se analiza la presencia de una proteína monoclonal con técnicas como la electroforesis. Sin embargo, si se utilizan técnicas de mayor sensibilidad estas cifras se elevan aún más. Así, se han reportado incidencias de hasta un 5% en individuos sanos entre 22 y 65 años y de 7-8% sobre los 55 años cuando se utiliza electroforesis de acetato de alta resolución. Esta entidad se caracteriza por la proliferación de un clon singular -o en un 2 a 3% de los casos de dos clones diferentes- de CPs, con la capacidad de producir una proteína monoclonal o CM, pero en ausencia de elementos sugerentes de MM, macroglobulinemia, amiloidosis, etc. En términos generales, los pacientes con MGUS presentan un componente-M $< 3\text{g/dL}$, menos de un 10% de CPs en médula ósea, escasa o nula cantidad de proteína-M en la orina y ausencia de compromiso sistémico como lesiones óseas, anemia, hipercalcemia o compromiso de la función renal.

3.2. Evolución de las MGUS en el tiempo

Desde el punto de vista evolutivo, la MGUS puede dar origen a un MM característico, situación que se observa, sin embargo, en sólo una minoría de los pacientes. En un estudio realizado en la Clínica Mayo, de 241 pacientes seguidos durante 24 a 38 años, 42 de ellos (17,4%) desarrollaron un MM, 7 (2,9%) una macroglobulinemia y 8 (3,3%) una amiloidosis primaria; un 10% adicional de pacientes incrementaron el componente monoclonal en suero, aunque sin llegar a tener elementos clínicos de enfermedad. Considerando esta información, la tasa actuarial de “transformación” de las MGUS es de 14% a 10 años y de 29% a 20 años, para los casos con IgG como proteína-M, y de 18% y 37%, respectivamente, para aquellas MGUS IgA. Sin embargo, tanto en el citado estudio, como en otros, no se ha podido establecer patrones que permitan predecir con claridad qué grupo de enfermos tienen un mayor riesgo de sufrir progresión a MM. Por esta razón, y desde el punto de vista clínico, el avance desde una entidad benigna a una maligna está dada por dos grupos de signos, que requieren necesariamente de un seguimiento estrecho del paciente: (a) Un aumento sostenido en la cantidad del componente monoclonal detectable en el suero y (b) La aparición de dolores óseos con lesiones líticas óseas no detectadas previamente. La aparición de cualquiera



de estos signos es evidencia suficiente para evaluar la enfermedad como “progresiva”, de modo que se requiere una intervención terapéutica en la mayoría de los casos que la presentan.

4. MIELOMA MÚLTIPLE

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de la línea linfóide B caracterizada por la acumulación en médula ósea de una población clonal de células de esta estirpe en su estadio final de diferenciación, es decir, de células plasmáticas, y por la producción de lesiones osteolíticas (y el dolor óseo secundario a ellas) que, junto a la presencia e incremento del componente M (ya sea en suero y orina), representan los hallazgos patológicos más frecuentes de la enfermedad. Las primeras observaciones sobre esta enfermedad fueron realizadas por Henry Bence-Jones en el año 1845, aunque los términos de mieloma múltiple o enfermedad de Kahler no fueron introducidos sino hasta los años 1873 y 1889, respectivamente.

El MM tiene su mayor incidencia durante la 7ª y 8ª década de la vida, si bien un número significativo de casos es diagnosticado en edades más tempranas (un 15% de los casos tienen menos de 50 años). El número de casos nuevos por cada 100.000 habitantes y año es de 3 a 5, por lo que el MM constituye aproximadamente el 1% de todas las neoplasias y el 10% de las neoplasias hematológicas.

A continuación se resumen algunas características clínicas más relevantes de la enfermedad:

4.1. Manifestaciones clínicas

Dolor óseo. El síntoma más típico y frecuente del MM es el dolor óseo, que se puede encontrar en un 70-75% de los pacientes en el momento del diagnóstico, si bien esta incidencia se ha reducido en las últimas décadas debido probablemente al diagnóstico precoz, siendo actualmente de alrededor de un 40%. Éste se debe a la presencia de lesiones generalmente de fácil reconocimiento por medio de métodos radiológicos (osteoporosis, osteólisis o fracturas patológicas). Sus localizaciones más frecuentes son el cráneo (imagen de “apolillamiento”), la columna vertebral (aplastamientos vertebrales y fracturas), las costillas, la pelvis y los huesos largos a nivel proximal. Estas lesiones tienen un origen multifactorial, destacando en su generación la activación de osteoclastos secundaria a la presencia de citoquinas como el factor de necrosis tumoral

(TNF) o la interleuquina-1 beta (IL-1 β).

Manifestaciones neurológicas. Con relativa frecuencia existen en el MM otras dos manifestaciones clínicas asociadas a la patología ósea, como son la hipercalcemia y las alteraciones neurológicas. Estas últimas se presentan frecuentemente como radiculopatías o como un síndrome de compresión medular, motivadas por la compresión de una raíz nerviosa por una lesión vertebral o por el compromiso, ya sea traumático (secundario a una fractura por aplastamiento) o por el crecimiento de un plasmocitoma (tumor de CPs) a la cavidad medular, respectivamente. Si bien existen casos en que la manifestación neurológica es dependiente de una polineuropatía secundaria a la presencia de paraproteinemias, esta situación es más bien excepcional. En estos casos la proteína anómala actuaría como anticuerpo dirigido contra determinantes antigénicos de la mielina.

Hipercalcemia. La presencia de hipercalcemia ($>11,5$ mg/dL tras corrección por los niveles de albúmina) ocurre en alrededor de un tercio de los pacientes. Dentro de su patogenia se ha descrito una alteración en el balance entre la actividad osteoclástica (reabsorción ósea) y la osteoblástica (formación ósea), de modo que la primera prevalece sobre la segunda. Este desbalance estaría explicado por la presencia y mayor actividad de ciertas interleuquinas: factor de necrosis tumoral (TNF) y a la IL-1 β , ambos influenciados estrechamente por la actividad de IL-6.

Síntomas generales. En los pacientes con MM es frecuente la presencia de síntomas constitucionales, tales como astenia, pérdida de peso, fatigabilidad, etc., muchas veces relacionados a la presencia de anemia y, en algunas oportunidades, al estado de hipermetabolismo que implica la enfermedad tumoral, como ocurre en los infrecuentes casos de leucemia de CPs.

Síndrome anémico. El valor medio de la hemoglobina (Hb) en la mayor parte de las series de pacientes con MM al diagnóstico es de alrededor de 10,5 g/dL, existiendo grados variables de anemia en el 60-70% de los casos. Además, alrededor de un 20-25% de ellos presentan anemia severa, con valores de Hb inferiores a 8,5 g/dL. La anemia en el MM es de origen multifactorial en que, además del mecanismo clásico de anemia de enfermedades crónicas, existen otros factores de importan-



cia, como son: (a) reemplazo de la hematopoyesis normal por CPs tumorales, (b) actividad regenerativa disminuida del tejido hematopoyético residual, (c) insuficiencia renal, (d) deficiencia de hierro y (e) disminución de la sobrevivida del glóbulo rojo. Además, en los últimos años ha quedado de manifiesto el papel de la eritropoyetina (Epo) y otras citoquinas en la patogenia de la anemia en el MM, sugiriéndose que en estos enfermos existiría una respuesta inadecuada a la Epo (para el grado de anemia) y/o una respuesta proliferativa disminuida de las células eritropoyéticas a niveles normales de esta sustancia. Por último, se ha demostrado que algunas citocinas (IL-1, TNF, TGF e IFN- γ) pueden disminuir tanto la eritropoyesis como la producción de Epo.

Insuficiencia renal. La falla renal es un rasgo característico del MM y es uno de los factores pronósticos más importantes, representando la segunda causa de muerte en estos pacientes. Aproximadamente un 30% de ellos presentan niveles de creatinina ≥ 2 mg/dL, incidencia que aumenta durante el curso de la enfermedad. Sin embargo, la mayoría de los enfermos son asintomáticos. Su etiología es también multifactorial, influyendo en ella la eliminación de cadenas livianas, hipercalcemia (estas dos causas presentes en un 90% de los casos afectados) e hiperuricemia, deshidratación, infecciones urinarias a repetición, hiperviscosidad, uso de drogas nefrotóxicas (especialmente antibióticos), amiloidosis e infiltración tumoral. El término “riñón mielomatoso” se usa para designar la formación de cilindros tubulares y está invariablemente asociado a la presencia de proteinuria de Bence-Jones.

Infecciones bacterianas. Constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad en el MM, siendo su incidencia global entre 0,5 y 3 episodios infecciosos por paciente/año (alrededor de 7 a 15 veces superior a la población normal de la misma edad). La causa más importante es la alteración de la inmunidad humoral, tanto por depresión de la producción de inmunoglobulinas normales (hipogammaglobulinemia) como por un hipercatabolismo de las mismas. Otros factores que parecen influir en la predisposición a las infecciones incluyen: (a) supresión de la producción de anticuerpos y de la proliferación de células B por parte de los monocitos/macrófagos estimulados por las CPs mielomatosas; (b) reducción en la producción de interleucina 4 (IL-4), responsable

de la activación inicial de las células B en reposo; (c) presencia de células T con actividad inmunosupresora; (d) defectos en la inmunidad celular (disminución de células CD4 y alteración de las células NK); (e) alteración funcional de la actividad del complemento; (f) presencia de granulocitopenia, secundaria tanto a infiltración medular como al tratamiento quimioterápico; (g) insuficiencia renal. Los focos y agentes más frecuentemente comprometidos son el pulmonar (*Streptococcus pneumoniae*) y el urinario (bacilos Gram negativos). Si bien la mayor parte de las infecciones en el MM son de origen bacteriano ($\approx 90\%$), también se reconocen en estos pacientes infecciones de origen viral (Herpes Zoster) y fúngicas (*Cándida albicans*, etc).

Otras manifestaciones clínicas. El síndrome de hiperviscosidad es menos frecuente que en otros síndromes linfoproliferativos (Macroglobulinemia de Waldenström), pero puede presentarse en algunos casos de mielomas IgA o IgG₃. Otro problema de relativa frecuencia lo constituye la amiloidosis, presente en alrededor de un 10-15% de los casos, generalmente mielomas Bence-Jones con excreción de cadena L lambda.

4.2. Pronóstico

La evolución de los pacientes portadores de MM es muy variable, con casos que cursan con una enfermedad agresiva que los lleva a la muerte en pocos meses y otros con un curso estable y sobrevivida que puede superar incluso los 10 años, situándose la mediana de supervivencia en torno a los 3 años. Esta variabilidad en el curso clínico se debe a la presencia de diferentes factores pronósticos, entre los que destacan el estado general, la edad, la presencia de insuficiencia renal, la anemia, la hipercalcemia y la hipoalbuminemia. En cuanto al tipo de MM parecen ser de peor pronóstico el IgD y el Bence-Jones. La clasificación pronóstica más utilizada hasta ahora es la de Durie-Salmon, resumida en la tabla 27-3. En los últimos años se han reconocido nuevos factores pronósticos como el nivel de beta-2-microglobulina ($\beta 2M$), de IL-6, proteína C reactiva, la actividad proliferativa de las CPs (el llamado “labelling index”), la expresión de ciertos antígenos en la célula plasmática, las alteraciones cromosómicas, la hipodiploidía y la expresión del gen de resistencia múltiple a drogas (MDR-1), algunos de los cuales serán revisados brevemente.



Tabla 27-3. Criterios de Etapificación de Durie-Salmon

Estadio I (baja masa tumoral: $< 0,6 \times 10^{12}/m^2$)	
Hemoglobina $> 10g/dL$	
IgG $< 5g/dL$; IgA $< 3g/dL$; Bence Jones $< 4g/24h$	
Nivel de Calcio normal	
Presencia de máximo una lesión osteolítica	
Estadio II (masa tumoral intermedia: $0,6 - 1,2 \times 10^{12}/m^2$)	
Criterios intermedios entre estadio I y III	
Estadio III (alta masa tumoral: $> 1,2 \times 10^{12}/m^2$)	
Hemoglobina $< 8,5g/dL$	
IgG $> 7g/dL$; IgA $> 5g/dL$; Bence Jones $> 12g/24h$	
Nivel de Calcio $> 12mg/dL$ (ajustado por la albúmina sérica)	
Presencia de lesiones osteolíticas múltiples	
A	Creatinina $< 2mg/dL$
B	Creatinina $\geq 2mg/dL$

$\beta 2$ -microglobulina. La $\beta 2M$ es uno de los factores pronósticos relevantes y se correlaciona estrechamente tanto con la masa tumoral, el compromiso renal y la clasificación de Durie-Salmon. Como factor independiente es capaz de predecir la supervivencia mejor que cualquiera de los otros parámetros, por lo que debe estar incorporado en los protocolos de estudio y tratamiento en todos los pacientes.

Proteína C Reactiva. La concentración de la PCR es un reflejo de la actividad de IL-6, citoquina fundamental en la proliferación y sobrevida de las CPs. El valor predictivo de este parámetro parece ser independiente de la $\beta 2M$, lo que ha permitido construir algoritmos de estratificación de riesgo basados en estos dos parámetros.

Índice Proliferativo de las CPs. El PCLI ("plasma cell labelling index") refleja la actividad proliferativa de las CPs que suele incrementarse con la progresión de la enfermedad. La sobrevida de los pacientes con PCLI $< 3\%$ es de 56 meses, que disminuye a 19 meses cuando este valor es $\geq 3\%$.

Citogenética. Las alteraciones de la composición cromosómica tienen un reconocido valor en enfermedades hematopoyéticas como las leucemias. Hasta hace pocos años la información en el MM era escasa debido a que este es un tumor de células esencialmente maduras con baja tasa

proliferativa y menor posibilidad de obtener metafases analizables. Sin embargo, entre un 30 y 50% de los pacientes tienen un cariotipo anormal (20-30% al diagnóstico y 35-60% post-tratamiento). Por otro lado, con técnicas de mayor sensibilidad como hibridación *in situ* (FISH) o citometría de flujo se puede observar cantidades anormales de DNA (aneuploidías de DNA) en hasta un 80% de los casos. Las alteraciones más frecuentes son traslocaciones (51%) y trisomías (45%). De particular interés ha resultado el valor pronóstico ominoso de la pérdida de un cromosoma 13 (monosomía 13) o de alteraciones de 11q.

5. VARIEDADES INFRECIENTES DE MIELOMA MÚLTIPLE Y OTRAS GAMMAPATÍAS

5.1. Mieloma "indolente"

Corresponde a pacientes con criterios diagnósticos inequívocos de mieloma pero en ausencia de anemia, insuficiencia renal, hipercalcemia o lesiones líticas múltiples. Estos pacientes tienen usualmente niveles de proteína M $> 3g/dL$ pero $< 4,5g/dL$ y $> 10\%$ de CPs atípicas en médula ósea. Estos pacientes suelen ser asintomáticos y no requieren tratamiento hasta que se evidencie una progresión de la enfermedad, lo que ocurre con una mediana de 26 meses.



5.2. Leucemia de células plasmáticas

Los pacientes con esta inhabitual presentación (< 5% de los pacientes) tienen un recuento absoluto de CPs $\geq 2 \times 10^6/\mu\text{L}$. Se debe diferenciar entre la variedad *de novo* y la transformación en Leucemia de Células Plasmáticas de un mieloma previamente conocido. El tratamiento de estos pacientes suele ser ineficaz y la mediana de supervivencia es de sólo 2 meses.

5.3. Mieloma osteoesclerótico

La principal característica de esta enfermedad es la presencia de una polineuropatía inflamatoria crónica desmielinizante causante de gran incapacidad motora. Esta alteración aparentemente es secundaria a una inmunoglobulina con toxicidad para las fibras nerviosas periféricas. Además, en esta variedad es frecuente la asociación de alteraciones endocrinológicas (síndrome de POEMS). La médula ósea de estos pacientes usualmente tiene proporciones normales de CPs (< 5%) y el diagnóstico debe confirmarse con la biopsia de una lesión lítica. Desde un punto de vista bioquímico, y comparado con los pacientes con MM “clásico”, estos pacientes suelen exhibir niveles más elevados de IL-1 β , TNF- α e IL-6, pero niveles inferiores de TGF- β , con un desbalance que favorece las citoquinas proinflamatorias.

5.4. Plasmocitoma extramedular

Esta rara entidad suele afectar con mayor frecuencia el tracto respiratorio superior aunque ocasionalmente afecta el tracto digestivo y otros órganos, en ausencia de criterios diagnósticos de un MM convencional. El tratamiento, al igual que en el caso de un plasmocitoma óseo solitario, es la radioterapia, con lo cual se observan excelentes resultados, incluyendo la curación en muchos de ellos.

5.5. Plasmocitoma óseo solitario

Corresponde a una lesión osteolítica única constituida por CPs clonales, en ausencia de infiltración en médula ósea. Suelen tener cantidades pequeñas de componente M ya sea en suero y/o en orina, la que desaparece tras radioterapia sobre la lesión. Lamentablemente sólo un 50% de estos casos puede ser curado, dado que la otra mitad de los pacientes evoluciona hacia un MM clásico en

los años siguientes. En este sentido, es posible que, aún en ausencia de criterios clásicos de MM en médula ósea, en aproximadamente un 50% es posible demostrar la presencia de CPs clonales en médula ósea por medio de citometría de flujo, sugiriendo que desde un comienzo se trata de un MM con manifestación primariamente “tumoral” y no infiltrativa.

5.6. Macroglobulinemia de Waldenström (MW)

Entidad descrita por primera vez en 1944 por Waldenström en 2 pacientes con fatiga, sangramiento de mucosas, adenopatías y anemia normocrómica asociada a un aumento de la viscosidad plasmática secundaria la presencia de grandes cantidades de proteína IgM circulante. A nivel de médula ósea se observa una infiltración de células linfoplasmocitoides productoras de la proteína IgM monoclonal, con frecuente presencia de basófilos tisulares (mastocitos) que ayudan en el diagnóstico. La edad media de presentación es sobre los 60 años, siendo más frecuente en el sexo masculino. Si bien la presencia de hiperviscosidad es la regla, sólo un 20% presenta síntomas relacionados a ella (cefalea, alteraciones visuales, etc). En todo caso, elevaciones de sobre 4 veces el valor normal confiere un riesgo de complicaciones clínicas que obligan a considerar la plasmaféresis como una de las medidas terapéuticas en estos casos. En alrededor de un 10% de los casos se observa una neuropatía desmielinizante sensitivo-motora crónica a nivel periférico; en la mitad de estos casos la paraproteína IgM está dirigida contra los epítomos carbohidratos de la glicoproteína asociada a la mielina (MAG). En términos generales la MW tiene una evolución larvada, con una mediana de supervivencia de alrededor de 5 años.

5.7. Enfermedad de cadenas livianas

La enfermedad de cadenas livianas o mieloma de Bence Jones se caracteriza por la producción monoclonal exclusivamente de la cadena liviana kappa o lambda, en ausencia de la cadena pesada correspondiente. En esta entidad es frecuente la asociación a daño renal de diversa magnitud secundario al paso de esta inmunoglobulina a través de la membrana glomerular. Además, y especialmente cuando la cadena liviana es de tipo lambda, el depósito de esta proteína a nivel del glomérulo



y mesangio puede dar origen a una amiloidosis renal capaz de producir un síndrome nefrótico frecuentemente irreversible.

5.8. Amiloidosis primaria

Se caracteriza por la formación de fibrillas con configuración espacial de tipo β a partir de cantidades variables de cadenas livianas monoclonales, siendo mucho más frecuente de observar en casos de clonalidad λ . Al igual que el MM, la amiloidosis suele presentarse durante la séptima década de la vida (mediana 62 años) y se caracteriza clínicamente por fatigabilidad, baja de peso, compromiso del estado general y alteraciones neurovegetativas (parestesia, mareo, síncope, etc) que resultan progresivas y muy limitantes; asimismo, un tercio de los pacientes presenta síndrome nefrótico. Esta enfermedad suele ser tratada en forma similar al MM, sin embargo, la respuesta puede ser pobre, con compromiso progresivo que lleva inexorablemente a la muerte.

5.9. Enfermedad por cadenas pesadas

Corresponden a enfermedades linfoproliferativas infrecuentes caracterizadas por la producción monoclonal de Igs que carecen de cadenas ligeras. El primer reporte fue hecho en un caso de cadena pesada γ (enfermedad de Franklin). Sin embargo, dentro de estos síndromes es más frecuente la enfermedad por cadenas α (enfermedad de Seligmann) la menos frecuente compromete a la cadena μ .

Cadenas pesadas γ

La edad media es de 60 años y usualmente se presenta con un cuadro semejante a un linfoma agresivo, con adenopatías, compromiso del estado general, anemia, fiebre y hepatoesplenomegalia y raramente —a diferencia del MM tradicional— con lesiones osteolíticas. Si bien hay casos de evolución prolongada, la enfermedad suele cursar agresivamente, con una mediana de supervivencia de alrededor de 12 meses.

Cadenas pesadas α

La mayor parte de los pacientes son de origen mediterráneo, con una presentación en edades más precoces que las otras variantes (segunda a tercera década de la vida). La enfermedad com-

promete frecuentemente el tracto digestivo, con síndrome de malabsorción como síntoma habitual de presentación y tiene una evolución agresiva y fatal.

Cadenas pesadas μ

En esta entidad es frecuente encontrar hepatoesplenomegalia y, en cambio, es infrecuente la presencia de lesiones osteolíticas. La electroforesis de proteínas puede ser normal, pero en dos tercios de los casos se observa proteinuria monoclonal. El curso clínico puede ser variable, con evolución incluso de varios años.

6. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE MGUS Y MM

Además de la dificultad para definir el grupo de pacientes con riesgo de progresar hacia un tumor clínico, la diferenciación inicial entre MGUS y MM en algunos pacientes puede presentar dificultades, dado que los parámetros clínicos hasta ahora utilizados no son suficientes para discriminar correctamente en todos los casos, razón por la cual el diagnóstico se realiza en presencia de un grupo de criterios clínicos como los definidos por el "Committee of the Chronic Leukemia-Myeloma Task Force", 1973 (tabla 27-4). Asimismo, la cantidad de componente-M sérico suele ser uno de los parámetros de mayor utilidad, dado que, mientras mayor sea éste, mayor es la probabilidad de que se trate de un proceso maligno. Los niveles de hemoglobina, el porcentaje de CPs en médula ósea, la presencia de hipercalcemia, lesiones líticas óseas, compromiso renal, etc., se utilizan en el diagnóstico diferencial entre estas dos entidades. Sin embargo, existen casos de MGUS que presentan, por ejemplo, valores de componente-M mayor de 3 g/dL mantenidos en el tiempo, nivel utilizado como punto de corte en el caso de la IgG. Una característica que parece tener importancia en el diagnóstico diferencial es el índice de proliferación celular ("labelling index"), que corresponde a la cuantificación del número de CPs en fase de síntesis de DNA durante el ciclo celular, aunque este método presenta una tasa de falsos negativos elevada (hasta un 30% en la evaluación de pacientes con MM). Por último, los niveles de IL-6, citoquina relacionada a la proliferación de las CPs (ver punto 5), están incrementados en una minoría de los pacientes portadores de MGUS,



mientras que se elevan en el 35% a 42% de los portadores de MM. El patrón inmunofenotípico evaluado por medio de citometría de flujo presenta menor índice de error en esta discriminación; mientras en el MM las CPs son siempre clonales en ausencia de CPs normales, en prácticamente el 100% las MGUS es posible demostrar la coexistencia de CPs clonales –del todo similares a las CPs presentes en pacientes con MM- con CPs policlonales inmunofenotípicamente normales. Más aún, con este tipo de metodología es posible evidenciar la naturaleza aneuploide de las primeras junto a la diploide de las segundas. Resulta interesante cómo este hecho explicaría la diferencia –muchas veces utilizada como otro criterio clínico diferencial- en la presencia de hipogammaglobulinemia residual en el MM pero no en las MGUS, que mantienen una producción basal normal de inmunoglobulinas por parte de estas CPs residuales. De cualquier modo, y en un sentido clínico práctico, es importante señalar que sigue siendo fundamental el seguimiento clínico de los pacientes, con mediciones periódicas tanto de su componente-M como el resto de las inmunoglobulinas séricas y la evaluación de posibles síntomas relacionados, para intentar pesquisar los casos de MM verdadero o aquellos casos de MGUS en transformación.

7. PATOGENIA

7.1. Papel de IL-6 y vía de la ciclina D1

Durante la última década ha quedado demostrado que uno de los factores de crecimiento más importantes para las CPs en el MM es la IL-6, que se acompaña, además, de un aumento en la expresión de la fracción soluble de su receptor. El origen de este aumento y su acción es tanto autocrino (origen en las propias CPs) como paracrino -a partir del estroma medular- y ocurre en respuesta a otras citoquinas como el TNF o al interferón alfa (IFN- α). Así, en etapas iniciales de la enfermedad, las CPs son dependientes de IL-6 para su proliferación, de modo que la suspensión de esta citoquina en estudios *in vitro* se acompaña de una reducción en la tasa proliferativa de las células tumorales y de un aumento de su apoptosis. A medida que la enfermedad avanza, y probablemente como consecuencia de alteraciones adicionales del ciclo celular, esta dependencia de IL-6 se pierde y las CPs son capaces de mantener un ritmo proliferativo elevado aún en su ausencia. Recientemente se ha demostrado que los niveles elevados de IL-6 estimulan la expresión de ciclina D1, con un aumento consecuente en la proporción de CPs reclutadas a ingresar al ciclo celular y, por

Tabla 27-4. Criterios diagnósticos de Mieloma Múltiple

Criterios Mayores

Plasmocitoma en biopsia tisular
Plasmocitosis medular $\geq 30\%$
Cuantificación de la Proteína Monoclonal
IgG $> 3,5$ g/dL
IgA > 2 g/dL
Bence Jones ≥ 1 g/24h

Criterios Menores

Plasmocitosis medular 10 – 29%
Proteína M presente en niveles inferiores a los descritos en criterios mayores
Lesiones osteolíticas
Disminución en las Inmunoglobulinas no comprometidas en el componente M
IgM < 50 mg/dL
IgA < 100 mg/dL
IgG < 600 mg/dL

El diagnóstico se confirma con al menos un criterio mayor y uno menor o tres criterios menores.



tanto, a un aumento en la proliferación celular. Apoyando esta vía se ha encontrado una asociación entre los niveles de expresión de ciclina D1 y la masa tumoral, junto a un incremento en antígenos asociados a proliferación celular –como, por ejemplo, Ki67- y a una mayor inmadurez celular. Por el contrario, se ha descrito variantes de IL-6 con menor afinidad por la gp-130 (constituyente esencial del receptor de IL-6, IL-GR) que se asocian a un "down regulation" en la expresión de ciclina D1, lo que se acompaña a su vez de una menor tasa proliferativa y de un aumento en la apoptosis en las CPs en líneas celulares. Finalmente, resulta interesante la observación de que en casos de MGUS las CPs no tendrían niveles incrementados de IL-6, lo que apoya el papel de esta vía regulatoria en el crecimiento tumoral en esta enfermedad. A nivel clínico resulta interesante que la proteína C reactiva (PCR) es regulada en su producción precisamente por la IL-6, por lo que la medición de este marcador se correlaciona con los niveles de la interleuquina estimuladora y, por lo tanto, de la actividad tumoral, como ya ha sido mencionado.

7.2. Genes supresores de tumores

Existen algunas evidencias preliminares sobre el papel de genes supresores en el caso del MM. Así, se ha encontrado mutación de p53 en un subgrupo de pacientes, aunque con baja frecuencia. Otro gen supresor es p16, que compite con la ciclina D1 en su unión a CDK4/CDK6, inhibiendo la actividad kinasa de este complejo. Esto resulta en un aumento en la defosforilación de pRb (gen de retinoblastoma) y en un aumento del arresto celular en fase G1 (es decir, limita la capacidad proliferativa). La inactivación de este gen, presente en una serie de tumores, ha sido descrita en algunos casos de MM, tanto a nivel estructural (cromosómico) como por hipermetilación, con la consiguiente pérdida de acción represora sobre el complejo ciclina D1/CDKs, como se ha evidenciado tanto en líneas celulares de MM como en casos al momento del diagnóstico. Un tercer gen supresor en estudio es p21, también inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y que contribuyen a mantener pRb en estado defosforilado. Se ha podido demostrar que en la mayoría de los casos de MM este gen se encuentra expresado en forma constitutiva y que esta expresión aumenta con el uso de dexametasona (droga conocidamente inductora de

apoptosis en CPs mielomatosas) y disminuye con niveles elevados de IL-6. Todos estos datos ponen en evidencia la importancia del balance entre el estímulo proliferativo inducido por citoquinas –particularmente IL-6- sobre la vía de las ciclinas, por un lado, y del efecto contrario dado por las proteínas inhibidoras de estas kinasas –como p16 y p21-, por otro, en la regulación del ciclo celular en las CPs del MM.

7.3. Apoptosis de CPs

La apoptosis -muerte celular programada- es un proceso complejo en su regulación. Una de las familias de genes más ampliamente estudiados en los últimos años es la familia de BCL-2, dentro de la cual existen genes con acción pro-apoptótica (BAX, BCL-X_(S)) y otro con función antiapoptosis (BCL-2, BCL-X_(L)). En el caso del MM no está aún bien caracterizado el estatus de esta familia de genes. Sin embargo, se han encontrado diferencias en la expresión de BCL-2 entre CPs de pacientes con MM y MGUS versus las CPs de plasmocitosis reactivas, con menor expresión en estas últimas y mayor expresión en MM en estadios avanzados. Además, recientemente se ha reportado que las CPs de MGUS tendrían un índice apoptótico mayor que en casos de MM. Por otro lado, existe una segunda vía de regulación de apoptosis en MM aparentemente independiente de BCL-2, constituida por la vía de APO/FAS (CD95). Al respecto, se ha podido ver que la apoptosis inducida por el ligando de CD95 (CD95L) se correlaciona con los niveles de CD95 expresados en las CPs en forma independiente del estatus de BCL-2.

7.4. Papel del estroma en las discrasias de CPs

Durante los últimos años se ha puesto especial énfasis en el papel que parece jugar el estroma en MM a través de la acción paracrina de IL-6 (producida por las células dendríticas del estroma), el posible rol de la infección por virus Herpes tipo 8, etc., que exceden el propósito de este capítulo pero sobre los que debemos mantener atención en los próximos años.

8. TRATAMIENTO

El detalle del tratamiento en esta enfermedad es complejo y excede los objetivos de esta



publicación, por lo que nos remitiremos a un resumen conceptual de los elementos más importantes:

Terapia de apoyo. Considerando la naturaleza crónica y hasta ahora no curable de esta enfermedad y las múltiples alteraciones clínicas que puede producir, resulta fundamental la evaluación constante y el tratamiento de los dolores óseos y fracturas en hueso patológico, anemia, hipercalcemia, etc.

Tratamiento citotóxico. Los pacientes inicialmente asintomáticos usualmente tienen una masa tumoral relativamente baja y una velocidad de progresión lenta. En este grupo no se ha demostrado un beneficio en términos de mediana de supervivencia con tratamiento citotóxico precoz. Por esta razón en etapas iniciales de la enfermedad sólo está indicado un seguimiento cercano, usualmente evaluando parámetros sencillos como hemograma y cuantía del componente M mediante una electroforesis de proteínas. Por el contrario, en aquellos pacientes sintomáticos y/o con enfermedad de alta masa tumoral o progresiva está justificado el tratamiento, dado que mejora en forma significativa tanto la calidad como la mediana de supervivencia. El tratamiento considera dos formas esencialmente distintas como son:

Dosis convencionales. Las drogas clásicamente más utilizadas son la combinación de Melfalán (usualmente 0,2 mg/Kg) y Prednisona (usualmente 2 mg/Kg) dados durante 4 días cada 4 a 6 semanas. Esta terapia suele ser relativamente bien tolerada y poco tóxica y permite un buen control de la enfermedad tanto en términos subjetivos como objetivos. Así, alrededor de un 50-70% de los pacientes logra una disminución en su sintomatología después de 3 a 6 meses de tratamiento, lo que suele acompañarse de una reducción en la masa tumoral, pero muy infrecuentemente de una desaparición del componente M, que se mantiene evidente en la mayoría de los casos. En aquellos casos que no responden a estas medidas o que se presentan con alteraciones agudas como insuficiencia renal una segunda alternativa consiste en quimioterapia endovenosa. Si bien existen diferentes protocolos en este sentido, una de las combinaciones de drogas más utilizadas son la Vincristina, Adriamicina y Dexametasona (VAD), que resulta en un rápido alivio sintomático en hasta dos tercios de los casos, con escasa toxicidad a la

médula ósea normal.

Dosis altas y trasplante de médula ósea. Dado que el incremento menor de dosis de agentes alquilantes no ha logrado un impacto mayor en la sobrevida de los pacientes, se ha intentado un aumento mayor –en dosis capaces de producir aplasia medular– apoyado por una reconstitución de la médula ósea a través de trasplante de progenitores hematopoyéticos autólogos (recolectados del mismo paciente previamente). Así, la experiencia del grupo francés demostró recientemente que este tipo de terapia es capaz de lograr una remisión completa de la enfermedad (ausencia de plasmocitosis medular y desaparición del componente M) en hasta un 50% de los pacientes, logrando una significativa mayor sobrevida comparado con dosis convencionales. Esto ha significado que en pacientes jóvenes (hasta 60 o incluso 65 años) con enfermedad agresiva esta sea, actualmente, la alternativa de elección en casi todos los grupos clínicos. Con respecto al trasplante alogeneico –esto es, a partir de un donante histocompatible relacionado– la experiencia es menor esencialmente por la edad de la mayoría de los pacientes (lo que disminuye la probabilidad de disponer de un donante) y por la toxicidad propia de él. Sin embargo, tanto la ausencia de contaminación tumoral de la médula ósea injertada como el posible efecto de ésta sobre las CPs tumorales residuales (efecto “injerto contra mieloma”) han logrado la curación de un reducido número de pacientes y puede ser una alternativa a evaluar en grupos seleccionados de pacientes.

Otras drogas. Otras vías terapéuticas interesantes de cara al futuro lo constituyen drogas que modulan la respuesta inmune o la actividad celular como respuesta a las CPs tumorales. En esta línea de pensamiento están drogas como la talidomida, los interferones y la producción de vacunas anti-idiotipos específicos para cada paciente, que por su extensión y complejidad no es posible desarrollar en este capítulo.

LECTURAS SUGERIDAS

Hallek, M.; Bergsagel, P.L.; Anderson, K.C., “Multiple myeloma: increasing evidence for multistep transformation process”, *Blood* 1998;91:3-21.



Kawano, M.M.; Mihara, K.; Huang, N. et al., "Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal-cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis", *Blood* 1995;85:487-94.

Klein, B.; Zhang, X.J.; Lu, Z.Y.; Bataille, R., "Interleukin-6 in human multiple myeloma", *Blood* 1995;85:863-72.

Kyle, R.A., "Monoclonal gammopathies" en **Clinical Immunology: Principles and Practice**, (Rich, R.R.; Fleischer, T.; Schwartz, B.D.; Shearer, W.T.; Strober, W., Editores). Mosby-Year Book, Inc USA, capítulo 116, pp. 1801-1811, 1996.

Kyle, R.A., "The gammopathies", *Seminars in Hematology* 1995;32(1):4-79.

Kyle, R.A.; Therneau, T.M.; Rajkumar, S.V. et al., "A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance", *N Engl J Med* 2002;346:564-9.

Lemoli, R.M.; Martinelli, G.; Zamagni, E. et al., "Engraftment, clinical and molecular follow-up of patients with multiple myeloma who were reinfused with highly purified CD34+ cells to support single or tandem high-dose chemotherapy", *Blood* 2000;95:2234-9.

Lichstentein, A.; Tu, Y.; Fady, C. et al., "Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells", *Cell Immunol* 1995;162:248-55.

Longo, D.L., "Plasma cell disorders" en **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 14ª Ed (Fauci, A.S.; Braunwald, E.; Isselbacher, K.J.; Wilson, J.D.; Martin, J.B.; Kasper, D.L.; Hauser, S.J.; Longo, D.L., Editores), capítulo 114, pp. 712-718, McGraw-Hill, USA, 1998.

Tricot, G., "New insights into role of microenvironment in multiple myeloma", *Lancet* 2000;355:248-50.

Vescio, R.A.; Hong, C.H.; Cao, J. et al., "The hematopoietic stem cell antigen, CD34, is not expressed on the malignant cells in multiple myeloma", *Blood* 1994;84:3283-90.





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 28

ENFERMEDADES ORALES DE ORIGEN INMUNOLÓGICO

Benjamín Martínez R.

-
- 1. Introducción**
 - 2. Reacciones de hipersensibilidad orales**
 - 3. Manifestaciones orales de inmunodeficiencias**
 - 3.1. Candidiasis oral en infección por VIH
 - 3.2. Leucoplasia pilosa
 - 3.3. Sarcoma de Kaposi
 - 4. Enfermedades autoinmunes orales**
 - 4.1. Síndrome de Sjögren
 - 4.2. Úlcera oral recurrente (aftas)





RESUMEN

La mucosa oral, inclusive la encía, puede presentar distintas lesiones de origen inmunológico, ya sea expresión por inmunodeficiencias, reacciones de hipersensibilidad, o manifestaciones de enfermedades autoinmunes. Muchas otras enfermedades bucales tienen participación del sistema inmune (por ejemplo las enfermedades periodontales tales como periodontitis y gingivitis) pero solamente nos referimos en este capítulo a aquellas que tienen un origen netamente inmunológico, algunas de ellas son muy frecuentes en la población como son las aftas (vulgarmente llamadas "fuegos"), otras ocasionan complicaciones bucales severas (síndrome de Sjögren) y otras han adquirido gran importancia en los últimos años (Sida y sus manifestaciones bucales).

1. INTRODUCCIÓN

Muchas de las enfermedades de la boca, incluyendo las que comprometen dientes, huesos maxilares, mucosa oral y glándulas salivales, tienen un componente inmunológico que puede explicar su origen, la forma como se desarrollan, cómo se defiende el organismo ante ellas, o por qué algunos pacientes presentan grados leves y otras grandes alteraciones. El gran avance experimentado por la inmunología básica no ha dejado de afectar el mejor conocimiento que se tiene de enfermedades tales como caries, quistes de los maxilares, cáncer oral y aftas.

Indudablemente que no se puede revisar todas las enfermedades de la boca en un capítulo, por lo cual hemos seleccionado aquellas condiciones patológicas más interesantes para el inmunólogo clínico y que pueden estar comprometiendo la boca. En este capítulo se describirán las manifestaciones orales de enfermedades de origen inmunológico; se han agrupado en reacciones de hipersensibilidad, enfermedades autoinmunes e inmunodeficiencias.

2. REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD ORALES

Las reacciones alérgicas no son extrañas de presentarse en la mucosa oral, y lamentablemente muchas veces no son reconocidas por el especialista, ya que adoptan un aspecto clínico variado el cual puede ser una úlcera, vesícula, lesión blanca,

roja o mezcla, blanco y roja, roja y ulceración.

Las sustancias causales de hipersensibilidad, pueden ser cualquier sustancia que esté o no en contacto con la mucosa oral, y la gran mayoría provocan una hipersensibilidad tardía o tipo IV de la clasificación de Gell y Coombs. Es muy raro encontrar otro tipo de reacción de hipersensibilidad en boca, tal como la reacción I o anafiláctica, pero los tipos II y III prácticamente no se presentan en mucosa oral.

La reacción de hipersensibilidad tipo IV (ver capítulo 21) es desencadenada en la boca por diversas sustancias tales como las que se encuentran en obturaciones de dientes como por ejemplo componentes de las amalgamas (plata, mercurio, estaño, cobre), de prótesis dentarias (níquel, cromo, cobalto), de otras coronas dentarias (níquel, paladio), o sustancias en contacto con la mucosa, que pueden ser alimentos (naranja, chocolate, nuez, almendra, flúor presente en el agua, etc.). También cosméticos tales como lápiz labial. Para establecer el diagnóstico es necesario solicitar test de hipersensibilidad a materiales dentales y alimentos. En el caso del producto dental al cual el paciente pudiera haberse sensibilizado, debiera ser reemplazado, por ejemplo las amalgamas por resinas, coronas de metales no nobles por metales nobles. En general la cerámica es muy poco alergizante y pudiera preferirse en estos pacientes pero tiene un costo elevado, la otra alternativa son resinas compuestas pero también se ha descrito hipersensibilidad a este material. En el caso de los alimentos sólo nos queda aconsejar que el paciente evite ingerir dicho alimento. En alergias a pró-



tesis metálicas dentales, o pacientes con alergia a níquel y que poseen en la boca prótesis metálicas, la alternativa es usar implantes de titanio, las que tienen un elevado costo.

Las manifestaciones clínicas que se pueden observar en pacientes con alergias a productos dentales son variadas: úlceras múltiples en boca, que aparecen constantemente, similares a úlceras orales recurrentes; lesiones dolorosas, con úlceras que son de dos a seis u ocho milímetros, rodeadas por halo rojizo, que aparecen constantemente. Esto no significa que las aftas (también llamadas úlceras orales recurrentes) sean de origen alérgico, pero sí en algunos pacientes puede demostrarse una causa de hipersensibilización, y estos pacientes se pueden mejorar por completo de sus úlceras. Las aftas (ver punto 4.1) no tienen una etiología clara pero se cree que diversos factores inmunológicos, tales como inmunodeficiencia celular, u otros pueden contribuir a su desarrollo como estrés, factores hormonales, alimentos, alteraciones hematológicas, y puede que en muchos pacientes coincidan varios factores. Existe casi completa unanimidad respecto a que la causa no es viral, bacteriana o de origen microbiológico.

Existen pacientes que presentan lesiones de hipersensibilidad en contacto con amalgamas, o grandes obturaciones, en estos casos las lesiones han sido llamadas reacciones liquenoides, y se han confundido frecuentemente con liquen plano. El aspecto clínico de estas lesiones son manchas rojas con halo blanquecino, o estrías blancas en la periferia (estrías de Wickham descritas en liquen plano). Ambas lesiones han sido difíciles de distinguir ya que ni clínica ni histológicamente pueden diferenciarse por completo; la evaluación del paciente, en conjunto con la biopsia de la lesión, el test de hipersensibilidad y la evolución pueden llevar a establecer su origen, y su mejor tratamiento. El liquen plano tiene un componente psicosomático importante y muchos pacientes tienen cancerofobia al igual como ocurre en el síndrome de boca urente, entidad en la cual se examina al paciente y no se encuentra ninguna alteración patológica, pero el paciente se queja de ardor en lengua, labios y a veces en mejillas. Estos pacientes en raras ocasiones pueden tener el síndrome de boca urente por hipersensibilidad y, por lo tanto, es conveniente descartar los agentes que se han mencionado anteriormente.

Como se ha señalado a veces los pacientes con reacciones de hipersensibilidad orales pueden presentar úlceras tipo aftas, otros presentan lesiones

idénticas o similares a liquen plano, otras lesiones blancas tipo leucoplasias, o rojizas tipo candidiasis eritematosa, o síndrome de boca urente y que corresponden a hipersensibilidad. El tratamiento debe iniciarse después que se ha establecido el agente al cual se ha sensibilizado el paciente, suprimir dicha sustancia y en caso de ser necesario administrar corticoides vía sistémica o tópica, lográndose un rápido alivio.

3. MANIFESTACIONES ORALES DE INMUNODEFICIENCIAS

La mayoría de los pacientes con inmunodeficiencias presenta lesiones orales en algún momento de su evolución, desde inmunodeficiencias inespecíficas, a inmunodeficiencias celulares o humorales. Debido a la importancia de la infección por HIV sólo se describirá ésta (ver capítulo 30).

Desde el inicio de la epidemia por HIV se ha observado frecuentemente el compromiso de la boca por diferentes infecciones oportunistas especialmente ocasionadas por hongos (Cándida) y virus (Epstein-Barr, Herpes). Además de la importancia que existe en reconocer o detectar un individuo infectado, lo cual eventualmente se puede realizar por las manifestaciones que se observan en la boca, también es importante diagnosticar y tratar adecuadamente las lesiones que se presentan ya que pueden ser causa de severa morbilidad.

Otro aspecto importante en las lesiones bucales asociadas con HIV, es que algunas de ellas están asociadas con una evolución más corta, en otras palabras, cuando se presenta candidiasis y leucoplasia pilosa, se ha observado que los individuos HIV positivos con dichas lesiones llegan antes a SIDA.

Clasificación de las lesiones orales asociadas con infección por HIV (como fue acordado en la Reunión del Grupo de Clasificación de la C.E.E. para los problemas orales relacionadas con la infección por HIV, realizada en Londres, en septiembre de 1992). Todas las lesiones en los tres Grupos aparecen en orden alfabético.

3.1. Candidiasis oral en infección por VIH

La infección por HIV frecuentemente, ya sea en individuos asintomáticos o con SIDA, se acompaña frecuentemente de infección por Cándida en



Tabla 28-1. Clasificación de las lesiones orales en la infección por HIV

Grupo I. Lesiones fuertemente asociadas con infección por HIV

Candidiasis: Eritematosa, Seudomembranosa
Enfermedad periodontal: Eritema gingival linear, Gingivitis Necrotizante (ulcerativa),
Periodontitis Necrotizante (ulcerativa)
Leucoplasia pilosa
Linfoma no Hodgkin
Sarcoma de Kaposi

Grupo II. Lesiones menos frecuentemente asociadas con infección por HIV

Estomatitis necrotizante (ulcerativa)
Enfermedad de Glándula salival
 Boca seca por disminución de flujo salival
 Tumoración uni o bilateral de glándulas salivales mayores.
Hiperpigmentación melanótica
Infecciones bacterianas: *Mycobacterium avium-intracelular*, *Mycobacterium tuberculosis*
Infecciones virales: Virus Herpes simplex, Virus Papiloma humano (lesiones tipo verrugas),
 Condiloma acuminado, Hiperplasia epitelial focal, Verruga vulgar, Virus varicela
 zoster, Herpes zoster, Varicela
Púrpura trombocitopénica
Ulceración NOS (Sin otra especificación, del inglés: "Not Otherwise Specified")

Grupo III. Lesiones observadas en la infección por HIV

Aftas recurrentes
Alteraciones neurológicas: Parálisis facial, Neuralgia del trigémino
Angiomatosis epitelioides (bacilar)
Enfermedad por arañazo de gato
Infecciones bacterianas: *Actinomyces israelii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,
 Infecciones por hongos diferentes de candidiasis: *Cryptococcus neoformans*,
 Geotrichum candidum, *Histoplasma capsulatum*, *Mucoraceae* (*mucormycosis*/
 cigomycosis), *Aspergillus flavus*
Infecciones virales: Citomegalovirus, Molusco contagioso
Reacciones a drogas (ulcerativa, eritema multiforme, liquenoide, epidermolisis tóxica).

la boca. Esta candidiasis puede ser eritematosa, como al parecer, empieza en muchos casos, con enrojecimiento del paladar duro y dorso de lengua, en la cual se observa área depapilada hacia el centro de ella, generalmente indolora. En la variedad pseudomembranosa se presentan manchas blanquecinas, que se pueden desprender al raspado, dejando una superficie roja, a veces sangrante. Mucho menos frecuente es la variedad hiperplásica, que generalmente ocurre en cara interna de mejillas. La otra forma de candidiasis, es

queilitis angular, como zona descamativa en las comisuras, con enrojecimiento. Cuando se observe alguna de estas presentaciones de candidiasis en un individuo joven y no hay algún factor predisponente sistémico o localizado para explicar la presencia del hongo en la boca, debiera solicitarse exámenes para descartar la infección por HIV. Los factores que favorecen el desarrollo de la candidiasis bucal son muchos, y entre ellos destacan los siguientes: ingestión previa de antibióticos o corticoides, déficit nutricionales,



alteraciones endocrinas, neoplasias malignas, y otras alteraciones inmunológicas distintas de la ocasionada por HIV. La candidiasis también es una condición frecuente en los extremos de la vida, recién nacidos y ancianos, portadores de prótesis (especialmente de acrílico), e individuos con xerostomía (sequedad de la boca). Se ha demostrado que individuos con HIV, asintomáticos, y que presentan candidiasis, desarrollarán signos de SIDA al cabo de tres meses, en el 59% de ellos. También se sabe que cerca del 70% de individuos con candidiasis oral tienen recuento de LT CD4 menor a 200 células/ μ L. El diagnóstico de la candidiasis generalmente se puede realizar por su aspecto clínico, pero se puede complementar con frotis y tinción de PAS, o cultivo. El tratamiento de la candidiasis oral es generalmente tópico: nistatina, de 500.000 UI, tres o cuatro veces al día (disolver y después ingerir), ojalá que por lo menos durante un mes en individuos HIV positivos o con SIDA. Pueden utilizarse otros antimicóticos tal como fluconazol pero es más costoso.

3.2. Leucoplasia pilosa

En 1984 Greenspan y colaboradores describieron esta nueva lesión en patología bucal, la cual es una mancha blanca, corrugada en el borde de lengua, bilateral, que no se desprende al raspado y ocasionada por el virus Epstein-Barr (VEB) que se observa más frecuentemente en individuos HIV positivos, pero que también ha sido descrita en otras inmunodeficiencias. Esta mancha blanca también se caracteriza porque se encuentran hifas de cándida en la superficie, pero es de origen viral, observándose en las biopsias, hiperplasia epitelial, con marcada paraqueratosis, células similares a coilocitos (en ellas se puede demostrar presencia de viriones de VEB), de citoplasma claro con cuerpos de inclusión intranucleares, acantosis, y ausencia de infiltrado inflamatorio. El diagnóstico de esta lesión también puede realizarse con frotis citológico teñido con Papanicolau. Esta lesión no requiere tratamiento, pero se ha observado que desaparece con algunos antivirales, y su importancia es que está asociada a HIV en la mayoría de los pacientes, y que en aquellos casos que se presenta, se observa una evolución a SIDA más rápida.

3.3. Sarcoma de Kaposi

El Sarcoma de Kaposi (SK) es la neoplasia intraoral más común que se observa en el SIDA y

generalmente se presenta en el paladar duro, como una mancha violácea o rojiza de límite difuso, indolora, que en el 20% de los casos puede ser la primera manifestación. Esta neoplasia a veces presenta un aspecto tumoral, pero muchas veces se observa como una mácula rojiza. En el primer caso tiene un pronóstico peor. La casi totalidad de casos observados en Chile, con SK, han sido hombres homosexuales, y al parecer es raro de observar en otros grupos de riesgo. Este tumor es multifocal y en la boca puede observarse varias lesiones en paladar y/o encía, aunque lo más frecuente es que el paciente tenga otras lesiones en la piel de las extremidades superiores, tórax, o piel de la cara. Histológicamente este tumor presenta una proliferación de células fusadas, más o menos arremolinadas, con formaciones de múltiples espacios vasculares, con células endoteliales atípicas, y abundante hemorragia antigua y reciente. Lamentablemente cuando se observa, son pocos los meses de vida que le quedan al paciente, y es también poco lo que se puede hacer, a no ser que el paciente esté en un programa intensivo de terapia anti-retroviral.

4. ENFERMEDADES AUTOINMUNES ORALES

Las enfermedades autoinmunes pueden afectar la boca, y la más conocida de ellas es el Síndrome de Sjögren, pero existen muchas otras que provocan lesiones severas como son el pénfigo, penfigoide, y en otras que la posible naturaleza de la lesión se cree que es autoinmune. A continuación se describirán el Síndrome de Sjögren y las aftas, debido a que son las más frecuentes en la población.

4.1 Síndrome de Sjögren

El Síndrome de Sjögren (SS) consiste en una tríada de xerostomía, queratoconjuntivitis sicca (sequedad de la conjuntiva ocular) y otra enfermedad autoinmune, la mayoría de las veces Artritis reumatoídea. Cuando se presenta sin otra enfermedad autoinmune se conoce como "Síndrome Sicca", o SS primario, y el otro caso SS secundario, o sea con artritis reumatoídea. Para establecer el diagnóstico de (SS), según criterio europeo, deben presentarse 4 de las 6 siguientes características, siendo requisito la presencia de (d) ó (e).



- a) Uno de tres síntomas oculares
¿Ha tenido durante los últimos tres meses, en forma persistente, molestias por sus ojos secos?
¿Tiene en forma recurrente sensación de arenilla en los ojos?
¿Utiliza sustitutos de lágrimas más de tres veces al día?
- b) Uno de tres síntomas bucales
¿Ha tenido durante los últimos tres meses, en forma persistente, sequedad de la boca?
¿Ha tenido tumoración recurrente o persistente de sus glándulas parótidas?
¿Frecuentemente toma líquidos para poder deglutir alimentos secos?
- c) Test de Schirmer (menor o igual a 5 mm/5 min). El test de Schirmer es un test oftalmológico para la evaluación de la producción de lágrimas, en el cual se coloca un papel filtro en ambos ángulos internos del ojo y se observa su humectación al cabo de 5 minutos. Si ella es menor o igual a 5 mm es sugerente de xeroftalmía y podría estar asociada a síndrome de Sjögren, aunque existen muchas causas de ella al igual que en la xerostomía. El valor normal es de 10 mm de humedad para cada ojo después de 5 minutos.
- d) Biopsia de glándula salival labial con “score” mayor o igual a 1 foco/mm² (Un foco: infiltrado de al menos 50 linfocitos periductales).
- e) Positivo para alguno de los siguientes autoanticuerpos: Factor reumatoideo (FR), Anticuerpos antinucleares, (ANA), SS-A, SS-B
- f) Positivo en alguno de los siguientes exámenes: cintigrafía, sialografía, flujo salival no estimulado.

El SS es más común en mujeres, y muchos pacientes se presentan con síntomas artríticos. La queratoconjuntivitis se manifiesta como sequedad y sensación de arenilla en los ojos. Las principales características orales son: disminución de la saliva, dificultad en la deglución y masticación, anomalías en la sensación del gusto y una mucosa oral lisa y lustrosa. Algunos pacientes pueden presentarse con tumoración bilateral de las glándulas

salivales, especialmente de la parótida.

Además del criterio europeo para el diagnóstico de SS, existe el llamado de San Diego, en que el diagnóstico se basa en presencia de hallazgos objetivos (compromiso ocular: test de Schirmer o rosa de bengala; compromiso oral: flujo salival, sialografía, scintigrafía), y debe incluir biopsia de glándulas salivales labiales, y además estudio serológico positivo (SS-A, SS-B, FR, ANA).

Para establecer el compromiso ocular se puede evaluar el flujo de las glándulas lacrimales con el test de Schirmer (explicación en el punto C). En cuanto a la xerostomía debe medirse el flujo salival, el cual en estos pacientes se hace normalmente con estimulación con ácido cítrico al 5%. De ayuda es la biopsia de glándulas salivales menores, normalmente de cara interna del labio inferior, donde se toman tres o cuatro lobulillos glandulares y se demuestra infiltrado focal linfocitario (más de un foco con 50 células mononucleares, principalmente linfocitos), periductales, que causan reemplazo de acinos glandulares. Otro estudio que se puede hacer es la sialografía (inyección de medio de contraste, especialmente en parótidas), aunque en la actualidad se prefiere la cintigrafía de las glándulas salivales. Tiende a utilizarse cada vez más el estudio de anticuerpos: SS-A, el cual está presente en el 70-80% de los pacientes con SS primario y menos del 10% de SS secundario. El anticuerpo SS-B, por otra parte se encuentra en el 50-70% de los SS primarios y menos del 5% de los casos secundarios.

La causa del SS es desconocida, pero pueden existir algunos factores genéticos y últimamente se cree que puede estar relacionado a infección por VEB. Cerca del 80 a 90% de los casos se observan en mujeres, cercanas a los 40 años, y en 15% de los pacientes que tienen artritis reumatoidea se observa SS. El principal síntoma oral es la xerostomía, causada por la disminución de la saliva, que a su vez ocasiona fácilmente infección por Cándida, en la mucosa del paladar y dorso de lengua, y también queilitis angular. Muchas veces la lengua, especialmente en casos avanzados, se observa depapilada, y que arde. La falta de saliva también favorece el desarrollo de caries cervicales, dificulta la alimentación, e impide el uso adecuado de prótesis removibles. Cerca de un tercio de los pacientes pueden tener tumoración de las parótidas en el curso de la enfermedad, generalmente bilateral pero no dolorosa, y recurrente. Debido a la xerostomía no es infrecuente que



se produzca además la infección glandular. La sialografía, inyección de medio de contraste en el conducto de Stensen, permite detectar sialectasia puntiforme y no se observa la trama ductal normal, por lo que se observa un aspecto de "cerezo en flor" o de "frutos sin ramas", pero lo más importante es determinar la presencia de zonas radiopacas de más de 2 mm. También con cintigrafía de Tecnecio 99 se puede demostrar retardo en la captación y retardo en el vaceamiento.

El paciente con SS también presenta queratoconjuntivitis, y generalmente más que el dentista, es el oftalmólogo quien realiza o sospecha primero del diagnóstico. La queratoconjuntivitis es debido a la xeroftalmía, falta de lágrimas, y en el SS no sólo estas glándulas están afectadas sino también otras como las que se encuentran en cualquier mucosa (respiratoria, esófago, genital, etc.). Las manifestaciones oculares son menores en la mañana y aumentan en la tarde, con sensación de arenilla, o cuerpo extraño en los ojos.

En los exámenes de laboratorio se observan una serie de alteraciones tales como aumento de la velocidad de sedimentación, aumento de los niveles de inmunoglobulinas, especialmente IgG. El estudio de autoanticuerpos puede ser de utilidad y en los últimos años se está utilizando el factor reumatoideo, positivo en el 75% de los casos. Anti-SS-A y anti-SS-B, son dos anticuerpos que se encuentran especialmente en pacientes con SS primario.

La histopatología demuestra que todas las glándulas salivales están afectadas, y por esta razón se utiliza biopsia de glándulas salivales menores, especialmente desde la cara interna del labio inferior, de donde se extirpan tres a cinco lobulillos glandulares, y si se encuentran focos de linfocitos y plasmocitos con 50 o más células cada uno, se confirma el diagnóstico de SS (en una área de 4 mm² de tejido glandular). Entre más focos de células inflamatorias se observan más severo es el cuadro, y dichos focos se asocian con un mayor reemplazo de acinos, mayor fibrosis y enfermedad más severa.

El tratamiento del SS es de apoyo en base a lágrimas y saliva artificiales, ya que no existe ningún tratamiento definitivo. Los sialogogos tales como pilocarpina pueden estimular la secreción salival. También se utilizan corticoides pero el tratamiento debe realizarlo el médico reumatólogo. El dentista puede colaborar evitando, tratando o ayudando a prevenir las complicaciones que aparecen en la boca, tales como candidiasis, caries

cervicales y enfermedad periodontal.

4.2 Úlcera oral recurrente (aftas)

a) Etiopatogenia

La úlcera oral recurrente, afta, o estomatitis aftosa recurrente, y vulgarmente llamada "fuego", constituye una alteración de la mucosa de revestimiento de la boca. Diferentes estudios han demostrado una frecuencia entre 5 y 66% de la población, dependiendo del grupo en estudio. La mayoría de los autores distingue factores predisponentes y factores etiológicos en el origen del afta. Pero la realidad hasta el momento es que la etiología exacta en la mayoría de los casos no se establece, por lo cual es difícil tratar de explicar cómo diferentes factores etiológicos pueden llegar a ocasionar la ruptura del epitelio, y especialmente en algunas ubicaciones de la boca, tal como en fondo de vestíbulo, cara interna de los labios, piso de boca, paladar blando, o sea donde se encuentra la denominada mucosa de revestimiento, pero generalmente no se presentan estas úlceras en la mucosa del dorso de la lengua, la encía o el paladar duro. De todas maneras para entender mejor como ocurre esta lesión es importante revisar los factores predisponentes, que en muchos casos puede explicar el origen del afta y demostrar en algunos casos factores que pueden corregirse y mejorar o disminuir la frecuencia de las úlceras. La mayoría de los pacientes que presentan aftas son en general sanos, pero debe recordarse que a veces se asocia esta lesión con algunas condiciones generales tales como la enfermedad de Behçet, neutropenia cíclica, síndrome de faringitis y fiebre periódica, déficit nutricionales, alteraciones gastrointestinales tales como colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, y en algunas inmunodeficiencias incluyendo SIDA.

Varios estudios han demostrado, especialmente en Inglaterra y Estados Unidos, déficit de hierro, ácido fólico, o vitamina B12, y se estima que aproximadamente el 20% de los pacientes con aftas presentan este tipo de alteraciones. Debe sospecharse de dichas alteraciones en pacientes con aftas que empeoran, o sea que presentan las úlceras cada vez con más frecuencia o mayor grado de severidad.

Algunos pacientes con aftas correlacionan la presencia de las úlceras con algunos alimentos, no existen publicaciones con suficiente número de casos que corroboren dicha aseveración, y ra-



ramente cambios en la dieta alimenticia producen algún beneficio. También existe la posibilidad de reacción de hipersensibilidad a algún antígeno, que estaría ocasionando probablemente un cuadro similar a dermatitis por contacto, o de atopía en algunos pacientes. En algunas mujeres se ha observado que las aftas tienen un ciclo relacionado con la fase lútea del ciclo menstrual, presumiblemente asociado con los cambios en los niveles de progestágenos. También existen factores locales que predisponen a la aparición de las aftas tales como trauma y en algunas personas predispuestas a la aparición de estas lesiones, un trauma mínimo puede desencadenar la lesión, en una mucosa no queratinizada; esto se relaciona también con la menor frecuencia de aftas que ocurre en fumadores, y la ausencia casi completa de úlceras en la mucosa oral queratinizada. De todas maneras es claro que las aftas y su etiología fundamental no está aún clara, y en la actualidad la mayoría de los autores concuerda que existe una alteración mediada por un mecanismo inmunológico, pero no existe tampoco acuerdo del mecanismo inmunopatogénico que ocasiona la ulceración, que explique la intermitencia de las lesiones, la naturaleza autolimitante de las úlceras, y la falta para responder ante drogas inmunomoduladoras.

Los estudios histopatológicos y mediante técnicas de inmunohistoquímica han permitido demostrar la presencia de linfocitos grandes granulares (células NK) y de linfocitos TCD4+, en la etapa pre-ulcerativa, mientras que la fase de ulceración está asociada con la aparición de linfocitos TCD8+, y estos son reemplazados por células TCD4+, en la fase de reparación. También se encuentran neutrófilos, pero a diferencia de la enfermedad de Behçet donde ellos están hiperactivos, en el afta no se observa alteración en la función quimiotáctica. En la fase ulcerativa los antígenos HLA de clase I y II se encuentran en las células basales del epitelio y posteriormente en todos los estratos epiteliales debido probablemente a interferón gamma (IFN γ) liberado por los linfocitos T. Estos antígenos pueden servir así de target para que las células epiteliales sean atacadas por linfocitos CD8+, y es posible observar en biopsias de pacientes con aftas la presencia, más allá de lo normal, de linfocitos intraepiteliales, en el estrato espinoso. De todas maneras el mecanismo inmune, que inicialmente se creyó que era mediada por células, parece ser más probable que involucre un mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por linfocitos

B, con participación de complejos inmunes, que incluso se ha observado elevados en algunos pacientes, pero no precisamente en aquellos que tienen aftas menores. Se ha observado depósito de complejos inmunes en biopsias, a nivel del estrato espinoso, y hay algunas evidencias de vasculitis por complejos inmunes que conlleva un depósito de inmunoglobulinas y complemento.

Uno de los aspectos que durante muchos años se ha investigado es la asociación del afta con algún microorganismo, especialmente de origen bacteriano, y en concreto del grupo de los estreptococos, ya sea como patógeno directo o como estímulo antigénico que llevaría a la generación de anticuerpos que podrían tener una reacción cruzada con el epitelio. Inicialmente en el año 1963 se demostró que sería un *Streptococcus sanguis* pero posteriormente se señaló que sería de la cepa *Streptococcus mitis*, pero estudios siguientes no han demostrado que haya diferencias entre los sujetos con aftas y controles en cuanto a su respuesta mitógena linfocitaria. No se ha demostrado la presencia de antígenos y viriones del virus herpes en el afta y es claro que los tratamientos del afta que han empleado antivirales no tienen ningún beneficio.

b) Características clínicas

Las úlceras orales recurrentes pueden clasificarse, de acuerdo a Lehner, en afta menor, afta mayor y úlceras herpetiformes. La asociación con lesiones extraorales de cualquiera de las variedades anteriores, en la cual se observa compromiso de mucosa genital, piel, y a veces articulaciones y alteraciones neurológicas se denomina síndrome Behçet.

Debido a que no hay ningún otro medio para hacer el diagnóstico del afta, diferente del reconocimiento de sus características clínicas, es extremadamente importante que el clínico que examina la mucosa bucal, establezca este diagnóstico correctamente. Esta lesión se caracteriza por la recurrencia de una o más úlceras de forma redondeada, dolorosa, a intervalos de unos pocos días o de meses. Generalmente se inicia en la niñez o adolescencia y persiste durante varios años.

Lamentablemente no existen suficientes publicaciones que permitan caracterizar los distintos aspectos clínico-patológicos de las distintas variedades de afta y en general uno encuentra publicaciones que relatan características para todos los tipos de aftas y parecería conveniente investigar



si existen algunos factores importantes en la etiología, la histopatología y el tratamiento en los distintos tipos de aftas.

Afta menor. Es la variedad más común, cerca del 80% de todas las úlceras orales recurrentes, y se caracteriza por úlceras, entre 1 y 5, redondas u ovaladas de menos de 10 mm de diámetro con una pseudomembrana blanco-grisácea y rodeada por un halo eritematoso. Generalmente este tipo de úlcera se presenta en cara interna del labio, mejilla y piso de boca, y excepcionalmente puede encontrarse en la encía y el dorso de la lengua. Estas lesiones sanan dentro de 10-14 días sin dejar cicatriz. Al parecer esta variedad es un poco más frecuente en mujeres. Muchas veces antes de presentarse existe una fase prodrómica caracterizada por parestesia en el sitio que posteriormente aparece la ulceración.

Afta mayor. Son úlceras muy dolorosas, pero afortunadamente menos frecuentes que el afta menor. El paciente generalmente tiene entre 1 y 10 úlceras, miden entre 10-30 mm y también recidivan con frecuencia. Afectan especialmente el paladar blando, mejillas, cara interna de los labios, pudiendo demorar hasta 6 semanas en sanar y dejando una cicatriz a diferencia de lo que ocurre en el afta menor. Esta úlcera se puede distinguir del afta menor, además del tamaño, por que tiene un aspecto crateriforme, y tendencia a presentar bordes levantados, y al igual que el afta menor también tiene un exudado fibrinoso amarillento-grisáceo, y una periferia rojiza.

Úlceras herpetiformes. Esta variedad de úlcera tiene una frecuencia similar con el afta mayor. Se caracteriza por la presencia de hasta 100 úlceras pequeñas, que pueden afectar de preferencia la mucosa de revestimiento, y ocasionalmente otras zonas, y se inicia como pequeñas úlceras del tamaño de una cabeza de alfiler, que pueden ir aumentando de tamaño y coalesciendo entre ellas. Puede haber una permanencia de las úlceras en la cavidad oral, pero generalmente sanan a los 14 días. A veces puede haber disfagia, y al igual que en el afta mayor, podría haber pérdida de peso por la dificultad para alimentarse.

LECTURAS SUGERIDAS

Daniels, T.E., "Sjögren's syndrome: clinical spectrum and current diagnostic controversies", *Adv Dent Res*; 10: 3-8, 1996.

Daniels, T.E., Fox, P.C., "Salivary and oral components of Sjögren's syndrome", *Rheum Dis Clin North Am.*; 18:571-589, 1992.

Eversole, L.R., "Viral infections of the head and neck among HIV- seropositive patients", *Oral Surg oral Med Oral Pathol*; 73: 155-163, 1992.

Fox, R.I., "Guest Editor in Sjögren's Syndrome", *Rheumat Dis Clin Am*; 18: 507-711, 1992.

Glick, M. et al., "Oral manifestations associated with HIV disease as markers for immune suppression and AIDS", *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*; 69:683-687, 1993.

Glick, M., **Dental Management of patients with HIV**, Quintessence, Chicago, 1994.

Greenspan, J.S., Greenspan, D., "Oral hairy leukoplakia: diagnosis and management", *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*; 67: 396-403, 1989.

Greenspan, J.S., Greenspan, D., **Oral Manifestations of HIV Infection**, Quintessence, Chicago, 1995.

Greenspan, D.; Greenspan, J.S.; Pindborg, J.J.; Schiodt, M., **AIDS and the Dental Team**. Munksgaard, Copenhagen, 1986.

Hajishengallis, G., Michalek, S.M., "Current status of a mucosal vaccine against dental caries", *Oral Microbiol Immunol*; 14:1-20, 1999.

Hooks, J.J. et al., "Classification, pathogenesis and etiology of recurrent oral ulcerative diseases and Behcet's syndrome", *J Oral Pathol*; 7: 436-438, 1978.

Klein, R.S. et al., "Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome", *N Eng J Med*; 311:354-358, 1984.

McCartan, B.E., McCreary, C.E., "Oral lichenoid drug eruptions", *Oral Dis*; 3:58-63, 1997.



Rogers, R.S., "Recurrent aphthous stomatitis: clinical characteristics and evidence for immunopathogenesis", *J Invest Dermatol*; 69: 499-501, 1977.

Scully, C., Porter, S.R., "Recurrent aphthous stomatitis: current concepts of etiology, pathogenesis and management", *J Oral Pathol Med*; 18: 21-27, 1989.

Scully, C., "Sjögren's syndrome: Clinical and laboratory features, immunopathogenesis and management", *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*; 62:510-523, 1986.

Tenovuo, J., "Antimicrobial function of human saliva-how important is it for oral health?", *Acta Odontol Scand*; 56:250-6, 1998.

Vitali, C.; Bombarieri, S.; Moutsopoulos, H. et al., "Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the european community", *Arth Rheumat*; 36: 340-348, 1993.





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 29

OTRAS ENFERMEDADES INMUNOMEDIADAS

Cecilia Sepúlveda C.

-
- 1. Introducción**
 - 2. Algunas enfermedades inmunomediadas**
 - 2.1. Lupus eritematoso sistémico
 - 2.2. Artritis reumatoidea
 - 2.3. Enfermedades mediadas por anticuerpos
 - 2.4. Otras enfermedades





RESUMEN

Un grupo heterogéneo de enfermedades es mediado por mecanismos inmunes. Dicha respuesta inmune puede estar dirigida contra antígenos ajenos al organismo o propios.

Entre las enfermedades autoinmunes, el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una de las más características y afecta principalmente a las mujeres. Se caracteriza por ser órgano inespecífica y en su patogenia participan complejos inmunes.

Otras enfermedades inmunomediadas, de las que se describe el mecanismo fisiopatológico en este capítulo, son: Artritis reumatoidea, Anemia hemolítica autoinmune, Síndrome de Good Pasteure, Enfermedad de Graves y Miastenia gravis.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades mediadas inmunológicamente comprenden un grupo clínicamente heterogéneo. Pueden ser iniciadas por una respuesta inmune dirigida contra antígenos extraños o propios (autoinmunidad). Los mecanismos patogénicos incluyen la participación de complejos antígeno-anticuerpo, autoanticuerpos dirigidos contra antígenos tisulares o de superficie celular, y células T. Los mecanismos efectores por los cuales los anticuerpos y los complejos inmunes inducen injuria tisular incluyen activación del sistema del complemento y de células inflamatorias. Las células T reclutan y activan macrófagos como los efectores principales de hipersensibilidad retardada e injuria tisular, en otros casos actúan directamente células T CD8+.

En algunas de estas enfermedades el agente etiológico es desconocido, como por ejemplo en el Lupus Eritematoso Sistémico (LES); en otras de ellas el agente etiológico se conoce y el daño está mediado por la respuesta inmune que se genera contra éste o bien a través del mimetismo molecular, cuando la respuesta inmune se produce contra un antígeno extraño que tiene similitud antigénica con antígenos propios, como ocurre en la Enfermedad reumática.

Algunas de estas enfermedades son sistémicas, es decir, afectan a varios órganos y sistemas, otras en cambio, son órgano específicas. En este capítulo se incluyen algunas de las enfermedades más frecuentes: Lupus Eritematoso Sistémico, Artritis Reumatoidea, Enfermedades mediadas por anticuerpos y Otras enfermedades.

2. ALGUNAS ENFERMEDADES INMUNOMEDIADAS

2.1. Lupus Eritematoso Sistémico

Es el prototipo de las enfermedades sistémicas autoinmunes, aqueja principalmente a mujeres en edad fértil y sus manifestaciones pueden afectar a todos los órganos y sistemas. La mayoría de los pacientes presentan alteraciones de la piel (por ejemplo eritema malar en mariposa), dolores y/o inflamación articular, manifestaciones renales y hematológicas. Se caracteriza por períodos de actividad de la enfermedad que fluctúan con períodos de remisión.

Si bien su causa se desconoce, es ampliamente aceptado que se requiere la interacción de múltiples factores para que el LES se desencadene, entre ellos factores genéticos, hormonales, ambientales e inmunológicos (ver capítulo 24). La predisposición genética del LES está relacionada con alelos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, HLA en humanos), así por ejemplo HLA-DR2 y HLA-DR3 están aumentados en pacientes con LES, y además con deficiencias del complemento, por ej. con el alelo nulo C4A. Es frecuente encontrar otros miembros de la familia afectados por enfermedades autoinmunes o bien detectar en ellos la presencia de autoanticuerpos sin manifestación alguna de enfermedad.

Entre los factores ambientales relacionados con el LES de gran importancia es la exposición a las radiaciones ultravioleta y algunas drogas (LES



inducido por drogas que es reversible al retirar la droga).

Las alteraciones inmunológicas que se encuentran en estos pacientes incluyen la presencia de autoanticuerpos, aumento de la funcionalidad de las células T "helper" cooperadoras, falla de la función de células T supresoras, disminución del "clearance" de complejos inmunes.

Múltiples autoanticuerpos son característicos y frecuentes en el LES, entre ellos los anticuerpos antinucleares dirigidos contra diferentes estructuras nucleares, los que pueden detectarse por la técnica de inmunofluorescencia indirecta y constituyen un marcador presente en casi el 100% de los casos. Muchos pacientes tienen anticuerpos anti-DNA nativo, así como autoanticuerpos dirigidos contra estructuras nucleares extractables en salino (ENA). También pueden tener anticuerpos dirigidos contra células sanguíneas y otras estructuras. Múltiples causas pueden llevar a la aparición de estos autoanticuerpos: quiebre de la tolerancia a lo propio, reactividad cruzada y mimetismo molecular, alteración en el control de la apoptosis, estimulación policlonal de células B, etc. El daño tisular en el LES es causado en gran medida por complejos inmunes, incluyendo daño debido a vasculitis y a glomerulonefritis.

En la actualidad el tratamiento del LES permite una expectativa de sobrevivencia que supera el 90% a los 10 años del diagnóstico, sin embargo, muchos pacientes pueden presentar secuelas por el daño inflamatorio del LES, por ejemplo falla renal. Por otra parte, pueden presentar complicaciones derivadas del tratamiento sostenido con corticoides e inmunosupresores.

2.2. Artritis Reumatoidea (AR)

La AR es una enfermedad inflamatoria crónica sistémica, que afecta a alrededor del 1% de la población, siendo más frecuente en mujeres, al igual que el LES. Si bien su causa se desconoce, ha podido establecerse que esta enfermedad se desencadena en individuos genéticamente susceptibles, cuando son expuestos a un agente antigénico relevante (ver capítulo 24). Muchas evidencias apuntan a que las células T, activadas por el antígeno, juegan un rol crítico en el inicio y perpetuación de la inflamación sinovial que caracteriza a esta enfermedad. En cuanto a la naturaleza de este antígeno, se han postulado varios agentes infecciosos ubicuos, los que en forma directa o indirecta, desencadenarían el daño. Entre los me-

canismos indirectos por los que podría causar daño este antígeno, se postula entre otros mecanismos, que alteraría la inmunogenicidad de las estructuras articulares, actuaría a través de mimetismo molecular, o bien actuar como tipo superantígeno.

En la sinovial inflamada se han encontrado múltiples citoquinas, postulándose que un desbalance en su producción sería un factor decisivo en la fisiopatología de la AR. Así, por ejemplo se encuentran aumentadas citoquinas tales como IL-1, TNF- α e IFN- γ , las cuales pueden favorecer la inflamación y proliferación sinovial, la destrucción del cartílago y del hueso adyacente y explicar algunas de las manifestaciones sistémicas de la enfermedad. Su relevancia en la patogenia de la AR ha quedado demostrada al demostrarse que la terapia con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el TNF- α , logran controlar estas manifestaciones.

Al igual que lo descrito en el LES, en la AR intervienen múltiples factores. Entre ellos los factores genéticos son de gran relevancia, como por ej. los alelos HLA-DR4, los más frecuentemente encontrados en estos pacientes.

La presentación clínica característica es la de una poliartritis simétrica, generalmente asociada a síntomas constitucionales como fiebre y fatiga. Se afectan, preferentemente, las pequeñas articulaciones de manos y pies, las cuales pueden llegar a deformarse como consecuencia del daño causado por la inflamación sinovial.

En el 75-90% de los casos se encuentra la presencia de factores reumatoides en estos pacientes. Estos son autoanticuerpos (generalmente de clase IgM) reactivos contra la región Fc de la IgG. Estos autoanticuerpos no son específicos, pueden encontrarse presentes en otras enfermedades (inflamatorias, infecciosas, tumorales), y también hasta en un 5% de la población general, especialmente de edad avanzada, en títulos bajos.

2.3. Enfermedades mediadas por anticuerpos

Muchas enfermedades inmunológicas se asocian con la producción de autoanticuerpos, o se cree que son causadas por éstos. La mayoría de estas enfermedades son órgano-específicas (tabla 29-1).

La **Anemia hemolítica autoinmune** y la **Trombocitopenia autoinmune** son causadas por autoanticuerpos dirigidos contra los glóbulos rojos y las plaquetas, respectivamente. Los anticuerpos causan lisis dependiente de comple-



Tabla 29-1. Enfermedades causadas por autoanticuerpos

Enfermedad	Clínica	Mecanismos	Autoanticuerpos
Glomerulonefritis (S. de Good Pasture)	Nefritis, hemorragia pulmonar	Complemento, neutrófilos	Anti-membrana basal riñón y pulmón
Anemia autoinmune Hemolítica	Anemia hemólisis	Lisis, fagocitosis	Anti-proteínas membrana
Pénfigo vulgar	Vesículas en piel	Disrupción adhesión intercelular	Anti-uniones intercelulares epidérmicas
Penfigoide buloso	Vesículas en piel	Disrupción unión dermo-epidérmica	Anti-membrana basal epidérmica
Miastenia gravis	Debilidad Muscular	Bloqueo receptores acetilcolina	Anti-receptor acetilcolina
Enfermedad de Graves	Hipertiroidismo	Estimulación receptor TSH	Anti-receptor TSH

mento de las células sanguíneas y las opsonizan, llevando a un aumento de la fagocitosis por los fagocitos mononucleares (ver capítulo 26). La anemia hemolítica autoinmune y la trombocitopenia autoinmune son generalmente de causa desconocida, aunque algunas veces se producen como una reacción adversa a algunas drogas. En este último caso, pueden deberse a la presencia de neoantígenos, creados al unirse la droga o sus metabolitos a las membranas celulares.

El **síndrome de Good Pasture** es una enfermedad caracterizada por hemorragias pulmonares y glomerulonefritis. Es causada por un autoanticuerpo que se une a un dominio del colágeno tipo IV presente en las membranas basales de los alvéolos pulmonares y capilares glomerulares. La unión de este anticuerpo provoca activación local del complemento y neutrófilos. Al examen microscópico puede observarse necrosis e infiltrados neutrofílicos y por microscopía de fluorescencia pueden detectarse depósitos de anticuerpos a lo largo de las membranas basales.

Algunas **enfermedades autoinmunes de la**

piel se deben a anticuerpos dirigidos contra moléculas de adhesión de las células epidérmicas o antígenos de la membrana basal. Los anticuerpos alteran la adhesión de las células entre ellas o a la membrana basal, causando la formación de ampollas.

Varias formas de **vasculitis**, inflamación de los vasos sanguíneos, se asocian con autoanticuerpos reactivos con proteinasas de los gránulos de los neutrófilos, éstos son los anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) que al reaccionar con el antígeno causan degranulación de los neutrófilos e injuria alrededor de los vasos sanguíneos.

El **Síndrome antifosfolípido**, caracterizado por trombosis venosas y abortos recurrentes, es causado preferentemente por anticuerpos dirigidos contra complejos proteínas-fosfolípidos aniónicos (ver capítulo 25).

Anticuerpos dirigidos contra receptores de membrana pueden causar alteraciones funcionales sin involucrar otros mecanismos. Así por ejemplo en la **Enfermedad de Graves**, una enfermedad autoinmune de la glándula tiroides caracteri-



zada por hipertiroidismo, un autoanticuerpo específico para el receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) presente en las células epiteliales tiroideas, se une a éstos estimulando a las células a producir hormonas tiroideas del mismo modo que lo hace la TSH proveniente de la hipófisis.

Un ejemplo de inhibición de la actividad de un receptor la vemos en la **Miastenia gravis**, una enfermedad causada por autoanticuerpos que se unen al receptor de la acetilcolina en la placa motora de la unión neuromuscular. La unión de estos anticuerpos interfiere con la transmisión neuromuscular mediada por acetilcolina. El resultado es una falla muscular para responder a los impulsos nerviosos, que se expresa en debilidad muscular progresiva.

Un muy buen ejemplo de enfermedad causada por anticuerpos producidos contra antígenos extraños que tienen reactividad cruzada con antígenos propios ocurre en la **Enfermedad Reumática**. Esta enfermedad se presenta como una complicación tardía de una amigdalitis estreptocócica y se caracteriza por artritis, endocarditis y miocarditis, y alteraciones neurológicas. Se cree que la injuria miocárdica se debe a un anticuerpo contra una proteína de la pared celular del estreptococo, el cual se une a un antígeno del miocardio, con el cual esta proteína presenta un mimetismo molecular.

2.4. Otras enfermedades

Existen varias otras enfermedades sistémicas autoinmunes, además del LES y de la AR, como por ejemplo la Esclerosis sistémica progresiva, el Síndrome de Sjögren, Artritis reumatoide juvenil, Espondiloartropatías y Vasculitis sistémicas. Entre las enfermedades órgano-específicas más frecuentes cabe destacar enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central, diabetes autoinmune, enfermedades inflamatorias del intestino, varias formas de hepatitis y de nefritis.

LECTURAS SUGERIDAS

Clinical Immunology Principles and Practice.

Editor in chief Robert R. Rich; 1996, vol I, secciones VI y VII.

Fan, P.; Davis, Somer T., et al. "A clinical approach to systemic vasculitis", *Seminar Arthritis Rheum* 1990; 9: 248-265.

Feldmann, M.; Brenan, F.M. and Maini, R.N., "Rheumatoid arthritis", *Cell* 1996; 85: 307-310.

Harris, E.D., "Rheumatoid arthritis", *N Eng J Med* 1990; 322: 1277-1281.

Naparstek, Y., and Poltz, P.H., "The role of autoantibodies in autoimmune diseases", *Annual Review of Immunology* 1993; 11: 79-104.



Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 30

INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

Mónica Cornejo De L. y Marta Zelazko de Ch.

-
- 1. Introducción**
 - 2. Inmunodeficiencias primarias**
 - 2.1. Aspectos genéticos de las IDP
 - 2.2. Estudios de laboratorio inmunológico para el diagnóstico de IDP
 - 2.3. Características de las IDP
 - 3. Tratamiento de las inmunodeficiencias congénitas**





RESUMEN

Existen deficiencias primarias del sistema inmune (defectos genéticos que se manifiestan generalmente en la infancia) o más frecuentemente secundarias a otros procesos patológicos. El defecto puede ser a nivel de la inmunidad específica (alteración de LT, B o ambos) o de la inmunidad innata (defectos de fagocitos o del complemento).

Las inmunodeficiencias se manifiestan principalmente por aumento de susceptibilidad a infecciones. La naturaleza de la infección recurrente depende del componente del sistema inmune alterado (ej. deficiencias de inmunidad humoral se asocian a infecciones por bacterias piógenas, deficiencias de inmunidad celular a infecciones por virus y microorganismos intracelulares). Existe, además, asociación a algunos tipos de enfermedades autoinmunes, mayor frecuencia de tumores (especialmente linforreticulares) y en algunos casos manifestaciones alérgicas.

En la mayoría de las Inmunodeficiencias Primarias el patrón hereditario es de carácter recesivo (mutaciones en cromosoma X o autosómico). En varias de ellas se ha localizado el cromosoma específico, es posible detectar portadores y hacer diagnóstico prenatal. En el capítulo se describen ejemplos seleccionados de deficiencias primarias de células B, T, o ambas y defectos de Inmunidad Natural.

Las posibilidades terapéuticas en la actualidad incluyen el uso de gammaglobulina endovenosa, trasplante de médula ósea, reemplazo enzimático y, a futuro, reemplazo del gen defectuoso.

1. INTRODUCCIÓN

La integridad del Sistema Inmune (SI) es esencial para la defensa contra organismos infecciosos y sus productos tóxicos y, por lo tanto, para la sobrevivencia de los individuos. Defectos en uno o más componentes del SI pueden llevar a enfermedades graves, ocasionalmente fatales. Estas enfermedades se clasifican en 2 grupos: Inmunodeficiencias Primarias (IDP) que son defectos genéticos del Sistema Inmune y se manifiestan generalmente en la infancia e Inmunodeficiencias Secundarias que se desarrollan por una variedad de condiciones patológicas (como cánceres diseminados, enfermedades metabólicas, desnutrición), drogas inmunosupresoras o infecciones de las células del Sistema Inmune (ej. Virus de la Inmunodeficiencia humana o VIH) (ver capítulo 31).

La respuesta deficiente puede resultar a su vez de anormalidades en la inmunidad adquirida o innata. Defectos de **inmunidad específica** pueden deberse a desarrollo, activación o función anormal de LT, B o ambos. Alteración de la **inmunidad innata**, a defectos a nivel de los Fagocitos o del Sistema de Complemento.

Tanto las Inmunodeficiencias Primarias como Secundarias se manifiestan por un aumento de susceptibilidad a infecciones. La naturaleza de la infección depende del componente del Sistema Inmune alterado, así por ejemplo, defectos de inmunidad humoral se asocian a infecciones por bacterias piógenas, mientras que defectos de inmunidad celular principalmente por virus y microorganismos intracelulares.

Además de las infecciones los pacientes con IDP Específicas son especialmente susceptibles a enfermedades malignas de tipo linforreticular (la mortalidad por cáncer en las inmunodeficiencias puede ser 10 - 200 veces mayor que lo esperado para población general de la misma edad). Algunas inmunodeficiencias se asocian a enfermedades autoinmunes como anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, lupus eritematoso, hepatitis crónica activa, entre otros y puede haber algún papel en el desarrollo de alergias.

Desde la descripción en 1952 de la primera inmunodeficiencia (Agammaglobulinemia, Bruton) a la fecha se han descrito un gran número de síndromes que regularmente son clasificados por un grupo de expertos de la Organización Mun-



dial de la Salud (OMS) (tabla 30-1). En los últimos años se ha visto un gran avance en terapia y en la identificación de las bases moleculares de

varias de estas enfermedades lo que ha permitido diagnósticos más específicos y terapias más efectivas.

**Tabla 30 - 1. Clasificación de Inmunodeficiencias Primarias
Grupo Científico OMS (1999)**

Inmunodeficiencias Combinadas

Inmunodeficiencia Combinada Severa (IDCS) T- B+

- a) Ligada al cromosoma X (deficiencia γ c)
- b) Autosómica recesiva (deficiencia Jak3)

Inmunodeficiencia combinada severa T- B-

- a) Deficiencia de RAG 1/ 2
- b) Deficiencia de adenosina desaminasa (ADA)
- c) Disgenesia reticular

Inmunodeficiencia combinada severa T+ B-

- a) Síndrome de Omenn
- b) Deficiencia del $R\alpha$ +IL - 2

Síndrome Hiper IgM ligado a X

Deficiencia de fosforilasa del nucleosido purina (PNP)

Deficiencia de CMH clase II

Deficiencia de $CD_3\gamma$ o $CD_3\epsilon$, ZAP-70, TAP-2

Deficiencias Predominantemente de Anticuerpos

Agammaglobulinemia ligada al X / Autosómica recesiva

Deleción gen cadena pesada Igs

Deficiencia cadena Kappa

Deficiencia selectiva de Ig

Deficiencia anticuerpos con Ig normal o elevada

Inmunodeficiencia común variable (IDCV)

Síndrome de Hiper IgM no ligado al X

Hipogammaglobulinemia Transitoria de la infancia

Inmunodeficiencia Asociada a Otros Defectos

Wiskott - Aldrich

Ataxia-Telangiectasia

Anomalía de DiGeorge

ID con albinismo

Síndrome proliferativo ligado a X

Deficiencias de Complemento

Deficiencias de Número y/o Función Fagocítica

Neutropenia congénita

Neutropenia cíclica

Defecto de adhesión leucocitaria

Deficiencia de gránulos específicos

Síndrome de Schwachman

Enfermedad Granulomatosa Crónica

- a) Ligada al cromosoma X

- b) Autosómica recesiva

Deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

Deficiencia de mieloperoxidasa

Defectos micobactericidas

- a) Deficiencia del receptor IFN γ

- b) Deficiencia del receptor IL-12
-

2. INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

Las deficiencias de respuesta inmune específica se clasifican, de acuerdo al Comité de Expertos de la OMS (tabla 30-1), en tres categorías generales: a) Inmunodeficiencias combinadas, b) Deficiencias predominantemente de anticuerpos y c) Inmunodeficiencias asociadas a otros defectos. Por su parte, las deficiencias de inmunidad innata comprenden: a) Deficiencias del sistema del complemento y b) Deficiencias de función fagocítica.

2.1. Aspectos genéticos de las IDP

En un número permanentemente creciente de IDP se ha localizado el cromosoma específico (tabla 30-2) y se ha identificado el error biológico fundamental.

En la mayoría de las IDP los patrones hereditarios son de carácter recesivo, algunos causados por mutaciones en genes en el cromosoma X y otras en cromosomas autosómicos. Se ha localizado el gen defectuoso en el cromosoma X en: Agammaglobulinemia ligada al X, Inmunodeficiencia combinada severa ligada al X, Síndro-

me de Wiskott-Aldrich, Enfermedad linfoproliferativa ligada al X, Síndrome Hiper IgM, Deficiencia de properdina, Enfermedad granulomatosa crónica.

Algunos ejemplos de mutaciones a nivel de cromosomas autosómicos incluyen: Deficiencia de proteínas de adhesión (CD18), Inmunodeficiencias combinadas debidas a defecto de Adenosina Desaminasa (ADA) o Fosforilasa del nucleósido purina (PNP, "Purine Nucleoside Phosphorylase").

En la actualidad es posible detectar portadores en varias de estas enfermedades, así como también hacer diagnóstico prenatal estudiando muestras de sangre fetal, células amnióticas o por biopsia de vellosidades coriónicas.

La identificación en la última década de numerosos genes implicados en la etiología de las Inmunodeficiencias Primarias nos ha permitido tener una nueva perspectiva al evaluar estas enfermedades. Esta nueva información obligó además a reevaluar los criterios utilizados hasta ahora para hacer diagnósticos de Inmunodeficiencias Primarias.

Los nuevos criterios diagnósticos recientemente establecidos por la Sociedad Europea

Tabla 30 - 2. Localización cromosómica de inmunodeficiencias primarias

Inmunodeficiencia	Cromosoma
Inmunodeficiencia combinada severa ligada al X	Xq13.1 - 13.3
Agammaglobulinemia ligada al X	Xq21.3 - 22
Síndrome de Hiper IgM ligado al X	Xq26 - 27
Síndrome de Wiskott-Aldrich	Xp11.22 - 11.3
Enfermedad Granulomatosa Crónica ligada al X	Xp21.1
Síndrome Linfoproliferativo ligado al X	Xq26
Deficiencia de Adenosina Desaminasa	20q13 - ter
Deficiencia Jak3	19p 13.1
Deficiencia de Fosforilasa del Nucleosido Purina	14q13.1
Deficiencia de ZAP- 70	2q12
RAG-1/RAG-2	11p12-13
Deficiencia de Cadena Kappa	2p11
Delección de Cadena Pesada de Ig	14q32.3
Ataxia-Telangiectasia	11q23.1
Enfermedad Granulomatosa Crónica Autosómica Recesiva	
p22 phox	16q24
p47 phox	7q11.23
p67 phox	1q25
Deficiencia de Adhesión Leucocitaria I	21q22.3
Síndrome de Chediak - Higashi	1q4.3



(ESID) y el Grupo Panamericano de Inmunodeficiencias Primarias (PAGID) se dividen en 3 categorías: **Definitivo, probable y posible**. El diagnóstico definitivo sólo puede hacerse, salvo en algunas excepciones de IDP ligadas al X, con la documentación del defecto molecular para cada caso. El hallazgo de la mutación es el método diagnóstico más confiable, la ausencia de mRNA específico o de proteína es suficiente para el diagnóstico en algunos síndromes, pero no en todos porque el mRNA o la proteína se pueden expresar sólo transitoriamente o en niveles muy bajos.

Los pacientes deben reunir siempre los criterios clínicos de inclusión característicos de las distintas enfermedades para evitar la incorporación de pacientes que tengan variantes polimórficas de los genes asociados con inmunodeficiencias.

2.2. Estudios de laboratorio inmunológico para el diagnóstico de IDP

La clínica de las IDP no es claramente distintiva y permite sólo sospechar y orientar el diagnóstico de los diversos síndromes. En todos los casos, deberán realizarse procedimientos apropiados de laboratorio que permitan evaluar la competencia inmunológica para definir el tipo y grado de compromiso. Se presenta una breve reseña de los estudios indicados para los diferentes sectores de la respuesta inmune, que deberán incluir siempre la valoración cuantitativa y funcional:

a) Estudio de la respuesta inmune humoral

- Determinación de la concentración sérica de IgG, IgM, IgA e IgE.
- Recuento de linfocitos B por expresión de antígenos de diferenciación (CD19, CD20).
- Búsqueda de anticuerpos preexistentes (Isohemaglutininas antiA y antiB) y respuesta de anticuerpos a la inmunización activa con antígenos proteicos (anticuerpo anti-tetánico, anticuerpo anti-diftérico) y antígenos polisacáridos (anticuerpo anti-neumococo).
- Determinación de la concentración sérica de subclases de IgG: IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄.
- Producción de inmunoglobulinas *in vitro* mediante estimulación con mitógenos (PWM).

b) Estudio de la respuesta inmune celular

- Determinación del valor absoluto de

linfocitos/ μ l

- Recuento de linfocitos T por expresión de antígenos de diferenciación: CD3, CD4, CD8.
- Pruebas de hipersensibilidad retardada a distintos antígenos: PPD, candidina, etc.
- Respuesta proliferativa *in vitro* a mitógenos: PHA, ConA, PMA+Ionomicina.
- Respuesta proliferativa a antígenos (candidina, PPD, toxoide tetánico) y células alogeneicas (cultivo mixto linfocitario).
- Producción de interleuquinas: IL-1, IL-2, IFN γ , TNF-alfa, IL-4, etc., en sobrenadantes de cultivos o por detección intracitoplasmática en respuesta a mitógenos.
- Estudios de actividad enzimática: ADA, PNP.

c) Estudio de la respuesta inmune inespecífica

Fagocitos

- Determinación cuantitativa y morfología de granulocitos y monocitos.
- Estudio de mecanismos microbicidas oxígeno dependientes:
- Prueba de reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT).
- Quimioluminiscencia, dihidrorodamina (DHR), Producción de anión superóxido.
- Estudio de la expresión de moléculas de adhesión: CD11, CD18, CD15.
- Estudios de actividad enzimática: Mieloperoxidasa, Glucosa 6 fosfato dehidrogenasa.
- Actividad bactericida.

Complemento

- Actividad lítica del complemento: CH50 y AP50.
- Determinación de la concentración sérica de componentes del complemento.
- Evaluación funcional de componentes del complemento.
- Determinación cuantitativa y funcional de inhibidores del complemento.

El reconocimiento de portadores sanos y el diagnóstico prenatal, son dos de las nuevas herramientas incorporadas al arsenal diagnóstico de las IDP, que pueden ser realizados con el desarrollo de técnicas de biología molecular:

- Estudios de inactivación del cromosoma X.



- Segregación de alelos relacionados con la patología.
- Caracterización de la mutación: a) Técnicas de rastreo Ej. Polimorfismo de DNA de simple cadena (SSCP) y b) Secuenciación del DNA.

2.3. Características de las IDP

Se describirán a continuación ejemplos seleccionados de defectos de células B, células T, ambos y de defectos de Inmunidad Natural.

2.3.1. Defectos predominantemente de anticuerpos

Estas enfermedades fueron las primeras en conocerse debido a que la cuantificación de inmunoglobulinas (Igs) séricas se usa como método de rutina desde 1950. Se definen como una reducción o ausencia de uno o más isotipos o subclases de Igs en ausencia de otra patología, debido a un bloqueo de la maduración del LB o respuesta defectuosa de estos linfocitos a las señales de los LT (figura 30-1). Algunos pacientes pueden tener Ig sérica normal, pero no responden apropiadamente a patógenos. Se presentan clínicamente como infecciones piógenas recurrentes.

A continuación se describirán algunos ejemplos de déficit de anticuerpos enfatizando el mecanismo del defecto de la célula B.

a) Agammaglobulinemia ligada al sexo (XLA). Representa el prototipo del déficit de células B puro. Se hereda como un rasgo recesivo ligado al X. Los niños afectados generalmente no presentan síntomas los primeros 9 - 12 meses de vida, porque están protegidos pasivamente por la IgG transplacentaria adquirida de la madre. Posteriormente tienen infecciones piógenas a repetición tales como otitis media, sinusitis, conjuntivitis, neumonía y piodermitis. Los gérmenes más frecuentes son *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y menos frecuente *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Si no se efectúa tratamiento profiláctico invariablemente resulta en enfermedad pulmonar obstructiva y bronquiectasias. Pueden presentar además viremia persistente y adquirir Poliomiелitis Parálitica si se usa vacuna con virus vivo. Son susceptibles a Enterovirus y la infección con *Giardia lamblia* induce diarrea crónica; 35% de los niños pueden presentar artritis, en muchos ca-

sos debido a micoplasma.

La cuantificación de Igs de estos pacientes, en la mayoría de los casos demuestra: IgG < 100 mg/dL, IgM e IgA no detectable e incapacidad de secretar anticuerpos en respuesta a estímulos antigénicos. Las células B se encuentran ausentes. En general la inmunidad celular no está afectada.

Se ha demostrado el gen de la agammaglobulinemia ligada al sexo en el brazo largo del cromosoma X en posición xq21.3 - 22. Se ha identificado y clonado además una molécula transductora de señales codificada por el gen llamado Btk (Bruton tirosine kinase o Tirosina kinasa de la célula B) que se expresa en etapas precoces del desarrollo de la célula B, no se encuentra en células T o plasmáticas y se expresa además en células mieloides. El gen Btk se supone que tiene una función fundamental en la maduración de la línea celular B; probablemente sería la señal para que las células preB reordenen los genes de cadena liviana, una vez que han aparecido las cadenas pesadas en su superficie. En pacientes agammaglobulinémicos se generan precursores de las células B en la médula ósea con la maduración detenida en el estadio Pre-B.

Las mujeres portadoras de la agammaglobulinemia ligada al X son inmunológicamente normales y presentan 2 poblaciones de precursores de células B: una mitad que porta un cromosoma X activo con gen Btk normal y la otra el gen defectuoso. Las células que portan Btk mutado en el cromosoma X activo no maduran a células B. Sólo maduran a células B aquellas con cromosoma X activo que tienen el gen normal. La inactivación no al azar del cromosoma X en las células B en las portadoras y, fundamentalmente, el hallazgo de la mutación en Btk permiten distinguir la XLA de otras formas autosómicas recesivas poco frecuentes de agammaglobulinemia con ausencia de LB como son las mutaciones de la cadena mu de las inmunoglobulinas y mutaciones en el gen lambda 5/14.1 componente del receptor de la célula Pre-B. Algunos casos de inmunodeficiencia común variable también presentan ausencia de LB.

b) Síndrome Hiper IgM ligado al sexo: Se describió en 1961 en 2 varones que presentaban un cuadro clínico similar a la agammaglobulinemia ligada al X con concentraciones de IgM sérica muy elevada, ausencia de IgA e IgG muy baja (<150 mg/dL). Además de presentar infecciones piógenas recurrentes, son susceptibles a infecciones oportu-



tunistas en particular por *Pneumocystis carinii* y problemas autoinmunes, especialmente neutropenia recurrente, a menudo severa. La infección por *Cryptosporidium* es causa frecuente de colangitis esclerosante con daño hepático severo. Aquellos pacientes que sobreviven más allá de la segunda década, presentan un mayor riesgo de desarrollar cánceres, especialmente del tracto gastrointestinal, hígado y vesícula.

El número de LB circulantes es normal, pero se detecta sólo IgM e IgD de superficie. No se observa desarrollo de centros germinales en ganglios y bazo. El número de células T es normal, sin embargo no sintetizan o expresan una molécula no funcional del ligando de (CD40L), necesario para la interacción con la célula B en el cambio de clase de Igs.

El gen del síndrome de hiper IgM ligado al X se encuentra en el brazo largo del cromosoma X en posición q26. En la actualidad es posible efectuar diagnóstico prenatal y de portadoras.

Teniendo en cuenta que el defecto primario del síndrome se encuentra en los LT, en las últimas clasificaciones de la OMS el síndrome ha sido incluido en las ID combinadas.

Un cuadro idéntico en las manifestaciones clínicas y perfil inmunológico ha sido descrito en mujeres. En esos casos el gen y la expresión del CD40L es normal, por lo que se sospechó un defecto en otras moléculas implicadas en la señalización de CD40. Recientemente se describió y publicó el defecto genético de esta forma *Autosómica recesiva de Síndrome de Hiper IgM*. Se trata de mutaciones en el gen de la citidina deaminasa inducido por activación (AID). Este hallazgo demuestra que la presencia de AID es un requerimiento absoluto para la diferenciación terminal del LB y la producción eficiente de anticuerpos.

c) Inmunodeficiencia Común Variable. El término Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV) se usa para designar un grupo de síndromes aún no bien definidos, pero caracterizados por formación defectuosa de anticuerpos y en que se han excluido otros defectos de inmunidad humoral. El patrón hereditario es variado (autosómico recesivo, dominante, ligado al X) siendo lo más común los casos esporádicos.

En población de origen europeo es la más frecuente de las inmunodeficiencias primarias específicas. Afecta en igual proporción a hombres y mujeres, generalmente entre los 20 y 30 años. Su

incidencia se estima entre 1:50.000 a 1:200.000.

Clínicamente se presenta como infecciones piógenas sinopulmonares recurrentes. Algunos pacientes pueden presentar infecciones con gérmenes inusuales como *Pneumocystis carinii*, micobacterias y hongos y en algunos casos enterovirus. Los pacientes son altamente susceptibles a otros patógenos entéricos como *Giardia lamblia* y a *Herpes simplex* y *zoster*. Existe una alta incidencia de enfermedades malignas linforreticulares y gastrointestinales. Puede observarse una variedad de desórdenes autoinmunes (anemia perniciosa, anemia hemolítica, neutropenia). Los familiares de estos pacientes tienen una mayor incidencia de déficit de IgA, enfermedades autoinmunes y condiciones malignas.

La concentración de IgG y generalmente de IgA e IgM en el suero se encuentra reducida. El número de células B en general es normal aunque puede estar reducido, pero el defecto no se encuentra a nivel de la diferenciación sino más bien de la activación *in vivo* de las células B. Cerca del 60% de los pacientes tiene una respuesta proliferativa disminuida al estimular el Receptor de Células T (TCR), sin embargo no existe una anomalía del mismo sino probablemente un defecto en la transducción de señales. En ausencia de una señal apropiada por LT no se produciría proliferación, diferenciación ni secreción de anticuerpos por las células B.

d) Deficiencia selectiva de IgA. Es una de las IDP más frecuentes. Se presenta en 1:700 individuos caucásicos y 1:18.500 japoneses. El patrón hereditario es variable, en algunas familias se ha demostrado herencia autosómica recesiva y asociación a algunos haplotipos HLA (Complejo Principal de Histocompatibilidad, MHC) Las características clínicas también son variables. La mayoría de los individuos no presentan enfermedad, otros tienen infecciones sinopulmonares. Su frecuencia es mayor en pacientes con enfermedad pulmonar crónica que en población normal.

El déficit de IgA se caracteriza por niveles ausentes o extremadamente reducidos de IgA sérica (< de 7 mg/dL) con IgG e IgM normal. Se supone que existe un defecto a nivel de la diferenciación de células B que expresan IgA a células plasmáticas secretoras de anticuerpos. No se encuentran anomalías a nivel de células T.

La deficiencia de IgA es en realidad una inmunodeficiencia más compleja de lo que se sospechaba. Podría tratarse, de una forma de expre-



sión menos grave de la IDCV. Las deficiencias de subclases de IgG, de IgA con deficiencia de subclases de IgG y las deficiencias de función de anticuerpos, también podrían considerarse formas intermedias.

e) Deficiencia selectiva de Subclases de IgG. Se han descrito pacientes con nivel IgG sérico total normal y una o más subclases de IgG bajo lo normal. Puede asociarse a niveles bajos de IgA. El déficit de IgG₃ es más frecuente en adultos y del IgG₂ en niños. El nivel normal de IgG₄ varía ampliamente en personas sanas, por lo que es difícil interpretar una deficiencia selectiva de IgG₄.

En la tabla 30-3, se resumen las características de algunos ejemplos de IDP cuyo defecto es predominantemente de anticuerpos.

= <2.000/ μ L) en el primer año de vida. Existe falla en el desarrollo del Timo. Los pacientes presentan retardo del crecimiento, diarrea intermitente o crónica e infecciones persistentes con gérmenes oportunistas de baja virulencia (*Cándida*, *Pneumocistis Carinii*, citomegalovirus). Estos hallazgos requieren diferenciar de niños con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) efectuando estudios para detectar Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), como son el aislamiento viral o reacción de polimerasa en cadena (PCR) para genoma viral. El diagnóstico de este tipo de inmunodeficiencia es una emergencia médica, ya que puede ser rápidamente fatal si el niño afectado no es sometido a un trasplante de médula ósea. Existen numerosos síndromes de Inmunodeficiencia Combinada Severa (IDCS),

Tabla 30 -3. Características de algunos defectos predominantemente de anticuerpos

Enfermedad	Igs séricas	Células B	Defecto
Agammaglobulinemia ligada al X	Todos los isotipos ↓	Ausentes o marcadamente ↓	Mutación gen Btk
Agammaglobulinemia autosómica recesiva	Todos los isotipos ↓	Ausentes o marcadamente ↓	Mutación cadena μ Mutación gen lambda 5/14.1
Inmunodeficiencia Común Variable	Reducción en uno o más isotipos (generalmente IgG)	N o ↓	Variable
Déficit selectivo de IgA	IgA1, IgA2 ↓	N o ↓ SIgA+	Falla en diferenciación terminal de cel B IgA+
Deficiencia selectiva de subclases de IgG	↓ uno o más subclases de IgG	N o inmadura	Defecto en diferenciación de isotipo

2.3.2. Defectos combinados de células T y B

Se caracterizan clínica e inmunológicamente por defectos tanto en las células T como en las células B (figura 30-1). Los criterios diagnósticos incluyen, presentación desde los primeros meses de vida de infecciones severas potencialmente fatales, graves anormalidades de la inmunidad mediada por células, deficiencia de anticuerpos y linfopenia debido al déficit de células T (Linfocitos

cuyos defectos genéticos son distintos pero que son indistinguibles desde la clínica.

Considerando los hallazgos inmunológicos un grupo de estos síndromes, que podrían llamarse formas *clásicas o típicas de IDCS*, se presentan con linfopenia marcada, agammaglobulinemia y ausencia de función inmune celular y humoral. En este grupo de IDCS clásicas podemos enumerar, entre otras, la IDCS ligada al X (LX), la IDCS autosómica recesiva (AR), la deficiencia de



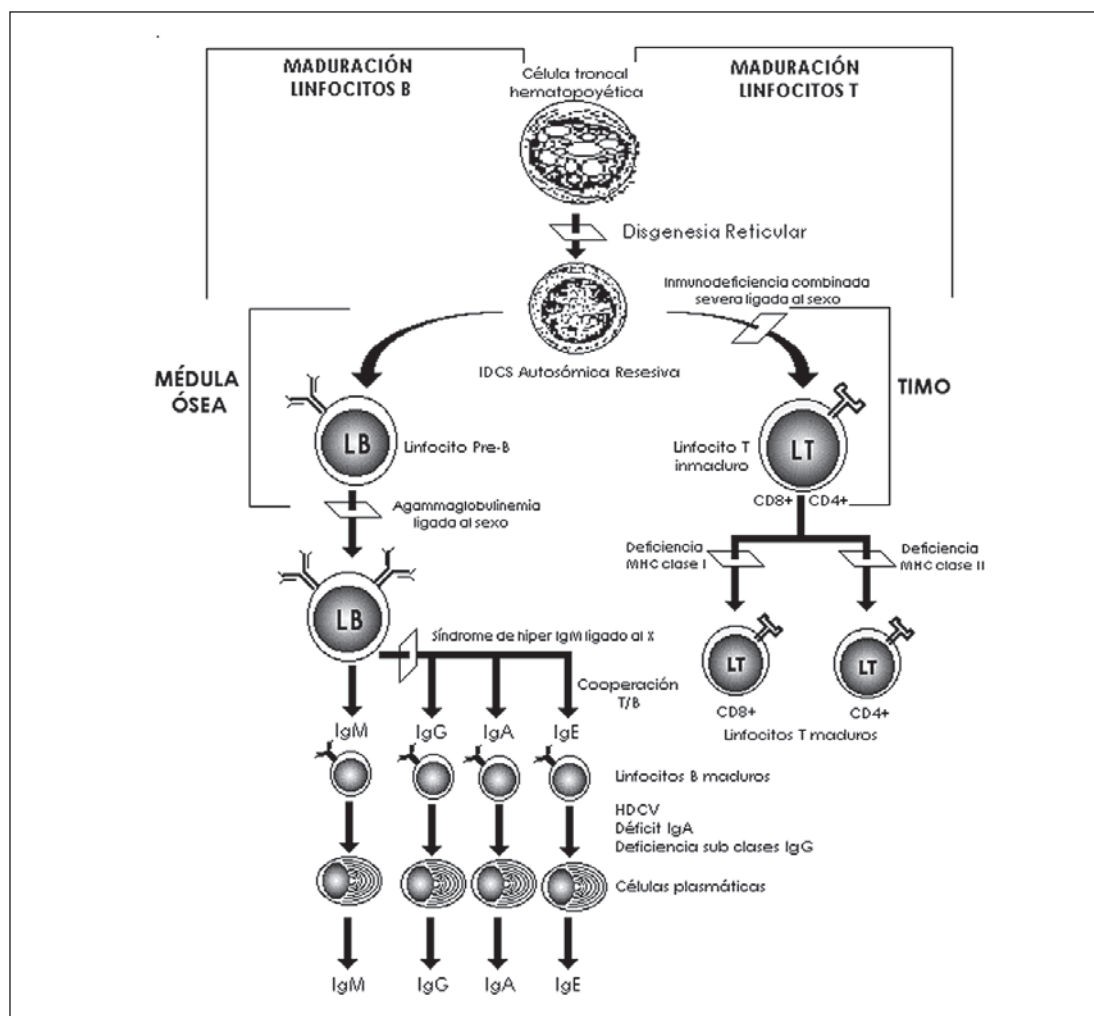


Figura 30-1. Defectos combinados de células T y B. Estos defectos se caracterizan clínica e inmunológicamente por defectos tanto en los LT y LB.

Adenosín deaminasa (ADA) y la disgenesia reticular .

a) Inmunodeficiencia Combinada Severa ligada al sexo (IDCS-LX). Es la más frecuente de las IDCS, constituye el 50 a 60% del total, lo que explica que la frecuencia de casos en varones sea 3 veces superior a los casos en mujeres. Se caracteriza por ausencia de linfocitos T y células NK con linfocitos B en número normal o aumentado pero no funcionales (fenotipo es por lo tanto T-, NK-, B+).

El defecto genético en la IDCS ligada al X ha sido identificado como una mutación de la cadena γ del receptor de la IL2. La cadena γ es un componente de los receptores de varias citoquinas como IL4, IL7, IL9, e IL15. De este modo, los

progenitores linfoides al no tener receptores intactos de varias interleuquinas no pueden ser estimulados por los factores de crecimiento necesarios para el desarrollo y diferenciación normal de los LT, lo que explica la marcada inmunodeficiencia que resulta. El gen anormal se encuentra en la región Xq13. El conocimiento del gen responsable y la posibilidad de establecer la mutación mediante técnicas de biología molecular permite detectar portadoras y realizar diagnóstico prenatal. Recientemente se ha podido corregir el defecto genético, insertando el gen de la cadena γ del receptor de interleuquina en las células troncales ("stem cells") de los pacientes.

En los últimos años se ha descrito una forma de IDCS, con el mismo fenotipo T-, NK-, B+, pero con patrón de herencia autosómica recesiva.



Esta entidad se ha relacionado con mutaciones a nivel de *JAK-3*, molécula que interviene en la trasducción intracelular de señales post-estimulación de la cadena γ del receptor de IL-2.

b) Inmunodeficiencia Combinada Severa autosómica recesiva (IDCS-AR). También conocida como alinfocitosis. Se presenta con un fenotipo T-, NK+, B-, y representa aproximadamente un 25% del total de las IDCS.

Esta entidad podría ser dividida en dos grupos: IDCS-AR *sin* radiosensibilidad aumentada e IDCS-AR *con* radiosensibilidad aumentada. En la primera se han encontrado mutaciones en los genes RAG-1 y RAG-2, involucrados en actividades de recombinasa para genes V(D)J de las inmunoglobulinas y del receptor del linfocito T. En la segunda también estarían involucrados mecanismos alterados de recombinación genética V(D)J, pero posiblemente a través de una proteína nuclear denominada DNA-PK (protein-kinasa dependiente de DNA).

c) Deficiencia de ADA. Es otra forma clásica de IDCS (fenotipo variable T-, NK-, B-). Representa aproximadamente el 15% de la totalidad de los casos de estas entidades. Se debe a mutaciones en el gen que codifica la enzima Adenosin Desaminasa, en el cromosoma 20q13. Esta enzima participa en el metabolismo de las purinas y se encuentra distribuida en todos los tejidos, pero con mayor actividad en el timo. La deficiencia de ADA determina la acumulación de intermediarios tóxicos de la síntesis de bases púricas (adenosina, 2' deoxyadenosina y 2'-O metiladenosina), que directa o indirectamente llevan a apoptosis de los linfocitos.

Recientemente se han identificado variantes de deficiencias de ADA, según el tipo de mutación encontrada. Las deleciones de la región catalítica del gen se relacionan con fenotipos clínicos muy graves, mientras que las mutaciones puntuales que dan lugar a formas inactivas o inestables de la proteína, se correlacionan con fenotipos más benignos de la enfermedad. Es la primera IDP en la que se ha ensayado terapia génica.

Otra deficiencia enzimática es también capaz de producir enfermedad inmunológica. Se trata de la deficiencia de **Fosforilasa del nucleósido purina (PNP)**, que se debe a defectos en el gen que codifica la enzima localizado en el cromosoma 14q13.1. En su ausencia se acumulan metabolitos

tóxicos (desoxi guanosina trifosfato). Los LT son particularmente sensibles a la acumulación de d-GTP por lo que se afectan en mayor grado que los LB (a diferencia de déficit de ADA).

d) Disgenesia reticular. Es un síndrome muy infrecuente que asocia a la deficiencia inmune con fenotipo T-, NK-, B-, neutropenia y ocasionalmente trombocitopenia. La alteración que da lugar a esta entidad todavía no se conoce, pero tiene semejanzas con una enfermedad murina producida por mutaciones en el gen Pu-1, que afecta la linfopoiesis y la mielopoyesis.

A diferencia de las formas clásicas que se describieron hasta ahora, las formas atípicas o no clásicas de inmunodeficiencia combinada pueden presentarse con recuentos linfocitarios normales, grados variables de hipogammaglobulinemia y en algunos casos, sólo con alteraciones funcionales. Aún en una misma familia, individuos portadores de la enfermedad, han desarrollado fenotipos clínicos diversos (infecciones severas en un miembro y autoinmunidad en otro) y de distinta gravedad. Dentro de este grupo de entidades se incluye, entre otras: deficiencia de expresión de MHC clase II, deficiencia de CD8 o ZAP-70, deficiencia múltiple de producción de interleuquinas, deficiencia de IL-2 y las deficiencias de expresión de moléculas del complejo CD3 (cadenas γ y ϵ) (ver capítulo 7).

a) Defectos en la expresión de MHC. Se llamó originalmente "Síndrome del linfocito desnudo". Es una inmunodeficiencia heterogénea desde el punto de vista genético ya que puede producirse por mutaciones en distintas proteínas que promueven la transcripción de moléculas MHC clase II. Se hereda de forma autosómica recesiva.

El número de células T CD4+ en la mayor parte de los casos está disminuido, pero el recuento de CD8+ es normal. Se presenta con hipogammaglobulinemia y ausencia de respuesta de las células T a antígenos específicos, con respuesta normal a estímulos mitogénicos.

b) Defectos de activación y función de células T. Estos defectos, se caracterizan por la presencia de un número normal de células T pero que no son capaces de proliferar o producir citoquinas en respuesta a estimulación con mitógenos, antígenos u otras señales de activación del TCR.

La caracterización a nivel molecular ha demostrado en algunos de estos casos expresión de



ficiente del complejo CD3/TCR debido a mutaciones que dan lugar a deficiencia selectiva de la subunidad γ o ϵ del CD3.

Otro de estos síndromes, es el denominado deficiencia de CD8 o de ZAP-70. La ZAP-70 es una proteína quinasa fundamental para los mecanismos de señalización intracelular del TCR (ver capítulo 10). Los pacientes con esta deficiencia muestran valores normales o aumentados de linfocitos, con células CD4 aumentadas y ausencia de CD8. El timo muestra estructura normal,

con LT doble positivos, CD4+ CD8+, LT CD4 normales y ausencia de CD8, demostrando que la ZAP 70 es crítica para la diferenciación intratímica de esta última subpoblación. *In vitro*, las células mononucleares de estos pacientes no responden al estímulo del TCR con anti-CD3, pero la respuesta es normal cuando se estimulan con PMA + ionomicina, evidenciando un defecto temprano de la estimulación del receptor del LT.

En la tabla 30-4, se muestran algunos ejemplos de ID combinadas de células T y B.

Tabla 30 -4. Inmunodeficiencias Combinadas

Enfermedad	Fenotipo	Herencia	Defecto
IDCS típicas			
IDCS	T - NK - B+	Ligada al X	Gen cadena gama R IL-2, 4, 7, 9 y 15
		AR	Gen Jak3
	T- NK+B-	AR	Genes RAG1/RAG2
		AR	Radiorresistentes
		AR	Recombinación Radiosensible
Deficiencia de ADA	T-B-(↓ progresiva) NK variable	AR	Gen ADA
Disgenesia Reticular	T-NK-B- Granulocitos-	---	---
IDCS atípicas			
Deficiencia MHC clase II	Variable.CD4↓	AR	Genes CIITA, RFX5
Deficiencia de moléculas CD3/TCR	CD3↓ o ausentes	AR	Genes cadena γ , ϵ
Deficiencia de IL2	Normal	AR	---
Def. de múltiples citoquinas	Normal	---	---
Síndrome de Ommen	Linfocitosis Th2 oligoclonal	AR	Genes RAG1/ RAG2
Deficiencia de CD8	CD8 ausentes	AR	Gen ZAP -70
Deficiencia de PNP	↓CD3 progresiva	AR	Gen PNP

IDCS Típicas: con linfopenia, agammaglobulinemia y falta de repuesta a antígenos y mitógenos.

IDCS Atípicas: sin linfopenia, con o sin hipogammaglobulinemia. En algunos casos la respuesta celular *in vitro* es deficiente sólo a antígenos.



2.3.3. Inmunodeficiencias asociadas a otros defectos

Son un grupo de enfermedades que comprometen múltiples sistemas.

a) Anomalia de DiGeorge. Resulta de un desarrollo defectuoso durante la embriogénesis del 3º y 4º arcos faríngeos. Estas estructuras dan origen al timo y paratiroides en la sexta a octava semana de gestación y al arco aórtico y porciones de los labios y orejas a las 12 semanas de gestación.

La mayoría de los pacientes presentan deleciones a nivel del cromosoma 22q11 que se han denominado “CATCH-22” debido a las anomalías que se originan: Cardíacas, Facie Anormal (dismórfica con micrognatia) Hipoplasia o Aplasia Tímica, paladar hendido (en inglés *Cleft*) e Hipocalcemia (por ausencia de paratiroides). Se han descrito otros casos que se asocian a consumo de alcohol o diabetes materna.

La mayoría de los niños afectados presentan tetania y/o falla cardíaca neonatal. Sólo un 20% de ellos presenta número o función de LT disminuidos. Los niños que sobreviven pueden adquirir células T funcionales y corregir su inmunodeficiencia. Esto es probablemente por la presencia de algo de tejido tímico o porque algún sitio extra tímico pueda asumir la función de la maduración de los LT. La existencia de estos sitios se ha sospechado pero no se han podido definir anatómicamente.

b) Síndrome de Wiskott-Aldrich. Se hereda como una enfermedad recesiva ligada al X y se caracteriza por eczema, trombocitopenia y susceptibilidad a infecciones bacterianas. Las plaquetas son pequeñas. Existe una expresión reducida de muchas glicoproteínas de superficie (CD43) pero su papel en la inmunodeficiencia no está claro.

El gen responsable se encuentra en el brazo corto (p11.22) del cromosoma X. El producto de este gen, una proteína rica en prolina llamada WASP, está involucrada en la regulación de la función linfocitaria y plaquetaria. Controla el ensamblaje de filamentos de actina que se requieren para la formación de microvesículas. La respuesta proliferativa de células T está ausente o muy disminuida. Las Igs pueden inicialmente ser normales pero luego disminuye especialmente IgM y suele asociarse con aumento de IgA e IgE. Hay déficit de producción de anticuerpos especialmente

frente a antígenos polisacáridos. Es importante el aumento en el riesgo de enfermedades linfoproliferativas malignas.

c) Ataxia telangiectasia. Este síndrome autosómico recesivo se caracteriza por ataxia cerebelar, telangiectasias (en lóbulos de las orejas y conjuntivas), y, en la mayoría de los pacientes, infecciones sinopulmonares recurrentes y marcada incidencia de tumores. Regularmente se encuentran niveles elevados de α feto proteína. Desde el punto de vista inmunológico, la inmunodeficiencia si no está presente se desarrolla posteriormente en el 70% de los casos. Las alteraciones son variables, siendo la más frecuente la disminución de Igs (IgG₂, IgG₄, IgA, IgE), y la respuesta a anticuerpos específicos deficiente que conduce a las infecciones recidivantes del aparato respiratorio. La función y número de LT se encuentra reducido.

El defecto genético asociado a esta enfermedad mapea en el cromosoma 11q23.1 La proteína codificada por este gen, ATM, se encuentra relacionada con el control del ciclo celular, transducción de señales mitogénicas, recombinación meiótica y respuesta al daño del DNA. Existe un aumento de la sensibilidad a radiaciones ionizantes debido a reparación del DNA defectuoso.

d) Síndrome de Chediak-Higashi (CHS) y Síndrome de Griscelli (GS). Tanto el CHS incluido por la OMS entre las deficiencias asociadas a otros defectos, como el GS, entidades de herencia autosómica recesiva, se caracterizan fenotípicamente por presentar albinismo parcial oculocutáneo, acompañado de disfunción N, alteraciones en la quimiotaxis y un grado variable de compromiso T. Estas alteraciones redundan en una predisposición a padecer infecciones piógenas. El CHS, a diferencia del GS, presenta gránulos gigantes intracitoplasmáticos en múltiples células, siendo fácilmente distinguibles en los neutrófilos.

El fenómeno distintivo de estas entidades, es la presencia de “fases aceleradas”, cuadros sistémicos de activación descontrolada del sistema inmune, gatilladas generalmente por intercurrentes infecciosas. Estos cuadros son también conocidos como síndrome hemofagocítico, linohistiocitosis hemofagocítica o síndrome de activación macrofágica. Clínicamente se presentan con fiebre, citopenias hemáticas (por lo menos dos linajes afectados), esplenomegalia, hipertrigliceridemia y/o hipofibrinogenemia, e



infiltración linfocitaria no maligna en médula ósea, ganglio o bazo, acompañada de hemofagocitosis.

El tratamiento de estos síndromes se basa en una potente inmunosupresión, pero sólo el trasplante de médula ósea despeja la posibilidad de desarrollar nuevamente cuadros similares.

A pesar de compartir la gran mayoría de sus características clínicas, el CHS y el GS codifican en cromosomas distintos: el primero mapea para la proteína VPS5 en el cromosoma 1q43, mientras que el segundo lo hace para la Myosin 5a, en el cromosoma 15q21. Ambas proteínas están involucradas en tráfico intracelular de organelos.

e) Inmunodeficiencia con respuesta inadecuada al virus de Epstein-Barr. Es una enfermedad de herencia ligada al cromosoma X, conocida también como síndrome de Duncan o Purtilo. Los individuos con este síndrome, son varones aparentemente sanos hasta que contraen la infección con el virus de Epstein-Barr y desarrollan mononucleosis infecciosa. La evolución de la infección es fatal en el 60-70% de los pacientes, principalmente debido a una necrosis hepática causada por LT citotóxicos activados. La mayoría de los que sobreviven desarrollan en distintos tiempos, linfomas B o hipogammaglobulinemia. En los portadores de esta enfermedad, la infección con el virus de Epstein-Barr gatilla una respuesta inmune vigorosa y descontrolada, acompañada de una proliferación policlonal T y B. La respuesta humoral contra el virus se desarrolla normalmente contra el antígeno de la cápside viral (VCA), pero es inexistente contra sus antígenos nucleares (EBNA). Se describe también una deficiente respuesta celular específica contra el virus, a pesar del incremento de los linfocitos CD8+, así como un déficit de la función citotóxica anticuerpo-dependiente (ADCC), mediada esta última por las células NK.

La alteración molecular relacionada con esta enfermedad ha sido localizada en el brazo largo del cromosoma X (Xq26) y codifica una proteína no catalítica denominada SH2D1A presente en células T y NK, cuya función sería la de evitar la activación celular.

2.3.4. Defectos congénitos de inmunidad natural

La inmunidad innata es mediada principalmente por los fagocitos y el complemento, y cons-

tituye la principal línea de defensa contra organismos infecciosos. Los fagocitos y el complemento participan además en la fase efectora de la respuesta inmune específica.

a) Deficiencias del Complemento. Se han demostrado deficiencias de todos los Componentes del Complemento (C1_q, C1, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9) a excepción de deficiencia de Factor B (ver capítulo 18).

En todos los casos se transmiten como defectos autosómicos recesivos; los casos heterocigotos pueden detectarse porque su suero contiene aproximadamente la mitad del nivel normal del componente deficiente. Las deficiencias de la vía alterna son muy raras. El defecto más común es C9 encontrado en donantes de sangre japoneses (sin asociación a enfermedades). Los defectos de C1, C4 o C2 se asocian a una mayor incidencia de enfermedades autoinmunes y/o por complejos inmunes. La ausencia de C3 con infecciones recurrentes severas por gérmenes gram negativos y gram positivos. En pacientes con déficit homocigoto de C5, C6, C7 y C8 se han demostrado infecciones recurrentes por *Neisserias*. (gonococo, meningococo).

Se han descrito asimismo deficiencias de Proteínas Reguladoras del Complemento solubles y asociadas a membranas:

Angioedema Hereditario o Enfermedad de Quincke. Es una deficiencia autosómica dominante del C1INH. Clínicamente se presenta como angioedema de la piel y mucosas causada por traumas o algunas veces infecciones virales que pueden llevar a la muerte por edema laríngeo. El compromiso de la mucosa intestinal produce dolor abdominal. Los ataques duran 48 - 72 horas y ceden al caer los niveles de C4 y C2. En el 85% de los casos hay un defecto en la síntesis de la proteína inhibidora de C1, en el resto puede existir una cantidad normal pero hay función defectuosa.

Las deficiencias de factores reguladores solubles de la vía alternativa (Factor I y Factor H) son raras. Deficiencias de proteínas reguladoras asociadas a membranas incluyen ausencia de DAF ("Decay Accelerating Factor"), HRF (Factor de restricción homólogo) y CD59. En ausencia de estas proteínas se puede producir lisis por activación del complemento en la superficie de glóbulo rojo dando origen a la enfermedad conocida como Hemoglobinuria Paroxística Nocturna.



b) Defectos de los fagocitos. Pueden existir defectos en el número (neutropenia) o la función fagocítica. Esta depende del movimiento en respuesta al estímulo quimiotáctico, adherencia, endocitosis y destrucción ("Killing") de las partículas ingeridas. La movilidad depende de la integridad del citoesqueleto y del sistema contráctil de la célula. La endocitosis depende de la expresión de ciertos receptores para IgG, C3b y IC3b, y de la fluidez de la membrana. Los defectos de la función fagocítica se enumeran en la tabla 30-1

Enfermedad granulomatosa crónica (EGC). Es un grupo de defectos caracterizados por falla en la producción de radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y otros radicales de oxígeno fundamentales para la muerte intracelular de los microorganismos.

Los pacientes afectados desarrollan infecciones recurrentes (adenitis, neumonía, osteomielitis, abscesos, hepatitis) por bacterias generalmente productoras de catalasa (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*), hongos (*Nocardia*, *Aspergillus*) y otros, con formación de granulomas especialmente en ganglios linfáticos, hígado y pulmón.

La reacción $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{O}_2 + \text{H}^+$ requiere un citocromo b específico de los fagocitos y NADPH oxidasa. El citocromo b558 es un heterodímero compuesto de una cadena de 91 kDa y otra de 22 kDa. En aproximadamente un 62% de los pacientes la enfermedad es ligada al cromosoma X y se han encontrado mutaciones del gen que codifica la cadena 91 kDa (gp 91 phox). El 38% restante presenta herencia autosómica recesiva debido a mutaciones del gen que codifica la cadena 22kDa o 1 de 2 proteínas citosólicas solubles (gp 47 phox o gp 67 phox).

In vitro, se ha logrado corregir el defecto por expresión de gp91 phox utilizando retrovirus. Desde el punto de vista clínico el uso de IFN γ recombinante ha demostrado ser útil en prevenir infecciones serias pero no se han comprobado cambios significativos en la producción de anión superóxido por los fagocitos.

Deficiencias de adhesión leucocitaria 1 y 2. La deficiencia de adhesión leucocitaria tipo 1 (LAD-1) es una enfermedad autosómica recesiva rara que se caracteriza por infecciones de la piel, periodontitis y fístulas intestinales o perianales. Existe además un retardo en la caída del cordón umbilical y dificultad en la curación de heridas.

La base molecular del defecto es expresión deficiente o ausente de la cadena β (CD18) del subgrupo de integrinas $\beta 2$ CD11a, CD18, CD11b, CD18 y CD11c CD18). Estas proteínas participan en la adhesión de los leucocitos a otras células y en la fagocitosis de partículas recubiertas de Complemento. El gen CD18 se ha clonado y secuenciado por lo que esta enfermedad es una más de las candidatas a terapia génica.

Se ha descrito una segunda forma de deficiencia de adhesión leucocitaria (LAD-2) que se debe a la ausencia del ligando Lewis X para las moléculas de adhesión selectina en el endotelio vascular (ver capítulo 12)

3. TRATAMIENTO DE LAS INMUNODEFICIENCIAS CONGÉNITAS

En teoría, la terapia de elección es reemplazar el gen defectuoso. Como se mencionó anteriormente, esta terapia se ha iniciado en algunas inmunodeficiencias seleccionadas.

En la mayoría de los casos, el tratamiento actual tiene como objetivos, controlar las infecciones y reemplazar el componente defectuoso del sistema inmune. Los procesos infecciosos deben ser tratados rápidamente y con dosis apropiadas del antibiótico seleccionado según antibiograma. El uso profiláctico de antibióticos de amplio espectro y poco generadores de resistencia, como el cotrimoxazol, es una práctica frecuente y efectiva entre estos pacientes.

En todo paciente con deficiencia de la respuesta inmune celular, las transfusiones, si son necesarias, deben realizarse con sangre irradiada y filtrada de leucocitos, por el riesgo de reacción injerto contra huésped. Las inmunizaciones con gérmenes vivos como las vacunas Sabin (Poliomielitis) y la BCG (tuberculosis), están formalmente contraindicadas.

Las terapias de reemplazo que han demostrado utilidad, son las siguientes:

a) Gammaglobulinas. Se usa en pacientes con deficiencia de anticuerpos, siendo la administración endovenosa la vía de elección. Se recomiendan dosis de 400 a 600 mg/kg/mes, que permitan mantener niveles séricos de IgG superiores a los 400-500 mg/dL. Son indicación absoluta de tratamiento permanente con gammaglobulina la Agammaglobulinemia ligada al sexo, la Deficiencia con hiper IgM, y la Inmunodeficiencia Común



Variable. Las deficiencias de subclases de IgG, asociadas o no a deficiencia IgA, se benefician con el tratamiento sustitutivo con gamaglobulina. En la deficiencia selectiva de IgA, el uso de gamaglobulina está contraindicado por sus potenciales efectos adversos.

Las Deficiencias Combinadas Severas y otras deficiencias como el Síndrome de Wiskott Aldrich, se benefician con el reemplazo de gamaglobulina como tratamiento auxiliar, pero deben implementarse otros tratamientos para corregir los defectos subyacentes.

El desarrollo de efectos adversos, del tipo de las reacciones anafilácticas, se producen con poca frecuencia y por mecanismos no bien aclarados. Con la GGEV, la infusión lenta reduce o elimina estos efectos.

b) Trasplante de médula ósea. El trasplante de médula ósea (TMO) de donante HLA idéntico (hermanos o miembros HLA idénticos en la familia) que ha llevado a una reconstitución inmunológica completa en pacientes con IDCS (incluyendo deficiencia de ADA y PNP), Disgenesia reticular, en Síndrome de Wiskott-Aldrich, Déficit de adhesión leucocitaria y Déficit de moléculas MHC clase II. Desafortunadamente 2/3 de los pacientes no tienen un donante compatible. En estos casos puede utilizarse médula idéntica no relacionada proveniente de "Bancos de médula" o se deberá realizar el trasplante con médula ósea haplo idéntica siendo necesario eliminar las células T del injerto para prevenir una complicación grave del TMO, la Enfermedad de injerto versus huésped.

La recuperación inmunológica post-trasplante puede evaluarse por la mejoría clínica, la presencia de linajes celulares inexistentes en el receptor antes del procedimiento. Ejemplo: linfocitos T y NK, en un paciente portador de IDCS-LX, la recuperación de la actividad enzimática en los deficientes previos, la presencia de inmunoglobulinas séricas o la detección de quimerismo celular (coexistencia de células del donante con las del receptor) por técnicas moleculares, entre otras.

c) Reemplazo enzimático: El reemplazo parcial de ADA o PNP puede efectuarse con glóbulos rojos congelados irradiados y ADA bovina modificada por conjugación con polietilenglicol.

LECTURAS SUGERIDAS

Buckley, R., "Primary immunodeficiency diseases due to defects in lymphocytes", *N Engl J Med*, 343:18 1319-1324, 2000.

Cavazzana-Calvo, M.; Hacein-Bey, S.; de Saint Basille, G. et al, "Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease", *Science*, 288: 669-672, 2000.

Conley, M.E.; Notarangelo L.; Etzioni A., "Diagnostic criteria for primary immunodeficiency", *Clin Immunol* 93:3 190-197, 1999.

Chain, M., R. (ed), "Primary T-cell immunodeficiencies", *Immunol and Allergy Clinics of North America*, 20:1, 2000

Chain M., R. (ed), "Humoral immunodeficiencies", *Immunol and Allergy Clinics of North America*, 21:1, 2001.

Ochs, H.; Smith, E.; Puck, J., **In Primary Immunodeficiency Diseases. A molecular and genetic approach**, Oxford University Press, 1999.

Pevy, P.; Muto, T.; Levy, Y. et. al., "Activation induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of hyper-IgM syndrome (HIGM2)", *Cell*, 102: 565-575, 2000.

"Primary immunodeficiency diseases: report of an IUS scientific committee", *Clin Exp Immunol*, 118: Suppl 1:1-28, 1999.



Capítulo 31

INMUNODEFICIENCIAS SECUNDARIAS

María Antonieta Guzmán M. y Cecilia Sepúlveda C.

- | | |
|---|---|
| 1. Introducción | 6. Inmunodeficiencia inducida por cirugía y trauma |
| 2. Infección por VIH y SIDA | 7. Inmunodeficiencia secundaria a enfermedades infecciosas |
| 2.1. Magnitud del problema | 7.1. Inmunodeficiencia secundaria a infecciones virales |
| 2.2. Características del virus | 7.2. Inmunodeficiencia secundaria a infecciones bacterianas y fúngicas |
| 2.3. Progresión de la infección por VIH-1 | 7.3. Inmunodeficiencia secundaria a infecciones parasitarias |
| 2.4. Ingreso al organismo | 8. Inmunodeficiencia secundaria a enfermedades infiltrativas y tumores |
| 2.5. Respuesta inmune anti-VIH | 8.1. Evasión de la respuesta inmune por tumores |
| 2.6. Diagnóstico de laboratorio | 8.2. Defectos inmunológicos en tumores |
| 2.7. Tratamiento | 9. Inmunodeficiencia secundaria a terapia inmunosupresora |
| 3. Sistema inmune fetal y neonatal | 9.1. Mecanismos de acción |
| 3.1. Inmunidad celular | 9.2. Impacto de la inmunodeficiencia asociada a inmunosupresores |
| 3.2. Inmunidad humoral | |
| 3.3. Inmunidad innata | |
| 4. Envejecimiento y sistema inmune | |
| 4.1. Inmunidad celular | |
| 4.2. Inmunidad humoral | |
| 5. Inmunidad y nutrición | |
| 5.1. Inmunidad celular | |
| 5.2. Déficit de nutrientes específicos | |





RESUMEN

En este capítulo se incluyen las inmunodeficiencias secundarias más frecuentes, tanto en el niño como en el adulto. Se hace énfasis especial en la infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), debido a su relevancia como problema de salud pública en todo el mundo. Además, aun cuando no constituyen inmunodeficiencias secundarias propiamente tales, se han incorporado algunos aspectos relevantes del sistema inmune neonatal y del sistema inmune del senescente, edades extremas de la vida en las cuales el sistema inmune presenta algunas características especiales que pueden mejorar una inmunodeficiencia.

1. INTRODUCCIÓN

Las inmunodeficiencias secundarias son aquellas que, a diferencia de las inmunodeficiencias primarias, no son causadas por alteraciones intrínsecas en el desarrollo y función de los componentes del sistema inmune. Estas inmunodeficiencias pueden afectar a uno o a varios de sus componentes y pueden ser transitorias o definitivas de acuerdo a la naturaleza y posibilidades de tratamiento o eliminación de la causa que las produce. La más conocida es la infección por VIH y el SIDA, otros ejemplos son las inmunodeficiencias secundarias a malnutrición, enteropatías perdedoras de proteínas, tumores malignos linforreticulares, las inducidas por cirugía y trauma, tratamientos inmunosupresores y quimioterapia. Como grupo, las inmunodeficiencias secundarias son las más comunes, especialmente las asociadas al VIH y a la malnutrición, pudiendo presentarse a cualquier edad.

2. INFECCIÓN POR VIH Y SIDA

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida SIDA fue reconocido como una nueva enfermedad en el mundo, en el año 1981. Los primeros casos en ser identificados, que pusieron en alerta a la comunidad médica y científica, se diagnosticaron en hombres homosexuales jóvenes, previamente sanos, los cuales desarrollaron raras enfermedades tales como sarcoma de Kaposi y neumonía por *Pneumocystis carinii*. Aunque estas enfermedades se habían observado ocasional-

mente en algunos subgrupos de la población, por ejemplo en hombres ancianos de origen mediterráneo en el caso del sarcoma de Kaposi y la neumonía por *Pneumocystis carinii* en individuos inmunodeprimidos por terapias inmunosupresoras, la ocurrencia de este tipo de enfermedades en personas jóvenes previamente sanas no tenía precedentes. Una característica común en esta nueva enfermedad, era la presencia de una progresiva y severa inmunodeficiencia; de ahí su nombre, **síndrome**, porque se presenta como un conjunto de signos y síntomas relacionados, **de inmunodeficiencia adquirida**, para distinguirlo de formas congénitas de inmunodeficiencia.

Pronto se reportaron casos de SIDA en otros grupos de la población, tales como consumidores de drogas intravenosas (CDI), personas que habían recibido transfusiones y productos de la sangre como los hemofílicos y, por último, hijos de madres con SIDA.

Todo indicaba que un agente infeccioso transmisible por contacto sexual íntimo y por la sangre era el responsable de este síndrome, y en 1983 se identificó y reconoció como agente causal del SIDA, el virus de inmunodeficiencia humano (VIH). Este virus tiene la particularidad de dañar al sistema de defensas del organismo, como queda de manifiesto por la severa disminución e incluso eliminación de los linfocitos T CD4+ ("helper") que lo caracteriza, en consecuencia, el individuo queda inerme frente a la agresión de múltiples agentes infecciosos y la muerte se produce, de no mediar ningún tratamiento, principalmente debido a estas complicaciones.



2.1. Magnitud del problema

La infección por VIH y el SIDA constituyen una epidemia mundial de gran magnitud, el VIH se ha propagado y sigue propagándose por todo el orbe, apareciendo incluso en comunidades inicialmente poco afectadas por la epidemia. Hasta fines de 2000, según las estimaciones del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), copatrocinadora del ONUSIDA, había en el mundo un total de 36,4 millones de personas viviendo con el VIH/SIDA, de los cuales más de 14 millones corresponden a mujeres. El número total de niños menores de 15 años con VIH, infectados en su mayoría a través de su madre antes de nacer, durante el parto o por la lactancia natural, se calcula en aproximadamente 5 millones desde los inicios de la epidemia, de los cuales alrededor de 3 millones ya han fallecido. Se calcula en alrededor de 16.000 las nuevas infecciones por el VIH que ocurren diariamente, de las cuales al menos un 60% ocurre en adolescentes y niños.

En América latina y el Caribe hay aproximadamente 1,8 millones de personas que viven con el VIH, calculándose la prevalencia del VIH en alrededor de 1 de cada 100 adultos en casi todos los 44 países y territorios de la región. Las tasas más altas se observan en países como Brasil y Argentina, y las más bajas en Ecuador y Bolivia.

En Chile, el primer caso de SIDA se notificó en 1984 y hasta el 30 de junio de 2000 se habían notificado 3.741 enfermos y 3.492 portadores asintomáticos en las trece regiones del país. La cifra real de portadores del VIH en el país podría ascender a alrededor de 30.000-40.000 personas.

El 89,7 % de los casos de SIDA son hombres y el 10,3% mujeres, con un crecimiento mayor de casos de SIDA en mujeres en relación a los hombres, incluyendo todos los mecanismos de transmisión. La proporción de casos de SIDA entre hombres y mujeres ha disminuido con el tiempo, desde 31,5:1 en 1990 a 8,5:1 en 1997.

Los principales grupos de edad afectados están entre los 20 y 49 años y concentran el 85,2% de los casos. Los menores de 20 años representan el 2,7% y los mayores de 50 el 12,1%. En cuanto a las categorías de exposición, la principal es la exposición sexual con el 92% de los casos. La vía sanguínea alcanza al 6% desde el inicio de la epi-

demia. La detección de anticuerpos anti-VIH se implementó en los bancos de sangre del país a partir del segundo semestre de 1987, frenando la exposición por transfusiones de sangre y otros productos hemoderivados. Sin embargo, se observa un aumento de casos asociados a la drogadicción intravenosa, vía que es hoy la fundamental dentro de la transmisión sanguínea. Los casos asociados a transmisión vertical constituyen el 2% del total, con una tasa de transmisión del VIH de la madre infectada a su hijo que alcanza al 27%, cifra acumulada desde el inicio de la epidemia.

2. 2. Características del virus

El VIH está clasificado en la familia Retroviridae y pertenece a la subfamilia de los lentivirus. Se distinguen dos tipos de VIH: VIH-1 y VIH-2, siendo el VIH-1 más importante debido a su potencial patogénico mayor, reflejado en su rápida diseminación por todo el mundo. El VIH-1 infecta las células CD4+ del sistema inmune, conduciendo a una profunda depresión de la inmunidad. Sin embargo, este virus también puede infectar otras células, como se verá más adelante.

Estructura del VIH

Al microscopio electrónico, el VIH tiene las características de un lentivirus, con un *core* con forma de cono compuesto por proteínas. Dentro de esta cápside o nucleóide se encuentran dos hebras idénticas de ácido ribonucleico (RNA), el material genético del virus, estrechamente asociadas con la enzima transcriptasa reversa que transcribe el RNA viral en DNA en la célula hospedera, otras enzimas y proteínas.

La superficie del virus se caracteriza por la presencia de 72 trímeros o tetrámeros formados por las glicoproteínas de envoltura. Éstas se originan a partir de un precursor de 160 kDa, la glicoproteína (gp) 160, la cual es clivada dentro de la célula hospedera en una gp 120 externa y una gp 41 de transmembrana. Parte de la porción central y terminal de la gp41 también se expresa hacia el exterior del virión, donde se une a la gp120 de manera no covalente.

La gp120 del virión, localizada externamente, contiene el sitio de unión para el receptor celular y los dominios neutralizantes mayores. Se ha reportado que la porción externa de la gp41 y parte de la p17, contienen epítomos de reconocimiento para anticuerpos neutralizantes.



Organización genómica del VIH-1

El tamaño genómico del VIH-1 es de alrededor de 9,8 kb. Contiene genes estructurales: *gag*, *pol* y *env*, y al menos 8 genes reguladores.

El transcripto primario del VIH es un RNA mensajero (mRNA) largo, el cual es traducido en las proteínas Gag y Pol. Por clivaje proteolítico, se originan las proteínas y enzimas maduras. Los productos de los genes no estructurales del VIH constituyen una variedad de proteínas virales reguladoras y accesorias que pueden afectar la replicación del virus en varios tipos celulares. Algunos estudios sugieren que los genes accesorios pueden ser más importantes para la replicación del VIH-1 en los macrófagos que en los linfocitos CD4+.

Variación genética del VIH-1

El VIH-1 se encuentra en los individuos infectados como mezcla de variantes virales genéticamente relacionadas, llamadas *cuasiespecies*, que son el resultado de una alta tasa de error en la actividad de la transcriptasa reversa. La variación genética observada no está distribuida uniformemente en el genoma viral, siendo *env* el gen viral más variable y *gag* y *pol* más conservados. Sin embargo, no todas las regiones de *env* varían en la misma forma, distinguiéndose 5 regiones variables (V1 a V5) y 4 regiones constantes. La tercera región hipervariable de la gp120, que tiene una estructura en asa central o *loop* V3, contiene el sitio más importante para la neutralización por anticuerpos. El asa V3 también está involucrada en el tropismo celular y formación de sincicios. Esta gran variación genética en un mismo individuo, da cuenta de la rápida emergencia de variantes resistentes a anticuerpos neutralizantes, a células T citolíticas y drogas antirretrovirales. Además, la naturaleza diploide del genoma del VIH contribuye a aumentar la variación viral mediante la recombinación genética.

Ciclo de replicación viral

La transmisión del VIH requiere de una adecuada interacción del virus con receptores de la superficie de la célula hospedera. Luego de ésta, se producen diversos eventos que facilitan la penetración de la cápside viral a través de la membrana celular.

El principal receptor celular del VIH es la

molécula **CD4**, presente en la membrana de las células CD4+, en particular linfocitos T helper (LTh). El sitio de unión de CD4 a la gp120 del virus se ha localizado en D1, la misma región de CD4 de unión a las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) clase II. En el virus, la región principal de unión a CD4 está en la región conservada C4, cerca del extremo carboxiterminal de la gp120. En esta interacción, de gran afinidad, son importantes la conformación tanto de CD4 como de la gp120.

Enseguida de la unión de la gp120 a la molécula CD4, la gp120 se desplaza, permitiendo la exposición del dominio de fusión de la gp41, necesario para la continuación del proceso. Este dominio se uniría a un receptor de fusión celular, permitiendo la fusión del VIH con la célula.

Varios estudios sobre la interacción inicial virus-célula hospedera indicaron que el receptor CD4 solo no era suficiente ni tampoco el único medio para permitir la entrada viral a la células. De este modo, se llegó a identificar que ciertos receptores de quimioquinas actúan como correceptores del virus. Así, la molécula CXCR-4 actúa como correceptor para cepas virales linfocitotrópicas, usualmente con fenotipo inductor de sincicios, en cambio CCR-5, ayuda a las cepas macrofagotrópicas no inductoras de sincicios a entrar a la célula. Una variante genética de CCR-5, con una delección de 12 bp se ha relacionado con resistencia a la infección por VIH-1 e *in vitro*, las células mononucleares de sujetos que han estado expuestos al VIH, pero que son homocigotos para esta mutación habitualmente son resistentes a la infección. También se ha sugerido un retardo en la progresión de la enfermedad en individuos que son heterocigotos para el alelo mutante.

Los receptores de quimioquinas toman contacto estrecho con el asa V3, facilitando una unión más estrecha del virus con la membrana de la célula hospedera, facilitando así la fusión. El mecanismo de entrada de la cápside, sin embargo, es desconocido.

Muchas células CD4- son susceptibles de ser infectadas por VIH, incluyendo fibroblastos de la piel y de la pulpa dental, células foliculares dendríticas, células de la glia, células endoteliales de capilares cerebrales, células epiteliales cervicales, células del trofoblasto, células de epitelio intestinal, células del epitelio renal. Se postula que esta infección es posible por la interacción con receptores secundarios como los de



quimioquinas o por un receptor de fusión desconocido. También se ha demostrado que en neuronas actúan como receptores virales los glicolípidos de membrana galacilceramida y galacilsulfuro. Estos receptores se han relacionado también con la infección de células intestinales y del epitelio vaginal.

El VIH establece además uniones con otras moléculas presentes en la membrana de la célula hospedera y que pueden aumentar su infectividad, como por ejemplo moléculas MHC y moléculas de adhesión celular (LFA-1, ICAM-1, CD44), proteínas que unen la manosa presente en la envoltura viral.

Un concepto clave en los eventos iniciales de la interacción del VIH con la célula es que probablemente la unión a CD4 provoca cambios conformacionales tanto en la gp120 como en CD4. Esta alteración causa los cambios necesarios para la unión con CXCR-4, CCR-5, u otros co-receptores. Luego ocurre la fusión entre gp41 y el receptor de fusión y se produce la fusión virus-células, que es pH independiente. Enseguida se produce la entrada del *core* completo en la célula. Posteriormente se inician eventos intracelulares como la transcripción reversa, producción del DNA viral y su duplicación en un DNA de doble cadena que llega al núcleo en donde se integra en el DNA cromosomal. La producción del mRNA y del RNA genómico viral conduce posteriormente a la producción de las poliproteínas virales. Enseguida se incorpora el RNA genómico en la cápside formada en la membrana celular y en compartimientos intracelulares, ocurriendo el procesamiento de las poliproteínas Gag y Gag-Pol en la membrana celular y en los viriones en gemación. Estas proteínas procesadas se incorporan en la envoltura viral constituyendo los nuevos viriones maduros. En la tabla 31-1 se presentan las etapas del ciclo celular del VIH-1.

Mecanismos adicionales de entrada del virus a la célula hospedera pueden estar mediados por receptores Fc y del complemento. De hecho, en estudios sobre la respuesta humoral en la infección por VIH, se ha demostrado la facilitación de la infección viral mediada por anticuerpos.

Control de la replicación del virus

El estado de activación de las células T es importante para la replicación viral e involucra la

interacción de factores intracelulares con las regiones LTR (“long terminal repeat”) presentes en los extremos del genoma viral. Durante este proceso, se activan factores transcripcionales, por ejemplo NF- κ B cuya interacción con regiones de los LTR puede aumentar o suprimir la replicación viral. Ciertas citoquinas y hormonas, así como proteínas transactivadoras de otros virus, pueden también aumentar la producción del VIH vía estos eventos intracelulares.

Tabla 31-1. Ciclo celular del VIH

- Unión de la gp120 de la envoltura viral al receptor de superficie celular: CD4 u alternativo.
- Cambio conformacional de la gp120 y quizás de la moléculas CD4.
- Unión de otra región de la gp120 a un co-receptor.
- Desplazamiento de gp120.
- Clivaje proteolítico del asa V3.
- Interacción del domino de fusión del VIH (por ej. gp41) con un receptor de fusión de la superficie celular (posiblemente un glicolípido).
- Fusión virus:célula.
- Entrada del RNA viral asociado con el core al citoplasma celular.
- Inicio de la transcripción reversa.
- Producción del DNA viral a partir del RNA viral y su duplicación en hebras de doble cadena, generación forma circulares unidas covalentemente y no covalentemente.
- Transporte del DNA copiado al núcleo, integración de las formas circulares unidas no covalentemente al DNA cromosomal.
- Producción del mRNA viral y del RNA genómico viral a partir del DNA proviral integrado.
- Producción de proteínas virales.
- Incorporación del RNA genómico en la cápside formada en la membrana celular.
- Procesamiento de las poliproteínas Gag y Gag-Pol en la superficie celular y en los viriones en formación.
- Gemación de la cápside viral a través de la membrana celular con incorporación de las glicoproteínas de envoltura procesadas presentes en la superficie celular.



Mecanismos citopáticos

Muy importante en la comprensión de la patogénesis del VIH en el individuo infectado es el conocimiento de los mecanismos citopáticos por los que actúan el virus o sus proteínas sobre las células infectadas y no infectadas. Ciertos VIH-1 aislados de individuos con enfermedad avanzada, tienen una mayor capacidad para matar células infectadas en cultivo que los aislados de individuos asintomáticos. La muerte celular parece ser el resultado de la formación de células multinucleadas, necrosis y apoptosis.

La formación de células multinucleadas o sincicios que ocurre en cultivo, y quizás en el individuo, es el resultado de la fusión de células infectadas con células CD4+ no infectadas; parece involucrar carbohidratos y glicolípidos de la superficie celular y muy probablemente múltiples interacciones gp120:CD4. VIH inductores de sincicios (IS) se encuentran más frecuentemente en individuos con enfermedad avanzada. Sin embargo, exceptuando el cerebro, no hay evidencias de la existencia de células multinucleadas *in vivo*.

Varias observaciones han relacionado la muerte celular con toxicidad directa del virus o de la envoltura viral. El mecanismo no es claro, pero podría involucrar un cambio de la integridad de la membrana celular y/o apoptosis. Se ha descrito actividad citotóxica a varias proteínas virales.

La apoptosis acelerada de células T que se observa en la infección por VIH-1 puede estar relacionada con varios mecanismos: proteínas virales específicas que actúan como inductoras, interacción de las proteínas del virus con la molécula CD4, interacción de citoquinas con sus receptores (particularmente el sistema Fas/Fas-ligando). A todos estos mecanismos, pueden sumarse defectos de las células presentadoras de antígeno que llevan a una actividad defectuosa de las células T y, por último, una actividad tipo superantígeno del VIH.

2.3. Progresión de la infección por VIH-1

La evolución en el tiempo de un paciente con infección por VIH es muy variable, sin embargo, se han evidenciado múltiples factores, que intervienen en una mayor o menor progresión a SIDA. En general, se describen tres grupos de pacientes de acuerdo a su evolución: los progresores típicos, que corresponden al 80-90% de los casos, y cuya sobrevida es aproximadamente

10 años; los progresores rápidos, evolucionan a SIDA en 3 a 4 años, y corresponden al 5-10% de los casos; y finalmente, los no progresores, o progresores lentos, que corresponden a no más del 5% de los pacientes con infección por VIH, y que permanecen asintomáticos por períodos de más de 10 a 15 años, manteniendo recuentos de células CD4+ superiores a 400/μL, y cargas virales muy bajas o indetectables.

Existen varios cofactores involucrados en la evolución a la enfermedad, como la vía de transmisión, edad al momento de la infección, estado previo del sistema inmune del huésped, primoinfección sintomática, coinfecciones con otros patógenos, etc.

Se han descrito importantes asociaciones del sistema HLA ("Human Leukocyte Antigen", MHC en humanos) y progresión de la infección por VIH, en este sentido, se han identificado haplotipos HLA-A1/B8/DR3/B35, asociados con una rápida progresión a SIDA, y con una mayor susceptibilidad a la infección, en tanto haplotipos HLA-A9/A25/ A32/ B5/ B18/ B27/ DR5/ DR6/ DR13, se asocian a individuos que presentan una lenta progresión a SIDA, y haplotipos HLA-A2/ A28/ DR13, a personas seronegativas, frecuentemente expuestas al VIH, por lo que se asocian con cierta resistencia a la infección.

Otro factor importante a considerar en el curso de la infección por VIH, es la respuesta de células Th1 y Th2. Aparentemente se produciría un "switch" en el curso de la infección por VIH, predominando la respuesta Th2 sobre Th1, lo que se ha relacionado con una rápida progresión a SIDA.

2.4. Ingreso al organismo

El VIH ingresa al organismo, directamente a través del torrente sanguíneo, o a través de mucosas, pudiendo ingresar como virus libre o células infectadas, lo habitual es la transmisión sexual a nivel de la mucosa genital. Las primeras células infectadas son las células dendríticas de la lámina propia, éstas se fusionan con células CD4+, y se produce diseminación a otros tejidos. El VIH puede ser detectado en los ganglios linfáticos regionales, a los pocos días después de producida la infección. Posteriormente ocurre diseminación sistémica. Lesiones en la mucosa e inflamación, debido a úlceras genitales, uretritis o cervicitis, favorecen que se establezca la infección por VIH.

En los ganglios linfáticos se produce infección de células CD4+ activadas, y



diseminación a otros tejidos linfoides y órganos a distancia. Es importante comprender que desde el punto de vista virológico, no existe período de latencia, ya que estos órganos linfoides, constituyen un reservorio del virus, y un sitio de constante replicación. Existe un verdadero secuestro del VIH a nivel de las células dendrítico foliculares, presentes en los ganglios linfáticos.

2.5. Respuesta inmune anti-VIH

En la infección por VIH, la evolución a SIDA está relacionada con el éxito de la respuesta inmune en controlar la replicación y diseminación del virus. La respuesta inmune específica, tanto humoral como mediada por células se ha demostrado en pacientes con infección por VIH, sin embargo, está claro que esta inmunidad específica al virus, no confiere adecuada protección. Esto se explica, en cierta medida, por el hecho de que las células CD4+, necesarias para iniciar una respuesta inmune específica y protectora, son destruidas o alteradas funcionalmente; además el virus presenta un alto grado de variabilidad genética, lo que lleva a variaciones antigénicas, que le sirven al VIH para evadir al sistema inmune del huésped.

2.6. Diagnóstico de laboratorio

La pesquisa de anticuerpos anti-VIH en muestras de suero es el método más comúnmente empleado para el diagnóstico de laboratorio de la infección por VIH. Los antígenos usados en los ELISAs y otras pruebas de tamizaje para pesquisar anticuerpos anti-VIH incluyen péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2. Debido a que estas pruebas son muy sensibles pero no tan específicas, y dado la trascendencia del diagnóstico de infección por el VIH es necesaria la confirmación de los resultados positivos. Entre las pruebas de confirmación se pueden citar las basadas en la inmunoelectrotransferencia o “western blot” (la más usada), inmunofluorescencia indirecta, radioinmunoprecipitación e “immunoblot” con antígenos recombinantes.

2.7. Tratamiento

El tratamiento en los pacientes VIH positivos dependerá de la etapa en que se encuentra la enfermedad. Se han establecido parámetros clínicos y de laboratorio para decidir el momento más adecuado para iniciar este tratamiento, que no es

curativo sino que está orientado a suprimir la replicación viral, permitiendo la recuperación inmunológica del individuo, mejorando su estado de salud y calidad de vida.

a) Tratamiento antirretroviral

Los objetivos terapéuticos frente a la infección por VIH han ido evolucionando en función de la eficacia y seguridad de los antirretrovirales, y de una forma esquemática se han ido planteado las siguientes alternativas posibles: (i) Reducción sustancial de la carga viral, sin que necesariamente se pretenda que la viremia sea indetectable, (ii) carga viral plasmática indetectable y (iii) erradicación de la infección.

Los principios generales del tratamiento frente a la infección por VIH son los siguientes: (i) tratamiento intenso, con el propósito de suprimir al máximo la replicación viral, (ii) análisis de beneficios y riesgos del inicio del tratamiento antirretroviral, (iii) desarrollo de resistencia a los antirretrovirales, (iv) base de la terapéutica actual son las combinaciones de antirretrovirales, (v) el recuento de LT CD4+ y la carga viral son imprescindibles, (vi) la adherencia al tratamiento es un pilar esencial frente a la infección por VIH.

Los antirretrovirales disponibles comercialmente pertenecen a 3 familias: (i) los inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos: zidovudina (ZDV), didanosina (ddI), zalcitabina (ddC), estavudina (d4T), lamivudina (3TC), (ii) los inhibidores de la transcriptasa reversa no análogos de nucleósidos: delavirdina, y (iii) los inhibidores de proteasa: ritonavir (RIT), saquinavir (SAQ), indinavir (IND) y lopinavir. Cada uno de estos medicamentos tiene un perfil de efectos adversos que es necesario considerar, e interacciones con otros fármacos.

b) Otros tratamientos

En el paciente con infección por VIH es esencial la atención integral. No sólo considerar la terapia farmacológica, sino el apoyo psicológico para él y su entorno, apoyo nutricional, prevención de complicaciones oportunistas, uso adecuado de ciertas vacunas, prevención de reinfecciones con el VIH (sexo más seguro), entre otras medidas. En este marco también puede tener un lugar, en casos seleccionados, la terapia inmunológica con citoquinas como la IL-2 para estimular la reconstitución inmunológica.



Respuesta humoral

La producción de anticuerpos con especificidad para varios de los componentes virales, se produce precozmente en el curso de la infección por VIH, constituyendo la base para el diagnóstico. Hay evidencias que demuestran que una disminución de los anticuerpos anti-gag o anti-pol, precede la progresión a SIDA en 1 a 4 años.

Existen anticuerpos que pueden neutralizar la infectividad de virus libres, o unidos a membrana, antes de su entrada a las células, también se han reportado anticuerpos neutralizantes de proteínas estructurales internas. El principal epítipo neutralizante, está localizado en la región hipervariable de la gp120 de la envoltura, la región V3, los anticuerpos con especificidad para esta región son tipo-específico.

En el genoma viral, que codifica para las gp 120 y gp 41, se han identificado los sitios específicos de reconocimiento antigénico, de anticuerpos neutralizantes, con propiedad ADCC (Citotoxicidad dependiente de anticuerpos) y reconocimiento de células T específicas.

Los anticuerpos neutralizantes contra la región hipervariable V3 de la gp 120, al parecer inhiben la infección al bloquear cambios conformacionales de la gp120, necesarios para el proceso de fusión y entrada del VIH a la célula. También se han descrito anticuerpos neutralizantes contra la región de unión a CD4 de la gp120, su rol protector es menos eficaz que los anteriores.

Los niveles séricos de anticuerpos neutralizantes, aparecen 2 a 4 semanas después de la primoinfección, alcanzando su "peak" durante la fase asintomática. En etapas avanzadas de la infección, estos anticuerpos se encuentran a muy bajos niveles. En cuanto a los anticuerpos con propiedad ADCC, o fijación del complemento, existe aún bastante controversia de su rol benéfico o deletéreo *in vivo*. Se ha observado que anticuerpos anti-VIH, que median ADCC de células que expresan gp120 o gp41, se elevan precozmente en el curso de la infección, y son detectados a través de toda la evolución, disminuyendo sus niveles con el desarrollo de la enfermedad.

También se han descrito los anticuerpos facilitantes de la infección por VIH, vía receptores del complemento o fracción Fc de las inmunoglobulinas. El significado "*in vivo*" de estos anticuerpos facilitantes es aún controvertido, aunque se ha observado que su presencia se correlaciona con progresión a SIDA.

Respuesta celular

Existen evidencias de la importancia de la inmunidad celular específica anti-VIH, y de su rol en la progresión a SIDA. Se han identificado respuestas de células Th anti-VIH, células CD8+ que median citotoxicidad directa de células infectadas, vía restricción MHC clase I, y también células CD8+ que suprimen la replicación del VIH por mecanismos MHC independientes. Se han identificado los epítipos de la envoltura viral, que son el blanco de los LTh y LT citotóxicos, sin embargo, se ha evidenciado respuesta a la mayoría de las proteínas estructurales y reguladoras del virus.

Diferentes ensayos de inmunización activa, en modelos animales, han demostrado que la respuesta inmune mediada por LT CD8+, es la que mejor se correlaciona con protección de la infección por VIH.

Para desarrollar una vacuna anti-VIH eficaz, es necesario comprender ampliamente los aspectos de la inmunidad protectora anti-VIH.

3. SISTEMA INMUNE FETAL Y NEONATAL

El recién nacido está expuesto a infecciones neonatales por bacterias piógenas, virus y ciertos patógenos intracelulares como *Toxoplasma Gondii* y *Listeria Monocytogenes*, dada la **inmadurez** de su sistema inmunitario, tanto humoral como celular.

3.1. Inmunidad celular

Tanto los linfocitos T CD4+ como los T CD8+ aparecen en el hígado y bazo a las 14 semanas de gestación, luego se produce un aumento progresivo hasta los 6 meses de vida extrauterina que declina gradualmente hasta llegar a los niveles del adulto durante la infancia. La relación CD4/CD8 es mayor durante la vida fetal (3,5) vs 2,5 al término del embarazo. La relación en un adulto se estima entre 1,2 y 2,1.

Así, los linfocitos T en niños de término están aumentados en número y presentan una mayor expresión de CD38 (marcador timocitario) o de CD45RA (marcador de linfocitos T *naïve*, presentes en el 90% de estos linfocitos a esta edad vs un 60% de representación en la misma población T en un adulto).

También existe una respuesta normal a mitógenos pero una menor respuesta proliferativa



a anticuerpos anti-CD2 y anti-CD3, lo que correspondería a una propiedad general de los linfocitos T *naïve* más que a una característica única de los linfocitos T del recién nacido.

Existe además un déficit de la producción de linfoquinas, IL-3, IL-4, IL-5 e IFN- γ , comparado con la producción de los linfocitos T del adulto.

Por los factores ya mencionados y por la menor expresión de moléculas coestimuladoras, como por ejemplo el ligando CD40 de superficie, existe una menor colaboración para la función de los linfocitos B, que tienen una menor producción de anticuerpos.

En general, las respuestas T citotóxicas están disminuidas en recién nacidos, promediando el 30 a 60% de aquella generada por las células adultas.

3.2. Inmunidad humoral

Aunque existe síntesis de anticuerpos específicos desde las 20 a 24 semanas de vida intrauterina, la concentración de IgM e IgA es baja al momento de nacer, por la falta de exposición antigénica. Respecto a la inmunoglobulina G, el neonato depende del paso transplacentario de este anticuerpo para protegerse contra ciertos patógenos, lo que ocurre principalmente en las últimas 8 a 10 semanas de la gestación, por lo cual un niño prematuro es más susceptible a desarrollar estas infecciones. Este paso transplacentario comienza a niveles bajos desde la octava semana de gestación, aumenta progresivamente durante el embarazo y en el recién nacido de término incluso excede en 5 a 10% el nivel de inmunoglobulina G materna.

Los linfocitos B del feto y neonato humano son funcionalmente inmaduros y sus respuestas de anticuerpos específicas son esencialmente IgM y la respuesta a antígenos polisacáridos está severamente alterada. Los linfocitos B neonatales no se diferencian a células plasmáticas productoras de IgG o IgA por falta de colaboración de los LTh cuya actividad también está disminuida, como veremos posteriormente.

También puede producirse una tolerancia neonatal a antígenos encontrados durante la vida intrauterina y desarrollarse una anergia clonal de estos linfocitos específicos, y ello puede explicar el déficit de producción de anticuerpos que puede observarse en infecciones congénitas adquiridas tempranamente *in útero*, como la Rubéola.

Existe un problema adicional con ciertos patógenos, ante los cuales la respuesta materna es

principalmente de IgM, como por ej. Salmonellas y *Escherichia Coli* y donde los niveles de IgG protectores son suficientes para la madre, pero no para el feto o recién nacido, ya que la madre puede montar una respuesta inmune secundaria con rapidez y también una respuesta de IgM más rápida a estos antígenos de “evocación”, cuando su sistema inmune se encuentra nuevamente con el patógeno.

Respecto a los niveles de inmunoglobulinas, es importante destacar que la IgM alcanza el nivel de un adulto al año de vida, la IgA en la adolescencia y la IgG alrededor de los 5 a 6 años. En un niño prematuro, se observarán menores concentraciones de inmunoglobulinas que en un niño de término.

3.3. Inmunidad innata

Respecto a las concentraciones de los factores del Complemento, y su actividad funcional están disminuidas incluso en recién nacidos de término, y estas deficiencias son aún más evidentes en prematuros. La vía alterna más es la afectada.

La síntesis de los factores del complemento se inicia a las 6 a 14 semanas de vida intrauterina, pero no es significativa hasta el tercer trimestre de la gestación. Al término del embarazo, los niveles de las proteínas del complemento representan el 50 a 75% de los niveles maternos.

También se ha observado que la concentración de fibronectina, una glicoproteína de alto peso molecular, que actúa como opsonina, está reducida en el recién nacido, en especial en aquellos que presentan *distress* respiratorio, asfixia y cuadros sépticos.

Respecto a las características del sistema fagocítico a esta edad, podemos señalar que el número de neutrófilos circulantes se eleva poco después del nacimiento, pero la capacidad de respuesta medular y producción de nuevas células en la presencia de cuadros infecciosos es limitada, especialmente en prematuros. Estas células alcanzan un *peak* a las 12 a 14 horas del nacimiento, y posteriormente disminuyen, alcanzando a las 72 horas los niveles sanguíneos de un adulto.

El número de monocitos circulantes, está normal o aumentado en recién nacidos, con una capacidad de respuesta medular conservada. La producción de macrófagos comienza desde la cuarta semana de gestación, pero se desconoce el número de macrófagos tisulares en recién nacidos. Estas células tienen una permanencia de 2 a 3 meses en los tejidos, luego de un paso sanguíneo de 2 a 3 días como monocitos.



La quimiotaxis de neutrófilos y monocitos está disminuida, probablemente debido a una menor expresión de moléculas de adhesión, defecto que se hace más evidente en prematuros. Por este motivo, la liberación de monocitos a tejidos inflamados o infectados, está retardada.

Las funciones fagocítica y microbicida de neutrófilos y monocitos provenientes de recién nacidos sanos, están conservadas *in vitro* pero alteradas en niños enfermos, especialmente si son prematuros.

La producción de citoquinas monocitarias está relativamente conservada en recién nacidos de término, y son capaces de secretar IL-1, IL-6, TNF- α e IL-8, en forma similar a las células de un adulto, ante un estímulo endotóxico.

También está conservada la capacidad de producir GM-CSF y G-CSF (Factor estimulador de colonias granulocito-monocito y granulocito, respectivamente).

Las células natural killer (NK) representan un 10 a 15% de los linfocitos circulantes en el adulto y en el recién nacido. Se observan en el hígado fetal a partir de la sexta semana de gestación. Su número alcanza un *peak* en el primer año de vida y a los 4 a 5 años alcanza los niveles de un adulto. Respecto a su funcionalidad, es importante destacar que ésta aumenta progresivamente en la vida fetal y postnatal, y que sólo el 50% de ellos expresa el marcador CD56 al momento del nacimiento. A esta edad estas células tienen una menor actividad citolítica.

4. ENVEJECIMIENTO Y SISTEMA INMUNE

En el anciano hay una mayor incidencia de enfermedades en general, y de enfermedades infecciosas en particular. Si bien parece lógico plantear que en el anciano, existe una inmunodeficiencia asociada con la edad, que podría explicar esta mayor incidencia, los marcadores más comunes de inmunodeficiencia no se constatan en el senescente saludable. Por ejemplo, no se produce una disminución del recuento de linfocitos totales circulantes ni de la concentración de inmunoglobulinas séricas con la edad. Más bien, la senescencia inmunológica se caracteriza por un cambio en el número y competencia de las subpoblaciones linfocitarias y de las citoquinas que ellas producen, como asimismo por un cambio en el repertorio de los linfocitos (menos clones) y

cambios en la regulación de la función de los monocitos/macrófagos. Por estas razones, la senescencia inmunológica más bien hay que entenderla como una disregulación del sistema inmune, que como una deficiencia.

4.1. Inmunidad celular

Si bien no hay cambios de los linfocitos T totales con la edad, se produce un aumento significativo del cuociente entre las dos principales subpoblaciones de linfocitos T, (LT CD4+ y LT CD8+), debido a un aumento significativo de los linfocitos T CD4+. A diferencia de lo que se encuentra en el individuo joven, en el que predominan las células T CD4+ vírgenes (no han tenido contacto con antígeno), que se caracterizan por el marcador de membrana CD45RA+, en el senescente estas células T CD4+ son predominantemente linfocitos T de memoria, que llevan el marcador CD45RO+. En los jóvenes, el porcentaje de células T virgen excede al de células T de memoria. A lo largo de la vida, la activación de las células T vírgenes estimula su transición a células T de memoria, y por esta razón el tamaño de estos dos compartimientos celulares, cambia recíprocamente con la edad. Ya en las edades medias de la vida, las células T de memoria son más numerosas que los LT vírgenes. Ambas subpoblaciones difieren no solamente en las moléculas que ellas activan sino también en las citoquinas que producen. Por estas razones, el cuociente alterado entre estas subpoblaciones contribuye en forma importante al efecto de la edad sobre la respuesta inmune.

Debido a que la expansión clonal de las células T es una etapa importante en la respuesta inmune, se ha estudiado extensamente la capacidad de respuesta proliferativa de los linfocitos T en individuos jóvenes y en senescentes. En los ancianos se ha encontrado que la capacidad de respuesta proliferativa de las células T a mitógenos como "phytohemagglutinin" (PHA), "concanavalin A" (Con A) y al anticuerpo monoclonal anti-CD3, está disminuida. Estos cambios parecen explicarse por alteraciones de la expresión de diversos proto-oncogenes que regulan la proliferación de los linfocitos T, constatadas en estos grupos de la población.

Esta menor capacidad de respuesta proliferativa de las células T en los ancianos, se asocia con una disminución de la producción y de la respuesta a la IL-2, interleuquina que es esen-



cial en esta etapa. Parece ser que esto se debe a una disminución de la expresión de los receptores de alta afinidad para la IL-2, que se ha constatado en estos individuos.

La producción de otras citoquinas inmunorreguladoras no está disminuida en el anciano. Con la edad la producción de IFN- γ no cambia y la producción de IL-4 y de IL-6 aumenta. Estas citoquinas actúan como factores de crecimiento de las células B, pueden contribuir al aumento de la producción de autoanticuerpos y de Igs monoclonales, que se observan en el senescente.

Estos cambios en la producción de citoquinas en el anciano pueden deberse, al menos en parte, al cambio que ocurre en la proporción de células T vírgenes y de memoria, ya que la secreción de citoquinas producidas por estas dos subpoblaciones celulares, es diferente. Ambas producen IL-2, pero las células T de memoria son las principales productoras de IFN, IL-4 e IL-6. La expresión dominante de esta subpoblación particular de linfocitos y la resultante producción de citoquinas puede contribuir a la mayor susceptibilidad a ciertas infecciones, que se produce con la edad.

La declinación de las respuestas cutáneas de hipersensibilidad retardada, asociada con la edad, fue el primer indicador que demostró que la función de las células T se altera con el envejecimiento. Muchas personas de edad avanzada, a pesar de infección previa con el *Mycobacterium tuberculosis*, tienen respuestas débiles o no tienen respuestas cutáneas frente al PPD y otros antígenos de evocación.

4.2. Inmunidad humoral

La inmunidad humoral se afecta poco. En general, el número y función de los linfocitos B permanece intacto, así como las inmunoglobulinas, que pueden estar normales o levemente aumentadas. Hace excepción la IgE, que puede estar muy alta, independientemente de la contribución de otros factores, tales como parasitosis o alergia, reflejando una regulación defectuosa de su producción por las células T.

Otros componentes del sistema de defensas inespecífico, tales como el sistema fagocítico, también está disminuido en la malnutrición, tan frecuente en el anciano. La fagocitosis generalmente se mantiene intacta, pero algunos estudios han mostrado una migración y una capacidad bactericida deficiente. En general, estos defectos

no son severos, pero ellos pueden contribuir, a hacer más profundas las alteraciones de la inmunidad celular que se describen antes.

5. INMUNIDAD Y NUTRICIÓN

La nutrición inadecuada, influencia adversamente la mayoría de las funciones inmunes normales. La primera línea de defensa en la inmunidad normal es la integridad física de piel y mucosas. Deficiencias de nutrientes específicos se han correlacionado con alteraciones de estas importantes barreras, entre otras, la deficiencia de vitamina A, riboflavina y piridoxina. La deficiencia proteica se asocia con atrofia generalizada de la piel y, a nivel celular, puede llevar a una depleción del número de linfocitos y de células plasmáticas en el espacio intersticial de las membranas mucosas. Estas células juegan un rol importante en la producción de IgA secretora, la principal inmunoglobulina de las mucosas.

5.1. Inmunidad celular

La disminución de la función de las células T y de la inmunidad celular es el hallazgo más consistente en la evaluación inmunológica de los individuos malnutridos. Hay depleción tanto de los linfocitos circulantes como tisulares y las respuestas cutáneas de hipersensibilidad retardada están disminuidas, en forma proporcional a la severidad de la malnutrición. Las respuestas proliferativas de los linfocitos T están alteradas en forma variable. Los mecanismos responsables de esta disminución de la inmunidad celular se conocen sólo parcialmente, postulándose la participación de numerosos factores. En niños, estas alteraciones se recuperan luego de una suplementación dietética adecuada.

5.2. Déficit de nutrientes específicos

Se ha demostrado que las deficiencias de nutrientes específicos, incluyendo vitaminas esenciales y minerales, tienen un efecto adverso sobre varios parámetros de la inmunidad. El problema de las interacciones de los micronutrientes con el sistema inmune es complejo, debido a la asociación frecuente con otras deficiencias nutricionales, la presencia de infecciones clínicas o subclínicas, las cuales por sí mismas tienen un efecto sobre el sistema inmune. Las deficiencias aisladas de



micronutrientes son raras, exceptuando las de hierro, la vitamina A y zinc.

El rol de la deficiencia de **vitamina A** en la disminución de las respuestas inmunes parece ser muy importante, como queda demostrado por la significativa disminución de la morbimortalidad que se ha observado en poblaciones deprivadas, sometidas a suplementación dietética con esta vitamina. La vitamina A parece jugar un papel importante en las funciones inmunes, como se mencionó, en la mantención de la integridad de las barreras anatómicas, pero además, se han documentado otros defectos inmunológicos en el déficit de vitamina A: leve reducción del peso del timo, disminución de la respuesta de los linfocitos T a los mitógenos, disminución de la producción de anticuerpos específicos, disminución de la proliferación de los linfocitos T *in vitro* y aumento de la adherencia bacteriana a las células epiteliales respiratorias.

La deficiencia de **zinc** se ha estudiado más extensamente que otras deficiencias. Estos estudios han demostrado que el zinc tiene los siguientes efectos profundos sobre la función inmune: atrofia de tejidos linfáticos en animales de experimentación, depleción linfocitaria, disminución de las respuestas de hipersensibilidad cutánea retardadas, disminución de la respuesta proliferativa de los linfocitos a mitógenos, menor quimiotaxis de los neutrófilos, entre otras.

La deficiencia de **vitamina E** se asocia con una disminución de la inmunidad celular, disminución del recuento de linfocitos T y de las respuestas de las células NK. También se han observado síntesis de anticuerpos disminuidas. Estos efectos son mayores cuando existe concomitantemente un déficit de selenio.

No existe mucha información acerca de los efectos de la malnutrición y, en particular, de déficit específicos de micronutrientes, en población anciana. La mayor parte de los trabajos, a este respecto, se han efectuado en niños.

6. INMUNODEFICIENCIA INDUCIDA POR CIRUGÍA Y TRAUMA

El trauma quirúrgico, ya sea accidental o en el pabellón gatilla una respuesta inflamatoria y metabólica, destinada a controlar sus efectos y a la reparación. En general, el estrés quirúrgico evoca una respuesta pequeña y controlable. La inflamación local producida por este proceso es nece-

saria para la reparación de la herida y para la defensa local contra los microorganismos.

Esta reacción también evoca una respuesta sistémica que, en general, es depresora de la inmunidad, cuya finalidad sería proteger al organismo de un síndrome de inflamación sistémico que podría llegar a ser deletéreo. El grado de inmunodeficiencia se correlaciona con el grado de injuria y estrés y es causa de mayor morbilidad y mortalidad en pacientes quirúrgicos y traumatizados, entre otras, sepsis y falla orgánica múltiple.

Los individuos con mayor riesgo son los recién nacidos, senescentes, pacientes con enfermedades severas subyacentes, especialmente las que afectan al sistema inmune, malnutridos y alcohólicos. La identificación de estos pacientes es importante y en pacientes con cirugía electiva es útil la evaluación previa de la inmunocompetencia, ya que pacientes anérgicos o que se hacen anérgicos con la cirugía tienen mayor riesgo de sepsis y también mayor mortalidad.

7. INMUNODEFICIENCIA SECUNDARIA A ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Existen diversos mecanismos por los cuales un agente infeccioso puede producir una alteración de la respuesta inmune.

Es un hecho conocido que después de algunas infecciones, como por ejemplo el sarampión, el paciente que la ha experimentado queda propenso a tener otras infecciones, lo que da cuenta de un deterioro de la respuesta inmune. Este déficit suele ser transitorio en la mayor parte de las patologías infecciosas que lo producen, pero existen otras, como la infección por VIH (ver punto 2) que conducen a un deterioro progresivo del sistema inmune.

Entre estos mecanismos de depresión inmunitaria están la infección directa de las células del sistema inmune, la alteración de subpoblaciones linfocitarias con linfopenia generalizada, supresión de la respuesta de LTh, activación de linfocitos T supresores, y la generación de mediadores solubles que afectan la acción de células o mediadores inmunológicos (interferones y citoquinas derivadas del huésped y factores supresores y superantígenos derivados del patógeno).

Existen diversos estudios epidemiológicos que muestran la mayor incidencia de infecciones respiratorias altas y bajas durante epidemias de



influenza, e infecciones por virus sincial respiratorio y adenovirus, en estos pacientes. También se ha observado la asociación de infecciones simultáneas, como por ejemplo, neumopatías por Citomegalovirus y Herpes simplex, e infección por virus de Epstein-Barr con Candidiasis diseminada, entre otros ejemplos. A continuación se analizan algunos de los principales patógenos asociados con inmunodepresión:

7.1. Inmunodeficiencia secundaria a infecciones virales

Sarampión. Este virus infecta directamente a las células linfoides, incluyendo monocitos, linfocitos T y B, también es capaz de alterar la actividad de células NK y la síntesis de inmunoglobulinas. Este período de inmunodepresión habitualmente se manifiesta por unas pocas semanas, pudiendo conducir al desarrollo de otras infecciones en ese momento. Este virus, se une a CD46, una proteína reguladora del complemento, que actúa como receptor viral, y esta unión impide la producción de interleuquina 12 por monocitos y macrófagos, *in vitro*. La IL-12 es crítica en el desarrollo de la inmunidad celular, ya que es un potente inductor de IFN- γ en linfocitos T y células NK y es importante en el desarrollo de respuestas de tipo Th1 y respuestas de hipersensibilidad retardada. Si se mide la producción de IL-12 por monocitos de sangre periférica de pacientes con sarampión, se observa una marcada supresión de la producción de esta citoquina. Este fenómeno es objetivable hasta varios meses después de la infección aguda.

En esta patología, como existe un déficit inmunitario global, comandado por la supresión de la proliferación T ante el estímulo antigénico, también es posible encontrar anergia cutánea en las pruebas de hipersensibilidad retardada, que es una característica común de infecciones donde el compromiso de la inmunidad celular es preponderante.

Virus de Epstein-Barr. Este es un virus de la familia de los Herpes virus, causante de la Mononucleosis Infecciosa (MNI), capaz de infectar directamente a los linfocitos B uniéndose al receptor CD21 de la superficie linfocitaria, y transformarlos produciendo una expansión policlonal de linfocitos B, con aumento de la producción de anticuerpos, y por otra parte, existe una intensa proliferación de linfocitos T CD8⁺, citotóxicos y su-

presores. Los primeros estarían encargados de eliminar los linfocitos B infectados y los linfocitos supresores más bien inhibirían la proliferación B y mantendrían al virus en estado latente. En esta enfermedad, existiría un estímulo de la IL-10, proveniente de linfocitos Th2, y también por un homólogo viral de esta IL-10, que actúan en forma inhibitoria, de la actividad Th1, de la liberación de citoquinas y de la síntesis de IL-12, actuando sobre los macrófagos para inhibir la activación Th1.

También se ha observado un aumento temporal del número de células NK, que presentan, sin embargo, una función disminuida, que dura aproximadamente 4 semanas, durante el curso de una MNI.

La infección por virus de Epstein-Barr también se ha asociado con defectos inmunitarios más severos y permanentes.

Citomegalovirus. La infección por este virus de la familia de los Herpes virus puede manifestarse por un síndrome mononucleósico o por patologías habitualmente más graves, cuando ocurre una reactivación de la infección en condiciones de depresión inmunitaria (Infección VIH, uso de inmunosupresores, etc), con diseminación de la infección y compromiso orgánico generalizado. Una vez que este agente infecta los monocitos, se replica en ellos e induce la producción de una molécula inhibitoria de la actividad de la IL-1.

Una vez que las personas superan la primoinfección por Citomegalovirus, la mayor parte queda como portadora de la infección en estado latente, y esta infección puede reactivarse con gran agresividad en casos de inmunodeficiencias posteriores.

Otros Herpes virus. La infección por virus *herpes simplex* se asocia con una expansión de la población T supresora, lo que se manifiesta con una linfoproliferación disminuida y una menor producción de anticuerpos. Las glicoproteínas virales pueden inhibir directamente la citólisis mediada por complemento, y, a través de la unión al fragmento Fc de la IgG, impedir una adecuada fagocitosis. A nivel de recuentos hematológicos, puede existir una linfopenia transitoria.

El virus herpes 6, causante de la Roseola infantil, puede infectar directamente las células NK. También se han reportado alteraciones en distintas funciones inmunitarias en la fase temprana de reactivación de infecciones por virus *varicella zoster*.



Virus Influenza. La infección aguda produce una linfopenia global transitoria, con disminución de la proliferación linfocitaria, incremento de la actividad NK debido a producción de IFN y generación de linfocitos supresores que inhiben la producción de IL-2.

Rinovirus. Es el agente del resfriado común, con una gran variedad de serotipos, lo cual representa un ejemplo de estrategia de evasión viral a la respuesta inmunitaria, que es específica de cada serotipo. Existe un receptor natural del virus, la molécula de adhesión intercelular ICAM-1 (CD54). La infección por este virus lleva a un aumento de la producción de IFN- γ y de la actividad de las células NK.

Adenovirus. La infección por este virus se caracteriza por un déficit en la producción de IL-2 y de la capacidad de respuesta inmunitaria a esta citoquina. Este virus produce una proteína capaz de antagonizar los efectos de los interferones y otra proteína que se une a las moléculas del MHC clase I, dificultando así la respuesta citotóxica de los linfocitos T CD 8+.

Virus Sincicial Respiratorio. Existen diversos estudios sugerentes de una modulación del sistema inmune por parte de este agente, sin que podamos claramente hablar de una inmunodepresión secundaria. Lo que se ha observado es una inmunomodulación viral específica a nivel de los linfocitos T helper 2 de memoria, que participarían en la expresión de manifestaciones obstructivas respiratorias, inclusive asma que presentan algunos sujetos, pero existe aún bastante controversia sobre este tema.

Virus Rubéola. Este virus es capaz de infectar directamente diversas células del sistema inmune, lo que se ha evidenciado en diversos estudios que han utilizado citometría flujo.

Papilomavirus. Este agente es el causante de patologías cutáneas como verrugas y condilomas acuminados, que en general, son difíciles de erradicar, pese a respuestas celulares y humores medibles contra este agente, lo que sugiere una inmunosupresión funcional. Se ha identificado la presencia de un factor soluble, derivado de linfocitos de sangre periférica, en estos pacientes, inhibitorio de la producción y actividad de IL-2. También se han reportado, en algunos pacientes,

la presencia de un mayor número de linfocitos T CD 8 supresores y defectos en las células T CD4+.

Virus de la Rabia. Este virus expresa un superantígeno viral, que puede producir notorios trastornos inmunitarios, ya sea por delección clonal o poderosas respuestas proliferativas de linfocitos T.

7.2. Inmunodeficiencia secundaria a infecciones bacterianas y fúngicas

Existen distintas alteraciones inmunológicas, comunicadas en humanos, que se han observado en infecciones bacterianas graves, que incluyen alteración de la quimiotaxis leucocitaria, disminución de la eliminación de partículas por el sistema fagocítico-mononuclear, fagocitosis disminuida y alteración transitoria de la función bactericida. Estas alteraciones no son consistentes en todos los estudios publicados y se refieren a la presencia de linfopenia y cambios de las subpoblaciones de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+.

Componentes aislados de algunos microorganismos tienen efectos supresores de la inmunidad, como por ejemplo, el Lipoarabinomannan, de origen micobacteriano o componentes de *Candida Albicans*, que afectarían especialmente la función linfocitaria T.

Distintos productos bacterianos ejercen un efecto de superantígeno sobre los linfocitos T, lo que puede conducir a estas células a su delección clonal o a su inactivación funcional. Entre ellos podemos mencionar toxinas estafilocócicas y estreptocócicas. Otros agentes no bacterianos asociados a un efecto de superantígeno son el virus de la rabia y el virus de la inmunodeficiencia humana.

7.3. Inmunodeficiencia secundaria a infecciones parasitarias

Algunas infecciones parasitarias severas se asocian con algunos déficit inmunitarios, entre ellas podemos mencionar la Malaria (asociada con alteración de la respuesta de anticuerpos a antígenos proteicos y polisacáridos), la Esquistosomiasis (asociada con disminución de respuestas linfocitarias a mitógenos *in vitro* y con escasa respuesta inflamatoria alrededor de los parásitos tisulares *in vivo*), la Enfermedad de Chagas (asociada con producción de moléculas capaces de bloquear la activación del complemento) y otras



Tripanosomiasis (asociadas con depresión de respuestas celulares y humorales) y algunas infecciones por Nemátodos (asociadas con disminución de respuestas proliferativas *in vitro* hacia antígenos parasitarios e incapacidad de producción de ciertas citoquinas como IL-1, IL-2 e IFN- γ).

8. INMUNODEFICIENCIA SECUNDARIA A ENFERMEDADES INFILTRATIVAS Y TUMORES

Se han observado diferentes alteraciones en las respuestas inmunológicas de pacientes con cáncer, tanto *in vivo* como *in vitro*, dadas por su enfermedad de base, a las cuales se pueden agregar las propias de las terapias antitumorales correspondientes.

Estos pacientes presentan una mayor susceptibilidad a infecciones, una menor respuesta en pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada y una menor respuesta de inmunoglobulinas específicas ante vacunaciones, entre otros defectos.

8.1. Evasión de la respuesta inmune por tumores

Ante el hecho de que ocurra la expansión de un tumor, al menos en su etapa inicial, podría pensarse en una falla inmunológica que permita el desarrollo y diseminación posterior de éste. Lo que ocurre es que estas células tumorales pueden evadir los mecanismos de control del sistema inmune de varias formas, entre ellas:

- Disminuir la expresión de las moléculas MHC clase I en su superficie, dificultando el procesamiento y presentación antigénica a linfocitos citotóxicos.
- Disminuir la expresión de moléculas de adhesión y de β -2 microglobulina de superficie, dificultando el reconocimiento antigénico y causando la pérdida de la inhibición del crecimiento por contacto entre las células, fenómeno que ocurre en tejidos sanos normalmente.
- Falta de expresión de moléculas coestimuladoras en tejidos tumorales, como por ejemplo la molécula B7 (CD80), lo que dificulta su reconocimiento por distintos subgrupos de linfocitos T.
- Las células tumorales pueden ser pobremente inmunogénicas, dependiendo de los antígenos que expresen, lo cual puede evolu-

cionar según la etapa de desarrollo en que este tumor se encuentre. Respecto a la expresión de antígenos por las células tumorales, es importante destacar que existen los llamados antígenos de diferenciación, asociados a tumores, que requieren de otras señales antigénicas para su reconocimiento, ya que representan epítomos celulares normales y que también existe expresión de neoantígenos, que contienen epítomos diferentes a los de antígenos normales, que se han utilizado en ciertas estrategias de tratamiento antitumoral.

- Los tumores pueden antagonizar funciones inmunológicas a través de la producción de factores solubles, la baja expresión de citoquinas en el microambiente tumoral o la inducción de defectos moleculares en el receptor del linfocito T.

Estas acciones no son comunes a todos los tipos de cáncer existentes, y se observan distintas alteraciones asociadas a distintas patologías neoplásicas. Así por ejemplo, se sabe que en el linfoma de Hodgkin y en algunos Gliomas malignos, existe secreción de prostaglandinas por las células tumorales, como prostaglandina E2 que es capaz de aumentar la actividad de células supresoras de la actividad monocitaria.

Las células tumorales (y también los linfocitos T humanos), son capaces de producir TGF- β (factor de crecimiento transformante- β), que dependiendo de la concentración, tiene efectos supresores la respuesta inmune, afectando la función de linfocitos T, B y células NK, la producción de IL-1, además de la función macrofágica y la producción de células inmunocompetentes en la médula ósea.

Las células tumorales normalmente son destruidas por diversos mecanismos inmunológicos, como la citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8+ y células NK, y la lisis celular mediada por complemento, activada por las vías clásica y alterna. Las células normales expresan inhibidores del complemento que las protegen de esta cascada lítica en condiciones fisiológicas. Se ha observado que varios tumores pueden expresar estas moléculas en alta concentración, como por ejemplo carcinomas, sarcomas, glioblastomas, melanomas y papilomas. Estos factores inhibidores son CD59, DAF (factor activador de la degradación del complemento) y CLI (inhibidor de la citólisis por complemento). Estudios *in vitro* muestran que la expresión de los mRNA de estas



moléculas se correlaciona con la resistencia a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

En investigaciones basadas en modelos de carcinoma de colon humano, se han observado diversos defectos moleculares del receptor del linfocito T, que se presentan progresivamente a medida que se desarrolla el tumor, y que comprometen su estructura interna y su función.

8.2. Defectos inmunológicos en tumores

Todos estos complejos mecanismos desarrollados por las células tumorales y su interacción con las células normales, finalmente conducen a la expresión de una serie de defectos inmunológicos, entre los que podemos mencionar la disminución de las respuestas de hipersensibilidad retardada, de respuestas proliferativas a mitógenos, de síntesis de inmunoglobulinas, de respuestas monocitarias oxidativas, de producción de citoquinas y el aumento de la actividad supresora a nivel monocitario. En algunos tumores, como linfomas y leucemias, se puede observar además la presencia de linfopenia.

En resumen, podemos concluir que existen diversas estrategias desarrolladas, a veces en forma evolutiva por las células tumorales, que les permiten por un lado escapar del control inmunológico y por otra, alterar esta respuesta inmune afectando el número y la función de distintos grupos de células inmunocompetentes.

9. INMUNODEFICIENCIA SECUNDARIA A TERAPIA INMUNOSUPRESORA

Existen numerosas enfermedades autoinmunes e inflamatorias cuyo tratamiento farmacológico necesariamente induce un **déficit inmunitario iatrogénico**. Algunos de estos fármacos también se utilizan en la prevención del rechazo de trasplantes. Dichos fármacos inmunosupresores se presentan en la tabla 31-2.

9.1. Mecanismos de acción

Estas terapias tienen distintas especificidades sobre el sistema inmune, y así, algunos fármacos actúan más selectivamente o más generalizadamente, como analizaremos a continuación.

Las sustancias que actúan sobre las células en división (Agentes alquilantes, antiproliferativos, inhibidores del metabolismo de las purinas) y las radiaciones ionizantes disminuyen la producción de linfocitos B y T maduros en el timo y médula ósea. Cuando son administrados junto a un antígeno, actúan selectivamente sobre linfocitos T y B activados, sin afectar los linfocitos de memoria en fase G0 del ciclo celular.

Los linfocitos T de memoria que circulan entre la sangre y la linfa son relativamente insensibles a los tratamientos inmunosupresores, pero pueden destruirse por irradiación linfoide total, drenaje prolongado del conducto torácico, proce-

Tabla 31-2. Categorías de Fármacos Inmunosupresores

Antiproliferativos

Metotrexato, Ciclofosfamida, Azatioprina, Mizobirina/Micofenolato, Brequinar, Deoxispergualina

Antagonistas de las Inmunofilinas, Sirolimus, Ciclosporina A, Tacrolimus (FK506), Rapamicina

Glucocorticoides

Antinflamatorios no esteroideos

Agentes biológicos

Globulinas antilinfocito y antitimocito, Gammaglobulina endovenosa, Anticuerpos monoclonales.

Citoquinas y antagonistas de sus receptores

Otros: Talidomida, Dapsona.

Radiaciones ionizantes



dimientos de aféresis repetidos e inyecciones de anticuerpos antilinfocitarios, que retiran una parte de los linfocitos T de larga vida. La renovación celular por parte del timo es más efectiva en individuos jóvenes que en ancianos.

Algunos inmunosupresores actúan sobre la presentación de antígenos a los linfocitos T (IL-10, Deoxispergualina) o sobre las interacciones celulares generadoras de señales coestimuladoras (Anticuerpos anti-CD4, anti-LFA-1). Otros inhiben la transcripción de los genes de citoquinas por las células T activadas (Ciclosporina A, FK506, Glucocorticoides) o bloquean las señales de progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Rapamicina, Anticuerpos anti-CD25). Las moléculas que interfieren con el metabolismo de las purinas inhiben la expansión clonal de los linfocitos T activados (Azatioprina, Mizobirina, Brequinar, Mofetil micofenolato metabolizado al producto activo, el ácido micofenólico en el organismo. Los agentes alquilantes (Mostaza nitrogenada, Ciclofosfamida, Clorambucil) y el Metotrexato también actúan en este estado, pero sin ninguna especificidad frente a los linfocitos T. Además, algunos fármacos actúan sobre la diferenciación de los linfocitos T y B activados por antígenos (Deoxispergualina y Citoquinas que controlan el desarrollo celular Th1 y Th2 (IFN- γ , IL-4). Se profundizará brevemente los mecanismos de acción y efectos colaterales de algunos de estos fármacos.

Agentes Alquilantes

Estos agentes forman uniones covalentes con el DNA, y cuando se administran a altas dosis, conducen a la muerte celular. Actúan, principalmente, en células en división y su uso implica riesgos como el desarrollo de aplasia medular, alopecia, esterilidad, cistitis hemorrágica, y a largo plazo, el desarrollo de tumores, como cáncer vesical y leucemia mieloide. Por tener efectos mutagénicos y teratogénicos, es indispensable el uso de un tratamiento anticonceptivo paralelo. Su acción se ejerce principalmente sobre los linfocitos B (Supresión de la producción de anticuerpos e hipogammaglobulinemia), los linfocitos T CD8+ a bajas dosis y los linfocitos T CD4+ a altas dosis.

Inhibidores del metabolismo de las purinas y pirimidinas

Uno de ellos es el **Metotrexato**; al inhibir la tetrahidrofolato reductasa, bloquea la síntesis de

timidilato, la síntesis *de novo* de purinas y la división celular. En dosis altas, produce una fuerte toxicidad hematológica y digestiva, aunque este efecto puede neutralizarse con la administración preventiva de ácido fólico. A dosis bajas, no se asocia con mayor riesgo de mutagenicidad ni teratogenicidad, pero posee toxicidad hepática y puede producir fibrosis pulmonares.

La **Azatioprina**, derivado de la 6-Mercaptopurina, no es activa por sí misma, sino por sus derivados. Bloquea la transformación del ácido inosínico en ácido adenílico, precursor de bases purínicas (guanina, hipoxantina). Su acción se ejerce, principalmente, sobre los linfocitos T CD4+ y CD8+ y sobre las células NK, pero también sobre el conjunto de células hematopoyéticas, por lo cual se requiere un ajuste muy preciso de sus dosis. La administración concomitante de inhibidores de la síntesis de ácido úrico (alopurinol) debe evitarse debido al riesgo de aplasia medular. La sobredosis puede producir pancitopenia, macrocitosis aislada y lesiones hepáticas. Este fármaco es utilizado principalmente en trasplantes de órganos, con frecuencia asociado a corticoides. En enfermedades autoinmunes, la Azatioprina se utiliza, principalmente, en las formas corticorresistentes o corticodependientes con el fin de reducir la dosis de éstos y sus efectos indeseables.

Nuevos inhibidores de la biosíntesis de nucleótidos

Son tres fármacos que inhiben en forma similar las respuestas linfocitarias T y B, pero con una menor incidencia de mielosupresión que los agentes anteriormente analizados.

La **Mizobirina** y el **Ácido Micofenólico** inhiben la acción de la inosinmonofosfatodehidrogenasa, suprimiendo la síntesis de nucleótidos guanínicos.

Brequinar inhibe una enzima requerida para la síntesis *de novo* de pirimidinas (Dihidroorotato dehidrogenasa).

Antagonistas de Inmunofilinas

La **Ciclosporina A** es un derivado de origen fúngico, descubierta en 1976, que actúa selectivamente frente a linfocitos T activados. Se une a receptores intracitoplasmáticos, las ciclofilinas A, B, C y D de la familia de las inmunofilinas y este complejo inhibe la acción de la fosfatasa 2B o Calcineurina. Este efecto condu-



ce a un bloqueo de la transcripción, calcio dependiente, del gen de IL-2 y de otras citoquinas como IL-3, IL-4 e IFN- γ . Al contrario de los fármacos ya analizados, que actúan sobre todas las células que sintetizan activamente DNA, este fármaco actúa exclusivamente sobre los **linfocitos activados**, principalmente sobre los linfocitos T CD4+. No tiene efectos adversos sobre la hematopoyesis y no modifica la población de linfocitos T de memoria. Su acción inmunosupresora es rápidamente reversible después de suspender la terapia. Entre sus efectos secundarios podemos mencionar: nefrotoxicidad, con hipertensión arterial secundaria.

El **FK506** es un macrólido de origen fúngico, que actúa a menores dosis que la Ciclosporina A. Este fármaco se liga a una inmunofilina citoplasmática, y este complejo también inhibe, a nivel transcripcional, la síntesis de IL-2 y otras citoquinas.

La **Rapamicina** es otro macrólido que se une al mismo receptor citoplasmático que FK506 pero sus efectos son distintos. Este fármaco bloquea la actividad de una serintreoninquinasa y su asociación con la ciclina D1, que controla la entrada de las células a la fase S del ciclo celular. Por ello, la Rapamicina no disminuye la síntesis de citoquinas pero impide la expansión clonal de linfocitos T estimulados por antígenos.

Glucocorticoides

Se unen a receptores intracitoplasmáticos y son traslocados al núcleo celular, donde el complejo se fija a secuencias reguladoras específicas, los elementos de respuesta a glucocorticoides, modulando positiva o negativamente la transcripción de ciertos genes, en particular, genes que codifican para citoquinas. También tienen efectos sobre la traducción del RNA, la síntesis y la secreción de citoquinas (IL-2 e IFN- γ).

In vivo, los glucocorticoides inhiben el acceso de los leucocitos a focos inflamatorios. A dosis altas, inducen una neutrofilia por movilización del pool marginal y una linfopenia que afecta principalmente a linfocitos T CD4+, por redistribución de éstos. Tienen, por lo tanto, su mayor efecto sobre la inmunidad celular.

Su acción antiinflamatoria se explica, principalmente, por los efectos que poseen sobre macrófagos y neutrófilos. Ellos inhiben la síntesis de IL-1, IL-6 y en menor grado de TNF. También disminuyen la síntesis de prostaglandinas y

leucotrienos, y la actividad de la fosfolipasa A2, además de inhibir la ciclooxigenasa de los macrófagos.

Los corticoides también son inhibidores de distintas proteasas: colagenasa, elastasa y activador del plasminógeno y de la producción de derivados del óxido nítrico. Por otra parte, actúan sobre las células endoteliales e inhiben la permeabilidad vascular inhibiendo la expresión de los genes MHC clase II y de las moléculas de adhesión ELAM-1 e ICAM-1. En el hombre, sólo los timocitos y los linfocitos T activados son susceptibles a la lisis por apoptosis.

Los corticoides más utilizados como inmunosupresores son la Prednisona y la Metilprednisolona. Los efectos secundarios son múltiples: síndrome Cushingoide, hipertensión arterial, osteoporosis, cataratas, diabetes, alteración del crecimiento, acné, defectos de cicatrización, entre otros.

Globulinas antitimocitos y Anticuerpos monoclonales

Las globulinas antitimocitos o antilinfocitos se obtienen inmunizando conejos o caballos con estas células de origen humano y se utilizan, primordialmente, en la prevención y tratamiento de los rechazos de trasplante. Tienen el severo riesgo de inducir una Enfermedad del suero, debido a la producción de anticuerpos contra estos anticuerpos heterólogos (de otra especie), que se manifiesta clínicamente en 10 a 30% de los pacientes, alrededor del décimo día de tratamiento, con la aparición de fiebre, artritis, adenopatías dolorosas, y leucocitosis con trombopenia y caída del nivel plasmático del fármaco administrado. Esta patología implica la detención de la terapia o el cambio por un anticuerpo de otro origen.

Los anticuerpos monoclonales anti-CD3 u OKT3, tienen un poderoso efecto inmunosupresor. El sitio probable de acción de este fármaco es la interferencia con transducción de señales que siguen al reconocimiento del receptor T (TCR) al antígeno presentado por células presentadoras de antígeno. Además existiría un efecto de lisis directa de los linfocitos T CD3 debido a que se produce una rápida caída de los recuentos linfocitarios. Se utiliza ampliamente en la prevención y tratamiento del rechazo de alotrasplantes.

Como estos fármacos son de origen murino, tienen el potencial de inducir anticuerpos humanos y desencadenar una Enfermedad del suero. La



modificación de este tipo de fármacos sustituyendo la región Fc por la secuencia aminoácida de IgG humana, puede colaborar en producir anticuerpos monoclonales menos sensibilizantes y con mejor cinética *in vivo*.

9.2. Impacto de la inmunodeficiencia asociada a inmunosupresores

Los tratamientos inmunosupresores producen un déficit inmunitario que puede traducirse en patologías infecciosas o tumorales, por lo cual estas terapias deben ser cuidadosamente vigiladas del punto de vista clínico y de laboratorio. La inmunosupresión intensa acarrea el riesgo de infecciones oportunistas, particularmente por hongos, virus y protozoos, así como a la emergencia de tumores asociados a infecciones virales crónicas.

LECTURAS SUGERIDAS

Atabani, S.; Byrnes, A.; Jaye, A.; Kidd, M.; Magnusen, A.; Whittle, H.; Karp, C., "Natural Measles causes prolonged suppression of interleukin-12 production", *J Infect Dis*, 2001; 184: 1-9.

Barré-Sinoussi, F.; Cherman, J.C.; Rey, F. et al., "Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)", *Science* 1983; 220: 868.

Chandra, R.K., "Micronutrients and immune functions: an overview", *Ann NY Acad Sci* 1990; 587: 147.

DePaoli, P.; Battistin, S.; Santini, G.F., "Age-related changes in human lymphocytes subsets: progressive reduction of the CD4/CD45R population", *Clin Immunol Immunopathol* 1988; 48:290.

Flynn, J., Ernst, J., "Immune responses in tuberculosis", *Curr Op Immunol* 12: 432-436, 2000.

Informe sobre la epidemia mundial de VIH/SIDA, Programa Conjunto de las naciones Unidas sobre el VIH/SIDA y Organización Mundial de la Salud, junio de 1998.

Mellors, J.W.; Muñoz, A.; Giorgi, J.V. et al., "Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV infection", *Ann Intern med* 1997; 126: 946-954.

Pantaleo, G.; Menzo, M.; Vaccarezza, C.; Graziosi, O.J.; Cohen, J.F.; Demarest, D.; Montefiori, J.M.; Orenstein, C.; Fox, L.K.; Schrager, J.B.; Margolick, S.; Buchbinder, J.V.; Giorgi and A.S. Fauci, "Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection", *N. Engl J. Med* 332: 209-216, 1995.

Rich, R. (editor in chief), **Clinical Immunology, Principles and Practice**, Vol I. Secondary Immunodeficiencies, pp. 707-836, 1996.

Rich, R. (editor in chief), **Clinical Immunology, Principles and Practice** Vol II. Therapy of immunologic diseases, caps. 126, 129 y 130, 1996.

Sepúlveda C., Cecilia y Afani S., Alejandro (Editores), **SIDA**, tercera edición. Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda., Santiago, Chile, 2002.

Serie Documentos CONASIDA, *Boletín Epidemiológico Trimestral*, Ministerio de Salud de Chile.

Sherman, AR., "Zinc, copper, and iron nutrition and immunity", *J Nutr* 1992;122: 1212.

Waynes S.J. et al., "Cell mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60", *J Gerontol* 1990; 45: M45.

Weksler, M.; Schwab, R.; Ai-hao, D., "Aging and the immune system" en **Clinical Immunology**, Robert Rich, Ed. 1996, Mosby, capítulo 49, p. 789.

Whitley, R., Roizman, B., "Herpes Simplex Virus Infection", *Lancet* 357: 1513-18, 2001.



Capítulo 32

INMUNIDAD FRENTE A BACTERIAS

Eva Burger, Edilia Andrews G. y Heriberto Fernández J.

1. **Introducción**
 2. **Inmunidad frente a bacterias extra-celulares**
 - 2.1. Características generales de las bacterias extracelulares
 - 2.2. Mecanismos de inmunidad natural
 - 2.2.1. Mecanismos comunes a bacterias extra e intracelulares
 - 2.2.2. Inmunidad natural a bacterias extracelulares
 - 2.3. Inmunidad adquirida a bacterias extracelulares
 - 2.3.1. Neutralización de toxinas o enzimas bacterianas por anticuerpos
 - 2.3.2. Efectos directos del sistema del complemento
 - 2.3.3. Efecto conjunto de anticuerpo, complemento y lisozima
 - 2.3.4. Opsonización y facilitación de la fagocitosis
 3. **Inmunidad frente a bacterias intracelulares**
 - 3.1. Características generales de las bacterias intracelulares
 - 3.2. Inmunidad natural a bacterias intracelulares
 - 3.2.1. Células NK
 - 3.2.2. Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos
 - 3.3. Inmunidad adquirida a bacterias intracelulares
 - 3.3.1. Macrófagos activados
 - 3.3.2. Linfocitos T
 - 3.3.3. Efecto conjunto de linfocitos T CD4+ y CD8+
 - 3.3.4. Linfocitos T $\gamma\delta$
 - 3.3.5. Citoquinas
 - 3.3.6. Granulomas
4. **Análisis comparativo del desarrollo de inmunidad en infecciones por bacterias extracelulares e intracelulares.**
 5. **Estrategias de intervención inmune en relación a bacterias intracelulares**
 - 5.1. Tipos de vacunas para bacterias intracelulares en uso
 - 5.2. Desarrollo de nuevas vacunas
 - 5.2.1. Identificación de antígenos protectores
 - 5.2.2. Cepas vaccinales atenuadas y recombinantes
 - 5.2.3. Vacunas de subunidades y empleo de adyuvantes
 - 5.2.4. Vacunas DNA





RESUMEN

En este capítulo se presenta algunas características de las bacterias extracelulares e intracelulares, incluyendo principios de su patogenicidad y virulencia. Algunos aspectos de la inmunidad frente a bacterias son abordados separadamente, cuando los mecanismos inmunológicos activos son diferentes en estos dos grupos de microorganismos.

Se describen los componentes de la respuesta inmune innata o natural comunes a ambos grupos bacterianos, tales como la influencia de la especie, el papel de la piel, de la concentración de hierro y de sustancias inhibitorias no inmunológicas como por ejemplo la lisozima. Se discute la participación de las citoquinas inflamatorias en la inmunidad natural a bacterias extracelulares y de las células NK y de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos en la inmunidad natural a bacterias intracelulares.

Consecuentemente, se analiza la participación de la respuesta inmune adquirida en la protección contra infecciones bacterianas. Los mecanismos efectivos relevantes son el brazo humoral de la respuesta inmune en el caso de las bacterias extracelulares y el brazo celular de la respuesta inmune en el caso de las bacterias intracelulares. Tratándose de mecanismos completamente diferentes, éstos fueron abordados separadamente. Así, en el tópico inmunidad adquirida a bacterias extracelulares, se presenta la neutralización de toxinas o de enzimas bacterianas por anticuerpos, los efectos del sistema complemento, ya sean directos o en conjunto con anticuerpos y lisozima, además de la opsonización y facilitación de la fagocitosis por el fragmento Fc de IgG y/o el componente C3b del complemento. En lo tocante a inmunidad adquirida a bacterias intracelulares se analiza la participación de varias poblaciones celulares, tales como macrófagos activados, linfocitos T, linfocitos T CD4+ y sus subpoblaciones, linfocitos T CD8+, linfocitos T- $\gamma\delta$, estudiándose también la participación de citoquinas y granulomas.

Finalmente, se presentan estrategias de inmunointervención en la prevención de infecciones causadas por bacterias intracelulares, destacándose las vacunas ya en uso y las nuevas vacunas en desarrollo, comprendiendo la identificación de antígenos protectores, cepas atenuadas y recombinantes, vacunas de subunidades y de DNA y el efecto de adyuvantes.

1. INTRODUCCIÓN

En el contexto de un libro de Inmunología, interesa estudiar los microorganismos de acuerdo con la respuesta inmune que inducen y no según su clasificación taxonómica. Considerando que entre la respuesta inmune frente a bacterias extracelulares e intracelulares existen diferencias fundamentales, en este capítulo, su estudio será presentando dividido bajo ese aspecto, con excepción de aquellos mecanismos de inmunidad natural comunes a ambos tipos de bacterias.

2. INMUNIDAD FRENTE A BACTERIAS EXTRACELULARES

2.1. Características generales de las bacterias extracelulares

Las bacterias extracelulares son capaces de replicarse fuera de las células del hospedero, como por ejemplo en la circulación, en el tejido conectivo y en espacios tisulares como las vías aéreas y el lumen intestinal.

Entre las bacterias extracelulares se cuentan las cocáceas Gram (+) piogénicas (*Staphylococcus*, *Streptococcus*) y los bacilos, principalmente anaerobios (*Clostridium*). Dentro de las Gram (-) se encuentran cocos (*Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae* y otras *Neisseria*) y



una gran gama de bacilos, incluyendo los microorganismos entéricos (*Escherichia coli*).

Las bacterias extracelulares causan enfermedad por varios mecanismos:

Producción de exotoxinas. La patogenicidad bacteriana puede ser producida por la secreción de proteínas, las cuales son las toxinas más potentes conocidas y que tienen varios efectos patológicos. Estas toxinas pueden ser exotoxinas, activamente secretadas por las bacterias y también, endotoxinas, las que forman parte de la pared bacteriana.

Las exotoxinas son citotóxicas y tienen la capacidad de translocarse a células de mamíferos. El mecanismo general por el cual ello ocurre es por la unión específica de una porción de la molécula a la superficie de la célula, mientras que otra parte de la molécula es el dominio tóxico. Estas dos porciones pueden ser producto de un gen único o de dos genes. Los lugares blancos intracelulares son diferentes, así como también su modo de acción. Como ejemplos de exotoxinas se pueden citar las toxinas diftérica, colérica, tetánica y clostrídica.

La respuesta inmune contra bacterias extracelulares tiende a destruir las bacterias y a neutralizar los efectos de sus toxinas.

Inducción de la respuesta inflamatoria excesiva. Las bacterias piogénicas inducen una respuesta inflamatoria muy acentuada la cual puede llevar a lesión tisular.

Secreción de superantígenos. Los *Staphylococcus* y los *Streptococcus* del grupo A producen toxinas que tienen la capacidad de activar un porcentaje muy alto de linfocitos T. Los síntomas clínicos varían pero en general incluyen choque sistémico. La respuesta inmune a estas sustancias y a proteínas relacionadas con ellas las torna únicas en términos de efectos biológicos y patológicos. Los efectos patológicos de las enterotoxinas estafilocócicas son mediadas por citoquinas, como el TNF- α .

Las enterotoxinas estafilocócicas son algunos de los mitógenos naturales más potentes para linfocitos T, actuando en concentraciones de 10^{-9} M o menos, uno de cada cinco linfocitos T responde a ella. La respuesta a enterotoxinas estafilocócicas requiere de células presentadoras de antígeno expresando moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) clase II. Estas enterotoxinas se unen directamente a la porción constante de las moléculas clase II (por fuera del sitio de unión para los antígenos) y no preci-

san ser procesadas. Este complejo es, entonces, reconocido por linfocitos T CD4+ $\alpha\beta$ expresando receptores de antígeno de cierto V β . En resumen, estos superantígenos se ligan a moléculas del MHC clase II y simultáneamente al TCR de un alto porcentaje de los linfocitos T, independientemente del péptido que esté siendo presentado. Las respuestas tóxicas se deben a la estimulación de linfocitos T y a la consiguiente excesiva producción de citoquinas.

Secreción de lipopolisacáridos (LPS). El LPS es otra clase de molécula que actúa indirectamente, causando autointoxicación del hospedero. El LPS liberado por las bacterias se une con gran afinidad por la porción altamente conservada en todas las enterobacterias (lípidos A) a la proteína de fase aguda LPS-ligante. El complejo se une a macrófagos, induciendo la formación de TNF- α e IL-1, las cuales desencadenan una cascada de citoquinas por parte de varias células del sistema inmune, desencadenando la sintomatología caracterizada por leucocitosis, choque y coagulación intravascular diseminada.

Invasión bacteriana. Algunas bacterias secretan sustancias nocivas como hialuronidasa (lisa el ácido hialurónico del tejido conectivo y permite la diseminación bacteriana), estreptoquinas (enzima fibrinolítica capaz de disolver coágulos), colagenasas y elastasas que destruyen la estructura del tejido conjuntivo.

2.2. Mecanismos de inmunidad natural

2.2.1. Mecanismos comunes a bacterias extra e intracelulares

influencia de la especie. Existe la resistencia de determinadas especies a ciertas infecciones. La resistencia de las gallinas a *Brucella abortus* es un ejemplo de esta condición, la cual es una manifestación de factores genéticos.

Integridad de la piel. La piel íntegra sustenta una alta densidad de bacterias comensales y potencialmente patógenas pero, luego, por debajo de la superficie ella es estéril. En la piel íntegra, es imposible la penetración de bacterias o de otros microorganismos excepto la de cercarias de *Schistosoma*. Heridas pequeñas permiten la entrada de *staphylococcus* y/o *streptococcus* mientras que heridas más profundas y la destrucción



de los tejidos generan un medio anaerobio y permiten el acceso de clostridium.

Substancias inhibitorias no inmunológicas. La relativa poca frecuencia de infecciones bacterianas debido a pequeñas heridas, indica la capacidad de los tejidos animales para contener la invasión bacteriana. Parte de esta resistencia se debe a la presencia de potentes substancias con propiedades antibacterianas en los tejidos:

Lisozima. La más importante de estas substancias inhibitorias es la lisozima, encontrada en tejidos y en todos los fluidos corporales con excepción del líquido cefalorraquídeo (LCR), sudor y orina. Se encuentra en altas concentraciones en las lágrimas y en la clara de huevo. Tiene la capacidad de lisar la capa de peptidoglicano de la pared y los acilaminopolisacáridos de las cápsulas de algunas bacterias Gram (+), induciendo su muerte. En acción sinérgica con la lactoferrina, en condiciones de baja osmolaridad, mata varias bacterias Gram (-). Actuando conjuntamente con el complemento, lisa bacterias Gram (-). La lisozima es más eficaz contra las bacterias Gram (+) porque en las Gram (-) la pared de peptidoglicano está protegida por la membrana externa. A pesar que las bacterias así lisadas no sean patógenas, esta ausencia de patogenicidad podría deberse, justamente, a su susceptibilidad a la acción de la lisozima. Esta enzima se encuentra en alta concentración dentro de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y, por tanto, se acumula en los lugares donde existe inflamación aguda, incluso sitios de invasión bacteriana. El pH ideal para ejercer su acción (pH 3-6) se alcanza en situaciones fisiológicas, tanto en los lugares de invasión bacteriana como dentro de fagosomas.

Otras substancias inhibitorias. Incluyen la espermina y la espermidina, que son tetraaminas presentes en riñón, páncreas y próstata las que, en conjunto con una alfa-globulina sérica, forman un complejo antibacteriano activo contra bacterias ácido-alcohol resistentes y *Bacillus anthracis*. Otras substancias inhibitorias, son los péptidos y proteínas básicas beta-lisina y fagocitina, ricas en lisina y arginina, originadas de la digestión de proteínas por enzimas proteolíticas liberadas de PMN o de plaquetas y que presentan un potente efecto antibacteriano. Los ácidos grasos libres inhiben el crecimiento bacteriano, mientras que los insaturados

son bactericidas para bacterias Gram (+).

Contenido de hierro. Un factor determinante del éxito o no de una invasión bacteriana es el contenido de hierro en los fluidos orgánicos. Muchas bacterias, como *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Escherichia coli* necesitan de hierro para su crecimiento. En el cuerpo, sin embargo, el hierro en su mayor parte se encuentra secuestrado, asociado a proteínas (transferrina, lactoferrina, haptoglobina y ferritina).

Después de una invasión bacteriana, cesa la absorción intestinal de hierro. La IL-1 liberada de macrófagos causa un aumento en la producción de transferrina y haptoglobina por los hepatocitos y aumento de incorporación de hierro en el hígado. El resultado final es la falta de disponibilidad (escasez) de hierro para la bacteria invasora. De modo análogo, la invasión bacteriana a la glándula mamaria determina la liberación del contenido de lactoferrina de los PMN aumentando, así, el poder bactericida de la leche.

Las bacterias han desarrollado mecanismos para la adquisición de hierro para su sobrevivencia y su crecimiento. Las enterobacterias secretan quelantes de hierro denominados sideróforos, los que compiten exitosamente por el hierro libre. Luego, por receptores proteicos específicos ubicados en la membrana, absorben el sideróforo repleto de hierro y lo transportan a receptores de hierro intracelulares. En seguida, el complejo sideróforo/hierro internalizado es clivado para originar hierro libre para la bacteria.

Algunas bacterias, como *Neisseria* y *Haemophilus influenzae* no producen sideróforos pero, adquieren el hierro directamente de la lactoferrina o de la transferrina. Otras bacterias, como *Mycobacterium tuberculosis* o *Escherichia coli*, producen compuestos con una poderosa capacidad quelante (micobactina y enteroquelina), que retiran el hierro de las proteínas séricas, dejándolas disponibles para las bacterias, las que entonces podrán invadir el organismo.

2.2.2. Inmunidad natural a bacterias extracelulares

Citoquinas inflamatorias. Debido al hecho de que las bacterias extracelulares son muertas eficientemente por los mecanismos microbicidas de los fagocitos, el principal mecanismo de inmu-



nidad natural a estos microorganismos es la fagocitosis por PMN, monocitos y macrófagos tisulares. La resistencia de las bacterias a la fagocitosis y a la digestión intracelular es, por tanto, una importante determinante de su virulencia.

Las endotoxinas, como el LPS estimulan la producción de citoquinas por macrófagos y por otras células, como por ejemplo el endotelio vascular. Estas citoquinas incluyen TNF- α , IL-1, IL-6 y quimioquinas (ver capítulo 11). La función fisiológica principal de las citoquinas derivadas de macrófagos es la de estimular la inflamación. Estas citoquinas inducen la adherencia de neutrófilos y monocitos al endotelio vascular en los sitios de infección, fenómeno que es seguido por la migración, acúmulo en el lugar afectado y activación de células inflamatorias. Las células inflamatorias tienen la función de eliminar las bacterias.

2.3. Inmunidad adquirida a bacterias extracelulares

El principal mecanismo capaz de conferir inmunidad específica contra bacterias extracelulares es la inmunidad humoral. Algunos de los componentes más inmunogénicos de paredes y cápsulas bacterianas son polisacáridos y constituyen ejemplos típicos de antígenos timo independientes, estimulando directamente linfocitos B y originando fuertes respuestas específicas de anticuerpos IgM. Otros isotipos pueden ser originados debido a la producción de citoquinas que inducen cambio de clase (“switch” isotípico), como por ejemplo la producción de IgG2 en humanos en respuesta a la cápsula polisacárida de *Streptococcus pneumoniae*, antígeno típicamente T-independiente.

2.3.1. Neutralización de toxinas o enzimas bacterianas por anticuerpos

Muchos productos agresivos necesitan ligarse a receptores celulares. Esto es evitado por la molécula de anticuerpo que se liga a epítopes importantes de la toxina, causando impedimento espacial. Este fenómeno puede ser a través de la molécula completa o solamente por la región Fab o F(ab)². Tanto anticuerpos IgG como IgM neutralizan toxinas bacterianas y evitan su unión a las células blanco. La neutralización involucra la competencia entre el anticuerpo y el receptor en la célula blanco por la molécula de toxina. La IgA presente en las secreciones neutraliza las toxinas

bacterianas en los tractos respiratorio y gastrointestinal y evita la colonización de los tejidos extraluminales.

2.3.2. Efectos directos del sistema del complemento

Varios componentes del sistema del complemento pueden atacar directamente y destruir bacterias. Como los productos intermediarios resultantes de la activación del sistema tienen acción quimiotáctica, pueden reclutar fagocitos hacia el sitio de la infección.

2.3.3. Efecto conjunto de anticuerpo, complemento y lisozima

Tanto la IgM como la IgG activan el sistema del complemento, llevando a la producción del complejo de ataque a membranas bacterianas de efecto microbicida y a la liberación de mediadores de la inflamación aguda. La función del complejo de ataque a membranas bacterianas es ejercida sólo en algunas infecciones, pues la deficiencia en los componentes tardíos C5 a C8 está asociada al aumento de la susceptibilidad a la infección por *Neisseria*, pero no a la de otras bacterias. El complejo de ataque a membranas no consigue lisar bacterias Gram (-) pero, al insertarse a la pared bacteriana, provee un sustrato a la lisozima, la cual, actuando en secuencia al complemento, produce la lisis de la bacteria. Individuos no inmunes pueden lisar bacterias a través de la activación de la vía alterna del complemento, pues las células bacterianas permiten la producción de la convertasa de C3 de la vía alterna (C3bBbP) (ver capítulo 18).

2.3.4. Opsonización y facilitación de la fagocitosis

Opsonización por Fc de IgG. La eficiencia de la fagocitosis aumenta cuando la membrana del fagocito se liga al objeto a ser fagocitado. Los anticuerpos IgG opsonizan las bacterias y favorecen la unión de macrófagos, monocitos y neutrófilos a través de sus receptores para Fc gamma (Fc γ R).

Opsonización por C3b. Los fagocitos también tienen receptores para C3b. Las personas deficientes en C3 son muy susceptibles a infecciones bacterianas piogénicas.



Opsonización por Fc de IgG y por C3b. Las consecuencias de la opsonización con C3b o Fc de IgG y más aún, su efecto conjunto, son el aumento de la unión de la partícula a ser fagocitada y la activación metabólica de los fagocitos. Los anticuerpos IgG e IgM activan el sistema del complemento, generan C3b e iC3b que se ligan a los receptores CR1 y CR3, respectivamente, y promueven la fagocitosis.

3. INTRODUCCIÓN A BACTERIAS INTRACELULARES

3.1. Características generales de las bacterias intracelulares

Las bacterias intracelulares causan enfermedades conocidas desde antiguo (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Salmonella typhi*) que afectan a más de medio billón de personas, y otras enfermedades, conocidas como emergentes, que afectan a pacientes con SIDA (*Mycobacterium intracellulare*). Estas bacterias viven dentro de las células del hospedero vertebrado durante gran parte de su vida y deben, por tanto, tener baja toxicidad, lo que tiene consecuencias sobre la respuesta inmune que ellas desencadenan.

En relación a su hábitat, las bacterias intracelulares pueden ser: (a) **intracelulares facultativas**, que prefieren fagocitos mononucleares, (*Mycobacterias*, *Salmonella*, *Brucella*, *Legionella* y *Listeria*) pero pueden infectar otras células, y (b) **intracelulares estrictas**, que no sobreviven fuera de las células y que prefieren células presentadoras no profesionales (endoteliales y epiteliales), a pesar de poder infectar monocitos mononucleares (*Rickettsia* y *Chlamydia*). Algunos ejemplos de bacterias intracelulares son los siguientes:

Mycobacterium tuberculosis y tuberculosis: *M. tuberculosis* es una bacteria aerobia estricta. Por tener muchos lípidos, glicolípidos y elementos grasos, es hidrofóbico y resistente a la lisis por complemento, a ácidos y álcalis. Es el patógeno responsable del mayor número de muertes e infecta entre 1/3 y 1/2 de la humanidad. Parasita prácticamente sólo a macrófagos.

Mycobacterium leprae y lepra: Es una enfermedad muy crónica, espectral, yendo desde la forma tuberculoide, con fuertes reacciones inmunes celulares y lesiones con pocos microorganismos,

hasta la forma lepromatosa con inmunidad celular deficiente y muchos bacilos. Parasita una gran variedad de células.

Listeria monocytogenes y listeriosis: Es una enfermedad de ovinos y bovinos pero puede afectar al hombre. La enfermedad experimental en ratones es aguda. Parasita preferentemente células presentadoras no profesionales (endoteliales, hepatocitos), además de macrófagos.

Brucella abortus. Cuando penetra al organismo, es captada y transportada por células fagocíticas hacia los órganos del sistema fagocítico mononuclear estableciendo una infección crónica. En bovinos se ubica en órganos del aparato genitourinario, posiblemente debido a la presencia de eritritol en la superficie de las células epiteliales. Respecto a la patogenicidad y virulencia de bacterias intracelulares, éstas entran al hospedero a través de las mucosas, principalmente por el intestino o por el pulmón. Luego, atraviesan las capas epiteliales. Enseguida, sufren los efectos de los mecanismos inespecíficos de defensa, desde los físicos y fisicoquímicos hasta aquellos que involucran la inmunidad natural. Si son capaces de sobrevivir, colonizarán los tejidos situados más profundamente y van a provocar el establecimiento de una respuesta inmune específica. En situaciones ideales, se consigue la erradicación de las bacterias, o si no, ellas permanecen en nichos poco accesibles al sistema inmune.

3.2. Inmunidad natural a bacterias intracelulares

El principal mecanismo de inmunidad natural contra microorganismos intracelulares es la fagocitosis, aunque las bacterias intracelulares patogénicas son relativamente resistentes a la lisis dentro de los fagocitos mononucleares. Por tanto, no es sorprendente que la inmunidad natural sea, generalmente, bastante ineficiente en controlar la colonización por estos microorganismos y su consecuente diseminación. La resistencia a la fagocitosis es también una razón por la cual estas bacterias tienden a causar infecciones crónicas que pueden durar años, frecuentemente de difícil erradicación y recrudesciendo después de curas aparentes.

3.2.1. Células NK

Las bacterias intracelulares activan células



NK, ya sea directamente o estimulando la producción de IL-12 por los macrófagos y PMN. Las células NK producen IFN- γ que, a su vez, activa macrófagos y promueve la lisis de las bacterias fagocitadas. Así, las células NK constituyen una línea de defensa en una fase inicial de la infección por este tipo de bacterias, antes del desarrollo de la respuesta inmune específica. De hecho, ratones con SCID (Inmunodeficiencia combinada severa) que son, deficientes en linfocitos T y B son capaces de controlar, por lo menos temporalmente, infecciones producidas por *Listeria monocytogenes* a través de la producción de IFN- γ por células NK.

3.2.2. Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos

Como estas células tienen alto potencial bactericida, pueden matar muchas bacterias intracelulares. Sin embargo, son de corta vida y las bacterias intracelulares están secuestradas en nichos. En la fase inicial de la infección disminuyen la carga infectante como por ejemplo en la listeriosis, en la que se observa una gran afluencia de PMN.

La muerte de bacterias intracelulares por macrófagos o por PMN es realizada por moléculas tóxicas, particularmente metabolitos reactivos del oxígeno e intermediarios reactivos del nitrógeno (ver capítulo 3). Alguna deficiencia en el anión superóxido favorece la susceptibilidad a muchas infecciones bacterianas (enfermedad granulomatosa crónica).

3.3. Inmunidad adquirida a bacterias intracelulares

La inmunidad mediada por células es la principal respuesta inmune protectora a infecciones por bacterias intracelulares. Individuos que presentan deficiencias en la inmunidad celular son extremadamente susceptibles a estas infecciones, como lo son, por ejemplo, los pacientes con SIDA.

Las principales respuestas inmunes protectoras son de dos tipos. Uno es la lisis de las bacterias intracelulares fagocitadas como resultado de la activación de macrófagos por citoquinas derivadas de linfocitos T, principalmente IFN- γ y, el otro, es la lisis de las células infectadas, por linfocitos T CD8⁺ citolíticos.

3.3.1. Macrófagos activados

La activación de las funciones antibacterianas

de los macrófagos constituye uno de los pasos fundamentales en la resistencia a bacterias intracelulares. Muchas de las actividades descritas para estas células no son expresadas constitutivamente en ellas. La expresión plena de las actividades antibacterianas de estas células depende del estímulo adecuado por citoquinas, de las cuales la más importante es el IFN- γ . Su efecto transforma los macrófagos de células que permiten la replicación microbiana en células efectoras que restringen o eliminan su capacidad de sobrevivencia. En macrófagos murinos, el IFN- γ es el principal activador de macrófagos, los que se tornan capaces de lisar *L. monocytogenes* o *Brucella* y de inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* y de *M. bovis*.

Los principales efectores de la actividad antibacteriana de los macrófagos son los intermediarios del metabolismo del nitrógeno. Estos mecanismos aun no están bien entendidos en los seres humanos, pues todavía no ha sido demostrada la producción de reactivos del nitrógeno en macrófagos humanos y el IFN- γ casi no induce inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis*. Sin embargo, TNF- α causa inhibición del crecimiento de *M. intracellulare* e IFN- γ , en conjunto con TNF- α , producen inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis*.

3.3.2. Linfocitos T

La resistencia adquirida a infecciones por bacterias intracelulares depende crucialmente de linfocitos T, que promueven la erradicación estéril de las bacterias susceptibles (*L. monocytogenes*) y “clearance” parcial y contención, a través de lesiones granulomatosas de las bacterias resistentes (*M. tuberculosis*). La formación y la mantención de los granulomas es gobernada por los linfocitos T y la coordinación entre linfocitos T, macrófagos y otras células es promovida por las citoquinas. La necesidad de linfocitos T se ilustra y queda en evidencia en pacientes deficientes en linfocitos T (enfermos de SIDA) y en animales atímicos.

a) Linfocitos T CD4⁺. Las bacterias intracelulares residen dentro de endosomas de macrófagos, pudiendo ser procesada como antígeno endógeno y ser presentada en el contexto de moléculas clase II. Los linfocitos CD4⁺ pueden responder también a antígenos de las bacterias, los que son internalizados y presentados en moléculas clase II, como por ejemplo el ppd de *M. tuberculosis*.



Las infecciones por bacterias intracelulares, incluyendo la tuberculosis, la listeriosis y la brucelosis experimentales, se caracterizan por una preponderancia de efectos de linfocitos Th1. Apparentemente las bacterias intracelulares estimulan la producción de IL-12 y de IFN- γ por células de la respuesta inmune natural. Solamente en la fase lepromatosa de la lepra ocurren fenómenos Th2, los que parecen contribuir a la inmunosupresión.

b) Linfocitos T CD8+. Además de linfocitos T CD4+ restringidos por MHC clase II, también los linfocitos T CD8+ restringidos por MHC clase I participan en la resistencia adquirida a infecciones por bacterias intracelulares.

Listeria, al ser capaz de dejar el endosoma y entrar al citoplasma puede ser procesada a través de la vía de presentación de antígeno endógeno, interactuar con MHC clase I y promover la activación de linfocitos T CD8+. Deben existir otros mecanismos de presentación en el contexto de clase I, ya que otras bacterias, que no van al citoplasma (*M. bovis*, *S. typhimurium*) también producen respuesta de linfocitos T CD8+, tal vez por translocación al citoplasma de algunos péptidos bacterianos durante la replicación bacteriana.

La importancia de la población de linfocitos T CD8+ en el control de la brucelosis se ha demostrado en experimentos realizados con ratones "knock out" en moléculas clase I, en los que observó una aumentada susceptibilidad a la brucelosis. Estas células tienen potencialmente dos funciones: pueden lisar células infectadas y pueden también producir INF- γ .

3.3.3. Efecto conjunto de linfocitos T CD4+ y CD8+

Estas dos poblaciones de células efectoras actúan complementariamente. En la listeriosis, los linfocitos T CD4+ producen IFN- γ que activa los macrófagos para destruir las bacterias fagocitadas. Sin embargo, *L. monocytogenes* escapa al citoplasma, protegiéndose de los productos del metabolismo del oxígeno que actúan en los fagolisosomas. Los linfocitos CD8+, entonces, lisarán esta célula que contiene bacterias en su citoplasma.

En la tuberculosis existe consenso que los linfocitos T CD8+ son cruciales para la protección, ya que animales carentes de beta-2 microglobina o de T CD8+ mueren de tuberculosis experimental. Este importante papel protector está en aparente conflicto con el hábitat

intrafagosomal de *M. tuberculosis*, lo que resultaría en la presentación del antígeno restringida por moléculas MHC clase II. La explicación para la presentación en el contexto de moléculas MHC clase I sería por drenaje de proteínas secretadas por las bacterias viables al citoplasma a partir del fagosoma, o por la presencia de *M. tuberculosis* libre en el citoplasma, de acuerdo a lo establecido en recientes estudios realizados con microscopía electrónica. En la tuberculosis, la enfermedad se exagera en ratones depletados de una de las dos poblaciones de linfocitos T y la enfermedad se torna fatal (*M. tuberculosis*) o más grave (*M. bovis*) en animales que no expresan moléculas clase I.

En la lepra y la tuberculosis, los granulomas están constituidos por linfocitos T CD4+ rodeados por linfocitos T CD8+.

3.3.4. Linfocitos T- $\gamma\delta$

Existen evidencias circunstanciales del papel de la LT $\gamma\delta$ en la inmunidad a bacterias intracelulares. Este tipo de linfocitos de individuos sanos o inmunes son muy estimulados por los componentes de las mycobacterias.

Han sido identificados muchos linfocitos T $\gamma\delta$ en los sitios donde existen lesiones en las cuales ocurre una rápida replicación de *L. monocytogenes* y *M. bovis*, en estadios reactivos de lepra y en lugares de hipersensibilidad de tipo tardía (HTT) contra lepromina y en los centros necróticos de las lesiones de la tuberculosis y muy pocos en lesiones crónicas de la tuberculosis o de lepra tuberculoide.

3.3.5. Citoquinas

El estudio del papel de varias citoquinas en la inmunidad a bacterias intracelulares experimentó un enorme impulso con el uso de citoquinas recombinantes, de anticuerpos monoclonales para su neutralización y de ratones "knock-out" para establecer su expresión génica.

Por ejemplo, el tratamiento con anticuerpos anti-IFN- γ o anti-TNF- α produce un agravamiento en la listeriosis haciéndola fatal así como también con anti-receptor de IL-1. Por otro lado, la administración de IFN- γ , TNF- α , IL-1 o IL-6 recombinantes, aumenta la resistencia a la listeriosis. El tratamiento con anti-IFN- γ o anti-TNF- α empeora un poco la tuberculosis y, en cambio, el tratamiento con anti-IL-4 tiende a mejorarla. Ratones sin receptores para IFN- γ son mucho más suscepti-



bles a la infección por *Listeria* que sus controles. En infecciones experimentales por *B. abortus* se ha observado que IL-12 se produce *in vivo* sólo durante la infección con bacterias vivas, también se ha observado que ratones "knock-out" en receptor para TNF son severamente deficientes en la producción de IL-12, la cual regula positivamente la producción de INF- γ de linfocitos T.

La cantidad de información acumulada en los últimos años hace imposible enumerar, en este capítulo, los efectos producidos por la gran cantidad de citoquinas existentes (ver capítulo 11). Sin embargo, es indiscutible el importante papel del INF- γ en la defensa contra infecciones causadas por bacterias intracelulares, así como el de otras citoquinas que favorecen la respuesta Th1. En general, el papel de las citoquinas Th2 es actuar ante el agravamiento de la enfermedad. Sin embargo, en algunas situaciones, es necesaria la presencia de IL-10 para controlar una respuesta inmune excesiva.

3.3.6. Granulomas

El encuentro entre las bacterias intracelulares y los mecanismos de defensa del hospedero es un evento local, que se verifica en la lesión granulomatosa, la cual constituye el núcleo de la protección antibacteriana.

La ausencia de desarrollo de un granuloma o la destrucción de un granuloma organizado, lleva a la exacerbación de la enfermedad, pudiendo ser, entonces, fatal. Por otro lado, los granulomas expansivos impiden las funciones fisiológicas de los tejidos, lo que es crucial para la patogénesis. De hecho, los granulomas tienen efecto protector contra *M. tuberculosis* y *M. bovis* pero no contra *L. monocytogenes*, donde las lesiones excesivas son perjudiciales.

Los mecanismos por los cuales los granulomas restringen el crecimiento bacteriano y confinan la infección, confiriendo protección, se deben a diversos factores como macrófagos activados que inhiben el crecimiento bacteriano, la encapsulación promovida por la fibrosis aísla las bacterias y la necrosis reduce la oferta de nutrientes y de oxígeno.

Existen varias citoquinas involucradas en la formación y/o mantención de los granulomas, entre ellas, TNF- α , INF- γ e IL-4.

4. ANÁLISIS COMPARATIVO DEL DESARROLLO DE INMUNIDAD EN INFECCIONES POR BACTERIAS EXTRACELULARES E INTRACELULARES

Tanto las bacterias extracelulares como las intracelulares infectan, transitoriamente, las células epiteliales como parte de sus mecanismos invasivos.

Los mediadores de la respuesta inmune a bacterias intracelulares son los linfocitos T que no interactúan directamente con ellas pero sí con la célula infectada del hospedero. Los principales mediadores de la respuesta inmune contra las bacterias extracelulares son los anticuerpos.

Las bacterias intracelulares son de baja o de ninguna toxicidad, siendo la patología la resultante de las reacciones inmunes. Las bacterias extracelulares producen varias toxinas responsables directamente de la lesión tisular.

Las bacterias intracelulares coexisten con su hábitat intracelular por mucho tiempo, dando como resultado períodos de incubación prolongados y enfermedad crónica. Las bacterias extracelulares causan enfermedad aguda que desaparece cuando se establece la respuesta inmune.

Las reacciones tisulares contra bacterias intracelulares son granulomatosas y tanto la respuesta inmune protectora como la patología se centran en esta característica. La ruptura del granuloma promueve la diseminación bacteriana y nuevas lesiones en otras zonas. Las reacciones tisulares contra las bacterias extracelulares son purulentas y llevan a la formación de abscesos o reacciones sistémicas.

Las infecciones por bacterias intracelulares se acompañan de reacciones de hipersensibilidad de tipo tardío que pueden expresarse después de la administración local de antígeno soluble como una reacción tisular tardía mediada por linfocitos T y llevada a cabo por macrófagos.

5. ESTRATEGIAS DE INTERVENCIÓN INMUNE EN RELACIÓN A BACTERIAS INTRACELULARES

Un conocimiento detallado acerca de la biología de las infecciones por bacterias intracelulares y de la respuesta inmune inducida por ellas, nos permite entender no sólo la compleja relación entre patógeno y el huésped, sino que también desarrollar medidas preventivas y estrategias de intervención terapéuticas.



Aunque en general, la vacunación es la medida profiláctica más exitosa contra las enfermedades infecciosas, la mayoría de las vacunas (ver capítulo 36) en uso están dirigidas contra microorganismos extracelulares. El éxito de estas vacunas está basado principalmente en la formación de anticuerpos que actúan impidiendo la invasión del patógeno o neutralizando toxinas o factores de virulencia.

5.1. Tipos de vacunas para bacterias intracelulares en uso

Actualmente existen sólo dos vacunas contra bacterias intracelulares y en ambos casos con limitado éxito. El BCG, es una cepa atenuada derivada de la cepa virulenta *M. bovis*. Desde su primer uso en 1921, ha sido administrado con pocos efectos colaterales pero, su eficacia protectora contra la tuberculosis pulmonar es muy variable (0 a 80%). La otra vacuna contra bacterias intracelulares corresponde a la cepa atenuada de *Salmonella typhi* Ty21. Por su baja protección y poca duración, se administra sólo a viajeros que visitan áreas donde existe alto riesgo de contraer fiebre tifoidea.

5.2. Desarrollo de nuevas vacunas

Existe la necesidad de disponer de formas de vacunas más efectivas, baratas y fáciles de aplicar, no sólo contra TBC y fiebre tifoidea, sino que también contra otras bacterias intracelulares de importancia en salud pública.

El desarrollo racional de una nueva generación de vacunas debe considerar el carácter particular que tiene la respuesta inmune efectiva contra el respectivo patógeno. Los requerimientos para tal vacuna incluyen:

- Inducción de la población de células T adecuada y secreción rápida de las citoquinas apropiadas que medien inmunidad protectora y al mismo tiempo dejen memoria inmunológica.
- Activación de los mecanismos efectores más apropiados que impidan que la infección se establezca o permitan eliminar el agente infeccioso.
- Especificidad frente al patógeno responsable para evitar el riesgo de una enfermedad autoinmune a través de antígenos de reacción cruzada.

- Que incluya antígenos expresados por la bacteria en el huésped y por varias otras cepas similares prevalentes.
- Inmunogenicidad para todos los haplotipos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (HLA en humanos) dentro de la población.

5.2.1. Identificación de antígenos protectores

Es importante primero definir los antígenos que son protectores. Una vacuna contra una bacteria intracelular debería contener aquellos antígenos capaces de inducir la combinación apropiada de células T CD4⁺ y CD8⁺ que produzcan IFN- γ para, subsecuentemente, activar macrófagos para eliminar la bacteria.

5.2.2. Cepas vaccinales atenuadas y recombinantes

El uso de bacterias vivas atenuadas como vacunas tiene la ventaja de que los microorganismos se replican en el huésped, al menos por un tiempo, con lo cual generalmente inducen inmunidad específica duradera. Además, por su gran homología con el patógeno virulento pueden inducir una respuesta inmune similar. Tal es el caso para las vacunas en humanos contra la tuberculosis (*M. bovis* BCG) y fiebre tifoidea (*S. typhi* Ty21) y para las vacunas utilizadas en el ganado (*B. abortus* RB51 *B. melitensis* Rev-1).

La identificación de factores de virulencia ha permitido la generación de cepas mutantes por delección genética creando cepas atenuadas que no producen daño en el hospedero y retienen su potencial inmunogénico. La cepa de *S. typhimurium* Aro A- fue creada por mutagénesis, es una mutante auxotrófica que tiene un defecto en la biosíntesis aromática. Puede conferir protección en ratones.

Otra aproximación, es el uso de bacterias vivas atenuadas como transportadoras de antígenos recombinantes, los cuales pueden ser expresados solos o junto con las citoquinas que son importantes en el control de los microorganismos intracelulares (IL-12, GM-CSF e IFN- γ).

5.2.3. Vacunas de subunidades y empleo de adyuvantes

El uso de proteínas nativas o recombinantes como antígenos vacunales tiene ventajas y des-



ventajas: Son vacunas altamente específicas y tienen bajo riesgo de efectos colaterales. Sin embargo, cuando se administran solas, su eficacia inmunoestimuladora y protectora es generalmente débil y de corta vida. La administración de subunidades bacterianas como vacunas depende, fuertemente, de adyuvantes inmunoestimuladores que simultáneamente generen el medio requerido para la estimulación de células T protectoras y además un reservorio para la liberación lenta de antígeno en el lugar de la administración para facilitar protección duradera. El único adyuvante aprobado para uso en humanos es el aluminio, que favorece respuestas de tipo Th2. El uso de adyuvantes capaces de estimular una respuesta Th1, que es lo que se requiere para vacunar contra bacterias intracelulares, presenta dificultades por la severa inflamación que acompaña su administración. Algunos glicolípidos y oligonucleótidos, por sus propiedades proinflamatorias, pueden ser considerados adyuvantes naturales para microorganismos intracelulares.

Las vacunas basadas en péptidos, escogidos entre epítopos protectores pueden disminuir el riesgo de reactividad cruzada por su especificidad única pero, tienen la desventaja de ser menos inmunogénicos. Debido a la existencia de distintos haplotipos de HLA, una vacuna basada en péptidos antigénicos tendría que cubrir la mayoría de las posibilidades del repertorio de epítopos de células T presentes en una población susceptible.

5.2.4. Vacunas DNA

En los últimos años, han aparecido métodos de vacunación con ácidos nucleicos (ver capítulo 36), los cuales constituyen un nuevo medio de expresión *in situ* de un antígeno seleccionado para la generación de una respuesta inmune humoral y celular que, eventualmente, puede inducir una respuesta inmune protectora. La inmunización con DNA ha sido usada para virus, bacterias y parásitos.

La vacunación con un plásmido bacteriano que tiene un gen que codifica para un antígeno seleccionado, se basa en la expresión del gen bajo control de un promotor viral fuerte como por ejemplo, el promotor de citomegalovirus (CMV), lo cual permite la expresión de genes codificados por las células eucariontes transfectadas. El plásmido se replica en una bacteria (*E. coli*), se purifica y luego se inyecta vía intramuscular en el huésped. Las células del huésped son capaces de sintetizar, procesar y presentar el antígeno a los linfocitos.

El plásmido es fabricado sin su origen de replicación funcional en células eucariontes, por lo tanto no se replica ni se integra al DNA cromosomal de la célula huésped transfectada. La integración de una secuencia líder en el plásmido permite la exportación del antígeno por la célula. El gen codificado por el plásmido se expresa hasta que éste es expulsado a través de la división celular. El plásmido puede ser administrado en la piel dentro de partículas, o a través de transportadores bacterianos. Posteriormente el antígeno puede ser fagocitado por monocitos y células dendríticas las cuales estimularán células T "helper". La vacunación por ácidos nucleicos induce tanto la inmunidad humoral como la inmunidad mediada por células. Se observa una reacción inflamatoria inducida por secuencias DNA bacteriano tales como los motivos CpG, que promueve la infiltración de monocitos, estimulación de células B para producir anticuerpos específicos contra el antígeno soluble, estimulación de células T CD8+ para diferenciarse a linfocitos T citotóxicos y también de células T CD4+ para diferenciarse a células Th1 y secretar citoquinas como IL-2 e INF- γ . En distinta medida todas estas vías de activación son importantes en la protección contra microorganismos de vida intracelular, además la inclusión de genes codificando citoquinas y moléculas coestimuladoras en el mismo plásmido puede promover una respuesta inmune más apropiada. Este tipo de vacuna es seguro y fácil de producir, mantener y administrar. La facilidad de construir y manipular los insertos de los genes, el bajo costo, la estabilidad del DNA, representan características deseables para una vacuna. Además la inmunización con ácidos nucleicos presenta como ventaja la capacidad de inducir mayores respuestas inmunológicas celulares que las vacunas de cepas vivas atenuadas, asociado a inmunidad a largo plazo.

La inmunización con inyección directa de plásmidos DNA codificando genes para antígenos proteicos específicos, se ha evaluado experimentalmente en varios modelos de infección, tales como virus de influenza, virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV), *Mycoplasma pulmoniae*, *L. mayor*, *B. burgdorferi*, así como con varios antígenos de *M. tuberculosis*.

La vacunación con DNA representa un avance promisorio e importante en el control de las infecciones por bacterias intracelulares.



LECTURAS SUGERIDAS

Schaible, E., Collins, H. y Kaufmann, S., “Confrontation between Intracellular Bacteria and the Immune System”, *Adv. Immunol.* 71:267-377, 1999.

Splitter, G.; Oliveira, S.; Carey, M.; Miller, C.; Ko, J. and Covert, J., “T lymphocyte mediated protection against facultative intracellular bacteria”, *Vet. Immun. Immunopath.* 54:309-319, 1996.

Ulmer, J., Donnelly, J.; Parker, S.; Rhodes, G.; Felgner, P.; Dwarki, V.; Gromkowski, S.; Deck, R.; Dewitt, C.; Fridman, A. y cols, “Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein”, *Science*, 259: 1745-1749, 1993.

Young, E.J., “An Overview of Human Brucellosis”, *Clin. Infect. Dis.* 21:283-290, 1995.

Zhan, Y.F. y Cheers, C., “Endogenous interferon- γ mediates the resistance to *Brucella abortus* infection”, *Infect. Immun.* 61:4899-4901, 1993.

Zhan, Y.F. y Cheers, C., “Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection”. *Infect. Immun.* 63:1387-1390, 1995.





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 33

INMUNIDAD FRENTE A HONGOS

Eva Burger, Luiz Zaror C., y Heriberto Fernández J.

1. Introducción

- 1.1. Consideraciones históricas
- 1.2. Características generales de algunos hongos oportunistas
- 1.3. Características generales de algunos hongos patógenos
- 1.4. Características generales de los dermatofitos
- 1.5. Conceptos sobre inmunidad a hongos patógenos

2. Inmunidad natural

- 2.1. Factores hormonales
- 2.2. Concentración de hierro
- 2.3. Sistema del complemento
- 2.4. Células “natural killer” (NK)
- 2.5. Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN)

2.6. Macrófagos

3. Inmunidad humoral a hongos

- 3.1. Papel de la inmunidad humoral
- 3.2. Mecanismos protectores de la inmunidad humoral

4. Inmunidad celular a hongos

- 4.1. Macrófagos
- 4.2. Linfocitos T
- 4.3. Citoquinas
- 4.4. Granulomas

5. Mecanismos de inmunidad protectora

- 5.1. Mecanismo principal
- 5.2. Otros mecanismos





RESUMEN

En este capítulo se presentan algunas características de los hongos oportunistas, de los hongos patógenos primarios agentes de micosis sistémicas y de los dermatofitos. Se introduce y analiza el concepto de que no existe un mecanismo protector específico capaz de conferir inmunidad protectora contra las micosis, haciendo énfasis en la participación y acción conjunta de varios mecanismos inmunológicos, los que también son efectivos en diferentes infecciones determinadas por otros agentes infecciosos.

También se describen los diferentes componentes de la respuesta inmune innata o natural, tales como factores inespecíficos (hormonios, concentración de hierro), factores solubles (componentes del sistema del complemento) y células efectoras (células killer (NK), leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y macrófagos alveolares y residentes).

Igualmente, se discute la participación de la respuesta inmune adquirida. Se analiza el papel protector o no protector de la inmunidad humoral como también los mecanismos efectores activos, tales como la opsonización de hongos por anticuerpos, citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) y la opsonización y/o lisis de hongos por complemento. Se estudia la participación preponderante de la inmunidad celular en la protección a infecciones fúngicas y el rol de las poblaciones celulares responsables de ella, como los macrófagos y sus productos antifúngicos, los linfocitos T CD4+ y T CD8+ y las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y sus productos de secreción (citoquinas). Finalmente, se discute también el papel de los granulomas en la infección por hongos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Consideraciones históricas

En la mayoría de los textos de Inmunología, cuando se trata el tema “Inmunidad a Infecciones”, el asunto “Inmunidad frente a Hongos” o está ausente o es de escasa extensión. Esto se debe a que, hasta hace poco, existía considerablemente menos información sobre la respuesta inmune frente a hongos que frente a las bacterias, virus e, incluso, protozoos y helmintos. Esto se debía a que las infecciones por hongos representaban un flagelo de mucho menor importancia para la humanidad que las infecciones de origen bacteriano. Actualmente, con el infortunado advenimiento del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), este cuadro ha sido completamente modificado.

Con la introducción de tratamientos inmunosupresivos en oncología y en trasplantes, el perfil inmunológico de la humanidad viene siendo drásticamente alterado, propiciando la aparición de un contingente cada vez mayor de pacien-

tes con deficiencias en la respuesta inmune y con tiempos de sobrevida más prolongados. Estos individuos constituyen una población extremadamente susceptible a las infecciones fúngicas.

En la historia natural de los hongos y en su relación con el hombre y los animales, su estado de parasitismo es un accidente o una necesidad poco apremiante y, por este motivo, hasta hace poco tiempo, eran considerados por muchos investigadores como organismos con poca capacidad invasiva y poca adaptación para el parasitismo. A la luz de lo expuesto precedentemente, estos conceptos deben ser necesariamente revisados.

1.2. Características generales de algunos hongos oportunistas

Los hongos oportunistas expresan capacidades patogénicas sólo en hospederos inmunocomprometidos. Algunos ejemplos de estos hongos se muestra en la tabla 33-1.



Tabla 33-1. Hongos oportunistas

Hongo	Características
<i>Candida albicans</i>	Forma parte de la flora normal (organismo endógeno). Infección mucocutánea por pérdida de la resistencia; en los tejidos infectados aparece formando pseudohifas.
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Hongo capsulado, el tamaño de la cápsula varía de acuerdo con la virulencia de cada cepa. Diseminación hematógena al cerebro y a las meninges; en casos graves compromete el sistema nervioso central. Grupo de riesgo: portadores de neoplasias malignas, pacientes con SIDA y trasplantados renales.

1.3. Características generales de algunos hongos patogénicos

Los hongos patogénicos, hongos considerados patógenos primarios, o sea, capaces de inducir infección y enfermedad en hospederos inmunocompetentes. Son todos hongos dimórficos, lo que ha inducido a algunos autores a considerar esta característica como una adaptación al

parasitismo. En la tabla 33-2, se muestra algunos ejemplos.

1.4. Características generales de los dermatofitos

En la tabla 33-3 se muestra algunos ejemplos de dermatofitos

Tabla 33-2. Hongos patogénicos

Hongo	Características
<i>Coccidioides immitis</i>	Presente en suelo de regiones áridas. La infección se produce por inhalación de esporas (artroconidias). En los tejidos ocurre crecimiento (esférulas) y fragmentación (endosporo). La enfermedad varía desde asintomática a diseminada (articulaciones, huesos, meninges y tracto génitourinario).
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Infección por inhalación de conidias. Infección subclínica o leve; a veces produce epidemias. Enfermedad pulmonar progresiva; diseminación hematógena fatal en individuos inmunosuprimidos. Parásito intracelular facultativo de macrófagos.
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	La infección se inicia en los pulmones. Forma progresiva: diseminación hematógena hacia el tracto génitourinario, huesos.
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Enfermedad granulomatosa progresiva crónica. Infección primaria del pulmón, diseminación hacia las mucosas oral, nasal, tracto gastrointestinal, órganos viscerales, linfonodos.



Tabla 33-3. Dermatófitos

Hongo	Características
<i>Epidermophyton</i>	Representan las micosis superficiales más frecuentes en Chile.
<i>Microsporun</i>	Atacan las áreas queratinizadas (piel, pelos y uñas).
<i>Trichophyton</i>	No forman parte de la biota de estas estructuras. Adaptados para utilizar la queratina como nutriente. El grado de inflamación producido depende del tipo de dermatofito (geofílico, zoofílico o antropofílico) y también del estado inmunológico del paciente.

1.5. Conceptos sobre inmunidad a hongos patogénicos

El reino Fungi comprende una gran variedad de especies que causan un amplio espectro de enfermedades de diferentes tipos. Los hongos patogénicos no causan un número elevado de muertes, considerando que muchos de ellos son controlados eficientemente mientras el sistema inmune mantenga su integridad. La producción de enfermedad, y particularmente de enfermedad grave, ocurre en determinadas circunstancias, las que serán descritas a continuación.

El sistema inmune, como un todo, es necesario para dar combate efectivo a las infecciones micóticas. La inmunidad protectora frente a infecciones producidas por hongos exige la participación eficiente de diversos mecanismos, los que incluyen diferentes células y moléculas.

A continuación se describen aspectos de la inmunidad natural o innata e inmunidad específica o adquirida (humoral y celular) asociada a infecciones micóticas.

2. INMUNIDAD NATURAL

2.1. Factores hormonales

Coccidioides immitis. Existe una mayor predisposición para la coccidioidomicosis durante el embarazo. La maduración de la fase tisular de *C. immitis* (esférulas/endosporos) se ve acelerada por efecto de esteroides, como por ejemplo del 17-beta estradiol presente en el suero durante el embarazo.

Paracoccidioides brasiliensis. La paracoccidioidomicosis es 20/90 veces más frecuente en hom-

bres que en mujeres. La transición de la fase miceliar a la fase levaduriforme es inhibida por el 17-beta estradiol, a través de la interacción con un receptor presente en el hongo.

Candida albicans. La candidiasis vaginal aumenta en mujeres hacia el final de la gestación y al final de la fase lútea del ciclo menstrual. Los estrógenos y los receptores de esta hormona influyen la conversión levadura/hifa. Al final del ciclo menstrual, cuando existen altos niveles de progesterona y bajos niveles de estradiol, se produce una disminución de la proliferación de linfocitos T frente a antígenos de *C. albicans*, lo que estimula el crecimiento de esta levadura.

Dermatófitos. Los dermatofitos presentan una distribución por edad, observándose *Microsporun* principalmente en niños. En cambio, los *Trichophyton* se observan preferentemente en adultos, lo que tiene que ver con la presencia de distintos ácidos grasos en la infancia y la pubertad, los que presentan diferentes espectros de acción sobre estos hongos. En las inmunodeficiencias como el SIDA, hay un notorio aumento de las dermatofitosis. En cambio, en la diabetes, el aumento de las dermatofitosis es levemente mayor, sin que éste sea estadísticamente significativo.

2.2. Concentración de hierro

Histoplasma capsulatum y *Paracoccidioides brasiliensis* necesitan de hierro para su crecimiento. En el organismo, el hierro está asociado a transferrina (proteínas transportadora) y ferritina (proteína de almacenamiento). Los hongos tienen, también, capacidad para secuestrar hierro para su crecimiento. Por tanto, existe una competencia



entre el hospedero y el hongo por este elemento, especialmente en su forma libre. Así, el aumento de hierro sérico aumenta la susceptibilidad las infecciones fúngicas.

En los dermatofitos, la transferrina no saturada puede prevenir el desarrollo de éstos en las capas profundas de la piel, por competencia por el hierro.

2.3. Sistema del complemento

El sistema del complemento puede ser activado por la vía clásica y alterna.

Activación por la vía alterna. Esta vía es activada por las paredes de *P. brasiliensis*, *B. dermatitidis*, *C. albicans*, *F. pedrosoi*, *C. immitis*, y *H. capsulatum* y por la cápsula de *C. neoformans*. Como resultado, se genera C3b, que opsoniza los hongos y favorece su fagocitosis. También aparecen diversos productos quimiotácticos que reclutan y activan leucocitos y, finalmente, aparece el complejo de ataque a membranas (MAC) con actividad lítica sobre los hongos. En el caso de los dermatofitos, al gatillar el sistema del complemento, se produce la atracción quimiotáctica de los neutrófilos.

Activación por la vía clásica. Los hongos patógenos son inmunogénicos e inducen la síntesis de anticuerpos específicos, favoreciendo la activación también por esta vía. Aún sin la participación de anticuerpos, esta vía puede ser activada pues, en la composición de su pared, muchos hongos presentan manosa, la cual se une a un receptor específico semejante al primer componente de la vía clásica (C1q).

2.4. Células “natural killer” (NK)

Mecanismos. El mecanismo de acción de las células NK se puede expresar tanto por un efecto fungicida directo o un efecto indirecto, a través de la producción de citoquinas, principalmente IFN-gama pero, también, de TNF- α y de GM-CSF.

Efectos de las células NK sobre algunos hongos. Los efectos antifúngicos de las células NK dependen de la especie de hongo de que se trate. Así, estas células presentan actividad anti *H. capsulatum* y juegan un papel en su “clearance”. También ha sido verificado que las células NK inhiben *C. immitis* y *C. albicans* y son fungistáticas para *C. neoformans* y *P. brasiliensis*.

En otros estudios se ha observado que los pa-

cientes con paracoccidioidomicosis tienen un mayor número de células NK que los individuos normales pero, éstas, son de menor actividad.

2.5. Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN)

Los PMN destruyen eficientemente los hongos siendo, incluso, más eficaces que otras células de la inmunidad natural pero, como tienen corta vida y las infecciones fúngicas son crónicas, su efecto es limitado. Así, en la fase inicial de las infecciones fúngicas los pmn disminuyen la carga infectante. Por otro lado, el papel de los pmn y su influencia en el tipo y la magnitud de la respuesta inmune adquirida debe ser estudiado con mayor profundidad.

PMN frente a hongos oportunistas. Los PMN son esenciales en la resistencia a la aspergilosis y a la candidiasis sistémica. De hecho, la susceptibilidad a la *Candida* sp. y a *Aspergillus* sp. aumenta en casos de neutropenia grave, enfermedad granulomatosa crónica en la cual existe una deficiencia de anión superóxido, la que lleva a una alteración en los niveles de mieloperoxidasa. Estas células son competentes para lisar extracelularmente hifas grandes de *C. albicans* y de *A. fumigatus* y tienen una significativa presencia en las fases iniciales de la candidiasis y de la criptococosis.

PMN frente a hongos patógenos. Los efectos antifúngicos de los PMN dependen de la especie de hongo patógeno. En la tabla 33-4 se mencionan algunos casos específicos.

2.6. Macrófagos

Macrófagos alveolares. Estas células fagocitan partículas infectantes de *H. capsulatum*, *C. immitis*, *C. neoformans*, *A. fumigatus*, *C. albicans* y *B. dermatitidis*. Fagocitan y matan hongos oportunistas y fagocitan, pero no matan, hongos patógenos primarios.

Macrófagos residentes. Cuando no son estimulados por citoquinas presentes durante la respuesta inmune adquirida, permiten la proliferación de *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* y *C. immitis*.

Producen óxido nítrico que inhibe el crecimiento de hongos patógenos fagocitados y serían activos contra hongos superficiales, como los dermatofitos.



Tabla 33-4. PMN y hongos patogénicos

Hongo	Papel de los PMN
<i>C. immitis</i>	Lisan alrededor del 20% de las artroconidias fagocitadas, digieren la pared de esférulas y no lisan endosporos.
<i>H. capsulatum</i>	Son poco eficaces en humanos y tienen importancia relativa en la respuesta primaria de animales.
<i>B. dermatitidis</i>	Pueden lisar células levaduriformes cuando son estimulados por IFN- γ .
<i>P. brasiliensis</i>	En pacientes, su capacidad fagocítica es normal pero su efecto fungicida es deficiente. <i>In vitro</i> son fungistáticos y cuando son estimulados por IFN- γ se tornan fungicidas.
Dermatofitos	Los neutrófilos y los monocitos/macrófagos aparecen como un importante mecanismo de defensa contra los dermatofitos a través de procesos microbicidas: oxidantes microbicidas (superóxidos, agua oxigenada, ácido hipocloroso) y monocloramina. Por muerte de los neutrófilos se producen sustancias microbicidas no oxidativas: catepsinas, defensinas, lactoferrina, lisozima, azuricidina, proteínas microbicidas que incrementan la permeabilidad. Los PMN tienen gránulos de Ca y Zn ligados a calprotectina.

Otras Células. Las células de la capa basal de la piel producen el crecimiento continuo de la epidermis hacia su derivación en queratinocitos. Estos, representan una barrera estructural contra antígenos externos y son importantes por mediar la respuesta inmune cutánea, secretando factores solubles capaces de estimular o disminuir la respuesta inmune. Producen marcadores de superficie, moléculas de adhesión, citoquinas quimiotácticas que serían responsables de la inflamación en las lesiones cutáneas, eicosanoides (PGE₂), factores de crecimiento e interleuquinas.

3. INMUNIDAD HUMORAL A HONGOS

3.1. Papel de la inmunidad humoral

Papel protector. Las infecciones fúngicas determinan la formación de anticuerpos específicos. Estos tienen efecto protector, pero su función es auxiliar. Sin embargo, la respuesta inmune humoral es importante en la fase inicial de la infección por *S. schenckii* y para evitar la candidiasis diseminada.

Papel no protector. Altos títulos de anticuerpos específicos se presentan en las formas clínicas graves de coccidioidomicosis y paracoccidioidomicosis. La activación policlonal de linfocitos B ocurre en formas clínicas graves de coccidioidomicosis y paracoccidioidomicosis. En estas micosis, una respuesta inmune humoral exacerbada representa un mal pronóstico. En las dermatofitosis las precipitinas son producidas infrecuentemente encontrándose bajos niveles de anticuerpos contra *T. rubrum*, los que podrían determinar reacciones cruzadas con otros organismos.

3.2. Mecanismos protectores de la inmunidad humoral

Opsonización de hongos por anticuerpos. El papel de las células fagocíticas que presentan receptores para la región Fc IgG (Fc γ R), se ve facilitado por la opsonización producida por los mismos anticuerpos. Así, PMN y monocitos humanos lisan *C. neoformans* opsonizados por anticuerpos, macrófagos de roedores o monocitos humanos ingieren *C. neoformans* encapsulados opsonizados por anticuerpos y los PMN se adhieren más a H.



capsulatum opsonizado por anticuerpos que a aquellos no opsonizados.

Citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC). Este mecanismo fue descrito contra *C. neoformans*, promoviendo un efecto fungistático.

Opsonización de hongos por complemento. Los PMN y monocitos humanos lisan *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *S. schenckii* opsonizados por complemento. Los macrófagos no activados no fagocitan *C. neoformans* opsonizado por complemento.

Lisis de hongos por complemento. El complejo de ataque a las membranas tienen efecto fungicida sobre *C. neoformans*. Un fenómeno interesante es que una deficiencia en el componente C5 de la vía efectora del sistema del complemento no implica en aumento de susceptibilidad a varias micosis profundas.

4. INMUNIDAD CELULAR A HONGOS

La inmunidad celular tiene importancia decisiva en la protección contra micosis profundas y en la candidiasis mucocutánea. Repetidamente ha sido verificado que los hongos patógenos tienen un efecto supresor sobre su inducción y/o sobre su expresión.

4.1. Macrófagos

Como ya fue visto, al contrario de los macrófagos residentes, que no lisan hongos patógenos, los macrófagos activados por IFN- γ son competentes fungicidas. Los efectos antifúngicos de estos macrófagos dependen tanto del hongo (especie, virulencia de la cepa) como de las características del macrófago (tipo, lugar de origen, especie del hospedero).

Substancias fúngicas relevantes. Los fagocitos lisan hongos a través de metabolitos tóxicos dependientes de NO (*P. brasiliensis*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. neoformans*), dependientes de O₂ (*H. capsulatum*, *C. immitis*, *C. albicans*) y también por medio de proteínas catiónicas (*C. immitis*).

4.2. Linfocitos T

Esta población celular es esencial para la resistencia a las infecciones causadas por hongos

dimórficos patógenos. Formas clínicas graves de algunas micosis están asociadas a la anergia de las respuestas mediadas por linfocitos T. Ciertas deficiencias en los linfocitos T, como aquella observada en pacientes con SIDA o en ratones atímicos, determinan formas infecciosas graves.

De hecho, a través de modelos experimentales fue posible comprobar un aumento en la gravedad de la infección por *H. capsulatum* en animales atímicos o depletados de linfocitos T, así como su incapacidad para eliminar *C. neoformans* y controlar su diseminación al sistema nervioso central. Sin embargo, no fue posible demostrar aumento de carga fúngica o exacerbación de la enfermedad causada por *C. albicans*.

Linfocitos T CD4+

Todos los hongos patógenos causan reacciones de hipersensibilidad de tipo tardío (HTT). El desarrollo de fuertes reacciones de HTT está asociado a formas clínicas benignas en pacientes con paracoccidioidomicosis y coccidioidomicosis. En modelos experimentales de varias micosis profundas se observó un paralelismo entre HTT y la cura o una buena evolución de la enfermedad, muchas veces precediendo al "clearance" de los hongos.

Muchos pacientes con dermatofitosis presentan HTT a antígenos de dermatofitos y también una vigorosa transformación de linfocitos como respuesta al antígeno pudiendo, éstos, acceder a la epidermis junto con neutrófilos.

Las respuestas de HTT participan en la lisis de los hongos de menor patogenicidad y del "clearance" parcial y la contención de hongos de mayor patogenicidad, incluyendo la formación de granulomas, se muestra en la tabla 33-5.

A continuación se describe el papel de subpoblaciones de células T CD4+ (LTh1 y LTh2) en la inmunidad células frente a algunos hongos.

***C. albicans* y *C. neoformans*.** En la respuesta inmune que se establece frente a estos hongos existe una asociación entre patrón de curación de la infección sistémica y respuesta predominantemente Th1 y entre patrón de no curación y el establecimiento de una respuesta predominantemente Th2, constituyendo, así, un perfil claramente dicotómico de producción de citoquinas Th1 y Th2.



Tabla 33-5. Papel de linfocitos T CD4(+) en la inmunidad celular a algunos hongos

Hongo	Papel de los linfocitos T CD4 (+)
<i>C. immitis</i>	Son necesarios para la inmunidad protectora en los pulmones, lo que fue confirmado por experimentos de transferencia de células.
<i>H. capsulatum</i>	Su ausencia determina un notorio aumento de la susceptibilidad y muerte por dosis menor del hongo que las usualmente conocidas.
<i>C. neoformans</i>	Son necesarios para el “clearance” de los hongos del pulmón.

P. brasiliensis, B. dermatitidis, C. immitis. En las infecciones por estos hongos existe una respuesta Th1 inicial seguida de una respuesta Th2, lo que se correlaciona con el agravamiento de la enfermedad. El patrón de producción de citoquinas Th1 y Th2 difiere entre los diferentes hongos, tanto en cuanto a su cinética como a los niveles producidos.

Linfocitos T CD8+. Los LT citotóxicos (LT CD8+) participan, en conjunto con linfocitos t CD4+, en la inmunidad protectora contra varios hongos patógenos, como *H. capsulatum* y *C. neoformans*. Los mecanismos por los cuales esta protección se produce pueden ser varios: lisis de macrófagos infectados (*H. capsulatum*), efecto fungicida directo (*C. neoformans*) o secuestro en granulomas (*C. neoformans*).

En la tabla 33-6 se describe la participación de las células T CD8+ en algunas infecciones micóticas.

4.3. Citoquinas. Las citoquinas Th1 (IFN- γ , IL-2) tienen un papel importante en la protección contra infecciones fúngicas, en el desarrollo de reacciones de HTT y en la activación de macrófagos.

Las citoquinas Th2 (IL-4, IL-10) están

involucradas en la exacerbación de infecciones fúngicas, en la anergia de reacciones de HTT y en la desactivación de macrófagos.

TNF- α y GM-CSF estimulan la actividad antifúngica de PMN, monocitos y macrófagos.

En la tabla 33-7 se muestra la participación de algunas citoquinas en la inmunidad celular de algunos hongos.

4.4. Granulomas

La formación de granulomas tiene el propósito de restringir el crecimiento fúngico y confinar la infección.

Los macrófagos activados inhiben el crecimiento fúngico. Cuando esto no es posible, ocurre la fusión de macrófagos formándose células gigantes multinucleadas para contener el desarrollo fúngico. La encapsulación promovida por la fibrosis también tiene efecto de contención sobre los hongos. Como ocurre necrosis, se reduce la oferta de nutrientes y de oxígeno necesarios para la proliferación de los hongos.

Los principales tipos celulares encontradas en varias micosis, como las causadas por *B. dermatitidis*, *C. immitis*, *S. schenkii*, *H.*

Tabla 33-6. Linfocitos T CD8+ y algunos hongos

Hongo	Papel de los linfocitos T CD8 (+)
<i>C. immitis</i>	Son necesarios para la inmunidad protectora en el pulmón.
<i>H. capsulatum</i>	Su ausencia determina un relativo aumento de la susceptibilidad pero no causa la muerte.
<i>C. neoformans</i>	Son necesarios para el “clearance” de estos hongos de los pulmones.



Tabla 33-7. Citoquinas e infecciones micóticas

Hongo	Papel de las citoquinas
<i>C. albicans</i>	IFN γ está asociada con el patrón de curación de la infección y, en contrapartida, IL-4 e IL-10 con el desarrollo de enfermedad crónica. IL-12 presenta efecto protector contra la diseminación del hongo, además de ser un poderoso inductor de la respuesta Th1 IFN- γ , GM-CSF y TNF- α son mediadores de la lisis intracelular.
<i>C. immitis</i>	TNF- α , IL-1 y IL-6 están involucrados en el síndrome respiratorio agudo y choque séptico, importantes en la patogénesis. IFN- γ y IL-12 son mediadores de la lisi intracelular de artroconidias. IL-12 tienen efecto protector también por inducción de la expresión de citoquinas Th1.
<i>H. capsulatum</i>	IL-12 tienen efecto protector indirecto, por la producción de IFN γ y relevancia en la respuesta inmune primaria. TNF α en conjunto con IL-12 aumentan la producción de IFN γ es el principal mediador de la lisis intracelular. TNF α en conjunto con IFN γ determinan la exacerbación del efecto protector. IL-4 modula la inmunidad protectora mediada por IFN γ
<i>C. neoformans</i>	TNF α , IL-12, IL-1, IFN γ son producidos al inicio de la infección, con un importante papel en la inducción de inmunidad celular protectora. IL-12 presenta efecto protector contra la diseminación. IFN γ , GM-CSF y TNF α son mediadores de la lisis intracelular.
Dermatofitos	El IFN γ está involucrado en gatillar la HTT y es responsable de las manifestaciones cutáneas y en la defensa del huésped contra la infección. Es producido por linfocitos periféricos en la dermatofitosis inflamatoria aguda, siendo baja su concentración en las formas crónicas. Liberan IL-8 por efecto de antígenos de dermatofitos iniciando la inflamación como defensa. Los niveles de IL-1 α inducidos por <i>T. mentagrophytes</i> son más altos que los producidos por el hongo antropofílico <i>T. rubrum</i> , lo que se relaciona con una respuesta inflamatoria más severa en el caso del hongo geofílico. Las células de Langerhans (2-5% de las células de la epidermis) producen marcadores de superficie y moléculas de adhesión (LFA-3, ICAM-1, B7) y citoquinas (IL-1B, IL-6, TNF- α), actúan como procesadoras y presentadoras del antígeno para activar los linfocitos T, además de fagocitosis de antígenos.

capsulatum y *C. neoformans*, son PMN, linfocitos, células epiteliales y células gigantes multinucleadas.

Los granulomas se presentan circunscritos en la enfermedad controlada y diseminados en las enfermedades graves.

5. MECANISMOS DE INMUNIDAD PROTECTORA

5.1. Mecanismo principal

El principal mecanismo protector que actúa en las micosis profundas es la producción de



citoquinas como el IFN γ por linfocitos T, llevando a la activación de macrófagos, con el consiguiente aumento de su capacidad fungicida.

5.2. Otros mecanismos

Además de éste, existen otros mecanismos capaces de conferir inmunidad protectora en infecciones fúngicas. De estos otros es necesario citar el desarrollo primordial o preferencial de una fuerte respuesta del tipo Th1, el efecto conjunto de linfocitos T CD4 $^{+}$ y T CD8 $^{+}$ además del efecto de otras poblaciones celulares y del efecto individual o sinérgico de varias citoquinas.

LECTURAS SUGERIDAS

Kwon-Chong, K.J. & Bennet, J.E., **Medical Mycology**, Lea & Febiger Ed., Philadelphia, 1992.

Journal of Medical and Veterinary Mycology, Volume 30, Supplement 1, 1992 (Proceeding of the XI Congress of ISHAM).

Medical Mycology, Volume 36, Supplement 1, 1998 (Proceedings of the XIII Congress of ISHAM).

Medical Mycology, Volume 38, Supplement 1, 2000 (Proceedings of the XIV Congress of ISHAM).

Sarosi, G.A & Davies, S.F., **Doenças Fúngicas do pulmão**. Revinter Ed., 2001.





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Roseblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 34

RESPUESTA INMUNE FRENTE A VIRUS

José M. Ojeda F. y Jorge A. Fernández V.

- | | |
|--|---|
| 1. Introducción | 3.3. Evasión de la respuesta inmune por virus |
| 2. Infección viral | 3.3.1. Persistencia intracelular |
| 2.1. Interacción virus-huésped | 3.3.2. Variación antigénica |
| 3. Respuesta inmune en infecciones virales | 3.3.3. Interacción con componentes del sistema inmune |
| 3.1. Inmunidad antiviral natural | 3.3.4. Interferencia con la presentación antigénica |
| 3.1.1. Producción de IFN tipo I y otras citoquinas | 3.3.5. Simulación molecular |
| 3.1.2. Células NK | 3.3.6. Inmunosupresión |
| 3.1.3. Activación del complemento y fagocitosis | |
| 3.2. Inmunidad antiviral específica | |
| 3.2.1. Inmunidad humoral | |
| 3.2.2. Inmunidad celular | |





RESUMEN

Aún cuando en su mayoría las infecciones virales son de tipo subclínico o asintomáticas, en general inducen respuesta inmune.

En este capítulo se revisa, brevemente, cómo ocurren las infecciones virales, indicando el tipo de interacciones ligando-receptor que se requieren para que estos parásitos intracelulares infecten las células blanco.

La mayor parte del capítulo se refiere a la respuesta inmune que se puede generar en las infecciones virales. En lo que se refiere a la inmunidad antiviral natural o innata, participan el interferón (IFN) tipo I, células NK y el sistema del complemento. Respecto a la inmunidad antiviral específica o adquirida, se describe la participación de los anticuerpos (inmunidad humoral) y de linfocitos T citotóxicos (inmunidad celular).

Finalmente, en el capítulo se explican las diferentes estrategias que utilizan los virus para evadir la respuesta inmune: persistencia intracelular, variación antigénica, interacción con componentes del sistema inmune, interferencia con la presentación antigénica, simulación molecular e inmunosupresión.

1. INTRODUCCIÓN

Los virus, son agentes infecciosos capaces de ejercer diversas interacciones con los hospederos que infectan, algunas de las cuales afectan a células, tejidos y órganos manifestando su poder patógeno. En estas interacciones, que conducen al desarrollo de enfermedad, participan factores propios del agente infeccioso, del hospedero y del ambiente. La patogenia de las enfermedades infecciosas involucra etapas que son determinadas por la acción de estos factores. Los factores dependientes del hospedero ejercen su acción a través de mecanismos de inmunidad natural o inespecífica y de los mecanismos específicos o de inmunidad adquirida (ver capítulo 3). Entre los mecanismos de inmunidad natural, que tienen importancia en el control de las infecciones, están: la fagocitosis, la acción del sistema complemento, células NK, las barreras cutáneas y de las superficies epiteliales, el pH gástrico, los movimientos ciliares, las secreciones en las mucosas, la flora gastrointestinal normal y otros. Los mecanismos de inmunidad específica (Linfocitos B, T, anticuerpos), serían de escasa o nula utilidad si no contaran con los mecanismos de inmunidad natural.

La evolución de las infecciones virales y de

sus enfermedades comprende una secuencia de interacciones entre los virus y sus hospederos. Éstas incluyen la entrada de los virus al organismo, su diseminación y localización en los tejidos u órganos blancos, evadiendo al mismo tiempo los mecanismos inmunes del hospedero.

La respuesta inmune frente a virus se caracteriza por:

- a) Estar mediada por ambos tipos de inmunidad, tanto innata, como adquirida, aunque en una primoinfección predominan los mecanismos innatos, cuya respuesta aislada se caracteriza por ser siempre de igual magnitud frente al mismo estímulo antigénico y carecer de memoria.
- b) Diferentes tipos de virus estimulan distintas respuestas y mecanismos efectores inmunes, ya que los virus difieren en sus patrones de infección, inmunogenicidad y por tanto su eliminación implica diversos sistemas efectores.
- c) La sobrevivencia y patogenicidad de los virus en el hospedero dependen de su habilidad para evadir o resistir los mecanismos inmunes. Los virus en su evolución han desarrollado una variedad de estrategias y eficientes mecanismos para su sobrevivencia, evadiendo la respuesta inmune.



d) El daño tisular y enfermedades derivadas de las infecciones por virus patógenos pueden ser causadas por la respuesta del hospedero contra el agente infeccioso, más que por la acción directa de él. La inmunidad, al igual que muchos otros mecanismos homeostáticos, es fundamental en la protección del hospedero ante las agresiones externas, pero también tiene la capacidad de provocarle daño.

2. INFECCIÓN VIRAL

Los virus pueden infectar a los individuos y causar enfermedad, si poseen capacidad o poder patógeno en dicho huésped. Sin embargo, las infecciones virales son en su mayoría de tipo subclínico o asintomáticas, sin generar procesos patológicos, pero sí una respuesta inmune.

2.1. Interacción virus-huésped

Los virus son organizaciones macromoleculares constituidas por ácido nucleico y proteínas. Sólo algunos virus poseen además una envoltura o membrana lipídica con glicoproteínas insertas. Las partículas virales poseen capacidad infectiva y por carecer de maquinaria de biosíntesis de sus macromoléculas, aprovechan la maquinaria metabólica de la célula hospedera, ejerciendo el carácter de parásitos estrictamente intracelulares. La utilización de los sistemas de biosíntesis celulares le permiten a los virus replicarse en el interior de las células infectadas.

Los virus animales entran a las células uniéndose a receptores moleculares presentes en la superficie celular y que corresponden a entidades que son fisiológicamente activas. Algunos ejemplos son: (i) Virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1), el cual se une a la molécula CD4 presentes en las células T "helper" humanas, (ii) Virus Epstein-Barr (VEB), que se une al receptor tipo 2 del complemento en los linfocitos B humanos, y (iii) Los Rinovirus, agentes causantes del resfrío común, que se unen a la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), expresada en el epitelio de la vía aérea.

Después del proceso de unión a los receptores los virus son internalizados a la célula por fagocitosis (viropexia) o por fusión de las membranas viral y celular. En el interior de las células infectadas los virus se liberan de su cubierta proteica, permitiendo que el genoma viral se re-

plique y exprese, generando nuevas copias de ácido nucleico y proteínas o antígenos virales.

La replicación viral produce inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas celulares, lo que conduce a alteraciones celulares que se manifiestan de diversas formas denominadas efectos citopáticos y que suelen concluir con la lisis o muerte celular. Algunos virus producen infecciones sin generar efectos citopatológicos evidentes, estableciendo infecciones a nivel celular de carácter latente o persistente. En algunos casos las células, así infectadas expresan proteínas o antígenos virales que pueden estimular la inmunidad específica, la que actúa a través de reacciones de hipersensibilidad produciendo el daño celular. Este tipo de reacciones suele observarse en infecciones por el virus de la Coriomeningitis linfocitaria en ratones y por virus de la Hepatitis B en los seres humanos.

3. RESPUESTA INMUNE FRENTE A VIRUS

La inmunidad contra los virus opera en dos etapas: En la fase inicial de infección, antes de que un virus haya entrado en las células (virus extracelular) y después de su penetración, cuando el virus se encuentra en el interior de las células infectadas y es inaccesible para los mecanismos de inmunidad humoral (anticuerpos y complemento) y los fagocitos.

La estimulación misma del sistema inmune en una infección viral puede tener tres consecuencias generales:

Activación de componentes del sistema inmune no específicos para antígenos virales, lo que puede significar la inducción de un proceso inflamatorio que favorece la eliminación del virus, pero que también puede causar daño en las células y tejidos del huésped. También la activación puede conducir al desarrollo de un estado patológico que tienda a persistir en el tiempo, independiente de la presencia del virus.

Activación de componentes del sistema inmune que exhiban especificidad para interactuar con estructuras virales. La interacción de mecanismos efectores específicos del sistema inmune con antígenos virales promueve la eliminación progresiva de virus.

Modificaciones en componentes del sistema inmune, algunas de ellas irreversibles, que perduran después de la eliminación del virus, que pueden conducir a variaciones en el repertorio de receptores de células T (TCR) (ver capítulo 7), ge-



neración de poblaciones celulares de memoria inmunológica y tolerancia.

3.1. Inmunidad antiviral natural

Hay dos mecanismos principales de inmunidad antiviral natural:

(i) producción de Interferón (IFN) tipo I (α y β) y otras citoquinas, que generan un estado antiviral, y (ii) participación de células NK ("Natural Killer") en la destrucción de las células infectadas. El (IFN) I puede aumentar la actividad citolítica de las células NK. Ambos mecanismos operan en la fase temprana de las infecciones virales, antes de que actúen los mecanismos de inmunidad específica.

Por otra parte, la activación del sistema del Complemento y la fagocitosis participan en la eliminación de virus extracelular presente en los fluidos corporales y constituyen también formas de inmunidad antiviral natural.

3.1.1. Producción de IFN tipo I y otras citoquinas

La infección viral estimula la producción de IFN tipo I y citoquinas en ciertos tipos de células (ver capítulo 10). Los interferones son proteínas que ejercen sus efectos antivirales a través de diversos efectos como: (i) mayor expresión de las moléculas MHC clase I y II, lo que facilita el reconocimiento de los antígenos virales por parte del sistema inmune, (ii) activación de las células NK y macrófagos con capacidad de destruir las células infectadas por los virus. El IFN- β estimula también a los linfocitos B, (iii) inhibición directa de la replicación viral. Diversos mecanismos contribuyen a producir este efecto.

Los IFN- α corresponden a una familia de 20 polipéptidos (18 kDa) relacionados estructuralmente entre sí y codificados por genes separados, en cambio el IFN- β es un polipéptido (20 kDa) codificado por un solo gen. Las principales células productoras de IFN- α son los fagocitos mononucleares y en el caso de IFN- β son los fibroblastos y las células infectadas por virus. La señal natural más potente para la síntesis de IFNs tipo I es la infección viral. Ambos tipos de IFNs son secretados también durante la respuesta inmune a antígenos, al ser estimulados los fagocitos mononucleares por los linfocitos T. Aunque los IFNs α y β muestran poca similitud estructural, se unen al mismo receptor celular e inducirían res-

puestas celulares similares.

El IFN producido por las células infectadas es secretado al exterior, donde se une a receptores presentes en la superficie de las células vecinas. Esta interacción IFN-receptor provoca una cascada de eventos moleculares similar a otra transducción de señales, que culmina con la activación de genes e inducción de proteínas antivirales como son: una proteína quinasa y una 2',5'-oligoadenilato sintetasa. La proteína quinasa inactiva por fosforilación al factor proteico de iniciación (eIF-2) necesario para la síntesis de proteínas virales. La sintetasa genera oligoadenilatos que activan una endorribonucleasa que degrada los ácidos ribonucleicos virales. El efecto antiviral de estos IFNs es por tanto paracrino, dado que la célula infectada secreta IFNs para proteger a las células vecinas aún no infectadas, produciendo el estado antiviral.

3.1.2. Células NK

Las células NK (ver capítulo 19) destruyen una gran variedad de células infectadas por virus. La actividad lítica de las células NK pueden ser uno de los principales mecanismos de inmunidad en contra de los virus, tempranamente o durante el curso de la infección, antes de que las respuestas inmunes específicas se hayan desarrollado. Los IFNs tipo I ejercen un efecto sinérgico aumentando la capacidad de las células NK para lisis las células infectadas. Las células NK destruyen o lisan estas células liberando el contenido de sus gránulos que consiste en perforinas o proteínas que generan canales en las membranas celulares, produciendo lisis osmótica y granzimas, que son endonucleasas que degradan DNA. También las células NK inducen Apoptosis (muerte celular programada) de la célula infectada.

3.1.3. Activación del Complemento y Fagocitosis

El Complemento y la Fagocitosis pueden eliminar virus desde sitios extracelulares y desde la circulación y fluidos corporales. La activación del complemento, como mecanismo de inmunidad natural, sería a través de la vía alterna. Constantemente se está formando en el plasma C3b a partir de C3. Si este C3b se deposita covalentemente sobre una membrana biológica (como puede ser la de los virus con envoltura), o sobre una superficie proteica (virus desnudos), y si es que estas



superficies, a diferencia de las membranas celulares, no poseen proteínas regulatorias como: H, CR1, MCP o CD59 puede producirse, en el caso de los virus envueltos, virolisis por ruptura de su envoltura lipídica al formarse MAC, o bien por opsonización y fagocitosis por las células del sistema fagocítico mononuclear que poseen receptores para C3b (CR1, CR3 y CR4).

3.2. Inmunidad antiviral específica

La inmunidad específica contra las infecciones virales es mediada por una combinación de mecanismos celulares y humorales. Ambos mecanismos participan en el control de la infección, ya sea actuando directamente sobre las partículas virales o bien sobre las células infectadas.

3.2.1. Inmunidad humoral

Durante la infección viral se estimulan los linfocitos B, haciendo que éstos proliferen y se diferencien en células plasmáticas capaces de sintetizar anticuerpos específicos que reconocen y reaccionan contra diferentes antígenos virales, ya sea estructurales (que forman parte de la partícula viral) o no estructurales (proteínas virales que se generan durante la infección viral, pero que no forman parte de la partícula viral).

Anticuerpos neutralizantes. Estos anticuerpos específicos son importantes por su acción protectora, ya que su función es la neutralización de la capacidad infectiva. Se unen a las proteínas de infectividad, que son aquellas que permiten la unión del virus a sus receptores celulares, impidiendo así su entrada y replicación.

Anticuerpos opsonizantes. Los anticuerpos subclase IgG1 e IgG3 tienen propiedades opsonizantes, se unen a los antígenos virales aumentando la fagocitosis de las partículas virales por células fagocíticas que poseen receptores Fc. Sin embargo, estos anticuerpos pueden en algunos casos facilitar la entrada de las partículas virales a estas células donde ciertos virus inician procesos infectivos y replicativos, como es el caso de la infección de fagocitos mononucleares por VIH.

Anticuerpos activadores del complemento. Otros anticuerpos son aptos para unirse a las partículas virales formando complejos antígeno-

anticuerpo capaces de activar el sistema complemento, generando destrucción de la partícula viral (virolisis) o promoviendo la fagocitosis.

Los anticuerpos que no son opsonizantes ni activan complemento, como IgA, IgE e IgG4 desempeñan funciones neutralizantes importantes a nivel de inmunidad local, especialmente en infecciones del tracto respiratorio e intestinal.

La manipulación de la inmunidad humoral ha sido fundamental en el establecimiento de las vacunas antivirales a virus atenuado o inactivado, ya que el éxito de la función protectora de una vacuna está relacionada con la capacidad de inducir una respuesta inmune de anticuerpos específicos contra determinados antígenos virales que son determinantes de la infección y poder patógeno.

La inmunidad humoral desempeña su función protectora, en gran parte por la función neutralizante de los anticuerpos. Sin embargo es importante considerar que esta protección es efectiva sólo en la fase temprana de la infección, es decir antes que el virus entre a la célula. Por otro lado, es difícil transferir inmunidad antiviral mediante anticuerpos purificados y la capacidad neutralizadora de un anticuerpo *in vitro*, generalmente muestra poca o ninguna correlación con su capacidad protectora *in vivo*. Estas consideraciones muestran que los anticuerpos son un componente importante de la inmunidad antiviral, pero que no son suficientes para eliminar muchas infecciones virales. Estos hechos se evidencian también en que determinadas deficiencias de la inmunidad humoral aumenta la susceptibilidad de determinadas infecciones virales.

3.2.2. Inmunidad celular

La respuesta inmune celular específica está dada por complejas interacciones entre la célula infectada y células del sistema inmune. La interacción más importante, referente al control de la infección es la que se establece entre los linfocitos T citotóxicos (LTc) y la célula infectada. En esta interacción se produce un reconocimiento por parte de ambas células, en la que es crucial la expresión de ciertos polipéptidos virales, que dan la especificidad de la respuesta y la acción citotóxica en sí, que es respuesta a este reconocimiento.

La principal población celular que ejerce esta acción citotóxica son las células CD8+, las que reconocen péptidos o antígenos virales sintetizados en la célula infectada, en asociación con mo-



lécúlas MHC de clase I. Una proporción menor, pero detectable de linfocitos citotóxicos de humanos y de ratones, corresponde a linfocitos CD4+ que reconocen péptidos virales en asociación con moléculas MHC de clase II. Esta acción citotóxica de las células CD4+ se ejerce sobre células infectadas que expresan tanto MHC-II, como péptidos virales. La diferenciación de los LTC de tipo CD8+ requiere de citoquinas producidas por células las células CD4+.

El efecto antiviral de los LTc conduce a la lisis de la célula infectada, la que se debe a diversas acciones como: producción de perforinas, estimulación de enzimas intracelulares que degradan genomas y proteínas virales, secreción de citoquinas como IFN, inducción de apoptosis y otros (ver capítulo 19).

La importancia de los LTc en el control de las infecciones virales ha sido demostrada en sistemas experimentales. Los ratones pueden ser protegidos contra el virus de influenza, a través de la transferencia de LTc específicos para el virus y del mismo tipo de MHC del animal. Sin embargo, una gran proporción de LTc específicos para virus influenza, no son serotipos específicos, porque ellos reconocen péptidos derivados de las proteínas virales como son las proteínas internas de la partícula viral, y que no se relacionan antigénicamente con las glicoproteínas de la envoltura proteicas (hemaglutinina y neuroaminidasa) que son las que determinan el serotipo. Por otra parte, la inmunidad adquirida activamente en el caso de infecciones por virus influenza es serotipo específica, lo indica que tanto los anticuerpos como los LTc participan en la respuesta inmune para proteger la célula hospedera, bloqueando la entrada del virus a la célula o inhibiendo la replicación viral.

Respuesta inmune antiviral y daño celular

En la mayoría de las infecciones virales agudas se produce destrucción celular y tisular por acción directa del virus sobre las células (citólisis) como consecuencia de sus efectos citopáticos.

La respuesta inmune de los LTc puede ser el factor más importante en producir daño celular en los tejidos infectados por virus no citopáticos. El mejor ejemplo son las infecciones por virus de la coriomeningitis linfocitaria (VCML), el cual induce inflamación de las meninges en ratones. El VCML infecta las célu-

las de la meninge, expresando péptidos y antígenos virales, pero sin destruirlas. Además el VCML estimula el desarrollo de LTc específicos que son los que reconocen las células infectadas y las destruyen. Los ratones infectados con VCML, pero deficientes en células T, son portadores crónicos del virus, pero no desarrollan meningitis, mientras que sí se desarrolla en los ratones normales infectados.

La infección del virus de la hepatitis B en humanos muestra algunas similitudes con la infección por VCML en ratones. Las personas inmunodeficientes que llegan a infectarse no desarrollan la enfermedad, pero pueden ser portadores del virus y transmitir la infección a personas sanas. Por otra parte, el hígado de pacientes con hepatitis aguda contiene gran cantidad de células T CD8+.

La respuesta inmune a infecciones virales, puede estar también relacionada a procesos de desarrollo de enfermedad, ya que como consecuencia de infecciones persistentes por algunos virus se forman complejos inmunes circulantes de antígenos virales con anticuerpos específicos. Estos complejos antígeno-anticuerpo se depositan en los vasos sanguíneos y suelen conducir a procesos inflamatorios de vasculitis y destrucción vascular.

Algunos virus contienen proteínas antigénicas, cuyas secuencias de aminoácidos poseen cierta homología con proteínas celulares. Algunas de estas proteínas virales, se expresan en la superficie celular de ciertos tejidos. Se ha postulado que debido a esta similitud molecular, la inmunidad antiviral puede conducir a respuestas de daño tisular. La tabla 34-1 muestra algunas proteínas virales homólogas a proteínas celulares y que poseen funciones biológicas determinantes en las propiedades patogénicas de ciertos virus. Algunas de estas proteínas pueden interactuar directamente con componentes del sistema inmune, como son las proteínas gVC-1 y gE de los virus HSV, que se unen a C3b del complemento y Fc de las inmunoglobulinas respectivamente. Otras de proteínas virales son homólogas a interleuquinas, como la proteína codificada por el gen K2 del virus HHV-8 que es similar estructural y funcionalmente con IL-6. También existen proteínas virales que actúan en forma similar a proteínas celulares, como es el caso de la proteína VGF de los virus Vaccinia que actúa igual que EGF, estimulando el crecimiento de células epiteliales.



Tabla 34-1. Proteínas virales homólogas a proteínas celulares

Virus	Proteína viral	Función
Adenovirus	E3	Impide translocación de MHC-I
	E1b	Interfiere con señal de transducción de TNF
Herpes simplex 1 y 2 (HSV)	g C-1	Se une a C3b
	g E	Se une a Fc de Ig
Citomegalovirus (CMV)	UL 18	Se une a β 2 MG
Epstein – Barr (EBV)	BHRF – 1	Homólogo a Bcl – 2
	BCRF – 1	Homólogo a IL – 10
Herpes Humano – 8 (HHV-8)	K2	Homólogo IL-6
	ORF – 4	Se une a Complemento
	ORF – 16	Homólogo α Bcl 2
	ORF – 72	Homólogo α Ciclina D
Vaccinia	VGF	Homólogo a EGF/TGF α
	VCP	Se une a C4b

El establecimiento de la secuencia génica de varios virus ha permitido establecer y comprobar la homología de genes y proteínas virales con sus contrapartes celulares. Se postula que estos genes virales han sido secuestrados o capturados de los genomas celulares durante los procesos evolutivos y que han sido parcialmente modificados, con el fin de permitir obtener ventajas selectivas a los virus para su existencia, replicación y transmisión.

3.3. Evasión de la respuesta inmune en las infecciones virales

Los virus han desarrollado diversos mecanismos para evadir los mecanismos de defensa antiviral del sistema inmune, los que han permitido su supervivencia. Se han identificado varios genes virales y sus proteínas que modulan la respuesta inmune y posiblemente existan muchos otros genes y proteínas virales con estas propiedades.

Varios virus son capaces de inhibir la presentación de sus propios antígenos a los linfocitos T citotóxicos. Estos linfocitos CD8+ con actividad citolítica restringida a MHC clase I, constituyen el principal mecanismo de defensa contra las

infecciones virales a nivel celular. Si un virus es capaz de expresar funciones inhibitorias para los MHC clase I o su presentación antigénica, se hará indetectable para los linfocitos T y podrá permanecer y replicarse en las células infectadas.

Existen diversos mecanismos por los cuales las infecciones virales escapan al control de la respuesta inmune, estableciendo infecciones de carácter crónico, ya sea con persistencia de partículas virales infectivas o por estados de latencia y transformación viral.

3.3.1. Persistencia intracelular

La permanencia intracelular de los virus, sin expresión de antígenos de reconocimiento y reactividad inmunológica, es el mecanismo más obvio por el cual ellos pueden escapar de las células y moléculas de la respuesta inmune, como es el caso de las infecciones de ciertas neuronas por los virus Herpes simplex, donde se encuentran latentes.

3.3.2. Variación antigénica

Existen virus capaces de presentar gran variación antigénica, especialmente en sus proteí-



nas de infectividad, como es el caso de los virus influenza (Hemaglutinina y Neuroaminidasa). Estas variaciones ocurren por mutaciones puntuales, recombinaciones y reordenamientos genéticos entre cepas virales diferentes. Como resultado, los nuevos virus no son susceptibles a la inmunidad generada en la población por infecciones previas. Existen muchos tipos antigénicos de rinovirus (más de un centenar) por lo que la inmunidad específica contra un tipo antigénico no protege de la infección por otro tipo. Ciertos virus RNA como VIH acumulan mutaciones durante su replicación por carecer de maquinaria de reparación de síntesis de ácidos nucleicos, de aquí que a su alta variación genética se asocia la variación antigénica.

3.3.3. Interacción con componentes del sistema inmune

Ciertos virus como Epstein Barr infectan a células del sistema inmune como son los LB. Por otra parte, VIH infecta LT CD4+ y otros virus infectan secundariamente a otras células del sistema inmune incluyendo macrófagos. La infección de las células del sistema inmune por estos virus provoca un desbalance que conduce a formas de evasión de la respuesta inmune antiviral.

3.3.4. Interferencia con la presentación antigénica

Existen ciertos virus que durante la infección viral expresan proteínas que interfieren con la presentación antigénica, especialmente la relacionada con los MHC, que es fundamental en el reconocimiento y destrucción de la célula infectada por los LT.

Varios virus son capaces de inhibir la presentación de sus propios antígenos a los linfocitos T citotóxicos. Estos linfocitos CD8+ con actividad citolítica restringida a MHC clase I, constituyen el principal mecanismo de defensa contra las infecciones virales a nivel celular. Si un virus es capaz de expresar funciones inhibitorias para los MHC clase I o su presentación antigénica, se hará indetectable para los linfocitos T y podrá permanecer y replicarse en las células infectadas. Cada una de las etapas de la presentación antigénica puede ser inhibida por productos virales:

- a) La transcripción de los genes de MHC clase I es inhibida por la proteína E1A de cepas patogénicas de ciertos Adenovirus.

- b) Los virus Herpes simplex, ya sea tipo 1 ó 2, expresan una proteína viral no estructural ICP-47, en las células infectadas, que se une al sitio de unión del péptido del transportador asociado con la presentación antigénica TAP e impide que los péptidos virales citosólicos se unan al TAP y sean transportados al retículo endoplásmico para unirse al MHC clase I (ver capítulo 9).
- c) La proteína E3 de algunos Adenovirus (19 kDa) se une y retiene a los MHC clase I en el retículo endoplásmico.
- d) La proteína US3 (codificada por un gen localizado en la secuencia única 3) del Citomegalovirus (CMV) humano es capaz de secuestrar moléculas de MHC clase I en el retículo endoplásmico y una proteína del CMV murino retiene MHC clase I en el cis Golgi.
- e) Las proteínas US2 y US11 del CMV se unen a moléculas de MHC clase I en el retículo endoplásmico y las llevan o descargan en el citosol, donde no pueden unirse a los péptidos de presentación y son degradadas.
- f) Las proteínas Vpu y Nef del virus de la inmunodeficiencia humana también inhiben la expresión de moléculas MHC clase I en las células infectadas.

La consecuencia del bloqueo de MHC clase I y su asociación con los péptidos de presentación en todos estos casos es que las células infectadas muestran una reducida expresión de moléculas estables de MHC clase I en la superficie celular y no presentan los péptidos virales para el reconocimiento y acción citolítica de los linfocitos T CD8+. Sin embargo, es difícil de demostrar que estos genes virales que codifican para las proteínas que inhiben la presentación de MHC clase I son genes de virulencia o patogenicidad de dichos virus.

Un ejemplo de esta compleja interacción es la adaptación del sistema inmune de los mamíferos para reconocer células deficientes en MHC clase I, de esta manera los virus tratan de evadir la respuesta inmune de los LTc inhibiendo MHC clase I, pero los linfocitos NK han desarrollado la capacidad para responder ante la ausencia de MHC clase I en las células infectadas por virus. El resultado de este continuo evolutivo determina si los virus o sus huéspedes logran el control celular.



3.3.5. Simulación molecular

Debido a la homología que poseen ciertos genes y proteínas virales con genes y proteínas celulares, estas proteínas virales pueden interactuar con elementos de la respuesta inmune bloqueando su efectividad y permitiendo la evasión y muchas veces provocando enfermedad. Ejemplos son la modulación de la presentación y reconocimiento en el caso de la proteína viral CMV que se une a la beta 2 microglobulina por poseer un dominio homólogo al MHC.

3.3.6. Inmunosupresión e infección viral

Algunos virus infectan células del sistema inmune, impidiendo su función y dando como resultado la inhibición de la respuesta inmune específica. El ejemplo más representativo son las infecciones por VIH, en las que se produce severa inmunodeficiencia por destrucción de las células CD4+ infectadas, lo que se manifiesta clínicamente en el síndrome de la inmunodeficiencia humana (SIDA). También se ha descrito inmunosupresión en infecciones virus Epstein-Barr, en las que la expresión de un gen viral homólogo al gen celular que codifica para la IL-10, sería responsable de los efectos inhibitorios de la respuesta inmune, los que son similares a los de esta citoquina.

LECTURAS SUGERIDAS

Abbas, A. K.; Lichtman, A.H.; Pober, J. S., **Cellular and molecular Immunology**, Chapter 15, Editorial W.B. SAUNDERS, 2001.

Dietz, M., "Viral Cytokines", *The Oncologist* 5: 77-80, 2000.

Gianani, R., Savetnik, N., "Viruses, Cytokines, Antigens and autoimmunity", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, U.S.A.; 93:2257-2259, 1996.

Roitt, I.; Brostoff, J.; Male, D., **Inmunología**, Capítulo 16: "Inmunidad frente a virus, bacterias y hongos", Tercera edición, 1991.

Stites, D.P., Abba, L.T., **Basic and Clinical Immunology**, Chapter 50, Séptima edición, 1991.



Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 35

INMUNIDAD FRENTE A PARÁSITOS

Ulises Vergara C. y Jorge González C.

- 1. Introducción**
- 2. Respuesta inmune frente a protozoos**
 - 2.1. Desarrollo de inmunidad protectora
 - 2.2. Activación de macrófagos infectados
 - 2.3. Activación de linfocitos T CD8+
 - 2.4. Rol de los anticuerpos en el control de protozoos
- 3. Respuesta inmune frente a nemátodos intestinales**
 - 3.1. Aspectos generales de la respuesta inmune
 - 3.1.1. Enterocitos
 - 3.1.2. Inmunoglobulinas
 - 3.1.3. Linfocitos
 - 3.1.4. Células mieloides
 - 3.2. Respuesta Th2 y protección inmunológica
 - 3.2.1. Mecanismos efectores y resistencia a la infección
 - 3.3. Respuesta Th1 y susceptibilidad a la infección
- 4. Respuesta inmune frente a tremátodos intestinales**
 - 4.1. Inmunidad protectora frente a Schistosoma
 - 4.1.1. Eosinófilos
 - 4.1.2. Macrófagos
 - 4.2. Inmunidad en la rata
 - 4.3. Inmunidad en el ratón
 - 4.4. Interferencia con la inmunidad





RESUMEN

En este capítulo se describe los mecanismos efectores asociados con resistencia a un grupo selecto de parásitos y se ha enfocado particularmente en parásitos que ilustran la diversidad de los mecanismos efectores que contribuyen a inmunidad protectora. La respuesta inmune requerida para eliminar protozoos intracelulares es bastante distinta de aquella requerida para controlar nemátodos intestinales y pueden dividirse en respuestas tipo Th1 y Th2. Sin embargo, mientras la respuesta de tipo Th1 controla las infecciones por protozoos intracelulares, la respuesta Th2 controla infecciones por nemátodos intestinales.

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos cuya forma de vida depende de la colonización de otro individuo, deben vencer diversos obstáculos para lograr su objetivo de instalación en un órgano o tejido que le proporcione las condiciones necesarias para reproducirse y completar su ciclo biológico. De esta manera, la evolución del parasitismo como forma de vida, ha requerido el desarrollo de una gran variedad de adaptaciones biológicas que permiten que la fisiología del parásito coincida, al menos en parte, con la fisiología del hospedero del cual obtendrá los metabolitos que le son indispensables para completar su ciclo biológico. Así, los parásitos han desarrollado nuevas y complejas vías metabólicas pero al mismo tiempo han perdido otras y, aunque en muchos casos se desconocen las ventajas o desventajas de estos cambios, su conocimiento es fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias quimioterapéuticas que permitan bloquear el desarrollo del parásito.

La sobrevida de un parásito depende de un delicado equilibrio entre sus propiedades inmunogénicas y los mecanismos efectores de respuesta inmune del hospedero. Un parásito exitoso debe ser inmunogénico y, por lo tanto, capaz de inducir una respuesta inmune que mantenga el número de parásitos en niveles compatibles con la sobrevida del hospedero. Al mismo tiempo, el parásito debe ser capaz de evadir los mecanismos de defensa del individuo colonizado y, durante los millones de años de coevolución con el sistema inmune, los parásitos han desarrollado diversas estrategias para evadir, desviar, suprimir o mani-

pular en su propio beneficio, la respuesta inmune del hospedero. Un individuo infectado, debe a su vez poner en marcha mecanismos de regulación de la respuesta inmune que le permitan controlar el curso de la infección y /o de la enfermedad y limitar el eventual daño de una respuesta incontrolada.

Como consecuencia de las complejas interacciones hospedero-parásito, las infecciones parasitarias pueden convertirse en cuadros crónicos y progresivos que debilitan de manera severa la salud del hospedero, o en infecciones latentes que, luego de la resolución de la fase aguda, persisten durante la vida del individuo sin causar síntomas o signos clínicos de enfermedad (a menos que el hospedero haga un cuadro de inmunodeficiencia o inmunodepresión).

El conocimiento, tanto de las características del ciclo de vida y la variabilidad biológica del parásito, como de sus distintas formas de interacción con el organismo hospedador, son esenciales para establecer métodos de control y eventual erradicación de las enfermedades parasitarias. Sin embargo cualquier intento de control y eventual erradicación de las infecciones de origen parasitario, deberá siempre considerar la utilización de estrategias múltiples y complementarias como:

1. Reducción o eliminación del agente parasitario por farmacoterapia
2. Reducción de la contaminación ambiental mediante educación sanitaria y mejoramiento de la vivienda y de las condiciones nutricionales y sanitarias de la población

3. Reducción de los hospederos intermediarios y modificación de su hábitat
4. Reducción de la exposición al riesgo de contaminación o infección
5. Desarrollo de estrategias inmunológicas que permitan controlar el curso de la infección y/o de la enfermedad.

Los mecanismos efectores innatos y adquiridos, necesarios para la protección inmunológica contra cualquier infección parasitaria, son bastante variados y dependen de las características específicas de cada parásito, como son su forma de entrada y localización en el hospedero, su ciclo biológico, los estadios infectantes y las diferentes estrategias de evasión de la respuesta inmune.

La respuesta inmune innata, que reconoce patrones moleculares parásito-específicos, rara vez proporciona protección contra la infección pero desempeña un importante papel, tanto en la puesta en marcha de señales tempranas de alarma que alertan al hospedero respecto de la presencia de un organismo invasor, como en el subsecuente desarrollo y regulación de una respuesta inmune específica. La regulación de los distintos mecanismos efectores específicos permitirá que ellos puedan luego operar simultáneamente en el curso de la infección o de manera restringida en función de las diferentes fases del ciclo de vida del parásito, de sus distintas formas infectantes o de sus diferentes localizaciones tisulares.

Entender la complejidad de los mecanismos efectores que se ponen en marcha durante una infección parasitaria y determinar cuál de ellos resulta crucial para el control de la infección, es fundamental para el desarrollo de terapias eficaces que conduzcan al control de las enfermedades parasitarias.

En el presente capítulo, se describen los aspectos más relevantes de la respuesta inmune frente a protozoos y helmintos parásitos. Se analiza primero la respuesta inmune frente a protozoos intracelulares como *Leishmania*, *Toxoplasma*, y *Trypanosoma cruzi*, que aunque pueden encontrarse fuera de las células, desarrollan una parte sustancial de su vida dentro de las células del hospedero mamífero, y gatillan una respuesta inmune polarizada de tipo Th1, que resulta crucial para el control de la infección. Se discute luego la respuesta inmune frente a la infección por helmintos y el repertorio de mecanismos efectores necesarios para la eliminación de estos parásitos multicelulares.

2. RESPUESTA INMUNE FRENTE A PROTOZOOS

Aunque *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* y *Cryptosporidium*, son todos protozoos intracelulares, ellos difieren substancialmente en sus ciclos de vida.

Leishmania existe en dos estadios distintos, los promastigotes metacíclicos y los amastigotes. Los promastigotes son formas alargadas, flageladas y extracelulares que se multiplican en el intestino de las hembras del insecto vector (de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomya*) para migrar luego a la parte anterior del insecto, donde permanecerán hasta ser inoculados en un nuevo hospedero vertebrado. Una vez inoculados en un hospedero mamífero, los promastigotes invaden rápidamente macrófagos y otras células del linaje monocito-macrofágico, transformándose en amastigotes ovalados e inmóviles, que se multiplican en el citoplasma de la célula infectada (figura 35-1)

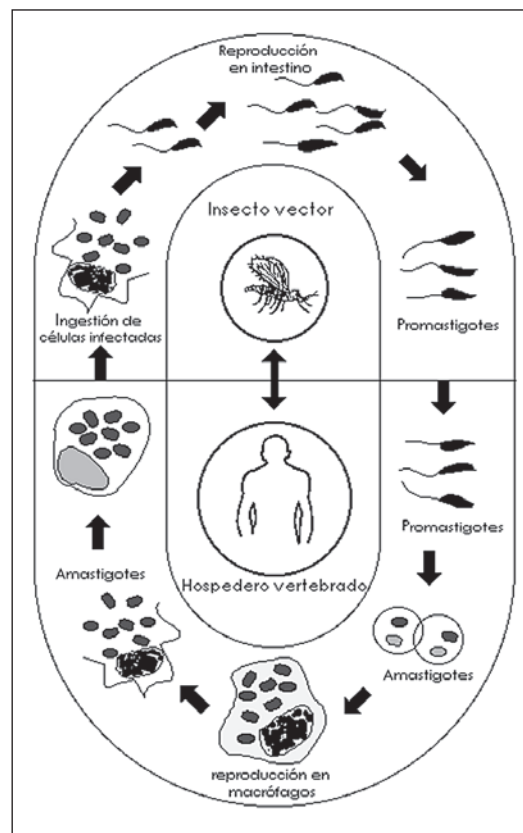


Figura 35-1. Ciclo biológico de *Leishmania*. *Leishmania* es un protozoo parásito, que tiene un ciclo de vida dimórfico que incluye promastigotes flagelados y extracelulares, que se multiplican en el intestino del insecto vector (de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomya*) y amastigotes inmóviles e intracelulares que residen y se multiplican en macrófagos y otras células del hospedero mamífero.



En *Trypanosoma cruzi*, las formas infectantes (tripomastigotes metacíclicos) son transmitidas por las deyecciones de insectos vectores reduviideos (*Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*) y pueden introducirse al organismo a través del orificio de la picadura, heridas o escoriaciones de la piel o atravesando directamente la mucosa ocular, nasal o bucal y de manera análoga a *Leishmania*, los parásitos invaden macrófagos transformándose en amastigotes intracelulares que se multiplican activamente por fisión binaria. Sin embargo, a diferencia de *Leishmania*, *T. cruzi* pueden invadir todas las células nucleadas y después de varios ciclos de división intracelular, los organismos se transforman en tripomastigotes flagelados, que abandonan las células infectadas y circulan libres en la sangre. Los tripomastigotes pueden reinvasar otras células, repitiendo así varias veces el ciclo de división intracelular (figura 35-2).

Toxoplasma gondii, tiene por su parte un ciclo de vida más complejo que *Leishmania* o *T. cruzi*. En el citoplasma de células del epitelio intestinal del gato, los parásitos desarrollan procesos de reproducción sexual que culminan con la producción de ooquistes, que se vuelven infectivos después de ser expulsados al medio con las deposiciones del hospedero. *Toxoplasma* puede multiplicarse sexualmente sólo en el intestino del gato y otros felinos, pero sus ooquistes pueden infectar una gran variedad de especies vertebradas en las cuales los parásitos invaden el epitelio intestinal y se transforman en taquizoítos, que entran en rápida multiplicación. Los parásitos pueden entonces diseminarse siendo capaces de invadir cualquier célula nucleada del organismo. Una vez que una respuesta inmune eficaz se ha establecido, un estadio parasitario de lenta división, el bradizoíto, puede sobrevivir dentro de los quistes. Así, la infección por *Toxoplasma* presenta a menudo una fase aguda, asociada con rápida multiplicación de taquizoítos, y una fase crónica, donde quistes que contienen bradizoítos persisten en el huésped, generalmente de por vida (figura 35-3).

Cryptosporidium sp., infecta a diferentes especies de animales incluyendo el hombre, que adquiere la infección al ingerir alimentos o aguas contaminadas con ooquistes del parásito. A nivel del epitelio intestinal los parásitos desarrollan procesos de reproducción asexual y luego de reproducción sexual que culminan con la producción y liberación de ooquistes maduros que se

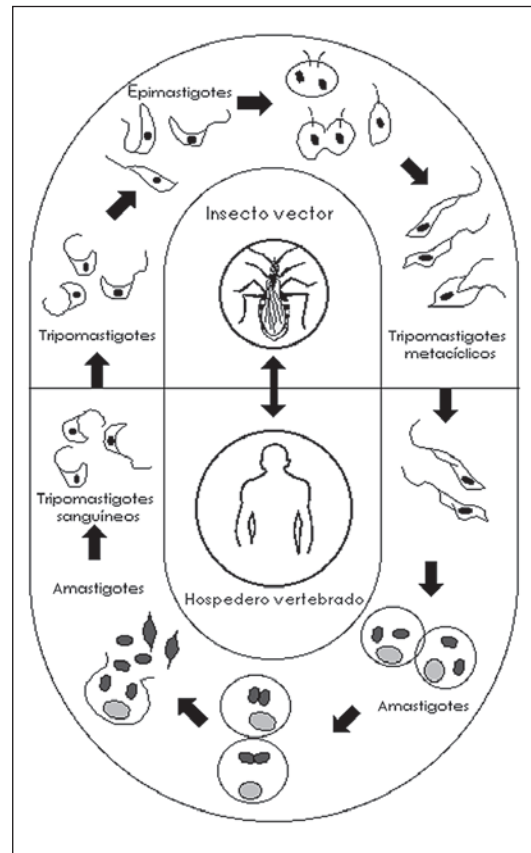


Figura 35-2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. En el intestino de insectos reduviideos (*Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*), el parásito se multiplica en forma de epimastigotes que dan luego origen a numerosos tripomastigotes metacíclicos que constituyen las formas infectantes para el hospedero vertebrado. Los tripomastigotes son transmitidos por las deyecciones del insecto vector y pueden introducirse en el hospedero a través del orificio de la picadura, a través de heridas y escoriaciones en la piel o directamente a través de la mucosa ocular, nasal o bucal. Los parásitos invaden macrófagos y células de diversos tejidos, transformándose en amastigotes intracelulares que se multiplican activamente para dar luego origen a tripomastigotes flagelados que abandonan la célula infectada y pueden circular libres en la sangre para invadir nuevas células.

eliminan con las deposiciones del hospedero infectado.

Además de las obvias diferencias en sus ciclos de vida, estos parásitos utilizan diferentes estrategias para sobrevivir dentro de las células del hospedero. Por ejemplo, *T. cruzi* secreta una hemolisina, que asociada a la acción de una transalidasa, facilita el escape del parásito desde el fagolisosoma al citoplasma, evitando así el ambiente tóxico producto de la fusión de lisosomas

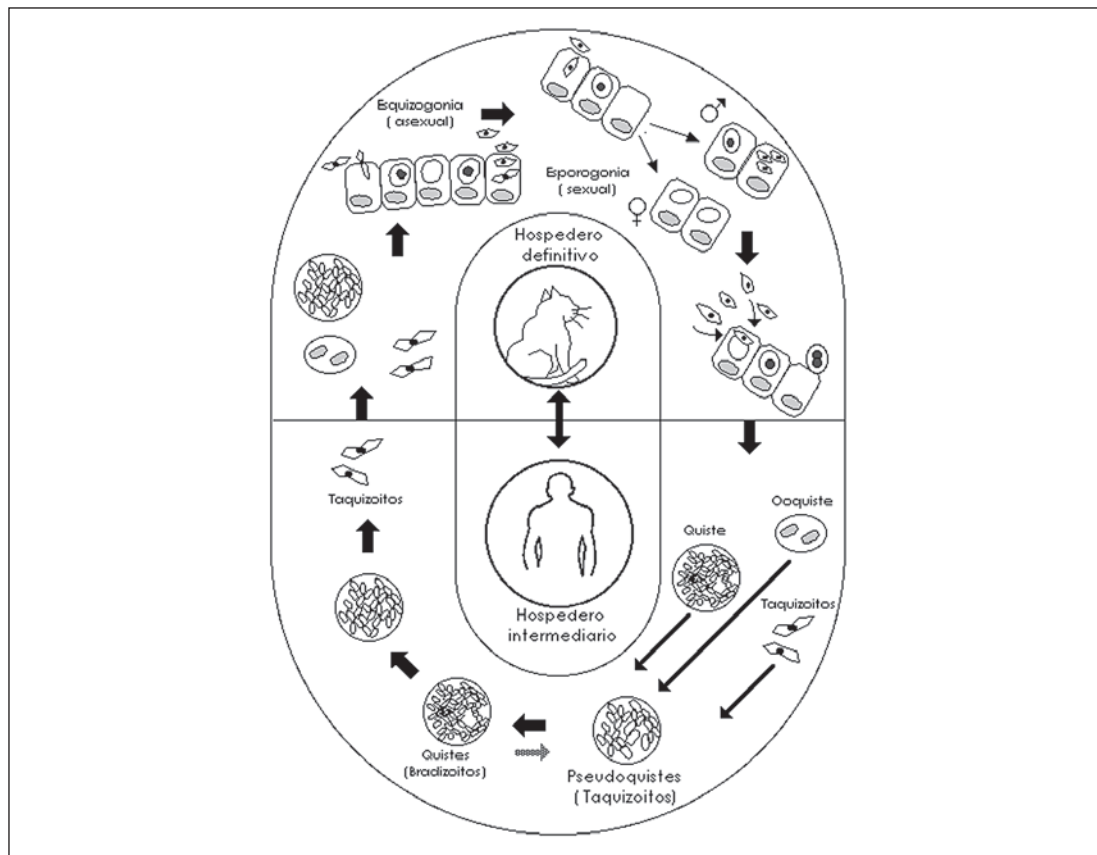


Figura 35-3. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. En las células epiteliales del intestino del hospedero definitivo, las formas infectantes (quistes, ooquistes y taquizoitos) se multiplican primero asexualmente por esquizogonia y luego sexualmente por esporogonia, para generar ooquistes que son eliminados con las heces del gato. El hombre y diversos mamíferos ingieren el parásito por vía oral y a partir de ooquistes se generan taquizoitos que invaden las células del hospedero para reproducirse y generar numerosos taquizoitos o quistes con bradizoitos.

al fagosoma. *Toxoplasma* crea su propia vacuola parasitófora, que impide la fusión con lisosomas. En contraste, *Leishmania* ha desarrollado mecanismos de resistencia que le permiten sobrevivir incluso después que el fagosoma se ha fusionado con los lisosomas. Por su parte, *Cryptosporidium*, a diferencia de otros patógenos intracelulares no se localiza en el citoplasma, puesto que invade las células localizándose justo entre la membrana celular y el citoplasma.

Las consecuencias inmunológicas de estas diferencias se traducen en que proteínas de *T. cruzi* y *Toxoplasma* parecen entrar más rápidamente en la vía de presentación antigénica por moléculas MHC de clase I, generando así una respuesta inmune protectora que involucra la participación de linfocitos T citotóxicos. En la leishmaniasis, también opera la vía de presentación MHC de clase I, sin embargo, no está claramente definido el rol

que células T CD8⁺ parásito-específicas, juegan en la protección contra la infección por *Leishmania*. En el caso de *Cryptosporidium*, la respuesta inmune del hospedero no es del todo conocida, pero parece involucrar mecanismos de presentación antigénica tanto en el contexto de moléculas MHC de clase I como de clase II. Por último es necesario señalar que la resistencia contra todas estas infecciones parasitarias, requiere la participación de células T CD4⁺.

2.1. Desarrollo de inmunidad protectora

La IL-12 juega un papel central en el desarrollo de inmunidad protectora contra estos protozoos intracelulares, promoviendo la polarización hacia una respuesta Th1 y la producción de IL-2 e IFN- γ . Los macrófagos y las células dendríticas (CDs) son las principales fuentes de



IL-12, y se piensa que la infección o la exposición a productos moleculares de los parásitos inducen la producción de estas citoquinas. Sin embargo, la infección *in vitro* de macrófagos con promastigotes metacíclicos o con amastigotes de *Leishmania* no induce la producción de IL-12, aunque DCs sí puede producir IL-12 después de la infección con el parásito. Es más, la infección de macrófagos puede suprimir la producción de IL-12 estimulada por algunos productos moleculares de *Leishmania*. La búsqueda de una explicación para este fenómeno permitió establecer que la unión de CD40 con linfocitos T que expresan el ligando CD40L, constituye una señal crítica de coestimulación que conduce a la producción de IL-12, como lo sugiere el hallazgo que ratones deficientes en CD40 o CD40L son susceptibles a infección y que esta susceptibilidad puede ser revertida mediante el tratamiento con IL-12.

Más recientemente, otra vía crítica que lleva a la producción IL-12, parece involucrar la participación de quimioquinas. Así, se ha observado que lisados de *Toxoplasma* son capaces de estimular la producción de MIP1a y MIP1b que constituyen ligandos para el receptor de quimioquinas CCR5 y que la unión de CCR5 a células dendríticas, conduce a la producción de IL-12. La importancia de esta vía de activación en iniciar el desarrollo de una respuesta inmune protectora fue demostrada por la observación que ratones deficientes en CCR5 son más susceptibles a infección por *Toxoplasma gondii*.

Cryptosporidium parvum, causa inflamación de la mucosa intestinal con numerosos neutrófilos intraepiteliales e importantes infiltrados de neutrófilos y células mononucleares en la lámina propia. Las células epiteliales humanas son capaces de secretar y expresar IL-8 y la quimioquina del tipo CXC denominada GRO- α ("Growth-related oncogene α ") y se ha observado que en la infección por *C. parvum* la respuesta de quimioquina CXC es más tardía que la observada en la infección con otros protozoos intestinales y no parece participar como un mecanismo efector sino más bien en el reclutamiento y activación de diversas poblaciones celulares.

De igual manera, la actividad de quimioquinas del tipo CC parece ser importante para el hospedero, en las infecciones por *T. cruzi*. Así, estudios *in vitro* han mostrado que quimioquinas como RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β aumentan la captura y destrucción intracelular de tripomasti-

gotes por macrófagos humanos. Resultados similares se han obtenido, tanto *in vivo* como *in vitro* utilizando el modelo murino. Las quimioquinas parecen inducir actividad tripanocida mediante la producción de óxido nítrico (NO).

Considerando que todos estos parásitos intracelulares pueden infectar células presentadoras de antígeno, la activación de células de T CD4⁺ pueden explicarse por interacción con macrófagos o CDs que han sido infectadas o que han tomado contacto con parásitos muertos. Las quimioquinas parecen jugar un papel importante en la migración de CDs que han capturado parásitos o antígenos parasitarios en los sitios periféricos de infección y los llevan a los ganglios linfáticos para su presentación a linfocitos T CD4⁺. Así, la proteína quimiotáctica MCP-1 ("Monocyte Chemoattractant Protein-1") se produce tempranamente en la infección por *Leishmania* y parece contribuir a la migración de CDs, puesto que en ratones deficientes en CCR2, la migración de CDs se encuentra afectada y este deterioro contribuye a aumentar la susceptibilidad de los ratones a la infección por *Leishmania major*. Por otro lado, luego de una inyección intravenosa con antígeno de *Toxoplasma*, las CDs se movilizan desde la pulpa roja y las zonas marginales del bazo a las regiones de células T de los linfonódulos periarteriales, y esta migración depende de la expresión del receptor de quimioquinas CCR5.

Existe consenso que en las infecciones por *Cryptosporidium*, los mecanismos responsables de la eliminación del parásito del tracto intestinal requieren la participación IFN- γ puesto que ratones "knockout" para IFN- γ desarrollan un parasitismo masivo de todo el intestino y mueren en dos a tres semanas luego de una infección experimental con *C. parvum* mientras los controles se muestran libres de la infección hasta por treinta días. Además, distintas cepas de ratones presentan diferencias significativas en la supervivencia a la infección con el parásito y estas diferencias se asocian a su habilidad en producir IFN- γ . Estudios utilizando ratones con insuficiencia severa combinada (ratones SCID), mostraron que estos ratones permanecen infectados por largo tiempo sin muestras de enfermedad, mientras los ejemplares incapaces de producir IFN- γ mueren rápidamente. De igual manera, células T CD4⁺ participan en la resolución tanto de las formas agudas como crónicas de la infección en ratones, puesto que la inmunidad es dependiente del aumento en el número de células T CD4⁺ en la población de linfocitos



intraepiteliales del intestino y la subsecuente generación de IFN- γ .

2.2. Activación de macrófagos infectados

La actividad microbicida de macrófagos es un mecanismo efector primario que lleva al control de patógenos intracelulares. Los macrófagos activados muestran cambios importantes que incluyen el aumento en la expresión de moléculas MHC de clase II, aumento en la actividad fagocítica y generación de radicales libres altamente tóxicos. Mientras los reactivos intermediarios de oxígeno (ROIs) y los reactivos intermediarios de nitrógeno (RNIs), son efectivos agentes microbicidas, el óxido nítrico parece particularmente importante en el control de parásitos intracelulares.

El óxido nítrico se genera a partir L-arginina en una reacción catalizada por la forma inducible de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS). Ratones deficientes en la enzima (iNOS -/-) son altamente susceptibles a la infección con *L. mayor* o *T. cruzi*. Más aún, una comparación directa de la importancia relativa de ROIs y RNIs en el control de la infección por *L. donovani*, mostró que aunque ROIs puede contribuir al control del parásito en etapas tempranas de la infección, óxido nítrico es la molécula efectora de central importancia en el control de *L. donovani*.

En contraste, la infección de ratones iNOS -/- por *Toxoplasma*, muestra un cuadro más complejo, dado que la resistencia a estas infecciones se asocia tanto con mecanismos iNOS dependientes como con mecanismos iNOS independientes. Así, los ratones “knockout” para iNOS son capaces de controlar *Toxoplasma* durante la fase aguda de la infección, pero mueren durante la fase crónica. Sin embargo, luego de la vacunación con cepas avirulentas de *Toxoplasma*, los ratones “knockout” para iNOS resultan tan resistentes como los ratones normales en el control de la infección con formas virulentas del parásito. La importancia de óxido nítrico en la resistencia a la infección con protozoos intracelulares es, por lo tanto, relativa y depende del parásito intracelular que se examina y de la fase de la infección que se analiza.

El modelo actualmente aceptado para explicar la activación de macrófagos, sugiere que IFN- γ es una citoquina fundamental en la activación de estas células, aún cuando otras citoquinas como TNF pueden facilitar este proceso. Ratones

depletados de IFN- γ por administración de anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ o ratones “knockout” para IFN- γ son altamente susceptibles a la infección con *Leishmania*, *Toxoplasma*, y *T. cruzi*.

La importancia de TNF en el control de la infección por parásitos intracelulares, se estableció al observar que ratones deficientes en el receptor de TNF (ratones TNFR), son altamente susceptibles a la infección con *Leishmania* o *Toxoplasma*. Sin embargo, ratones “knockout” TNFRp55 y TNFRp55p75 infectados con *L. major* son capaces de controlar y eliminar la mayoría de los parásitos, sugiriendo que señales accesorias como la interacción CD40/CD40L, podrían compensar la ausencia de TNF. Un papel crítico para TNF en el control de parásitos intracelulares se observó luego de la infección con *L. donovani* de ratones deficientes en IFN- γ , los cuales resultaron inicialmente mucho más susceptibles a la infección con el parásito. Sin embargo, después de 8 semanas de infección, la replicación del parásito fue parcialmente controlada. En estos ratones “knockout” para IFN- γ , el control temprano de la infección, puede ser inducido mediante la administración de IL-12, pero no mediante la administración de IL-12 más anticuerpos anti-TNF.

Mientras la mayoría de los estudios de parásitos intracelulares se han centrado en los macrófagos, es evidente que *Toxoplasma* y *T. cruzi* infectan además otras células distintas de los fagocitos, pero que igualmente requieren eliminar los parásitos para controlar la infección. Se ha sugerido que óxido nítrico proveniente de macrófagos activados situados en la vecindad de las células infectadas, puede matar parásitos en células no hematopoyéticas. La creación de quimeras de médula ósea entre ratones normales y ratones deficientes en el receptor para IFN- γ (IFN-R), permitió establecer que la resistencia a la infección con *Toxoplasma*, es dependiente de la expresión del receptor para IFN- γ , tanto en células hematopoyéticas como en células no hematopoyéticas. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual IFN- γ ejerce sus efectos en células no hematopoyéticas no está claro. Se ha mostrado que IFN- γ puede aumentar la actividad de la dioxigenasa de indoleamina en fibroblastos infectados con *Toxoplasma*, lo que conduce a la degradación de triptofano necesario para la replicación de los parásitos. No obstante, esta vía no opera en macrófagos humanos ni tampoco en la infección



por *T. cruzi*. Así, los mecanismos independientes de iNOS que operan en el control de *Toxoplasma* o *T. cruzi*, permanecen sin definir. Sin embargo, algunas respuestas a este problema podrían provenir de los estudios con ratones carentes de proteínas ligadoras de GTP (IGTP) que es regulada por IFN- γ . En efecto, ratones que no poseen esta molécula pueden controlar infecciones por patógenos intracelulares como *Listeria monocytogenes* y Citomegalovirus, pero son incapaces de controlar infecciones por *Toxoplasma*.

2.3. Activación de linfocitos T CD8+

La importancia de las células T CD8+ en la resistencia a *T. cruzi* y *Toxoplasma* ha sido bien establecida, observándose un aumento en la susceptibilidad a la infección en ratones deficientes en células T CD8+.

Las células de T CD8+ reconocen antígenos presentados en el contexto de moléculas MHC de clase I, lo que facilita la detección de infecciones por patógenos intracelulares en cualquier célula del organismo, aspecto que resulta particularmente importante en el control de infecciones por *T. cruzi* y *Toxoplasma*. Los linfocitos T CD8+ secretan citoquinas como IFN- γ que activa macrófagos, pero son también capaces de lisar células infectadas, mediante la liberación de perforina. Ratones “knockout” para perforina, muestran una significativa mayor susceptibilidad a la infección por *Toxoplasma* durante la fase crónica de infección. Sin embargo, los ratones deficientes en perforina, pero vacunados con una cepa avirulenta de *Toxoplasma* son tan resistentes como ratones controles, a la infección con cepas virulentas del parásito. Lo anterior hace pensar que las células T citolíticas pueden ser importantes para el control de la fase crónica de toxoplasmosis (cuando los quistes están presentes en el cerebro), pero menos importante durante la fase aguda, cuando los taquizoítos se multiplican rápidamente.

Un resultado diferente se observa en la infección con *T. cruzi*, donde se encontró que aún en las infecciones con cepas avirulentas, se requieren linfocitos T CD8+ para la protección contra el parásito. Sin embargo, ratones “knockout” para perforina y granzima B, son tan resistentes a la infección por *T. cruzi*, como los ratones controles, indicando que las células T CD8+ que protegen contra *T. cruzi*, no requieren de mecanismos de citotoxicidad que involucren perforina o granzima B.

El papel que las células de T CD8+ juegan en leishmaniasis es menos claro, puesto que ratones deficientes en células T CD8+ pueden resistir la infección primaria con *L. mayor*. Como *Leishmania* reside dentro del fagolisosoma, podría predecirse que células de T CD8+ no se activan durante infección. Sin embargo, tanto en infecciones humanas como en infecciones experimentales, por *Leishmania* las células T CD8+ antígeno-específicas se encuentran aumentadas y estudios *in vitro* muestran que células infectadas pueden presentar antígenos a células de T CD8+. La importancia de las células de T CD8+ en leishmaniasis ha sido demostrada mediante estudios que indican que ellas contribuyen a la resistencia a la infección o el desafío secundario y a la resistencia inducida por vacunación. La manera cómo las células de T CD8+ influyen la infección por *Leishmania* no está bien establecida. Sin embargo, estudios *in vitro* indican que macrófagos infectados no actúan como blancos para el citolisis por las células T CD8+, sugiriendo que su función protectora se asocia más a la producción IFN- γ , en lugar de actuar como células citotóxicas.

En *Cryptosporidium spp* el papel de las células T CD8+ no está claro, no obstante parecen jugar algún papel en el control de la infección en ratones.

2.4. Rol de los anticuerpos en el control de protozoos

La infección con *T. cruzi*, *Toxoplasma*, o *Leishmania* se asocia a la producción de anticuerpos específicos que parecen tener una variedad de funciones, eventualmente involucradas en el control de estos parásitos. Los anticuerpos pueden, por ejemplo, unirse a las formas infectantes que se movilizan de una célula a otra o que circulan libremente circulan en la sangre. Además pueden neutralizar o modular la invasión de nuevas células, de promover la fagocitosis de estas formas parasitarias (opsonización), o bien producir su lisis por activación del sistema del complemento y/o mediante mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Mientras muchos estudios *in vitro* han sugerido algún rol de los mecanismos efectores que involucran la participación de anticuerpos, su importancia en el control de la infección, ha sido más difícil de establecer *in vivo*.

El uso de animales deficientes en células B o en receptores Fc (ratones FcR), ha permitido



mostrar inequívocamente que células B y anticuerpos son requeridos para la protección contra *T. cruzi* y *Toxoplasma*. Así, ratones deficientes en células B infectados con *Toxoplasma*, mueren durante la fase crónica de infección, mostrando un elevado número tanto de taquizoitos, como de quistes en cerebro y pulmones. Los anticuerpos no son, por lo tanto, necesarios para la protección durante la fase aguda de la infección.

Ratones deficientes en linfocitos B, inoculados con *Toxoplasma* son mucho más susceptibles a la infección que los controles normales. No obstante, el uso de ratones deficientes en FcR y C5 ha permitido establecer que aunque células B son esenciales para la resistencia a la infección por *Toxoplasma*, ni la activación de mecanismos efectores Fc-dependientes o de lisis mediada por complemento, son requeridos para el efecto protector de los anticuerpos.

En la infección por *T. cruzi*, los ratones deficientes en linfocitos B sobreviven más tiempo que los ratones deficientes en células T CD4⁺ o que los deficientes en células T CD8⁺. Sin embargo, los anticuerpos y particularmente aquéllos denominados “anticuerpos líticos”, parecen importantes en el control de la infección. Estos anticuerpos, que están presentes en el suero de pacientes humanos, y en ratones crónicamente infectados, corresponden a IgG de las subclases IgG2a e IgG2b y son generalmente inducidos por parásitos vivos pero no por aquéllos que han sido fijados o lisados. De esta forma, cuando tripomastigotes que son habitualmente resistentes a la acción del complemento, se incuban con suero de infectados crónicos que contiene anticuerpos líticos, la IgG se une específicamente a los parásitos haciéndolos sensibles a la lisis por complemento.

Estudios recientes utilizando ratones deficientes en linfocitos B, indican que estas células no participan en la susceptibilidad o resistencia a la infección con *L. mayor*. Sin embargo, estudios con *L. amazonensis* indican que en ausencia de células de B o de FcR, la infección por *L. amazonensis* es menos severa. Estos resultados sugieren que la unión de anticuerpos a los FcR aumenta la captura y sobrevivencia de los parásitos o que los FcR activan señales de alarma que modulan la respuesta del hospedero frente a la infección. Por otro lado, se ha observado que la activación vía FcR conduce a un aumento en la producción de IL-10, la cual podría regular negativamente el desarrollo de una respuesta inmune protectora.

En infecciones por *Cryptosporidium spp.*, no se han observado diferencias entre ratones normales y aquellos depletados de células B, sugiriendo que la síntesis de anticuerpos no cumple un rol en el control de la infección.

3. RESPUESTA INMUNE FRENTE A NEMÁTODOS INTESTINALES

El intestino de vertebrados es, para los parásitos nemátodos, uno de los principales sitios ancestrales de invasión, dado que en el curso de la evolución, la ingestión accidental de vermes o de sus formas infectantes, resultó un mecanismo simple de acceso a los hospederos vertebrados. La sobrevivencia de los parásitos en el intestino fue favorecida por la existencia de una oferta nutritiva ilimitada, mientras el desarrollo de su ciclo evolutivo resultó facilitado por la posibilidad de salida y escape fácil desde el hospedero. De esta manera, aún cuando diversos helmintos pueden invadir distintos órganos y tejidos, la mayor parte de ellos residen en el intestino. El intestino se ha mantenido como el sitio ideal para el desarrollo de los parásitos adultos, aún cuando el ingreso al hospedero se produzca a través de la piel y complejos mecanismos de migración deban ponerse en marcha antes de llegar al intestino.

Muchos estudios han demostrado que el intestino no es un simple hábitat para los helmintos. Nemátodos grandes como *Ascaris lumbricoides* viven en el lumen, mientras especies de menor tamaño como las uncinarias y *Trichostrongylus*, entran en estrecha relación con la mucosa y por ello se encuentran en condiciones microambientales muy diferentes. Mientras algunas especies viven en la mucosa durante la mayor parte de su desarrollo y sólo emergen al lumen como formas maduras, otras permanecen en la mucosa durante todo su ciclo de vida intestinal.

Los nemátodos presentan problemas particulares para el desarrollo de una respuesta inmune en el hospedero. Su cutícula es relativamente gruesa y sus movimientos son muy activos y, aunque no son inertes desde el punto de vista inmunológico ni metabólico, su cutícula los protege de la respuesta inmune y sólo pueden ser atacados por los orificios naturales. La cutícula es altamente inmunogénica y puede ser dañada por mecanismos efectores de la respuesta inmune, sin embargo no está claro si esta respuesta desempeña algún papel importante en la inmunidad contra pa-



rásitos intestinales. Además, es muy probable el desarrollo de una respuesta efectora contra antígenos secretados o excretados por los helmintos.

En humanos, se conoce poco respecto a la respuesta frente a helmintos. Datos epidemiológicos sugieren la existencia de inmunidad adquirida frente a la infección; no obstante algunos nemátodos como *Trichuris* persisten por largo tiempo y la reinfección es muy frecuente.

Sin embargo, los nemátodos gastrointestinales constituyen uno de los grupos parasitarios más exitosos, estimándose que en la población humana actual una de cada cinco personas alberga, a lo menos, una de estas especies. La infección por estos patógenos generalmente no es fatal, pero constituyen cuadros insidiosos, a menudo con un grado alto de morbilidad, particularmente en niños. Un rasgo particularmente importante de este tipo de infecciones parasitarias (y que la distingue de otras infecciones) es que el grado de infección o la carga parasitaria del hospedero, es un reflejo del número de eventos de invasión. Los nemátodos intestinales, generalmente no se multiplican dentro del hospedero y la carga parasitaria se adquiere por eventos de infección múltiples, y no a través de un único contacto con las formas infectantes.

La respuesta inmune frente a helmintos difiere claramente de aquélla inducida por protozoos. Los helmintos son organismos pluricelulares de mayor tamaño, que no se replican dentro del hospedero. La diferencia en tamaño limita los mecanismos efectores de respuesta inmune y la carencia de replicación tiene repercusiones importantes en las estrategias de sobrevivida desarrolladas tanto por el hospedero como por el parásito.

Debido a la dificultad para estudiar la infección en condiciones naturales, la mayor parte de nuestro conocimiento actual sobre la infección por nemátodos intestinales proviene de las investigaciones realizadas en roedores de laboratorio infectados experimentalmente con parásitos tan diversos como *Nippostrongylus brasiliensis*, *Trichinella spiralis*, *Trichuris muris*, *Heligmosomoides*, y *Polygyrus Strongyloides spp.* La mayor parte del trabajo se ha concentrado en modelos en los que luego de la infección primaria, ocurre expulsión natural de los parásitos del tracto gastrointestinal (*N. brasiliensis* de *T. spiralis* y *Strongyloides*), aunque interesantes resultados se están generando en sistemas en los cuales puede ocurrir una infección crónica natural (*T. muris* y de *H. polygyrus*).

3.1. Aspectos generales de la respuesta inmune

La respuesta inmune frente a nemátodos intestinales, tiene relación inevitable con las condiciones y arquitectura particular del sistema digestivo. De esta manera en la generación de esta respuesta participan distintas células y mecanismos efectores.

3.1.1. Enterocitos

El intestino es la principal vía de entrada de antígenos al organismo, no sólo de aquellos derivados de eventuales parásitos, sino también los que son aportados por los alimentos, los contaminantes ambientales y la flora bacteriana. Los enterocitos que forman el epitelio de la mucosa intestinal, constituyen una barrera física que además puede capturar antígenos desde el lumen. Este proceso es aún más activo y eficiente cuando como producto de una inflamación aumenta la permeabilidad de la capa epitelial. Citoquinas liberadas durante la inflamación inducen un aumento en la expresión de moléculas MHC en los enterocitos, permitiendo que puedan de esta manera participar como células presentadoras de antígeno. La captura y transcitosis de antígenos es además claramente facilitada por la existencia de células M, asociadas al epitelio que tapiza las placas de Payer. Los antígenos también pueden ser capturados mediante mecanismos que involucran la participación de anticuerpos presentes en la superficie de la mucosa.

3.1.2. Inmunoglobulinas

El principal isotipo de anticuerpos que se encuentran en la mucosa intestinal corresponde a IgA dimérica, la cual puede ser secretada a través de los enterocitos o junto a la bilis luego de pasar por el epitelio del ducto biliar como ocurre en roedores. Las moléculas de IgA permanecen intactas y actúan a nivel del lumen intestinal debido a la presencia de la porción secretora que la protege de la degradación por proteasas intestinales. La IgM es también transportada a través del epitelio y permanece activa en el lumen intestinal. Por otra parte, IgG es producida localmente por células plasmáticas localizadas en la lámina propia. A diferencia de IgA, los anticuerpos IgM e IgG son rápidamente degradados por proteasas, no obstante sus fragmentos Fab pueden permanecer funcionales por algún tiempo.

3.1.3. Linfocitos

Una cantidad apreciable de linfocitos T y B están presentes en la lámina propia del intestino. Las células B contribuyen fundamentalmente a la generación de células plasmáticas secretoras de las inmunoglobulinas que estarán presentes en el epitelio y el lumen intestinal. Subpoblaciones linfocitarias T CD4⁺ y T CD8⁺ se encuentran en la lámina propia, no obstante las células T CD4⁺ parecen más importantes en términos de una respuesta antiparasitaria.

3.1.4. Células mieloides

En la mucosa normal existen diversas células efectoras linfoides y no linfoides, que aumentan durante las infecciones parasitarias. Entre ellas se encuentran células “natural killer”, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y además basófilos y mastocitos. Estas últimas poseen aminas y otros mediadores así como también receptores de alta afinidad para IgE (FcεRI). La infiltración de la mucosa por mastocitos, basófilos y eosinófilos, durante la infección es dependiente de la liberación de citoquinas por parte de linfocitos T específicos. Estas citoquinas y otros mediadores solubles son responsables de la inflamación intestinal, que tiene obvias consecuencias en la estructura y función intestinal, alterando la cantidad y propiedades del mucus intestinal.

3.2. Respuesta Th2 y protección inmunológica

Distintos estudios han sugerido que la expulsión de nemátodos intestinales, es principalmente consecuencia de una respuesta asociada a la secreción de citoquinas TCD4 del tipo Th2. Así, en el modelo murino la IL-4 parece desempeñar un rol importante en la respuesta inmune que permite la expulsión de *H. polygyrus* y *T. muris* del intestino delgado de los ratones experimentalmente infectados.

Linfocitos T activados en los nódulos linfáticos mesentéricos durante el curso de la infección, resultan fundamentales en la inmunidad protectora contra muchos nemátodos intestinales, incluyendo *Trichinella spiralis*. Este parásito infecta el intestino y los gusanos adultos liberan larvas que penetran la pared intestinal y se enquistan luego en los músculos esqueléticos (figura 35-4). El mecanismo de expulsión del parásito adulto del intestino es un proceso complejo que involucra la

activación de linfocitos Th2, y mastocitos y la producción de citoquinas como IL-4, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-18. Ratones “knockout” para IL-18 son altamente resistentes a la infección con *T. spiralis*, expulsan más rápidamente los gusanos adultos y desarrollan niveles más bajos de enquistamiento larval en el músculo esquelético. La expulsión de los gusanos se asocia a un alto número de mastocitos en la mucosa intestinal y secreción aumentada de IL-10 e IL-13

Ratones “knockout” para IL-4 muestran sólo pequeñas alteraciones en la cinética de expulsión de *T. spiralis*, en comparación con los ratones normales no deficientes, sugiriendo que la expresión de IL-4 no es esencial para la expulsión de los gusanos.

No obstante, se ha demostrado que la IL-13

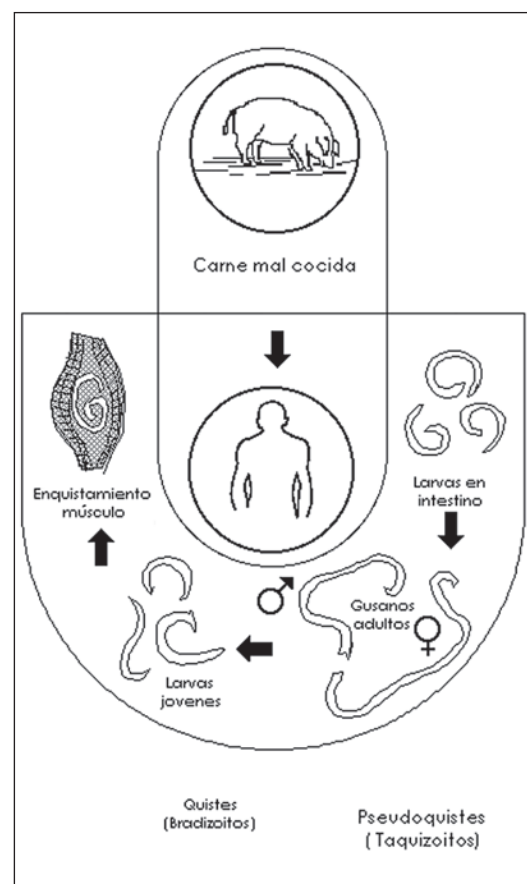


Figura 35-4. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*. El parásito desarrolla su ciclo biológico en un único hospedero que puede ser omnívoro o carnívoro. El hombre se infecta al ingerir carne mal cocida, que contiene larvas enquistadas en los músculos esqueléticos. Las larvas liberadas en el intestino, maduran rápidamente y las hembras fecundadas darán origen a larvas jóvenes que vía sanguínea o linfática migran a los tejidos para enquistarse en los músculos estriados.



(una citoquina estrechamente relacionada con IL-4), parece desempeñar un rol importante en la expulsión de muchos nemátodos intestinales. Ratones “knockout” para IL-13, por ejemplo, tardan bastante más tiempo en expulsar los gusanos del intestino, cuando se les infecta experimentalmente con *N. brasiliensis*. De la misma manera, ratones doble “knockout” para IL-4/IL-13 tardan mucho más en la expulsión de los parásitos, que los ratones con “knockout” único.

Una situación similar ocurre en las infecciones experimentales con *T. spiralis*, puesto que ratones doble deficientes en IL-4/IL-13, muestran un marcado retraso en la expulsión del parásito, lo que no ocurre en ratones normales o en ratones deficientes sólo en IL-13.

La importancia relativa de IL-4 e IL-13 en la resistencia a nemátodos intestinales es también influenciada por el repertorio genético del hospedero. Así, ratones C57BL/6 deficientes en IL-4, son uniformemente susceptibles y desarrollan infecciones crónicas a *T. muris*, mientras los ratones de tipo silvestre expelen su carga de gusanos. Por otro lado, ratones BALB/c deficientes en IL-4, muestran una sensibilidad sexo-dependiente puesto que, mientras los machos desarrollan infección crónica, las hembras expulsan sus parásitos. La expulsión de parásitos en estas hembras es mediada por IL-13, como lo muestran experimentos en que se administra la proteína de fusión IL-13Ra2.

La importancia de IL-4/IL-13 y de IL-4Ra en la respuesta a nemátodos intestinales, sugiere una importante función para la molécula STAT6 en la generación de una respuesta protectora. Ratones deficientes en STAT6 son más susceptibles a *T. spiralis* que los ratones normales y muestran una deprimida respuesta de mastocitos intestinales y de citoquinas del tipo Th2 y supresión de la síntesis de IgG parásito-específicas. Estos mismos ratones “knockout” para STAT6 muestran una expulsión retardada de *N. brasiliensis*, pero en este caso la respuesta de citoquinas y mastocitos no están deprimida.

Además de IL-4 e IL-13, otras citoquinas (como IL-3 e IL-9) parecen estar también involucradas en la protección a helmintos intestinales. IL-3 parece importante en la protección contra infecciones por *Strongyloides* y *T. spiralis* y la utilización de ratones transgénicos ha permitido demostrar que IL-9 induce un aumento en la expulsión de parásitos tales como *T. spiralis*, *T. muris*, *N. brasiliensis* y *H. polygyrus*. En infec-

ciones experimentales con *T. spiralis*, la resistencia inducida por IL-9 se expresa fundamentalmente mediante la inducción de mastocitosis intestinal, y en modelos de infección *T. muris*, la neutralización de IL-9 mediante anticuerpos específicos, induce infección crónica en ratones normalmente resistentes.

3.2.1. Mecanismos efectores y resistencia a la infección.

El rol de las citoquinas producidas por linfocitos Th2 en la expulsión de nemátodos intestinales está bien establecida; sin embargo, permanecen todavía sin definir, los mecanismos efectores que conducen a la expulsión de los parásitos. Muchas infecciones parasitarias inducen aumento en el número de eosinófilos de los individuos afectados, pero no existe evidencia que sugiera que estas células están de alguna manera involucradas en la protección del hospedero. Por otro lado la participación de mastocitos en la resistencia a los helmintos intestinales, ha sido también controversial. La evidencia más convincente ha surgido de modelos murinos de infección experimental con *T. spiralis*, que demuestran que la supresión de mastocitos, produce un retraso significativo en la expulsión de los parásitos desde el intestino. Por otro lado, ratones deficientes en una proteasa específica de mastocitos, denominada MMCP1, muestran un retardo significativo en la expulsión de *T. spiralis* del intestino. Aunque la función de MMCP1 permanece sin definir, se ha sugerido que proteasas de mastocitos, podrían tener como blanco las uniones firmes existentes entre las células del epitelio intestinal. Cambios en la contractibilidad de la musculatura lisa intestinal y cambios asociados al aumento de la permeabilidad intestinal y la disminución de la absorción de fluidos, se producen a menudo durante la expulsión de *H. polygyrus* y *T. spiralis*.

3.3. Respuesta Th1 y susceptibilidad a la infección

Las infecciones naturales por nemátodos intestinales tienden a ser cuadros de tipo crónico y muy pocos estudios han investigado los mecanismos responsables de la cronicidad y susceptibilidad a estas infecciones, aunque es cierto que cuando la respuesta de tipo 2 está deprimida, la expulsión de los gusanos está claramente retardada.

En condiciones naturales, hay factores como



la coinfección y el estado nutricional del hospedero, que pueden estar involucrados en el desarrollo de resistencia. Así por ejemplo, un estudio reciente de infección experimental por *H. polygyrus*, sugiere la importancia de la dieta proteica en la resistencia a la infección, puesto que hospederos expuestos a dietas pobres en proteína muestran una depresión en la respuesta Th2 y un marcado retardo en la expulsión de los gusanos en comparación con aquellos animales que recibieron dietas ricas en proteínas.

Algunos modelos de infección experimental inducen de manera natural un cuadro crónico, lo que ha permitido identificar importantes factores asociados a la susceptibilidad a la infección. En el modelo *T. muris*, mientras la mayor parte de las cepas de puras o “inbred” de ratones expulsan una moderada o alta carga parasitaria, unas pocas cepas fallan en expulsar los gusanos y muestran altos niveles de parasitismo que evoluciona hacia una infección crónica. Está ahora claro, que en estos animales, se desarrolla una respuesta dominante de tipo Th1, mediada por IFN- γ . La neutralización de IFN- γ o IL-12 en cepas susceptibles de ratones induce la expulsión de los gusanos, con un coincidente aumento en la respuesta de tipo Th2. Sin embargo, la administración de IL-12 a los animales resistentes induce susceptibilidad, la cual es dependiente de IFN- γ . Ratones “knockout” para IL-12 son altamente resistentes a la infección, como lo son también los ratones deficientes en el receptor de IFN- γ . RKO. Trabajos más recientes han identificado a IL-18 como el principal factor involucrado en la inducción de susceptibilidad. Las cepas de ratones susceptibles muestran una fuerte y temprana regulación positiva de los mRNA para IL-18 en el intestino infectado y esto es seguido por una regulación positiva de IL-12 y IFN- γ . Ratones deficientes en IL-18 son altamente resistentes a la infección, y la administración de IL-18 induce cronicidad. En este caso, pareciera ser que más que inducir altos niveles de IFN- γ la IL-18 podría regular la producción de IL-13. La acción de IL-18 podría ser muy sensible a la influencia del medio, ya que datos recientes muestran que IL-18 también pueden promover la síntesis de IL-4 y el desarrollo de respuesta Th2.

En el modelo *H. polygyrus*, la mayoría de las cepas de ratones desarrollan infecciones primarias crónicas, aunque algunas cepas empiezan a eliminar vermes varias semanas después de la infección. La infección primaria crónica está aso-

ciada con una respuesta Th2 y no con un cambio significativo a una respuesta dominante de citoquinas Th1. Sin embargo, es importante notar que la infección crónica puede asociarse con una regulación negativa de ciertas citoquinas Th2, como IL-9 e IL-10 y una regulación negativa de la mastocitosis intestinal. La base para la regulación negativa de la respuesta de citoquinas tanto para *T. muris* como *H. polygyrus* permanece sin definir, pero se piensa que involucra la participación de factores inmunomoduladores producidos por el parásito. En el modelo de *T. muris*, hay evidencias que sugieren que el parásito puede producir una citoquina semejante a IFN- γ . El concepto que los nemátodos del intestino producen y secretan moléculas inmunomoduladoras se refuerza mediante la observación que extractos de *N. brasiliensis* pueden inducir una fuerte respuesta Th2 en ausencia de infección.

El modelo de *T. muris* agrega otra faceta interesante a la inducción de infección crónica luego de la exposición a diferentes niveles de infección. En cepas de ratones resistentes, que normalmente expelen una moderada o alta cantidad de gusanos, ello no ocurre en infecciones producidas por bajas cargas parasitarias (10 a 20 gusanos) y tienden a desarrollar cuadros crónicos. El hospedero genera en estos casos una respuesta dominante de tipo Th1, mientras las infecciones con alta carga parasitaria se genera una fuerte respuesta Th2 y resistencia al desafío parasitario. Esta respuesta es además difícil de alterar aún después del tratamiento con IL-12, que normalmente induce una fuerte respuesta Th1 y por lo tanto susceptibilidad. Tomando estos datos en su conjunto, especialmente aquellos derivados de experimentos con bajos niveles de infección y que más estrechamente reflejan lo que ocurre en infecciones naturales, es posible sugerir que bajos niveles de infección llevan a susceptibilidad mientras que repetidos desafíos con bajos inóculos pueden llevar a resistencia. Esta condición de “resistencia” es difícil de alterar una vez que es adquirida.

4. Respuesta inmune frente a tremátodos intestinales

Un paradigma en el estudio de la respuesta inmune a tremátodos es el modelo de infección por ejemplares del género *Schistosoma*. Los esquistosomas son platelmintos tremátodos que viven en los vasos sanguíneos tanto en hospederos mamíferos como en aves. La mayoría de los



tremátodos son hermafroditas, pero los esquistosomas presentan dimorfismo sexual. Su ciclo evolutivo es indirecto e involucra la participación de caracoles como hospederos intermedarios (figura 35-5). Los huevos son liberados por las hembras hacia las deposiciones o la orina, dependiendo de la especie de esquistosoma. En contacto con el agua, se libera el miracidio móvil que debe entrar en contacto con un caracol para continuar su ciclo biológico. En el caracol se desarrolla el esporocisto, que genera una segunda generación de esporocistos y luego las cercarias. Durante este proceso de reproducción asexual, el parásito aumenta en número y en potencial reproductivo. Por ejemplo, en *Schistosoma mansoni*, un esporocisto es capaz de generar 200.000 cercarias. Las cercarias abandonan el caracol y constituyen las formas infectantes que penetran activamente la piel de su hospedero definitivo. Esta fase del ciclo de vida va acompañada de profundos cambios en la estructura y fisiología de la cercaria, que se transforma en un estadio denominado esquistosómula. La esquistosómula migra vía vasos sanguíneos hacia los pulmones y desde allí al hígado, donde alcanza el estado adulto. Los vermes adultos se aparean y migran a las venas mesentéricas o hacia aquellas localizadas en las cercanías de la vejiga. Los adultos viven 5 a 6 años liberando entre 300 (*S. mansoni*) y 3000 (*S. japonicum*) huevos por día. Los huevos son depositados en vasos de pequeño diámetro donde quedan atrapados. El miracidio se desarrolla precozmente dentro del huevo, de manera que enzimas secretadas por este estadio facilitan el pasaje del huevo a través de los tejidos hasta el intestino o la vejiga.

Los hospederos son infectados por un elevado número de vermes y por un largo período de tiempo, de esta forma la infección está asociada a una respuesta inmune amplia y variada. La penetración inicial de las cercarias produce escasa respuesta, no obstante en infecciones masivas puede existir respuestas de hipersensibilidad local. Entonces, aunque el desarrollo inicial puede estar asociado a reacciones alérgicas, generalmente la primera respuesta evidente es aquella derivada de la producción y liberación de los huevos. La liberación constante de estos, induce una fuerte respuesta de tipo celular y lleva también a procesos inmunopatológicos. Los gusanos adultos no son directamente patogénicos pero son fuertemente inmunogénicos, al liberar antígenos de su tegumento, de su intestino y aquellos derivados de su metabolismo.

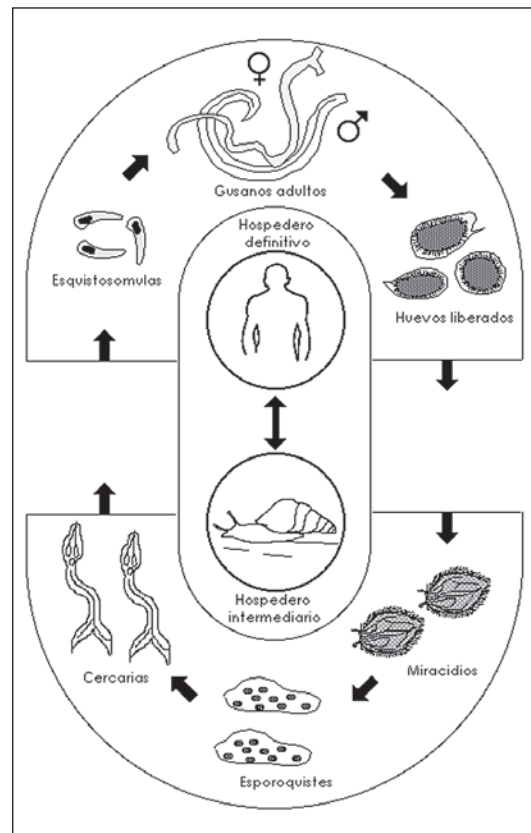


Figura 35-5. Ciclo biológico de *Schistosoma*. Las formas larvales o cercarias que nadan libremente en aguas infectadas, pueden penetrar a través de la piel humana, convirtiéndose en esquistosómulas que vía circulatoria viajan a los pulmones y luego al hígado, donde se convertirán en gusanos adultos y maduros. Desde el hígado los parásitos migran hasta los vasos sanguíneos del intestino, donde luego de reproducirse sexualmente, darán origen a numerosos huevos que son expulsados a través de las deposiciones u orina del hospedero. En el agua, los huevos dan origen a larvas ciliadas o miracidios que al entrar en un caracol, que actúa como hospedero intermedio, se reproducen asexualmente generando esporocistos a partir de los cuales se originan finalmente las cercarias infectantes para diversos hospederos mamíferos.

4.1. Inmunidad protectora frente a *Schistosoma*

En el hombre, existen claras evidencias acerca de la existencia de inmunidad adquirida y resistencia a la infección. El hecho que los individuos sobreviven en áreas endémicas con elevada transmisión y la observación de que los niveles de infección llegan a un equilibrio después de la segunda década de vida, se consideran evidencias de tal inmunidad. De igual manera se acepta que la habilidad para expresar esa resistencia se desarrolla de manera paulatina y que los niveles de



resistencia varían de un individuo a otro. Estudios en diferentes poblaciones humanas han mostrado que la resistencia a la infección aumenta con la edad y que la respuesta inmune específica incluye la participación de IgE, eosinófilos, IL-4 e IL-5, lo que se asocia además a bajos niveles de reinfección luego de la quimioterapia.

En modelos animales existe clara evidencia que la inmunidad depende del tipo de hospedero utilizado. Frente a la infección experimental por *S. mansoni*, monos y ratones desarrollan una fuerte respuesta inmune y aunque la infección primaria persiste por varios meses, los individuos se hacen resistentes a las reinfecciones. En ratas se desarrolla una respuesta inmune capaz de erradicar la infección primaria y de inducir una fuerte resistencia a la reinfección. Los monos Rhesus son capaces de destruir la mayoría de los vermes de *S. mansoni* producidos en la reinfección, pero son incapaces de eliminar aquellos establecidos en la infección inicial. De igual manera, la inmunidad a la infección puede estimularse por exposición de los monos a cercarias irradiadas o por trasplante de vermes adultos al sistema vascular. Así la inmunidad a la reinfección puede ser estimulada por los gusanos adultos para actuar contra los estadios larvales, sin afectar a los adultos (fenómeno de inmunidad concomitante). Hoy se acepta que la inmunidad concomitante frente a esquistosomas se manifiesta en diferentes hospederos y resulta por lo tanto particularmente interesante establecer los mecanismos que permiten a los vermes adultos evadir la respuesta inmune y los mecanismos efectores que conducen a la destrucción de las cercarias.

Estudios *in vitro* han mostrado que una variedad de mecanismos efectores que involucran células y anticuerpos, pueden actuar contra las larvas de esquistosomas. Así, las esquistosómulas pueden ser destruidas por lisis mediada por complemento. La interacción de las células efectoras con las larvas opsonizadas ocurre por medio de receptores para Fc y/o C3b. Aunque varias células actúan contra las esquistosómulas *in vitro*, los tipos celulares más importantes son macrófagos y eosinófilos.

4.1.1. Eosinófilos

Cuando las larvas se exponen a anticuerpos específicos y se activa el sistema del complemento, la adherencia de eosinófilos a la larva puede ocurrir por medio de receptores para Fc o C3b.

Los eosinófilos unen moléculas de IgE mediante receptores de baja afinidad FcεII, lo que les permite adherirse a la larva reconociendo la porción Fc de las IgE que se han unido a antígenos larvales específicos. En la rata, se han descrito reacciones ADCC con participación de eosinófilos e IgG2a que se producen durante las primeras 6 semanas de la infección, puesto que más tarde IgE será el anticuerpo predominante. Las IgG reconocen antígenos presentes en el tegumento tanto en larvas como en parásitos adultos, y esto explica por qué los gusanos adultos generan inmunidad contra las larvas. Los anticuerpos IgG2a pueden también unirse a mastocitos y la destrucción de esquistosómulas por eosinófilos y anticuerpos es estimulada en presencia de mastocitos. Este fenómeno que se asocia a la liberación de tetrapéptidos como el factor eosinofílico quimiotáctico de anafilaxis (ECF-A). La participación de IgA en reacciones de ADCC con participación de eosinófilos también ha sido descrita y luego de adherirse a la larva, estas células quedan en estrecho contacto con el tegumento del parásito, y sus gránulos de secreción de la célula se localizan adyacentes a la zona de contacto, se fusionan con la membrana celular y su contenido se vierte sobre el verme. Estos gránulos contienen una variedad de mediadores incluyendo enzimas como peroxidasa y fosfolipasa B y la llamada proteína básica principal, todas las cuales tienen efecto deletéreo para el tegumento. Así la permeabilidad del tegumento parasitario es seriamente alterada y los eosinófilos pueden también invadir activamente el tegumento. Se ha demostrado además que los eosinófilos pueden expresar moléculas coestimuladoras como CD28 y CD86 y participan en la secreción selectiva de citoquinas Th1 como IL-2 y IFN-γ.

Estudios inmunoepidemiológicos han mostrado, que en el hombre existe correlación entre niveles de anticuerpos IgE y resistencia a la reinfección. Se ha mostrado que eosinófilos, macrófagos y plaquetas son capaces de matar esquistosómulas en presencia de IgE. Existe una fuerte evidencia de que reacciones de ADCC mediadas por IgE pueden ser un componente importante de la inmunidad protectora aunque otros mecanismos también podrían participar y la mayor o menor participación de un determinado mecanismo puede depender del modelo utilizado.

4.1.2. Macrófagos

La muerte de esquistosómulas por macró-



fagos parece operar de dos maneras distintas. Por un lado, linfocitos T activados liberan IFN- γ que va a estimular macrófagos con la consiguiente producción de metabolitos tóxicos y óxido nítrico. El segundo mecanismo es específico y requiere la participación de anticuerpos IgE, los cuales no son opsonisantes pero permiten la adhesión del macrófago y la liberación de enzimas sobre el tegumento del parásito.

Entre los mecanismos efectores contra esquistosómulas se encuentra la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (DAC) que resulta muy eficiente contra larvas jóvenes. Esta susceptibilidad de las larvas decrece con el tiempo, puesto que el rápido desarrollo de resistencia a la ADCC es fundamental en la sobrevivencia del parásito, aún en infecciones primarias. Aunque anticuerpos no están presentes en las etapas iniciales de la infección, la activación de la ruta alterna del sistema del complemento resulta en la adherencia de C3b. La pérdida de la susceptibilidad se correlaciona con alteraciones en la antigenicidad de la superficie de las esquistosómulas, que conducen a disminuir la unión de anticuerpos y de factores del complemento y el tegumento del parásito muestra una mayor resistencia a los mecanismos efectores de inmunidad. Aunque esquistosómulas son el principal blanco de la respuesta protectora, estadios posteriores (postpulmonares) e incluso adultos pueden ser afectados por la inmunidad.

4.2. Inmunidad en la rata

La rata es un hospedero relativamente no permisivo, que desarrolla una fuerte respuesta inmune a la infección primaria, de manera que los gusanos adultos no se reproducen y son rápidamente eliminados. De igual modo, la infección primaria confiere inmunidad al desafío o a la reinfección y los pulmones parecen ser el principal sitio de destrucción de parásitos. Esta inmunidad es dependiente de células T, pero se ha mostrado la participación de anticuerpos y la actividad protectora de sueros inmunes está asociada a los isotipos IgG2a e IgE. Datos obtenidos *in vitro* muestran que estos anticuerpos participan en reacciones de tipo ADCC en las cuales los eosinófilos juegan un papel central. Estudios de vacunación utilizando el antígeno recombinante Sm28GST, han confirmado la participación de IgE en la inmunidad pero han mostrado también que IgA pueden participar en la protección citotóxica dependiente de eosinófilos

4.3. Inmunidad en el ratón

El ratón es un hospedero permisivo, en el que se produce la sobrevivencia y establecimiento de poblaciones reproductivas del verme. La infección primaria, lleva al desarrollo de patología hepática, seguida de la formación de granulomas alrededor de los huevos que quedan atrapados en los capilares mesentéricos. Las infecciones secundarias producen bajo número de vermes adultos, pero este fenómeno resulta en parte por la formación de anastomosis portal y cava que permite una menor población de vermes en el hígado. Los ratones pueden sin embargo ser inmunizados con cercarias y esquistosómulas irradiadas las cuales no maduran a adultos productores de huevos permitiendo el estudio de la inmunidad en ausencia de patología.

En el ratón, la inmunidad inducida por vacunación es generalmente T-dependiente con participación de subpoblaciones T CD4⁺. Las reacciones de ADCC (con participación de IgG) y la activación de macrófagos por linfocitos T serían los principales mecanismos efectores, pero es posible que la relevancia de los distintos mecanismos efectores dependa de la localización tisular del parásito. Eosinófilos y neutrófilos han sido implicados en la respuesta a nivel de la piel mientras que macrófagos juegan un papel central en el hígado. Estudios de respuesta inmune frente a estadios pulmonares sugieren que la respuesta Th1 es de fundamental importancia. Luego de la estimulación antigénica, estas células liberan IFN- γ que activa macrófagos los que interactúan con esquistosómulas y otras citoquinas, para iniciar el desarrollo de un foco inflamatorio en el cual la larva es atrapada. El mecanismo de daño mediado por macrófagos involucra intermediarios reactivos de oxígeno, nitrógeno y TNF. La inmunidad es reducida si los ratones infectados se tratan con anticuerpos anti-IFN- γ .

Estudios de inmunoprotección han mostrado que en el hombre y la rata la protección estaría dada por mecanismos efectores mediados por subpoblaciones Th2, mientras que en el ratón la inmunidad protectora estaría dada por Th1 con la participación de IFN- γ e IL-12. Estudios *in vitro* utilizando tanto células humanas como de ratón, sugieren que reacciones ADCC participan en la muerte de las larvas de esquistosoma. Este mecanismo parece mediado por IgE con la participación de células efectoras como eosinófilos y plaquetas. Dado la importante contribución de IL-



4 e IL-5 en la inducción de anticuerpos IgE y de eosinofilia, parece claro que una respuesta Th 2 es un respuesta protectora en estas especies.

Estudios de protección con cercarias irradiadas muestran claramente la importancia de células T CD4+ en la resistencia, la cual es claramente dependiente de IFN- γ . De igual manera, la inmunidad es reducida en ratones deficientes en células CD4+, células B, IFN- γ o IL-12, sugiriendo que linfocitos Th1 son particularmente importantes en el desarrollo de una respuesta efectiva contra el parásito. De hecho, ratones vacunados que desarrollan una respuesta Th1 y altos niveles de IL-12 resultan fuertemente protegidos. Aunque los mecanismos que operan en esta protección mediada por Th 1, no están definidos, existe fuerte evidencia que sugiere que podría estar mediada por IFN- γ , TNF- α , macrófagos activados y células endoteliales. No obstante, cuando ratones reciben una vacunación de refuerzo mediante cercarias irradiadas, se desarrolla una mezcla de respuestas Th1/Th 2 con producción de anticuerpos parásito-específicos y capaces de proteger mediante transferencia pasiva a ratones no inmunizados. Estas observaciones, sugieren que respuestas efectoras Th1 y Th 2 podrían contribuir a la inmunidad protectora de ratones vacunados con múltiples dosis. Características importantes de la respuesta inmune frente a esquistosomas se han conocido mediante el uso de ratones doble “knockout” que muestran respuestas altamente polarizadas para Th 1 (ratones deficientes en IL-10/IL-4) o Th 2 (ratones deficientes en IL-10/IL-12). Los hallazgos más significativos se observaron en animales deficientes en IL-10, los cuales desarrollaron respuesta protectora tanto Th1 como Th 2, con altos títulos de anticuerpos específicos, alta proliferación de linfocitos, elevada respuesta inflamatoria pulmonar y aumento en el número de células productoras de IFN- γ e IL-4. Estos resultados sugieren que, en esquistosoma, una óptima respuesta inmune no se basa en una respuesta polarizada Th1 o Th2, sino más bien en la inducción de ambas. Estos hallazgos son semejantes a los obtenidos en animales tratados con IL-12, los cuales al ser expuestos a cercarias irradiadas, muestran un aumento significativo de las respuestas humoral y celular, aunque a diferencia de lo que ocurre con ratones deficientes en IL-10, la IL-12 induce una respuesta polarizada de tipo Th1.

4.4. Interferencia con la inmunidad

En las poblaciones humanas expuestas a la infección, el desarrollo de inmunidad es lento y depende de la intensidad de la transmisión. Estudios serológicos de reinfección realizados en escolares tratados en áreas endémicas, sugieren que el estado de inmunidad es determinado por el balance entre los anticuerpos IgG4 e IgE. La reinfección está significativamente reducida en los niños con altos niveles de IgE contra gusanos adultos y mucho más reducida en aquéllos con altos niveles de IgG4. La explicación para este fenómeno se asocia al hecho que IgG4 bloquea las reacciones ADCC en que participan los eosinófilos y podría además interferir con otros mecanismos efectores (degranulación de mastocitos, por ejemplo). El concepto de anticuerpos bloqueadores está bien documentada en la relación esquistosoma-hospedero, y en humanos se ha mostrado que anticuerpos IgM dirigidos contra epítomos particulares de la superficie de esquistosoma, bloquean efectivamente la unión de IgG dirigidas contra el mismo epítomo. En ratas el monoclonal IgG2c bloquea la muerte por eosinófilos dependiente del monoclonal IgG2b mientras que en el ratón monoclonales IgM bloquean la ADCC mediada por IgG. Estos anticuerpos bloqueadores muestran especificidad por epítomos de carbohidratos presentes tanto en la larva como en los huevos. Estos anticuerpos originados en respuesta a la infección por adultos productores de huevos, interfieren cruzadamente la inmunidad contra las larvas invasivas.

La síntesis de un particular isotipo de anticuerpos es regulada por citoquinas producidas por células T. Trabajos de infección por esquistosoma en el ratón, han mostrado que el comienzo de la producción de huevos esta asociada a un cambio desde una respuesta predominantemente Th1 a una de tipo Th2, una regulación negativa de las citoquinas IFN- γ e IL-2 y un aumento en la producción de IL-4, IL-5 e IL-10. Muchos de los eventos inflamatorios que ocurren en ese momento se pueden asociar al patrón de citoquinas secretado y el balance de citoquinas también determina la producción de determinados isotipos de anticuerpos.

La esquistosomiasis es una de las pocas parasitosis en las que la patología asociada a la infección es causada no por la presencia directa del gusano sino por la respuesta inmune e inflamatoria del hospedero. En el daño



inmunopatológico, destacan la dermatitis que sigue a la penetración de las cercarias, la alergia aguda causada por la migración a través del pulmón, la fase alérgica tardía observada en infecciones por *S. mansoni* y las enfermedades por inmunocomplejos. No obstante la entidad mejor estudiada son las reacciones asociadas a la infección crónica con *S. mansoni* la cual es responsable de los importantes cambios que se observan en el hígado. Aunque algunos huevos son eliminados por las heces del hospedero, otros, aunque no permanecen en las venas y capilares mesentéricos son capaces de pasar a la vena porta y llegar al hígado donde quedan atrapados en las vénulas presinusoidales. En huéspedes crónicamente infectados, los miracidios secretan potentes inmunógenos (Antígenos solubles del huevo, ASH), estimulando hipersensibilidad retardada, por lo que cada huevo es foco de producción del granuloma. Los ASH son liberados por los poros del huevo y corresponden a estructuras complejas de proteínas, lipoproteínas, carbohidratos y glicolípidos. Algunos de estos componentes son reconocidos por linfocitos TCD4 que participan en la iniciación, desarrollo y modulación del granuloma. Los linfocitos T helper y sus citoquinas al aumento local de macrófagos, eosinófilos y otras células inflamatorias, que se localizan alrededor de cada huevo produciendo un foco de inflamación. Los ASH parecen promover una selectiva respuesta Th2 con liberación de IL-5 responsable de la acumulación de eosinófilos. La respuesta inmune lleva entonces a la formación de granulomas, pero también protege del daño por hepatotoxinas liberadas por los miracidios. El ataque inmunológico consigue destruir los miracidios y ratones deficientes en linfocitos T aunque no forman granulomas sufren severo daño hepático, caracterizado por necrosis en las áreas inmediatamente vecinas a los huevos atrapados.

LECTURAS SUGERIDAS

Bogdan, C., Rollinghoff, M. "How do protozoan parasites survive inside macrophages?", *Parasitol. Today* 15: 22-28, 1999.

Brenier-Pinchard, M.P. et al., "Chemokines in host-protozoan-parasite interactions", *Trends in Parasitol.* 17: 292-296, 2001.

Carruthers, V. B., "Host cell invasion by opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*", *Acta Tropica* 81: 111-122, 2002.

Helmby, H., Grecis, R.K. "IL-18 regulates intestinal mastocytosis and Th2 cytokine production independently of IFN- γ during *Trichinella spiralis* infection", *J. Immunol.* 169: 2553-2560, 2002.

Kaufmann, S.H.E., Sher, A., Ahmed, R. **Immunology of Infectious Diseases**, American Society of Microbiology, 2002; 495.

Theodos, C.M., "Innate and cell-mediated immune response to *Cryptosporidium parvum*", *Adv. Parasitol.* 40:87-119, 1998.

Wakelin, D., **Immunity to parasites. How parasitic infections are controlled**, Second edition. Cambridge University Press, 1996; 204.





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 36

VACUNAS

Ulises Vergara y Rosario Billetta

-
1. **Introducción**
 2. **Vacunas naturales o tradicionales**
 3. **Vacunas recombinantes**
 4. **Vacunas anti-idiotípicas**
 5. **Vacunas sintéticas**
 6. **Vacunas de DNA**
 7. **Vacunas Genómicas**
 8. **Adyuvantes, inmunomoduladores e inmunogenicidad**





RESUMEN

La vacunación contra diversas enfermedades infecciosas ha sido uno de los mayores éxitos en el campo de la inmunología desde los tiempos de Jenner. Bacterias y virus vivos atenuados que conservan su capacidad de replicación y su inmunogenicidad pero no su patogenicidad; bacterias y virus muertos que sólo conservan su inmunogenicidad; fracciones antigénicas purificadas; proteínas, subunidades proteicas y toxinas bacterianas se han utilizado como vacunas para controlar diversos agentes infecciosos. Sin embargo, aún cuando estas vacunas han logrado disminuir la incidencia, morbilidad y mortalidad de un gran número de enfermedades infecciosas, existen todavía enfermedades que son difíciles de prevenir y controlar por medios profilácticos, porque no existe una vacuna disponible, o las que existen son menos seguras o menos efectivas de lo deseado. Carencia de suficiente material a partir de fuentes naturales de material biológico, efectos colaterales adversos, inestabilidad de la vacuna en su forma atenuada, material biológico contaminante, baja inmunogenicidad de sus componentes y dificultades en su producción, almacenamiento transporte y forma de administración, son algunas de las causas que explican la ausencia o baja efectividad de algunas de nuestras vacunas. Los recientes avances en biotecnología ofrecen hoy en día nuevas posibilidades para el desarrollo de vacunas efectivas basadas en antígenos recombinantes altamente purificados, bacterias o virus recombinantes vivos, anticuerpos anti-idiotípicos que representan imágenes internas de epítopes protectores, fragmentos peptídicos químicamente sintetizados y vacunas génicas y genómicas de DNA, que codifican respectivamente, la expresión de antígenos protectores individuales o del repertorio antigénico completo en forma de genes

1. INTRODUCCIÓN

La vacunación contra diversas enfermedades infecciosas ha sido uno de los mayores logros en el campo de la inmunología desde 1798 cuando Edward Jenner demostró que la inoculación de virus vivos provenientes del ganado (poxavirus del género vaccinia) proporcionaba inmunidad contra la viruela en la especie humana. Este importante hallazgo se basó en la observación, durante una epidemia de viruela, de la ausencia de la enfermedad en ordeñadoras que habían permanecido en contacto con el ganado bovino. Hoy día estos virus están siendo genéticamente manipulados *in vitro* y utilizados como vectores para la introducción de diversos determinantes antigénicos de manera que su expresión, en las células infectadas con el virus recombinante, conduzca al desarrollo de una respuesta inmune protectora contra el agente infeccioso del cual derivan esos antígenos.

La vacunación para prevenir diversas enfermedades infecciosas ha sido practicada por casi

200 años y el proceso ha sido bastante conservador desde los tiempos de Jenner, manteniendo el objetivo de inducir una respuesta inmune humoral y/o celular que proporcione protección frente a la infección natural con el patógeno. El inmunógeno de elección ha sido siempre el agente infeccioso muerto o atenuado y sólo en los últimos 15 años se han hecho esfuerzos para reemplazar las vacunas que utilizan el patógeno completo por vacunas basadas en subunidades o porciones no viables o no infecciosas que contengan fracciones antigénicas altamente purificadas y todavía capaces de inducir una respuesta inmune protectora. El uso de vacunas de subunidades del agente infeccioso ha resultado atractiva porque evita los problemas asociados a la inactivación o atenuación incompleta del patógeno y la posibilidad de contaminación biológica durante el cultivo del agente infeccioso a gran escala. Inmunógenos específicos pueden ahora producirse a través de la purificación de proteínas individuales, el uso de anticuerpos anti-idiotípicos que representan imágenes internas de ciertos deter-



minantes antígenos del agente infeccioso o mediante la utilización de la tecnología del DNA recombinante y la síntesis química de péptidos.

Una vez aislado e identificado un agente infeccioso, cualquier intento de generación de una vacuna contra la enfermedad debe considerar una serie de factores que pueden favorecer o complicar el desarrollo de la misma. Estos factores pueden estar relacionados con el agente infeccioso, con la enfermedad y con sus posibilidades de control o erradicación (tablas 36-1 y 36-2). Además, la inducción de una respuesta inmune protectora humoral y/o celular en los individuos vacunados, dependerá en último término de la naturaleza y forma fisicoquímica de los antígenos utilizados, de su forma de administración, del destino metabólico de los mismos y del repertorio genético del individuo y los diversos mecanismos de regulación de la respuesta inmune. La edad del individuo es también un factor a considerar en la inducción de respuesta inmune a una vacuna, puesto que existen diferencias en la capacidad de respuesta en los primeros meses de vida y durante la senescencia. La presencia de altos niveles de anticuerpos maternos adquiridos en forma pasiva en los primeros meses de vida, dificultan o alteran la respuesta inicial a algunas vacunas. En los ancianos existe una disminución en la capacidad

de respuesta a la estimulación antigénica y se requiere, muchas veces, una mayor cantidad de antígeno para lograr la respuesta inmune deseada.

Luego de identificados los inmunógenos que pueden servir de base para la generación de una vacuna contra un agente infeccioso, el desarrollo de la misma debe cumplir 3 rigurosas etapas o fases, que ponen a prueba su eficacia, seguridad y estabilidad, antes de su uso masivo para el control de la enfermedad (tabla 36-3)

2. VACUNAS NATURALES O TRADICIONALES

La defensa contra una gran variedad de agentes infecciosos depende de la habilidad del sistema inmune para reconocer, neutralizar y eliminar antígenos del agente patógeno y el objetivo de la vacunación es inducir una adecuada respuesta inmune protectora contra la infección natural. Así, bacterias y virus vivos atenuados que conservan su capacidad de replicación y su inmunogenicidad, pero no su patogenicidad; bacterias y virus muertos que sólo conservan su inmunogenicidad; fracciones antigénicas purificadas; proteínas, subunidades proteicas y toxinas bacterianas, se han utilizado como vacunas para controlar diver-

Tabla 36-1. Factores que favorecen el desarrollo de vacunas efectivas

Del agente infeccioso

- Sólo uno o pocos serotipos, con poca variación antigénica
- Patógeno moderada o escasamente infeccioso
- Antígenos con epítomos B y T fácilmente identificables
- Inmunidad sistémica de fácil inducción.

De la enfermedad

- Infección induce respuesta inmune protectora
- Existencia de un modelo animal que reproduce la evolución de la infección y/o la enfermedad.

De la erradicación

- La infección está limitada a humanos y no existen otros reservorios naturales
- La infección induce un cuadro clínico característico y no existen infecciones subclínicas o portadores sanos.
- Existencia de un marcador simple de vacunación exitosa



Tabla 36-2. Factores que complican el desarrollo de vacunas efectivas

Del agente infeccioso
<ul style="list-style-type: none">• Existencia de variación antigénica y por lo tanto múltiples serotipos• El patógeno es altamente infeccioso• Eventual variación en el tropismo del patógeno• Patógeno provisto de mecanismos de evasión de la respuesta inmune
De la infección
<ul style="list-style-type: none">• Infección puede ser transmitida por células infectadas que no expresan antígenos del patógeno• Integración de genes del patógeno en el genoma del hospedero• La infección no induce una respuesta inmune protectora• Inducción de mecanismos de supresión de la respuesta inmune• Infección y/o destrucción de subpoblaciones linfocitarias• Ausencia de un modelo animal que simule la infección o la enfermedad en humanos
De la erradicación
<ul style="list-style-type: none">• Existencia de reservorios naturales• Distintas manifestaciones clínicas de la infección o enfermedad y existencia de formas subclínicas y de portadores sanos.

Tabla 36-3. Fases en el desarrollo de una vacuna

Fase I :	Corresponde a la fase de seguridad que determina la ausencia de reacciones adversas en voluntarios inoculados
Fase II:	Corresponde al desafío, de los voluntarios inmunizados, con el agente infeccioso en condiciones restringidas. Esta fase requiere la disponibilidad de drogas para control del patógeno y eventual tratamiento de los voluntarios.
Fase III:	Exposición de los voluntarios inmunizados, a la infección natural con el patógeno en una región en la que la infección o la enfermedad es endémica. Requiere también drogas para el control del patógeno y eventual tratamiento de los voluntarios

sos agentes infecciosos. Sin embargo, aún cuando estas vacunas convencionales han ciertamente disminuido la incidencia, morbilidad y mortalidad de un gran número de enfermedades infecciosas, existen todavía enfermedades que son difíciles de controlar y prevenir por medios profilácticos, ya que no existe una vacuna disponible o las que existen son menos seguras o menos efectivas que lo deseado. Las razones que explican la ausencia de estas vacunas son desde luego diversas y entre ellas podemos mencionar la caren-

cia de suficiente material biológico a partir de fuentes naturales, efectos colaterales no deseados, efectos nocivos por insuficiente atenuación o inestabilidad de la vacuna en su forma atenuada, baja inmunogenicidad de sus componentes, presencia de material biológico contaminante y dificultades en la producción, almacenamiento, transporte y forma de administración de la vacuna. Una vacuna ideal debe desde luego reproducir la respuesta inmune protectora inducida por la infección natural, debe ser estable y carecer de efectos colatera-



les adversos, pero además debe ser de bajo costo, sin dificultades de producción, almacenamiento o transporte y debe ser fácil de administrar en los distintos individuos. Muchas de las vacunas convencionales actualmente disponibles no son ideales debido a su alto costo de producción (hepatitis B, rabia), por sus potenciales efectos tóxicos o virulentos (pertussis, rubéola) o por la inadecuada protección inducida (cólera, tífus).

Ahora bien, la preparación de una vacuna a partir de fuentes naturales de material biológico, requiere la obtención del agente patógeno a partir de fuentes humanas o de animales infectados, su identificación y caracterización, su mantención en cultivo de tejidos o diversos medios de cultivo *in vitro* y los variados procesos de atenuación o inactivación.

Prevenir la replicación del agente infeccioso (mediante tratamiento con luz ultravioleta, fenol, formaldehído, beta propiolactona, imina) parece la forma más simple de destruir su carácter patogénico, pero el proceso de inactivación no debe alterar la estructura antigénica necesaria para la inducción de una respuesta inmune protectora. La inmunidad conferida por microorganismos muertos (difteria, tétanos, tifoidea, influenza, rabia, virus polio Salk) no induce inmunidad permanente con una única dosis y requiere dosis repetidas y refuerzos para mantener la respuesta inmune protectora. La inmunidad conferida por las vacunas inactivadas o muertas es en muchos casos menor que la conferida por las vacunas vivas, ya que la replicación del agente infeccioso permite la exposición a una dosis mayor y sostenida de antígeno, al tiempo que favorece el procesamiento y la presentación de los mismos. Este fenómeno es particularmente importante en las enfermedades virales, que requieren de la infección celular para la expresión de ciertos antígenos y una adecuada inducción de respuesta inmune celular. Las vacunas naturales inactivadas o no infecciosas entonces, son en general bastante estables y seguras pero requieren habitualmente de altas dosis de inoculación por vía parenteral, lo que puede provocar reacciones de hipersensibilidad.

El proceso de atenuación de un patógeno pretende producir un agente infeccioso modificado que mantenga o imite la conducta natural del microorganismo original, pero sin causar enfermedad. Así ha ocurrido con las vacunas contra sarampión, rubéola, fiebre amarilla, poliomielitis (Sabin) y parotiditis que confieren inmunidad de por vida o permanente con una sola dosis, puesto

que no sólo simulan la infección natural, sino que además se multiplican en el receptor produciendo gran cantidad de antígenos.

La atenuación del agente infeccioso puede obtenerse por modificación de las condiciones de crecimiento o de cultivo del patógeno (como por ejemplo bacilo de Calmette y Guérin de *Mycobacterium tuberculosis*), pero una vacuna atenuada puede también generarse mediante la utilización de especies o variantes distintas del patógeno y que son virulentas para hospederos heterólogos, distintos de aquél que se pretende proteger con la vacuna. El ejemplo más conocido es el del virus vaccinia (cowpox de bovinos) que protege contra la viruela humana y representa uno de los éxitos más espectaculares en el control de una enfermedad infecciosa, la que se considerada erradicada desde 1980. En este grupo de vacunas atenuadas se encuentran también las vacunas contra sarampión, rubéola, parotiditis, fiebre amarilla y la vacuna Sabin contra poliomielitis.

Algunas bacterias producen enfermedad no por efecto directo sino por la liberación de toxinas que pueden tener enormes efectos destructivos en órganos o tejidos distintos del sitio de infección. Así, exotoxinas bacterianas inactivadas por calor o químicamente modificadas por tratamiento ácido, tratamiento con formaldehído o con enzimas proteolíticas, han dado origen a vacunas basadas en este producto detoxificado denominado toxoide. Vacunas basadas en toxoides de difteria y tetanus inducen una respuesta de anticuerpos protectores que neutralizan la toxina y facilitan su fagocitosis.

Las vacunas naturales o tradicionales pueden, en general, agruparse en:

- Aquéllas que utilizan microorganismos inactivados o muertos, por ejemplo cólera (*Vibrio cholerae*), fiebre tifoidea (*Salmonella typhi*), tos convulsiva (*Bordetella pertussis*) y antrax.
- Las que utilizan patógenos atenuados como poliomielitis, parotiditis, fiebre amarilla, influenza, varicela, adenovirus, viruela y tuberculosis
- Las que utilizan toxinas detoxificadas (toxoides) ya sea solas o unidas a un carrier proteico. En este grupo se encuentran las vacunas contra botulismo (*Clostridium botulinum*), difteria (*Corynebacterium diphtheriae*) y tétanos (*Clostridium tetani*)



- Las que utilizan material capsular soluble (como polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella typhi* y *Haemophilus influenzae*)
- Las que utilizan fracciones antigénicas purificadas, como por ejemplo influenza y antígeno de superficie de hepatitis B.

Ahora bien, cuando se inocula un agente infeccioso, ya sea vivo o muerto o partes substanciales de él, se está introduciendo en los individuos material biológico que es, en gran parte, desconocido y altamente mutable. Si el agente infeccioso ha crecido en cultivo de tejidos, es imposible garantizar la ausencia de contaminación biológica y mientras más aprendemos sobre mutabilidad y latencia viral, mayor debe ser la preocupación por los efectos a largo plazo de nuestras vacunas. El hecho es que junto a los determinantes antigénicos indispensables para la inducción de una respuesta inmune protectora, estamos también introduciendo al vacunar, moléculas innecesarias e irrelevantes que pueden ser inmunogénicas y por lo tanto capaces de activar linfocitos T supresores o de inducir la síntesis de anticuerpos que participen en la formación de complejos inmunes que pueden tener algún efecto patológico al fijarse en diversos órganos o tejidos.

Partiendo del supuesto que la respuesta inmune contra un agente infeccioso está en su mayor parte dirigida contra moléculas de la superficie del agente patógeno, los esfuerzos de los investigadores se han concentrado en la identificación y caracterización de estos antígenos con el objeto de reemplazar las vacunas que utilizan agentes infecciosos vivos o muertos, por fracciones antigénicas altamente purificadas, por antígenos recombinantes, por fragmentos peptídicos químicamente sintetizados o por la inoculación directa del DNA o RNA que codifica la expresión de un antígeno protector. Además algunos virus están siendo genéticamente manipulados para eliminar del genoma aquellas regiones que codifican la expresión de los factores responsables de su virulencia, y de esta manera desarrollar vacunas efectivas, de virus vivos que conserven intacta su capacidad de replicación y su capacidad para inducir una respuesta inmune protectora, al tiempo que carecen de la posibilidad de revertir a una forma patológica.

3. VACUNAS RECOMBINANTES

La preparación de cualquier vacuna contra un agente infeccioso requiere la obtención del patógeno a partir de fuentes humanas o animales de material biológico, y su mantención en cultivo para la producción de los antígenos implicados en la inducción de una respuesta inmune protectora. Sin embargo, muchos agentes infecciosos son difíciles o imposibles de cultivar y otros ofrecen un muy bajo rendimiento, aún después de cultivos masivos a gran escala. Este es el contexto en el que los recientes avances en biotecnología ofrecen sorprendentes y atractivas posibilidades para la producción de una nueva generación de vacunas efectivas contra diversos agentes infecciosos.

Una aproximación para generar grandes cantidades de un inmunógeno proteico específico, es la utilización de la tecnología del DNA recombinante que involucra el aislamiento del DNA que codifica la expresión del antígeno protector, su inserción en un vector de clonamiento autorreplicante (plásmido o virus) y su amplificación en bacterias (*E. coli*), levaduras o células de mamífero (figura 36-1). Si el DNA no está disponible, se purifica el RNA mensajero del agente infeccioso y se le utiliza como molde para generar por transcripción inversa un DNA complementario (cDNA) que se insertará en el vector de clonamiento.

En general, las estrategias utilizadas para la introducción de DNA extraño en un vector de clonamiento autorreplicante pueden conducir a la construcción de una **biblioteca** genómica (genoteca) a partir del DNA del agente infeccioso (figura 36-1), o la generación de una genoteca de cDNA a partir del RNA mensajero del mismo patógeno.

La construcción de una genoteca implica:

- a) Elección y purificación del vector de clonamiento, plásmido o virus, más adecuado.
- b) Purificación de DNA total, del agente infeccioso
- c) Tratamiento, bajo condiciones apropiadas, del vector de clonamiento y del DNA del agente infeccioso (DNA foráneo o extraño) con la misma enzima o nucleasa de restricción. De esta manera el DNA circular del vector de clonamiento se convierte en una estructura lineal, mientras el DNA del agente infeccioso

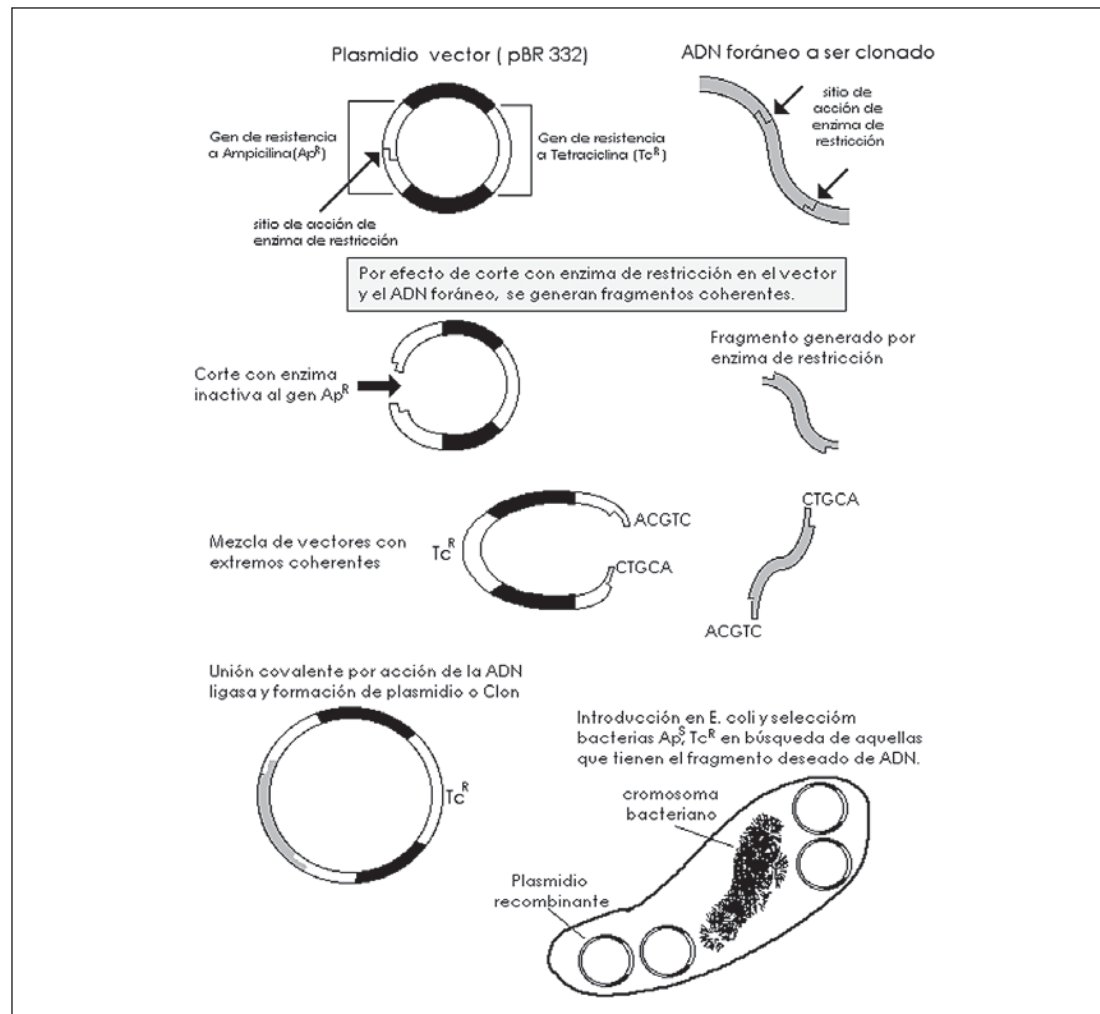


Figura 36.1. Estrategia general utilizada en la tecnología del DNA recombinante. El vector de clonamiento elegido es el plásmido pBR322 que confiere resistencia a los antibióticos ampicilina y tetraciclina, a las bacterias que lo poseen o lo incorporan. Tanto el plásmido como el DNA del agente infeccioso se tratan con la misma enzima de restricción para convertir el DNA circular del plásmido en una estructura abierta y lineal, mientras en el DNA del agente infeccioso se generan diversos fragmentos de restricción. El vector de clonamiento y los fragmentos de DNA se mezclan y unen luego en presencia de la enzima DNA ligasa, para generar vectores recombinantes que incorporan algún fragmento de DNA (gen) extraño del agente infeccioso (la inserción del DNA extraño, en el gen de resistencia a ampicilina, determina la inactivación del mismo). La amplificación de los plásmidos en cultivos de *E. coli*, permitirá seleccionar bacterias tetraciclina resistentes por incorporación de un plásmido recombinante.

se convierte en pequeños "fragmentos de restricción", algunos de los cuales contendrán el gen de interés. Como alternativa, la fragmentación del DNA del agente infeccioso se puede obtener por métodos físicos como ruptura de las moléculas de DNA por pasaje a través de una jeringa o por sonicación, entre otros. Finalmente se puede tratar enzimáticamente el DNA total mediante digestión parcial con DNasa, esto evita el uso de enzimas de restricción que pueden cortar en medio de la secuencia codificante de los genes.

- d) Mezcla y unión de la forma lineal del vector de clonamiento y con los fragmentos de DNA extraño, y tratamiento con la enzima DNA ligasa para generar vectores recombinantes (clonamiento del DNA).
- e) Introducción y amplificación de cada vector de clonamiento en bacterias, levaduras o células de mamífero en cultivo, en condiciones que sólo permiten el crecimiento de los vectores recombinantes que han incorporado algún gen o fragmento génico del DNA extraño (selec-



ción positiva). De esta manera se genera una genoteca, que contiene fragmentos de todo el genoma del agente infeccioso y está por lo tanto constituida por la colección completa de vectores recombinantes generados durante el proceso de clonamiento.

La estrategia alternativa de clonamiento a partir de RNA mensajero del agente infeccioso y la consiguiente construcción de una genoteca de cDNA implica:

- a) Purificación del RNA mensajero total o de una fracción del RNA mensajero del patógeno.
- b) Transcripción inversa del RNA mensajero, para generar una copia de DNA complementario (cDNA). La reacción es catalizada por la enzima transcriptasa inversa, que utiliza la molécula de mRNA como molde para la síntesis de una molécula de cDNA.
- c) La hebra simple de cDNA es convertida en una doble hélice de DNA en una reacción catalizada por la enzima DNA polimerasa.
- d) Corte del vector de clonamiento con enzima de restricción y agregado de pequeñas secuencias nucleotídicas homopoliméricas en los extremos abiertos del vector y de secuencias homopoliméricas complementarias en los extremos del cDNA.
- e) Inserción de las moléculas de cDNA en el vector de clonamiento, en presencia de la enzima DNA-ligasa. Se generan así vectores recombinantes de cDNA
- f) Introducción y amplificación de cada vector de clonamiento en bacterias, levaduras o células de mamífero en cultivo, en condiciones que sólo permitan el crecimiento de vectores recombinantes. Se genera así una genoteca de cDNA que contiene sólo las regiones que se transcriben del genoma del patógeno y está constituida por la colección completa de vectores recombinantes generados a partir del mRNA del agente infeccioso.

Una vez construida una biblioteca genómica o una biblioteca de cDNA, debe realizarse la identificación de los clones recombinantes que contienen el gen que codifica la expresión del antígeno de interés. Esta identificación y selección de clones recombinantes específicos puede hacerse por hibridización *in situ* con una sonda radiactiva de

DNA o RNA, mediante una sonda marcada (por ejemplo un anticuerpo o un ligando específico radiactivamente marcado), que permitan detectar la expresión del antígeno mismo en cultivos de bacterias, levaduras o células de mamífero transfectadas con los clones o vectores recombinantes (ver capítulo 30).

La producción de antígenos mediante técnicas de biología molecular ofrece un alto rendimiento del inmunógeno en cuestión, el que será similar, si no idéntico a la proteína original expresada por el agente infeccioso. Regiones seleccionadas del genoma del agente infeccioso (que codifican la expresión de proteínas involucradas en la inducción de una respuesta inmune protectora) pueden, luego de su inserción en el vector de clonamiento, ser amplificadas y expresadas en cultivos de bacterias, levaduras o células de mamífero, a partir de los cuales se purificará el "antígeno recombinante". El crecimiento de plásmidos o virus recombinantes en estos cultivos a gran escala, ofrece un gran potencial, tanto para el desarrollo de vacunas recombinantes no infecciosas que reemplacen las vacunas tradicionales ya existentes, (*B. pertussis*, *H. influenzae*, pneumococcus, meningococcus, hepatitis B, sarampión, polio), como para la generación de vacunas contra agentes infecciosos que son difíciles o imposibles de cultivar en el laboratorio.

Una alternativa adicional en la generación de vacunas recombinantes es la utilización de bacterias o virus recombinantes vivos como inmunógeno. La estrategia de preparación de estas vacunas consiste en escoger el DNA del agente patógeno que codifica la expresión de una proteína capaz de inducir una respuesta inmune protectora, e insertarlo en el genoma de un virus o bacteria de reconocida seguridad y eficacia como vacuna viva. Virus como vaccinia, herpes, varicela, adenovirus, papiloma, SV40 y polio y bacterias como *Salmonella*, BCG y *Escherichia coli* están siendo utilizados como vectores de clonamiento para el desarrollo de estas vacunas recombinantes vivas. El segmento génico protector es insertado en el genoma viral o bacteriano de manera tal que la replicación del vector recombinante desencadene en los individuos inoculados, una respuesta mixta contra el vector y contra el producto génico del DNA extraño del agente infeccioso. Este DNA extraño del patógeno debe ser insertado en un lugar tal del genoma del vector recombinante, que no se alteren los mecanismos de replicación ni la sobrevivencia del vector en el hospedero. Al incorpo-



rarse en la célula del individuo vacunado, el vector recombinante dirigirá la síntesis de sus propias moléculas incluyendo la proteína codificada por el gen extraño del patógeno. Esta proteína será luego adecuadamente procesada, glicosilada e insertada en la membrana de la célula infectada o bien procesada y presentada al sistema inmune del hospedero, en asociación con una molécula MHC en la superficie de la misma célula.

La estrategia de virus o bacterias recombinantes ha sido utilizada con éxito para el antígeno de superficie de la hepatitis B, glicoproteína D del virus Herpes simplex, hemoaglutinina del virus influenza, glicoproteína del virus rabia, glicoproteína gp 160 y otra proteínas de HIV, virus Epstein-Barr, cytomegalovirus, parainfluenza, sarampión y virus respiratorio sincicial.

Finalmente es importante señalar que una limitación de la tecnología del DNA recombinante es que ella no es aplicable a la síntesis de antígenos hidrocarbonados o lipídicos o péptidos glicosilados en los que epítipo inductor de la respuesta inmune protectora reside en la porción hidrocarbonada de la molécula. Pero anticuerpos anti-idiotípicos que imiten o representen imágenes internas de estas estructuras epitópicas, pueden constituir una alternativa para el desarrollo de vacunas protectoras.

4. VACUNAS ANTI-IDIOTÍPICAS

Un camino alternativo para la producción de vacunas efectivas es la utilización de anticuerpos anti-idiotípicos que reconocen el sitio de combinación o paratopo, de un anticuerpo específico para un agente infeccioso.

Por definición un suero anti-idiotípico producido contra inmunoglobulinas específicas para un epítipo determinado, contendrá anticuerpos que reconocen determinantes antigénicos idiotípicos presentes en la porción variable del anticuerpo que reconoce al epítipo original (ver capítulo 13). Algunos de estos anticuerpos anti-idiotípicos poseen un sitio de combinación que se asemeja o representa al determinante antigénico original contra el cual está dirigido el idiotipo.

La inoculación de anticuerpos anti-idiotípicos que poseen tal imagen interna de un epítipo, puede inducir una respuesta inmune contra ese determinante antigénico o más ampliamente contra el antígeno o el agente infeccioso que posea tal epítipo. De esta manera un individuo puede

desarrollar una respuesta inmune contra un antígeno al cual nunca ha estado expuesto.

Los antígenos de muchos agentes infecciosos son de naturaleza hidrocarbonada o lipídica y no pueden prepararse por DNA recombinante o síntesis química, pero anticuerpos anti-idiotípicos que representen imágenes internas de tales antígenos pueden constituir excelentes vacunas, las que pueden además prepararse a través de la producción de anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos.

Existen numerosos ejemplos de infecciones experimentales en las que se ha demostrado inducción de una efectiva repuesta inmune protectora mediante la inmunización anti-idiotípica. Entre ellas podemos mencionar infecciones virales por virus Sendai, virus rabia, herpes simplex, polio hepatitis B y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) para el cual se ha preparado un anticuerpo anti-idiotípico que representa la imagen interna de CD4 y por lo tanto compite en la unión con el virus; bacterias como *Streptococcus pneumoniae*, *Lysteria monocytogenes*, *E. coli*; infecciones parasitarias como malaria, schistosomiasis, trypanosomiasis africana y leishmaniasis.

5. VACUNAS SINTÉTICAS

Un tercer camino para la preparación de vacunas distintas de las vacunas tradicionales lo constituye la utilización de péptidos sintéticos que contienen o representan la secuencia aminoacídica de epítopos protectores derivados de antígenos proteicos.

Aunque la respuesta inmune contra una proteína extraña es bastante compleja, se ha demostrado que pequeños péptidos derivados de la proteína original reaccionan con anticuerpos producidos contra la proteína completa. Además la frecuencia con la cual anticuerpos contra pequeños péptidos de menos de 20 aminoácidos reaccionan o reconocen la proteína de la cual derivan, es bastante más elevada de lo que se esperaba y algunos péptidos han sido tan efectivos como inmunógenos que muchos investigadores han centrado su interés en la síntesis de péptidos que, presentados y administrados de manera apropiada, puedan estimular una respuesta inmune protectora efectiva contra antígenos de agentes infecciosos. En la búsqueda de epítopos individuales, la atención se ha centrado en los epítopos estructurales o continuos, que están confinados a una corta secuencia



aminoacídica de la proteína y que pueden ser fácilmente sintetizados.

El atractivo de los péptidos sintéticos como vacunas parece bastante claro: ellos evitarían la necesidad de vacunas compuestas de preparados inactivos o de cepas no patógenas del agente infeccioso. Evitarían además la necesidad de una fuente de material biológico o la sangre de individuos afectados a partir de los cuales se preparan las fracciones antigénicas que sirven de base para las vacunas tradicionales. No requieren del cultivo y manipulación de organismos patógenos y evitan el complejo proceso biotecnológico implicado en la manipulación genética de virus, bacterias, levaduras o células eucariontes para la producción masiva de proteínas antigénicas recombinantes. Todo esto es reemplazado por un proceso de síntesis química de péptidos, de bastante menor costo que el de las vacunas tradicionales o de las vacunas recombinantes. Las vacunas basadas en péptidos sintéticos son uniformes, específicas y su contenido perfectamente conocido y libre de los innecesarios e indeseables componentes del huésped o del agente infeccioso.

Para sintetizar un péptido antigénico es necesario determinar la secuencia aminoacídica del epítipo reconocido por el sistema inmune del individuo. Luego debe ser administrado en la forma, dosis y ruta más apropiada para la inducción de una respuesta inmune protectora.

La identificación y aislamiento de antígenos protectores mediante las técnicas de biología molecular, permite determinar la secuencia nucleotídica de los respectivos genes y deducir la secuencia aminoacídica de las proteínas que codifican. Analizando luego la secuencia aminoacídica de una proteína, es posible predecir qué regiones o segmentos de la molécula estarán expuestos en la superficie de la proteína en solución y, por lo tanto, disponibles para interactuar o ser reconocidos por el sistema inmune del individuo.

La técnica de difracción de rayos X de proteínas, purificadas y cristalizadas, puede detectar las regiones que protruyen o sobresalen en la superficie de la molécula permitiendo predecir epítipos que estimulen linfocitos B o linfocitos T. Existen además programas computacionales que partiendo de la secuencia aminoacídica de una proteína pueden combinar la detección de estructuras beta con la hidropaticidad o anfipaticidad de las distintas regiones de la molécula (existencia de dominios hidrofílicos o hidrofóbicos) para predecir qué dominios estarán expuestos en la super-

ficie de la molécula en solución. Péptidos sintéticos pueden entonces sintetizarse para identificar epítipos protectores los que serán acoplados más tarde a un carrier adecuado para generar un preparado antigénico eventualmente seguro y eficaz como vacuna sintética.

Por otro lado, conociendo la secuencia aminoacídica de una proteína es posible establecer o confeccionar una biblioteca peptídica constituida por todos los pequeños péptidos de secuencia aminoacídica superpuesta que puedan sintetizarse cubriendo toda la secuencia desde el extremo amino al extremo carboxilo de la molécula. Así, si la biblioteca se construye en base a péptidos de 10 aminoácidos, el primer péptido incluirá desde el aminoácido 1 al 10, el segundo incluirá los aminoácidos 2 al 11, el tercero irá del aminoácido 3 al aminoácido 12 y así sucesivamente hasta el último residuo en el extremo carboxilo de la proteína. Los distintos péptidos se prueban luego para determinar su habilidad para ser reconocidos por la respuesta inmune protectora contra la proteína original y para inducirla bajo condiciones adecuadas. De esta manera se logra identificar los péptidos sintéticos que contienen o imitan (mimotopos) la estructura de epítipos antigénicos y que pueden por lo tanto utilizarse como base para el desarrollo de una vacuna sintética.

Diferentes modelos experimentales han mostrado que péptidos sintéticos pueden inducir inmunidad protectora contra diversos agentes infecciosos: tetradecapéptido 188-201 de toxina diftérica, péptido 135-155 de antígeno de superficie de hepatitis B; péptido 91-108 de hemaglutinina del virus influenza, péptido 134-160 de proteína VP1 del virus aftosa y diversos péptidos de toxina del cólera, glicoproteína D del virus herpes, proteína M de *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, pilina de *E. coli*, pilina de *Neisseria gonorrhoeae*, proteína circumsporozoítica de *Plasmodium falciparum* y otros plasmodios de la malaria, etc. En la mayoría de los casos los péptidos han sido administrados con un adyuvante y covalentemente acoplados a un carrier proteico para hacerlos inmunogénicos. La elección de un adyuvante y de un carrier apropiado es por lo tanto de primera importancia para el desarrollo de vacunas sintéticas de uso humano.

Finalmente debe señalarse que un aspecto importante a considerar en el desarrollo de vacunas sintéticas es la calidad e intensidad de la respuesta inmune protectora y la inducción o no de me-



moria inmunológica por un tiempo prolongado, en comparación con la respuesta inmune inducida por la proteína original o por el agente infeccioso completo. La inducción de una respuesta inmune requiere de un cierto grado de complejidad antigénica para estimular las necesarias interacciones celulares entre macrófagos, células presentadoras de antígeno, linfocitos T y linfocitos B que conducen al desarrollo de una efectiva respuesta protectora. La omisión de cualquiera de estos epítomos funcionales limitará la eficacia de una vacuna sintética.

Como es difícil estabilizar una estructura peptídica en el caso de un péptido que representa un epítipo B de tipo conformacional, se han empleado estrategias alternativas para preservar la estructura antigénica de una secuencia peptídica. En general, se han usado regiones "beta-loops" de varias proteínas andamio donde se ha expresado el péptido de interés. Así, se han utilizado entre otras, las regiones hipervariables de inmunoglobulinas, regiones "beta-loops" de proteína de superficie de virus filamentosos de *E. coli*, de la proteína gp120 del virus VIH y la proteína sérica humana transferrina.

El desarrollo de una eventual vacuna sintética contra un agente infeccioso no es entonces una tarea fácil. Requiere un conocimiento de la secuencia aminoacídica de la proteína protectora, requiere la identificación de epítomos T y epítomos B y muchas veces los epítomos B son epítomos conformacionales que no son fácilmente imitados por péptidos sintéticos. Los péptidos, por lo general, no inducen síntesis de anticuerpos y deben conjugarse a un carrier que contenga epítomos T y administrarse junto a un adyuvante para hacerlos inmunogénicos. Surge entonces el problema de seleccionar carriers y adyuvantes apropiados para uso humano. La toxina tetánica por ejemplo, ha sido usada para vacunación humana por muchos años sin efectos colaterales adversos y ha funcionado muy bien como adyuvante en modelos experimentales con diversos animales, pero su utilización como adyuvante en humanos induce la activación de linfocitos T supresores que inhiben la respuesta inmune contra el péptido (supresión epitópica). Este fenómeno de "supresión epitópica" es similar pero opuesto, al "efecto carrier" descrito para los conjugados carrier hapteno. En el efecto carrier, la respuesta secundaria de anticuerpos contra un hapteno específico requiere la inoculación de un complejo carrier-hapteno formado con el mismo carrier utilizado en la inmunización pri-

maria; la respuesta requiere entonces sensibilización previa con el carrier, para la activación de linfocitos T helper carrier específicos. En el fenómeno de supresión epitópica, en cambio, la sensibilización previa con el carrier, estimula la activación de linfocitos T supresores carrier específicos que inhiben la respuesta contra el péptido (hapteno) en el encuentro secundario con el mismo carrier.

6. VACUNAS DE DNA

Al inicio de la década de los 90, evidencias experimentales demostraron que inoculaciones directas *in vivo* de genes incluidos en vectores de expresión eucarióticos en animales de laboratorio pueden facilitar una fuerte respuesta inmune contra los antígeno expresados. Este método se ha denominado "Inmunización Genética" o "Vacunas de DNA" y ha sido utilizado para promover una efectiva respuesta inmunoprotectora de tipo humoral y celular en una amplia variedad de modelos animales pre-clínicos para enfermedades infecciosas, alergia, cáncer y cuadros autoinmunes.

La vacunación de DNA es particularmente efectiva para la inducción de células T citotóxicas. Recientemente, se ha reportado la primera vacuna en un ensayo clínico contra linfoma y malaria y existen resultados preliminares en ensayos clínicos humanos en infección por VIH, lo que ha confirmado el valor e interés por esta estrategia de inmunización en el modelo humano. Efectivamente, la vacuna de DNA es el método más cercano para imitar la inmunidad natural y puede ser utilizado como una estrategia para programar el sistema inmune a responder contra una gran variedad de antígenos, e inducir de esta manera protección contra diversas enfermedades.

Las vacunas de DNA consisten en un plasmidio bacteriano que contiene un promotor viral fuerte como Cytomegalovirus (CMV), Rous Sarcoma Virus (RSV), Simian Virus 40 (SV40), el gen de interés, una secuencia de terminación transcripcional y de polyadenylation, y finalmente un Intron. El plasmidio es cultivado en *E. coli*, purificado y posteriormente inyectado en el huésped usando una solución salina o con la ayuda de un adyuvante. El plasmidio inyectado es adsorbido por las células del hospedero y producirán luego la proteína codificada por el DNA incluido en el vector. La expresión de plasmidios usados para



la Inmunización Genética no es replicada en el huésped mamífero y no se integra al DNA cromosomal del individuo, aunque recientemente se han reportado dos casos de integración cromosomal del gen inyectado.

El éxito logrado en la inmunización intramuscular de animales de experimentación con vacunas que contienen DNA, ha proporcionado un sorprendente y revolucionario método para la generación de anticuerpos y la activación de linfocitos T citotóxicos específicos contra la proteína codificada por ese DNA. La eficacia de estas vacunas génicas parece depender de la eficiencia de la transfección (o incorporación y expresión del DNA) y la eficiencia con que las células transfectadas presentan al sistema inmune las proteínas codificadas por el DNA.

La eficacia de la inmunización con DNA, fue inicialmente demostrada usando la inoculación intramuscular de ratones con un plasmidio de DNA que codifica la hemoaglutinina (HA), una glicoproteína de superficie del virus influenza A. El experimento demostró la posibilidad de generar altos niveles de anticuerpos anti-HA que protegen a los ratones inmunizados, en experimentos de desafío con cepas homólogas del virus de la influenza.

Este modelo de vacunación en animales, ha sido usado también ocupando el gen que codifica una proteína interna conservada (la nucleoproteína) del virus influenza A. Los animales así inmunizados desarrollaron tanto anticuerpos nucleoproteína-específicos, como una respuesta celular de tipo citotóxico. La inyección intramuscular de 100 microgramos de plásmido, que contiene el DNA codificante de la nucleoproteína del virus influenza, induce en ratones la expresión citosólica de la proteína y un adecuado procesamiento y presentación al sistema inmune, de fragmentos peptídicos asociados con moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad. Se genera así una buena respuesta inmune contra la proteína, pero ésta es aún mayor si la vacuna génica se co-inyecta con, o contiene plásmidos que codifican citoquinas como GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos). El método ha sido utilizado también con éxito para la generación de una eficiente respuesta inmune contra la glicoproteína del virus rabia y contra *Mycobacterium tuberculosis*.

Las ventajas de las vacunas génicas sobre otros tipos de vacunas son múltiples: pueden ge-

nerar una respuesta inmune sin necesidad de un vector vivo autorreplicante. La expresión del gen extraño, por las células del hospedero, puede conducir a la síntesis de una proteína mucho más cercana a la proteína original del agente infeccioso y puede ser más adecuadamente procesada y presentada al sistema inmune. Las vacunas de DNA tendrían además, un menor costo de producción que cualquier otro tipo de vacunas y podrían ser convertidas en un "pellet" seco, estable a temperatura ambiente, de fácil almacenamiento y transporte y, de fácil reconstitución ya que sólo requeriría de agua antes de su administración.

Sin embargo, es importante señalar que el uso de vacunas de DNA conlleva también una serie de riesgos como las eventuales consecuencias a largo plazo, de la existencia de un plásmido u otro vector de clonamiento en las células del hospedero y la expresión constitutiva de un gen extraño en las células de los individuos inmunizados. El DNA del vector puede además incorporarse en el genoma del hospedero con el consiguiente riesgo de transformación celular por integración de un oncogen, activación de un proto-oncogen o inactivación de un gen supresor de oncogenes.

En respuesta a esta preocupación, se han establecido desde la mitad de los años 90, una serie de normas y reglamentaciones que regulan el uso de las vacunas de DNA. Diversas normas han sido establecidas por agencias Norteamericanas y Europeas basadas en las experiencias obtenidas a partir de estudios preclínicos y clínicos. Entre los varios requerimientos de seguridad se incluyen conocimiento sobre la distribución en tejidos, la persistencia en el organismo y la eventual integración en el genoma del hospedero, del DNA inoculado.

En conclusión, la Inmunización Genética, ciertamente, ofrece potenciales soluciones a algunos de los desafíos asociados al desarrollo de vacunas: brinda una amplia protección contra diferentes cepas virales debido a la respuesta T citotóxica mediada por linfocitos T que reconocen epítomos de proteínas conservadas e inducen una respuesta inmune duradera. La respuesta de células T helper facilita la combinación de diferentes inmunógenos y adyuvantes moleculares en una preparación única, induciendo una fuerte e inmunomodulada respuesta inmune con la opción de inmunización simultánea para varias enfermedades.



7. VACUNAS GENÓMICAS

Un nuevo método para el desarrollo de vacunas, llamado “Inmunización Genómica” o “Expression Library Immunization” (ELI), hace uso de técnicas de Inmunización con DNA partiendo de la suposición o del conocimiento que la colección completa de antígenos de un patógeno, debe estar necesariamente codificada en su genoma. Utilizando entonces como inmunógeno genético, toda la “Genoteca de Expresión” del DNA de un agente patógeno (o toda la colección génica o genómica de cualquier patógeno) pueden obtenerse resultados efectivos de presentación antigénica y de protección inmunológica en forma de una “vacuna viva sin riesgo”. La evidencia experimental en modelo murino ha demostrado que aún una “Genoteca de Expresión” parcial hecha a partir del DNA de *Mycoplasma pulmonis*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium chabaudi* son capaces de proporcionar protección contra la agresión por el agente patógeno.

El reciente desarrollo de la Inmunización Genómica se ha perfeccionado en base a la disponibilidad de la información de las secuencias genómicas de varios patógenos. Esta tecnología está basada en las sorprendentes evidencias recién encontradas que fragmentos amplificados por PCR, pueden ser hechos transcripcionalmente activos simplemente cruzándolos con secuencias activas de tipo promotor y terminador. Cuando se mezclan secuencias codificante, promotora y terminadora se cruzaron por hibridación espontáneamente para formar "Elementos de Expresión Linear" (LEE). Además, cuando estas LEE fueron transfectadas en cultivo celular o inyectadas en animales se obtuvo un considerable nivel de expresión de la secuencia codificada. Significativamente, cuando genes/antígenos del genoma del patógeno humano, *Mycobacterium tuberculosis*, fueron utilizados como secuencias codificadas y las secuencias LEE transcripcionalmente activas fueron administradas por Inmunización del DNA intradérmica por “gene gun” o inyectadas intramuscularmente, los animales inyectados desarrollaron anticuerpos contra el antígeno de la tuberculosis.

Estas dos nuevas tecnologías, cuando propiamente asociadas a un método de “screening”, pueden proporcionar una solución al difícil problema de descubrir qué gen del patógeno incluir en el vector genético de inmunización especialmente

con patógenos con genomas mayores tales como las bacterias y parásitos. “Expression Library Immunization” usado con genotecas de expresión de cDNA e Inmunización Genética pueden básicamente identificar los genes protectores dentro de un genoma ofreciendo un sistema imparcial para descubrir candidatas para vacunas en varios modelos de enfermedad.

8. ADYUVANTES, INMUNOMODULADORES E INMUNOGENICIDAD

Los adyuvantes, a diferencia de los carriers proteicos son sustancias que no forman enlaces covalentes con los antígenos con que administran y están destinados a aumentar la inmunogenicidad de moléculas como proteínas, péptidos e hidratos de carbono, que son muy poco inmunogénicas.

La asociación de proteínas con adyuvantes tradicionales como hidróxido de aluminio (alúmina) o su emulsión con adyuvantes que contienen aceites minerales y productos bacterianos (tabla 36-4), permiten convertir moléculas solubles en un complejo particulado que será más fácilmente ingerido por fagocitos profesionales y adecuadamente procesado y presentado para la inducción de una respuesta efectiva. En general los diversos adyuvantes retardan la liberación de los antígenos en el sitio de inculación, facilitan su ingestión por macrófagos y otros fagocitos profesionales e inducen la activación de los mismos, lo que favorece el procesamiento y presentación de antígenos en asociación con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad.

Los complejos inmunoestimuladores (ISCOM= “immune stimulating complex”) son glicósidos que pueden formar complejos multiméricos con diversos antígenos y pueden atravesar las membranas celulares, como hacen los liposomas. Esto permite el ingreso de antígenos al citoplasma celular facilitando su adecuado procesamiento y presentación.

Por último es importante señalar que citoquinas como interleuquina- 12 (IL-12), que estimula la inducción de una respuesta celular Th1 dependiente e inhibe el desarrollo de una respuesta Th2, pueden constituirse en coadyuvantes o inmunomoduladores importantes para el desarrollo de vacunas efectivas contra una enfermedad infecciosa.

El rol adyuvante de ciertas secuencias



inmunoestimuladoras (ISSs) de DNA bacterianos, ha sido recientemente propuesto en función de sus habilidades estimuladoras de respuesta T helper-1 (Th1) en animales vacunados con genes o proteínas. Se trata de motivos de secuencia que contienen dinucleótidos demetilado CpG y que comúnmente se encuentran en DNA bacteriano. Regiones no codificantes de plásmido de DNA enriquecido en ISS o ISS oligonucleótidos (ISS-ODNs), estimulan una potente respuesta inmune al ser coadministrado con antígenos. Estas secuencias ISS activan directamente macrófagos, células NK y linfocitos, induciendo síntesis y secreción de citoquinas, quimioquinas e inmunoglobulinas como parte de la respuesta inmune innata inducida por interacción de las secuencias CpG con receptores específicos de la familia de receptores “Toll-like”, en la superficie de estas células. Se ha demostrado que ISS-DNAs juegan un papel

supresor en la síntesis de IgE, pero promueven la síntesis de IgG2a y la producción de IFN- γ . Adicionalmente, la secuencia ISS promueve la secreción de un particular patrón de citoquinas, como IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IL-12 e IL-18, que favorecen la respuesta humoral TH1 y la inmunidad celular. La adición de la secuencia ISS como adyuvante molecular o como subunidad en vacunas con virus inactivados, puede conducir a la generación de una respuesta inmune efectiva a las infecciones virales, tanto en la inmunización con DNA como en la inmunización con antígeno proteico tradicional.

El desarrollo entonces de adyuvantes e inmunomoduladores apropiados es una necesidad evidente para la administración de vacunas en una forma inmunogénicamente adecuada para la inducción de una respuesta inmune protectora efectiva un agente infeccioso.

Tabla 36-4. Adyuvantes que aumentan la inmunogenicidad de diversos antígenos e inducen una respuesta inmune efectiva

Adyuvante	Composición	Mecanismo de acción
Adyuvante Incompleto de Freund	Emulsión de aceite mineral y agua	Retarda la liberación de antígenos y facilita su ingestión por fagocitos
Adyuvante Completo de Freund's	Emulsión de aceite mineral, agua y mycobacterias muertas	Retarda liberación de Ag. facilita su ingestión y activa macrófagos
Adyuvante de Freund's con péptidoglicano muramil dipéptido (MDP= N-acetyl-muramyl L-alanil.D isoglutamine)	Emulsión de aceite mineral, agua y MDP de mycobacterias	Retarda liberación de Ag. facilita su ingestión activa macrófagos
Alúmina o Hidróxido de Aluminio	Gel de hidróxido de aluminio	Retarda liberación de Ag. facilita su ingestión y activa macrófagos
Polinucleótidos de doble hélice	Poli-inosina y ácido policitídílico (poli-IC) o ácido poliadenílico-poliuridílico (poli-AU)	Activación de linfocitos T antígeno específicos y activación de macrófagos
Complejos Inmunoestimulantes (ISCOMs)	Matriz de Quail A, componente activo de la saponina	Entrega antígenos en el citosol y activa linfocitos T citotóxicos



LECTURAS SUGERIDAS

Ada, Gordon L. "Vaccines" in **Fundamental Immunology**, Edited by William Paul, Third Edition, Raven Press Limited, New York, 1993, pp. 1309-1352,.

Aggarwal, A. et al., "Oral salmonella: Malaria circumsporozoite recombinants induce specific CD8⁺ cytotoxic T cells". *J. Exptl. Med.*, 172: 1083.1090, 1990.

Audibert, F.M.. and Lise, L.D., "Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects", *Immunol. Today*, 14: 281-284, 1993.

Barry, M.A., Lai, W.C. and Johnston, S.A., "Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization", *Nature* 377:632, 1995.

Brown, F., "The potential of peptides as vaccines", *Semin. Virol.* 1: 67-74, 1990.

Brown, F., Schild, G.C. and Ada, G.L., "Recombinant vaccinia viruses as vaccines", *Nature* 319: 549-552, 1986.

Cease, K.B. and Berzofsky, J.A.. "Toward a vaccine for AIDS: The emergence of Immunobiology-Based vaccine development", *Annu. Rev. Immunol.* 12: 923-989, 1994.

Darji, A.; Guzman, C.A.; Gerstel, B.; Wachholz, P.; Timmis, K.N.; Wehland, J.; Chakraborty, T.; and Weiss, S., "Oral somatic transgene vaccination using attenuated typhimurium", *Cell* 91:765, 1997.

Dietrich, G.; Bubert, A.; Gentschev, I.; Sokolovic, Z.; Simm, A.; Catic, A.; Kaufmann, S.H.; Hess, J.; Szalay, A.A.; and Goebel, W., "Delivery of antigen- encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes* [see comments]", *Nat Biotechnol* 16:181, 1998.

Fynan, E.F. et al., "DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations", *Proc. Nat. Acad.Sci. USA.* 90: 11478-11482, 1993.

Gerloni, M.; Billetta, R.; Xiong, S. and Zanetti, M., "Somatic transgene immunization with DNA encoding an immunoglobulin heavy chain", *DNA Cell Biol* 16:611, 1997.

Hemmi, H.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Kaisho, T.; Sato, S.; Sanjo, H.; Matsumoto, M.; Hoshino, K.; Wagner, H.; Takeda, K. and Akira, S., "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA", *Nature* 408:740, 2000.

Milich, D.R., "Synthetic T and B cell recognition sites: Implications for vaccine development", *Adv. Immunol.* 45: 195-282, 1987.

Nussenzweig, V., and Nussenzweig, R.S., "Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine". *Adv. Immunol.* 45: 283-305, 1989.

Nussenzweig, R.S. and Long, C.A., "Malaria vaccines: multiple targets", *Science* 265: 1381-1383, 1994.

Piedrafita, D.; Xu, D.; Hunter, D.; Harrison, R.A.; and Liew, F.Y., "Protective immune responses induced by vaccination with an expression genomic library of *Leishmania major*", *J Immunol* 163:1467, 1999.

Roman, M.E.; Martin-Orozco, J.S.; Goodman, M.D.; Nguyen, Y.; Sato, A.; Ronaghy, R.S.; Kornbluth, D.; Richman, D.; Carson, D.A., and Raz, E., "Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants", *Nat Med* 3:849, 1997.

Smith, H.A. and Klinman, D.M., The regulation of DNA vaccines, *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 299-303, 2001.

Smooker, P.M.; Steeper, K.R.; Drew, D.R.; Strugnell, R.A.; and Spithill, T.W., "Humoral responses in mice following vaccination with DNA encoding glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*: effects of mode of vaccination and the cellular compartment of antigen expression", *Parasite Immunol* 21:357, 1999.

Staats, H.F. et al., "Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development", *Curr. Opin. Immunol.* 6: 572-583, 1994.



Stover, C.K., "Recombinant vaccine delivery systems and encoded vaccines", *Curr. Opin. Immunol.* 6: 568-571, 1994.

Sykes, K.F., and Johnston, S. A., "Linear expression elements: a rapid, in vivo, method to screen for gene functions [see comments]", *Nat Biotechnol* 17:355, 1999.

Tang, D.C., De Vit, M. and Johnston, S.A., "Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response", *Nature* 356:152, 1992.

Tanner, M., Teuscher, T. and Alonso, P.L., "The first malaria vaccine", *Parasitol. Today* 11: 10-13, 1995.

Ulmer, J.B., "Hetrologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein", *Science* 259: 1745-1749, 1993.

Vergara, U. et al., "Multiple non-repeated epitopes on the circumsporozoite protein of *Plasmodium knowlesi*", *Mol. Biochem. Parasitol.* 14: 283-292, 1985.

Vergara, U. et al., "Conserved group-specific epitopes of the circumsporozoite proteins revealed by antibodies to synthetic peptides", *J. Immunol* 134: 3445-3448, 1985.

Vergara, U. and Tam, J., "A novel design of peptide Immunogens: Synthetic peptide with a reversible handle for attachment to protein carriers", *Peptide Research* 2: 134-139, 1989.

Waine, G.J. and McManus, D.P., "Nuclei acids: Vaccines of the future", *Parasitol Today* 11: 113-116, 1995.

Williams, R. S.; Johnston, S.A.; Riedy, M.; De Vit, M.J.; McElligott, S.G. and Sanford, J.C., "Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles", *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2726, 1991.

Xiang, Z. and Ertl, H.C.J., "Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by co-inoculation with plasmids expressing cytokines", *Immunity* 2: 129-138, 1995.





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 37

MECANISMOS DE INMUNIDAD ANTITUMORAL

Flavio Salazar O. y Javier Puente P.

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">1. Introducción2. Defensa inmunológica contra el cáncer<ul style="list-style-type: none">2.1. La hipótesis de vigilancia inmunológica antitumoral2.2. Componentes de la respuesta inmune antitumoral<ul style="list-style-type: none">2.2.1. Respuesta inmunológica humoral2.2.2. Respuesta inmunológica celular3. Antígenos asociados a tumores<ul style="list-style-type: none">3.1. Clasificación de AAT reconocidos por LT | <ul style="list-style-type: none">4. Estrategias tumorales de evasión inmunológica<ul style="list-style-type: none">4.1. Disminución de la expansión de las moléculas MHC4.2. Factores inmunosupresores producidos por los tumores5. Terapia inmunológica contra el cáncer<ul style="list-style-type: none">5.1. Anticuerpos monoclonales5.2. Terapia biológica contra el cáncer<ul style="list-style-type: none">5.2.1. Utilización de citoquinas5.2.2. Terapia celular adoptiva5.3. Inmunización activa contra tumores |
|---|---|





RESUMEN

Una de las funciones asignadas al sistema inmune es la inmuno-vigilancia, propiedad que le permitiría controlar el desarrollo de células tumorales. Sin embargo, la gran mayoría de las células tumorales son débilmente inmunogénicas, hecho sumado a que individuos inmunosuprimidos, ya sea por tratamiento farmacológico o por inmunodeficiencias genéticas no presentan una mayor incidencia de tumores. Las células tumorales presentan además diversas estrategias de evasión de la respuesta inmunológica; disminución de la expresión de las MHC y la producción de moléculas inmunosupresoras. La especificidad de los LT, especialmente los LT CD8+, ha permitido ir conociendo un gran conjunto de antígenos asociados a tumores (AAT), muchos de los cuales corresponden a proteínas normalmente expresadas y una muy pequeña fracción a antígenos tumorales propiamente tales. Además, en algunos casos, han podido utilizarse anticuerpos monoclonales que reconozcan a antígenos tumorales en diagnóstico y terapia.

La inmunoterapia antitumoral (terapia celular adoptiva) ha emergido de forma tal de estimular los mecanismos defensivos del individuo y se basan en la estimulación *in vitro* de LT específicos (células TIL) o de células NK (células LAK) del paciente las que una vez activadas son readministradas al paciente. En este mismo sentido se han utilizado citoquinas estimuladoras de la respuesta inmunológica como tratamiento en forma individual y en conjunto con la terapia celular adoptiva. Entre las estrategias más recientes se encuentra la utilización de células tumorales modificadas genéticamente, péptidos antigénicos tumorales y DNA que exprese a los péptidos antigénicos y a moléculas co-activadoras. Todos estos casos son representativos de la denominada vacuna contra el cáncer, vacuna de características terapéuticas diseñada para estimular la respuesta inmunológica del paciente. Este conocimiento también ha permitido utilizar células dendríticas a las que se les incorpora *in vitro* el péptido antigénico, y se le inserta el gen de moléculas co-activadoras transformándolas en células presentadoras de antígenos tumorales y de las señales coactivadoras necesarias para una interacción eficiente con los LT específicos.

1. INTRODUCCIÓN

Las **neoplasias** son tejidos formados por células que debido a mutaciones en su material genético, ven alterada la regulación de su ciclo celular y comienzan a proliferar descontroladamente. La acumulación de células neoplásicas asociadas a células infiltradas del sistema inmune forman los tumores. Las células tumorales a su vez, adquieren mediante un proceso de acumulación de mutaciones, la capacidad de invadir otros tejidos distantes formando las denominadas **metástasis**. Las neoplasias con capacidad de producir metástasis constituyen los **tumores malignos** y producen un grupo de enfermedades llamadas **cáncer**.

Existen ciertos factores que permiten a algunas células liberarse paulatinamente de las condiciones que regulan la división celular. Sustancias

químicas, como las producidas por el humo del tabaco, la irradiación de rayos ultravioleta, algunas infecciones virales y mutaciones genéticas heredadas son algunos de estos factores. Junto con la proliferación celular descontrolada, estos cambios genéticos dan origen a cambios en la expresión de proteínas en la célula maligna, lo que se manifiesta en la sobre-expresión de algunos genes o en la activación de genes que generalmente no se expresan en ciertos tejidos normales. Estos genes dan lugar a proteínas que pueden ser reconocidas como aberrantes por el sistema inmune y propiciar una respuesta antitumoral.

Aunque esta respuesta inmunológica puede ser humoral, a través de anticuerpos que reconocen proteínas expresadas en la membrana de las células tumorales, experimentos realizados en animales y estudios recientes en humanos demuestran que el papel principal en la reacción inmune



antitumoral está dado por la respuesta celular, principalmente los linfocitos T (LT), los que reconocen antígenos procesados y presentados en asociación con las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC).

La paradoja existente entre la existencia de células antitumorales en los pacientes con cáncer y la progresión sistemática de la enfermedad, sugieren la existencia de mecanismos mediados por el tumor para evadir la respuesta del sistema inmune.

Una de las mayores preocupaciones de la medicina a lo largo del tiempo, lo representa el conocimiento del cáncer, hecho que se ha transformado en una verdadera lucha contra esta enfermedad. Entre las numerosas alternativas de tratamiento del cáncer, están obviamente las más convencionales: la erradicación del tumor mediante cirugía, procedimiento que sigue siendo una de las mejores alternativas; la quimioterapia y radioterapia, las que en su conjunto apuntan hacia la destrucción de las células tumorales, aprovechando especialmente la propiedad de activa división de estas células. Considerando el papel propuesto para el sistema inmune, de reconocimiento de los antígenos tumorales y la eliminación de las células que los presentan, ha emergido la **inmunoterapia del cáncer**. Esta se basa en la posibilidad de uso de anticuerpos monoclonales contra antígenos tumorales específicos, los que también van con el objetivo de la destrucción del tumor, y en la denominada **terapia biológica** contra el cáncer, que utiliza principios diferentes a los anteriormente mencionados en la acción antitumoral. La terapia biológica contra el cáncer, no va dirigida a destruir por sí misma al tumor, sino que a provocar la activación de los propios mecanismos inmunológicos del paciente para que puedan actuar efectivamente contra el tumor.

En este capítulo se revisarán los mecanismos efectores de inmunidad antitumoral, las características de los antígenos tumorales, las estrategias de evasión utilizada por los tumores y los métodos inmunoterapéuticos para tratar el cáncer.

2. DEFENSA INMUNOLÓGICA CONTRA EL CÁNCER

2.1. La hipótesis de vigilancia inmunológica antitumoral

La inmunología antitumoral está basada en la premisa de que existen antígenos tumorales que

pueden ser reconocidos por el sistema inmune y pueden generar una respuesta contra las células neoplásicas. Experimentos realizados en ratones singénicos, en la década del 40, demostraron que tumores inducidos químicamente y luego extirpados conferían resistencia contra un desafío con el mismo tumor en otro ratón de la misma cepa. Esta resistencia estaba principalmente mediada por los linfocitos, ya que al ser estos trasplantados desde un animal resistente a uno no resistente transmitían la inmunidad.

Estas y otras observaciones posteriores llevaron al científico australiano Sir Frank Macfarlane Burnet (1899-1985) a elaborar, en 1970, la hipótesis de **vigilancia inmunológica antitumoral**. En ella se postula que una de las principales funciones del sistema inmune sería la de reconocer a las células neoplásicas y eliminarlas antes de que formen tumores. Esta afirmación implica que, en ausencia del sistema inmune, la incidencia de tumores sería enormemente mayor. Sin embargo, observaciones realizadas en ratones inmunosuprimidos por alteraciones genéticas o por manipulación experimental, no concuerdan plenamente con esta hipótesis ya que la incidencia de tumores en éstos no se ve, significativamente, alterada. En humanos, excepto por algunos tumores del sistema linforreticular, como el linfoma asociado a Epstein Barr virus, con una incidencia aumentada en pacientes postrasplantados y por lo tanto inmunosuprimidos, o el **Sarcoma de Kaposi** frecuente en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, no existen evidencias de un aumento significativo de la incidencia de tumores por inmunosupresión que avalen la hipótesis. De todas formas, los avances en la comprensión celular y molecular de los procesos de presentación y reconocimiento de antígenos asociados a las moléculas MHC y la manipulación terapéutica del sistema inmune en la lucha contra el cáncer, le ha conferido nuevamente validez al concepto de escape de la inmunovigilancia antitumoral pero ahora con relación a la inmunoterapia.

2.2. Componentes de la respuesta inmune antitumoral

El sistema inmune consiste en una serie de estrategias complejas desarrolladas durante la evolución para combatir la invasión de microorganismos y para detectar, eliminando, células anómalas propias que puedan poner en peligro la supervivencia del organismo. Ambos bra-



zos del sistema inmune, el de la inmunidad innata y el del sistema inmune adquirido participan en la defensa inmunológica antitumoral. El primero tiene uno de sus principales exponentes en las células NK (ver capítulos 10 y 19). Las células NK han sido identificadas por su capacidad de reconocer espontáneamente ciertas líneas celulares tumorales *in vitro*, células infectadas por virus y células alogénicas. Estudios realizados, *in vivo* e *in vitro*, han establecido la capacidad de las células NK de reconocer células tumorales deficientes en la expresión de moléculas MHC clase I. Tumores deficientes en moléculas MHC clase I son más eficientemente eliminados por ratones no inmunizados, efecto que desaparece totalmente con la neutralización de las células NK. Sin embargo, el papel fisiológico de las células NK en la respuesta inmunológica antitumoral no está lo suficiente bien clarificado, aunque existen indicios que permiten deducir una función relacionada con el control de las metástasis.

2.2.1. Respuesta inmunológica humoral

Durante varios años la atención de los inmunólogos del cáncer estuvo enfocada al brazo humoral de la respuesta antitumoral. Se partía de la hipótesis de que existirían proteínas de membrana específicas de los tumores o sobreexpresadas en éstos, que permitirían una discriminación entre la neoplasia y el tejido normal. Si bien varias proteínas han sido identificadas como **antígenos asociados al tumor (AAT)**, con presencia de anticuerpos específicos en el suero de los pacientes con cáncer, estos anticuerpos tienen una importancia menor en los mecanismos de rechazo de los tumores y más bien adquieren relevancia con relación al diagnóstico y a terapias inmunológicas. Debido a que muchos antígenos tumorales no son necesariamente inmunogénicos en el hospedero del tumor, su identificación se ha realizado con anticuerpos xenogénicos, o sea a través de la inmunización de otras especies con el tumor. Desde el punto de vista práctico, son más bien **marcadores tumorales** aunque, a veces, se encuentran en pequeñas cantidades en células normales o en tumores benignos. Ejemplos de estos antígenos son la **α -fetoproteína (α -FP)**, el **Antígeno Carcinoembrionario (CEA)** y el **Antígeno asociado a la Próstata (PSA)**.

2.2.2. Respuesta inmunológica celular

Sin duda, la actividad inmunológica antitumoral más importante está dada por la respuesta celular. Durante las últimas tres décadas se ha experimentado un enorme avance en la comprensión del funcionamiento del sistema inmune especialmente con relación al reconocimiento antigénico. Esta acumulación de conocimientos, sumados al gran impulso de técnicas de biología molecular que facilitan el clonamiento de genes y la producción de proteínas recombinantes, han permitido la identificación de antígenos asociados a tumores y su posterior caracterización.

Experimentos pioneros demostraron que el crecimiento de tumores singénicos podía ser prevenido en ratones inmunizados con el mismo tumor irradiado para evitar su proliferación. Guiados por estudios en modelos animales, los linfocitos T humanos han mostrado ser capaces de lisis específicamente tumores autólogos *in vitro*. Las células T son también capaces de secretar citoquinas como IL-2, IFN- γ , GM-CSF y TNF- α , y proliferar en respuesta a la estimulación con células tumorales autólogas. Las células T antitumorales pueden ser expandidas *in vitro* y transferidas adoptivamente para tratar incluso grandes cargas tumorales en ratones y humanos. En conjunto, estos resultados proveen evidencias innegables de que una respuesta mediada por linfocitos T puede ocurrir contra los tumores autólogos.

Las **células presentadoras de antígenos (CPA)** juegan un papel fundamental en la generación de una respuesta antitumoral mediada por linfocitos T. Estas células especializadas, entre las que se incluyen **los macrófagos, los linfocitos B y las células dendríticas (DC)**, poseen la capacidad de capturar antígenos tumorales y presentarlos asociados a las moléculas MHC. Además expresan gran cantidad de moléculas coestimuladoras, las que proveen señales cruciales que garantizan la efectividad de la respuesta mediada por linfocitos T. Destacan en este aspecto las DC, también llamadas **CPA profesionales**, ya que se encuentran estratégicamente localizadas en los sitios de concentración antigénica, internalizan, procesan y presentan eficientemente antígenos solubles en el contexto de MHC clase I y II, siendo las más eficientes en la inducción de una respuesta primaria de LT.



3. ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMORES

Los linfocitos T citotóxicos (LTc) CD8+ tienen la capacidad de reconocer tumores a través de fragmentos peptídicos de 8-10 aminoácidos derivados de proteínas citoplasmáticas o nucleares que estén asociados al MHC clase I. Los LTc melanoma-específicos, transferidos adoptivamente o activados *in vivo* por epítomos de antígenos asociados a melanoma, poseen capacidad terapéutica, pudiendo inducir la regresión de tumores y sus micrometástasis. Durante los últimos años varios antígenos melanoma-asociados reconocidos por LTc han sido identificados y sus epítomos peptídicos caracterizados utilizando métodos genéticos y bioquímicos.

3.1. Clasificación de AAT reconocidos por LT

Los AAT reconocidos por linfocitos T pueden ser agrupados de acuerdo al origen de las proteínas de las cuales derivan, de los niveles de su expresión y de su distribución en distintos tejidos. El primer grupo está conformado por los llamados **Antígenos tumor-específicos**. Los genes de estos antígenos codifican proteínas de origen embrionario, silentes en células adultas y solamente expresados en el tejido tumoral. El científico belga Thierry Boon y colaboradores han definido varios antígenos de este tipo tales como MAGE-1, MAGE-3, BAGE y GAGE entre otros. Células tumorales que expresan estos antígenos han sido encontradas en tumores de distinto origen (tabla 37-1). Entre los llamados **Antígenos de diferenciación tisular o tejido-específicos** se agrupan la mayoría de los antígenos reconocidos por los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) de pacientes con cáncer. Estas proteínas se expresan no sólo en el tumor sino que también en los tejidos normales de los cuales éstos derivan. También pueden ser encontrados en otros tejidos normales aunque en niveles de expresión mucho menores. En melanoma, uno de los tumores más caracterizados, existen varias proteínas asociadas a la síntesis y control de la melanina como MART-1/Melan-A; gp100, tirosinasa y MC1R que son AAT. Un tercer grupo lo conforman los **Antígenos derivados de Oncogenes y Proto-Oncogenes**. P53, p-Ras, y HER2/neu son genes que codifican proteínas relacionadas directamente con el control del ciclo celular. Ha sido demostrado que muchos tumores poseen mutaciones en estos genes o bien éstos se encuentran sobreexpresados en las células

las cancerígenas.

Péptidos derivados de estas proteínas, normales o mutadas, pueden ser reconocidos por LT. Existe una clara relación entre algunos tipos de cáncer e infecciones virales. El virus papiloma humano (HPV) ha sido asociado a ciertos tumores cervicales y el virus Epstein Barr (EBV) a algunos linfomas tipo B. Las células tumorales infectadas con estos virus presentarían **antígenos virales** en el contexto de moléculas MHC, los que serían reconocidos por las células LT.

A la luz de las investigaciones llevadas hasta ahora resulta cada vez más clara la casi inexistencia de antígenos tumorales propiamente tales, excepto los de origen embrionario, que se expresan única o especialmente en los tumores. El reconocimiento de AAT por parte del sistema inmune se debería principalmente a la sobreexpresión o a la expresión inadecuada de algunas proteínas en ciertos tejidos, lo que relaciona a la respuesta inmune antitumoral con fenómenos de autoinmunidad.

4. ESTRATEGIAS TUMORALES DE EVASIÓN INMUNOLÓGICA

Los tratamientos inmunoterapéuticos utilizados hasta hoy para combatir el cáncer no han sido del todo exitosos, produciendo una respuesta positiva solamente en una parte de los pacientes. Varias razones incidirían en las dificultades para activar óptimamente al sistema inmune de los pacientes con cáncer. Algunos se deberían a la inmunosupresión propia de estos enfermos, aunque la mayoría está más relacionada con alteraciones del sistema inmune inducidas por el propio tumor. Los mecanismos de evasión tumoral han sido resumidos en la tabla 37-2 y algunos de ellos discutidos más abajo.

4.1. Disminución de la expresión de las moléculas MHC

La mayoría de los péptidos asociados al MHC clase I derivan de proteínas propias intracelulares o de microorganismos infecciosos (ver capítulo 9). Estas proteínas son cortadas en segmentos polipeptídicos y transportadas por distintas proteínas chaperonas hasta asociarse a moléculas MHC y ser presentadas en la superficie celular a los linfocitos T. Defectos en el funcionamiento de cualquiera de los componentes del procesamiento



Tabla 37-1. Antígenos tumorales humanos reconocidos por células T MHC clase I restringidas

Tipo de antígeno tumoral	Neoplasias que presentan el péptido	Péptido	Molécula MHC-I presentadora
Productos de oncogenes activados			
Ras	10 % de tumores humanos	CLLDILDTAGL	A2
Producto p210 del reordenamiento de bcr/abl	Leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda	VVVGAVGVG SSKALQRPV ATGFKQSSK KQSSKALQR ATGFKQSSK	B35 A2 A3 A3 A11
HER-2/neu/c-erb/p185	Carcinomas pancreático, mamario, ovárico, gástrico, colorectal y melanoma	GFKQSSKAL KIFGSLAFL IISAVVGIL VMAGVGSPYV ELVSEFSRM QLFEDNYAL RLLQETELV ILHNGAYSL ALCRWGLLL VLRENTSPK	B8 A2 A2 A2 A2 A2 A2 A2 A2 A3
Productos de genes supresores de tumor p53 mutada			
	50% de tumores humanos	LLPENNVLSPL GLAPPQHLIRV RMPEAAPPV KTCPVQLWV	A2 A2 A2 A2
Producto de genes embrionarios reactivados			
MAGE-1	Melanomas, carcinomas, sarcomas y otros	EADPTGHSY	A1
		SAYGEPRKL	CW*1601
MAGE-2		KMVELVHFL	A2
		YLQLVFGIEF	A2
MAGE-3		EVDPIGHLV	A1
		FLWGPRALV	A2
BAGE		KVAELVHFL	A2
GAGE		MEVDPIGHLV	B44
RAGE		AARAVFLAL	CW*1606
		YRPRPRRY	CW6
		SPSSNRIRNT	B7
Antígenos de diferenciación tejido-específicos			
MART-1/Melan-A	Melanomas y otros	AAGIGILTV	A2
		ILTVILGVL	A2
gp100/Pmel 17		ITDQVPFSV	A2
		LLDGTATLRL	A2
		VLYRYGSFSV	A2



Tirosinasa		KTWGQYWQV	A2
		YLEPGPVTA	A2
		YMDGTMSQV	A2
MC1R		MLLAVLYLL	A2
		AFLPWHRLF	A24
		SEIWRDIDF	B44
		TILLGIFEL	A2
Antígeno específico prostático		FLALIICNA	A2
		AIIDPLIYA	
Antígeno específico prostático de membrana	Carcinomas prostáticos	KLQCV DHLV	A2
		FLTPKKLCQV	A2
		VISNDVCAQV	A2
		LLHETDASV	A2
		ALFDIESKV	A2
Proteínas propias ampliamente expresadas			A2
Antígeno carcinoembrionario	Variados carcinomas	YLSGANLNL	A2
	mamarios, ováricos y	IMIGVLGV	A2
MUC-1	carcinomas pancreáticos	STAPPAHGV	A2
			A11
			A2
Productos de genes virales			
Proteínas E6 y E7 del virus papiloma humano	Carcinoma cervical	FAFRDLCIV	A2
		LLMGTLGIV	A2
		YMLDLQPETT	A2
Proteínas del virus Epstein-Barr	Enfermedad de Hodgkin	TLGIVCPI	A11
	Linfoma de Burkitt y	AVFDRKSVAK	A11
	carcinomas	IVTDFSVIK	A2
	nasofaríngeos,	CGLGLLTMV	A3
Proteínas del virus hepatitis B	Carcinoma hepatocelular	RLRAEAGVK	A2
		FLPSDFFPSV	A11
Proteínas del virus-1 de la Leucemia de células T Humana	Leucemia de células T	YVNVNMGLK	A2
		LLFGYPVYV	B14
		VPYKRIEEL	
Antígenos mutados			
CDK4-R24C-1 mutada	Melanoma	EEKLIVVLF	B-44
		ACDPHSGHFV	A2
b-catenina		SYLDSGIHF	A24

Tabla adaptada de Salazar-Onfray *et al.* Med Oncol, 1999.

y presentación antigénica incide en una incapacidad de los linfocitos T de reconocer a la célula presentadora, en este caso la célula tumoral. La pérdida de uno o varios alelos de HLA ("Human Leukocyte antigen", MHC en humanos) es un evento común en varios tipos de tumores especialmente en las metástasis. Estos defectos han sido atribuidos a mutaciones puntuales en la $\beta 2$ -

microglobulina o en otros genes del complejo MHC. Recientemente defectos en otras proteínas relacionadas con la presentación antigénica como los proteosomas y las TAP han sido también descritos en melanomas y otros carcinomas.



Tabla 37-2. Mecanismos de escape a la vigilancia del sistema inmune utilizada por los tumores

- Pérdida de la expresión de MHC para evitar el reconocimiento por los LT.
- Disminución o pérdida en el tumor de la expresión de antígenos asociados al tumor.
- Disminución o pérdida de la expresión de moléculas coestimuladoras, en el tumor o en las células dendríticas, requeridas para una eficiente interacción con los LT.
- Neutralización de la respuesta inmune a través de la inducción de anergia o debido a la eliminación clonal de los LT específicos.
- Activación, mediada por el tumor, de células supresoras o células del sistema inmune que secretan citoquinas inhibidoras.
- Cambios, inducidos por el tumor, en las moléculas transductoras de señales en los LT.
- Utilización de factores estimulantes, que favorecen el crecimiento tumoral, producidos luego de la activación del sistema inmune (TGF- β).
- Secreción de factores inmunosupresores por los tumores (Prostaglandina E₂ e IL-10).

Tabla adaptada de Salazar-Onfray *et al.* Med Oncol, 1999.

4.2. Factores inmunosupresores producidos por los tumores

Numerosos factores inmunosupresores producidos por las células tumorales han sido identificados y estudiados en relación al escape tumoral. Un ejemplo clásico es la **Prostaglandina E₂** (PGE₂). La PGE₂ ha sido implicada en la patogénesis del cáncer actuando a través de la inmunorregulación. Evidencias indirectas que indican que el tratamiento profiláctico con ácido acetil-salicílico, un inhibidor de la síntesis de PGE₂, reduce la incidencia de cáncer colo-rectal, respalda el rol de la PGE₂ en la progresión de los tumores. El **Factor de Crecimiento Transformante- β** (TGF- β) y la **Interleuquina-10** (IL-10) son las citoquinas con mayor efecto inmunosupresor. Experimentos en animales indican que la mayor actividad de la TGF- β *in vivo* es la promoción de la invasión y la metástasis. *In vitro* el TGF- β inhibe la expansión de las LTc y de los linfocitos B, inhibe la expresión de receptores de IL-2 de

alta afinidad inactivando los LT, células NK y a las células LAK (células NK activadas por linfoquinas). En humanos el TGF- β ha sido involucrado en el aumentado potencial metastásico de melanomas y otros carcinomas. La IL-10 es una citoquina del tipo Th2, la que favorece una respuesta de tipo humoral más que celular, siendo esta última la más efectiva contra los tumores. La IL-10 inhibe además la producción de citoquinas pro-inflamatorias en monocitos y macrófagos y reduce la expresión de MHC clase I y II en las células presentadoras de antígenos. Esto redundando directamente en la inhibición del crecimiento y activación de linfocitos T y células NK y por lo tanto en el escape de los tumores. La IL-10, que es producida por una gran variedad de tumores, inhibe la expresión de MHC clase I y II en éstos a través de la inhibición de componentes del procesamiento y presentación antigénica como las TAP y los proteosomas.

5. TERAPIA INMUNOLÓGICA CONTRA EL CÁNCER

La utilización del sistema inmune para combatir el cáncer es una antigua idea, extensamente investigada durante varias décadas. Algunos períodos de la historia de la inmunología antitumoral han estado marcados por un excepcional entusiasmo y optimismo respecto de los beneficios que estas terapias proporcionarían a los pacientes con cáncer, mientras que otros son acompañados por la frustración y el escepticismo. De todas formas, ciertas terapias inmunológicas han dado resultados esperanzadores, lo que unido con una comprensión más profunda del funcionamiento del sistema inmune abre buenas perspectivas para el tratamiento generalizado de cierto tipo de tumores.

5.1 Anticuerpos monoclonales. La capacidad de los anticuerpos de reconocer proteínas aberrantes en la membrana celular y el desarrollo de la técnica de producción de anticuerpos monoclonales (AcMo), ha permitido la utilización de estos últimos en tratamientos contra algunos tipos de cáncer con buenos resultados. Recientemente se ha demostrado un aumento en la sobrevivencia de pacientes con carcinomas colo-rectales tratados con AcMo contra CEA. Otros AcMo, actualmente en uso clínico o en las últimas fases de desarrollo son: anti-Her2/Neu en el caso de cáncer mamario y anti-CD20 en linfoma (tabla 37-3). Existirían varios



mecanismos por los cuales los AcMo pueden destruir a los tumores. Uno, es la activación del sistema de complemento, esto determinado por el isotipo del AcMo. Los AcMo pueden también inducir citotoxicidad celular dependiente de Ac (ADCC) contra los tumores. La ADCC es eficientemente mediada por las células NK, pero además puede ser mediada por monocitos, macrófagos y granulocitos. Estas células contienen receptores para los Fc que activan la citotoxicidad. Finalmente los AcMo podrían ser directamente letales para las células tumorales por la inducción de apoptosis, a través del bloqueo de receptores de membrana esenciales para algún factor de crecimiento o la inhibición del contacto intercelular. Otra estrategia basada en los AcMO pero también con pocos exponentes en uso clínico son los anticuerpos unidos a compuestos tóxi-

cos para la célula como radionuclidos o toxinas, estos conjugados se denominan **inmunotoxinas**. El mecanismo general de estos agentes se basa en la interacción específica con la célula tumoral y en su posterior internación. La toxina una vez en el interior celular puede ejercer su acción tóxica.

5.2 Terapia biológica contra el cáncer. Esta inmunoterapia conceptualmente corresponde a la activación de los mecanismos defensivos del paciente, en este caso dirigidos contra el tumor. El creciente conocimiento acerca de las diversas citoquinas, historia que comenzó a fines de la década del '50 con la descripción de la molécula de interferón, creó grandes expectativas de inmunoterapia contra el cáncer y otras enfermedades, especialmente infecciosas. Entre muchos intentos fallidos, al inicio de la década de los '80

Tabla 37-3. Inmunoterapia del Cáncer¹

Células activadas o modificadas genéticamente²

a) Células LAK

b) Células TIL

Células TIL CD4+ o CD8+

Células TIL modificadas genéticamente. Introducción de genes de citoquinas o de factores de crecimiento.

c) Células tumorales modificadas genéticamente

Introducción de genes de citoquinas, factores de crecimiento y otros MHC, B7.

d) Células dendríticas modificadas.

Presentación de antígenos tumorales (incorporados *in vitro*)

Introducción de genes de moléculas co-activadoras.

Anticuerpos y citoquinas²

Citoquinas: IL-2, IFN- α , IFN- γ .

Anticuerpos monoclonales contra los antígenos CEA (cáncer colo-rectal),

Her-2Neu (cáncer mamario), CD20 (linfoma).

Antígenos tumorales²

Péptidos antigénicos

DNA: con información para la expresión del antígeno tumoral

y para la expresión de moléculas co-activadoras.

¹ Estos tratamientos se aplican, en general, de forma mixta y también en conjunto con los tratamientos convencionales: quimioterapia, radioterapia, hormonoterapia.

² Muchos de estos tratamientos se encuentran aún en fases clínicas de desarrollo. LAK, células NK activadas por linfoquinas; TIL, linfocitos infiltrantes de tumor



comenzó la visión de una terapia basada en el uso de células citotóxicas del propio paciente: inmunoterapia adoptiva primero inespecífica, células LAK, y posteriormente específica, células TIL, péptidos antigénicos y células dendríticas (figura 37-1).

inducir la presentación antigénica en las CPA incluyendo las células tumorales. Hasta ahora, el principio utilizado ha sido el uso de una citoquina estimuladora en altas concentraciones. Tomando en cuenta la amplia variedad de estos compuestos y de otros mediadores endógenos que modulan la

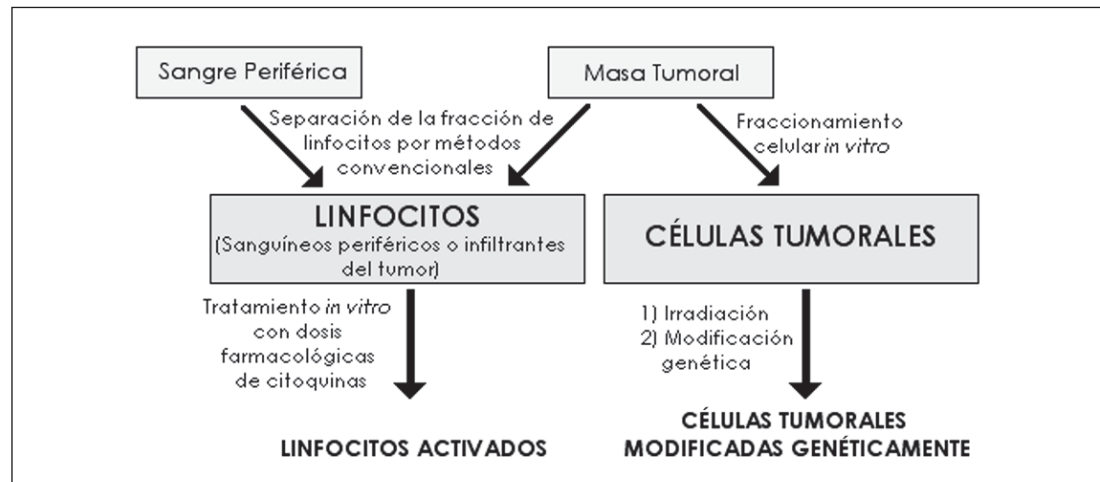


Figura. 37-1. Esquema general de obtención de linfocitos activados o de células tumorales modificadas genéticamente utilizados en la terapia biológica contra el cáncer.

5.2.1 Utilización de citoquinas. En el caso de citoquinas únicamente como inmunoterapia, se han utilizado IFN- α , IFN- γ , IL-2 y GM-CSF, entre muchas otras. También se ha intentado mezclas de citoquinas y citoquinas más tratamientos convencionales (tabla 37-3). La base del uso de las citoquinas es la acción estimuladora de la respuesta inmune del hospedero y no necesariamente una acción directa sobre las células tumorales. La citoquina **IL-2** ha sido una de las más estudiadas; de 15,5 kDa, es producida por los linfocitos T activados, presenta un t_{1/2} de 8 horas en la circulación y se la ha utilizado en protocolos de altas y bajas dosis. El efecto antitumoral de esta citoquina parece derivar de al menos dos acciones diferentes: La IL-2 puede mediar la generación de células citotóxicas inespecíficas, a partir de linfocitos precursores en reposo, que pueden destruir las células tumorales. Además de esta acción antitumoral, esta citoquina puede expandir a las células T que reconocen específicamente antígenos tumorales, provocando una respuesta específica. Este tipo de tratamientos ha tenido una respuesta objetiva (remisión completa y/o parcial) del orden del 20%. Otra citoquina muy utilizada, especialmente en melanomas, es el IFN- γ cuyo efecto principal es

respuesta inmune en un delicado balance, no parece ser la mejor de las opciones. Este punto se ha visto reforzado por una observación que cada vez se hace más general en la respuesta inmune: los mecanismos de activación celular pueden culminar en la destrucción de la célula activada por mecanismos de muerte celular programada o apoptosis. En el caso de las células NK este tipo de mecanismo ya está claramente establecido, la estimulación simultánea por ejemplo por IL-2 e IL-12 o IL-12 e IL-15, provoca inicialmente estimulación celular y posteriormente apoptosis. Por lo tanto, es posible que la toxicidad de los tratamientos en base a citoquinas podría deberse, en parte a este fenómeno. Estos tratamientos tienen un efecto parcial y varios efectos colaterales si se utilizan dosis altas, tales como náuseas, fiebre y dolores musculares intensos. Su efecto en todo caso, es lo suficientemente importante como para ser un tratamiento alternativo en algunos tipos de cáncer.

5.2.2. Terapia celular adoptiva

a) Precursores células NK. Se basa en la activación general *in vitro* de linfocitos sanguíneos periféricos, con altas dosis de las citoquinas IL-2,



IL-7 o IL-12. Bajo estas condiciones de cultivo, se genera una nueva estirpe celular inespecífica (**células LAK**) cuyos precursores son las células NK circulantes, y que se caracteriza por adquirir una mayor agresividad y una acción lítica más amplia. La clave de su utilización como inmunoterapia la dio la observación que estas células eran capaces de lisar muy eficientemente *in vitro* las células del tumor autólogo; acción de la que las células NK precursoras carecían. Una vez obtenidos los linfocitos a través de un procedimiento denominado leucoféresis, que permite obtenerlos en grandes cantidades, se tratan *in vitro* con la citoquina, principalmente IL-2 y posteriormente se readministran al paciente, generalmente en protocolos mixtos: células activadas más la citoquina activadora. En los seres humanos normales, la mayoría de las células NK circulantes se encuentra en reposo, por lo tanto, la generación de las células LAK, se puede seguir, además de su citotoxicidad, por el aumento de las proporciones de células CD56+, CD25+ (IL-2 α R; indicador de activación de los linfocitos). Han sido ampliamente utilizados en cáncer renal metastásico y melanomas malignos, con un máximo de respuesta objetiva (remisiones completas y parciales) de un 30-40 %. La distribución de las células LAK *in vivo* en modelos animales y en algunos pocos casos de tratamiento en la patología humana, ha demostrado que se distribuyen primeramente en los pulmones y posteriormente en hígado y bazo y no necesariamente en el sitio del tumor. Por ello también se han administrado localmente en el sitio del tumor o sitios adyacentes. Si bien constituyen una alternativa real, existen riesgos como la toxicidad del tratamiento, lo que implica un riguroso control del paciente en todas las etapas del tratamiento. Las células LAK se utilizan también en conjunto con tratamientos convencionales, quimio y radioterapia en donde se ha observado una potenciación de su acción. También se han utilizado células A-NK, una subpoblación de células NK activadas por IL-2 y adherentes, ambas características necesarias para su aislamiento desde la sangre periférica o del bazo. Las células A-NK, expresan CD11a/CD18, son muy eficientes en la producción de citoquinas, migración e ingreso a órganos sólidos y muy eficientes también en la eliminación de las metástasis. La utilización de anticuerpos monoclonales (ver capítulo 43) unidos a soportes magnéticos y la citometría de flujo (ver capítulo 42) han sido contribuciones fundamentales para la obtención

de fracciones celulares altamente purificadas para su uso potencial en terapia.

b) Precursores células T. Se basa en la activación de los linfocitos que han infiltrado el tumor, es decir que ya han reconocido antígenos tumorales, pero que obviamente, en su totalidad, la respuesta no ha sido suficiente para erradicar el tumor. El proceso por lo tanto requiere la extirpación quirúrgica del tumor o bien el manejo de una biopsia, la que debe ser disgregada por tratamientos enzimáticos convencionales para la obtención de células a partir de un tejido, separación de los linfocitos infiltrantes del tumor (**TIL**) y cultivo de éstos en el laboratorio en presencia de IL-2 para lograr una densidad celular que permita readministrarlos al paciente, generalmente también en forma mixta: células infiltrantes más la citoquina utilizada. Este tipo de linfocitos es CD4+, CD8+; principalmente CD8, que ha demostrado actividad citolítica específica *in vitro* contra las células del tumor autólogo y además una efectividad, en modelos animales, de uno a dos órdenes de magnitud mayor a las células LAK en lo que se refiere a reducción de las metástasis. La mayoría de las células TIL expresan los marcadores de activación CD25 y CD28 (el ligando de B7). Han sido utilizadas también preferentemente como tratamiento de cáncer renal metastásico y melanoma maligno y con resultados porcentuales no mayores a los obtenidos con las células LAK. Un hecho de gran relevancia de estas células fue que se demostró que debido a su especificidad, una vez administradas podían ser detectadas en el sitio del tumor, es decir pueden volver al tumor original. La figura. 37-1 esquematiza la obtención de estos tipos celulares para la utilización clínica.

Si bien no son del todo conocidos los mecanismos por los cuales estas células citotóxicas (LAK y TIL) median sus efectos terapéuticos, obviamente la destrucción del tumor mismo o de sus metástasis y la eliminación de las células tumorales debería ser uno de los más importantes. Las células TIL son principalmente LTc CD8+ y por lo tanto capaces de reconocer y lisar a células que presenten antígenos tumorales. De hecho las células TIL se han utilizado como precursores para identificar nuevos antígenos principalmente de melanoma. Tanto las células LAK y TIL median sus efectos citotóxicos a través del mecanismo membranolítico y dependiente de FasL-Fas. Sin embargo, además de la citotoxicidad el contacto



de las células LAK y TIL con las células tumorales provoca la liberación de diversas citoquinas y factores de crecimiento. Este último mecanismo, es de especial importancia, pues la liberación en el sitio del tumor, de citoquinas como TNF- α , GM-CSF, IFN- γ , que poseen propiedades citotóxicas y de reclutamiento y activación de otras células inmunocompetentes, se encamina justamente al objetivo de destrucción del tumor por los propios mecanismos inmunológicos del paciente. Además, se ha intentado purificar la población celular efectora; es necesario enfatizar que estas poblaciones celulares son altamente heterogéneas y que además su rendimiento va a depender del estado del paciente del cual se obtienen, lo que por sí mismo constituye un proceso altamente complejo.

Una alternativa que resume varias características terapéuticas importantes la constituye el uso de células TIL modificadas genéticamente. Considerando las propiedades de estas células, especialmente su localización en el sitio del tumor, la posibilidad de inserción de un gen, específicamente de alguna citoquina, que permita su secreción en el mismo sitio del tumor aparece como una posibilidad muy interesante. En modelos animales el esquema de tratamiento con células TIL modificadas genéticamente ha funcionado muy bien; en el caso de inmunoterapia para el cáncer humano, se han insertado a células TIL los genes de IL-2, TNF- α , IFN- γ , alternativas que se encuentran en estudio.

Actualmente, se utilizan además tratamientos de terapia biológica en conjunto con tratamientos convencionales de quimioterapia o radioterapia. La tabla 37-3, resume algunas de las alternativas más utilizadas hasta ahora en esta área de la biomedicina.

5. 3. Inmunización activa contra tumores

El comienzo de la historia basada en la idea que el sistema inmune puede detener el desarrollo de un tumor, comienza a fines del siglo pasado, cuando se observó la regresión de esta enfermedad en algunos pacientes que contraían enfermedades infecciosas bacterianas. Uno de los hitos importantes fue el logrado por el médico William B. Coley, quien llegó a utilizar bacterias atenuadas como tratamiento de pacientes con cáncer. Desde luego, este tipo de enfoque inespecífico, corresponde a lo que actualmente conocemos como inmunoterapia, y más aún a un intento de **vacuna contra el cáncer**, que justamente representa en la

actualidad uno de los últimos y más esperanzadores enfoques terapéuticos. Actualmente el enfoque de terapia del cáncer de Coley, se puede considerar como de activación no específica del sistema inmune. Ese enfoque se sigue aplicando, siendo uno de los ejemplos más representativos el tratamiento del cáncer a la vejiga por tratamiento a nivel local con el bacilo Calmette-Guérin o BCG, el cual genera una respuesta inflamatoria. Por lo tanto, son los mediadores de la inflamación los activadores de la respuesta que ataca al tumor.

En contraste con las vacunas contra agentes infecciosos extracelulares, en las cuales la estrategia más importante es la activación del sistema inmune humoral y la generación de anticuerpos neutralizantes, el foco de las vacunas contra el cáncer está dirigido a la generación de la respuesta celular específica mediada por linfocitos T. Hasta ahora, las vacunas contra el cáncer no son preventivas, sino más bien terapéuticas. Éstas intentan la activación del sistema inmune contra moléculas sobreexpresadas o mutadas, presentes en las células tumorales, con el fin de eliminar tumores preexistentes en el hospedero.

Las células tumorales por lo general son poco inmunogénicas y además capaces de inducir tolerancia activamente. Esto principalmente debido a la carencia de moléculas co-estimuladoras y a la secreción de factores inmunosupresores. La estrategia de las vacunas antitumorales es quebrar este estado de tolerancia aumentando la densidad de los antígenos expresados en las moléculas MHC acompañada de un incremento de las moléculas co-estimuladoras.

La forma más simple de intentar inmunizar pacientes con cáncer, consiste en utilizar células tumorales autólogas irradiadas o tratadas químicamente para evitar su proliferación una vez reinyectadas en el paciente. Estas células tumorales pueden ser genéticamente modificadas con el fin de que expresen moléculas co-estimuladoras y/o citoquinas proinflamatorias como IL-2, IL-4, IFN- γ o GM-CSF, (ver figura. 37-1) lo que eleva la inmunogenicidad de los tumores generando una respuesta más eficiente contra las metástasis. Nuevamente en base a modelos animales se ha podido formar el siguiente escenario que permite explicar esta acción: las células tumorales genéticamente modificadas, deben secretar *in vivo* la citoquina que expresan, lo que a su vez debe traer como consecuencia la activación y/o reclutamiento de linfocitos CD4, CD8, células NK y de CPA. Como resultado de esta acción deberían



destruirse las células tumorales, favoreciéndose además la presentación de los antígenos tumorales por las células presentadoras. Finalmente entonces, el tumor debería ser rechazado mediante la acción de células efectoras específicas. Una de las posibilidades más interesantes de este tipo de tratamientos ha sido la utilización de células tumorales (melanoma, cáncer prostático, cáncer renal) modificadas genéticamente por la inserción del gen de GM-CSF. Esta citoquina es un factor de crecimiento muy importante para las DC, de modo que estas células pueden activarse en estas condiciones y por lo tanto capturar y procesar antígenos tumorales. Bajo estas condiciones, las DC también pueden expresar la molécula co-estimuladora B7, necesaria para la respuesta mediada por los LT.

La identificación de epítomos de AAT ha permitido explorar la inmunización con péptidos recombinantes derivados de los antígenos gp100 y MART-1 en melanoma y Her2/Neu en cáncer ovárico. Estos intentos no han sido del todo exitosos, pero han permitido mejorar los protocolos de inmunización. Durante los últimos dos años, ha adquirido mayor relevancia el papel de las células presentadoras de antígeno profesionales como las **células dendríticas**, en la inducción de la respuesta inmune contra los tumores. Las DC, derivadas de monocitos de sangre periférica, pueden ser activados *in vitro* utilizando IL-4 y GM-CSF y expandidas en cantidades suficientes para inmunizar. Previo a la inmunización, las DC son cargadas exógenamente con péptidos antigénicos o transfectadas con genes que codifican estos antígenos. Las respuestas a estos tratamientos son las más promisorias y pareciera que sería la estrategia a seguir. La combinación *in vitro* de DC con células tumorales apoptóticas, permite la presentación de múltiples antígenos tumorales en una misma célula presentadora, en un contexto adecuado para la inducción de respuesta.

Una de las técnicas más modernas de inmunización, consiste en la utilización de **DNA desnudo** conteniendo los genes codificadores de antígenos tumorales, generalmente asociado a genes que inducen la inflamación, citoquinas, proteínas bacterianas etc. Las **vacunas de ADN**, sorprendentemente eficientes, están siendo exploradas no solamente en el contexto de la inmunología antitumoral, sino que además como estrategia antiviral o contra otros patógenos, (ver capítulo 35).

En resumen, el desarrollo de la inmunología

antitumoral, si bien no ha sido lo suficientemente exitosa desde el punto de vista terapéutico, ha permitido avanzar enormemente en la comprensión del sistema inmune y continúa abriendo perspectivas en la utilización de las defensas naturales de nuestro organismo en el combate contra el cáncer, uno de los enemigos más enconados de la especie humana.

LECTURAS SUGERIDAS

Greten, T.F. y Jaffee, E.M., "Cancer vaccines", *J Clin Oncol* 17:1047-1060, 1999.

Rosenberg, S.A., "A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode tumor antigens". *Immunity* 10: 281-287, 1999.

Salazar-Onfray, F., "Interleukin-10: a strategy used by tumors to escape from the immune system (Review)". *Med Oncol* 16: 86-94, 1999.

Van den Eynde, B.J. y van der Bruggen, P., "T cell defined tumor antigens", *Curr Opin Immunol* 9: 684- 693, 1997.



Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 38

MECANISMOS INMUNOLÓGICOS DEL RECHAZO DE ALOINJERTOS

Cecilia Sepúlveda C.

- 1. Introducción**
- 2. Rechazo de aloinjertos**
 - 2.1. Presentación directa de aloantígenos
 - 2.2. Presentación indirecta de aloantígenos
 - 2.3. Células que participan en el rechazo
- 3. Mecanismos efectores del rechazo**
 - 3.1. Rechazo hiperagudo
 - 3.2. Rechazo agudo
 - 3.3. Rechazo crónico
- 4. Prevención y tratamiento del rechazo**
 - 4.1. Inmunosupresión
 - 4.2. Selección de donantes
 - 4.3. Inducción de tolerancia





RESUMEN

En la actualidad los trasplantes son cada vez más frecuentes. Muchas personas requieren ser sometidas a este tipo de tratamiento en el cual se reemplazan células, tejidos u órganos enfermos, por otros, provenientes de un donante sano. Una barrera importante al éxito de los trasplantes es, sin embargo, la barrera inmunológica, lo que conocemos como rechazo. En este capítulo se presenta y discute los principales mecanismos de rechazo, sus características y componentes. Asimismo se discute las estrategias más importantes para lograr un mayor éxito en la sobrevida y funcionamiento de los trasplantes, ya sea efectuando trasplantes entre individuos con la mayor semejanza posible o a través del uso de terapias inmunosupresoras.

1. INTRODUCCIÓN

Trasplante es el proceso de tomar células, tejidos u órganos (el trasplante o injerto) de un individuo y colocarlo (generalmente) en otro individuo. El individuo que proporciona el injerto es el **donante** y el que lo recibe es el **receptor**.

Un injerto trasplantado en el mismo individuo del cual se obtuvo se denomina trasplante **autólogo o autotrasplante**. Un injerto trasplantado entre individuos genéticamente idénticos o **singeneicos** se denomina trasplante **singeneico**. Un trasplante efectuado entre individuos genéticamente diferentes pero que pertenecen a la misma especie se llama trasplante **alogeneico o alotrasplante**. Un injerto entre individuos de especies diferentes es un trasplante **xenogeneico o xenotrasplante**.

Las moléculas que son reconocidas como extrañas por el sistema inmune del receptor en los alotrasplantes son los **aloantígenos** y las de los xenotrasplantes son los **xenoantígenos**. Los linfocitos y anticuerpos que reconocen aloantígenos o xenoantígenos se denominan **alorreac-tivos** o **xenorreactivos**, respectivamente.

La mayor parte de los trasplantes que se efectúan en la actualidad son alotrasplantes. Los más comunes son los de riñón, corazón e hígado, pero es cada vez más frecuente el injerto de otros órganos como páncreas, intestino y pulmón. La transfusión de sangre, trasplante de células sanguíneas circulantes y/o plasma de un individuo a otro, es también muy frecuente, así como el trasplante de médula ósea.

La respuesta inmune del receptor a los aloantígenos del donante presentes en el injerto es muy intensa y se denomina **rechazo**. Esta respuesta de rechazo es una de las principales barreras al éxito de los trasplantes, por lo que su estudio y comprensión es de la mayor importancia.

2. RECHAZO DE ALOINJERTOS

La respuesta inmune a los aloantígenos puede ser tanto **humoral** como **celular**, siendo en general, la respuesta inmune celular la de mayor importancia.

El reconocimiento del mosaico antigénico que significa el injerto, ya sea como propio o extraño, está determinado principalmente por las moléculas codificadas por el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), presentes en las membranas celulares. Como es conocido, las moléculas MHC juegan un rol crítico en la respuesta inmune a antígenos extraños, principalmente en la presentación de péptidos derivados de antígenos proteicos de una forma que ellos puedan ser reconocidos por las células T. Por ello, el rol de las moléculas MHC como aloantígenos es incidental.

Las moléculas MHC alogénicas pueden ser presentadas para el reconocimiento de las células T del receptor por dos vías fundamentalmente diferentes. La primera es la llamada **presentación directa** e involucra el reconocimiento de moléculas MHC intactas expresadas en la membrana de células presentadoras de antígenos (CPA) del donante en el injerto y es una consecuencia de la

similitud entre moléculas MHC intactas del injerto y las del receptor. La segunda vía, llamada **presentación indirecta**, involucra el procesamiento de las moléculas MHC del donante por CPA del receptor y la presentación de los péptidos derivados de estas MHC alogénicas asociadas con las MHC propias del receptor. En este caso, las moléculas MHC del injerto son procesadas y presentadas como cualquier antígeno extraño, siendo los mecanismos de la presentación indirecta indistinguibles de los que normalmente utiliza el sistema inmune (figura 38-1).

expresadas en las membranas celulares normalmente tienen péptidos unidos. Como durante el proceso de tolerancia central se eliminan o inactivan sólo las células T que reconocen péptidos propios unidos a MHC propios, las células T específicas para reconocer péptidos propios unidas a MHC alogénicos persisten a este proceso de selección y son capaces de responder a los aloinjertos. Se ha calculado que hasta un 2% de las células T son capaces de reconocer y responder directamente a una sola molécula MHC extraña y esta alta frecuencia de células T reactivas

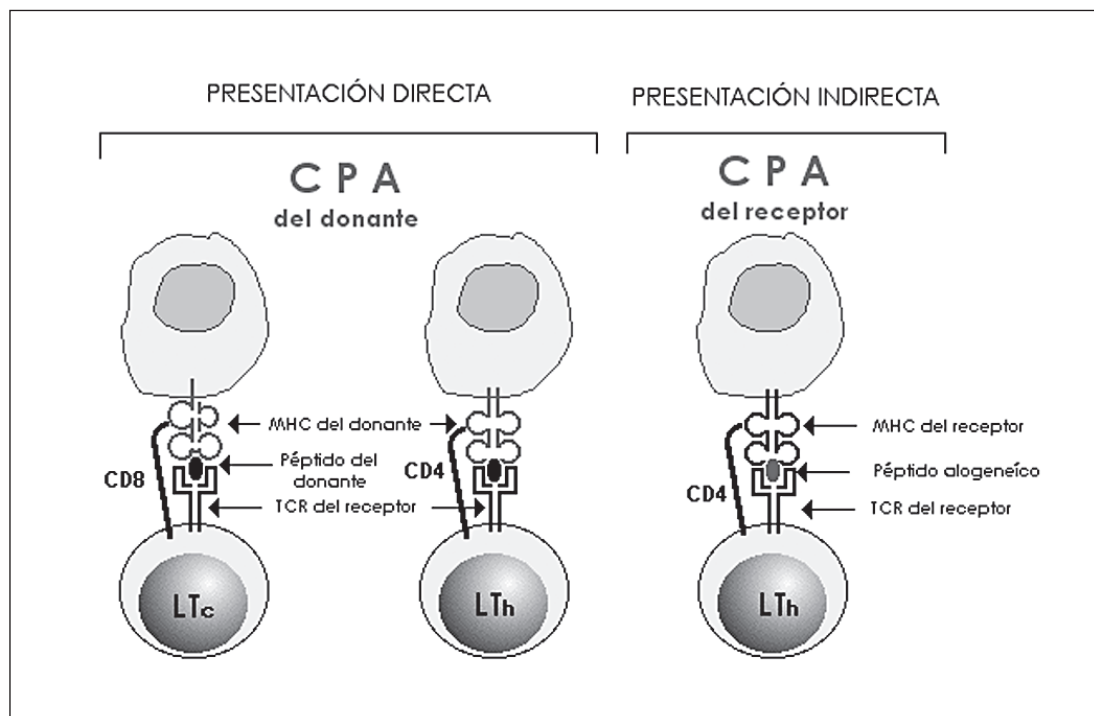


Figura 38-1. Vías de presentación de Ag de trasplante: directa e indirecta.

2.1. Presentación directa de aloantígenos

El reconocimiento directo de moléculas MHC extrañas se debe a que los receptores de células T normales presentes en el receptor, seleccionadas para reconocer moléculas MHC propias asociadas a péptidos extraños, reconocen las moléculas MHC alogénicas del injerto asociadas a péptidos, debido a la similitud estructural entre éstas (reacción cruzada).

Las moléculas MHC alogénicas con un péptido unido pueden imitar el determinante formado por una molécula MHC propia más un determinado péptido extraño. Las moléculas MHC

con moléculas MHC alogénicas es una de las razones del por qué los aloinjertos generan respuestas inmunes intensas *in vivo*.

2.2. Presentación indirecta de aloantígenos

Moléculas MHC alogénicas pueden también ser reconocidas como moléculas extrañas convencionales. Como las moléculas MHC extrañas difieren estructuralmente de las del receptor, ellas pueden ser procesadas y presentadas de la misma manera que cualquier antígeno extraño, esto es, como péptidos asociados con las moléculas MHC propias del receptor. La presentación indirecta



usualmente implica el alorreconocimiento por células T CD4+ ya que los aloantígenos usualmente son procesados por las CPA del receptor por la vía vesicular endosómica y requiere la presentación por moléculas MHC clase II. Es posible, sin embargo, que algunos aloantígenos sean reconocidos por células T CD8+ y presentados vía moléculas MHC clase I.

También otros aloantígenos polimórficos pueden causar reacciones de rechazo inmunológico, habitualmente más débiles y lentas, y se los conoce como antígenos menores de histocompatibilidad.

2.3. Células que participan en el rechazo

Pueden participar tanto células T CD4+ como CD8+, que reconocen las moléculas MHC del injerto presentadas tanto en forma directa como indirecta. Las CPA del receptor y del donante están involucradas en el proceso de rechazo, siendo tal vez las más importantes las células dendríticas. Estas CPA presentan los antígenos a las células T del receptor presentes en el injerto y también CPA del donante podrían migrar a los ganglios linfáticos donde activarían células T *naive* en forma directa. Por otra parte, CPA del receptor pueden entrar al injerto y transportar los aloantígenos a los ganglios linfáticos y presentarlos a los linfocitos por la vía indirecta. Estas CPA también proveen moléculas coestimuladoras que contribuyen a la expansión y diferenciación de las células T alorreactivas.

La **reacción mixta linfocitaria (RLM)** es un modelo *in vitro* muy útil del reconocimiento directo de las moléculas MHC alogénicas y se utiliza como predictor del rechazo de aloinjertos. Esta reacción es inducida cultivando *in vitro* células mononucleares provenientes de dos individuos diferentes, esto determina que se produzca una respuesta proliferativa a los 4-7 días de cultivo, denominada RLM alogénica. Puede ser bidireccional o unidireccional, en este último caso se procesa una de las dos poblaciones linfocitarias para que no prolifere. Durante este proceso son estimuladas tanto células T CD4+ como CD8+. Las CD8+ se diferencian a células citolíticas y las células CD4+ en células productoras de citoquinas, tal cual ocurre en una reacción inmune contra antígenos proteicos restringida por moléculas MHC clase I o II, respectivamente.

Menos conocidos son los mecanismos que llevan a la producción de aloanticuerpos contra

moléculas MHC alogénicas. Se presume que las células B específicas para los aloantígenos son estimuladas por mecanismos similares a los que operan frente a proteínas extrañas.

3. MECANISMOS EFECTORES DEL RECHAZO

Tanto células T CD4+ como CD8+ y aloanticuerpos participan en el rechazo del aloinjerto, a través de diferentes mecanismos efectores. Estos mecanismos se clasifican según la histopatología que los caracteriza, y según el tiempo después del trasplante en que se manifiestan. De acuerdo a la experiencia de los trasplantes renales, estos son: rechazo hiperagudo, agudo y crónico.

3.1. Rechazo hiperagudo

El rechazo hiperagudo se caracteriza por hemorragia y oclusión trombótica de la circulación del injerto y ocurre en minutos u horas de colocado éste. Está mediado por anticuerpos preexistentes que se encuentran en la circulación del receptor y que se unen a antígenos del endotelio vascular del injerto. Esta unión activa al sistema del complemento causando daño endotelial y promoviendo la trombosis intravascular del injerto.

Este tipo de rechazo puede ser provocado por aloanticuerpos dirigidos contra antígenos de grupo sanguíneo ABO u otros, que se expresan también en las células del endotelio vascular. En la práctica esto no sucede o no debiera suceder, ya que donantes y receptores se seleccionan considerando que deben tener grupo sanguíneo compatible.

El rechazo hiperagudo puede ocurrir por aloanticuerpos de la clase IgG dirigidos contra moléculas MHC o contra otros antígenos que no son de grupo sanguíneo presentes en las paredes endoteliales. Estos aloanticuerpos se generan en exposiciones previas a aloantígenos, por ej., por transfusiones, embarazos múltiples, trasplantes anteriores. Si el título de anticuerpos es bajo el rechazo puede producirse en el transcurso de varios días, siendo entonces denominado "acelerado".

En los pacientes que van a recibir un aloinjerto se investiga rutinariamente la posible presencia de aloanticuerpos preexistentes contra el posible donante, con el fin de seleccionar el re-



ceptor más adecuado, con mayores probabilidades de éxito del injerto, y evitar la pérdida de éste por un rechazo hiperagudo.

3.2. Rechazo agudo

El rechazo agudo se caracteriza por injuria vascular y parenquimatosa del injerto, mediada por células T, macrófagos y anticuerpos, que se presenta usualmente después de la primera semana de efectuado el trasplante. Las células T CD8+ activadas causan lisis directa de las células del injerto y las células T CD4+ a través de la producción de citoquinas que reclutan y activan células inflamatorias, las cuales causan necrosis. En injertos vascularizados, un hallazgo frecuente en los episodios de rechazo agudo es una endotelitis microvascular, indicando que las células endoteliales son un blanco importante en el rechazo agudo. También los anticuerpos pueden participar en el rechazo agudo.

3.3. Rechazo crónico

El rechazo crónico se caracteriza por fibrosis con pérdida de las estructuras normales de los órganos la cual ocurre en un período de tiempo prolongado, entre 6 meses a un año después del trasplante. En la medida que el tratamiento del rechazo agudo ha ido permitiendo su mejor control, el rechazo crónico ha emergido como la principal causa de la pérdida de los aloinjertos. No se conoce bien la patogenia de este tipo de rechazo pero en muchos casos se ha observado una arterioesclerosis acelerada o de injerto, con proliferación de las células musculares lisas de la íntima. Ésta puede representar una forma especializada de hipersensibilidad retardada en la cual los linfocitos activados inducen a los macrófagos a secretar factores de crecimiento de las células musculares. Es frecuente en trasplantes cardíacos y de riñón. En modelos experimentales se ha demostrado participación importante de células T CD4+ y de células B en este tipo de rechazo.

4. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL RECHAZO

Si el receptor tiene un sistema inmune competente, siempre se producirá alguna forma de rechazo. Para lograr un mayor éxito en la sobrevida de los trasplantes y el menor rechazo posible, las

estrategias posibles son: minimizar la intensidad de la respuesta inmune alogénica efectuando trasplantes entre individuos con la mayor semejanza posible y, por otro lado, a través del uso de inmunosupresores.

4.1. Inmunosupresión

Existen varios grupos de fármacos inmunosupresores que se utilizan en clínica, entre ellos se encuentran los inmunosupresores tradicionales, como la azatioprina y la ciclofosfamida y aquellos más selectivos, que no deprimen todas las respuestas inmunes sino que principalmente a las células estimuladas por los antígenos alogénicos. Entre estas últimas se encuentran la ciclosporina, el mofetil micofenilato, la rapamicina y la llamada FK-506.

Una de las más usadas es la ciclosporina, cuyo principal mecanismo de acción es inhibir la transcripción de ciertos genes, especialmente los que codifican IL-2. El resultado es que la ciclosporina bloquea la proliferación y diferenciación de las células T dependientes de esta citoquina, por lo tanto, bloquea las células T que están siendo activadas por los aloantígenos y es por esto que esta droga actúa "selectivamente". Además, la ciclosporina induce la síntesis de una citoquina inmunosupresora, el factor transformante beta (TGF- β).

También se utilizan anticuerpos dirigidos contra moléculas de membrana de las células T, especialmente en el tratamiento de los episodios de rechazo agudo. Entre estos están los anticuerpos monoclonales **anti-CD3** (OKT3) y **anti-CD25**; el primero se une a la molécula CD3 de las células T bloqueando su funcionamiento, causando lisis directa por activación del complemento y aumentando su remoción por fagocitosis, y el anti-CD25 que bloquea la activación de las células T bloqueando la unión de la IL-2 a su receptor y favoreciendo también la lisis y remoción de estas células.

También tiene un rol importante el uso de agentes antiinflamatorios como los **corticoides**, que bloquean la síntesis y secreción de diferentes factores solubles por los macrófagos, tales como citoquinas (TNF e IL-1), generación de prostaglandinas, metabolitos del oxígeno, y óxido nítrico.

El uso de los inmunosupresores, especialmente de la ciclosporina y más recientemente del mofetil micofenilato, ha permitido un dramático aumento de la sobrevida de los aloinjertos, espe-



cialmente de aquellos que provienen de donante-cadáver. Previamente al uso de estas drogas, la sobrevida a un año de los injertos provenientes de donante-cadáver era de un 50-60%, aumentando a un 90% gracias al uso de ellas. En el caso de usar donante vivo relacionado (familiar) la sobrevida es de un 90%.

La inmunosupresión mantenida en el tiempo es responsable de un aumento de la susceptibilidad a infecciones y tumores oportunistas en estos pacientes. Esto es particularmente notorio en el trasplante de médula ósea, el cual requiere de una intensa inmunosupresión preparatoria. Además, en este tipo de trasplante, puede producirse una respuesta de los linfocitos de la médula ósea contra los aloantígenos del receptor, causando la llamada **enfermedad de injerto versus huésped (Graft Versus Host Disease, GVHD)**.

4.2. Selección de donantes

Para evitar el rechazo hiperagudo, deben seleccionarse donantes que compartan antígenos de grupo sanguíneo ABO con el receptor. Asimismo, que no posean anticuerpos preformados contra antígenos del donante. Esto último se realiza a través de la técnica del "cross matching", que consiste en colocar en contacto suero del receptor (que contiene los posibles anticuerpos) con células del donante, en presencia de complemento. En caso de haber anticuerpos preexistentes se va a producir una lisis celular, cuya intensidad va a ser proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en el receptor. Además, se realiza el estudio de **tipificación HLA** utilizando una técnica de microlinfocitotoxicidad en placa (técnica de Terasaki), buscando la mayor identidad entre las moléculas MHC del donante y las del receptor (ver capítulo 42).

En el trasplante renal, se ha constatado que, a mayor número de alelos MHC compartidos entre donante y receptor, mejor es la sobrevida del aloinjerto, especialmente en el primer año después del trasplante. La experiencia clínica demuestra que los de mayor relevancia son los antígenos HLA A, B y DR.

Los estudios de tipificación HLA requieren tiempo y no son posibles de realizar en todos los trasplantes, algunos órganos, como corazón e hígado, no pueden preservarse por muchas horas sin sufrir deterioro y deben ser trasplantados lo más pronto posible.

4.3. Inducción de tolerancia

La tolerancia específica frente a los aloantígenos del donante sería el método ideal para prevenir el rechazo de los aloinjertos. No sería necesaria la inmunosupresión, no habría riesgo de rechazo ni de complicaciones derivadas de la inmunosupresión crónica. Experimentalmente se ha podido inducir tolerancia, tanto central como periférica. Un ejemplo de ello es la anergia periférica que se induce bloqueando la interacción de señales coestimuladoras necesarias para la activación de las células T.

LECTURAS SUGERIDAS

Abbas, A., Litchman, A., Pober, J., **Cellular and Molecular Immunology**, Edition WB Saunders, chapter 16, 2000.

Denton, M.D., Magee, C.C., Sayegh M.H. "Immunosuppressive strategies in transplantation". *Lancet* 353:1083-1991, 1999.

Gould, D.S., Auchincloss, A. Jr., "Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection", *Immunology Today* 20:77-82, 1999.

Kahan, B., Clark, J., **Transplantation of solid organs in Samter's Immunological Diseases**, ed. 5, Boston, Little Brown, 1994.

Sherman, L.A., Chattopadhyay, S., "The molecular basis of allorecognition", *Annual Review of Immunology* 11:385-402, 1993.





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 39

INMUNOMODULADORES

Cecilia Sepúlveda C. y María Antonieta Guzmán M.

-
- 1. Introducción**
 - 2. Principales Inmunomoduladores**
 - 2.1. Antiproliferativos
 - 2.2. Antagonistas de las Inmunofilinas
 - 2.3. Glucocorticoides
 - 2.4. Agentes biológicos
 - 2.5. Citoquinas
 - 2.6. Trasplante de médula ósea
 - 2.7. Células autólogas modificadas
 - 2.8. Isoprinosine
 - 3. Efectos Adversos de los Inmunomoduladores**





RESUMEN

Existen numerosas enfermedades de base inmunológica: autoinmunes e inflamatorias, inmunodeficiencias, alérgicas y de hipersensibilidad, cuyo tratamiento se basa en el uso de fármacos y agentes biológicos inmunomoduladores, ya sea capaces de aumentar (inmunoestimuladores) o de suprimir (inmunosupresores) las respuestas del sistema inmune alterado o deficiente. Algunos de estos fármacos también se utilizan en la prevención y tratamiento del rechazo de trasplantes, situación en la cual el sistema inmune reacciona frente a la agresión causada por los antígenos extraños del trasplante. En este capítulo se hará mención a algunos de los inmunomoduladores de mayor aplicación clínica actual.

1. INTRODUCCIÓN

Un inmunomodulador puede definirse como una sustancia biológica o no biológica que influye directamente una función inmune específica, o indirectamente al modificar uno o más de los componentes del sistema inmune. Así, por ejemplo, los inmunomoduladores pueden participar en: (a) la reconstitución de un sistema inmune globalmente deficiente, (b) la reconstitución selectiva de un defecto inmune específico, (c) la estimulación de una función normal, por ejemplo de células supresoras o citotóxicas y (d) la eliminación o supresión selectiva de un tipo celular o de una función inmune específica, por ejemplo, de células tumorales o de células supresoras activadas.

Pese a los enormes avances en la obtención de inmunomoduladores selectivos y específicos, la principal limitación de su uso clínico reside en la complejidad del sistema inmune, que hace prácticamente imposible modular un componente aislado de esta red sin perturbar la homeostasis de todo el sistema.

2. PRINCIPALES INMUNOMODULADORES

Aunque la experiencia con inmunomoduladores en estudios clínicos controlados es aún limitada, algunos de estos agentes constituyen las modalidades terapéuticas de elección en ciertas patologías, habiendo sido aprobados para su uso clínico. Algunos de estos agentes, originalmente de

origen biológico, están actualmente disponibles en cantidades ilimitadas, y en formas extraordinariamente puras gracias a las tecnologías de DNA recombinante, de hibridomas y de clonación celular. Los más conocidos y en uso clínico se señalan en la tabla 39-1.

2.1. Antiproliferativos

En este grupo se encuentran los agentes alquilantes y los inhibidores del metabolismo de las purinas y pirimidinas, incluidos varios nuevos inhibidores.

a) Agentes Alquilantes

Estos agentes forman uniones covalentes con el DNA, y cuando se administran a altas dosis, conducen a la muerte celular. La mayoría de las drogas de este grupo fueron originalmente aplicadas en dosis altas en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, en dosis más bajas o en forma de "pulsos" intravenosos de aplicación periódica se han demostrado útiles como agentes inmunosupresores y antiinflamatorios. Su acción se ejerce, principalmente, sobre los linfocitos B pudiendo llegar a causar la supresión de la producción de anticuerpos e hipogammaglobulinemia, los linfocitos T CD8 a bajas dosis y los linfocitos T CD4 a altas dosis.

Actúan principalmente en células en división y su uso implica riesgos como el desarrollo de aplasia medular, alopecia, esterilidad, cistitis hemorrágica. Usados a largo plazo puede llegar a



Tabla 39-1. Inmunomoduladores

Antiproliferativos

Alquilantes

Inhibidores del metabolismo de las purinas y de las pirimidinas

Antagonistas de las Inmunofilinas

Glucocorticoides

Agentes biológicos

Globulinas antilinfocito y antitimocito

Gammaglobulina endovenosa

Anticuerpos monoclonales

Citoquinas

Trasplante de médula ósea

Células autólogas modificadas

Inmunostimuladores sintéticos

desarrollarse tumores, como cáncer vesical y leucemia mieloide.

Uno de los más usados es la ciclofosfamida, de gran utilidad en el tratamiento de formas severas de enfermedades reumatológicas autoinmunes e inflamatorias.

b) Inhibidores del metabolismo de las purinas y pirimidinas

Metotrexato. Es un inhibidor de la tetrahidrofolato reductasa bloqueando así la síntesis de timidilato, la síntesis *de novo* de purinas y la división celular. En dosis altas, produce una fuerte toxicidad hematológica y digestiva, aunque este efecto puede neutralizarse con la administración preventiva de ácido fólico. A dosis bajas inhibe la función de las células B, suprime la función macrofágica, la quimiotaxis de los neutrófilos, la producción de ciertos leucotrienos, y la producción de citoquinas como la IL-1 (IL: Interleuquina). No se asocia con mayor riesgo de mutagenicidad ni teratogenicidad, pero posee toxicidad hepática y puede producir fibrosis pulmonar. Se utiliza en el tratamiento de enfermedades reumatológicas autoinmunes e inflamatorias.

Azatioprina. Es un derivado de la 6-mercaptopurina; no es activo por sí mismo, sino por sus derivados. Bloquea la transformación del ácido inosínico en ácido adenílico, precursor de bases purínicas (guanina, hipoxantina). Su acción se ejer-

ce, principalmente, sobre los linfocitos T CD4 y CD8 y sobre las células NK, pero también sobre el conjunto de células hematopoyéticas, por lo cual se requiere un ajuste muy preciso de sus dosis. La administración concomitante de inhibidores de la síntesis de ácido úrico (alopurinol), debe evitarse debido al riesgo de aplasia medular. La sobredosis puede producir pancitopenia, macrocitosis aislada y lesiones hepáticas. Este fármaco es utilizado principalmente en la prevención del rechazo de trasplantes de órganos, con frecuencia asociado a corticoides. Una vez que el esquema terapéutico se establece, la dosis se mantiene salvo la ocurrencia de una patología infecciosa. La azatioprina ha sido utilizada en forma prolongada en trasplantes dada la ausencia de nefrotoxicidad a dosis habituales, y que en todo caso, requiere ajuste de dosis si existe insuficiencia renal. La tioguanosina, uno de sus metabolitos, es capaz de producir rupturas cromosómicas, pero el riesgo oncogénico de la azatioprina en monoterapia no está bien establecido. En las enfermedades autoinmunes, la azatioprina se utiliza principalmente en las formas corticorresistentes o corticodependientes con el fin de reducir la dosis de éstos y sus efectos indeseables.

c) Nuevos inhibidores de la biosíntesis de nucleótidos

Estos fármacos que inhiben en forma similar las respuestas linfocitarias T y B, pero con una menor incidencia de mielosupresión que los agentes anteriormente analizados. La **mizobirina** y el **ácido micofenólico** inhiben la acción de la inosinmonofosfatodehidrogenasa, suprimiendo la síntesis de nucleótidos guanínicos. Su uso es creciente en la prevención del rechazo de alotrasplantes, con muy buenos resultados. **Brequinar** inhibe la enzima dihidroorotato dehidrogenasa, requerida para la síntesis *de novo* de pirimidinas.

2.2. Antagonistas de las Inmunofilinas

Ciclosporina A. Es un derivado de origen fúngico, descubierto en 1976, que actúa selectivamente frente a linfocitos T activados. Se une a receptores intracitoplasmáticos, las ciclofilinas A, B, C y D de la familia de las inmunofilinas; el complejo formado inhibe la acción de la fosfatasa 2B o calcineurina. Este efecto conduce a un bloqueo de la transcripción, calcio dependiente, del gen de IL-2 y de otras citoquinas como IL-3, IL-4 e



interferón gamma (IFN- γ). Al contrario de los fármacos ya analizados, que actúan sobre todas las células que sintetizan activamente DNA, este fármaco actúa exclusivamente sobre los linfocitos activados, principalmente sobre los linfocitos T CD4. No tiene efectos adversos sobre la hematopoyesis y no modifica la población de linfocitos T de memoria. Su acción inmunosupresora es rápidamente reversible después de suspender la terapia.

Por su gran potencia inmunosupresora y su relativa mayor selectividad de acción este agente farmacológico ha revolucionado la era de los trasplantes, mejorando muy significativamente la sobrevida y la calidad de vida de los pacientes. También se utiliza en formas severas de enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

Entre sus efectos secundarios podemos mencionar: nefrotoxicidad, con hipertensión arterial secundaria, hipertrofia gingival, hipertriosis, parestesias distales, síndromes del tipo hemolítico-urémico, y raramente, hepatitis con patrón colestásico.

FK506. Es un macrólido de origen fúngico, que actúa a menores dosis que la ciclosporina A. Este fármaco se liga a una inmunofilina citoplasmática, la FKBP, y este complejo también inhibe, a nivel transcripcional, la síntesis de IL-2 y otras citoquinas.

Rapamicina. Es otro macrólido que se une al mismo receptor citoplasmático que FK506 pero sus efectos son distintos. Este fármaco bloquea la actividad de una serintreoninquinasa y su asociación con la ciclina D1, que controla la entrada de las células a la fase S del ciclo celular. Por ello, la rapamicina no disminuye la síntesis de citoquinas pero impide la expansión clonal de linfocitos T estimulados por antígenos.

2.3. Glucocorticoides

Los glucocorticoides constituyen uno de los grupos de drogas más importantes en el tratamiento de enfermedades mediadas inmunológicamente. Son además, los más potentes antiinflamatorios conocidos. Estos fármacos son capaces de unirse a receptores intracitoplasmáticos y son trasladados al núcleo celular, donde el complejo se fija a secuencias reguladoras específicas, los elementos de respuesta a glucocorticoides, modulando positiva o negativamente la transcripción de ciertos genes,

en particular, genes que codifican para citoquinas. También tienen efectos sobre la traducción del RNA, la síntesis y la secreción de citoquinas (IL-2 e IFN- γ)

In vivo, los glucocorticoides inhiben el acceso de los leucocitos a focos inflamatorios. A dosis altas, inducen una leucocitosis por movilización del "pool" marginal y una linfopenia que afecta principalmente a linfocitos T CD4, por redistribución de éstos. Tienen por lo tanto su mayor efecto sobre la inmunidad celular.

Su acción antiinflamatoria se explica, principalmente, por los efectos que poseen sobre macrófagos y neutrófilos. Ellos inhiben la síntesis de IL-1, IL-6 y en menor grado, de TNF. También disminuyen la síntesis de prostaglandinas y de leucotrienos, y la actividad de la fosfolipasa A2, además de inhibir la ciclooxigenasa de los macrófagos. Inhiben la óxido nítrico sintetasa y así la producción del vasodilatador local, óxido nítrico (NO). También son inhibidores de distintas proteasas: collagenasa, elastasa y activador del plasminógeno y de la producción de derivados del NO. Actúan sobre las células endoteliales e inhiben la permeabilidad vascular inhibiendo la expresión de los genes MHC de clase II y de las moléculas de adhesión ELAM-1 e ICAM-1. En el hombre, sólo los timocitos y los linfocitos T activados son susceptibles a la lisis por apoptosis.

Los corticoides de síntesis más utilizados como inmunosupresores son la **prednisona** y la **metilprednisolona**. Los efectos secundarios son múltiples: síndrome Cushingoide, hipertensión arterial, osteoporosis, cataratas, diabetes, alteración del crecimiento, acné, defectos de cicatrización, entre otros.

2.4. Agentes biológicos

Globulinas antitimocitos o antilinfocitos. Se obtienen inmunizando conejos o caballos con estas células de origen humano y se utilizan, principalmente, en la prevención y tratamiento de los rechazos de trasplante. Tienen el severo riesgo de inducir el desarrollo de la enfermedad del suero, debido a la producción de anticuerpos contra estos anticuerpos heterólogos (de otra especie), que se manifiesta clínicamente en 10 a 30% de los pacientes, alrededor del décimo día de tratamiento, con la aparición de fiebre, artritis, adenopatías dolorosas, y leucocitosis con trombocitopenia y caída del nivel plasmático del fármaco administrado. Esta patología implica la detención de la



terapia o el cambio por un anticuerpo de otro origen.

Inmunoglobulinas intravenosas: Se utilizan inmunoglobulinas intravenosas como terapia de reemplazo en pacientes con inmunodeficiencias primarias de anticuerpos (ver capítulo 30), y también en algunas inmunodeficiencias secundarias con déficit de inmunoglobulinas.

Existen variadas inmunoglobulinas intravenosas comerciales. Estas deben estar libres de agregados, y provenir de un "pool" de más de 1.000 donantes en los cuales se ha descartado la presencia de infecciones transmisibles como la causada por el VIH y otros virus.

La terapia de reemplazo con inmunoglobulinas está indicada en pacientes con niveles de IgG significativamente disminuidos y que tienen una deficiencia de anticuerpos documentada, de significado clínico. Su propósito es proveer cantidades suficientes de anticuerpos específicos, para disminuir la frecuencia y severidad de las infecciones que presentan estos pacientes y mejorar su calidad de vida.

Anticuerpos monoclonales. Producidos por un solo clon de células B, son monoespecíficos y homogéneos. Los anticuerpos monoclonales se utilizan como agentes terapéuticos principalmente en el tratamiento del rechazo agudo de alotrasplantes, *in vitro* en la eliminación de células de la médula ósea, como agentes anti-tumorales y en el tratamiento de ciertas enfermedades inflamatorias crónicas.

Entre los anticuerpos monoclonales más usados, especialmente en el tratamiento del rechazo agudo de trasplantes se encuentra el anticuerpo monoclonal anti-CD3 (OKT3), con poderoso efecto inmunosupresor. El sitio probable de acción de este fármaco es la interferencia con señales de transducción que siguen al reconocimiento del receptor T al antígeno presentado por células presentadoras de antígeno. Además existiría un efecto de lisis directa de los linfocitos T CD3 debido a que se produce una rápida caída de los recuentos linfocitarios.

Existen otros anticuerpos monoclonales aprobados para su uso clínico, utilizados también en la prevención y manejo de rechazos de trasplantes, algunos tumores y en enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoidea y la enfermedad de Crohn.

Como estos fármacos son de origen murino,

tienen el potencial de inducir anticuerpos en el individuo y desencadenar una enfermedad del suero y otros síndromes de hipersensibilidad, pero esto es raro.

La modificación de este tipo de fármacos sustituyendo la región Fc de la inmunoglobulina por una secuencia aminoacídica de anticuerpo humano, puede colaborar en producir anticuerpos monoclonales menos sensibilizantes y con mejor cinética *in vivo*.

Actualmente su producción *in vitro* en sistema de producción industrial, está llevando a un requerimiento cada vez menor del uso de animales. A través de la ingeniería genética se están generando anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados e incluso humanos.

2.5. Citoquinas

Interferones. Comprenden una familia de proteínas (glicoproteínas en el estado natural y proteínas no glicosiladas producidas por tecnología de DNA recombinante) clasificadas como alfa, beta y gamma (ver capítulo 11). El IFN- α es producido por los leucocitos polinucleares, el IFN- β por los fibroblastos, y el IFN- γ por los linfocitos T.

Además de sus conocidas propiedades antivirales, los interferones tienen efectos antiproliferativos contra células tumorales, y efectos específicos sobre las funciones inmunológicas. El IFN- α está estructuralmente relacionado al IFN- β y ambos son producidos en respuesta a la estimulación con virus y polirribonucleótidos. En cambio, el IFN- γ no está relacionado estructuralmente con ellos, y es producido por los linfocitos T en respuesta a estímulos específicos, mitógenos e IL-2. Además, tiene importantes propiedades inmunomoduladoras que no poseen los otros interferones.

Los IFNs que están actualmente en uso clínico son IFNs naturales parcial o altamente purificados, e IFNs altamente purificados producidos por ingeniería genética o recombinantes. Su uso y eficacia han sido difíciles de probar, tanto por sus variadas preparaciones, vías de administración y dosis, como por la heterogeneidad de las situaciones clínicas en las que se han evaluado.

Sólo recientemente han surgido algunas indicaciones precisas en el uso de estos agentes. Fundamentalmente éstas se refieren al uso del IFN- α en el tratamiento de las hepatitis virales crónicas por virus B y virus C, IFN- β en la esclerosis múltiple e IFN- γ en la enfermedad granulomatosa cró-



nica, una inmunodeficiencia primaria que se caracteriza por un defecto del metabolismo oxidativo de los leucocitos (ver capítulo 30).

En la actualidad se dispone de algunos IFNs "pegilados"; esto es, unidos a polietilenglicol, lo que facilita su utilización permitiendo su administración semanal, con menos efectos adversos.

Interleuquina-2. Esta citoquina producida por los linfocitos T activados, facilita y permite la expansión clonal de estas células. Además, estimula la producción de células NK, células killer activadas con linfoquinas (células LAK) (ver capítulo 37), y de linfocitos B. Estimula la actividad NK directamente y quizás también indirectamente estimulando la producción de IFN- γ . Puede también estimular a los linfocitos T a producir otras linfoquinas activadoras de los linfocitos B.

La IL-2 se ha estudiado en pacientes con cáncer y en la infección VIH/SIDA. En la actualidad se utiliza, combinada con IFN- α , en el tratamiento del cáncer renal metastásico, y asociada con terapia antirretroviral específica, en ciertos casos de SIDA.

También se está evaluando la administración intratumoral de genes de citoquina para lograr una secreción paracrina de citoquinas inmunoestimuladoras, por ejemplo, del gen de la IL-2 en cáncer renal metastásico.

2.6. Trasplante de médula ósea

El objetivo del trasplante de médula ósea es el reemplazo de las células defectuosas o ausentes del receptor, con células inmunocompetentes normales capaces de autorreplicarse. La médula ósea normal contiene células pluripotenciales que pueden dar origen a eritrocitos, granulocitos, células de la línea monocito-macrofágica, megacariocitos, y células T y B inmunocompetentes. Constituye actualmente la única forma de terapia adecuada para pacientes con inmunodeficiencias severas, celulares y combinadas. En trasplantes HLA-idénticos la sobrevida es de un 80%, con evidencias de injerto exitoso de células T y células pluripotenciales del donante. En trasplantes HLA-haploidénticos, aproximadamente el 54% de los pacientes sobrevive.

2.7. Células autólogas modificadas

Son linfocitos T y células NK activadas por incubación con IL-2, a las que se denomina célu-

las LAK. Método descrito en 1980, ha sido extensamente estudiado en una variedad de tumores metastásicos y en la actualidad se evalúan varias modificaciones del método original: células LAK alogénicas, infusión arterial directa de células LAK y de IL-2 en los órganos afectados, células infiltrantes del tumor activadas (células TIL), etc.

2.8. Isoprinosine

Isoprinosine es un complejo que contiene inosina y paracetaminobenzoato de dimetilamino-2-propanol. Gracias a su componente inosina, este fármaco estimula a los linfocitos T lo que puede ser verificado por un aumento de la respuesta de estas células a los mitógenos. Además de este efecto sobre los linfocitos T, parece aumentar su número así como el número y función de las células NK. También aumenta la función de los linfocitos B activados por el Ag.

Isoprinosine estimula la síntesis de RNA en linfocitos activados, a través de la activación de la vía "salvaje" de las purinas.

Muchas infecciones virales frecuentemente disminuyen la inmunidad celular en forma transitoria, en muchos casos esta forma de inmunosupresión puede corregirse con el uso de isoprinosine.

3. EFECTOS ADVERSOS DE LOS INMUNOMODULADORES

Los tratamientos inmunosupresores producen un déficit inmunitario que puede traducirse en patologías infecciosas o tumorales, por lo cual estas terapias deben ser cuidadosamente vigiladas del punto de vista clínico y de laboratorio.

La inmunosupresión intensa acarrea el riesgo de infecciones oportunistas, particularmente pneumocystosis, toxoplasmosis, listeriosis, legionelosis, aspergillosis y criptosporidiosis.

Las infecciones virales son frecuentes en los inmunodeprimidos, especialmente por citomegalovirus, herpes simplex 1 y 2, virus de Epstein-Barr, virus varicella zoster, papilomavirus e incluso, por virus de Hepatitis B y C.

La mayor parte de las infecciones virales crónicas pueden conducir al desarrollo de cánceres, especialmente después de terapias inmunosupresoras prolongadas: epitelomas espinocelulares, cáncer de cuello uterino, linfomas, hepatocarcinomas, entre otros.



Existen distintos protocolos terapéuticos en trasplantes y en enfermedades autoinmunes, y actualmente están en ensayo diferentes metodologías de manipulación de la respuesta inmune, que pretenden minimizar las consecuencias negativas de estas terapias.

LECTURAS SUGERIDAS

Bounpas, D., "Glucocorticoid Therapy for Immune-mediated Diseases: Basic and Clinical Correlates", *Ann Int Med.*, 119:1198,1993.

Buckley, R., "Bone marrow reconstitution in primary immunodeficiency" en **Clinical Immunology** (Rich R., editor), Mosby-Year Book, Inc St Louis, Nissouri, 1996.

Calabresi, P., Chabner B., "Antineoplastic agents" in Goodman and Gillman's, **The Pharmacologic Basis of Therapeutics**, 8va. Edición, McGraw Hill, New York, 1993.

Hong J.C., Kahan B.D. "Immunosuppressive agents in organ transplantation: past, present, and future", *Sem nephrol* 20; 108, 2000.

International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group, "A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease", *N Eng J Med*, 324:509,1991.

Rosenberg, S.; Yannelli, J.; Yang, J. et al., "Treatment of patients with metastatic melanoma using autologous tumor infiltrating lymphocytes and interleukin-2, *J Natl Cancer Inst*, 86: 1159, 1994.

Rovira P.; Mascarell, L.; Truffa-Bachi, P., "The impact of immunosuppressive drugs on the analysis of T cell activation", *Curr Medicin Chem* 7: 673; 2000.



Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

SECCIÓN V

MÉTODOS INMUNOLÓGICOS Y DE BIOLOGÍA MOLECULAR







Capítulo 40

MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS

Darwins Castillo A. y Carolina Valenzuela B.

1. Introducción

2. Inmunoanálisis

2.1. Inmunoanálisis con reactivos no marcados

2.1.1. Reacción de precipitación

2.1.1.1. Reacción de precipitación en medio líquido

- a) Precipitación en tubo
- b) Floculación
- c) Turbidimetría
- d) Nefelometría
- e) Precipitación de complejos inmunes solubles

2.1.1.2. Reacción de precipitación en gel

- a) Inmunodifusión doble
- b) Inmunodifusión radial
- c) Inmunolectroforesis
- d) Inmunofijación
- e) Contraelectroforesis
- f) "Rocket" inmunolectroforesis
- g) Inmunolectroforesis cruzada o bidimensional de Laurell

2.1.2. Reacción de aglutinación

- a) Aglutinación directa
- b) Aglutinación indirecta

c) Aglutinación pasiva

2.1.3. Reacción con participación del complemento

- a) Fijación del complemento
- b) Actividad hemolítica del complemento

2.2. Inmunoanálisis con reactivos marcados

2.2.1. Inmunoanálisis fluorescente

- a) Microscopía inmunofluorescente
- b) Inmunoanálisis de fluorescencia polarizada
- c) Inmunoanálisis de fluorescencia unida a enzima
- d) Citometría de flujo

2.2.2. Enzimainmunoanálisis (EIA)

- a) EIA homogéneo
- b) EIA heterogéneo
- c) Electroinmunotransferencia o "Western blot" o "Immunoblotting"

2.2.3. Radioinmunoanálisis (RIA)

- a) RIA en fase soluble
- b) RIA en fase sólida
- c) Detección inmunoradiométrica para antígeno

2.2.4. Quimiluminiscencia

2.2.5. Bioluminiscencia





RESUMEN

La base de los métodos inmunoquímicos es la unión del antígeno y/o hapteno con el anticuerpo, es una reacción específica, de alta afinidad y reversible. Está definida por una constante de equilibrio o de asociación intrínseca (K) que es una medida de fuerza de la interacción de la reacción para formar complejos estables.

Los anticuerpos son proteínas relativamente estables, y sus reacciones con haptenos o antígenos pueden ser estudiados en un amplio rango de condiciones. Las modificaciones en la constante de asociación inciden en las fuerzas que estabilizan los complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). La reacción es dependiente de algunos parámetros como: temperatura, pH y fuerza iónica del medio que deben considerarse al llevar a cabo un inmunoanálisis.

Los **inmunoanálisis** pueden ser divididos en métodos que requieren de sistemas Ag-Ac no marcados y marcados. La mayoría de los inmunoanálisis no marcados se basan en reacciones inmunes secundarias (precipitación). Los inmunoanálisis marcados se basan en reacciones inmunes primarias (inmunoanálisis fluorescentes).

En el inmunoanálisis con reactivos no marcados, la interacción de antígenos solubles macromoleculares y anticuerpos específicos llevan a la formación de complejos, que en una relación molar equivalente precipitan en solución (**precipitación**). Existe una reacción anómala llamada **floculación**, en que la precipitación se observa sólo en un rango muy estrecho de la proporción Ag/Ac. La interacción de antígenos particulados con sus anticuerpos específicos producen **aglutinación**. La **turbidimetría** y **nefelometría** determina niveles de antígeno o de anticuerpo en baja concentración, formando pequeños agregados que producen una turbidez que puede ser medida por disminución y dispersión de la luz incidente, respectivamente.

Los métodos de **precipitación en gel** detectan la presencia y/o concentración de antígenos y/o anticuerpos por la formación de bandas, anillos o arcos de precipitado que corresponden a complejos antígeno-anticuerpo en la zona de equivalencia (**inmunodifusión doble**, **inmunodifusión radial**, **inmunolectroforesis**, **inmunofijación**, **contrainmunolectroforesis**, **“rocket” inmunolectroforesis** e **inmunolectroforesis cruzada**).

El inmunoanálisis con reactivos marcados se clasifica en homogéneo o heterogéneo y puede ser de dos tipos competitivo y no competitivo. El **inmunoanálisis fluorescente** incluye la **microscopía inmunofluorescente** que corresponde a la tradicional inmunofluorescencia (IF) que es una técnica inmunohistoquímica o inmunocitoquímica que permite la localización de antígenos en células ó tejidos, y la detección y titulación de anticuerpos específicos; el **inmunoanálisis de fluorescencia polarizada (FPIA)** que es homogéneo y competitivo; el **inmunoanálisis de fluorescencia unida a enzima (ELFIA)** que es heterogéneo y puede ser competitivo o no competitivo; y la **citometría de flujo** que permite medir la cantidad de anticuerpo monoclonal fluorescente unido en cada célula que atraviesa un láser e identificarla según su tamaño y granularidad de acuerdo a la forma que defleca o dispersa la luz del láser.

El **enzaimmunoanálisis (EIA)** se basa en dos fenómenos biológicos: reacción inmunológica (unión Ag-Ac) y la amplificación por reacciones químicas (enzima que actúa sobre el sustrato). Se dispone de **EIA homogéneo** representado por el “enzyme-multiplied immunoassay technique” (EMIT) que además es competitivo y de **EIA heterogéneo**, como el “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) y el “microparticle enzyme immunoassay” (MEIA) que además son no competitivos. La **electroinmunotransferencia** combina la electroforesis en gel SDS-poliacrilaminada y el enzaimmunoanálisis. El **radioinmunoanálisis (RIA)** utiliza antígeno o anticuerpo, generalmente marcados con isótopos como ^{125}I o, eventualmente, ^{131}I y este inmunoanálisis puede llevarse a cabo en fase soluble o sólida.

Finalmente existe el **inmunoanálisis quimiluminiscente** que utiliza la emisión de luz producida en ciertas reacciones químicas de oxidación, como por ejemplo, la oxidación del luminol y el **inmunoanálisis bioluminiscente** que se basa en un sistema natural la D-luciferina/luciferasa, en que la luciferasa cataliza la oxidación de la D-luciferina en presencia de ATP y Mg^{+2} a oxiluciferina, con emisión de luz a 546 nm.

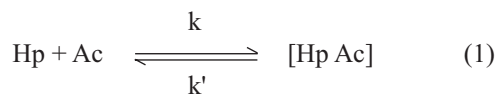


1. INTRODUCCIÓN

La unión del antígeno (Ag) con el anticuerpo (Ac) es una reacción fundamental en la metodología inmunoquímica. En general, la mayoría de los antígenos son macromoléculas, especialmente proteínas con una estructura completamente establecida en que regularmente no conocemos la identidad, ni la conformación del determinante antigénico que reacciona con el anticuerpo, ni el número por molécula de Ag. Para comprender la reacción Ag-Ac y evitar reacciones complicadas con Ags macromoleculares, en adelante se van a considerar reacciones de Acs específicos con moléculas de haptenos (Hp) simples.

La producción de Acs contra Hp se obtiene generalmente inmunizando animales con el Hp unido covalentemente a una proteína. La formación de complejos específicos Hp-Ac puede ser examinados en detalle con sistemas relativamente simples y los anticuerpos que reaccionan son fácilmente aislados e identificados.

Como se ha señalado, la base de los métodos inmunoquímicos es la unión del antígeno y/o hapteno con el anticuerpo. Esta reacción se caracteriza por ser específica, de alta afinidad y reversible. Está definida por una constante de equilibrio o de asociación intrínseca (K) que es una medida de la fuerza de interacción de la reacción para formar un complejo estable.



$$K = \frac{k}{k'} = \frac{[\text{Hp Ac}]}{[\text{Hp}] [\text{Ac}]} \quad (2)$$

k : constante de asociación

k' : constante de disociación

K representa la afinidad intrínseca de un sitio activo representativo del anticuerpo por un hapteno o ligando en término de concentración en equilibrio, que puede calcularse midiendo la concentración de hapteno o ligando libre.

Existen varios métodos para distinguir hapteno libre (Hp) de hapteno unido (Hp-Ac),

como ultracentrifugación, "quenching" fluorescentes, y otros. Pero, el método que se utiliza corrientemente es el equilibrio de diálisis.

En forma práctica, en el laboratorio se calcula la constante de asociación intrínseca promedio (Ko) obtenida a través de la ecuación de Scatchard, que se define por la concentración de hapteno o ligando libre requerida para ocupar la mitad de los sitios activos o de unión de los anticuerpos. De acuerdo a esta premisa, en la ecuación 2:

$[\text{Hp Ac}] = [\text{Ac}]$, por lo tanto,

$$K_o = \frac{1}{[\text{Hp}]}$$

La unidad de Ko es el recíproco de la concentración, es decir, litro/moles.

Los anticuerpos son proteínas relativamente estables y sus reacciones con haptenos o antígenos pueden ser estudiados en un amplio rango de condiciones. Las modificaciones que se producen en la constante de asociación inciden en las fuerzas que estabilizan los complejos Ag-Ac. Por lo tanto, las características de la reacción es dependiente de varios parámetros como: temperatura, pH y fuerza iónica del medio. Por ejemplo, un aumento de la temperatura puede afectar la interacción del anticuerpo con hapteno o antígeno que puede disminuir o no la constante de asociación y, por lo tanto, modificar la afinidad. Sin embargo, la práctica general es incubar la mezcla de anticuerpos y antígenos a 37°C o a temperatura ambiente (aproximadamente 22° C).

La unión del hapteno p-aminobenzoato con el anticuerpo anti-p-aminobenzoato disminuye tanto con la reducción de pH de 7 a 4, como con el aumento de la concentración de cloruro de sodio (NaCl) desde 0,1 a 1 M. Sin embargo, idénticos cambios no afectan a la unión del hapteno 2,4-dinitroanilina (DNP) a su anticuerpo anti-DNP. La explicación se debería probablemente a que el grupo COO⁻ del benzoato interactúa con un grupo cargado positivamente del sitio de combinación de los anticuerpos y que en cambio, en el grupo DNP las interacciones iónicas no son importantes para la unión con el sitio de su anticuerpo.



2. INMUNOANÁLISIS

Los inmunoanálisis son actualmente herramientas de amplio uso en los laboratorios para medir diferentes analitos biológicos, debido a su facilidad de trabajo, como en la obtención de resultados sensibles y específicos.

Los inmunoanálisis pueden ser divididos en métodos que requieren de sistemas Ag-Ac **no marcados** y **marcados**. La mayoría de los inmunoanálisis no marcados se basan en reacciones inmunes secundarias, como por ejemplo, precipitación y aglutinación. Se miden por métodos cuya base es la dispersión de la luz o por recuento de partículas o células. Los inmunoanálisis marcados se basan en reacciones inmunes primarias, como por ejemplo, inmunoanálisis fluorescente y enzaimmunoanálisis.

2.1. Inmunoanálisis con reactivos no marcados

La interacción de antígenos solubles macromoleculares (polivalentes) y anticuerpos específicos llevan a la formación de complejos

(Ag-Ac) con relación variable de Ag o de Ac, que frecuentemente llegan a ser insolubles y precipitan en solución. Esta se conoce como **reacción de precipitación** que es dependiente de la relación molar Ag y Ac. La formación de complejos de haptenos o de pequeños antígenos univalente con sus anticuerpos son solubles. La interacción de antígenos particulados, como microorganismo o células con sus anticuerpos específicos producen la **reacción de aglutinación**. En la tabla 40-1 se muestran los métodos de inmunoanálisis con reactivos no marcados.

2.1.1. Reacción de precipitación

2.1.1.1. Reacción de precipitación en medio líquido

a) Precipitación en tubo. La precipitación en tubo es un procedimiento que no se usa corrientemente en el laboratorio, pero que es necesario conocer para apreciar las características generales de la reacción de anticuerpo con antígeno de alto peso molecular en medio líquido. En forma práctica se

Tabla 40-1. Inmunoanálisis con reactivos no marcados

Reacción de precipitación	
En medio líquido	Precipitación en tubo Floculación Turbidimetría Nefelometría Precipitación de complejos inmunes solubles
En gel	Inmunodifusión doble Inmunodifusión radial Inmunoelectroforesis Inmunofijación Contrainmunoelectroforesis “Rocket” inmunoelectroforesis Inmunoelectroforesis cruzada o bidimensional de Laurell
Reacción de aglutinación	
	Aglutinación directa Aglutinación indirecta Aglutinación pasiva
Reacción con participación del complemento	
	Fijación del complemento Actividad hemolítica del complemento



realiza en una batería de tubos que contienen un volumen fijo de antisuero (concentración fija de anticuerpo) a los que se les añade diferentes concentraciones de antígeno, midiendo la proteína total del precipitado formado y detectando el excedente de Ac o de Ag en el sobrenadante.

Como se muestra en la figura 40-1, a una concentración definida de anticuerpos, la cantidad de complejo Ag-Ac precipitado aumenta con la cantidad de antígeno añadido hasta un valor máximo, que sobrepasándolo lleva a una disminución progresiva de la precipitación. Se produce precipitación de una cantidad máxima de anticuerpos por una cantidad óptima de antígeno.

acuerdo a la teoría del enrejado ("lattice theory") de Heidelberger, Kendall y Marrack. Ellos sugirieron que la precipitación puede ser consecuencia del crecimiento del agregado antígeno-anticuerpo de tal manera que la molécula del antígeno se une a más de una molécula de anticuerpo y cada molécula de anticuerpo se une a más de una de antígeno en que participan activamente interacciones Fc-Fc, de manera que cuando el agregado excede un volumen crítico, precipita espontáneamente.

El precipitado formado puede disociarse y volver al equilibrio con adición de Ag fresco. Cuando se produce un exceso suficiente se forman pequeños

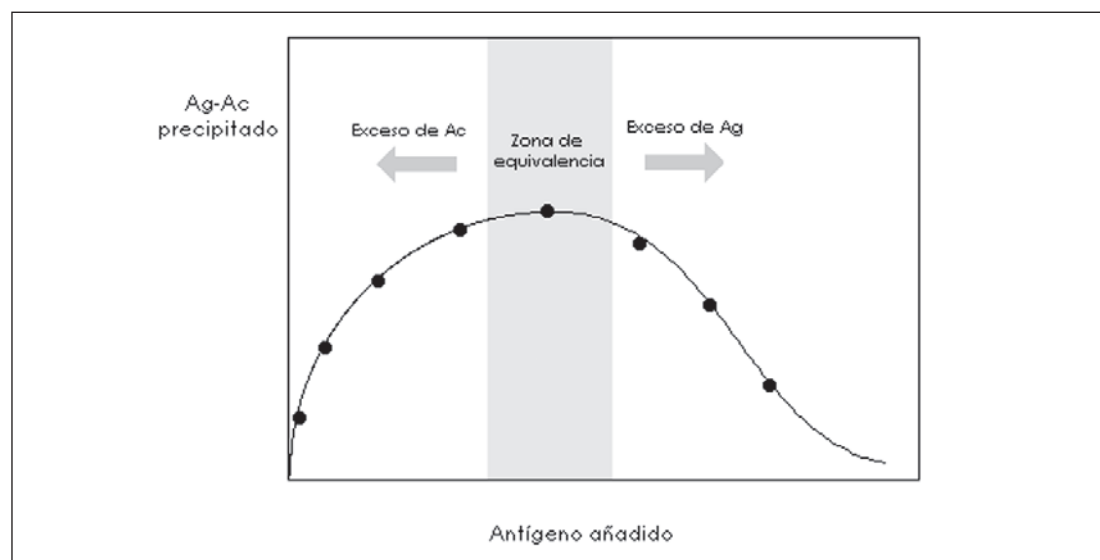


Figura 40-1. Curva de precipitación para un complejo específico Ag-Ac.

En la curva de precipitación se encuentra una zona de exceso de anticuerpos, el sobrenadante contiene anticuerpo libre, una zona de exceso de antígeno, el sobrenadante contiene antígeno libre y una zona de equivalencia o punto de equivalencia, el sobrenadante está libre de anticuerpo y antígeno libre.

Es importante tener presente que en las zonas de exceso de anticuerpos y de antígenos se detectan complejos inmunes solubles. En la zona de exceso de antígeno los sobrenadantes contienen complejos solubles de varias composiciones como $Ag_4 Ac_3$, $Ag_3 Ac_2$ y $Ag_2 Ac$. En el extremo de esta zona los complejos que principalmente se forman son $Ag_2 Ac$ que se atribuye a los dos sitios activos o a la divalencia de la molécula de anticuerpo IgG. Este fenómeno es explicado de

complejos solubles y el precipitado se solubiliza.

b) Floculación. La floculación es una reacción de precipitación anómala, donde la precipitación se observa solamente en un rango muy estrecho de la proporción Ag/Ac. Los agregados insolubles se forman en una relativa gran cantidad de Ag. Estas reacciones se dan sólo con algunos antisueros, como por ejemplo, sueros de caballos antitoxina diftérica, antitoxina tetánica y antitoxinas estreptocócicas y suero humano anti-tiroglobulina. Es posible que los antisueros que floculan contengan algunos anticuerpos no precipitantes de alta afinidad que deben ser previamente saturados con el antígeno.

c) Turbidimetría. La turbidimetría cuantifica la nubosidad o turbidez de una solución en que



reacciona el antígeno con el anticuerpo en baja concentración. El fotodetector está en línea a la luz incidente y la solución, en ángulo de 0° o 180° y mide una disminución de la señal o reducción en la intensidad de la luz que ocurre como resultado de la combinación de la reflexión, absorción o dispersión de la luz incidente.

d) Nefelometría. La nefelometría es una técnica que permite determinar niveles de antígeno o de anticuerpo en soluciones a muy baja concentración. La nubosidad o turbidez que producen los pequeños inmunocomplejos es medida por la luz que se dispersa ("scattered light"), a través de un fotodetector que está en un ángulo diferente a la fuente de luz incidente (30° a 90°). Se puede obtener una gran sensibilidad usando luz monocromática de un rayo láser y por adición de polietilenglicol que aumenta el tamaño de los agregados. En el laboratorio clínico se está usando masivamente por sus ventajas en la cuantificación de proteínas, como: rápido, altamente automatizado, simple de operar, usa pequeños volúmenes de muestra y reactivo, alta sensibilidad (menor que 1 ng/litro) y excelente precisión.

e) Precipitación de complejos inmunes solubles. Existen algunas situaciones que hacen necesario precipitar complejos inmunes solubles para identificar el antígeno o determinar el contenido de anticuerpos, que se lleva a cabo modificando la solubilidad del complejo con polietilenglicol al 2% o sulfato de amonio al 50% o por adición de un reactivo anti-inmunoglobulinas (anticuerpos anti-inmunoglobulinas o proteína A de estafilococo).

2.1.1.2. Reacción de precipitación en gel

Los métodos de **precipitación en gel** permiten detectar la presencia y/o concentración de antígenos y/o anticuerpos presente, por la formación de bandas opacas de precipitado que corresponden a complejos antígenos-anticuerpos en la zona de equivalencia.

a) Inmunodifusión doble. La inmunodifusión doble fue desarrollada principalmente por Ouchterlony en Suecia. Se basa en la difusión del Ag y el Ac en un medio semisólido (gel de agar), formando bandas de precipitación donde los reactantes están en proporciones equivalentes. Estos complejos son insolubles y pueden ser analizados visualmente.

La técnica se basa en preparar un gel uniforme de agar en una placa Petri o portaobjeto. En el agar se practica perforaciones de un diámetro y esquema previamente establecidos. Las soluciones que contiene el antígeno y el anticuerpo se colocan en perforaciones adyacentes y se deja difundir hasta formar líneas o bandas de precipitación. La intensidad, nitidez y posición de estas bandas es dependiente de la concentración del Ag y Ac.

La inmunodifusión doble se utiliza para análisis de antígenos y anticuerpos. Permite determinar la relación immunoquímica entre dos antígenos a través de componentes idénticos o de reactividad cruzada. Se distinguen tres patrones de reactividad: reacción de identidad, de no identidad y de identidad parcial o cruzada (figura 40-2). También, puede utilizarse para determinar monoespecificidad de un antisuero y para conocer el título de los anticuerpos.

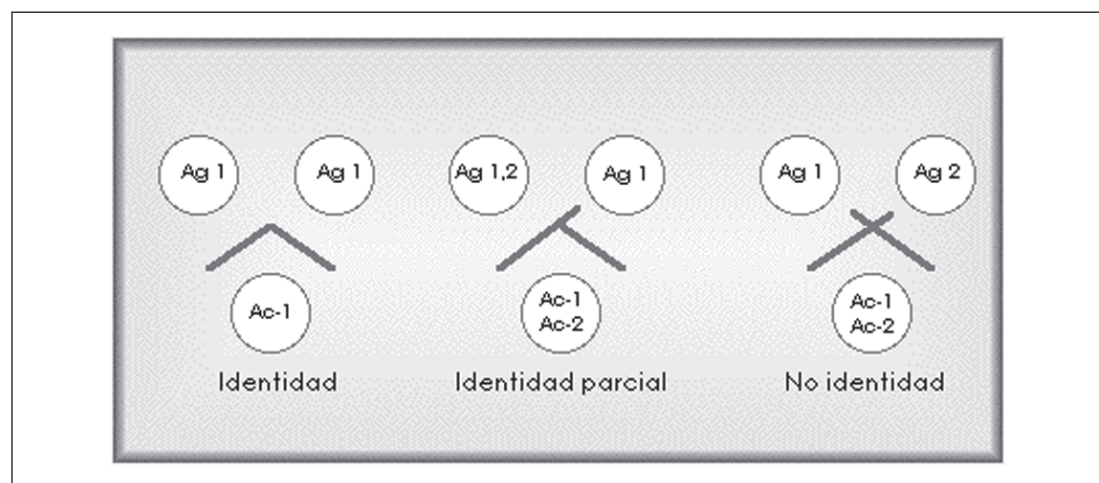


Figura 40-2. Inmunodifusión doble. Reacciones de precipitación en agar que ilustran reacciones de identidad, identidad parcial y no identidad.



La figura 40-3 muestra la utilidad de la inmunodifusión doble en la detección de antígenos proteicos en orina.

b) Inmunodifusión radial. La inmunodifusión radial es una técnica de precipitación en gel, en que el agar se ha mezclado con un antisuero mono-específico sobre un portaobjeto o placa de Petri. Se hacen perforaciones cilíndricas que se llenan con volúmenes fijos de soluciones de referencia de antígeno para el cual el antisuero es específico y con soluciones o muestras problemas. La difusión del Ag en el agar permite la formación de anillos de precipitación, cuya área es proporcional a la concentración inicial del Ag. Al término de 16 a 48 horas de difusión en cámara

húmeda y temperatura constante, se leen los diámetros del halo de precipitación. Se construye un gráfico o se obtiene la ecuación de la recta con las concentraciones de referencias versus área o diámetro del anillo y se interpola la lectura de la muestra problema.

Este procedimiento ha sido ampliamente adaptado para medir muchos antígenos, como por ejemplo, inmunoglobulinas en diversos líquidos biológicos y su sensibilidad puede llegar a 0,1 mg/ml y su coeficiente de variación es menor al 20% (figura 40-4).

c) Inmunoelectroforesis. La inmunoelectroforesis (IEF) desarrollada por Grabar y Williams, es una técnica cualitativa que permite la identificación

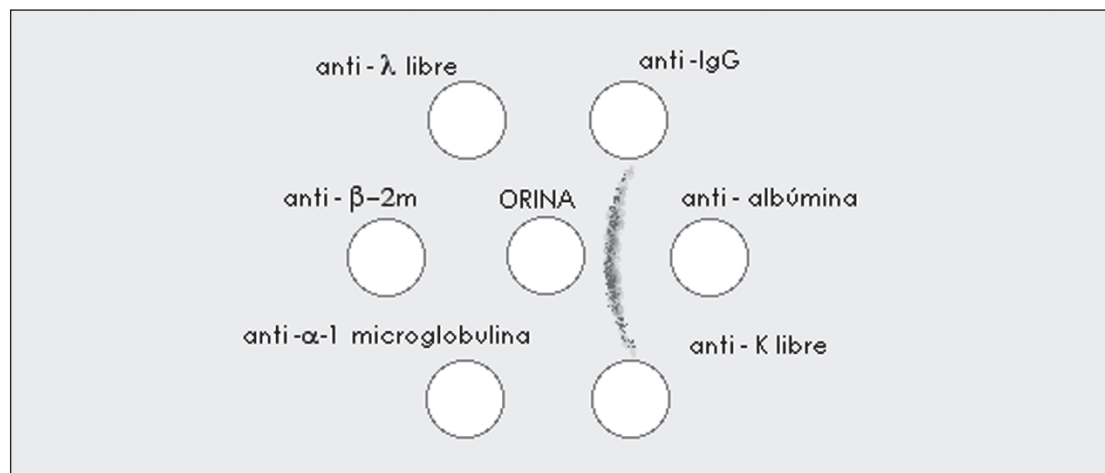


Figura 40-3. Inmunodifusión doble de una muestra de orina. Se observa un elevado nivel de albúmina y ausencia de IgG, lo que indica un posible daño inicial del glomérulo.

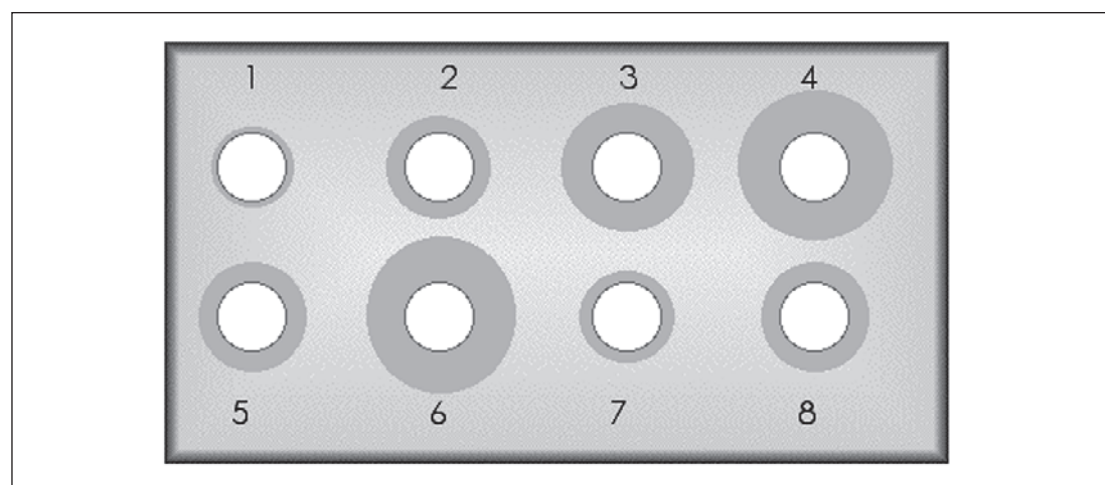


Figura 40-4. Cuantificación de IgG humana por Inmunodifusión radial. Curva de referencia IgG (pocillos 1 al 4) y muestras de suero de pacientes (pocillos 5 al 8).





de diferentes antígenos en mezclas complejas, que pueden tener semejante movilidad electroforética y peso molecular, pero diferentes determinantes antigénicos.

Esta técnica se realiza en geles de agar o agarosa y se distinguen dos etapas: (1) la solución de proteínas se somete a separación electroforética y (2) terminada la electroforesis, las proteínas son analizadas con antisueños poli o monoespecíficos en el agar en un canal paralelo al eje de migración. Luego de un período de difusión en cámara húmeda, se observan arcos de precipitación cuya forma y posición dependen de las características inmunoquímicas y de la concentración de cada antígeno.

La IEF es de gran utilidad para el análisis e identificación de componentes monoclonales que caracterizan las enfermedades asociadas con gammopatías monoclonales (figura 40-5).

d) Inmunofijación. La inmunofijación es un procedimiento que utiliza, en una primera etapa, la electroforesis de proteína en gel de agarosa y luego, la inmunoprecipitación. Sobre la placa de agarosa en que se han separado las proteínas por

electroforesis se aplican antisueños monoespecíficos y la presencia del antígeno complementario forma complejos antígeno-anticuerpo que precipitan. La formación de un precipitado estable antígeno-anticuerpo fija la proteína en el gel (figura 40-6). Se utiliza esencialmente en la caracterización de inmunoglobulinas monoclonales.

La inmunofijación y la inmunolectroforesis son técnicas complementarias en la identificación de una gamapatía monoclonal. La inmunofijación debiera ser utilizada frente a proteínas anómalas que son difíciles de caracterizar por inmunolectroforesis.

e) Contraelectroforesis. La contraelectroforesis se realiza en gel agar, donde el pH del tampón de electroforesis permite que el anticuerpo de cargue positivamente y el antígeno negativamente. La sensibilidad del método es aproximadamente 20 veces mayor que la doble difusión. Actualmente el uso más importante es en el diagnóstico de enfermedades infecciosas cuyos antígenos migran hacia el polo positivo en el agar (figura 40-7).

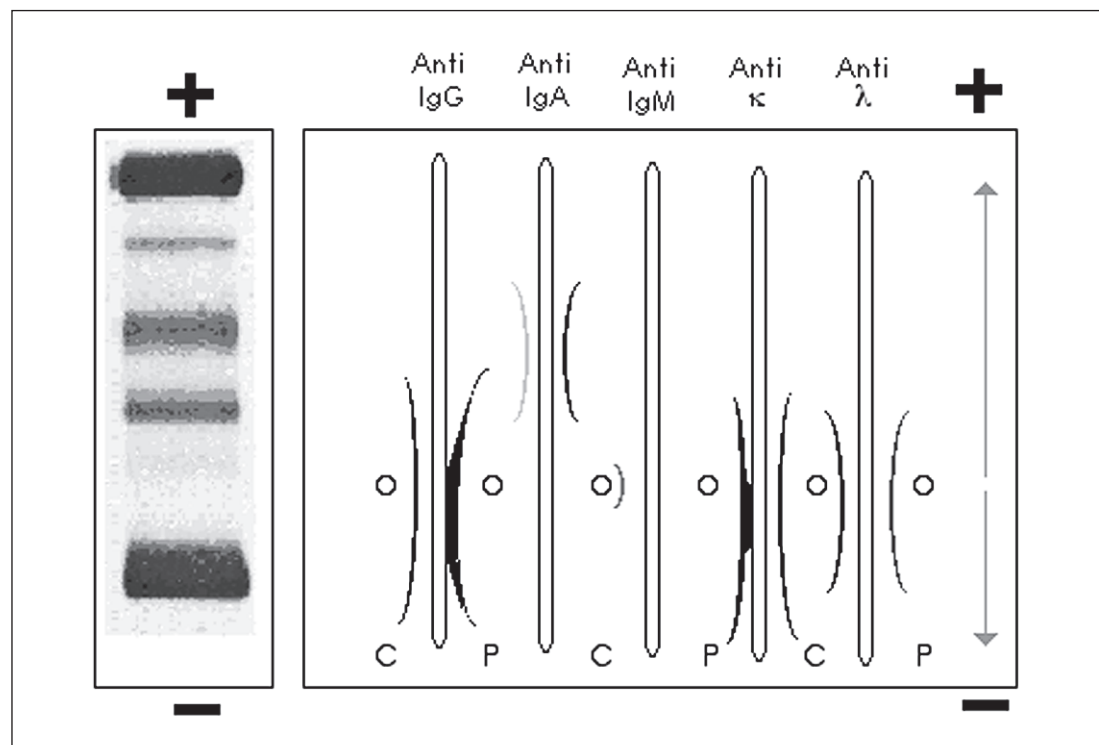


Figura 40-5. Electroforesis e inmunolectroforesis del suero de un paciente (p) con gammapatía monoclonal IgG, κ . Suero control (c), suero anti-IgG (γ), suero anti IgA humana (α), suero anti-IgM humana (μ), suero anti-kappa libre humana (κ) y suero anti-lambda libre humana (λ).

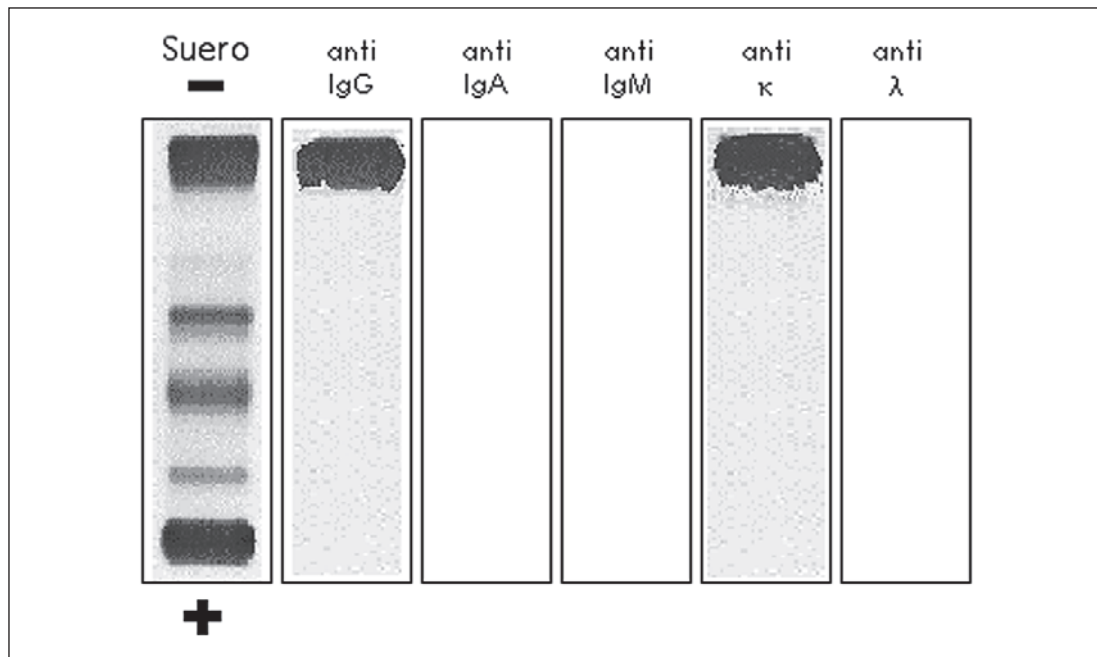


Figura 40-6. Electroforesis e inmunofijación del suero de un paciente (p) con gammapatía monoclonal IgG, κ . Suero anti-IgG humana (γ), suero anti-IgA humana (α), suero anti-IgM humana (μ), suero anti-kappa libre humana (κ) y suero anti-lambda libre humana (λ).

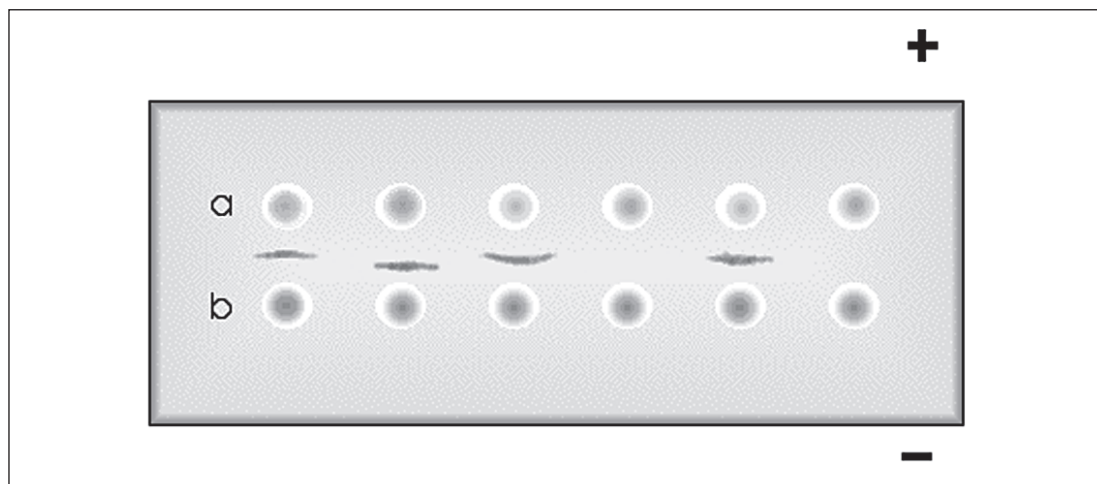


Figura 40-7. Contrainmuno-electroforesis para la determinación de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Pocillos a: Suero de conejo anti-antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Pocillos b: Sueros humanos positivos y negativos a antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

f) “Rocket” Inmuno-electroforesis. El “rocket” inmuno-electroforesis es la combinación de la electroforesis y la inmunodifusión radial que han proporcionado un método rápido para medir concentración de antígenos. El Ag migra por electroforesis (aplicado en un pequeño pozo) en un agar que contiene antisuero (anticuerpos en exceso). El tiempo requerido para la precipitación es de

aproximadamente 2 horas. La altura de la zona de precipitación que tiene la forma de un “rocket” es proporcional a la concentración de antígeno.

El antígeno debe migrar hacia el polo positivo en la electroforesis, por tanto, es conveniente para albúmina, transferrina y ceruloplasmina, pero para inmunoglobulina es más conveniente la inmunodifusión radial (figura 40-8).

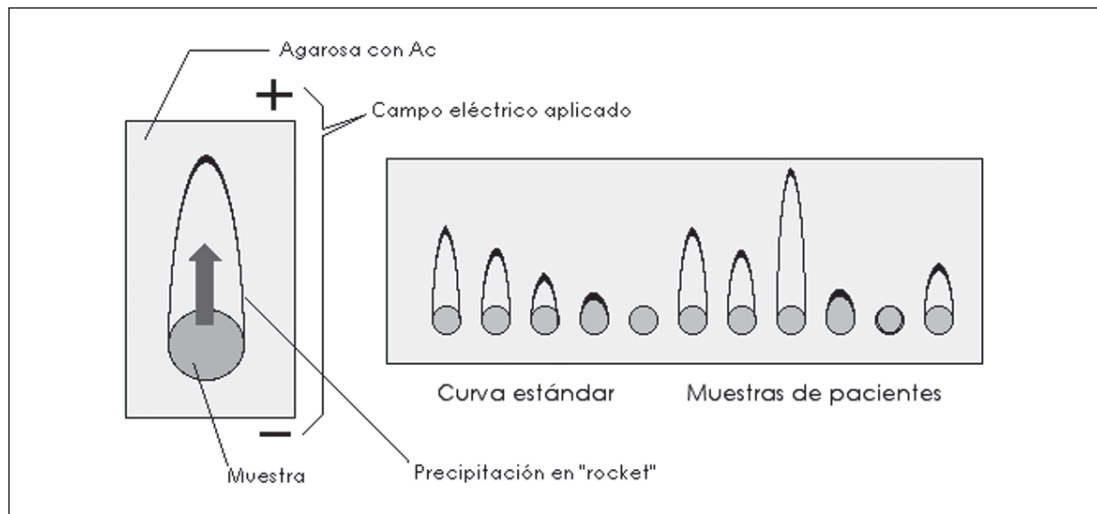


Figura 40-8. "Rocket" inmunoelectroforesis para la determinación de albúmina humana. Concentraciones de referencia de albúmina (pocillos 1 al 3) y muestras de pacientes (pocillos 4 al 7).

g) Inmunoelectroforesis cruzada o bidimensional de Laurell. La inmunoelectroforesis cruzada requiere inicialmente la separación electroforética de una mezcla de antígeno en una dirección perpendicular al fenómeno final de precipitación o de etapa "rocket". Esta es capaz de resolver mezcla de antígenos altamente complejas y cuantificar cada uno de ellos (figura 40-9). Por ejemplo, se ha utilizado para estimar el grado de conversión de tercer componente del complementario (C3) a la forma inactivada C3c.

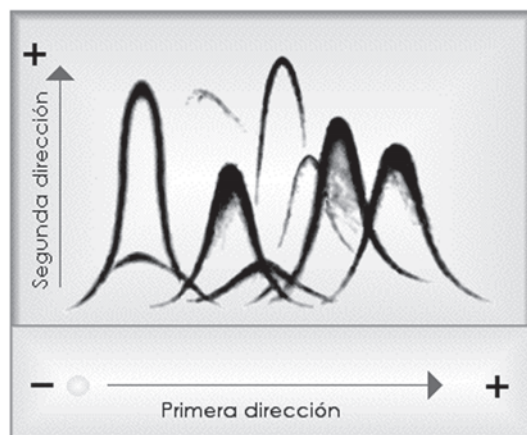


Figura 40-9. Inmunoelectroforesis cruzada o bidimensional de Laurell. Primera dimensión: El pocillo contiene suero humano. Segunda dimensión: el gel de agar contiene un antisuero oligoespecífico. Los precipitados o "rocket" corresponden a las siguientes proteínas: (1) transferrina, (2) alfa 2-macroglobulina, (3) ceruloplasmina, (4) alfa 1-antitripsina, (5) alfa 1-glicoproteína ácida.

2.1.2. Reacción de aglutinación

Los antígenos particulados, como microorganismos y suspensiones celulares son corrientemente aglutinados cuando se mezclan con sus antisueros. Los anticuerpos son dirigidos contra determinantes antigénicos de superficie que permiten un adecuado entrecruzamiento con el Ag particulado permitiendo la **reacción de aglutinación**. Los principios de la aglutinación son los mismos descritos para las reacciones con antígenos solubles.

Las reacciones de aglutinación se utilizan preferentemente para identificar bacteria y tipificar glóbulos rojos, es llevada a cabo, generalmente en solución fisiológica (NaCl 0,15 M; pH 7,0) y es ampliamente utilizada en determinaciones semicuantitativas.

En las reacciones de aglutinación se debe considerar el fenómeno de **prozona** que consiste en que algunos sueros dan una efectiva reacción de aglutinación solamente cuando están francamente diluidos. Sueros no diluidos o diluidos levemente no reaccionan visiblemente con el Ag. Actualmente se conoce que en la prozona existen anticuerpos absorbidos en la superficie celular y el fenómeno se explica por el exceso de anticuerpos y a la presencia de anticuerpos conocidos como bloqueadores o incompletos que corresponden a anticuerpos univalentes (Acs con un solo sitio activo).

a) Aglutinación directa. La aglutinación directa se utiliza cuando el antígeno particulado posee



suficientes determinantes antigénicos en su superficie permitiendo que el antisuero (Ac) correspondiente produzca espontáneamente el fenómeno de aglutinación. Se usa regularmente en la serotipificación bacteriana.

b) Aglutinación indirecta. La aglutinación indirecta se utiliza para células que tienen un número reducido de determinantes antigénicos o que existe una cantidad insuficiente de anticuerpos que dificultan el procedimientos de aglutinación, para lo cual es necesario disponer de otro reactivo que es el anticuerpo anti-inmunoglobulinas. Por ejemplo, determinación del antígeno D (Rh) de los glóbulos rojos.

c) Aglutinación pasiva. La aglutinación pasiva se utiliza para antígenos solubles que se absorben en forma covalente a la superficie de las partículas. Se han usado partículas como glóbulos rojos (**hemaglutinación pasiva**) o polímeros sintéticos tal como el poliestireno o un coloide mineral como la bentonita. La determinación del factor reumatoideo utiliza partículas de poliestireno de aproximadamente 0.20 a 0.25 μm de diámetro recubiertas con gammaglobulina humana.

La aglutinación es considerada más sensible que la precipitación para detectar anticuerpos, debido básicamente a que grandes partículas cubiertas con Ag sirven para amplificar la reacción.

2.1.3. Reacción con participación del complemento

a) Fijación del complemento. La fijación del complemento permite detectar anticuerpos por la formación de complejos inmunes que fijan complemento por la vía clásica y que por una reacción secundaria, lisis de un sistema indicador glóbulos rojos-anti glóbulos rojos permite determinar la cantidad de antígeno o de anticuerpo presente en la reacción.

b) Actividad hemolítica del complemento (CH50). La determinación de la actividad hemolítica del complemento (CH50) permite conocer la actividad funcional del sistema complemento y se basa en determinar la cantidad mínima de suero (complemento) que lisa el 50% de glóbulos rojos indicadores que han sido previamente sensibilizados en forma óptima con su anticuerpo (hemolisina). La hemólisis se produce por la activación de la vía clásica del complemento.

2.2. Inmunoanálisis con reactivos marcados

Los inmunoanálisis con reactivos marcados se clasifican en: homogéneos y heterogéneos y existen dos tipos básicos: competitivo y no competitivo.

El **inmunoanálisis homogéneo** no requiere separación física del antígeno unido, del libre. Considera las diferencias fisicoquímicas (tamaño o cambios conformacionales) entre el antígeno libre y el acomplexado al anticuerpo, siendo este hecho el que caracteriza la señal de respuesta. La sensibilidad puede verse afectada debido a que no hay separación de la muestra del paciente con la señal de detección final, facilitando interferencias. A veces se recomienda tratamiento previo de la muestra para eliminar estas interferencias. Su automatización es fácil y se utiliza preferentemente en la detección de drogas y hormonas.

El **inmunoanálisis heterogéneo** contempla la separación del antígeno unido del libre, considerando las diferencias físicas, químicas o inmunológicas (tamaño, carga, adsorción a superficie sólida). Permite eliminar la mayoría de las interferencias de la muestra, mejorando la sensibilidad de la determinación. Su automatización es compleja y se aplica en la determinación de anticuerpos específicos, marcadores tumorales y hormonas.

El **inmunoanálisis competitivo** se basa en la competencia entre el antígeno de interés (analito) y una cantidad constante del antígeno similar marcado por una cantidad fija y limitada de anticuerpo específico. En este caso está marcado el analito.

El **inmunoanálisis no competitivo** usa un exceso de anticuerpo específico marcado contra el antígeno o analito de interés. En este caso está marcado el reactivo.

En la tabla 40-2 se muestra los métodos inmunoquímicos que utilizan reactivos marcados.

2.2.1. Inmunoanálisis fluorescente

a) Microscopía inmunofluorescente. La microscopía inmunofluorescente incorpora el concepto tradicional de inmunofluorescencia (IF) que básicamente es una técnica inmunohistoquímica o inmunocitoquímica que permite la localización de antígenos en células y tejidos y la



Tabla 40-2. Inmunoanálisis con reactivos marcados

Inmunoanálisis fluorescente
Microscopía inmunofluorescente
Inmunofluorescencia directa
Inmunofluorescencia indirecta
Inmunoanálisis de fluorescencia polarizada (“FPIA”)
Inmunoanálisis de fluorescencia unida a enzima (“ELFIA”)
Citometría de flujo
Enzimainmunoanálisis (EIA)
EIA homogéneo. “EMIT”
EIA heterogéneo. “ELISA”, “MEIA”
Electroinmunotransferencia o “Western blot” o “Immunoblotting”
Radioinmunoanálisis (RIA)
RIA en fase soluble
RIA en fase sólida
Detección inmunorradiométrica para antígeno
Quimiluminiscencia
Bioluminiscencia

detección y titulación de anticuerpos específicos.

La fluorescencia es un fenómeno producido por moléculas excitadas que emiten radiación, energía o luz que cesa inmediatamente después que se retira la luz excitante. Las moléculas que tienen esta característica se llaman fluorocromos. Los fluorocromos o fluoróforos son sustancias coloreadas que absorben radiación y luego son excitadas emitiendo máxima energía a una determinada longitud de onda.

Para obtener un máximo rendimiento de la IF es necesario conocer los “peak” de excitación y de emisión del fluorocromo en uso que permita seleccionar adecuadamente la fuente de luz y la combinación de filtros (primarios y barrera) del microscopio de fluorescencia. El “peak” de excitación es la longitud de onda a la que el fluorocromo absorbe radiación con una máxima eficiencia. El “peak” de emisión es la longitud de onda a la que la energía fluorescente resultante es máxima.

Los fluorocromos más utilizados son el isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina B y ficoeritrina. Los anticuerpos con uno o dos residuos de fluorocromo por molécula son intensamente fluorescentes y mantienen su actividad específica. Existen dos procedimientos de inmunofluorescencia que se utilizan

regularmente en el laboratorio: directa e indirecta.

a.1) Inmunofluorescencia directa (IFD). La IFD utiliza un anticuerpo específico conjugado con el fluorocromo que se aplica directamente sobre el sustrato (tejido, célula, u otro) permitiendo identificar la estructura responsable de la especificidad. Se utiliza preferentemente para identificar microorganismo y tipificar células (por ejemplo: linfocitos).

a.2) Inmunofluorescencia indirecta (IFI). La IFI es una técnica de doble capa, en que un anticuerpos no marcado se aplica directamente sobre el sustrato y se visualiza la reactividad con un conjugado anti-inmunoglobulinas-fluorocromo. Se utiliza preferentemente para la detección de autoanticuerpos (figura 40-10).

En la inmunofluorescencia se puede aumentar la sensibilidad con el sistema avidina (estreptavidina)-biotina que tiene una alta afinidad, que utiliza primariamente un conjugado anticuerpo-biotina y luego conjugado avidina-fluorocromo.

b) Inmunoanálisis de fluorescencia polarizada. El inmunoanálisis de fluorescencia polarizada (“fluorescence polarization immunoassay”; FPIA)

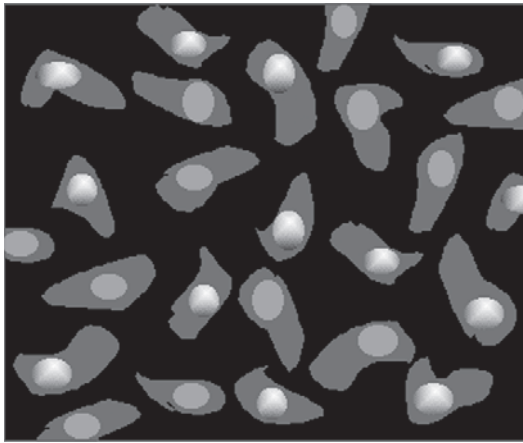


Figura 40-10. Detección de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta. Se usa células HEp-2. En este caso se observa un patrón homogéneo.

es un inmunoanálisis homogéneo y competitivo que usa un antígeno marcado con un fluoróforo y polarizado, y su sistema de detección está basado en la fluorometría. Es fácilmente automatizado y se utiliza para medir pequeñas moléculas como drogas y hormonas.

c) Inmunoanálisis de fluorescencia unida a enzima. El inmunoanálisis de fluorescencia unida a enzima ("enzyme-linked fluorescence immunoassays", ELFIA) es un inmunoanálisis heterogéneo y puede ser de tipo competitivo o no competitivo, en que el inmunorreactante marcado con enzima está en combinación con un sustrato fluorogénico que permite la detección por fluorometría. El ELFIA está automatizado y es uno de los métodos más sensibles hoy en día en el laboratorio clínico. Utiliza preferentemente como enzima marcadora fosfatasa alcalina y como sustrato fluorogénico el 4 metil umbeliferona (4MUP).

d) Citometría de flujo. La citometría de flujo permite medir la cantidad de anticuerpo monoclonal fluorescente unido a cada célula en forma individual, facilitando la identificación y tipificación de diferentes subgrupos de poblaciones celulares con una extraordinaria sensibilidad, eficiencia y rapidez.

En el citómetro de flujo las células atraviesan un rayo láser y son analizadas individualmente. Las células deflexan o dispersan la luz de un láser de una forma estrechamente relacionada con su tamaño y granularidad que es registrada en un

detector (ver capítulo 43). La molécula de fluorocromo unida al anticuerpo monoclonal absorbe luz del rayo láser y emite luz en otra longitud de onda, en que su intensidad es captada por otro detector que está en ángulo recto al rayo. Ambos fenómenos facilitan la correcta identificación de las poblaciones celulares.

2.2.2. Enzimainmunoanálisis

El enzimainmunoanálisis (EIA) ha reemplazado a muchas técnicas tradicionales en el diagnóstico clínico e investigación biológica desde que se introdujo en 1966 por Avrameas y Uriel. Este método se basa en dos fenómenos biológicos: alta especificidad del anticuerpo por un antígeno (reacción inmunológica) y la amplificación por reacciones químicas llevadas a cabo por enzimas que actúan sobre sustratos que originan productos coloreados (reacción indicadora).

La técnica de EIA es utilizada rutinariamente para localización de antígeno o anticuerpo sobre tejidos o células, para la detección de antígeno o anticuerpos inmovilizados en una fase sólida, para la titulación de anticuerpo y para la medición de antígeno. Los antígenos pueden ser medidos por procedimientos inmunoenzimáticos homogéneos o heterogéneos.

Las enzimas que se utilizan corrientemente para marcar anticuerpo o antígeno son: **fosfatasa alcalina**, cuyo sustrato es el p-nitrofenil-fosfato y la lectura de absorbancia se lleva a cabo a 405 nm; **peroxidasa** que puede utilizar tres sustratos diferentes: o-fenilendiamina (oPD)/H₂O₂; 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB)/H₂O₂ y 2,2'-di-azino(3-etilbenzotiazolina 6-ácido sulfónico (ABTS)/H₂O₂ con lecturas de densidad óptica a 492, 450 y 415 nm respectivamente y **beta-galactosidasa**, cuyo sustrato es el o-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido (oNPG) y la lectura se realiza 420 nm.

En los EIA automatizados se usa corrientemente la fosfatasa alcalina como enzima marcadora y como sustrato el 4-metilumbeliferil fosfato (MUP). El MUP es catalizado a un producto fluorescente (metilumbeliferona) que es medido por fluorometría.

El EIA, también puede ser amplificado utilizando la interacción avidina (estreptavidina)-biotina. Se utiliza los conjugados anticuerpos-biotina y avidina-enzima.

a) EIA homogéneo. El "enzyme-multiplied immunoassay technique" (EMIT) es un EIA



homogéneo y competitivo que usa una enzima marcadora y el sistema de detección es espectrofotométrico. La enzima marcadora es unida covalentemente al antígeno en una posición cercana al sitio activo de la enzima. Durante la reacción inmunológica, cuando el antígeno marcado con la enzima se une al anticuerpo, el sitio activo de la enzima es bloqueado físicamente y la enzima es inhibida funcionalmente. En la forma libre del antígeno marcado con la enzima, la enzima permanece activa funcionalmente y actuará sobre el sustrato que se añade generando un producto coloreado. El cambio de color resultante es proporcional a la cantidad de antígeno marcado libre disponible y debido a la naturaleza competitiva del inmunoanálisis, será proporcional a la cantidad de analito (antígeno) presente en la muestra. El EMIT se ha automatizado fácilmente y es usado principalmente en la detección de drogas.

b) EIA heterogéneo. Los procedimientos EIA heterogéneos son en general más sensibles que los homogéneos.

El "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) se realiza sobre una fase sólida (placas de poliestireno u otro similar) y es un EIA heterogéneo, no competitivo y su detección preferentemente es por espectrofotometría (figura 40-11). Es ampliamente utilizado en el laboratorio clínico en la detección y medición de autoanticuerpos y varias otras proteínas. Existe una variedad que se realiza sobre papel de nitrocelulosa que se ha llamado inmunofijación en punto o "immuno blot, "dotimmunobinding" o "dot" (figura 40-12).

El "microparticle enzyme immunoassay" (MEIA) es un método heterogéneo, no competitivo y de tipo "sandwich". Utiliza una enzima marcadora y el sistema de detección es por fluorometría o espectrofotometría. Incorpora micropartículas que permiten aumentar el área en la cual ocurre la reacción antígeno-anticuerpo facilitando la cinética de la reacción y disminuyendo el tiempo de incubación. Ha sido automatizado permitiendo cuantificar una gran cantidad de moléculas, incluyendo hormonas y marcadores tumorales.

c) Electroinmunotransferencia ("Western blot" o "Immunoblotting"). La electroinmunotransferencia combina la electroforesis en gel SDS-poliacrilamida y la alta sensibilidad del enzi-

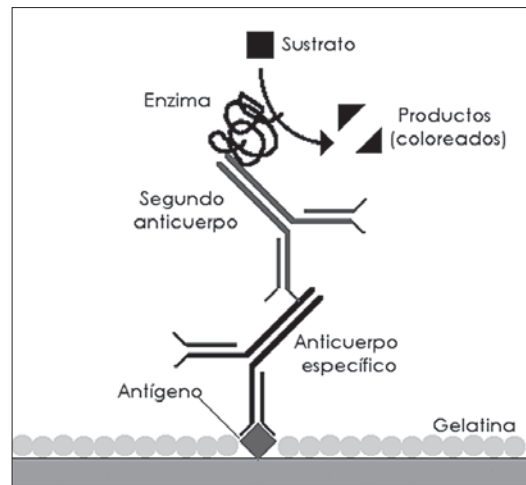


Figura 40-11. Esquema de enzaimmunoanálisis en fase sólida (ELISA) para detección y cuantificación de anticuerpos específicos. En el esquema el antígeno se ha unido a un soporte sólido; luego el anticuerpo (Ac primario) a pesquisar (suero del paciente) reconoce el antígeno. Posteriormente el conjugado anticuerpo secundario-enzima se une al Ac primario, evento que es reconocido con la adición del sustrato que catalizado por la enzima forma productos coloreados cuya densidad óptica se lee a una determinada longitud de onda.

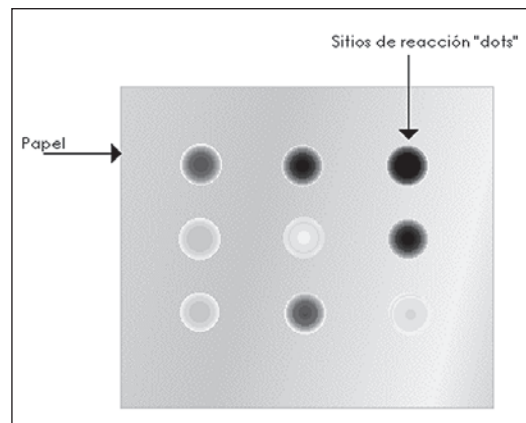


Figura 40-12. Inmunodifusión en punto o "dot immunobinding". Enzaimmunoanálisis sobre papel de nitrocelulosa para detección de anticuerpos específicos. Los puntos coloreados indican positividad.

mainmunoanálisis para originar una poderosa herramienta que permite estudiar cualitativa y cuantitativamente las reacciones antígeno-anticuerpo. Los antígenos son separados en gel SDS-poliacrilamida y transferidos a una membrana de nitrocelulosa uniéndose inespecíficamente e identificados con procedimientos inmunoenzimáticos. Debido a que existe un proceso de denaturación de los antígenos por los



detergentes utilizados se recomienda utilizar antisueros policlonales en el análisis ("blotting") para aumentar la probabilidad de detectar epítomos o determinantes antigénicos que no se han alterado por la denaturación.

La electroinmunotransferencia se utiliza en el diagnóstico viral (confirmación de anticuerpos anti-HIV), tipificación de bacterias (*Neisseria meningitidis*), detección de autoanticuerpos (anticuerpos anti-antígenos nucleares extracelulares), etc.

2.2.3. Radioinmunoanálisis

El radioinmunoanálisis (RIA) utiliza antígeno o anticuerpo generalmente marcados con isótopos como, ^{125}I o eventualmente ^{131}I . Este inmunoanálisis puede llevarse a cabo en fase soluble o sólida.

a) RIA en fase soluble. El RIA en fase soluble permite determinar la capacidad de unión de un anticuerpo, por adición de un moderado exceso de antígeno marcado a un antisuero, los anticuerpos forman complejos solubles y se precipitan por los procedimientos ya indicados. En el precipitado se mide la radiactividad dando una estimación de la capacidad de unión del anticuerpo específico por su antígeno. Este inmunoanálisis en fase soluble, también permite determinar antígeno (RIA clásico) por adición de un antígeno marcado a una cantidad fija y limitada de anticuerpo, cuya unión puede ser parcialmente inhibida por la adición de antígeno no marcado. La extensión de esta inhibición puede ser usada como una medida del antígeno no marcado. Se debe realizar la medición de la radiactividad del antígeno radiomarcado libre, que debe estar separado de los otros constituyentes del sistema.

b) RIA en fase sólida. El RIA en fase sólida permite medir un anticuerpo a través de su capacidad de unión al antígeno que ha sido insolubilizado por adsorción física a un soporte plástico. La inmunoglobulina unida puede ser estimada por la adición de un anticuerpo anti-inmunoglobulinas radiomarcada producida en otra especie. Este procedimiento se ha utilizado en la prueba RAST ("radioallergosorbent test") para la determinación de IgE específica en pacientes alérgicos. En este caso, el alérgeno es covalentemente unido a un soporte y que luego es incubado con el suero del paciente. La cantidad

de IgE específica unida al soporte es estimada por la adición de un anticuerpo anti-IgE radiomarcado.

c) Detección inmunorradiométrica para antígenos. En las pruebas inmunorradiométricas el reactivo marcado es utilizado en exceso. Para la determinación de antígeno, los anticuerpos están absorbidos sobre un soporte sólido al que se le agrega la solución de antígeno. Luego el soporte es lavado y la cantidad de antígeno unido puede ser estimado por la adición en exceso de un anticuerpo radiomarcado. La prueba muestra una mayor especificidad cuando los anticuerpos utilizados reconocen diferentes epítomos del antígeno. La aplicación clásica de esta prueba es el RIST ("radioimmunosorbent test") para la determinación de IgE total, donde el anticuerpo anti-IgE se ha unido covalentemente a microcristales de celulosa y se le adiciona el suero del paciente y los sueros controles. La IgE total unida es medida por la adición de un anticuerpo anti-IgE radiomarcado.

2.2.4. Quimiluminiscencia

La quimiluminiscencia es la emisión de luz producida en ciertas reacciones químicas de oxidación. La mayoría de las reacciones quimiluminiscentes son de oxidación debido a que la producción de luz visible requiere reacciones altamente energéticas. La reacción quimiluminiscente más estudiada ha sido la oxidación del luminol. Los marcadores más populares son los derivados de isoluminol y ésteres de acridina. Para detectar un marcado quimiluminiscente se usa una amplia variedad de luminómetros que miden la emisión de luz.

En este último tiempo se está usando como marcador la fosfatasa alcalina que reacciona con sustratos basados en el adamantil 1,2-dioxetano aril fosfato, que los desfosforila para producir un fenóxido intermediario y éste al descomponerse produce emisión de luz a 470 nm. Actualmente, los inmunoanálisis quimiluminiscentes son utilizados por varios analizadores automatizados. En ellos se determinan drogas, hormonas, marcadores tumorales y otras proteínas.

2.2.5. Bioluminiscencia

La bioluminiscencia es un fenómeno natural que se encuentra en muchas formas inferiores de vida. Un sistema natural es la D-luciferina/luciferasa,



en que la luciferasa cataliza la oxidación de la D-luciferina en presencia de ATP y Mg^{+2} a oxiluciferina, con emisión de luz a 546 nm. En los inmunoanálisis bioluminiscentes se está utilizando conjugado anticuerpo-fosfatasa alcalina o conjugado analito-fosfatasa alcalina que reacciona con la D-luciferina-o-fosfato liberando D-luciferina. La D-luciferina es oxidada por la luciferasa con emisión de luz. Aún no está disponible inmunoanálisis bioluminiscente para aplicación rutinaria en el laboratorio.

Wild, D., **The Immunoassay Handbook**, Segunda Edición, CPL Scientific Publishing, Hardback, U.S.A., 2000.

LECTURAS SUGERIDAS

Avrameas, S., "Amplification systems in immunoenzymatic techniques", *J Immunol. Meth.*, 150: 23-32, 1992.

Chan, D. and Sokoll, L., "Immunoassays automation at the millenium", Editorial, *J. Clin. Ligand Assay*, 22(1), 1999.

Diamandis, E. and Christopoulos, T., **Immunoassay**, Academic Press. U.S.A., 1996.

Eisen, H., **Immunology**, Harper and Row Publishers, U.S.A., capítulo 16, pp. 297-336, 1980.

Kemeny, D., "Titration of antibodies", *J. Immunol Meth.*, 150: 50-76, 1992.

MacCrindle, C., Schwenzer, K. and Jolley, M., "Particle concentration fluorescence immunoassay: A new immunoassay technique for quantification of human immunoglobulins in serum", *Clin. Chem.*, 31/9:1487-1490, 1985.

Porstmann, T. and Kiessig, A., "Enzymes immunoassay techniques. An overview", *J. Immunol. Meth.*, 150: 5-21, 1992.

Roitt, I., **Essential Immunology**, chapter 5, Blackwell Scientific Publications, London, 1991.

Slagle, K. and Ghosn, S., "Immunoassays. Tools for sensitive, specific and accurate test results", *Lab. Medicine*, 27: 177-183. 1996.

Volland, H.; Vulliez Le Normand, B.; Mamas, S.; Grassi, J.; Créminon, C.; Ezan, E. and Pradelles, P., "Enzyme immunometric assay for leukotriene C₄", *J. Immunol. Meth.*, 175: 97, 1994.





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 41

MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA INMUNIDAD CELULAR

Jorge González C. y Pilar Vega C

- 1. Introducción**
- 2. Preparación y aislamiento de diferentes poblaciones celulares**
 - 2.1. Métodos de purificación tradicionales
 - 2.2. Separación inmunomagnética
- 3. Estudio de la respuesta inmune celular específica**
 - 3.1. Estudio de las subpoblaciones de linfocitos
 - 3.2. Estudio de las funciones de inmunidad celular específica
 - 3.3. Estudio de la síntesis de citoquinas y sus receptores
 - 3.4. "DNA microarrays"
 - 3.5. Pruebas para evaluar reacciones de hipersensibilidad retardada (RHR)
 - 3.6. Estudios de la especificidad de células T
 - 3.7. Detección de células T precursoras
- 4. Estudio de la inmunidad celular inespecífica**
 - 4.1. Ensayos funcionales de neutrófilos
 - 4.2. Ensayos funcionales de eosinófilos
 - 4.3. Ensayos funcionales de monocitos y macrófagos
- 5. Evaluación de laboratorios del paciente infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana. Un modelo del estudio de las deficiencias en la respuesta celular**
 - 5.1. Estudio fenotípico de linfocitos
 - 5.2. Estudio de la respuesta proliferativa
 - 5.3. Estudio de la respuesta citotóxica
 - 5.4. Evaluación de los niveles de citoquinas y subpoblaciones de linfocitos T





RESUMEN

La respuesta inmune celular del hombre debe ser evaluada mediante pruebas de laboratorio, no sólo frente a la sospecha de estados inmunes alterados, sino también frente a tratamientos con modificadores biológicos de la respuesta y en eventuales estudios de vacunación. Frente a cualquiera de estas situaciones, la respuesta inmune celular puede ser evaluada tanto *in vivo* como *in vitro*. Las respuestas *in vivo*, se evalúan únicamente mediante pruebas cutáneas, llamadas reacciones de hipersensibilidad.

Por otro lado, un vasto arsenal de pruebas *in vitro*, están disponibles, para evaluar la respuesta celular y la factibilidad de su uso dependen tanto del nivel de equipamiento de cada laboratorio como de la formación de sus recursos humanos. No obstante, de manera general ningún ensayo aislado es suficiente para un adecuado diagnóstico; una visión adecuada del funcionamiento de la respuesta celular puede obtenerse por la combinación e interpretación de varios métodos y parámetros.

Especial cuidado debe tenerse en el análisis, manejo e interpretación de los resultados. Debe considerarse que los resultados obtenidos podrían variar dependiendo de la metodología empleada, del background genético de los diferentes individuos e incluso dentro de un mismo individuo. Por ello resulta de especial valor que cada laboratorio determine y maneje con propiedad los parámetros normales para cada prueba, pudiendo así acceder a interpretaciones laborales más adecuadas.

El desarrollo de ensayos sensibles para analizar la respuesta inmune celular tanto en el hombre como en modelos experimentales ha llevado a importantes descubrimientos tanto en inmunología básica como clínica.

En el futuro, el empleo de métodos más sensibles y específicos, sumados a la utilización de tecnologías emergentes como los "DNA microarrays" y el estudio de proteínas (proteómica), permitirá mejorar el diagnóstico y el pronóstico de las diferentes enfermedades infecciosas y de base inmunológica

1. INTRODUCCIÓN

La rama celular de la respuesta inmune, confiere inmunidad mediante la generación de células efectoras. Aunque en estos mecanismos, pueden además participar tanto anticuerpos como factores del complemento, éstos juegan un papel secundario. Por ello, tanto células específicas como no específicas estimuladas para un mismo antígeno contribuyen a la respuesta inmune mediada por células.

Las células específicas, corresponden a las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+, mientras que en las células no específicas se incluye a macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y células "natural killer" (NK). No obstante, la actividad de ambos tipos de células depende de las concentraciones locales de citoquinas, que son mediadores solubles secretados por diferentes

poblaciones celulares. De esta forma, mientras la respuesta humoral, permite controlar y eliminar microorganismos extracelulares y neutralizar sus productos, la respuesta celular es responsable del control de microorganismos intracelulares, la destrucción de células infectadas por virus, células tumorales y el rechazo a injertos. De esta forma se puede afirmar que la respuesta celular está adaptada para reconocer y eliminar células alteradas, sean éstas infectadas por patógenos intracelulares o que expresen antígenos tumorales.

La importancia de la inmunidad mediada por células, resulta evidente cuando el sistema es defectuoso. Por ejemplo, en niños con síndrome de Di George, quienes nacen sin timo y por ende son deficientes en células T, generalmente controlan patógenos extracelulares, pero no así los intracelulares (ver capítulo 29). Esta falla funcional en la respuesta inmune mediada por células,



resulta en infecciones a repetición por diferentes patógenos intracelulares, donde incluso vacunas atenuadas pueden producir estados infecciosos.

La evaluación de la respuesta inmune celular permite, en pacientes, conocer de manera cualitativa y cuantitativa la funcionalidad de células y mediadores de esta rama de la respuesta inmune, de manera de determinar en correlación con los antecedentes clínicos, el estado inmune del paciente. La detección de estados alterados puede corresponder a las llamadas inmunodeficiencias las cuales pueden ser congénitas o adquiridas (ver capítulos 29 y 30). Por otro lado, también se consideran estados de inmunidad alterada la reactividad contra antígenos propios conocida como autoinmunidad (ver capítulo 23) y la hiperreactividad propia de la alergia (ver capítulo 22).

De igual forma, el monitoreo de los niveles de productos de la función celular como citoquinas y monoquinas, puede ser de utilidad clínica en estudios frente a modificadores de la respuesta biológica (MRB). En el ámbito de la investigación biomédica, ya sea en modelos animales, como en personas, permite conocer y definir de manera experimental las características de la respuesta inmune celular posibilitando la identificación de antígenos protectores tanto frente a patógenos como frente a tumores, en eventuales estudios de vacunación.

En este capítulo se describe los principales métodos diagnósticos que permiten evaluar el estado de la rama celular de la respuesta inmune. Muchas de las pruebas que permiten la evaluación de la respuesta inmune celular han sido utilizadas por muchos años. Otras son de incorporación más reciente al arsenal de pruebas de laboratorio. Algunas de ellas son de reciente aplicación en el ámbito de la inmunología y aunque no siempre podrían ser factibles de aplicar de manera masiva en los laboratorios, es necesario conocer la existencia de ellas y sus posibles proyecciones.

2. PREPARACIÓN Y AISLAMIENTO DE DIFERENTES POBLACIONES CELULARES

El estudio de la respuesta inmune celular requiere, en algunos casos, disponer de poblaciones celulares puras o enriquecidas que permitan la evaluación de diferentes parámetros. Se puede utilizar métodos de purificación tradicionales y basados en separación inmunomagnética.

2.1. Métodos de purificación tradicionales

Utilizan soluciones de ficoll-hipaque o percoll en diferentes densidades, las que mediante centrifugación permiten la separación de las diferentes poblaciones celulares, basándose en sus diferencias de tamaño y densidad.

2.1.1. Separación de linfocitos

Para ello la sangre total es diluida en buffer fosfato salino en proporción 1:1, depositándola sobre ficoll-hipaque a densidad de 1,077. Luego de centrifugar, en la interfase entre el plasma diluido y la solución de ficoll, se forma un anillo blanco rico en leucocitos, mientras que en el pellet se encuentran los eritrocitos y los polimorfonucleares (PMN).

2.1.2. Separación de polimorfonucleares y linfocitos

La sangre heparinizada se mezcla con una solución de dextrano al 6% y se deja sedimentar a temperatura ambiente. De esta manera, se obtiene un plasma rico en PMN, monocitos y linfocitos pero libre de eritrocitos (figura 41-1).

2.1.3. Separación de linfocitos y PMN

Una buena separación de linfocitos y PMN se consigue a partir del plasma obtenido por sedimentación con dextrano al 6%. Esta se obtiene mediante centrifugación diferencial sobre ficoll-hipaque con densidad 1,077, observándose en la interfase un anillo blanco que contiene los linfocitos mientras que el pellet contiene los eritrocitos (figura 41-1).

En todos los casos los procedimientos de purificación deben ser monitoreados mediante frotis y evaluación morfológica de las células recuperadas. La confirmación del tipo celular recuperado se puede realizar mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales contra marcadores de superficie. El control de la viabilidad de estas células debe realizarse mediante pruebas de exclusión con azul tripan, o mediante métodos fluorescentes utilizando ésteres de acetoxymetil calceína (calceína-AM).

2.1.4. Aislamiento de monocitos humanos

Gradientes de ficoll-hipaque han sido

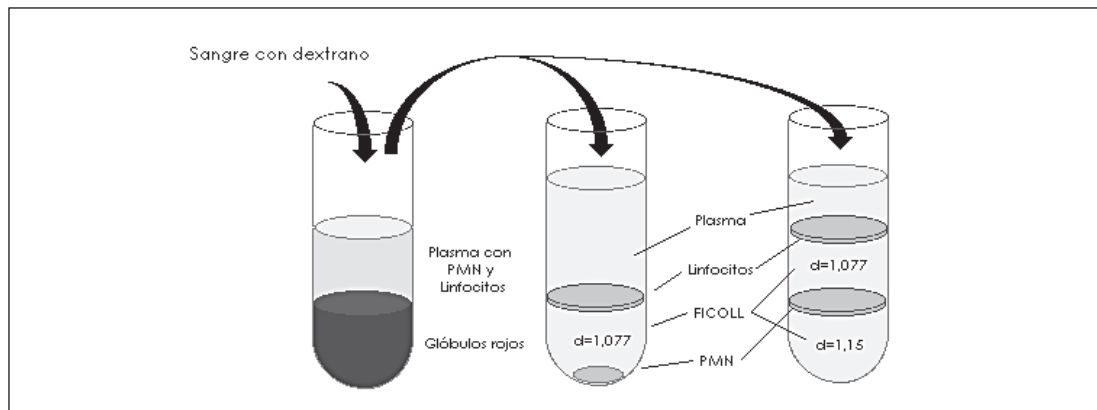


Figura 41-1. Separación de PMN y linfocitos. Utilizando dextrano 6% se pueden separar los PMN y linfocitos de los glóbulos rojos y a la vez los dos primeros se pueden separar usando ficoll hipaque 1.077 o bien una gradiente doble de ficoll hipaque.

rutinariamente utilizadas para inicialmente aislar células mononucleares, de las cuales entre 10-20% corresponden a monocitos. Para aislar los monocitos, se usa su capacidad de adherir al plástico, luego de incubación por 1 h a 37 °C. El procedimiento de aislamiento se desarrolla en esterilidad, a temperatura ambiente, utilizando medios y material de vidrio o plástico que estén libres de endotoxinas, debido a que endotoxinas bacterianas como el lipopolisacárido (LPS) son potentes activadores de monocitos y macrófagos.

2.1.5. Aislamiento de eosinófilos

El bajo número de eosinófilos en sangre periférica de individuos normales ha hecho relativamente difícil obtener preparaciones en número y pureza apropiadas para estudios funcionales. Para ello, protocolos basados en la separación de eosinófilos de neutrófilos la principal célula contaminante, mediante densidad han sido utilizados por largo tiempo. Estas técnicas resultan en células de alta viabilidad, no obstante posean bajo rendimiento y grados de pureza variable. Más aún la mayoría de los eosinófilos son de alta densidad (1095-1100 g/mL), por lo que presumiblemente representarían poblaciones no activadas. Recientemente, se ha introducido la selección negativa, basada en la remoción de neutrófilos por medio de separación celular magnética usando perlas recubiertas de anticuerpo monoclonal anti-CD16. Este método aumenta la recuperación y pureza de los eosinófilos con respecto a las técnicas que utilizan gradiente de densidad. No obstante, estas preparaciones difieren de las obtenidas por gradiente, ya que contienen además los eosinófilos

hipodensos. Debe tenerse en mente que diferencias funcionales han sido observadas dependientes del método utilizado en la purificación. Aparentemente, eosinófilos purificados mediante separación celular magnética son menos respondedores a lípidos quimiotácticos que las células obtenidas por gradiente.

2.1.6. Aislamiento de basófilos

Los basófilos son los leucocitos de menor abundancia en sangre humana y por ende su purificación es relativamente difícil. Los procedimientos basados en centrifugación por gradiente permiten enriquecer las preparaciones de basófilos hasta en un 50%, pero contienen una significativa contaminación con otros tipos celulares especialmente linfocitos. Durante cualquier procedimiento de enriquecimiento deberá tenerse presente en prevenir su estimulación y degranulación.

2.2. Separación celular inmunomagnética

Recientemente han sido utilizadas técnicas basadas en la separación inmunomagnética de neutrófilos, usando perlas magnéticas recubiertas de anticuerpo monoclonal anti-CD16. Aunque el marcador CD16 no es exclusivamente expresado por neutrófilos (también está presente en algunos eosinófilos y en algunas células mieloides precursoras), el aislamiento inmunomagnético a partir de sangre periférica permite obtener preparaciones enriquecidas de neutrófilos con más de 99% de pureza (figura 41-2). De igual manera, usando perlas sensibilizadas con anticuerpos anti-CD14 es posible separar monocitos humanos, mientras

que perlas magnéticas con anticuerpos CD4 y CD8 permiten separar estas poblaciones linfocitarias.

3. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR ESPECÍFICA

La evaluación de la respuesta inmune celular específica, requiere conocer tanto el número de células como su capacidad funcional. De igual manera, hoy es necesario conocer su capacidad

para secretar algunos mediadores biológicos como son las citoquinas. Entonces, es necesario conocer los niveles de linfocitos T (LT), tanto CD4+ como CD8+ y sus propiedades funcionales evaluando las principales citoquinas secretadas por éstos. De igual manera es importante ensayar tanto la especificidad de estos linfocitos, basándose en aspectos estructurales, como también detectar células T precursoras en poblaciones que proliferan en respuesta a un antígeno. En todos los casos, la hipótesis diagnóstica permite orientar la investigación de laboratorio, así como los resultados del laboratorio deben ser interpretados a la luz de los hallazgos clínicos.

3.1. Estudio de las subpoblaciones de linfocitos

El estudio de la competencia celular debe comenzar por determinar los niveles de las células que participan en esta respuesta. Por ello, el número y capacidad funcional de los leucocitos circulantes en sangre periférica refleja el estado general de competencia inmune de un determinado individuo. De esta manera en una variedad de situaciones clínicas, la evaluación del número y función de linfocitos, granulocitos y monocitos han comenzado a ser rutinarias tanto en el diagnóstico de diferentes patologías como en el monitoreo de tratamientos con inmunosupresores o inmunorestauradores.

Inicialmente, la determinación en el laboratorio de linfocitos T y B, se realizó, mediante la utilización de eritrocitos de cordero y la formación de rosetas. Los linfocitos T poseen la capacidad de unirse a los eritrocitos de cordero, formando un complejo en el que estas células están rodeadas de eritrocitos, de manera semejante a una flor, denominada roseta E (eritrocito). La evaluación de rosetas se realiza mediante lectura microscópica. De igual manera, linfocitos B, polimorfonucleares y macrófagos poseen receptores de superficie para fragmentos Fc de IgG y para complemento. Por ello, en presencia de anticuerpos y el factor C3b del complemento, forman las rosetas EAC (eritrocito, anticuerpo-complemento), las cuales son también evaluadas mediante microscopía óptica (figura 41-3).

3.1.1. Determinación del fenotipo inmunológico mediante citometría de flujo

En los últimos años, el uso de las pruebas de citometría de flujo (ver capítulo 42) en la deter-

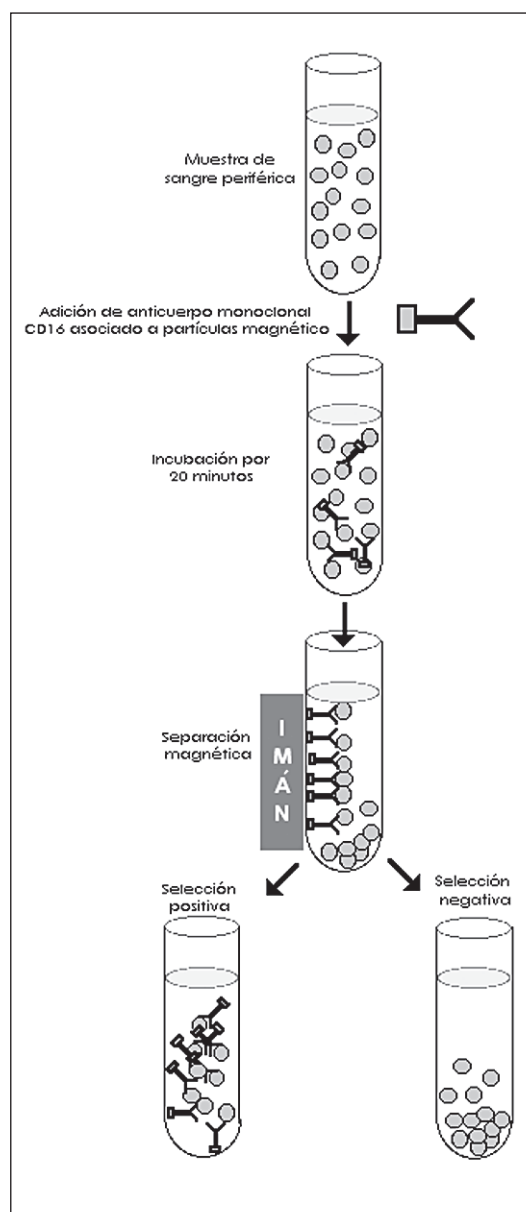


Figura 41-2. Separación inmunomagnética de neutrófilos, utilizando anticuerpo monoclonal CD16 unido a partículas magnéticas.

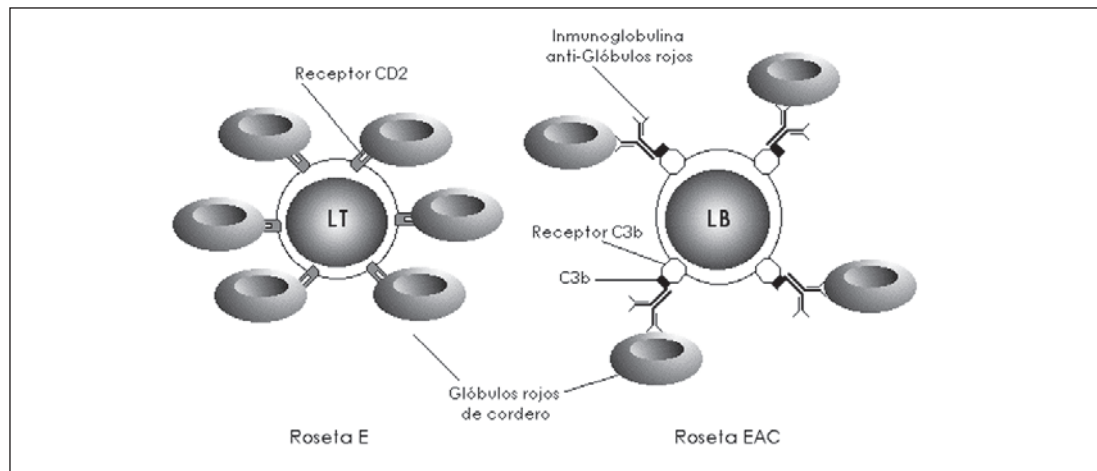


Figura 41-3. Determinación de linfocitos por formación de Rosetas E y Rosetas EAC. La roseta E se produce por unión del glóbulo rojo al receptor CD2 del LT. La roseta EAC se produce por interconexión entre el receptor para C3b del LB y la unión de C3b al fragmento Fc de IgG. También pueden haber uniones de Fc al receptor que tiene LB humano.

minación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos, se ha transformado en un importante método tanto en el diagnóstico como en el pronóstico de varias entidades clínicas, incluyendo la evaluación de las inmunodeficiencias y los desórdenes inmunológicos.

La citometría de flujo, permite la enumeración de diferentes tipos de linfocitos, los cuales difieren en sus propiedades funcionales, su linaje y su estado de maduración. Entonces mediante esta técnica es posible determinar los diferentes tipos de linfocitos mediante el uso de anticuerpos monoclonales marcados con sustancias fluorescentes, que reconocen sus marcadores de superficie (figura 41-4). Desde la invención de los anticuerpos monoclonales, miles de ellos han sido generados contra determinantes de superficie de células hematopoyéticas. Inicialmente, grupos de estos anticuerpos que demostraron propiedades semejantes en cuanto a su ligación y distribución tisular fueron designados como "clusters differentiation" o antígenos CD (ver capítulo 45).

La identificación de estos CD en la superficie celular de los linfocitos, mediante anticuerpos monoclonales, ha sido esencial en delinear los componentes del sistema inmune. Estos anticuerpos son ahora rutinariamente usados en la identificación, recuento y separación de diferentes subpoblaciones de leucocitos y en la clasificación de afecciones malignas de estos leucocitos.

Los anticuerpos monoclonales usados para reconocer LT totales están dirigidos contra los

antígenos CD45 y CD3, mientras que las subpoblaciones de LT "helper" son reconocidos por los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4. Las subpoblaciones de LT citotóxicos y supresores se definen con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD8, mientras que los linfocitos B presentan el marcador CD19. Por otro lado, las células NK, se definen por el fenotipo CD3-, CD16+ o CD56+. No es posible identificar células NK mediante un único antígeno, no obstante, el fenotipo CD3-/CD56+, incluye la mayoría de las células NK. Por ello se requiere marcación con dos fluorocromos, siendo que existe un porcentaje de LT que son CD3+/CD56+. En esta perspectiva, el uso de anti-CD3 marcado con fluoresceína y anti-CD16 y anti-CD56 marcados con otro fluorocromo (ficoeritrina o texas red) es recomendable para determinar en definitiva el fenotipo de las células NK.

3.1.2. Determinación de subpoblaciones de linfocitos mediante inmunofluorescencia

La determinación de subpoblaciones linfocitarias, es también posible mediante microscopía de fluorescencia utilizando anticuerpos anti-CD, marcados con compuestos fluorescentes. Para ello, luego de purificar los linfocitos, se confecciona un frotis con las células fijadas, las que se incuban con los respectivos anticuerpos. Al microscopio, se cuentan a lo menos 250 células, determinando su fenotipo, mediante la marcación del anticuerpo. Este método permite calcular el porcentaje de un determinado

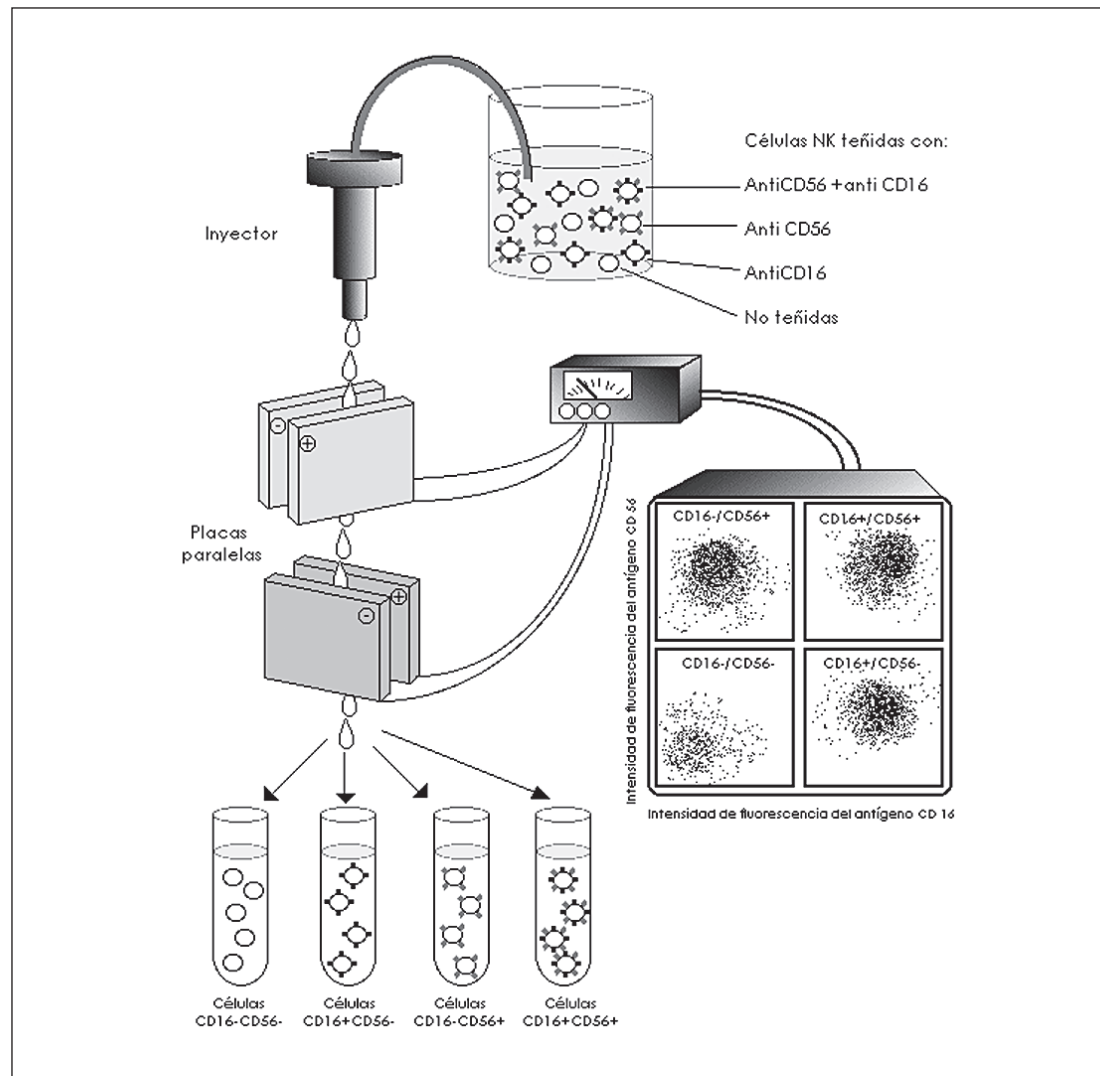


Figura 41-4. Identificación de células “natural killer” mediante citometría de flujo. Para la identificación, separación y recuento de estas células se utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos contra sus antígenos marcadores de superficie CD16 y CD56. Uno de estos anticuerpos está marcado con fluoresceína y el otro con rodamina por lo que emiten fluorescencia en diferentes longitudes de onda.

fenotipo. Mediante un procedimiento un tanto más sofisticado, como es la microscopía confocal, es también posible utilizar dos o tres diferentes anticuerpos marcados con diferentes fluorocromos.

3.2. Estudio de las funciones de inmunidad celular específica

Es aceptado que las características fenotípicas de las células del sistema inmune no proveen información sobre su actividad. Por ello, aunque el análisis funcional es algo más complejo por requerir experiencia y adecuados controles de cali-

dad para así lograr una apropiada interpretación de los resultados, resulta importante evaluar estos parámetros funcionales. La importancia del análisis funcional resalta porque cada vez son más frecuentes sus aplicaciones en el diagnóstico y monitoreo de pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), cáncer, enfermedades autoinmunes y en casos de pacientes que requieren trasplantes de órganos. De igual manera, el uso de inmunomoduladores y MRBs en estudios clínicos precisa de un monitoreo confiable del sistema inmune por parte del laboratorio clínico. Entonces, hoy es posible medir un amplio espectro de parámetros funcionales que in-



cluyen desde la activación, proliferación y productos de síntesis hasta la función de células efectoras. Más aún, considerable progreso se ha obtenido en la separación y aislamiento de varias subpoblaciones de células del sistema inmune. Sin embargo, no sólo los ensayos funcionales pueden ser de utilidad sino que también los estudios estructurales y la detección de células T precursoras.

Así, con un arsenal considerable de ensayos de laboratorio y opciones de evaluar diferentes funciones, la elección de las pruebas más apropiadas permitirá al inmunólogo clínico disponer de la información que permita conocer el estado de la respuesta inmune celular del paciente.

3.2.1. Activación de Linfocitos T

La activación de linfocitos T es un proceso caracterizado por una compleja cascada de eventos bioquímicos y moleculares, cuyo resultado final es la producción de citoquinas, la expresión de receptores, la proliferación y en algunas células la expresión de citotoxicidad. En condiciones fisiológicas, este fenómeno se inicia con la presentación antigénica en el contexto de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) clase I o II e involucra complejos mecanismos de señalización con participación de quinasas, fosfatasa y segundos mensajeros (ver capítulo 10).

Indicaciones clínicas. La activación de células T, debe evaluarse frente a la sospecha de desórdenes inmunológicos congénitos o adquiridos. Dentro de éstos se incluyen la inmunodeficiencia combinada severa (falla en el desarrollo de células B y T), el síndrome de Di George (falla en el desarrollo del timo), síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de Chediak-Higashi (inmunodeficiencia por ataxia telangiectasia con albinismo parcial), inmunodeficiencias variables comunes y frente a infecciones recurrentes por virus, parásitos y hongos.

Las disfunciones de células T, predisponen a infecciones virales por *Herpes simplex*, *Varicella-zoster* y *Cytomegalovirus*. De igual manera la candidiasis mucocutánea recurrente es frecuentemente asociada con disfunción de células T. Dentro de las infecciones por protozoos, *Pneumocystis carinii* y *Toxoplasma gondii* a menudo complican el curso de pacientes con SIDA, en los cuales la subpoblación de linfocitos CD4⁺ es deficiente.

La activación de células T, también puede monitorearse, para evaluar el tratamiento mediante

terapias inmunomoduladoras y para detectar la memoria inmunológica frente a diferentes antígenos como: derivado de proteína purificada (PPD), streptoquinasa, *Candida*, tetanus y difteria.

Ciertos desórdenes inmunológicos como Lupus eritematoso sistémico se manifiestan con múltiples disfunciones de células T. Por ello, cuantificar la activación de células T es también útil para monitorear el efecto de las terapias inmunomoduladoras.

Interpretación de los datos. La capacidad de linfocitos para proliferar, *in vitro*, en respuesta a lectinas mitogénicas como fitohemaglutinina (FHA) y concanavalina A (Con A), es el método más común para evaluar la inmunidad mediada por células. La proliferación celular es ensayada 72 horas después, evaluando la incorporación de ³H timidina en el DNA recientemente sintetizado por la célula T. Métodos de más reciente aplicación permiten evaluar eventos tempranos del proceso de activación, tales como la elevación de calcio intracelular, la activación de proteína quinasa C (PKC) o eventos que ocurren en las primeras 24 h, tales como la síntesis de IL-2 y la expresión de su receptor IL-2R. Estos últimos son los abordajes más directos y presentan varias ventajas técnicas, como el hecho de requerir un pequeño número de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), no necesitan enriquecer los linfocitos T de CMSP, su ejecución requiere menos tiempo y realizada en serie resulta de más bajo costo. Desde este punto de vista resulta apropiado evaluar la síntesis de IL-2 y su receptor, IL-2R, ya que la síntesis de éstos muestra además que las vías en que participa fosfoinositol/Ca⁺⁺ y PKC, están intactas.

La IL-2 es evaluada en sobrenadantes de cultivo de CMSP, luego de la estimulación con mitógenos por 24 h. La cantidad de IL-2 producida por CMSP normales en cultivo, depende del estímulo, las condiciones de cultivo y del método empleado en su cuantificación. La activación de células T puede ser inducida utilizando diferentes agonistas tales como lectinas, anticuerpos anti-receptor, ionóforos y forbol ésteres. Lectinas como FHA y Con A pueden adicionarse directamente a los cultivos de CMSP. En presencia de monocitos que secretan IL-1, las células T producirán IL-2 y desarrollarán una enérgica respuesta proliferativa con "peak" a las 72 h. Las ventajas de usar mitógenos son su estabilidad, bajo costo y fácil



uso. Agonistas específicos como anticuerpos monoclonales contra el receptor CD3 pueden usarse para activar células T y permiten evaluar la capacidad del receptor para iniciar la traducción de señales por la vía fosfoinositol/ Ca^{2+} /PKC.

Una disminución en la producción de IL-2 es asociada con una disminución en la expresión de IL-2R. La disminución en la síntesis de IL-2 y en la expresión de IL-2R sugiere un defecto en la vía fosfatidilinositol/ Ca^{2+} /PKC. Entonces para determinar si esta vía de señalización no es funcional, la medición de Ca^{2+} y de la actividad de PKC pueden ser de utilidad. La determinación de Ca^{2+} en células T puede realizarse usando algunos indicadores fluorescentes como Fura 2 o Quin 2. Por otro lado los ensayos para PKC son sensibles y específicos, no obstante requieren poblaciones enriquecidas en células T. En este tipo de ensayo las células T deben ser activadas por un agonista, para luego preparar un extracto celular en el cual se evalúa la incorporación de P^{32}ATP en un sustrato peptídico sintético o en histonas. Es claro que ambos ensayos requieren personal entrenado y algunas condiciones del laboratorio por lo que no se realizan de manera rutinaria.

3.2.2. Estudio de proliferación de linfocitos

El reconocimiento entre receptores de superficie de linfocitos y determinados ligandos, inicia una cascada de señales intracelulares que inclu-

yen interacciones de membrana con citoesqueleto, influxos de Ca^{2+} , activación de fosfolipasa C, liberación de Ca^{2+} inducida por inositol-trifosfato y activación de genes (ver capítulo 10). Las señales de transmembrana causan cambios significativos en el linfocito como ser la redistribución de receptores, secreción de citoquinas y anticuerpos, movilidad celular, reconocimiento entre células o iniciación de la proliferación celular. Entonces, la capacidad de un linfocito para responder a un ligando, es utilizada tanto en investigación básica como clínica, evaluando la proliferación. Como ya se describió, diferentes lectinas, anticuerpos y compuestos químicos pueden estimular la proliferación de linfocitos. La respuesta proliferativa puede entonces ser evaluada en cultivos de sangre total, o en células mononucleares aisladas y en diferentes subpoblaciones de linfocitos. No obstante, debe considerarse que en muchos casos se requiere más de un tipo celular para responder a un determinado ligando. Frecuentemente, además de las células T, se requiere la participación de células accesorias que expresen asociadas a su membrana moléculas MHC clase II, como monocitos y macrófagos.

De manera sucinta, un ensayo de proliferación debería medir el número de células sobrevivientes y aquellas generadas como consecuencia del estímulo. Esto comúnmente se evalúa de manera indirecta por medio de la incorporación de un nucleótido radiactivo (^3H -timidina) en el DNA sintetizado (figura 41-5).

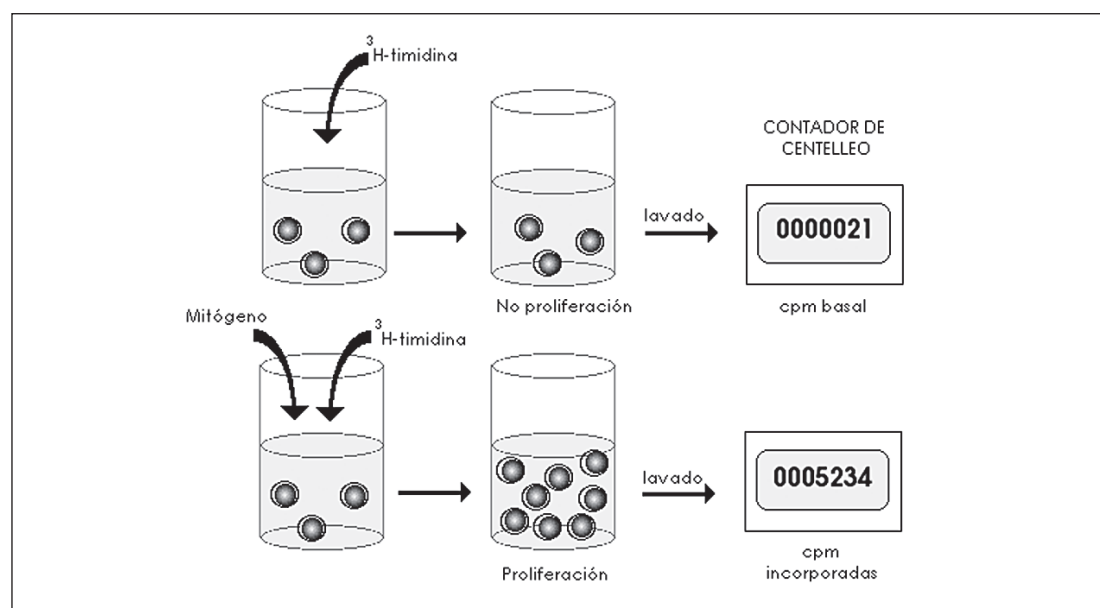


Figura 41-5. Estudio de la proliferación de linfocitos T, mediante la incorporación de ^3H -timidina al ADN. Se miden las cuentas por minuto (cpm) incorporadas al DNA de los linfocitos T que proliferan luego del estímulo mitogénico.



Indicaciones clínicas. Parece claro que los ensayos de proliferación o blastogénesis poseen amplias aplicaciones clínicas. El ensayo es utilizado para estudiar alteraciones derivadas de inmunodeficiencias congénitas, así como también aquellas secundarias derivadas de enfermedades infecciosas, cáncer, desnutrición, cirugías y enfermedades autoinmunes. Dentro de las inmunodeficiencias congénitas se incluye la inmunodeficiencia combinada severa, caracterizada por una marcada deficiencia en las funciones de células B y T (ver capítulo 29). Entonces la utilidad clínica de este ensayo radica en proveer información de la capacidad funcional de linfocitos de sangre periférica. Esta información es de valor para conocer el estado del sistema inmune del paciente y como indicador del progreso de una terapia.

La aparición del SIDA, atrajo nuevamente la atención a la investigación clínica de las inmunodeficiencias y reafirmó la importancia de las determinaciones *in vitro* de las funciones de la inmunidad celular. Por ejemplo, una disminución en la respuesta proliferativa a *Phytolectina americana* (una lectina que actúa como estimulador de células B y T) o frente a algunos antígenos de memoria tales como *Cándida albicans* o toxoide tetánico, tiene valor pronóstico, por ser la capacidad de proliferar un indicador precoz del deterioro de la función inmune en personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), en períodos de la infección en que los niveles de CD4⁺ están aún dentro de límites normales.

De igual manera, el ensayo de proliferación puede ser utilizado para definir otras inmunodeficiencias adquiridas, como el síndrome de fatiga crónica (SFC), que frecuentemente se acompaña con reactivación frente a virus de alta prevalencia como Epstein-Barr o virus Herpes. Por ejemplo, la respuesta proliferativa a PWM estuvo bajo la media de los controles normales en el 95% de pacientes con SFC. De igual manera, la habilidad de linfocitos estimulados con mitógenos a producir IFN, generalmente se puede correlacionar con respuesta proliferativa.

Los antígenos de potencial uso en clínica son numerosos y deben ser escogidos con cuidado de acuerdo al problema a investigar. Para evaluar respuesta frente a antígenos en los cuales altos porcentajes de la población están expuestos, (marcadores generales de inmunocompetencia celular), *Cándida albicans* y toxoide tetánico deberían utilizarse.

La reacción mixta de linfocitos (RML) es una respuesta proliferativa a dos poblaciones de células T alogénicas cultivadas en conjunto. En otras palabras, se usa para conocer la reactividad de la población de linfocitos de un paciente frente a las células de otro individuo. El principal estímulo en este tipo de reacciones son los antígenos del MHC, presentados en la membrana de los linfocitos T. Esta es sin duda la técnica de más amplio uso para estudiar la respuesta inmunológica de los linfocitos. En esta reacción se verifican tres eventos principales: síntesis de macromoléculas, transformación blástica y proliferación. Las células respondedoras en RML son principalmente linfocitos CD4⁺. Éstas reconocen moléculas de MHC clase II por lo que antígenos de Clase II son sus principales estimuladores. Además de poder determinar los niveles de la respuesta de linfocitos, esta reacción sirve para demostrar la compatibilidad de MHC. Se conoce dos tipos de RML, la unidireccional y la bidireccional. En la unidireccional, una población celular sirve como antígeno (también conocidas como células estimuladoras) y es usada sólo después de la inhibición de su propia proliferación. Entonces sólo se determina la respuesta proliferativa de la segunda población celular (también llamadas células respondedoras). En la RML bidireccional la respuesta proliferativa de ambas poblaciones celulares es evaluada ya que ninguna población celular es inhibida en su división. Si existe reconocimiento o reactividad de los linfocitos habrá proliferación e incorporación de ³H-timidina (figura 41-6).

Esta reacción ha sido usada para evaluar los defectos de la respuesta inmune. No obstante, su aplicación más importante es en el área de tipificación de tejidos y trasplante de órganos y células.

Interpretación, rangos normales y control de calidad. La utilidad clínica del ensayo de proliferación depende de la habilidad del inmunólogo clínico para interpretar de manera adecuada los resultados. Esto requiere conocer de manera exacta la respuesta a esperar en individuos inmunocompetentes, para poseer los adecuados controles. Esto implica, además, que cada laboratorio debiera poseer sus propios rangos de valores normales para la respuesta a cada inmunógeno, tomando en consideración aspectos como edad, sexo y grupo étnico.

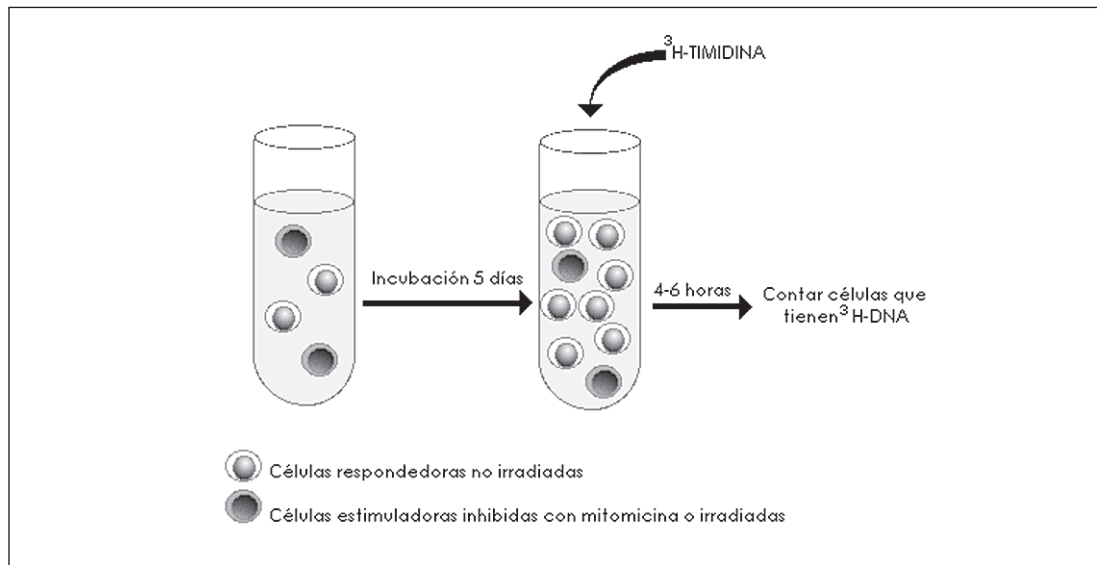


Figura 41-6. Cultivo mixto de linfocitos. Las células no respondedoras (irradiadas) presentan sus antígenos de superficie a las células respondedoras, que como respuesta entran a división celular e incorporan ^3H -timidina en el DNA.

3.2.3. Estudio de la citotoxicidad celular

La citotoxicidad celular es una de las funciones más importantes de esta rama de la respuesta inmune. La citotoxicidad se entiende como la capacidad de una célula de atacar o ser tóxica para otra célula blanco. Esta propiedad la poseen los LT citotóxicos (LTc), las células NK y aquellos tipos celulares que participan de fenómenos de citotoxicidad dependientes de anticuerpos (ADCC) (ver capítulo 19).

De manera general las células citolíticas efectoras se pueden dividir en dos grupos: aquellas que requieren sensibilización previa con un antígeno y reconocen en el contexto de moléculas de HLA y aquellas que no requieren sensibilización previa, ya que poseen reactividad espontánea, su respuesta no está restringida a HLA y son activadas por citoquinas. La mayor parte de las células T CD8- y CD4-, no actúan restringidas a HLA, pero las subpoblaciones (tanto CD4+ como CD8+) pueden ser restringidas a HLA. De igual manera las células T L/B (células TCR2+) pueden mediar ambos tipos de citotoxicidad, donde la expresión de la molécula CD56 permite separar ambas subpoblaciones. La restricción de HLA parece ser más bien relativa que una propiedad constante de los linfocitos T citolíticos. Esto podría depender de la naturaleza y presentación del antígeno, implicando que una célula efectora tiene potencial para ex-

presar diferentes tipos de estructuras de reconocimiento y mediar más de un tipo de citotoxicidad.

Las células citolíticas efectoras humanas comprenden diferentes tipos celulares los cuales dependiendo de su microambiente difieren en número, estado de activación y en el mecanismo utilizado en reconocimiento y muerte de la célula blanco. Luego del reconocimiento y el contacto de superficie, la célula citolítica efectora activa una cascada de señales, desencadenando una acción irreversible y letal hacia la célula blanco. La célula efectora, generalmente puede asociarse a nuevas células blanco en dos o tres ocasiones sin necesitar de reactivar su cascada de señales. En el capítulo 19 se describen los diferentes mecanismos de citotoxicidad que presenta los LTc y células NK.

Significancia clínica e interpretación de los resultados. La evaluación de las funciones citolíticas provee una medida eficaz para evaluar la eficiencia de las diferentes subpoblaciones celulares en estados de salud y de pérdida de ella.

Estos ensayos constituyen una parte sustancial de la evaluación clínica de pacientes inmunocompetentes. Las células citolíticas efectoras parecen jugar un importante papel en una variedad de enfermedades del hombre. Por un lado, una función citotóxica ausente o disminuida, al análisis *in vitro* de células citolíticas, se observa en pacientes con inmunodeficiencias como SIDA,



en pacientes con cáncer, en infecciones crónicas por virus y hongos y en ciertas enfermedades autoinmunes. Por otro lado, la activación de la función citolítica se observa en pacientes inmunodeficientes que reciben una terapia exitosa, en pacientes que se recuperan de infecciones virales y en personas con cáncer que responden a la terapia. Las células citolíticas participan en el rechazo a trasplantes (entre ellos los de médula ósea), eliminación de células anormales y en numerosos procesos patológicos.

Ensayos en sangre humana. Los estudios clínicos a menudo requieren monitorear la actividad de células NK. Sin embargo, en algunos pacientes incluyendo niños la cantidad de sangre disponible es escasa. Por ello, ha sido necesario desarrollar protocolos sensibles que usen pequeños volúmenes de sangre total evitando procesos de purificación. Estos protocolos han proporcionado resultados comparables con los procedimientos tradicionales.

3.2.4. Linfocitos T citolíticos

Las células T LB⁺ (TCR2⁺), que incluyen aquellas células que participan en la respuesta citolítica restringida por HLA, son la principal población circulante de células T. Una población significativamente menor, aunque importante, corresponde a los linfocitos T g/d⁺, los cuales pueden mediar reacciones citolíticas no restringidas por HLA, o semejantes a NK, después de cultivarse en presencia de IL-2, pero podrían también mostrar lisis por antígenos que son restringidos por moléculas de HLA clase semejante a I. Las células LB TCR2⁺, de linfocitos citotóxicos reconocen segmentos relativamente cortos, de 10-20 aminoácidos, que asociados a moléculas de HLA se exponen en la superficie de la célula. Por ello la susceptibilidad de una determinada célula blanco al ataque de una determinada célula citotóxica, depende primariamente del tipo de vía de procesamiento del antígeno en la célula blanco. Así, antígenos que son endógenamente procesados y asociados en la superficie celular con moléculas de clase I, son reconocidos por LTc, CD8⁺. Por otro lado, antígenos procesados por medio de proteasas endosomales se asocian con moléculas de HLA clase II y son reconocidos por LTc, CD4⁺. Es claro que bajo ciertas circunstancias, ambos procesamientos pueden ocurrir en la misma célula blanco.

Los LTc, son importantes en la inmunidad del huésped a infecciones por virus y otros patógenos

intracelulares, en trasplante de órganos y en el control de neoplasias. La actividad antiviral puede ser detectada directamente en CMSP, sólo en períodos relativamente cortos en la infección aguda. Esta respuesta de LTc, se desarrolla dentro de pocas semanas luego de la infección viral. Después de la resolución de la infección aguda, la respuesta de LTc sólo puede detectarse por estimulación *in vitro* de CMSP, cultivando estas células durante varios días en presencia del antígeno viral específico. La CMSP de dadores normales generalmente contienen cantidades suficientes de células presentadoras de antígeno (monocitos) y células ayudadoras (linfocitos T CD4⁺) para estimular esta respuesta de LTc de memoria. No obstante citoquinas exógenas como IL-2 y IL-6, pueden adicionarse al cultivo para aumentar la diferenciación de LTc precursoras en células killer funcionales. Una excepción la constituyen los pacientes con SIDA quienes parecen mantener niveles detectables de células circulantes maduras con fenotipo CD8⁺ específico para HIV.

Todas las otras respuestas por LTc pueden ser evaluadas por medio de una estimulación *in vitro* de las células T de memoria mediante incubación de CMSP con antígenos relevantes, para así inducir una activación *in vitro* y una expansión clonal de las células T reactivas al antígeno. Por ello una falla en la respuesta para generar respuesta por LTc *in vitro*, podría ser indicativo de: a) ausencia de célula T de memoria; b) falla en las células T de memoria para activarse, proliferar o diferenciarse en respuesta al antígeno; c) fallas en la presentación del antígeno por parte de las células presentadoras de antígeno; d) incapacidad para inducir la muerte de la célula blanco.

Los nuevos abordajes terapéuticos como trasplante de médula ósea, transferencia pasiva de células y terapia con citoquinas, están tornando cada vez más importante identificar la causa de la deficiencia de la respuesta por LTc de manera tan precisa como sea posible. Debe quedar claro que una célula citolítica puede ser capaz de reconocer y matar a una célula blanco por más de un mecanismo. Entonces la activación *in vitro* de LTc puede ser capaz de matar tanto de manera específica y restricta a HLA como de manera no restricta a HLA y semejante a como matan las células NK. Por ello la interpretación de los ensayos de LTc es a menudo difícil y requiere una cuidadosa consideración de la historia clínica del paciente, su estado clínico actual y la interpretación de los parámetros de laboratorio en el contexto de los valores normales establecidos por el laboratorio.



Los métodos que evalúan citotoxicidad son comunes a todas las células involucradas en este tipo de reacciones y se basan en la marcación previa de las células blanco con ^{51}Cr . Las células blanco marcadas son incubadas con las células efectoras citolíticas y el ^{51}Cr , liberado por las células y presente en el sobrenadante, es un índice de la actividad citolítica (figura 41-7).

está significativamente asociada con el desarrollo de metástasis a distancia. Las células NK responden rápidamente a MRB, aumentando la citotoxicidad, por lo que esta propiedad puede ser utilizada como un sensible indicador en estudios *in vitro* destinados a evaluar la capacidad de las células del paciente en responder frente a la activación de un determinado agente terapéutico. De

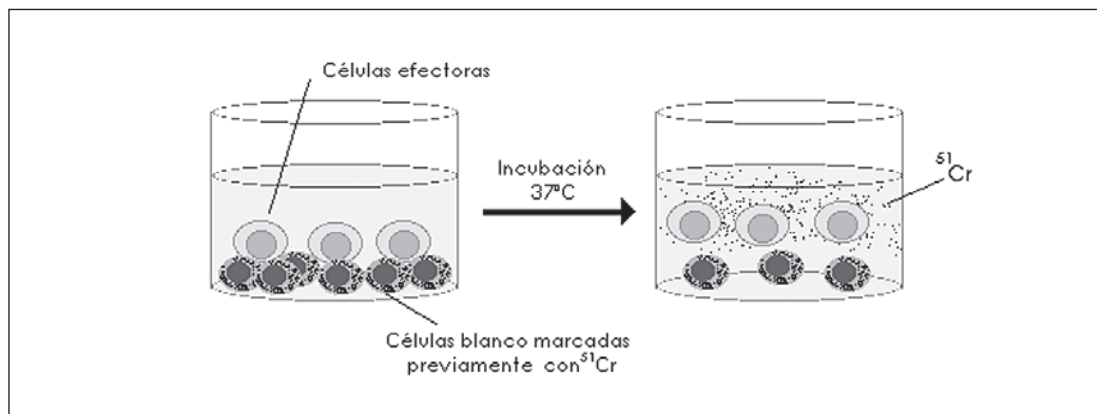


Figura 41-7. Medición de la citotoxicidad mediada por células. Células blanco marcadas con ^{51}Cr , son incubadas con células efectoras (LT, células NK) HLA idénticas; luego la lisis de las células blanco se detecta cuantificando el ^{51}Cr liberado.

3.2.5. Células NK

Las células NK circulantes, representan entre el 10-15% de las CMSP y son capaces de inducir la lisis espontánea de células blanco neoplásicas o infectadas por patógenos intracelulares, sin una necesaria sensibilización y sin restricción de HLA. Evidencias recientes muestran que células NK pueden ser activadas para producir citoquinas tales como $\text{TNF}\alpha$, β e $\text{IFN}\gamma$, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, IL-3 y probablemente otros factores necesarios para el desarrollo células hematopoyéticas. Las células NK parecen ser importantes y activos componentes de varios procesos patológicos en el ser humano. Por ello la medición de la actividad de células NK circulantes o en tejidos parece necesaria para definir la contribución de estas células al proceso patológico. Por ejemplo en cáncer, una baja actividad de células NK tiene un valor predictivo en el progreso del tumor, la respuesta pobre al tratamiento y la disminución en el tiempo de supervivencia sin metástasis. Una baja en la actividad NK también puede significar un factor de riesgo en la instalación de procesos malignos. De igual manera, una baja actividad de NK en la sangre de pacientes

igual manera el monitoreo seriado de la actividad de células NK puede ser usado para demostrar cambios en el estado de activación de células inmunes circulantes durante la terapia con MRB.

El papel de células NK como primera línea de defensa frente a las infecciones es conocido. Por ende en pacientes inmunocomprometidos, hay una estrecha correlación entre actividad NK y la presencia de infecciones severas. En el trasplante de médula ósea, células NK parecen ser las primeras en re-colonizar la médula, por lo que estas células pueden ser importantes para su instalación exitosa y control de las infecciones virales postrasplante. Anormalidades en la respuesta NK pueden encontrarse también en enfermedades autoinmunes. Por todo lo anterior, la evaluación seriada de la actividad NK es necesaria para conocer el estado de la respuesta inmune frente a varias enfermedades.

3.2.6. La reacción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

Los ensayos de ADCC pueden ser clínicamente útiles para valorar la inmunocompetencia de subpoblaciones de células efectoras caracteri-



zadas por la presencia del receptor $Fc\gamma RII$ y $Fc\gamma RIII$. En el hombre, las células NK $CD3-CD56+CD16+$ y una pequeña fracción de células T $CD3+CD16+$ participan en ADCC. Así, en pacientes con varias enfermedades y especialmente en pacientes con cáncer que han sido tratados con MRB, estas pequeñas subpoblaciones pueden expandirse *in vivo* y ser responsables por una fuerte respuesta antitumoral y antiviral. Siendo que las actividades NK y ADCC parecen ser mediadas por diferentes subpoblaciones de CMSP ($CD3-CD56+CD16-$ versus $CD3-CD56+CD16+$ y $CD3+CD56+CD16+$, respectivamente), podría ser necesario monitorear todas ellas en estados de enfermedad. De igual manera, se sabe que estos dos tipos de citotoxicidad parecen participar en momentos diferentes de una determinada enfermedad. Las células NK son la primera línea de defensa mientras que las reacciones de ADCC asumen un papel importante una vez que las IgG dirigidas contra un patógeno o célula blanco han sido sintetizadas y se encuentran en la circulación (figura 41-8).

Otra de las principales aplicaciones de ADCC es la evaluación de la reactividad de anticuerpos contra aloantígenos, células tumorales y virus. La ADCC puede utilizarse para estudiar el suero de pacientes que recibirán un injerto o están desarrollando un rechazo a injerto, en pacientes con cáncer que están siendo tratados con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el tumor y en pacientes con infecciones virales. Entonces ADCC entrega importante información acerca de la función de la citotoxicidad mediada por células en dichos pacientes durante la enfermedad.

3.2.7. Células “killer” activadas por linfoquinas

El ensayo de células “killer” activadas por linfoquinas (LAK) es frecuentemente usado para monitorear la respuesta a la terapia en pacientes tratados con citoquinas u otros MRBs. Células efectoras activadas *in vivo* pueden ser capaces de matar células blanco resistentes a NK. Así, CMSP no son capaces de matar tales células en ensayos de 4 h que miden liberación de ^{51}Cr , mientras que algunos linfocitos residentes en tejidos pueden tener una actividad LAK espontánea. Entonces, la evaluación de la actividad LAK en CMSP frescas es una medida de la activación *in vivo* de células efectoras. Por ello el ensayo de la actividad de células LAK, realizado antes y después de la activación *in vitro* de CMSP con IL-2 u otra citoquina es una medida de la capacidad de células NK y T para activarse y expresar sus funciones efectoras.

3.2.8. Citotoxicidad por macrófagos

En el ensayo para evaluar la competencia de monocitos para destruir células blanco, el tipo de célula blanco puede indicar el tipo de mecanismo involucrado en la destrucción *in vitro*. Alteraciones de la función de monocitos se presentan en algunas inmunodeficiencias o pueden ser secundarias a episodios infecciosos, así como también en procesos malignos y enfermedades autoinmunes y pueden en general acompañarse de inmunosupresión. Generalmente otros ensayos son más comunes para evaluar la capacidad funcional de monocitos, no obstante la evaluación de la citotoxicidad es una función especializada que

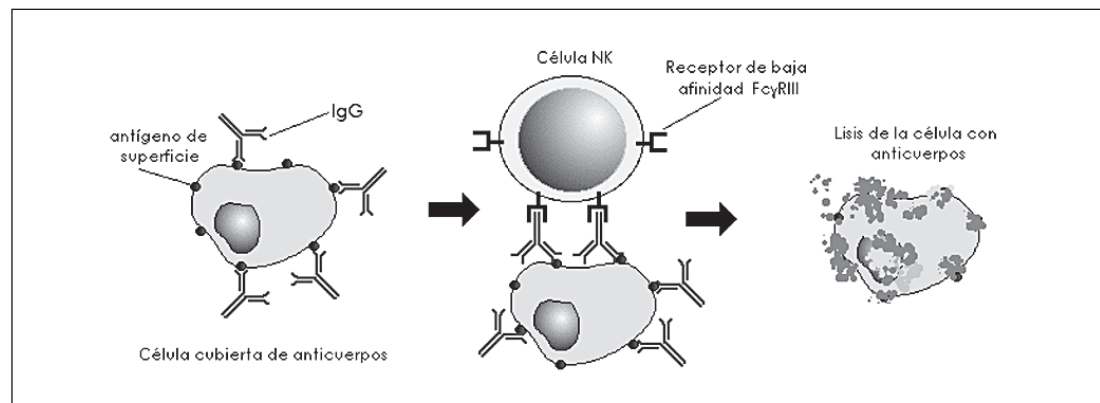


Figura 41-8. Reacción de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. Células blanco incubadas en presencia de anticuerpos IgG, son reconocidas por células efectoras NK que expresan receptores del tipo $Fc\gamma RII$ y $Fc\gamma RIII$. Como resultado final, la célula recubierta de anticuerpos es lisisada.





podría ser importante en pacientes con cáncer y en aquellos que padecen de enfermedades infecciosas. El ensayo de la citotoxicidad de monocitos debe ser usado en conjunto con otras pruebas funcionales, para evaluar la regulación positiva o negativa de la función de monocitos luego del tratamiento *in vivo* o *in vitro* con MRBs.

3.2.9. Nuevos métodos de evaluación de la actividad citotóxica

a) Ensayos de fragmentación de DNA. Diferentes observaciones muestran que las células sujetas a ataque de linfocitos citotóxicos presentan cambios morfológicos semejantes a los observados en células que desarrollan muerte celular programada, también llamada apoptosis. Este proceso es acompañado por pérdida de la integridad de la membrana celular, lo cual la hace más simple de cuantificar.

Los mecanismos de esa muerte celular están basados en la inducción de fragmentación del DNA de la célula blanco, hecho que ocurre pocos minutos luego del contacto con la célula citotóxica. El grado de solubilización del DNA depende de la naturaleza de la célula blanco. Esta afirmación se basa en la observación de que las células citotóxicas inducen el mismo tipo de daño en el envoltorio nuclear de todas las células, sin embargo estos daños llevan a la desintegración celular sólo en algunas células. No obstante, evidencias posteriores no mostraron que el envoltorio nuclear resulte dañado por los LTC en células que no desarrollan desintegración celular.

La verificación de la fragmentación del DNA, requiere de electroforesis en geles de agarosa para demostrar el clásico patrón en escala. Para cuantificar la fragmentación del DNA, es necesario evaluar la fracción soluble. El principio de esta técnica se basa en que el DNA de doble hebra que ha sufrido un extensivo daño se mantiene soluble, mientras que el DNA intacto permanece insoluble. Recientemente el uso de ^3H -timidina en vez de ^{125}I -UdR ha sido propuesto por poseer ventajas como ser menos tóxica para el propio DNA.

b) Cuantificación de apoptosis usando colorantes fluorescentes. El uso de compuestos fluorescentes que se asocian a DNA es una técnica simple que nos permite determinar el porcentaje de células que están en proceso apoptótico. La combinación de bromuro de etidio y naranja de acridina es ampliamente utilizada. Naranja de

acridina tiñe de verde el DNA y de naranja el RNA, ya que este colorante no intercala RNA. Las células muertas son teñidas con bromuro de etidio y se ven naranjas, mientras que las células vivas excluyen este colorante.

c) Cuantificación de la fragmentación del DNA. Estas técnicas se basan en el hecho que DNA fragmentado no sedimenta junto con el cromosoma íntegro cuando es centrifugado. Siendo que esta técnica es complicada sin ventajas comparativas sobre las otras técnicas ya descritas, se recomienda sólo para evaluar poblaciones celulares que no puedan ser fácilmente marcadas en su DNA, como por ejemplo los linfocitos en reposo.

d) Ensayo de pérdida de adhesión de células blanco. Esta técnica tiene por objetivo evaluar las consecuencias funcionales resultantes de la interacción tumor-células T. Por ello la medición de la pérdida de la adhesión de las células tumorales permite evaluar además la actividad lítica de esas células T.

e) Aislamiento de gránulos citoplasmáticos. El estudio de gránulos citoplasmáticos aislados y purificados entrega conocimientos más profundos acerca de los mecanismos de citotoxicidad celular, más allá de la simple observación *in vitro* de la actividad citotóxica.

f) Ensayo de esterasa. Las serino esterasas están dentro de las numerosas moléculas biológicas que participan en los mecanismos de toxicidad celular. El ensayo es simple y confiable y se basa en la medición de las esterasas liberadas durante las reacciones de citotoxicidad en que participan LTC. Los linfocitos citotóxicos pueden ser activados por diferentes mecanismos como anticuerpos monoclonales que semejan el efecto de células blanco portadoras de antígeno, por combinación de ionóforos de calcio y proteína quinasa C (o forbol éster) o de manera tradicional incubándolos con células blanco.

3.3. Estudio de la síntesis de citoquinas y sus receptores

Las citoquinas son glicoproteínas solubles que desempeñan funciones reguladoras. Son sintetizadas y secretadas por diferentes células, siendo capaces de estimular células del sistema inmunológico para inducir cambios en su función,



activación y expresión génica (ver capítulo 11). Las citoquinas son producidas como resultado de la activación celular y se caracterizan porque su síntesis y secreción es breve y autolimitada. Por ello, la evaluación de ellas en muestras biológicas puede ser utilizada para monitorear tanto la respuesta inmunológica como inflamatoria, correlacionándose con el estado de activación de la respuesta inmune celular.

De igual manera, es conocido que los linfocitos T helper, pueden subdividirse en dos subpoblaciones, llamadas Th1 y Th2, las que se pueden caracterizar por el patrón de secreción de citoquinas. El predominio de una determinada subpoblación de LT en el hombre, ha sido asociada a la patogénesis en algunos desórdenes como el asma, las enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso y artritis reactiva, así como también en la resistencia a enfermedades infecciosas y parasitarias. Por ello la determinación de los patrones de citoquinas secretadas por linfocitos humanos es cada vez de mayor relevancia.

Aunque las citoquinas pueden ser directamente evaluadas por medio de ensayos biológicos (evaluando su función biológica sobre células blanco) o por medio de enzima inmunoanálisis (ELISA) (ver capítulo 39), estos métodos poseen algunas limitaciones. La primera, se refiere al tipo de muestra disponible. El ensayo de actividad de citoquinas es apropiado para muestras líquidas, tales sobrenadantes de cultivo o fluidos biológicos, pero no es factible de realizarse en muestras de tejido sólido. El segundo aspecto a considerar es que la cantidad de citoquina en un determinado fluido representa un remanente de la cantidad de citoquina producida con respecto a la utilizada o degradada. Así, los valores de citoquinas como IL-2 e IL-4 en sobrenadantes de cultivo conteniendo anticuerpos anti-IL-2R o IL-4R que bloquean su utilización, son considerablemente más altos que en mediciones realizadas en cultivos en ausencia de estos anticuerpos, sugiriendo que las concentraciones de citoquinas producidas son generalmente mucho más altas que lo que las mediciones tradicionales suelen indicar. Entonces, bajo estas circunstancias la medición en sobrenadantes o en fluidos biológicos, no siempre podría entregar resultados representativos de los reales niveles de síntesis de una determinada citoquina cuando métodos basados en la captura y posterior identificación mediante ensayos tipo ELISA son utilizados.

Aunque los métodos que cuantifican el mRNA específico para cada citoquina, resultan algo más complejos y demandan más trabajo, se han empleado para evitar los problemas derivados de los métodos basados en la evaluación de la proteína o de su actividad. La ventaja de este tipo de ensayos radica en que permiten el análisis de la expresión de una citoquina particular o un grupo de citoquinas en un tejido definido, órgano o grupo de células en un período de tiempo determinado. Más aún, la alta sensibilidad de estas técnicas permiten estudiar la expresión de citoquinas en un pequeño número de células, lo que resulta imposible si se utilizan otros ensayos. Varios métodos han sido propuestos para cuantificar mRNA de citoquinas. Dentro de los más usados están el "Northern blotting", ensayo de protección para ribonucleasa y la reacción de polimerasa en cadena-transcriptasa reversa (RT-PCR). Estos métodos, requieren como primer paso del aislamiento del RNA, previo a evaluar la expresión génica de las citoquinas o su receptor. Por ello, errores en este procedimiento de aislamiento llevan a menudo a errores en los resultados y en la reproductibilidad del método. Se debe considerar de manera especial que el RNA aislado es inestable y sensible a la degradación por ribonucleasas presentes tanto en la muestra original como en el material donde se realiza la extracción. Por ello, para obtener una buena preparación de ARN se debe minimizar la actividad de ribonucleasas durante la lisis de células o tejidos, evitando introducir trazas de ribonucleasas en soluciones o material de vidrio. Para evitar en parte este problema, el material debe ser autoclavado, se deben usar guantes durante todas las fases de la extracción y agua tratada con dietilpirocarbonato, que es una sustancia inhibidora de ribonucleasa. De igual manera, el uso exclusivo de material para la extracción de RNA es fuertemente recomendado.

Los procedimientos de extracción de RNA, utilizan la mezcla de isotiocianato de guanidina y cloroformo más agentes reductores como 2-mercaptoetanol, los cuales desintegran las estructuras celulares, disocian las nucleoproteínas y al mismo tiempo inactivan las ribonucleasas endógenas.

De esta manera, a partir del RNA aislado, se puede purificar el mRNA mediante cromatografía de afinidad en columna de oligo(dT) celulosa, para investigar la expresión de un determinado receptor. No obstante, la mayoría de los métodos utilizados para este propósito, los cuales se describen



a continuación, no requieren de este paso de purificación.

3.3.1. Reacción de polimerasa en cadena-transcriptasa reversa (RT-PCR)

Luego de la descripción original de esta técnica orientada a amplificar pequeñas cantidades de DNA, el método fue adaptado para la detección de RNA, incluyendo un paso inicial que utiliza transcriptasa reversa en el cual el cDNA es sintetizado para ser usado como molde en la amplificación posterior (ver capítulo 44). La PCR usa partidores específicos, ya definidos para la mayoría de las citoquinas tanto humanas como murinas (tabla 41-1).

Estos partidores específicos para cada citoquina, permiten su amplificación a partir de pequeñas cantidades del cDNA generado. Los productos de la PCR pueden ser fácilmente detectados por medio de varias técnicas como la electroforesis en geles de agarosa, los cuales son teñidos con bromuro de etidio, el “Southern blotting” seguido de hibridización con sondas marcadas con ³²P o mediante técnicas colorimétricas que usan sondas marcadas con sustancias fluorescentes. La sensibilidad de estas metodologías de RT-PCR hacen de ellas métodos de elección para la detección de RNA específico, especialmente cuando se trabaja con pocas cantidades de células o con RNA, que normalmente son expresados en pequeñas cantidades.

Tabla 41-1. Secuencias de partidores para la detección de algunas citoquinas humanas mediante reacción de polimerasa en cadena

Citoquina	Partidores
IL-1B	5'-TACGAATCTCCGACCACCTACAG-3' A5'-TGGAGGTGGAGAGCTTTCAGTTCATATG-3'
IL-2	5'-ACTCACCAGGATGCTCACAT-3 A5'-AGGTAATCCATCTGTTCAGA-3'
IL-4	5'-CCTCTGTTCTTCTGCTAGCATGTGCC-3' A5'-CCAACGTACTCTGGTTGGCTTCCTTCA-3'
IL-6	5'-AGCTCAGCTATGAACTCCTTCTC-3' A5'-GTCTCCTCATTGAATCCAGATTGG-3'
IL-10	5'-ATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA-3' A5'-TCTCAAGGGGCTGGGTCAGCTATCCCA-3'
IL-12p40	5'-CCAAGAACTTGCAGCTGAAG-3' A5'-TGGGTCTATTCCGTTGTGTC-3'
IL-13	5'-TATGCATCCGCTCCTCAATCCTC-3' A5'-CGAAGTTTCAGTTGAACCGTCC-3'
TNFα	5'-CGGGACGTGGAGCTGGCCGAGGAG-3' A5'-CACCAGCTGGTTATCTCTCAGCTC-3'
IFNγ	5'-AGTTATATCTTGGCTTTTCA-3' A5'-ACCGAATAATTAGTCAGCTT-3'
β-actina	5'-ATTGCCGACAGGATGCAGAA-3' A5'-GCTGATCCACATCTGCTGGAA-3' P5'-CAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCA-3'



3.3.2. Ensayo de protección de ribonucleasa (EPR)

Es una técnica sensible y específica para la detección y cuantificación de mRNA. Se basa en la hibridización en fase líquida, de una sonda radiactiva de RNA antisense con el mRNA, seguida de la exposición a RNAsas que degradan la sonda remanente así como también cualquier RNA no hibridizado. El material remanente "protegido" es separado mediante electroforesis, visualizado y cuantificado mediante autorradiografía, densitometría o aparatos y "softwares" que permiten evaluar fosfoimágenes. Entonces la intensidad de las bandas es comparada con las cantidades del RNA blanco, originalmente presentes en la muestra. En los últimos años, "kits" comerciales para esta metodología están disponibles, los cuales permiten el análisis simultáneo de múltiples citoquinas en una misma muestra.

3.3.3. Tinción intracelular de citoquinas

Una eventual limitación de los métodos moleculares radica en la imposibilidad de poder seleccionar una determinada célula para su estudio y la imposibilidad de obtener información acerca de la identidad y frecuencia de células productoras de una citoquina particular dentro de una población celular. Entonces, en ausencia de preparaciones celulares puras, estas técnicas no pueden ser utilizadas para estudiar la producción de citoquinas por subpoblaciones definidas de células como es el caso de las subpoblaciones Th1 y Th2 de células T CD4+. Más aun considerable evidencia muestra que cambios en la frecuencia de diferentes subpoblaciones celulares puede ocurrir en diferentes enfermedades por lo que la capacidad para detectar la producción de citoquinas por células individuales y fenotípicamente definidas resulta hoy de particular importancia.

Inicialmente, métodos de dilución limitante y ELISPOT se utilizaron para determinar la frecuencia de células productoras de una determinada citoquina. Estos métodos son laboriosos y consumen mucho tiempo. Por ello, técnicas de reciente introducción basadas en la tinción intracelular de citoquinas han simplificado el estudio de la producción de citoquinas en células individuales. Aparte de ser técnicas de gran sensibilidad y especificidad, no son afectadas por factores como son la presencia de receptores solubles y de membrana para la citoquina en estudio.

Estas técnicas se basan en la detección intracelular, previa permeabilización de la célula, de una determinada citoquina mediante el uso de anticuerpos anti-citoquina marcados con compuestos fluorescentes, seguida de un corto periodo de activación de las células en presencia de un estimulador conocido de la síntesis y en presencia de bloqueadores del transporte de proteínas como Brefeldina A o Monesina. Estos inhibidores impiden la secreción induciendo la acumulación citoplasmática de la citoquina. Las células son también teñidas con anticuerpos dirigidos contra marcadores de membrana (CD3, CD4, CD8, etc.) en atención a definir la población celular productora de una determinada citoquina. Anticuerpos marcados con diferentes fluorocromos están disponibles comercialmente. No obstante dependerá de la población celular a estudiar y de las citoquinas a investigar el tipo de anticuerpo anti-marcador celular y anti-citoquina a ser utilizado.

3.3.4. Evaluación del interferón

Aunque esta molécula fue identificada a fines de la década del cincuenta, como una proteína antiviral, sus vastos efectos biológicos la sitúan como una molécula inmunorreguladora capaz de alterar una amplia variedad de procesos tales como crecimiento celular, diferenciación, transcripción génica y traducción. Los interferones son producidos por una variedad de células en respuesta a la infección, y son por ello sintetizados como producto de la activación de la respuesta inmune (ver capítulo 11). Existen tres tipos conocidos de IFN α , β y γ , por lo que tanto el tipo celular como el agente que actúa como inductor de su síntesis son importantes en determinar el tipo de IFN producido. De esta manera IFN α es producido por linfocitos T y B, macrófagos, células NK y linfocitos granulares grandes, en respuesta a variados estímulos como virus, productos bacterianos, polinucleótidos, células tumorales y células alogénicas. Estos mismos inductores podrían gatillar la síntesis de IFN β , al tomar contacto con fibroblastos, células epiteliales y en menor medida con linfocitos. Por otro lado, el IFN γ es producido por linfocitos T CD4+ y CD8+, para cuya síntesis requieren de la cooperación de monocitos y macrófagos. Esta citoquina es producida de manera específica cuando células T sensibilizadas actúan frente a un antígeno o complejos antígeno anticuerpo. De igual manera,



su síntesis es inducida de forma inespecífica por mitógenos, anticuerpos anti-linfocito o citoquinas como IL-2.

Todos los IFNs pueden aumentar o disminuir en una amplia variedad de reacciones inmunes. Los tipos celulares y las funciones que pueden ser modificadas por los IFNs son variados. Los IFNs modifican la reactividad inmune actuando sobre células B, T, NK, macrófagos, basófilos o células germinales de médula ósea. La alteración resultante de tales estímulos se traduce en la producción de anticuerpos, la citotoxicidad de células T, reacciones de injerto versus huésped, blastogénesis mediada por mitógenos y antígenos, alteración de varias funciones de los macrófagos, hipersensibilidad retardada, citotoxicidad por células NK, liberación de histamina mediada por IgE y maduración de células germinales de la médula ósea. Estos estados de inmunidad alterada pueden ser importantes en la fisiopatología de la autoinmunidad, inmunodeficiencia, procesos linfoides malignos y en infecciones virales.

La sobreproducción, la subproducción o la producción selectivamente localizada de IFN γ puede ser un importante factor en autoinmunidad y en las inmunodeficiencias.

Los tres IFNs son proteínas diferentes desde el punto de vista antigénico, por lo que anticuerpos pueden utilizarse para su identificación y evaluación mediante métodos de RIA y ELISA (ver capítulo 39).

Indicaciones clínicas. Se debe evaluar los niveles circulantes de IFNs, en pacientes con una variedad de desórdenes, así como la detección *in vitro* de la producción de IFN γ podría ser un marcador de la función de células T. De igual manera, IFNs pueden ser evaluados en la circulación de pacientes con desórdenes autoinmunes sistémicos como el lupus eritematoso. En estos pacientes la presencia de IFN α se correlaciona con enfermedad clínica activa. Además, las determinaciones de IFNs son esenciales en el monitoreo de pacientes que participan en estudios clínicos. Ensayos biológicos deberían usarse para asegurar la actividad biológica de IFNs que serán administrados a los pacientes. También, es importante monitorear los niveles séricos de IFN de pacientes que están recibiendo terapia con IFN. La síntesis de anticuerpos anti-IFN, puede ser detectada en el suero de pacientes en respuesta a terapias con IFN. En estos casos, los sueros deberían ser evaluados

mediante algún bioensayo o mediante ELISA.

La producción *in vitro* de IFN γ por células mononucleares de sangre periférica, seguida de la estimulación con mitógenos o antígenos específicos es una manera efectiva de evaluar la función de células T (en lo que respecta a la producción de citoquinas) y la interacción monocito-célula T. Un defecto en la producción de IFN γ u otras citoquinas puede ser sugestivo de que el problema de fondo es una aberración en las señales regulatorias. La depresión en la producción de IFN γ , en respuesta a mitógenos, antígenos específicos o a IL-2 puede indicar un defecto en el número y función de células T y un defecto en la habilidad de monocitos para interactuar con células T. La alteración *in vitro* de los linfocitos para secretar IFN γ frente a un estímulo, se asocia con enfermedades de base inmune como autoinmunidad, inmunodeficiencia, procesos linfoides malignos e infecciones con ciertos virus incluyendo VIH.

a) Ensayos biológicos

Los ensayos biológicos para IFNs, permiten evaluar la extensión en que esta molécula inhibe una o varias manifestaciones del crecimiento viral como son, la inhibición de la producción de partículas virales, la inhibición del efecto citopático, la inhibición de la formación de placas, la inhibición de la formación de antígenos virales o de la síntesis de DNA viral. Estos ensayos requieren la incubación de células con IFN, la remoción del IFN, la infección de las células con virus y la evaluación de la reducción del crecimiento viral. La actividad antiviral observada es cuantificada en unidades (U), donde 1U de IFN corresponde al recíproco de la más alta dilución de IFN que inhibe una magnitud específica del crecimiento o de la actividad viral (generalmente el 50%), comparado con un control no tratado con IFN.

b) Inmunoensayos para IFN

Todos los tipos de IFNs, pueden ser determinados mediante ensayos inmunoenzimáticos e inmunoradiométricos. La principal ventaja de estos ensayos es la rapidez y la posibilidad de tamizar muchas muestras. No obstante, los inmunoensayos no siempre reemplazan a los ensayos biológicos, especialmente cuando se requiere identificar una molécula biológicamente activa, como es el caso de la evaluación de

diferentes partidas de IFNs para uso en inmunoterapia.

Interpretación. Los ensayos para IFN en suero de pacientes con HIV, evalúan la respuesta de células linfoides frente a HIV y agentes oportunistas así como alteraciones en los aspectos inmunorregulatorios. La replicación de HIV puede ser responsable de la presencia de IFN α , β y γ , mientras que la respuesta T a proteínas de HIV, puede ser responsable de los niveles de IFN γ . No obstante, debe quedar claro que en la infección aguda por diferentes patógenos oportunistas se podría observar síntesis de IFNs. Elevados niveles de IFN, se asocian con anomalías en la función inmune tales como hipergamaglobulinemia o depresión de algunas respuestas celulares. Sin embargo la producción de IFNs puede asociarse con síntesis de otros factores no relacionados como son producción de neopterin, aumento de la expresión de moléculas de HLA clases I y II, expresión de $\beta 2$ microglobulina y producción de 2-5 oligoadenilato sintetasa.

Niveles séricos de IFNs son detectados en personas infectadas con HIV y se observan de manera precoz en el desarrollo del síndrome de inmunodeficiencia adquirida. De hecho los niveles séricos de neopterin y $\beta 2$ microglobulina, las cuales son inducidas por IFNs, se elevan

precozmente en pacientes que desarrollan SIDA y por ello poseen elevado valor pronóstico.

3.4. "DNA microarrays"

Este tipo de análisis, denominados genómicos, se han desarrollado en los últimos cinco años y permiten evaluar en forma simultánea la expresión de miles de genes. Los genes de un determinado tipo celular son dispuestos de manera ordenada sobre un soporte sólido. Estos genes están representados ya sea por oligonucleótidos o por fragmentos de cDNA. El mRNA de las células en que se desea estudiar la expresión génica es utilizado para generar las sondas de cDNA total para hibridizar con el "microarray". Estas sondas están marcadas con compuestos fluorescentes, por lo que su eventual hibridización con genes del "microarray" es cuantificada mediante fluorescencia, cuya intensidad refleja la abundancia de un determinado mRNA dentro de la célula en estudio. La medición de la expresión génica mediante esta técnica ha mostrado estar en estrecha correlación con los resultados obtenidos con otras metodologías convencionales como "northern blot" y PCR cuantitativa. Entonces, es posible mediante este método estudiar a gran escala la expresión génica durante la activación de células T, durante la respuesta inmune a diferentes agentes infecciosos o durante la terapia con inmunomoduladores (figura 41-9).

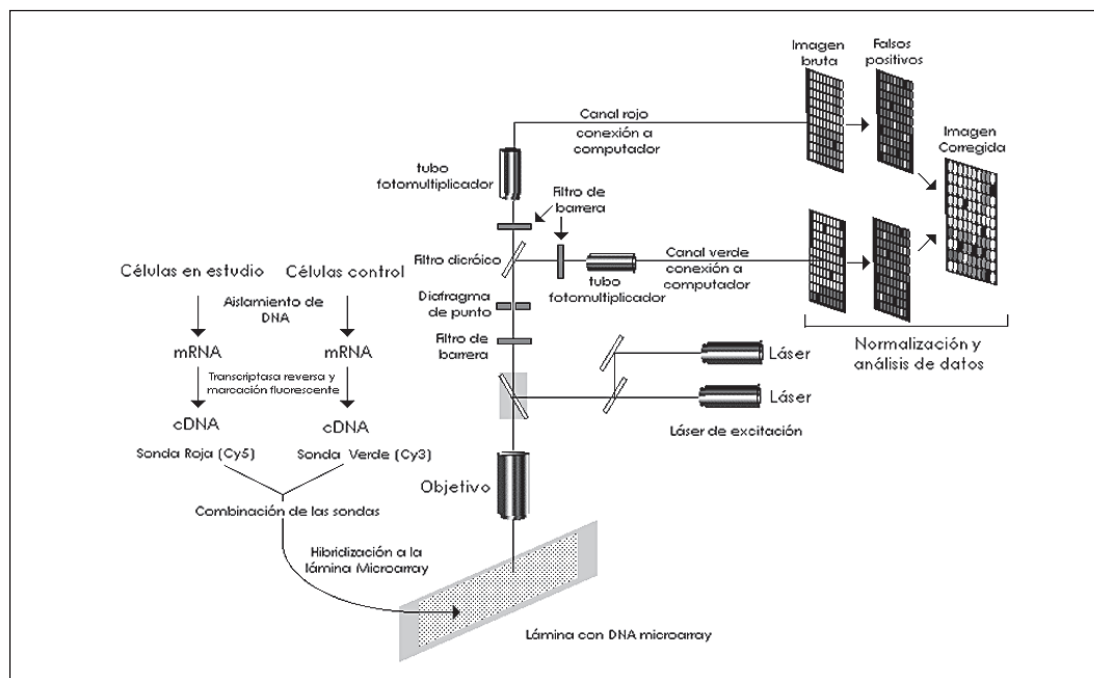


Figura 41-9. DNA microarrays. Representación esquemática de la preparación del material genético, hibridación, captura y análisis de imágenes.



3.5. Pruebas para evaluar reacciones de hipersensibilidad retardada (RHR)

La inyección intradérmica de antígenos, como tuberculina (PPD), estreptoquinasa y *Candida* entre otros, puede inducir una o más de los cuatro tipos de reacciones cutáneas: (a) una reacción circular y enrojecida que alcanza su máxima induración 15-20 minutos después de la inoculación y es debida a la presencia de IgE específica en la piel, (b) una reacción de fase tardía mediada por IgE con una máxima induración entre 12-24 h posteriores a la inyección, (c) una reacción caracterizada por una vasculitis local, denominada reacción de Arthur, que toma lugar entre 12-24 h luego de la inoculación y es mediada por anticuerpos fijadores de complemento presentes en el sitio de la inoculación y (d) una reacción de hipersensibilidad retardada dependiente de macrófagos y linfocitos, caracterizada por eritema e induración en el sitio de la inoculación que se produce en 24-48 h posteriores al contacto con el antígeno. De esta manera las RHR representan un fenómeno de memoria inmunológica, para uno o más grupos de antígenos frente a los cuales el individuo se ha sensibilizado. Esto significa que una exposición previa causó la sensibilización a un determinado antígeno y la nueva presencia de ese antígeno recuerda y alerta al sistema inmunológico. Ello desencadena una respuesta inflamatoria específica al antígeno, donde el diámetro de la reacción es un índice de la hipersensibilidad cutánea. Así, las pruebas de hipersensibilidad retardada usando inyección intradérmica son aún un método válido, de costo razonable para detectar hipersensibilidad y evaluar inmunidad celular en el hombre (única prueba funcional *in vivo*). Respuestas dérmicas positivas generalmente se correlacionan con los ensayos *in vitro* para hipersensibilidad retardada, incluyendo la proliferación de linfocitos y la medición de la síntesis de citoquinas.

Indicaciones clínicas de la RHR. Es útil en la evaluación de pacientes con síndromes de inmunodeficiencias primarias o adquiridas. Si un paciente no presenta reacción después de la inoculación intradérmica de cualquier antígeno, se dice que es anérgico o presenta un estado de anergia. Esta condición debe necesariamente ser comprobada utilizando concentraciones más altas de antígeno.

Las RHR, también han sido utilizadas para

monitorear los resultados de inmunoterapia en algunas enfermedades malignas o en inmunodeficiencias, para monitorear el curso de enfermedades como coccidiomicosis y para el diagnóstico de algunas enfermedades infecciosas.

Interpretación. Debe considerarse que algunos individuos podrían no responder a un determinado antígeno, por no haber tenido contacto previo con él. No obstante, ciertos antígenos son ubicuos y por ello la gran mayoría de las personas responden frente a ellos por haber sido sensibilizados un algún momento de sus vidas. Una revisión de la literatura extranjera, acerca de la respuesta de personas sanas a diferentes antígenos, evaluada mediante RHR mostró que: 75,5% responde a paperas; 53,3% a *Cándida albicans*; 43,5% a *Trichophyton*; 38,3% a toxoide tetánico; 37,6% a tuberculina (PPD) y 20,4% a coccidina. En base a estos estudios, los referidos antígenos podrían ser utilizados en los paneles de evaluación, o al menos ser utilizados para validar la realidad nacional. En orden a obtener resultados reproducibles, deberá existir consenso en lo referente a los antígenos a ser utilizados y establecer criterios uniformes en cuanto a su preparación, vía y forma de administración del antígeno así como también respecto a los criterios a ser utilizados en la evaluación de la respuesta dérmica.

3.6. Estudios de la especificidad de células T

3.6.1. Tetrámeros. Las células T reconocen pequeños péptidos, los que son presentados en el contexto de moléculas de MHC, en asociación con el receptor para células T (TCR). Entonces, es posible utilizar complejos MHC-péptido, marcados con colorantes fluorescentes, los que al asociarse con el TCR permitan visualizar esta ligación y a la vez evaluar la especificidad de esas células T por un determinado antígeno. No obstante, debe considerarse que la asociación entre TCR y el complejo péptido-MHC es bastante débil como para producir un complejo estable. Esto, puede ser compensado mediante el uso de multímeros fluorescentes del complejo péptido-MHC, lo cual aumenta su avidéz por la célula T. Así, dímeros y aún mejor, tetrámeros de complejos péptido-MHC clase I, han sido usados en ensayos de citometría de flujo, para enumerar, caracterizar y purificar células CD8+, específicas para un determinado péptido. En este tipo de ensayos, tanto la cadena ligera como la pesada de MHC, son



producidas en *Escherichia coli*, para luego ser ensambladas *in vitro*, en presencia del péptido antigénico. Los complejos así formados son purificados mediante filtración en gel. Entonces, una molécula de biotina es adicionada en el carboxilo terminal de la cadena pesada de MHC. Esto permite su incubación con fluoresceína marcada con streptoavidina, permitiendo que estos tetrameros puedan ser utilizados en ensayos de ligación.

Relevancia clínica. La frecuencia de células T evaluadas mediante el ensayo de tetrameros es generalmente 10 veces más alta de lo que revelan las mediciones realizadas con métodos convencionales. Considerando que la ligación del complejo MHC-tetramero, requiere la expresión del TCR apropiado, este ensayo no provee evidencia acerca de la funcionalidad de la célula T ya que el ensayo está restringido a epitopos de células T previamente identificados. No obstante la característica más interesante del ensayo de tetrameros es su capacidad para visualizar todas las células T específicas sean éstas precursoras, efectoras, funcionales o anérgicas.

3.6.2. Inmunoscopia. La diversidad del repertorio de células T, es creada mediante un proceso de rearreglo del DNA somático denominado recombinación V(D)J. La tercera región hipervariable (CDR3) tanto de las cadenas α como β de TCR, son producto de esta recombinación. Entonces, mediante PCR utilizando partidores específicos para V y C, las diferentes regiones de CDR3 pueden ser amplificadas y su distribución de tamaños puede ser analizada mediante electroforesis en geles de agarosa. Varias docenas de segmentos de genes BV y 4 ó 5 de BJ que codifican para la cadena β son conocidos en el ratón y el hombre. Por ello, las posibilidades de combinación de los segmentos V y J con los posibles CDR3 representan más de 2.000, las que pueden ser analizadas en una única muestra. Después de la inmunización, unos pocos clones de células T son amplificados. Todas las células pertenecientes a un mismo clon presentarán el mismo CDR3. Este abordaje, ha sido utilizado para visualizar y cuantificar la expansión clonal tanto en el hombre como el ratón. Utilizando la tecnología del PCR, el método inmunoscópico es altamente sensible y una única célula T específica puede ser detectada en 2×10^5 células.

Relevancia clínica. La inmunoscopia provee información acerca del repertorio de células T que ha sido seleccionado durante la respuesta inmune. En combinación con la técnica de tetrameros es posible evaluar la diversidad de clones de células T específicos para un epitopo, expandidas luego de la inmunización. De igual manera, el uso simultáneo de ambas técnicas permite el análisis detallado del repertorio de células T sin necesidad de que estas poblaciones celulares sean amplificadas *in vitro*.

3.7. Detección de células T precursoras

Las células T precursoras no tienen ninguna función efectora. Sin embargo pueden proliferar al enfrentarse al estímulo antigénico. Esta proliferación ha sido ensayada mediante variados métodos que utilizan la incorporación de precursores radiactivos o compuestos fluorescentes. Sin embargo, ninguno de estos métodos permite purificar y caracterizar las células precursoras que proliferan frente a un antígeno. La capacidad de una célula precursora para proliferar, permite la amplificación de una población específica para un antígeno, así como también determinar la frecuencia de estas células precursoras. Esto es posible mediante técnicas de dilución limitante y citometría de flujo. Esta última, utiliza colorantes fluorescentes para teñir la membrana de la célula por lo que es más sensible y de mayor utilidad. Entonces, las células son teñidas con colorantes fluorescentes como carboxifluoresceína o PKH26. Después de cada división celular, las células acaban siendo dos veces menos fluorescentes, producto de la partición del colorante fluorescente en las dos células hijas resultantes de cada ciclo. Esto permite deducir el número de ciclos celulares a partir de la intensidad de la fluorescencia. De igual manera, la frecuencia inicial de células T precursoras puede ser calculada a partir de la fluorescencia observada al final del experimento (generalmente entre 4 y 15 días).

Relevancia clínica. El ensayo de la respuesta proliferativa de células precursoras mediante citometría de flujo es un método que presenta ventajas sobre aquellos que utilizan la incorporación de precursores radiactivos, más aún si se considera que se puede utilizar la misma muestra para determinar en paralelo la asociación de tetrameros.



4. ESTUDIO DE LA INMUNIDAD CELULAR INESPECÍFICA

El estudio de este tipo de inmunidad, involucra evaluar las células y mediadores que participan en esta vía de la respuesta inmunitaria. Dentro de ellos debemos considerar los neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares, PMN), monocitos, eosinófilos y basófilos.

Los defectos en la fagocitosis y muerte celular llevan a un aumento en la susceptibilidad a infecciones y pueden asociarse a alteración de estas células o bien a deficiencias en factores quimiotácticos como C3a y C5a. Éstos también pueden deberse a fallas en la opsonización sea esta por déficit de anticuerpos opsonizantes o de factores opsonizantes del complemento como C3b y C4b.

4.1. Ensayos funcionales de neutrófilos

Los neutrófilos o leucocitos PMN constituyen el más abundante tipo de leucocito en sangre periférica normal, donde sus concentraciones varían entre 2000 y 5000 células/ μ l (ver capítulo 3). Estas células participan en la fase efectora de la respuesta inmune jugando además un importante papel en la inflamación y en la patogénesis de muchas enfermedades. Su función en el control de microorganismos es potenciada por actuar en interdependencia con algunos factores del sistema de complemento y anticuerpos opsonizantes. Los defectos intrínsecos de los neutrófilos que alteran su funcionamiento son, generalmente, de base genética, como es el caso de la enfermedad granulomatosa crónica (ver capítulo 29). En este proceso se observa una ingestión normal, pero el proceso de destrucción intracelular no ocurre. Esto es debido a la inactivación de la enzima NADPH oxidasa, responsable de la síntesis de intermediarios reactivos del oxígeno. Por otro lado, la deficiencia genética de mieloperoxidasa y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, es responsable por los defectos en la capacidad de PMN en inducir la muerte celular de los microorganismos.

Los neutrófilos en su calidad de células fagocíticas, son la principal población celular involucrada en la respuesta inflamatoria aguda. Estas células pueden ser aisladas en gran número y pureza de la sangre del hombre y animales.

a) Medición de la actividad fagocítica. La actividad fagocítica de neutrófilos puede medirse utilizando una variedad de microorganismos tales

como bacterias (*Staphylococcus aureus*) y levaduras (*Cándida albicans*). Los microorganismos fagocitados pueden ser detectados mediante la tinción con colorantes y lectura microscópica así como también mediante el uso de células microbianas marcadas con sustancias fluorescentes (citometría de flujo; ver capítulo 42) o precursores radiactivos para luego evaluar la fluorescencia o radiactividad asociada a los PMN.

b) Ensayo de actividad microbiciida. Para evaluar la actividad microbiciida de PMN, células purificadas son incubadas con microorganismos (*S. aureus*, *C. albicans*), en una proporción célula: microorganismo igual a 1:5, en presencia de anticuerpos del paciente y de C3b más controles apropiados. Los tubos se incuban durante 3 h, tomándose alícuotas cada 30 minutos. En cada caso, las alícuotas son centrifugadas, las células lisadas y la suspensión resultante es sembrada en medios de cultivo apropiados para mediante el desarrollo bacteriano, evaluar la cantidad de bacterias fagocitadas que permanecen viables.

c) Prueba de reducción del azul de nitrotetrasolium. La habilidad de neutrófilos para reducir el azul de nitrotetrasolium (NTB) es una medida de su actividad de NADPH oxidasa y su capacidad para generar productos reactivos intermediarios de oxígeno. El O_2^- y otros productos del estallido respiratorio tienen la capacidad de reducir el NTB a formazán, un precipitado negro azulado que se determina espectrofotométricamente. Alternativamente, los neutrófilos se pueden fijar y examinar al microscopio, después de la incubación con NTB, permitiendo de esta manera determinar el porcentaje de células que contienen el colorante reducido (formazan).

d) Generación de anión superóxido. La generación de anión superóxido (O_2^-) puede ser evaluada utilizando tanto en células estimuladas como no estimuladas, mediante la medición de la inhibición de la reducción de ferrocitocromo c por superóxido dismutasa.

e) Formación de peróxido de hidrógeno. La generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por neutrófilos se produce como consecuencia del estímulo de membrana y puede medirse mediante el método basado en la oxidación del ácido homovainilínico. Esta reacción es catalizada por peroxidasa (HPR) y depende del H_2O_2 generado por



la célula. Métodos fluorescentes de reciente introducción, permiten medir la producción de H_2O_2 usando el 10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazima, el cual en presencia de HPR, reacciona con H_2O_2 , generando resorufina, compuesto que es altamente fluorescente con emisión máxima a 563 nm. La lectura se realiza en microplaca usando un espectrofluorómetro.

4.2. Ensayos funcionales de eosinófilos

Los eosinófilos son granulocitos derivados de la médula ósea y cuyos gránulos contienen proteínas básicas que se tiñen con colorantes ácidos como la eosina. En personas sanas no alérgicas, estas células corresponden al 2-5% de los leucocitos sanguíneos (ver capítulo 3). Aunque son capaces de fagocitar, su función está dada frente a ciertos agentes infecciosos incluyendo los helmintos. Además estas células juegan un papel significativo en la inflamación y la injuria celular seguida a las reacciones de hipersensibilidad retardada. La producción y activación de eosinófilos está bajo el control de células T CD4+ pertenecientes a la subpoblación Th2, responsables por la producción de IL-5, que es el principal factor activador de eosinófilos. Después de su activación, los eosinófilos aumentan de tamaño y disminuyen su densidad. Eosinófilos activados son potentes efectores de reacciones de ADCC y producen una variedad de mediadores inflamatorios incluyendo leucotrienio C4 (LTC4) y O_2^- .

a) Generación de LTC4. El leucotrienio C4 es un mediador derivado de ácido araquidónico que es producido por mastocitos, basófilos y eosinófilos. LTC4 y sus metabolitos derivados, LTD4 y LTE4, son poderosos mediadores de vasoconstricción, jugando un papel central en la patogénesis del asma. La producción de LTC4 por eosinófilos después de estimulación con varios agentes (IL-5, GM-CSF, Zynosan, ionóforo A23187) puede medirse utilizando diferentes kits comerciales basados en el radioinmunoanálisis.

b) Ensayo de anión superóxido. Al igual que neutrófilos, los eosinófilos luego de su activación pueden generar O_2^- . Éste puede medirse inhibiendo la reducción de ferricitocromo c por superóxido dismutasa.

c) Ensayo de adhesión de peroxidasa de eosinófilos. La adhesión de eosinófilos al colágeno o a células de endotelio vascular humano, es

medida en placas de 96 orificios, detectando los eosinófilos asociados a célula por medio de la medición de la actividad de peroxidasa propia de los eosinófilos.

4.3. Ensayos funcionales de monocitos y macrófagos

Desde los trabajos pioneros de Ellie Metchnikoff, los macrófagos han sido considerados como las células responsables de la regulación de la respuesta inmune. Los macrófagos participan en procesos de recambio celular, incluyendo el remodelamiento tisular durante embriogénesis, destrucción tisular y reparación de los tejidos con posterioridad a injurias e infecciones y renovación tisular que permite la eliminación de células senescentes o malignas. Los macrófagos son células de central importancia en la respuesta inmune. Una de sus características distintivas que avala su papel central en la inmunidad es su presencia en la mayoría de los tejidos de nuestro cuerpo. Entonces su principal función es monitorear y regular los fluidos circulantes y reaccionar frente a los cambios. Los macrófagos participan tanto de las vías aferentes como eferentes de la respuesta inmune. Sus funciones son variadas e involucran pinocitosis, degradación de material ingerido, quimiotaxis, actividad antimicrobiana, secreción de monoquinas y otros factores, procesamiento y presentación de antígenos, cooperación con células T y B y actividad citolítica.

Los monocitos y los macrófagos son células que se originan en la médula y son programadas para madurar y diferenciar de la célula hematopoyética germinal hasta ser liberada para circular en la sangre periférica. La diferenciación de monocitos a macrófagos ocurre en diferentes tejidos, dependiendo de la localización tisular y del microambiente al que los monocitos son expuestos.

Los monocitos circulantes y los macrófagos tisulares desempeñan importantes funciones en la defensa del huésped contra microorganismos invasores y células tumorales. Por otro lado, la fagocitosis, degradación y muerte de microorganismos permite a monocitos y macrófagos participar en la presentación de antígenos, primer y esencial paso en el montaje de la respuesta inmune. De igual manera estas células pueden responder a un determinado antígeno secretando citoquinas (monoquinas) solubles, que permiten



activar y reclutar diferentes tipos de células efectoras. La primera monoquina secretada frente a un estímulo antigénico es interleucina 1 (IL-1), que inicia la respuesta inmune actuando sobre células T CD4⁺ y CD8⁺, permitiendo la secreción de IL-2 y la expresión de receptores para IL-2, que permite la proliferación de estas células. Otra monoquina es IL-6, que posee capacidad para activar células NK, timocitos y linfocitos T.

Monocitos activados también producen el factor estimulador del crecimiento de granulocitos y macrófagos, el cual induce la maduración de monocitos y neutrófilos de la médula ósea y la activación funcional de los monocitos circulantes. Monocitos estimulados por antígenos también producen IL-8. El TNF sintetizado por monocitos activados posee propiedades antitumorales pero además es capaz de activar monocitos, granulocitos y eosinófilos. No obstante monocitos y macrófagos no sólo producen monoquinas capaces de estimular la respuesta inmune sino que además pueden producir factores inmunosupresores como prostaglandina E₂. Entonces el aislamiento de monocitos de sangre periférica permite evaluar la actividad microbicida y antitumoral de estas células así como su funcionalidad en producir monoquinas y prostaglandinas.

Indicaciones clínicas. La evaluación *in vitro* de la función de monocitos se recomienda en pacientes en los cuales se sospecha deficiencias en la inmunidad mediada por células. Deficiencia en la función de monocitos se puede manifestar clínicamente como aumento en la frecuencia de infecciones las que podrían ser debidas a fallas en la capacidad de matar gérmenes, en deficiencias en el procesamiento y la presentación de antígenos o en la producción de monoquinas. En estos casos, el primer y más simple ensayo consiste en evaluar la capacidad antimicrobiana seguida de la evaluación de la capacidad de secretar monoquinas como TNF. En pacientes con cáncer, la evaluación de la capacidad tumoricida puede entregar valiosa información acerca de las capacidades funcionales *in vivo* de estas células. Por otro lado la medición de la producción de PGE₂ por monocitos permite conocer el nivel de actividad supresora de los monocitos. Ciertas enfermedades crónicas como cirrosis, tuberculosis, sarcoidosis, actinomycosis y enfermedad de Crohn, pueden asociarse con disfunción de monocitos por lo que el monitoreo de la función de estas células puede ser informativo acerca del estado de la enfermedad.

a) Producción de intermediarios del metabolismo oxidativo. Durante la fagocitosis y la actividad citotóxica, los macrófagos son capaces de producir varios intermediarios del metabolismo del oxígeno. Durante las fases iniciales de la fagocitosis, los macrófagos muestran un aumento en el consumo de oxígeno, cortocircuito de la actividad de hexosa monofosfato y producción de intermediarios de oxígeno, en un proceso conocido como estallido respiratorio. La generación de radicales superóxido es catalizada por una NADPH oxidasa localizada en la membrana, siendo generado por una apropiada estimulación de membrana. Esta oxidasa transfiere electrones de NADPH citosólica al oxígeno extracelular, produciendo H₂O₂, el que es necesario para la muerte de los microorganismos invasores, pero al mismo tiempo causa inflamación y daño tisular. El estallido respiratorio no necesariamente depende de la fagocitosis pero permite caracterizar la actividad fagocítica. La producción de O₂⁻, es el paso inicial de la conversión de oxígeno a peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, los cuales son potentes metabolitos microbicidas. Por ello la evaluación del nivel de producción de O₂⁻, es un importante indicador del potencial microbicida de los macrófagos. En este aspecto, el método más apropiado para la medición de O₂⁻ es evaluar la inhibición de la reducción de citocromo c Fe³⁺ a Fe²⁺, la que es dependiente de superóxido dismutasa.

b) Estudio de la fagocitosis. Bajo el término de fagocitosis se describe la capacidad de células de tomar partículas sólidas, tales como eritrocitos, diferentes microorganismos, materiales orgánicos e inorgánicos. Diferentes eventos celulares han sido asociados con la internalización y subsecuente procesamiento del material ingerido. Cada fase de la fagocitosis es un proceso celular complejo, con características funcionales propias y diferentes requerimientos metabólicos donde participan factores intra y extracelulares. Por ello, la fagocitosis representa uno de los parámetros funcionales usados para caracterizar la función de los macrófagos.

Para obtener una evaluación más objetiva de este proceso biológico, es importante escoger de manera cuidadosa la partícula a ser fagocitada. Además de eritrocitos y varias cepas de bacterias, existen partículas comúnmente clasificadas como inertes que son empleadas como reactivos para la cuantificación de la actividad fagocítica. Ellas son sílica, metales carboxilados, microcristales y partículas de látex. No obstante, la fagocitosis de



bacterias es una de las técnicas tradicionalmente usadas por más de una centuria. Prácticamente todas las bacterias pueden ser utilizadas. Entonces cultivos de monocitos se ponen en contacto con los microorganismos por un período de tiempo. Luego, los cultivos son lavados y se evalúa tanto el número de bacterias intracelulares por cada 100 monocitos, como el porcentaje de monocitos que contienen bacterias intracelulares. El índice fagocítico que muestra la relación entre el porcentaje de macrófagos con a lo menos una bacteria y la media del número de bacterias por macrófagos positivos, puede también ser considerado. Tradicionalmente, esta evaluación se ha realizado mediante microscopía óptica, aunque protocolos más recientes y algunos reactivos comerciales disponibles utilizan bacterias (*Escherichia coli* K12) marcadas con fluoresceína, lo que permite evaluar la fagocitosis por microscopía de fluorescencia, citometría de flujo y espectrofluorometría. Resulta interesante destacar, que las metodologías fluorescentes permiten diferenciar entre microorganismos localizados extracelularmente y los microorganismos intracelulares. Estos protocolos se basan en la observación de la viabilidad del microorganismo al ser teñido con naranja de acridina y luego observado en el rango ultravioleta o con excitación azul. El microorganismo se mostrará de color verde si estuviese viable o de color rojo si estuviese muerto.

Otro posible abordaje, se basa en el uso de microesferas fluorescentes y efectos de bloqueo, que permite la fácil diferenciación entre las partículas asociadas y aquellas interiorizadas. La técnica se basa en la propiedad de algunos colorantes como el cristal violeta o el azul tripan de apagar la fluorescencia de partículas fluorescentes libres o asociadas al monocito, mientras que aquellas interiorizadas permanecen fluorescentes. El fenómeno responsable por este bloqueo se llama transferencia de energía de excitación. La transferencia ocurre cuando el espectro de absorción del agente bloqueador se superpone al espectro de emisión del marcador fluorescente.

c) Evaluación de la actividad microbicida. La actividad microbicida y la fagocitosis puede evaluarse incubando cultivos de monocitos con levaduras, como *C. albicans*, a diferentes relaciones levadura : monocito (1:3; 1:10; 1:30). Luego de incubación a 37°C por 18 h, las levaduras son marcadas metabólicamente con ^{14}C -glucosa, adicionando el isótopo en agua, lo que permite la

lisis de los monocitos. Por ello sólo incorporarán el isótopo aquellas levaduras que permanecen viables, por lo que la radiactividad incorporada se compara con un control en que se cultivó idéntico inóculo inicial pero en ausencia de monocitos. También es posible evaluar la actividad microbicida mediante recuento microscópico del número de células infectadas y el número de levaduras por cada 100 células infectadas.

d) Evaluación de la actividad citostática frente a tumores. La habilidad de monocitos para controlar el crecimiento tumoral, puede evaluarse mediante la incorporación de ^3H - timidina en células tumorales que sobreviven luego de la incubación con monocitos y que son comparadas con la incorporación de células tumorales que fueron incubadas en ausencia de macrófagos.

e) Evaluación de la actividad tumoricida. La evaluación de la actividad tumoricida es semejante a la evaluación de la actividad citostática, con la diferencia de que las células tumorales son marcadas antes de la incubación con los macrófagos.

f) Estudios de inducción de monoquinas. De manera general, cultivos de monocitos purificados son incubados por 24-48 h con algunos inductores de la producción de monoquinas como el LPS de *Escherichia coli*. Luego los sobrenadantes son colectados mediante centrifugación y sometidos a evaluación o congelados inmediatamente. Tanto ELISA como RIA pueden ser usados para la detección de monoquinas. La principal desventaja de estos métodos es que también detectan monoquinas biológicamente inactivas. Por ello, los métodos moleculares, principalmente aquellos basados en PCR, presentan grandes ventajas tanto en sensibilidad como en especificidad (ver punto 3.3.1 y capítulo 44).

- **Ensayo de IL-1.** Para el ensayo de la actividad biológica de IL-1, sobrenadantes de monocitos estimulados son usados para estimular la proliferación dependiente de IL-1 de una línea de células T (clon de células T murinas). El ensayo utiliza IL-1 α como control de la proliferación de las células T.

La presencia de esta monoquina puede ser identificada mediante ensayos de ELISA utilizando preparados comerciales, los cuales tienen sensibilidad en el rango de 20-50 pg/



mL, sin reacciones cruzadas con otras monoquinas y citoquinas.

- **Ensayo de IL-6.** Los ensayos biológicos miden la habilidad de sobrenadantes de cultivo de monocitos estimulados en inducir la proliferación dependiente de IL-6 en una línea celular de plasmocitoma (por ejemplo T1165 o B9). Diluciones seriadas de IL-6 recombinante son incluidas como control. De igual manera, "kits" comerciales pueden ser utilizados para evaluar los niveles de IL-6. La sensibilidad de estos es de 3.5 pg/mL, de proteína por ml, no presentando reacciones cruzadas con otras citoquinas. Estos ensayos son a lo menos tan sensibles como los ensayos biológicos con la ventaja de ser más rápidos y la desventaja de su relativo alto costo.
- **Ensayo para GM-CSF.** Los ensayos biológicos de la actividad de factor estimulador de colonias granulocito-monocito (GM-CSF), miden la habilidad de sobrenadantes de cultivo de monocitos estimulados en inducir la proliferación dependiente de GM-CSF en una línea celular de leucemia humana (con frecuencia se usan los clones Mo7e o TALL-101). Diluciones seriadas de GM-CSF recombinante humano son utilizados como control. En este caso debe considerarse que las líneas tumorales utilizadas son respondedoras tanto a GM-CSF como a IL-3 por lo que una caracterización definitiva de la actividad de GM-CSF, se realiza incubando los sobrenadantes de monocitos esimulados con anticuerpos anti-GM-CSF y anti-IL-3, antes de evaluar la actividad de GM-CSF. De igual manera "kits" comerciales de ELISA pueden ser utilizados.
- **Ensayo de TNF.** Para el ensayo biológico de la actividad de TNF, se evalúa la capacidad de sobrenadantes de cultivo de monocitos estimulados, en lisar una línea celular de fibrosarcoma murino, caracterizado por ser altamente sensible a TNF (por ejemplo WEHI 164-JD). En este caso las células del fibrosarcoma son marcadas con ^{51}Cr y luego incubadas con diluciones seriadas del sobrenadante de cultivo de monocitos. Controles se realizan con células incubadas en ausencia de sobrenadantes. Diluciones seriadas de TNF recombinante son incluidas como control y las

unidades de TNF son calculadas en base a una curva estándar. Considerando que tanto $\text{TNF}\alpha$ como $\text{TNF}\beta$ (también llamada linfotóxina) son detectados en este ensayo, la neutralización con anticuerpos contra cada uno de éstos, es necesaria para conocer cuál monoquina está siendo detectada. No obstante sólo $\text{TNF}\alpha$ es sintetizado por monocitos, por lo que la detección de $\text{TNF}\beta$ sugiere que la preparación pudiese estar contaminada con linfocitos. Si no fuese posible o pertinente marcar las células con ^{51}Cr , el ensayo podría realizarse tiñendo las células al final de la incubación con azul tripan para así evaluar la viabilidad celular o teñir con cristal violeta que tiñe las células tumorales residuales. Esta técnica es particularmente apropiada cuando se usan como célula blanco los fibroblastos murinos L929.

g) Ensayo de prostaglandina E_2 . La prostaglandina E_2 es detectada por RIA. El sobrenadante de monocitos estimulados es ajustado a pH 12,5 con NaOH y luego es hervido, neutralizado y evaluado. Las concentraciones de PGE_2 son calculadas en base a una curva de referencia.

5. EVALUACIÓN DE LABORATORIO DEL PACIENTE INFECTADO CON EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA: UN MODELO DE ESTUDIO DE LAS DEFICIENCIAS EN LA RESPUESTA CELULAR

Frente a la sospecha inicial de encontrarse frente a un paciente infectado por HIV, el diagnóstico de laboratorio se realiza mediante la búsqueda de anticuerpos, utilizando ELISA. Las pruebas de "Western blot" y PCR se usan como confirmatorias. Por ello, la evaluación de la respuesta inmune celular en estos pacientes, es de central importancia ya que permite monitorear el curso de la infección, evaluar el tratamiento y sus resultados poseen valor pronóstico (ver capítulo 30).

5.1 Estudio fenotípico de linfocitos

En base a lo anterior, el estudio inicial del laboratorio debería incluir el análisis fenotípico mediante citometría de flujo, de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T, evaluando particularmente los marcadores CD3^+ , CD4^+ y



CD8+. Este examen se orienta particularmente a conocer el porcentaje y recuento absoluto de LT CD4+, ya que éstos poseen una relación estricta con el estado de la infección. De acuerdo a la clasificación del Centro de Control de las Enfermedades Infecciosas de los Estados Unidos (CDC), en relación a los niveles de células T CD4+, se pueden clasificar a los pacientes en tres categorías: a) Recuentos mayores 500 células/ μ L, b) Recuentos entre 200-499 células/ μ L, c) Recuentos menores a 200 células/ μ L.

No obstante, el avance en las técnicas de citometría de flujo, ha permitido proponer nuevos marcadores con valor predictivo. Entre éstos se incluye evaluar la prevalencia e intensidad del marcador CD38 de células T CD8+, el porcentaje de células CD4+ que muestran pérdida de marcadores CD26 y CD28 y el porcentaje de células CD4+ que expresan el marcador CD95. La intensidad del marcador CD38 en linfocitos CD3/CD8+ se ha podido correlacionar de manera estrecha a la progresión futura de la enfermedad, de manera más absoluta que el recuento único de linfocitos CD4+. Pruebas adicionales podrían ser realizadas en estudios clínicos orientados a evaluar efectos terapéuticos de una determinada droga o el efecto protector de una eventual vacuna. En estos casos podría ser interesante un estudio fenotípico extensivo a otras poblaciones celulares, incluyendo marcadores para monocitos, células NK, células B y marcadores de la activación de células T, tales como HLA-DR o el monitoreo de la expresión de receptor para IL-2.

5.2. Estudio de la respuesta proliferativa

Una de las alteraciones más tempranas del paciente infectado con HIV, es una marcada reducción en la habilidad de los linfocitos T para proliferar *in vitro*, en respuesta a mitógenos, antígenos solubles y aloantígenos. Es por ello importante la evaluación de la respuesta proliferativa de los linfocitos de pacientes infectados con HIV. De esta manera, el estudio de la respuesta proliferativa de células T a mitógenos, antígenos solubles y aloantígenos puede ser de gran valor.

5.3. Estudio de la respuesta citotóxica

Varias evidencias sugieren que LTc podrían ser importantes en la defensa frente a HIV. Éstas se basan en la observación que una fuerte

respuesta por LTc se manifiesta en períodos tempranos de la infección, en personas en que a pesar de estar infectadas por más de una década no presentan signos de enfermedad, o en trabajadoras sexuales y recién nacidos de padres infectados que no contrajeron la infección. Aunque en pacientes infectados con HIV los niveles de CD8+ son cercanos a los niveles normales, la habilidad para generar respuesta LTc, la cual requiere IL-2, está disminuida, ya que se observa una reducción en los niveles de IL-2. Por ello, estudios recientes sugieren la evaluación de la respuesta citotóxica de células T de pacientes infectados, frente a células blanco infectadas con HIV o que expresan proteínas virales. En estos casos se sugiere colectar CMSP y someterlas *in vitro* a estimulación previa con diferentes antígenos de HIV tales como *nef*, *gag*, *pol*, *vif* y *env*. Esta estimulación previa parece ser indispensable, ya que permite la estimulación específica y la amplificación de pequeñas poblaciones precursoras de células T citotóxicas, que pudieran encontrarse en la sangre periférica en el momento de la recolección de la muestra. Por encontrarse en bajo número, de no mediar una estimulación previa, la actividad citotóxica de estas células no sería detectada en ensayos de citotoxicidad convencionales.

De igual manera pueden ser importantes, la evaluación del efecto citotóxico de células NK. Aunque el porcentaje de NK en pacientes infectados con HIV puede permanecer normal, el número absoluto de algunas subpoblaciones de NK pueden estar disminuidas, por lo que la función NK se deteriora según progresa la infección. Entonces, la actividad NK puede ser detectada en CMSP, mediante métodos que miden la liberación de ^{51}Cr por parte de células blanco.

Las reacciones de ADCC, específicas para HIV, pueden también ser evaluadas, ya que la actividad ADCC, mediada por células NK, declina conforme progresa la enfermedad. Dos tipos de ADCC pueden utilizarse en la evaluación de pacientes infectados con HIV. La primera, es denominada ADCC clásica o indirecta, en la cual se usa suero de pacientes infectados y linfocitos de dadores normales. La lisis de las células infectadas es evaluada de mediante la liberación de ^{51}Cr . Por otro lado, la ADCC directa, usa células NK frescas, aisladas de pacientes infectados, las que son cultivadas con anticuerpos citofílicos anti HIV y luego incubadas con células blanco infectadas con HIV o recubiertas con antígenos del virus.

5.4. Evaluación de los niveles de citoquinas y subpoblaciones de linfocitos T

Varias observaciones sugieren, que en la infección por HIV, ocurre una alteración en el balance de la expresión de citoquinas y sus receptores, lo que podría contribuir a la patogénesis de la infección. Elevados niveles de IL-1, IL-6, GM-CSF, TNF α y TNF β se han reportado en suero y líquido cefalorraquídeo en pacientes con HIV. De igual manera, según progresa el síndrome, se observa una disminución en los niveles de IL-2 y IFN γ , a la vez que aumentan IL-4 e IL-10. Esta observación sugiere que durante el transcurso de la enfermedad, la actividad de la subpoblación Th1 disminuye mientras que la subpoblación Th2 aumenta. Siendo que Th1 están asociados a las RHR y a las reacciones de citotoxicidad mientras que Th2 se asocia a la producción de anticuerpos, este cambio en el predominio de una determinada subpoblación podría contribuir a la progresión de la enfermedad. La disminución en la subpoblación Th1 se puede asociar al hecho que en pacientes con SIDA, se observa una significativa reducción en la reactividad de las pruebas de sensibilidad cutánea ("skin-test"). De esta manera, la determinación de citoquinas y sus receptores mediante métodos moleculares parece ser de central importancia en la evaluación de la progresión del síndrome.

Los procedimientos de laboratorio propuestos en la evaluación de pacientes con HIV se resumen en la figura 41-10.

LECTURAS SUGERIDAS

Abbas A. K., Murphy, K., M, Sher, A., "Functional diversity of helper T lymphocytes", *Nature* 383:787-793, 1996.

Abbas A. K., Lichtman, A.H., Pober, J.S., "Effector mechanisms of cell-mediated immunity". **Cellular and Molecular Immunology**, chapter 13, W.B.Saunders Company, 2000.

Castillo D., Vega, P., Reid, M., **Metodología inmunidad celular, Manual de Procedimientos Técnicos de Laboratorio Clínico**, Inst. Salud Pública de Chile, 1994, pp. 26-42.

Fernández-Botran, R. and Vetvicka, V., **Advanced Methods in Cellular Immunology**, chapters 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, CRC Press, 2000.

Hagmann, M., "Doing Immunology on a Chip", *Science* 290: 82-83, 2000.

Kuby, J., **Immunology**, Chap 3, 10, 11, 12, 13, 15, 21, 23, W.H. Freeman and Company, New York, 1994.

Michel, N., Kim. J.H., **HIV Protocols. Methods in Molecular Medicine**, Humana Press, 1999.

Rose, N.R., De Macario, E.C., Fahey, J.L., Friedman, H., Penn, G.M., **Manual of Clinical Laboratory Immunology**, chapters 22-24, 30, 31, 33-36, 41, 42, 59, 64-66, 115, 1992.

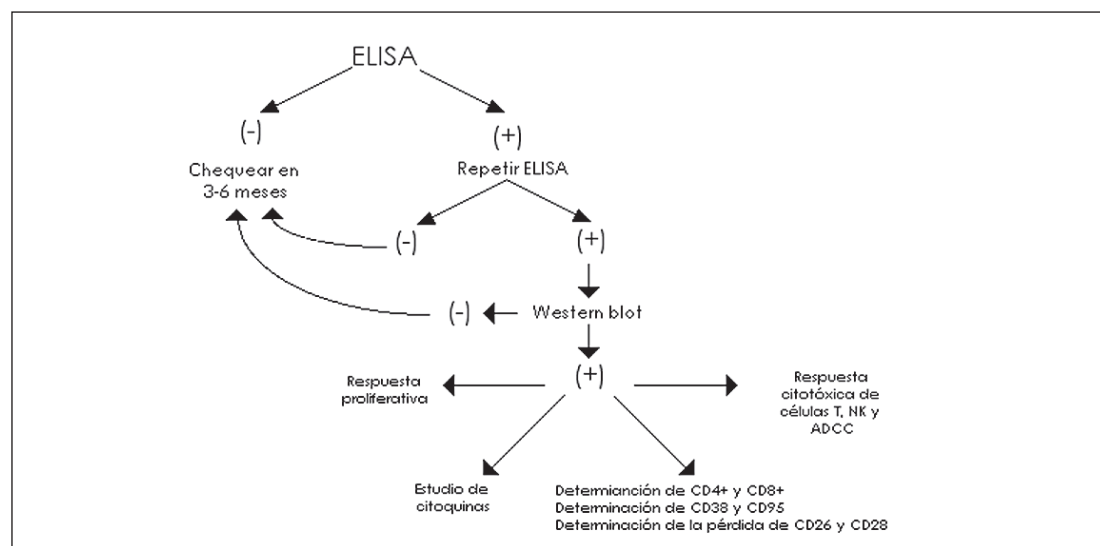


Figura 41-10. Flujograma de la evaluación inmunológica del paciente infectado con HIV.



Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 42

LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y TRASPLANTE DE ÓRGANOS

Susana Elgueta M., Alejandra Arenas C. y Cristina Navarrete

- 1. Introducción**
- 2. Nomenclatura HLA**
 - 2.1. Genética
- 3. Tipificación HLA**
 - 3.1. Técnica serológica
 - 3.2. Técnica celular
 - 3.3. Técnica molecular
- 4. Anticuerpos HLA**
 - 4.1. Anticuerpos reactivos con panel
 - 4.2. Crossmatch
- 5. Requerimientos de histocompatibilidad para trasplante**
- 6. Otras aplicaciones de la tipificación HLA**





RESUMEN

El Complejo Principal de Histocompatibilidad, HLA en el hombre, tiene un rol fundamental en la regulación de la respuesta inmune. El gran polimorfismo de este sistema asegura la supervivencia de la especie, al permitir la presentación de péptidos inmunogénicos derivados de distintos agentes patógenos a los linfocitos T.

Este polimorfismo es reconocido e identificado en el laboratorio clínico a través de la llamada tipificación HLA, la cual ha tenido una evolución importante, desde la tipificación serológica inicial, a las actuales técnicas moleculares que permiten el reconocimiento de las variantes alélicas.

Las técnicas, cada día más sensibles, de identificación de anticuerpos anti-HLA del receptor contra los antígenos del donante, en especial la citometría de flujo, han permitido en el área de trasplantes, evitar rechazos hiperagudos que ponen en riesgo la vida del paciente o sirven como indicador de factor de riesgo para la pérdida del injerto.

Sin embargo, el uso clínico del conocimiento sobre el MHC es aún limitado a sólo algunas áreas de la medicina, pero en la medida que se siga profundizando en el conocimiento y comprensión del rol de estas moléculas del MHC y junto al desarrollo tecnológico, no cabe duda que se ampliarán las fronteras de su aplicación al paciente.

1. INTRODUCCIÓN

Los antígenos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), llamado “Human Leucocyte Antigen” (HLA) en el hombre, es después de los grupos sanguíneos clásicos ABO, la segunda barrera más importante para el éxito del trasplante de órganos, células y tejidos.

La compatibilidad de los grupos sanguíneos ABO es esencial para el éxito de los trasplantes de órganos sólidos y la identidad proporciona mejores resultados en los trasplantes hepáticos y de células hematopoyéticas.

El rol fundamental de las moléculas de HLA de clase I y II es la de unir péptidos antigénicos, y presentarlos a los linfocitos T. Los receptores de antígenos de los linfocitos T (TCR, T cell receptor) sólo reconocen antígenos presentados como fragmentos peptídicos unidos a las moléculas HLA propias. Sin embargo, las moléculas de HLA no sólo pueden presentar péptidos antigénicos derivados de antígenos nominales al sistema inmune como por ejemplo de virus o bacterias, sino que ellas mismas pueden ser reconocidas como antígenos por los receptores de las células T. Este reconocimiento puede ser directo, vale decir de la molécula HLA incompatible o ajena presente en

el tejido o célula trasplantada, o indirecto a través de péptidos antigénicos derivados de estas moléculas de HLA ajenas presente en estos tejidos o células y presentados por moléculas HLA propias del receptor. Estos mecanismos se denominan alorreconocimiento directo e indirecto, respectivamente.

Es así como estas moléculas participan en la fase de inducción y como blanco de la respuesta inmune, en la cooperación entre células inmunes, en la selección del repertorio de linfocitos T y en la inducción de tolerancia.

En el capítulo 8 se explicó el sistema HLA en el hombre y se indicó sus características y los loci correspondientes a las moléculas de clase I y II. Sin embargo, debemos insistir en su organización génica ya que es fundamental para comprender la nomenclatura actualmente en uso, su polimorfismo y las técnicas de su determinación.

Una de las características importante de los genes que codifican las moléculas clásicas de HLA clase I (HLA-A, -B, -C) o clase II (HLA-DR, -DQ, -DP) es su alto nivel de polimorfismo, representado por la gran cantidad de alelos presente para cada uno de los loci de clase I y II.

En las moléculas clásicas de clase I (HLA-A, -B y -C) el polimorfismo radica en la cadena

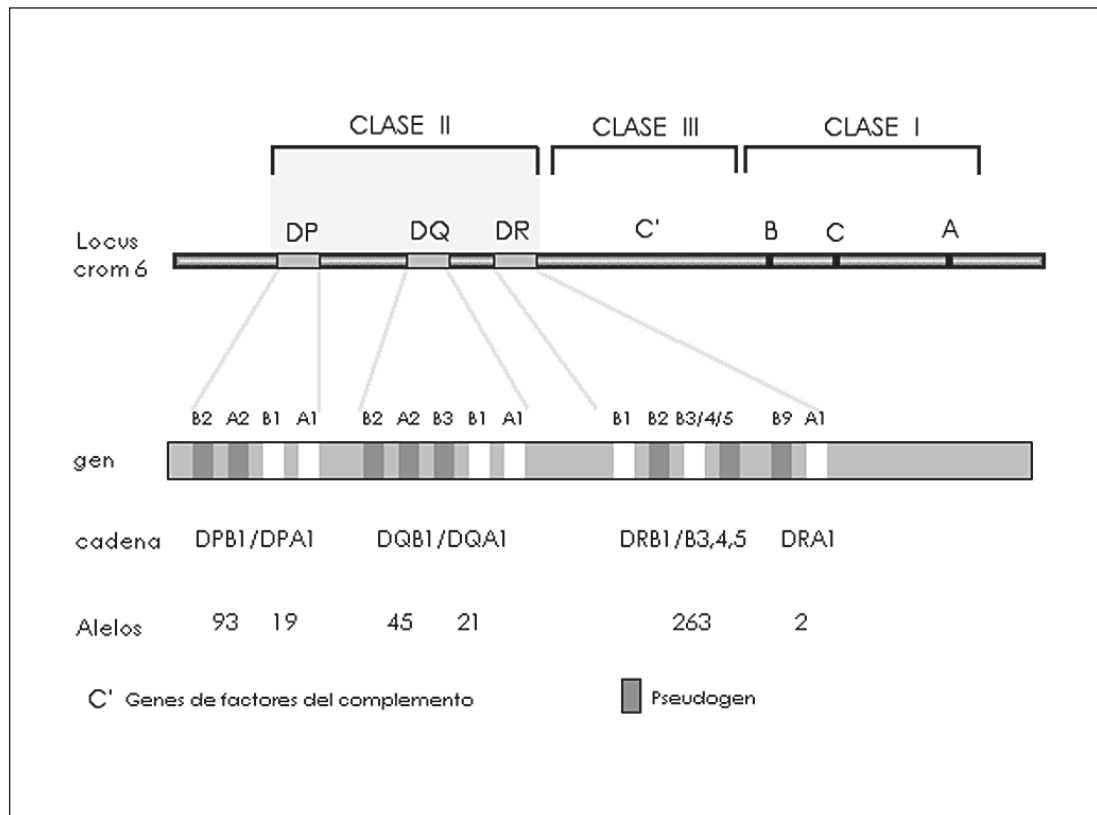


Figura 42-1. Representación esquemática del sistema HLA

pesada o alfa, y el número de alelos descritos para el locus HLA-A es de 209, para HLA-B es de 414 y para HLA-C es de 101. La cadena liviana llamada Beta 2 microglobulina, asociada a las cadenas alfa es constante y está codificada por un gen fuera de la región del HLA.

La determinación de la secuencia nucleotídica de los genes clásicos de clase I (HLA-A, -B y -C) demostró que los alelos o variantes difieren entre sí en sólo unos pocos aminoácidos, presentando una homología global de 75% a 99%. La mayor variabilidad la presentan los dominios alfa 1 y alfa 2, con diferencias de 7 a 15 residuos de los 90 que posee cada dominio, mientras que el dominio alfa 3 que interactúa con la Beta 2 microglobulina es el más conservado. Existen epítomos comunes a varias moléculas clase I como los supertípicos Bw4 y Bw6, y donde se demostró que los aminoácidos en las posiciones 79, 80 y 83 son críticos en la definición de estas especificidades.

A diferencia de los productos de clase I, la homología entre las cadenas alfa y beta de las diferentes moléculas de clase II es moderada, va-

riando entre un 50% y 65%. En las moléculas DR el polimorfismo radica en la cadena beta siendo la cadena alfa esencialmente idéntica. Se describen de 9 a 18 sustituciones de aminoácidos entre los diferentes alelos, en las llamadas zonas de hipervariabilidad correspondientes a los aminoácidos 9-13, 26-33 y 67-74. Sin embargo, en las moléculas DQ y DP el polimorfismo está presente en ambas cadenas alfa y beta. Se han descrito 21 alelos DQA1 y 45 alelos en DQB1. Similarmente, se han descrito 19 alelos en la cadena DP alfa1 y 93 en la DP beta1.

La subregión HLA-DR es la más compleja ya que el número de moléculas expresadas varía dependiendo del haplotipo. Así, el gen DRB1 determina los antígenos HLA-DR1 a DR18, el gen DRB3 determina el antígeno HLA-DR52, el gen DRB4 codifica para HLA-DR53 y el DRB5 para HLA-DR51. Los genes DRB2, 6, 7, 8 y 9 son pseudogenes.

Los dominios alfa 1 y 2 de la cadena pesada de las moléculas clase I y los dominios alfa 1 y beta 1 de las moléculas clase II forman una hendidura o "bolsillo" que une el péptido antigénico y

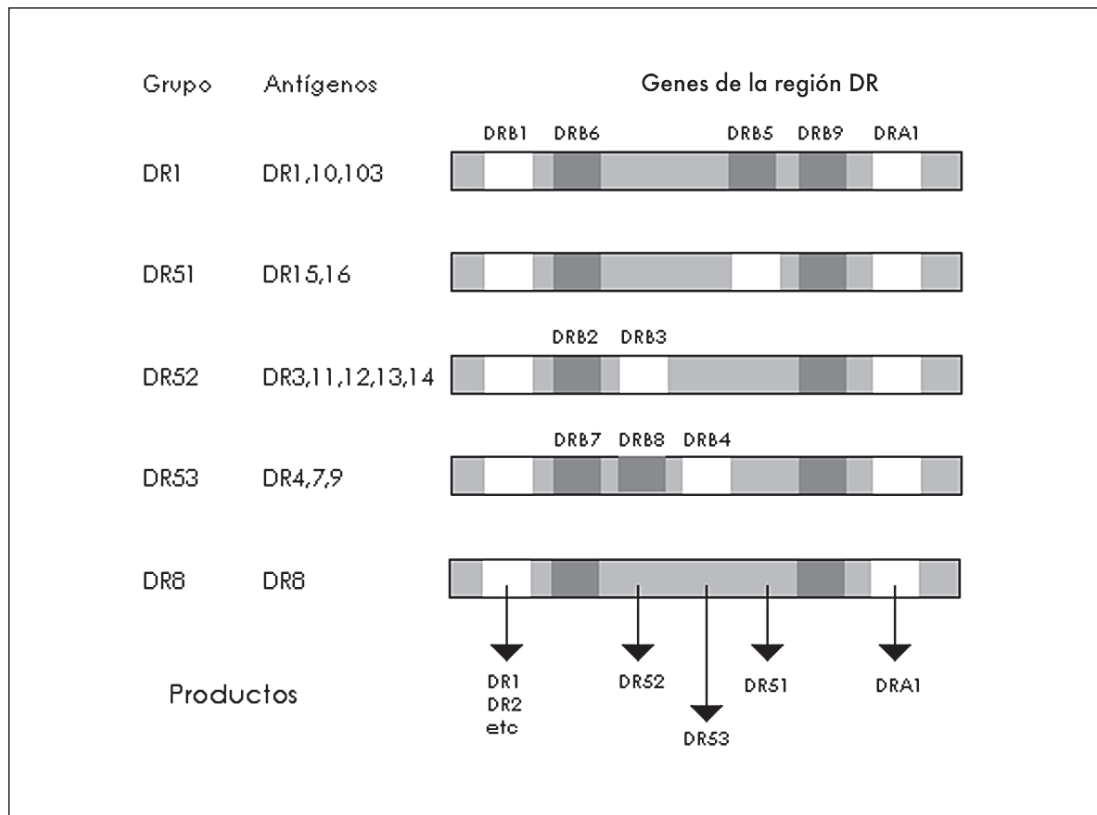


Figura 42-2. Representación esquemática de la Región HLA-DR.

que corresponde a la estructura de una alfa hélice con una base de hoja beta plegada. Los residuos polimórficos, es decir aquellos aminoácidos que varían entre diferentes formas alélicas, son localizados en los lados de la alfa hélice del "bolsillo" o en la hoja beta que forma el piso de este "bolsillo". El polimorfismo entre clase I y II sirve para crear variación en la superficie química del "bolsillo" que une el péptido. Otros residuos polimórficos de la molécula MHC contactan con el receptor para el antígeno del linfocito T.

El polimorfismo de MHC clase I y II determina la superficie química del "bolsillo" y es el principal determinante de la especificidad y afinidad de la unión del péptido y el reconocimiento por células T.

2. NOMENCLATURA HLA

Históricamente los antígenos HLA se denominaron con un número que sigue a la identificación del locus con una letra. Ej.: HLA-A1 es el alelo llamado 1 del locus A del sistema HLA, HLA-A2 es el alelo 2 del locus A, etc. Esta designación se acordó

en las reuniones internacionales de trabajo llamadas workshop, y en aquellos alelos en los que no existe consenso se agrega una w que precede al número, como por ejemplo HLA-Bw 70. En el caso de los alelos del locus C siempre se coloca esta w para diferenciarlos de los componentes del complemento.

La identificación de nuevos alelos por técnicas moleculares dejó en claro que la nomenclatura serológica no era suficiente para dar cuenta de todas las especificidades detectadas, de tal forma que el Comité de Nomenclatura de la OMS acordó designar la letra del gen seguido de un asterisco, luego la especificidad serológica que corresponde a los dos primeros números y luego dos o más números que corresponden a la especificidad molecular. Por ej.: HLA-B*2701 se refiere a la primera variante descrita para HLA-B27. La nomenclatura incorporando el gen (*) indica que la designación se ha hecho por métodos moleculares.

En las tablas 42-1 y 42-2 se indica algunos ejemplos de designación de alelos HLA clase I (HLA-A y B) y II (HLA-DR y DQ), señalándose en cada caso la especificidad serológica, y en el caso de los HLA clase II la especificidad HLA-D



Tabla 42- 1. Ejemplos de designación de alelos HLA.

Alelo HLA	Especificidad HLA	Equivalente previo
A*0101	A1	-
A*0102	A1	-
A*0201	A2	A2.1
A*0202	A2	A2.2F
A*0203	A203	A2.3
A*2301	A23(9)	-
A*2402	A24(9)	-
etc		
B*0702	B7	B7.2
B*0703	B703	BPOT
B*0704	B7	B7E
B*1401	B64(14)	-
B*1402	B65(14)	-
B*1501	B62(15)	-
B*1502	B75(15)	-

Tabla 42-2. Ejemplos de designación de alelos DR.

Alelo HLA	Especificidad serológica	Especificidad HLA-D asociada	Equivalente previo
DRA*0101	-	-	DR α
DRA*0102	-	-	DRH
DRB1* 0101	DR 1	Dw1	-
DRB1* 0102	DR 1	Dw20	DR1-NASC
DRB1* 0103	DR103	Dw"BON"	DR1 CETUS
DRB1* 0104	DR1	-	DRB1*01New
DRB3* 0101	DR52	Dw24	DR3III,
DQA1*0101	-	Dw1	DQA 1.1, 1.9
DQA1*01021		Dw2, w21, w19	DQA 1.2, 1.19
DQA1*0201		Dw7, w11	DQA 2, 3.7

2.1. Genética de los antígenos HLA

Es importante recordar que el sistema HLA es un sistema genético codominante, es decir se expresan tanto los genes heredados de la madre como del padre y que el alto grado de polimorfismo hace poco frecuente la existencia de individuos homocigotos.

Por lo tanto al determinar (o tipificar) en el laboratorio las moléculas o antígenos HLA encontraremos la expresión de 2 moléculas distintas para

cada locus. En la práctica diaria del laboratorio encontraremos que los individuos heterocigotos presentan 2 antígenos HLA-A, 2 antígenos HLA-B, 2 HLA-C, 2 HLA-DR, 2 HLA-DQ. Otros antígenos de clase II, como los codificados por el locus DP, son más difíciles de determinar ya que no existe serología disponible y sólo son detectados con técnicas celulares o de DNA.

Otro aspecto importante del sistema HLA, es la existencia de alelos en diferentes loci HLA cuya frecuencia de combinación es mayor a la espera-



da por la frecuencia génica individual de cada uno de ellos, esto es lo que se denomina desequilibrio de ligamiento (ejemplo A1, B8, DR17)

Este patrón de segregación ha permitido el establecimiento de haplotipos, algunos de los cuales son característicos de un tipo de población humana, en cambio otros se encuentran presentes en todos los variados grupos étnicos.

El tipo de herencia mendeliana y la expresión codominante determina que entre hermanos exista un 50% de probabilidad de ser semiidénticos en estos antígenos HLA, es decir, compartir un haplotipo (haplotipo son los genes heredados en un mismo cromosoma), un 25% de probabilidad de ser idéntico (compartir los 2 haplotipos), y un 25% de probabilidad de no compartir haplotipos. Sin embargo, la determinación de haplotipos y genotipos sólo puede ser hecha por estudios familiares. La probabilidad de posibles haplotipos en individuos no relacionados, debe ser realizada en base a la frecuencia de haplotipos para el grupo étnico al que pertenece el individuo.

Los fenotipos y genotipos deben ser expresados de acuerdo a las recomendaciones de la O.M.S., como en los siguientes ejemplos:

Fenotipo: HLA-A2,30; B7 (Bw6), 44 (Bw4); Cw5; DR1,4; DQ5,7

Genotipo: HLA-A2, B44(Bw4), Cw5, DR1, DQ5 / A30, B7(Bw6), Cwx, DR4, DQ7.

Los antígenos indicados entre paréntesis corresponden a antígenos públicos o supertípicos, presentes en varios alelos.

3. IDENTIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS HLA

Las técnicas utilizadas en la tipificación HLA son de tres tipos, básicamente: Técnica serológica, Técnica celular y Técnica de biología molecular.

3.1 Técnica serológica. la técnica de microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento, desarrollada por Terasaki fue la técnica estándar para tipificación HLA durante muchos años. La técnica serológica permitió la definición de los antígenos HLA presentes sobre la superficie de las células. En esta técnica, sueros de especificidad conocida (de origen policlonal o monoclonal) se enfrentan con las células que se quieren tipificar, y en presencia de complemento

de conejo se produce la muerte celular en aquellos pocillos en los que se produce reacción antígeno-anticuerpo. La reacción se evidencia por tinción con colorantes vitales o con fluorocromos y se visualiza generalmente en microscopio de fase invertida o de fluorescencia.

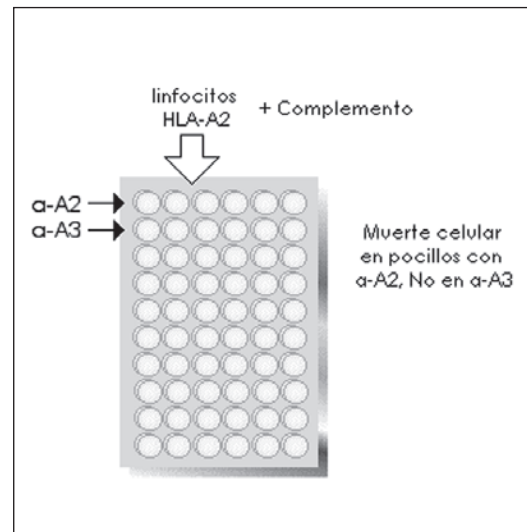


Figura 42-3. Representación esquemática de la técnica de microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento.

Es importante recalcar algunas características de esta técnica que son las grandes limitantes:

- Requiere de células con viabilidad mayor al 90% y alta pureza
- Es difícil obtener antisueros monoespecíficos contra determinadas especificidades HLA y más aún contra subtipos.
- Reproducibilidad baja entre baterías comerciales
- Los antígenos HLA así determinados presentan reacción cruzada entre ellos, por lo que es aconsejable disponer de dos o más sueros de distinta procedencia pero con la misma especificidad para asegurar la identificación del antígeno HLA.
- El tipo celular en el que se determinarán los antígenos HLA deben expresar dichos antígenos. Es así como para la tipificación de moléculas clase II (HLA-DR y DQ) se utiliza preferencialmente linfocitos B los que deben ser aislados de los linfocitos totales, ya que representan sólo un 15 a 20% de ellos. Para esto se utiliza separación por columnas de lana nailon o perlas magnéticas. Estas últimas aun-



que de mayor costo, dan mayor pureza a la separación celular. La tipificación de moléculas clase I (HLA-A,B y C) es más simple ya que se puede realizar en linfocitos totales.

Algunos antígenos muestran reactividad cruzada entre ellos, lo que está dado por el hecho que diferentes determinantes antigénicos o epítomos son compartidos entre diferentes especificidades, esto debe ser considerado en el momento de la interpretación de la tipificación serológica

Determinantes antigénicos compartidos por muchos antígenos HLA se les denominó epítomos públicos (ejemplo: Bw4 presente en B51, B52, B44, B49 etc., Bw6 presente en B35, B45, B50 etc). Existen además epítomos compartidos por un grupo de antígenos y éstos son los llamados CREG (“cross reactive group”), por ejemplo el grupo de los antígenos B5, B35, B51, B52, B53

3.2 Técnicas celulares. Estas técnicas permitieron en los primeros años determinar los antígenos de clase II DR y DP, para los cuales no se disponía de serología. Estos antígenos se denominaron HLA-Dw y hoy se sabe que las especificidades de los antígenos Dw no tienen correlación exacta con los antígenos detectados por serología o por biología molecular. La identificación de estos epítomos que estimulan el cultivo mixto linfocitario y que se identifican como alelos Dw se realiza con un panel de células homocigotas previamente caracterizadas para cada uno de los alelos Dw conocidos. Estas células irradiadas, se usan para estimular la proliferación de los linfocitos a tipificar, los que responderán ante alelos diferentes y no responderán ante alelos idénticos.

Los alelos HLA-DP se identifican por un cultivo mixto secundario de linfocitos, ya que son débiles estimulantes en cultivos primarios. Se debe disponer de un panel de linfocitos previamente estimulados, los que responderán al enfrentarse a las células que presenten el mismo alelo HLA-DP que las estimuló primariamente. En este caso la reactividad celular sí se correlaciona con el polimorfismo de las moléculas DP.

Como es obvio estas técnicas son más complejas que las serológicas por lo que su uso está limitado a sólo algunos laboratorios con una adecuada infraestructura. Con la introducción rutinaria de las técnicas moleculares para la definición de los antígenos de clase I y II, estas técnicas celulares han quedado prácticamente obsoletas.

3.3. Técnicas de biología molecular. Al igual que en otros campos, las técnicas moleculares han revolucionado la tipificación HLA. El extremado polimorfismo de los genes del MHC y la gran homología entre las secuencias, se han convertido en un desafío importante para los biólogos moleculares. En los últimos años, múltiples técnicas que requieren de DNA se han desarrollado con el fin de ser aplicadas en el laboratorio de Histocompatibilidad, de acuerdo a la urgencia clínica de los resultados, al número de muestras, sensibilidad de las determinaciones y equipamiento de cada laboratorio.

Los métodos moleculares ofrecen mayor flexibilidad en la resolución, reproducibilidad y exactitud comparada con la serología tradicional. Las técnicas basadas en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) son las más utilizadas para la tipificación HLA. Éstas pueden ser clasificadas de acuerdo a la metodología que utilizan para detectar los alelos:

Técnicas de hibridización y sondas:

- PCR-SSO (oligonucleótidos de secuencia específica)
- PCR-Oligocaptura en sándwich
- PCR- Oligocaptura de fase dual

Técnicas basadas en electroforesis

- PCR-SSP (secuencias de partidores específicos)
- PCR-RFLP (polimorfismo de largos fragmentos de restricción)
- PCR-SBT (tipificación basada en la secuencia)

Técnicas de análisis de conformación de DNA

- PCR-SSPC (polimorfismo conformacional de hebra simple)
- PCR-HA (análisis de heterodúplex)
- PCR-UGH (análisis de heterodúplex con un generador de heterodúplex universal).
- PCR-RSCA (análisis conformacional mediado por hebras de referencias)

Las más utilizadas, a nivel de laboratorio clínico, son las técnicas PCR-SSP y PCR-SSO, ya que son capaces de entregar información básica como la serología. Virtualmente las mayores ventajas que presenta la tipificación basada en PCR son la flexibilidad de la resolución que depende del número de partidores o sondas que utilice, lo que permite tener pruebas de baja resolución a alta resolución y la consistencia en la definición, ya que siempre se usan los mismos reactivos (primers o sondas).



Tabla 42-3. Comparación de técnica PCR-SSP Y PCR-SSO

Característica	PCR-SSP	PCR-SSO
Partidores	Multiples	Único
Sondas de oligonucleótidos	No	Múltiples
Visualización	Electroforesis	Quimioluminiscente
Estándares internos de PCR	Sí	No
Resolución	Baja y mediana	Mediana y alta

Una ventaja del PCR-SSP sobre el PCR-SSO es que el PCR-SSP detecta polimorfismo unido a un cromosoma individual (cis), mientras que PCR-SSO detecta polimorfismo del DNA de ambos cromosomas (cis y trans). Así el PCR-SSP tiene un mayor poder para discriminar entre heterocigocidad que involucre dos alelos relacionados fuertemente.

Un DNA de buena calidad es imprescindible para la PCR-SSP y PCR-SSO. Sangre con citrato o EDTA como anticoagulante es preferible a la heparina que inhibe la PCR y específicamente la PCR-SSP.

La desventaja que se atribuye a trabajar con métodos moleculares basados en secuencias conocidas es que variantes alélicas nuevas pudieran no ser detectadas o discriminadas de alelos conocidos. Para eliminar esta posible falla, tanto para SSO y SSP, se utilizan un gran número de partidores o sondas cuyas combinaciones pudieran, potencialmente, detectar estos nuevos alelos y aumentar la resolución del sistema de tipificación.

Métodos utilizados a nivel de investigación:

Tipificación basada en la secuencia

Se realiza un secuenciamiento a partir de producto de PCR alelo específico y su aplicación está relacionada con laboratorios de referencia por su capacidad para detectar alelos nuevos y con laboratorios de tipificación para trasplante alogeneico de médula ósea.

Análisis conformacional del DNA

La comparación de secuencias alélicas ha permitido comprender que cada alelo individual contiene una única combinación de secuencias, cada una de las cuales tiene su forma. Esta forma de

polimorfismo ha complicado la aplicación de métodos basados en DNA que permite una identificación de las secuencias para los tipos de genes HLA. Una alternativa de aproximación de este problema es el uso del análisis conformacional del DNA sobre la base de electroforesis en gel de poliácridamida no denaturante. Se utiliza principalmente para identificar mutaciones.

En resumen, podemos decir que las grandes ventajas de la biología molecular sobre la serología, dada por su sensibilidad y especificidad, es la identificación de los verdaderos homocigotos, la asignación certera de los alelos y la identificación de subtipos, además del uso de pequeños volúmenes de muestra para la obtención de DNA, lo que es muy ventajoso en muestras pediátricas.

4. ANTICUERPOS HLA

Las principales vías de sensibilización a los antígenos HLA son los embarazos, transfusiones y trasplantes, lo que se traduce en la presencia de anticuerpos HLA. Esta sensibilización se pesquisa en el laboratorio a través de la determinación del PRA ("Panel reactive antibodies"). En trasplantes no sólo es importante definir el grado de sensibilización, sino también determinar la especificidad de dichos anticuerpos.

4.1. Anticuerpos reactivos con panel

La técnica tradicional para determinar el grado de sensibilización a antígenos HLA consiste en enfrentar el suero del paciente con un panel de linfocitos, en base a la técnica de microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento. Se define el porcentaje de células con las que dicho suero reacciona, lo que se traduce en porcentaje de



PRA. Por ejemplo, si el panel de células está constituido por 40 células y el suero reacciona con 20, ese suero tiene un 50% de PRA, si reacciona con las 40 células tiene un 100% de PRA y si no reacciona con ninguna tiene 0% de PRA.

Es importante en la constitución del panel celular considerar la distribución normal de los antígenos HLA de la población, de tal forma que estén representados todos estos antígenos en el panel. Este panel puede ser formado por linfocitos totales o linfocitos T que identificará principalmente anticuerpos anti-HLA clase I, y también se puede tener panel de linfocitos B y de células de leucemia linfocítica crónica (LLC). Estas células se mantienen criopreservadas en nitrógeno líquido, donde mantienen su viabilidad por muchos años. También es posible determinar el PRA utilizando células frescas al azar o preferentemente de individuos previamente tipificados (con antígenos HLA conocidos)

En esta reactividad hay que considerar la posibilidad de la presencia de autoanticuerpos, los que darán altos porcentajes de PRA, falsos. Las células de LLC, expresan antígenos HLA clase I y II, pero prácticamente no expresan autoantígenos, por lo que son útiles en la interpretación de esta reactividad. Los autoanticuerpos se identifican por la presencia de un autocrossmatch positivo.

Desde hace algunos años han aparecido nuevas técnicas para la determinación de anticuerpos anti-HLA, entre éstas destaca el uso de ELISA comerciales, algunos de los cuales son útiles como screening para determinar presencia de anticuerpos anti-clase I y II; detectan anticuerpos no fijadores de complemento. Estos kits comerciales de ELISA, utilizan antígenos HLA clase I y II solubilizados y unidos a las microplacas y el revelado utiliza un conjugado anti IgG o anti IgM

humana unido con enzima, la que convierte un sustrato en producto coloreado, cuando se ha producido la reacción antígeno-anticuerpo inicial.

Más nueva es la aparición del uso de la citometría de flujo en la determinación de PRA, de alta sensibilidad y con capacidad para detectar anticuerpos no fijadores de complemento. Esta determinación se realiza incubando partículas unidas con antígenos HLA con el suero del paciente, seguido por la adición de una anti-inmunoglobulina humana marcada con un fluorocromo, y analizándose las muestras en el citómetro de flujo.

Estas tres técnicas también pueden ser utilizadas en la determinación de especificidad de estos anticuerpos anti-HLA. La identificación de la especificidad puede ser bastante compleja y de alto costo, pero es muy útil para la interpretación de las pruebas cruzadas entre donante y receptor (crossmatch, XM). La determinación de la especificidad anti-HLA muchas veces requiere contar con un software de análisis que permita identificar estas especificidades en el suero de los pacientes.

Se recomienda que la sensibilidad del test escogido para determinar los anticuerpos -HLA sea similar a la de la técnica que se utilice en las pruebas cruzadas o crossmatch.

4.2 Crossmatch

El objetivo de esta prueba es pesquisar la presencia de anticuerpos preformados contra antígenos HLA presentes en el potencial donante. Esta prueba consiste en enfrentar el suero del paciente con las células del donante potencial, lo que se denomina alocrossmatch. La forma clásica utiliza la técnica de microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento, con variantes que aumentan la sensibilidad de la prueba, como lavados, aumento del tiempo de incubación, uso de anti-

Tabla 42-4 Expresión de moléculas clase I y II en distintas poblaciones celulares.

Célula	MHC-I	MHC-II	autoAntígeno no MHC
Linfocitos T	+	sólo activados	+
Linfocitos B	+	+	+
LLC*	+	+	-

LLC* : leucemia linfocítica crónica
+ : molécula presente - : molécula ausente



inmunoglobulina humana (AHG, “anti human globulin”). Las células utilizadas como blancos son preferencialmente linfocitos totales o linfocitos T y linfocitos B, a distintas temperaturas de incubación. La clase de anticuerpo involucrado en la reacción se puede definir utilizando algunos reductores como el dithiotreitol (DTT), el cual reduce los puentes disulfuros intermoleculares de la inmunoglobulina M sin inactivar la inmunoglobulina G.

La presencia de autoanticuerpos se pesquiza a través de un autocrossmatch, en el que se enfrenta suero del receptor con sus propias células. Se ha definido que los autoanticuerpos no son nocivos para los trasplantes de órganos y son generalmente de clase IgM y por lo tanto pueden ser reducidos con tratamiento con DTT. Hay que tener presente que pueden coexistir auto y aloanticuerpos.

De mayor sensibilidad es el crossmatch por citometría de flujo, que permite identificar la clase de anticuerpo de acuerdo al conjugado utilizado (anti-IgG, anti-IgM). En la práctica se usan protocolos de dos o tres colores. En el protocolo de dos colores las células y suero son incubados y el complejo antígeno anticuerpo se revela con un anticuerpo anti inmunoglobulina humana marcado con un fluorocromo (FITC), al mismo tiempo que un anticuerpo monoclonal marcado con otro fluorocromo (PE) identifica células CD3+ (LT) o células CD 19+ (LB)

La interpretación de los resultados de un crossmatch es de suma importancia, ya que determina la presencia o ausencia de anticuerpos nocivos para el trasplante. Aún hoy en día existe controversia frente a algunos resultados de crossmatch y el riesgo de fracaso del trasplante.

5. LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y TRASPLANTE

El mayor uso de la tipificación HLA es en el campo del **trasplante clínico**, principalmente en trasplante de células hematopoyéticas y trasplante renal, pero existen otras aplicaciones útiles en la clínica diaria como por ejemplo en estudios de asociaciones entre HLA y enfermedades, en proveer plaquetas HLA compatible, en medicina forense y estudios de paternidad.

Los requerimientos de estudio de histocompatibilidad varían de acuerdo al órgano o tejido que se trasplante y se discute el efecto de ellos en

el trasplante de los distintos órganos.

El trasplante de células troncales hematopoyéticas es uno de los más exigentes en cuanto a compatibilidad HLA puesto que el desarrollo de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD, “graft versus host disease”), es uno de los riesgos más altos que acompañan a este tipo de tratamiento y está directamente ligado al grado de compatibilidad de los antígenos HLA entre el paciente y el donante. De tal modo que la mayoría de los laboratorios que apoyan a programas de trasplante de células hematopoyéticas han adoptado la tipificación por DNA. La aplicación de alta resolución para alelos HLA han indicado que cerca de un 20% de los trasplantes que inicialmente no tenían incompatibilidad DR por serología a nivel alélico presentan incompatibilidades y disminución de la sobrevida del injerto. Otros grupos han observado correlación entre incompatibilidad HLA clase I y GvHD.

En el trasplante renal la compatibilidad de HLA si bien es importante no es esencial, de tal modo que en estos casos la mayoría de los trasplantes se realiza con algún nivel de incompatibilidad. En cambio sí existe consenso absoluto de contraindicación del trasplante frente a un crossmatch positivo con linfocitos T, especialmente si el suero del paciente es reciente o suero “actual”. Son numerosos los estudios de la compatibilidad de los diferentes loci HLA entre donante y receptor y el efecto en el injerto renal, con resultados disímiles. Muchas de estas discordancias son explicadas por la población analizada, tipo de mismatch considerados, tipo de tipificación (serológica o molecular), efecto estudiado (sobrevida, frecuencia de rechazos) etc. Existen muchos factores, no inmunológicos, que gravitan fuertemente en la sobrevida del injerto y que deben ser considerados en los análisis multivariantes de sobrevida.

Opelz en su estudio colaborativo de trasplante (CTS) ha demostrado que mientras mejor es la compatibilidad HLA entre donante y receptor, mejor es la sobrevida del injerto renal (Opelz et al, 1991). Este efecto es más pronunciado en retrasplantes renales. Las técnicas de DNA están tratando de establecer la relación que podría tener DQ en la sobrevida del injerto, lo que ha sido dificultoso debido al fuerte desequilibrio de unión entre DQ -DR. En el caso de HLA-DP se ha observado que su efecto está claramente relacionado en un segundo trasplante. El uso retrospectivo de SSO para especificidades AB y RFLP para DR,



ha permitido establecer una diferencia de un 15% en la sobrevida del injerto entre aquellos trasplantes con 0 incompatibilidades AB determinados por PCR-SSP comparados con aquellos con alguna incompatibilidad al A ó B.

En trasplante de corazón se ha demostrado que la compatibilidad HLA sería beneficiosa en la sobrevida de este injerto, por lo tanto se recomienda efectuar crossmatch si el receptor tiene anticuerpos HLA previos al trasplante.

En trasplante hepático no se ha demostrado la utilidad del crossmatch ni de la compatibilidad HLA.

En trasplante de córnea en pacientes de alto riesgo, son útiles algunos estudios de histocompatibilidad, dándosele mayor valor a la compatibilidad de antígenos clase I que a los de clase II.

En Chile, los criterios actualmente en uso para la selección de receptores de trasplante renal de donante cadáver considera la compatibilidad ABO y crossmatch negativo como criterios de exclusión. A la compatibilidad HLA, tiempo de espera en programa y porcentaje de anticuerpos linfocitotóxicos se les asigna un puntaje que define la selección. A los receptores menores de 18 años se le asigna puntaje adicional.

6. OTRAS APLICACIONES DE LA TIPIFICACIÓN HLA

Además de la relevancia del sistema HLA en el **trasplante clínico**, existe un número de otras aplicaciones útiles en la clínica diaria como por ejemplo:

Refractariedad a transfusión de plaquetas. Esta condición clínica definida como la incapacidad de cierto grupo de pacientes de obtener incrementos luego de una transfusión de plaquetas, es debido a la presencia de anticuerpos HLA que reaccionan y destruyen las plaquetas incompatibles transfundidas. En estos pacientes la transfusión de plaquetas compatibles para los antígenos HLA, tiene un efecto benéfico.

HLA y enfermedad. Como se describió en el capítulo 8, existen numerosas enfermedades asociadas a un determinado antígeno o alelo HLA. El más utilizado es la determinación del HLA-B27 que apoya el diagnóstico clínico de Espondiloartritis anquilosante prácticamente en todos los grupos étnicos.

Actualmente las técnicas moleculares han permitido encontrar nuevas asociaciones de susceptibilidad o resistencia a una enfermedad, de evolución y pronóstico de respuesta a tratamiento. Por ejemplo el 70 a 80% de los pacientes con artritis reumatoidea agresiva, según la población estudiada, portan uno o más de uno de los genes del grupo de genes DR4 de susceptibilidad: DRB1*0401, 0404, 0405.

Sin embargo, dado que estas enfermedades son generalmente multifactoriales, el uso de esta determinación tiene utilidad clínica limitada frente a un caso individual

Abortos espontáneos a repetición. Se ha identificado que en un porcentaje de abortos espontáneos a repetición en los que se han descartado causas gineco-obstétricas, existe una mayor compatibilidad en antígenos HLA entre la pareja. En muchos de estos casos se ha tenido embarazos exitosos después de la sensibilización de la mujer a los antígenos HLA mediante inyecciones intravenosas o subcutáneas de células mononucleares del esposo o de un tercero.

Medicina forense y pruebas de paternidad. Gracias al uso de técnicas de DNA es ahora posible la tipificación HLA en pequeñas cantidades de células o tejido de distintos origen incluidos folículos, uñas etc. Esta determinación de los antígenos HLA que permite descartar o identificar a una persona, con un alto grado de probabilidad, utilizando el conocimiento de la frecuencia de estos antígenos en la población general está siendo usado en casos de medicina forense y en casos de pruebas de paternidad.

Antropología. Conocer las frecuencias de antígenos HLA en las poblaciones indígenas ha permitido apoyar teorías de migración poblacional que se dieron hace miles de años, al comparar las frecuencias génicas de estas poblaciones. Con las actuales técnicas moleculares estos estudios han tomado fuerza ya que es posible la tipificación HLA a partir de productos como el pelo, piel etc.

LECTURAS SUGERIDAS

A map of the Human Major Histocompatibility Complex, *Immunol Tod* 18 (2), 1997.



American Society for Histocompatibility and Immunogenetics "Standards for histocompatibility testing", 1995.

Anderson, G.; Anderson, L.; Larhammar, D. et al., "Simplifying genetic locus assignment of HLA-DRB genes", *Immunol Tod* 15 (2) : 58-61, 1994.

Bidwell, Jeffrey L., Navarrete, Cristina, **Histo-compatibility testing**, Imperial College Press, London, 2000.

Bodmer, J.G.; Marsh, S.G.; Albert, E.D. et al., "Nomenclature for factors of the HLA system", *Human Immunol* 43:149-164, 1995.

Brodsky, F.M.; Lem, L.; Bresnahan, P.A., "Antigen processing and presentation", *Tissue Antigens* 47: 464-471, 1996.

Buc, M., "The Major Histocompatibility Complex in man", *Folia Biologica (Praha)* 39:223-242, 1993.

Dyer, P.A.; Jawaheer, D.; Ollier, B. et al., "HLA allele detection using molecular techniques", *Disease Markers* 11 : 145-160, 1993.

Dyer, P.A.; Martin, S.; Sinnott, P., "Histocompatibility testing for kidney transplantation: an update", *Nephrol Dial Transplant* 10 Supl 1 : 23-28, 1995.

Hawkins, B.R., "The HLA System: An introductory review Part II Its applications in the '90s" *JIFCC* 4 :50-56, 1992.

Ichikawa, Y.; Hashimoto, M.; Nojima, M. et al., "The significant effect of HLA-DRB1 matching on long-term kidney graft outcome", *Transpl* 56: 1368-1371, 1993.

Mackay, I.; Rosen, F., "The HLA system", *N Engl J Med* 343 : 702-709, 2000.

Martin, S., Dyer, P.A., "Identification and importance of MHC The definition of HLA specificities by cytotoxicity", *Transplant Immunology* 2 : 108-115, 1994.

Navarrete, C.V., "The HLA system in blood transfusion", *Bailliere's Clinical Haematology* 13 : 511-532 , 2000.

Navarrete, C., "Human leucocyte antigens", Capítulo 4, en **Practical Transfusion Medicine**, Murphy, M.F.; Pamphilon, D. H., Blackwell Science, 2001.

Nepom, G.T.; Gersuk, V., Nepom, B.S., "Prognostic implications of HLA genotyping in the early assessment of patients with rheumatoid arthritis", *J Rheumatol* 23 Sup 44: 5-9, 1996.

Olerup, O., Zetterquist, H., "HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation", *Tissue Antigens* 39: 225-235, 1992.

Opelz, G.; Scherer S.; Mytilineos, J., "Collaborative Transplant Study Analysis of HLA-DR split-specificity matching in cadaver kidney transplantation", *Transpl* 63:57-59, 1997.

Opelz, G.; Wujciak, T.; Döhler, B.; Scherer, S.; Mytilineos, J., "HLA compatibility and organ transplant survival", *Rev Immunogenetics* 1:334-342, 1999.

Piazza, A.; Borrelli, L.; Buonomo, O. y col., "Flow cytometry cross-match and kidney graft outcome", *Transplant Proc* 31: 314-316, 1999.





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 43

CITOMETRÍA DE FLUJO: PRINCIPIOS BÁSICOS Y APLICACIONES

Valeska Simon Z. y María Rosa Bono

- 1. Introducción**
- 2. Principios generales**
 - 2.1. Sistemas de fluidos
 - 2.2. Sistema óptico
 - 2.3. Sistema electrónico
 - 2.4. Reactivos para citometría de flujo
- 3. Aplicaciones de la citometría de flujo**
 - 3.1. Determinación de poblaciones celulares
 - 3.2. Fenotipificación de neoplasias hematológicas
 - 3.2.1. Fenotipificación de leucemias
 - 3.2.2. Fenotipificación de linfomas
 - 3.3. Enfermedad de Hodgkin
 - 3.4. Trasplante de médula ósea
 - 3.5. Análisis de DNA y ciclo celular
 - 3.6. Análisis de enfermedad residual mínima





RESUMEN

La citometría de flujo tiene aplicaciones en numerosos campos de la biología. Una de sus principales ventajas es la posibilidad de realizar análisis multiparamétricos los cuales permiten determinar la presencia de varios marcadores simultáneamente, tanto en la membrana como en el citoplasma o núcleo de las células, sean éstas de origen animal o vegetal. La identificación de marcadores celulares permite evaluar al interior de una muestra heterogénea la proporción relativa de una población. Gracias a la utilización de computadores que poseen una gran capacidad de memoria, es posible analizar poblaciones celulares presentes en proporciones relativamente bajas. Existen además citómetros capaces de aislar una determinada población celular para estudios posteriores. Finalmente, la cuantificación de la inmunofluorescencia constituye un avance importante para los estudios farmacológicos. Esto permite estudiar *in vitro* la acción de nuevos medicamentos y las modificaciones inducidas por los tratamientos *in vivo*. El desarrollo de nuevos instrumentos cada vez más simples en cuanto a la calibración y alineamiento, capaces de automatizar la adquisición de datos y análisis ha hecho del citómetro de flujo un instrumento indispensable en los laboratorios clínicos.

En este capítulo se describen los principios básicos de la citometría de flujo y sus aplicaciones, destacando las que son usadas en el laboratorio clínico.

1. INTRODUCCIÓN

La historia de la citometría de flujo es relativamente corta, sin embargo, se ha popularizado enormemente gracias al desarrollo de citómetros de flujo de fácil utilización, rápidos y precisos en el análisis de células únicas dentro de un fluido y al desarrollo de una amplia gama de sondas fluorescentes. Esta tecnología permite medir los más diversos parámetros celulares tales como antígenos de superficie, citoplasmáticos y nucleares, contenido de ácidos nucleicos, actividad enzimática, flujo de calcio, potencial de membranas y pH entre otras.

Un citómetro de flujo puede considerarse, muy simplificado, como un potente microscopio que cuenta con un sistema transportador de partículas y un sistema de detección de la luz. Las partículas suspendidas en una solución fisiológica (células u otras entidades biológicas como espermios o levaduras), son inyectadas bajo presión en el sistema de fluidos que las transporta hacia un haz de luz focalizada en el cual, al chocar con las células, se desvía y es registrado por detectores especiales. Si además se acoplan a las células anticuerpos conjugados con un fluorocromo, estas emitirán luz de determinadas

longitudes de onda la cual puede ser registrada por fotodetectores ubicados perpendicularmente al fluido que las transporta. Las componentes de las emisiones fluorescentes pueden ser separadas utilizando filtros ópticos, la información transformada en pulsos eléctricos por el sistema electrónico y almacenada en la memoria de un computador para ser posteriormente analizadas utilizando programas computacionales especializados.

En resumen, una vez comprendidos los principios de operación del citómetro de flujo, éste se transforma en una herramienta muy útil y en continuo desarrollo tanto para la investigación básica como para la medicina y la industria. Por otra parte, las posibilidades de automatización de esta tecnología permite su uso en forma rutinaria en laboratorios clínicos y hospitales.

2. PRINCIPIOS GENERALES

Los citómetros de flujo están constituidos fundamentalmente por tres sistemas: el sistema de fluidos, un sistema óptico de iluminación y detección, y el sistema electrónico (figura 43-1).

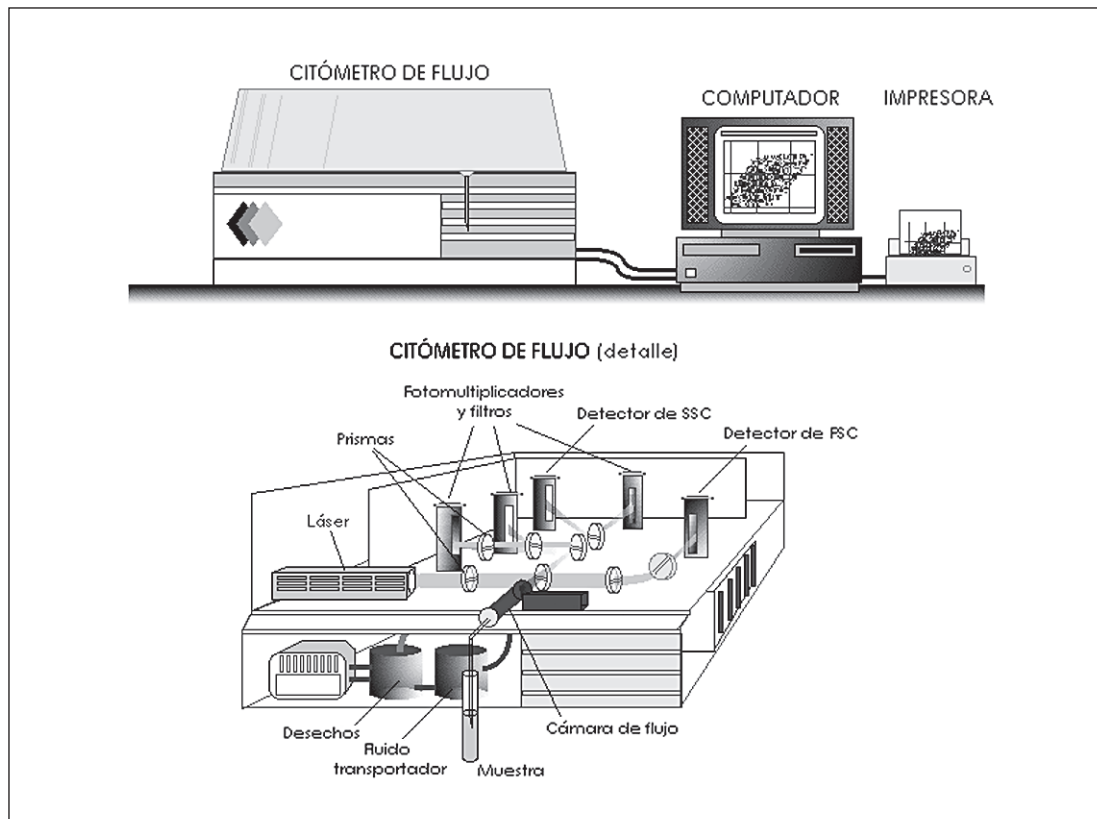


Figura 43-1. Diagrama de un citómetro de flujo junto con el sistema computacional.

2.1. Sistema de fluidos

El sistema de fluidos es el encargado de transportar las células o partículas contenidas en una solución hacia un punto interceptado por el rayo de luz proveniente de un láser. Está constituido por un fluido transportador, la suspensión celular y los controles de presión, estos últimos necesarios para movilizarlos a ambos hacia el punto de contacto con el haz de luz. Este sector es denominado cámara de flujo (figura 43-2). La suspensión celular es inyectada dentro del caudal del fluido transportador a través de la cámara de flujo, hacia un estrecho orificio en el cual las células adquieren una rápida aceleración. Esto focaliza las células hidrodinámicamente dentro del fluido y las dirige hacia un orificio cuyo diámetro es similar al de una célula. Las células así focalizadas, desfilan una a una frente a la fuente de excitación luminosa.

La velocidad y presión con la que son transportadas las partículas dentro de la cámara de flujo son fundamentales en la resolución óptica

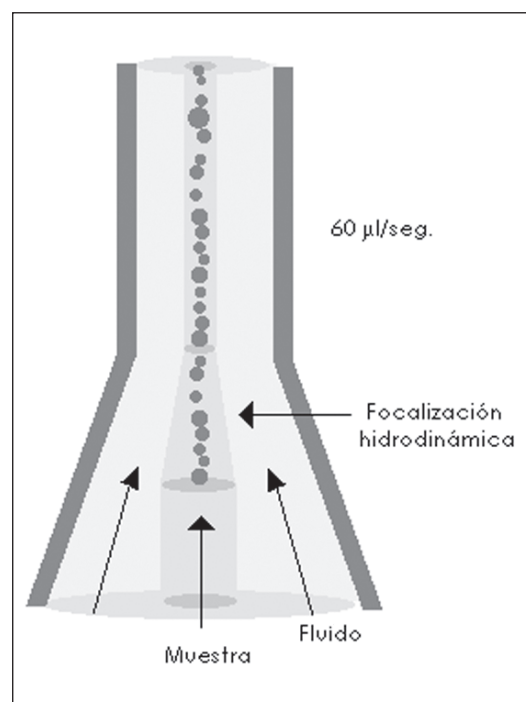


Figura 43-2. Cámara de flujo del citómetro.



de un citómetro de flujo. Por ejemplo, al aumentar la presión de la muestra, se incrementa la velocidad del flujo, con lo cual aumenta también el diámetro del caudal de la muestra obteniéndose una menor calidad de análisis óptico.

2.2. Sistema óptico

El sistema óptico está constituido fundamentalmente por dos componentes: una fuente de iluminación y un sistema de detección de la luz.

Generalmente, se utiliza un láser como fuente de excitación luminosa ya que se requiere una intensa iluminación debido al tamaño de las células y a la rápida velocidad a la que están desfilando frente a ésta. El láser produce una luz de baja divergencia, monocromática, unidireccional y de alta intensidad. La luz láser abarca un amplio rango de longitudes de onda, que representa una mezcla de longitudes de onda específicas (líneas láser), éstas pueden ser seleccionadas por espejos que reflejan sólo la longitud de onda de interés. La luz del láser excita los fluorocromos unidos a las células, los que a su vez emiten luz detectable por los fotomultiplicadores. El láser más utilizado en los citómetros de flujo es el láser de Argón que emite luz de longitud de onda de 488 nm. Algunos citómetros poseen más de un láser lo que les permite tener otras posibilidades en cuanto a longitudes de onda de excitación.

El segundo componente del sistema está constituido por dos tipos de detectores: un fotodiodo y 4 fotomultiplicadores. El fotodiodo denominado detector de “forward scatter” o FSC está ubicado al lado opuesto de la fuente luminosa y recolecta la luz dispersada frontalmente por las partículas al pasar frente al láser. La luz detectada es aproximadamente proporcional al tamaño de las células. FSC es extremadamente útil para discriminar entre diferentes tipos de células y desechos celulares.

Los fotomultiplicadores recogen la luz difundida perpendicularmente a las partículas al pasar frente a la fuente luminosa. Este sistema permite medir la luz dispersada lateralmente, “side scatter” o SSC y la luz correspondiente a las emisiones de fluorescencia en 3 rangos de longitud de onda diferentes (FL1, FL2, FL3) (figura 43-3). La luz dispersada lateralmente o SSC entrega información respecto a la estructura interna y complejidad de las células y la emisión de fluorescencia determina características particulares de las células dependiendo de la molécula a

la cual está acoplado el fluorocromo. La emisión de fluorescencia tiene una intensidad de varios órdenes de magnitud más pequeña que la luz dirigida hacia el frente (FSC). Esto hace necesario la utilización de fotodetectores altamente sensibles como son los tubos fotomultiplicadores en los cuales un fotón excita una cascada de electrones lo que amplifica la señal detectada.

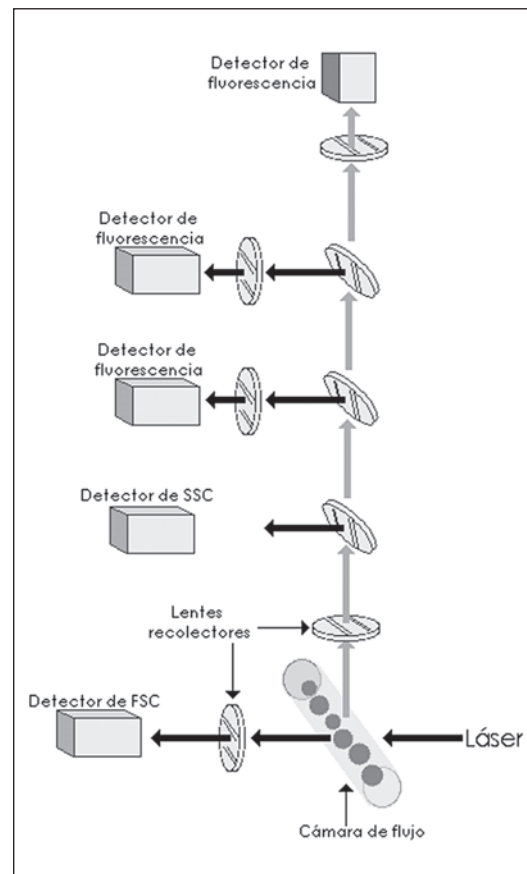


Figura 43-3. Configuración óptica de un citómetro de flujo. Esta configuración permite la detección simultánea de “forward scatter” (tamaño), “side scatter” (granulosidad) y tres colores distintos de fluorescencia.

2.3. Sistema electrónico

La producción de electrones por los fotodetectores es proporcional a la intensidad de la luz que ha incidido en ellos. Esta se convierte en una señal de voltaje que es procesada por una serie de amplificadores que la transforman en pulsos electrónicos. Generalmente existe una relación lineal entre el número de moléculas de fluorocromo unidas a una célula y la intensidad

de fluorescencia medida. El sistema electrónico convierte las señales de los fotodetectores en valores digitales, los cuales se guardan para su posterior análisis. El sistema de colección de datos consiste de un discriminador de eventos, un convertidor análogo-digital y una interface donde se guardan los datos (figura 43-4).

certeza en subtipos, determinar el contenido de DNA y analizar las propiedades fisiológicas de las células.

Las señales fluorescentes de cada célula son detectadas sólo unos pocos milisegundos después de ser excitadas con la luz. El sistema de detección es muy sensible pudiendo incluso dar una señal

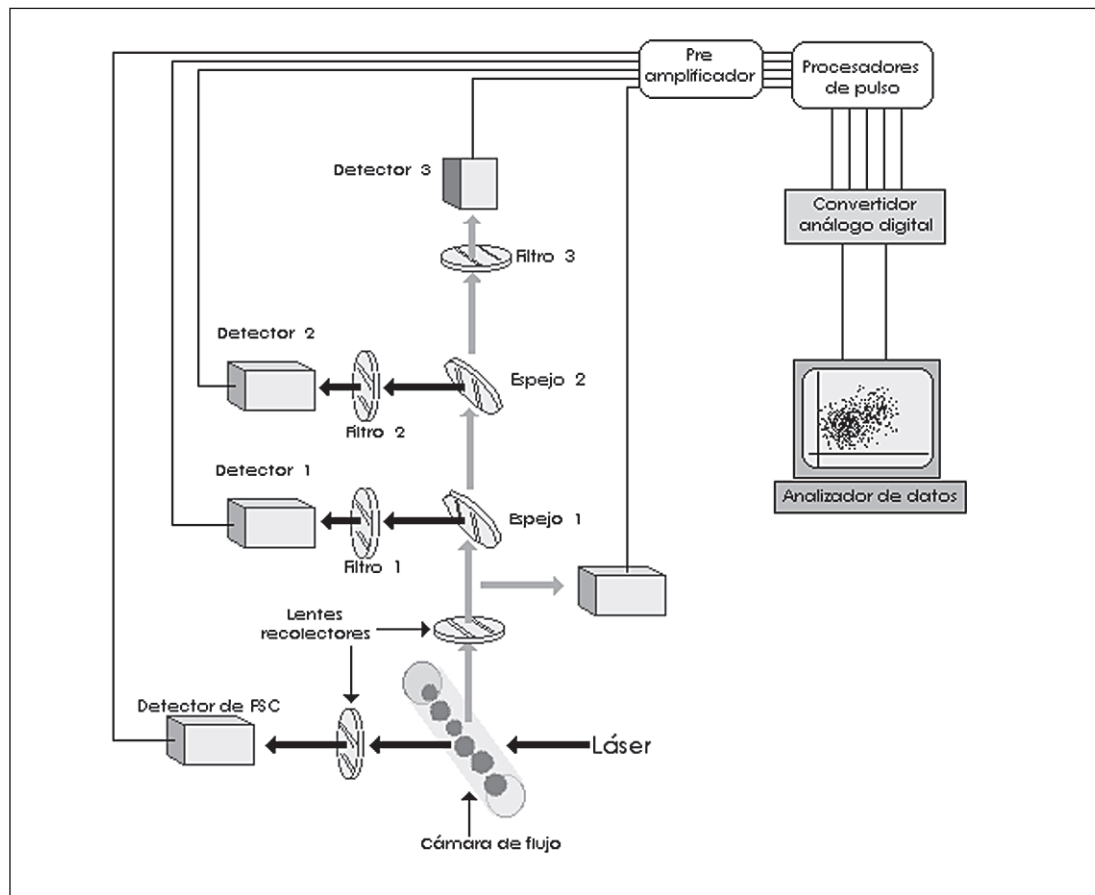


Figura 43-4. Sistema de colección y análisis de datos de un citómetro de flujo.

2.4. Reactivos para citometría de flujo

Las moléculas asociadas a las células pueden ser reconocidas por anticuerpos u otras proteínas, como son lectinas, hormonas, avidina o estreptoavidina, entre otras. También el DNA o RNA son susceptibles de ser visualizados con reactivos fluorescentes. Esto es la base de la versatilidad de la citometría de flujo. Así, aunque las mediciones de FSC y SSC permiten identificar tipos celulares dentro de una población heterogénea, son realmente las sondas fluorescentes las que nos permiten clasificarlas con

positiva de fluorescencia en una célula que contiene 1000 partículas del fluorocromo cuando se la compara con la fluorescencia basal o autofluorescencia de las células.

El fluorocromo más utilizado en microscopía y citometría de flujo es isotiocianato de fluoresceína (FITC). Las ventajas que FITC ofrece por sobre otros fluorocromos son: su alto coeficiente de extinción, su eficiencia cuántica y sus características de absorción y emisión máxima, óptimas para trabajar con láser de Argón y lámparas de Mercurio. Además, se pueden obtener comercialmente una amplia variedad de



anticuerpos y otras sondas conjugadas con FITC. Sin embargo, también presenta algunos inconvenientes tales como la transferencia de energía entre moléculas de FITC situadas muy próximas lo que hace disminuir la intensidad global de fluorescencia obtenida ("quenching" de fluorescencia). De este modo, en el caso de utilizar anticuerpos marcados con FITC, el resultado final en términos de intensidad de fluorescencia no depende sólo del número de partículas fluorescentes unidos a la célula, sino también de otras características como la proximidad espacial entre ellos. Si se requiere un segundo o tercer anticuerpo para marcajes simultáneos, se utilizan fluorocromos que se exciten a la misma longitud de onda que la fluoresceína, como R-ficoeritrina (PE) por ejemplo cuyos rangos de emisión son distinguibles del verde de la fluoresceína y por tratarse de un fluorocromo muy sensible que no presenta fenómenos de "quenching" es el elegido en el caso de buscar antígenos presentes en alta densidad. La mayoría de los restantes fluorocromos empleados, más que fluorocromos individuales, son grupos de dos fluorocromos unidos entre ellos de forma natural (por ejemplo, la proteína peridilclorofila o PerCP) o artificialmente (por ejemplo la ficoeritrina-cianina 5, PE/Ci5, conocida también como Tricolor).

Utilizando sondas capaces de unirse estequiométricamente al DNA y RNA de las células, intercalándose en la doble hebra de ácidos nucleicos como Yoduro de Propidio o Bromuro de Etidio, por ejemplo, es posible evaluar contenido de DNA y las diferentes fases del ciclo celular. También es posible medir simultáneamente ciclo celular y antígenos, tanto en la membrana como en el citoplasma o núcleo de las células. En la tabla 43-1 se muestran ejemplos de fluorocromos y sus principales características.

Es importante recordar que las células son entidades vivas y, en consecuencia, cualquier tratamiento al que se les someta puede provocar cambios en ellas. Esto hace imprescindible el uso de controles negativos y positivos que permitan la adecuada interpretación de los resultados.

3. APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

Las aplicaciones actuales de la citometría de flujo reposan esencialmente en la identificación

y cuantificación de los antígenos expresados tanto en la membrana como en el citoplasma de las células y en el análisis del ciclo celular. El estudio de las poblaciones celulares linfocitarias identificadas por antígenos de diferenciación, forman parte actualmente de los exámenes de rutina para la evaluación del estado inmunológico de un paciente. En estos estudios se utiliza una nomenclatura estandarizada que categoriza los anticuerpos de acuerdo al antígeno que éstos reconocen. Cada categoría se denomina grupo de diferenciación o CD ("cluster of differentiation") seguida por un número y en ocasiones por una letra, por ejemplo: CD1, CD1a, CD2, etc. (ver capítulo 46). Las aplicaciones más corrientes están destinadas a caracterizar las anomalías cualitativas y cuantitativas de las subpoblaciones linfocitarias en las deficiencias inmunitarias congénitas o adquiridas, en la vigilancia de los trasplantes de órganos o de médula ósea y en el estudio del fenotipo de un clon neoplásico en las proliferaciones linfoides malignas. En este último campo, la fenotipificación por citometría de flujo ha aportado nuevos criterios de clasificación, pronóstico, elección de la terapia y seguimiento del tratamiento para evaluar remisión y recaída precoz. La citometría de flujo permite, además, estudiar componentes séricos tales como complejos inmunes circulantes. Si se poseen anticuerpos contra un determinado virus, es posible por lo demás determinar qué poblaciones celulares son infectadas por el virus.

Las aplicaciones de la citometría de flujo son innumerables y sólo se revisarán a continuación con más detalle algunas de las aplicaciones clínicas de mayor interés.

3.1. Determinación de poblaciones celulares

La disponibilidad de una enorme variedad de anticuerpos monoclonales ha difundido el uso de la citometría de flujo en investigación básica y clínica. El diseño de instrumentos en los cuales se ha automatizado la alineación y calibración del citómetro, unido al permanente desarrollo de programas computacionales automatizados para la adquisición y análisis de datos, ha permitido la expansión de esta metodología de trabajo hacia los laboratorios clínicos los que pueden obtener resultados rápidos, objetivos y altamente reproducibles.



Tabla 43-1. Características de los principales fluorocromos utilizados en citometría de flujo.

Fluorescencia	Marcaje	Excitación Máxima (nm)	Emisión Máxima (nm)	Tipo de láser	Abreviatura
“Fluorescein- isothiocyanate”	proteínas	495	520	488Ar	FITC
“R-Phycoerythrin”	proteínas	565,545,480	575	488ar	R-PE
“Texas Red”	proteínas	595	620	595Dye R6G	TX
“Tamdem PE-TX”	proteínas	565,545,480	613	488Ar	
“Allophycocyanin”	proteínas	650	660	632HeNe 595	APC
“Tamdem PE-Cy5”	proteínas	565,545,480	670	488Ar	
“Perchlorophyll”	proteínas	470	680	488Ar	PerCP
“Propidium iodide”	ácidos nucleicos	495,342	639	488Ar	PI
“Ethidium bromide”	ácidos nucleicos	493,320	637	488Ar	EB
“Acridine orange”	ácidos nucleicos	503	530(DNA) 640(ARN)	488Ar	AO
“Mithramycin”	ácidos nucleicos	445	569	458Ar	
“Chromomycin A ₃ ”	ácidos nucleicos	430	580	457Ar	
“Hoechst 33342”	ácidos nucleicos	395	450	UV a o K	H342
“4',6-diamidino-2- phenylindole”	ácidos nucleicos	372	456	UV A o K	DAPI
“Pyronin Y”	ácidos nucleicos	545	656	530 K	PY 514 A

En el análisis de subpoblaciones de linfocitos, provenientes tanto de sangre periférica como de médula ósea, ha resultado fundamental la utilización simultánea de anticuerpos conjugados con fluorocromos diferentes, siendo de gran utilidad la mezcla de anticuerpos CD45 y CD14 marcados con FITC y PE, que se unen en forma diferencial a las distintas poblaciones de leucocitos, permitiendo identificarlas, cuantificarlas y analizarlas separadamente (figura 43-5). La producción reciente de anticuerpos monoclonales conjugados con PerCP permite

realizar marcajes en tres colores simultáneamente al utilizarlos junto con anticuerpos marcados con FITC y PE. Existen además, citómetros con más de un láser y otros dispositivos detectores de luz que permiten utilizar 4 fluorocromos distintos simultáneamente (FL1, FL2, FL3 y FL4). De esta manera es posible obtener rápidamente mucha información con una cantidad mínima de muestra. La co-expresión de moléculas de superficie o intracelulares en una misma célula permite diferenciar con certeza distintas subpoblaciones (figura 43-6).

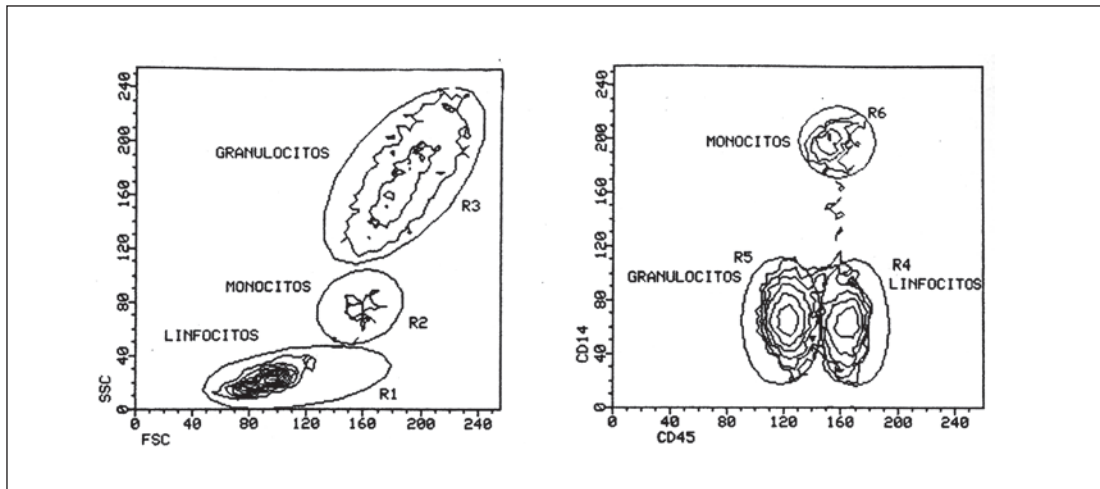


Figura 43-5. Estrategia de análisis simultáneo de subpoblaciones celulares en una muestra de sangre total lisada. Las distintas poblaciones celulares son claramente distinguibles por su tamaño, granulosidad y expresión diferencial de antígenos de superficie, detectados con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD45 y CD14.

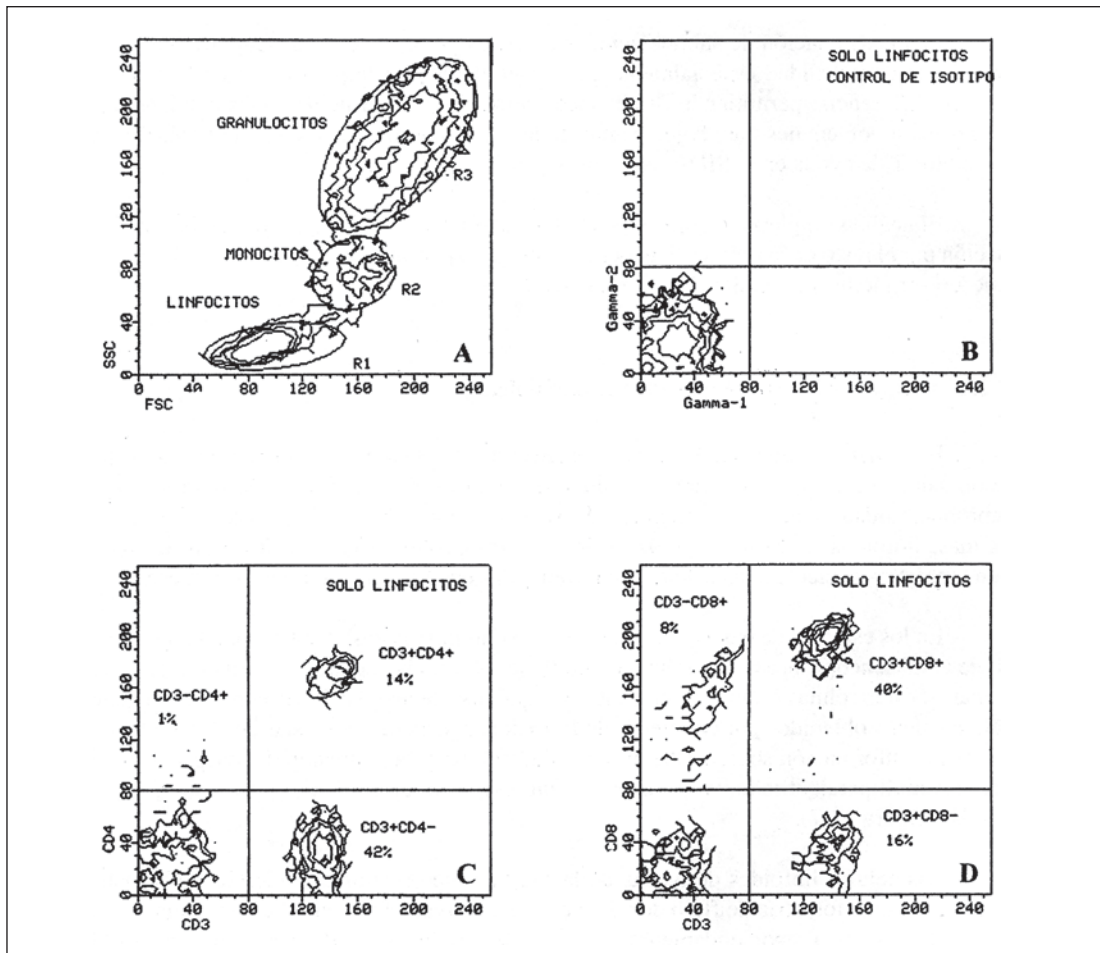


Figura 43-6. Análisis simultáneo de poblaciones linfocitarias en sangre total lisada de un paciente con SIDA. En A se muestra el gráfico de FSC (tamaño) versus SSC (granulosidad) de una muestra de sangre total lisada. En éste se distinguen claramente linfocitos, monocitos y granulocitos. En B, C y D se analiza la expresión de CD3, CD4 y CD8 de la población correspondiente a los linfocitos.



Los protocolos de marcaje de células leucocitarias sanguíneas y de médula ósea se han visto favorecidos por el desarrollo de reactivos que permiten eliminar fácilmente los glóbulos rojos, población mayoritaria en la sangre.

La caracterización de subpoblaciones linfocitarias es una herramienta de gran utilidad en el seguimiento de la progresión de cuadros de inmunodeficiencia. Esto permite detectar con alta sensibilidad subpoblaciones poco representadas dentro de la población total, como son los linfocitos T CD4+ en el SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida).

El análisis de glóbulos rojos y plaquetas no requiere purificación ya que la contaminación por el resto de las células leucocitarias no es importante (menos de 0,1%) y pueden ser fácilmente eliminadas en la etapa de análisis.

3.2. Fenotipificación de neoplasias hematológicas

En general la aplicación de la citometría de flujo en el diagnóstico de patologías neoplásicas se ha incrementado considerablemente en los últimos años debido a la reproducibilidad de los datos obtenidos. Esta información permite determinar sin ambigüedad las células comprometidas en varias neoplasias como es el caso de las leucemias agudas, linfomas y mielomas entre otras.

En estos estudios, la información del número de células neoplásicas presentes, por lo general, es irrelevante, siendo más importante determinar si estas células están o no presentes y a qué tipo de neoplasia representan. El análisis multiparamétrico que considera la fluorescencia, el tamaño y la granulosidad de las células permite obtener una excelente información de la heterogeneidad celular (figura 43-7).

Las células derivadas de la sangre, médula ósea o de órganos linfoides son relativamente fáciles de aislar para analizarlas por citometría de flujo. Sin embargo, cuando se trata de estudiar células provenientes de tejidos u órganos es recomendable realizar cortes histológicos antes y durante la disgregación del tejido para asegurar una adecuada representación de los diversos tipos celulares que conforman la muestra. La correlación del estado clínico del paciente, morfología celular, citotóxica e histoquímica, el inmunofenotipo obtenido por citometría de flujo, el contenido de DNA y análisis del ciclo celular son antecedentes

que deben ser considerados, en conjunto, para establecer acertadamente un diagnóstico y tratamiento apropiado en cada caso.

3.2.1 Fenotipificación de leucemias

Las leucemias agudas (LA) son expansiones clonales de células precursoras hematopoyéticas (blastos) en la médula ósea con algunas características en común como son una baja respuesta a mecanismos regulatorios y una capacidad de diferenciación disminuida. Su expansión se realiza, generalmente, a expensas de los elementos normales de la médula ósea.

Un proceso se clasifica como maligno por la presencia de una hematopoyesis disminuida y un exceso de blastos. Las subclasificaciones se realizan considerando que los blastos presentes mantienen algunas de las características de sus contrapartes normales.

En el análisis de leucemias se deben tener en cuenta el porcentaje de células con morfología de blastos determinado por histoquímica y/o citotóxica y el linaje celular de los blastos determinado por citometría de flujo. Las leucemias se clasifican en agudas o crónicas dependiendo del grado de madurez de los blastos. Las células linfoides o mieloides pueden estar involucradas en la leucemia, incluso simultáneamente. Con menos frecuencia se observan leucemias con compromiso de megacariocitos o eritrocitos.

Es importante resaltar que no existen marcadores específicos para leucemia y que lo que se realiza es la interpretación de un conjunto de marcadores celulares comparado con la ontogenia normal.

Leucemia aguda linfoblástica (LLA). Es la leucemia más frecuente en niños menores de 15 años, con una incidencia mayor entre los 3 y 5 años, sin embargo, también se presenta en niños menores de 1 año y con menor frecuencia en adultos jóvenes. El pronóstico es más favorable en niños entre 1 y 10 años de edad que en adultos. La mayor parte de las LLA son proliferaciones de células B (entre 75 a 85%) variando en el grado de maduración que presentan las células. El fenotipo más común de las LLA de células B es la LLA común o cALLa: expresan CD10, CD19, CD20, TdT (transferasa deoxiterminal), HLA-DR y en ocasiones CD34. No expresan inmunoglobulinas de superficie ni citoplasmáticas. Este es el fenotipo con mejor pronóstico y representa aproximada-

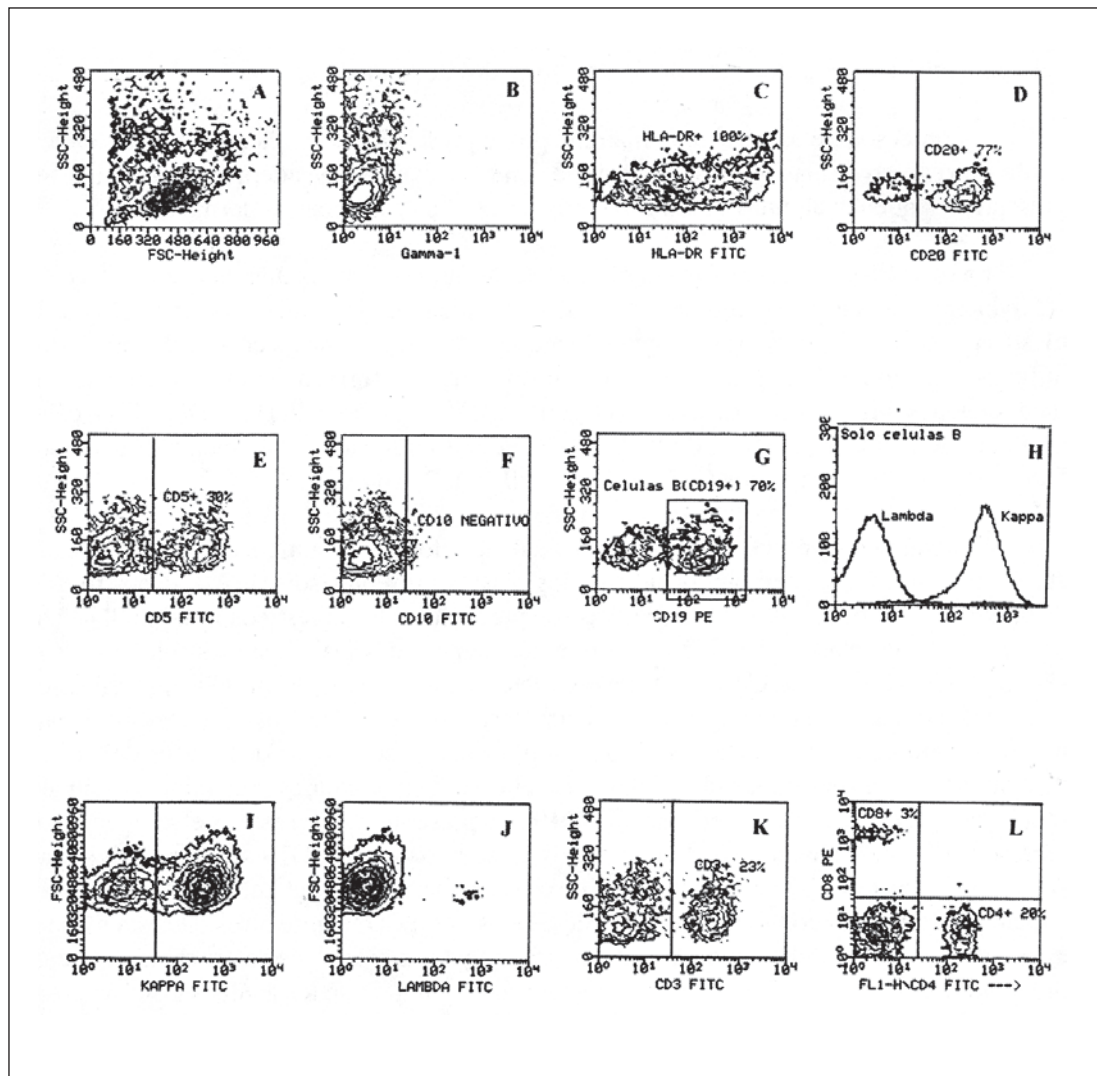


Figura 43-7. Estrategia de análisis para una inmunofenotipificación. La muestra corresponde a una biopsia de ganglio fresca. La población a analizar se define en base al tamaño y granulosidad (A). En (B) se muestra el control negativo utilizando un anticuerpo irrelevante. En (C) se muestra la expresión del marcador de activación celular HLA-DR. En (D) y (G) se analiza la expresión de antígenos específicos de linfocitos B (CD19 y CD20). Puesto que se observa expresión de marcadores de linfocitos B, se analiza la expresión del antígeno CD10 (F). En (E,K y L) aparece la expresión de marcadores de linfocitos T (CD5, CD3, CD4 y CD8). Luego se analiza la expresión de cadenas livianas de inmunoglobulinas (κ y λ) (H, Y y J). El resultado del análisis muestra expresión clonal de la cadena liviana kappa en las células B, lo cual es característico de un proceso neoplásico.

mente un 50% de los casos. Le siguen en frecuencia (30% de los casos) la LLA que expresa los mismos antígenos ya descritos a excepción de CD20. Con menor frecuencia, las LLA expresan sólo CD19 o, en otros casos, expresan CD19, CD20, HLA-DR, CD10 e inmunoglobulinas de superficie o citoplasmáticas. La enzima TdT puede estar presente tanto en LLA de células B como T. La expresión de HLA-DR es de mayor intensidad en células B más inmaduras. La leucemia de tipo

Burkitt es la de peor pronóstico y presenta células morfológicamente distintas a las de una LLA de células B. Los blastos se caracterizan por presentar vacuolas en el citoplasma que se tiñen con Oil Red O, tienen un fenotipo de células B maduras con expresión de inmunoglobulinas en la membrana celular. Las leucemias de células T comprenden aproximadamente el 15-25% de los casos siendo, por lo general, bastante agresivas y con menor respuesta al tratamiento. El fenotipo de esta



patología es más complejo que el de LLA de células B. Esto se debe a que no existen marcadores de clonalidad ni marcadores específicos frecuentes para las etapas tempranas de maduración de linfocitos T. El marcador más útil es CD7, que se expresa en aproximadamente 95% de las LLA de células T. Sin embargo, CD7 también se expresa en los linfocitos T normales en forma aberrante en las LLA de células B y en un porcentaje más alto (25%) en las leucemias de estirpe mieloide. Otros marcadores para LLA de células T son CD1a (excepto en el timo ya que los timocitos expresan normalmente CD1a), CD3, CD2 y CD5. Estos dos últimos están presentes, con alta frecuencia en este tipo de leucemia. HLA-DR es frecuentemente negativo en LLA de células T y en ausencia de otros marcadores de linfocitos T, la presencia de CD3 citoplasmático es definitiva para asignar este linaje. En la LLA de células T se busca más bien expresión aberrante (por ejemplo, coexpresión de CD4 y CD8) o ausencia de uno o más marcadores clásicos de linfocitos T.

Leucemias agudas no-linfocíticas (LANL). Este grupo de patologías está conformado por las leucemias agudas mieloides (LMA), eritrocíticas y megacariocíticas. La fenotipificación de estas leucemias ha sido útil para diferenciarlas de las LLA más que para clasificarlas en subtipos de LMA ya que, en general, desde el punto de vista del tratamiento y diagnóstico, no establece diferencias importantes. Las LMA son más frecuentes en adultos entre los 15 y 40 años. Solamente alrededor del 20% de las leucemias en niños son LMA. Una característica particular de los blastos LMA es su homogeneidad en tamaño y granulosidad dentro de la heterogeneidad habitual de las células de la médula ósea. Los marcadores celulares CD13, CD14, CD33 y CD34 nos indican si las células son de linaje mieloide y el grado de diferenciación monocítico. Aunque HLA-DR no es un marcador mieloide específico, es útil para diferenciar las leucemias promielocíticas en las que HLA-DR está generalmente ausente o tiene una expresión débil. Por otra parte la ausencia de CD45 en conjunto con la presencia de otros marcadores como CD71 o glicoforina A es un indicio de leucemia de linaje eritroide. Si además están presentes marcadores de plaquetas como CD61 y/o CD41a esto indica una leucemia megacarioblástica. La expresión de CD14 está virtualmente restringida a los monocitos más maduros, por esto, es de gran ayuda para

diferenciar los monocitos normales, de los blastos o de los precursores de monocitos. CD11c en conjunto con CD14 permiten diferenciar entre leucemia mielomonocítica y leucemia aguda monocítica ya que, por lo general, no se expresan en otras formas de LLA o LMA. La coexpresión del antígeno CD15 es muy útil ya que éste se va adquiriendo durante la maduración de la serie mieloide granulocítica, a la vez que disminuyen la expresión de CD45.

Leucemia linfocítica crónica (LLC). Esta es una patología asociada a adultos mayores, y ocurre con mayor frecuencia en hombres que en mujeres. Esta enfermedad, que involucra la médula ósea, los nódulos linfáticos y/o el bazo, es una expansión clonal de linfocitos inmunológicamente competentes. La enfermedad es prácticamente indistinguible de un linfoma bien diferenciado y es denominada LLC si la médula ósea está extensamente comprometida. Si la enfermedad se inicia en los nódulos linfáticos o en el bazo se utiliza el término linfoma bien diferenciado o linfoma de linfocitos pequeños. Morfológicamente, estas células son muy similares a los linfocitos normales, de allí la relevancia del análisis por citometría de flujo en este tipo de patología. La mayor parte de las LLC están compuestas por células B monoclonales, las que presentan una expresión monotípica de cadenas livianas de inmunoglobulinas y coexpresión de CD5, CD20 y CD19.

Leucemia mieloide crónica (LMC). Es una patología de células troncales multipotenciales y puede, por lo mismo, involucrar más de un linaje celular. La inmunofenotipificación de esta enfermedad no es frecuente, excepto en los casos de crisis blástica que es la forma progresiva y agresiva de esta patología. En este caso, el fenotipo se utiliza para definir el tipo celular involucrado en la proliferación blástica.

3.2.2 Fenotipificación de linfomas

Los linfomas son tumores del sistema inmune que se presentan principalmente en los nódulos linfáticos, bazo, médula ósea, en tejidos linfoides asociados a mucosas y, con menor frecuencia en la piel u otros órganos. Ocasionalmente los blastos pueden detectarse en gran cantidad en la circulación sanguínea.

El método básico en el diagnóstico y



clasificación de los linfomas es la microscopía. En los últimos años, se han desarrollado gran variedad de esquemas histológicos para la clasificación de estos tumores. La clasificación del "International Lymphoma Study Group" presentada en el año 1994 no categoriza estos tumores clínicamente como de alto o bajo grado de malignidad (actualmente se reconoce que cada entidad tiene sus propias características individuales), sino que los agrupa dependiendo del tipo celular involucrado en la neoplasia, basándose en las características antigénicas, citogenéticas, morfológicas y la observación clínica.

De este modo, en el caso de los linfomas no-Hodgkins, existen 10 que son de origen linfocítico B y éstas son la leucemia/linfoma linfoblástico de células B precursoras y las neoplasias de células B periféricas llamadas: leucemia linfocítica crónica de células B, inmunocitoma, linfoma del manto, linfoma folicular, linfoma MALT, leucemia de células velludas, plasmocitoma, linfoma B difuso de células grandes y linfoma de Burkitt.

Otra categoría importante, aparte de la enfermedad de Hodgkin, son las neoplasias que tienen su origen en células T y células "Natural Killer" (NK). En este grupo se encuentran la leucemia/linfoma T linfoblástico de células precursoras y las neoplasias de células T periféricas y de células NK llamadas: leucemia linfocítica crónica de células T, leucemia de linfocitos grandes granulares, micosis fungoide / síndrome de Sézary, linfomas de células T periféricas inespecíficos, linfoma angioinmunoblástico de células T, linfoma angiocéntrico, linfoma intestinal de células T, leucemia/linfoma de células T del adulto y linfoma de células anaplásicas grandes.

No es la intención de este capítulo hacer un estudio extenso de cada clasificación por lo que nos limitaremos a resaltar las características inmunofenotípicas más relevantes en el estudio de estas neoplasias por citometría de flujo.

Leucemia/linfoma linfoblástico B. Se presenta típicamente como una leucemia. Aunque el compromiso de la médula ósea y la sangre es muy común, unos pocos casos se localizan como tumores sólidos, usualmente en los nódulos linfáticos. La enfermedad, aunque es agresiva, puede ser curada, particularmente cuando se trata de niños. Típicamente expresa TdT, CD10 (aunque a veces está ausente), puede expresar cadenas pesadas de inmunoglobulina en el citoplasma, pero es más frecuente que este

marcador sea negativo. Expresa otros marcadores de células B como son CD19, CD20, CD79a y CD22. Por lo general, muestra trisomía 12 o anormalidades 13q en algunos casos.

Inmunocitoma (linfoma linfoplasmocítico). Esta neoplasia de origen B tiene tendencia a diferenciarse a un estado de células plasmáticas. Es posible detectar IgM en el citoplasma o como inclusiones intranucleares (cuerpos de Dutcher) en las células de aspecto plasmocítico. Si la IgM también aparece en el suero como paraproteína, la enfermedad corresponde a una Macroglobulinemia de Waldenström's. La fuerte positividad para IgM citoplasmática y de superficie, en conjunto con la ausencia de CD5, puede ayudar a distinguir esta enfermedad de las neoplasias linfocíticas pequeñas. El resto de los marcadores de células B, CD19, CD20, CD22 y CD79a son positivos. CD10 es negativo. Es una enfermedad de adultos que suele seguir un curso indolente aunque puede transformarse en un linfoma de células grandes más agresivo.

Linfoma de células del manto. Esta enfermedad se presenta, por lo general, con linfadenopatías, pero puede encontrarse en sitios extranodales, principalmente en el tracto gastrointestinal. Las células son, en la mayoría parte de los casos, pequeñas y de alto SSC debido a sus núcleos irregulares. Presentan el marcador CD5 y carecen de CD23. Existe asociación con una anormalidad citogenética característica, la traslocación recíproca (t) (11;14) lo que determina la producción de la ciclina D1, la cual puede ser identificada por citometría de flujo. Expresan también los marcadores de células B CD19, CD20 CD22 y CD79a, y tienen expresión clonal de cadenas livianas de inmunoglobulina, con mayor frecuencia cadenas lambda. CD10 es frecuentemente negativo. Esta enfermedad se presenta preferentemente en adultos, siguiendo un curso moderadamente agresivo.

Linfoma folicular. Esta enfermedad es de progresión lenta, pero esencialmente incurable. Las células presentan los marcadores de células B CD19, CD20, CD22 y CD79a. Son CD5 y CD23 negativas y CD10 positivas. Presentan expresión clonal de cadenas livianas de inmunoglobulina (kappa con mayor frecuencia). La traslocación (14;18) está presente en dos tercios de los casos acompañada de la expresión de la proteína BCL-2, sin embargo, los casos que carecen de esta



traslocación también expresan la proteína BCL-2 y presentan las mismas características clínicas de aquellos que sí la tienen.

Linfoma de células B marginales (tipo MALT).

Este linfoma es también conocido como linfoma de células pequeñas. Se origina en el ducto gastrointestinal o en otros sitios extranodales, generalmente en el tejido epitelial glandular. Este linfoma tiende a mantenerse localizado, por lo que es en general de buen pronóstico, aunque puede transformarse en un linfoma B de células grandes. Estas células tienen el fenotipo de células B con expresión de CD19, CD20, CD22, CD79a e inmunoglobulinas de superficie. No expresan CD5, CD10 ni CD23. El perfil citogenético suele presentar t(11;18) en muchos casos y trisomía 3 en algunos. Este mismo fenotipo se encuentra en el linfoma B de la zona marginal del bazo que representa una forma rara de leucemia crónica conocida como “linfoma esplénico de linfocitos velludos” y se diferencia del linfoma tipo MALT en la alta incidencia de enfermedad en la médula ósea.

Leucemia de células velludas o tricoleucemia.

Es una leucemia de células B, las que expresan todos los marcadores B además de CD25, CD103 y CD11c. No expresan CD5, CD10 ni CD23. Es, por lo general, una enfermedad de adultos que sigue un curso indolente pudiendo presentar esplenomegalia y pancitopenia.

Plasmocitoma / Mieloma de células plasmáticas.

Las células plasmáticas son características del Mieloma múltiple o plasmocitoma. Por lo general las células no expresan los marcadores B CD19, CD20 y CD22, pero son positivas para inmunoglobinas citoplasmáticas (clonal para una cadena liviana) acompañada en aproximadamente un 50% de los casos de CD79a. Expresan CD38, CD138 y, en un elevado número de casos CD56. Los pacientes son en su mayoría adultos (mayores de 50 años) que responden inicialmente al tratamiento, pero que recaen luego de un período de remisión variable.

Linfoma difuso de células B grandes. Es uno de los linfomas no-Hodgkin más comunes. Expresan marcadores B (CD19, CD20, CD22, CD79a) y en algunos casos CD5 y CD10. Expresan las inmunoglobulinas con más frecuencia en la superficie que en el citoplasma. La citogenética muestra t(14;18) en aproximadamente 30% de los

casos y rearrreglamentos (40%) y/o mutación (75%) de BCL-6. Es una enfermedad tanto de niños como de adultos. Sigue un curso agresivo, pero puede ser curable.

Linfoma de Burkitt. Este tipo de linfoma se presenta con mayor frecuencia en niños que en adultos. Es una enfermedad agresiva pero responde a una terapia intensa, especialmente en niños. El fenotipo es de células B periféricas: CD19, CD20, CD22, CD79a e IgM de superficie positivas. CD10 es siempre positivo. No expresa CD5 ni CD23. El marcador Ki67 es positivo en 85% de los casos. La citogenética muestra t(2;8), t(8;14) o t(8;22), rearrreglo de c-Myc en el cromosoma 8 y en el gen para cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. Con menos frecuencia están involucradas las cadenas livianas.

Leucemia/linfoma T linfoblástico de células precursoras. Esta leucemia es morfológicamente indistinguible de las neoplasias de origen B. Se presenta, por lo general, como leucemia aguda pero ocasionalmente puede dar origen a tumores en los nódulos linfáticos o timo. Presenta positividad para antígenos de línea T, aunque debido a su inmadurez, el CD3 puede ser citoplasmático, es positivo para TdT, CD7, CD4 o CD8. CD1a es frecuentemente positivo.

Leucemia linfocítica crónica de células T. Esta patología involucra la sangre periférica y se asemeja a la de tipo B en la morfología. Cuando las células presentan nucleólos más prominentes y citoplasma algo más abundante, se clasifican como leucemia prolinfocítica de células T, siendo menos frecuente y de peor pronóstico. Estos linfomas expresan marcadores de células T CD2, CD3, CD5, CD4 con más frecuencia que CD8 y siempre son CD7 positivos. La citogenética muestra trisomía 8q e Inv 14(q11;32) en el 75% de los casos. Es una enfermedad de adultos y más agresiva que su equivalente de tipo B.

Leucemia linfocítica de células granulares grandes. Se subdividen fenotípicamente en aquellas que se originan de células T y aquellas que probablemente derivan de células NK. La primera, se presenta como una enfermedad de curso indolente y los pacientes suelen ser asintomáticos. El pronóstico es por lo general bueno. En cambio en el segundo tipo, de células NK, los pacientes son de menor edad (40 años como promedio) y los sínto-



mas son más agudos pudiendo presentar esplenomegalia masiva, compromiso del tracto gastrointestinal y coagulopatía. Esta patología tiende a seguir un curso más agresivo. Fenotípicamente ambas son similares, presentando antígenos comunes como CD2 y CD56; CD3 es positivo en el caso de células T, CD8 puede ser positivo en ambas, CD16 y CD57 son positivos en el caso de ser células NK.

Micosis fungoide/ Síndrome de Sézari. La Micosis fungoide es un linfoma de células T que se ve con más frecuencia en la piel y se define como síndrome de Sézari cuando las células se detectan también en la circulación. Si la enfermedad progresa, puede involucrar los ganglios linfáticos. Esta enfermedad sigue un curso variable pudiendo extenderse y transformarse en tumores de células grandes. Estas células expresan antígenos de células T: CD2, CD3, CD5 y CD4. Son CD7, CD8 y CD25 negativos. En muchos casos CD30 es positivo, lo que es útil para diferenciar esta patología de una dermatitis.

Linfoma periférico inespecífico de células T. Típicamente, esta enfermedad contiene una mezcla de células neoplásicas pequeñas y grandes, con una marcada presencia de otros tipos celulares no neoplásicos, incluido macrófagos y eosinófilos. Es una enfermedad de adultos, de curso agresivo pero potencialmente curable. Presenta una variedad de patrones antigénicos de células T siendo CD4 positivo con más frecuencia que CD8. CD3 puede ser positivo o negativo. El resto de los antígenos de células T se presentan en forma variable.

Linfoma angioinmunoblástico de células T. Es una enfermedad sistémica con linfadenopatía, fiebre, pérdida de peso y rash cutáneo. Presenta hipergammaglobulinemia policlonal. Es moderadamente agresiva y se considera un linfoma de alto grado. Aunque las células presentan fenotipo de células T con preferencia CD4 positivas, su característica más relevante es la presencia de otros tipos celulares como histiocitos, células plasmáticas, eosinófilos y células dendríticas foliculares. El diagnóstico es más bien morfológico por presentar una arquitectura particular.

Linfoma angiocéntrico. Esta patología se presenta tanto en niños como en adultos. Involucra zonas extranodales como nariz, paladar y piel. El curso clínico varía de indolente hasta agresivo. El

virus Epstein Barr está siempre presente en las células neoplásicas. Estas células se originan, más probablemente, en células NK que expresan CD2 y CD56. Sin embargo, también se puede detectar marcadores de células T como CD5, CD7, CD4 o CD8. Por lo general se encuentra CD3 citoplasmático.

Linfoma intestinal de células T. Es una enfermedad de adultos que sigue un curso agresivo. Por lo general, los pacientes presentan una historia larga de enfermedad celíaca, mientras que en otros se presenta directamente como linfoma. El pronóstico es malo debido a que esta neoplasia suele ser multifocal. Las células presentan fenotipo de células T. Son CD3 y CD7 positivas. CD8 es con frecuencia positivo. En muchos casos las células expresan la integrina CD103.

Leucemia/linfoma de células T del adulto. Esta patología se asocia a la infección con el retrovirus HTLV-1. Los nódulos linfáticos son reemplazados difusamente por células T neoplásicas y en algunos casos éstos se detectan en la sangre periférica. La enfermedad se asocia con lesiones óseas e hipercalcemia. Sigue un curso por lo general agresivo, pudiendo ser, en escasas ocasiones, indolente. El fenotipo es de células T CD3, CD2, CD4, CD5 y CD25 positivo. CD7 es negativo.

Linfoma anaplástico de células grandes. Las células expresan el antígeno CD30 o Ki-1, un antígeno presente en las células de Reed-Sternberg y suelen ser más grandes que en otros linfomas. En algunos casos es difícil hacer diagnóstico diferencial con linfoma de Hodgkin. Típicamente, el tumor invade los ganglios linfáticos y en otros, se confina en la piel. Con poca frecuencia expresan marcadores de linfocitos, pero cuando los hay éstos indican un origen de células T.

3.3. Enfermedad de Hodgkin

La utilidad de la citometría de flujo en el diagnóstico de esta patología es escasa ya que se utilizan, con mayor éxito, criterios morfológicos. La clasificación es compleja y está mejor definida en el campo de los patólogos, por lo que no será descrita en esta ocasión.

3.4. Trasplante de médula ósea

La citometría de flujo tiene aplicación en las



diferentes etapas del trasplante de médula ósea. Contribuye, en conjunto con otras técnicas, a la evaluación de la enfermedad residual en el momento de la decisión terapéutica así como también en la evaluación de las células progenitoras CD34+. Las células progenitoras pueden definirse como células que tienen la capacidad de duplicarse y diferenciarse en una amplia variedad de líneas hematopoyéticas que, al ser trasplantadas en un receptor aplásico (pancitopenia resultante tanto de una enfermedad como de una terapia mielosupresora) son capaces de reconstituir la médula ósea del paciente. Se considera que el número de células CD34+ trasplantadas se correlaciona con el éxito y rapidez de la reconstitución lo cual contribuye a disminuir el período de tiempo en que el paciente se encuentra inmunosuprimido o bajo los efectos de una quimioterapia de altas dosis.

La movilización de células CD34+ desde la médula ósea hacia la sangre periférica con factores de crecimiento de colonias (en pacientes cuya médula ósea no se encuentra comprometida), ha permitido recolectar células progenitoras desde la médula ósea o por leucoaféresis, evaluarlas y criopreservarlas para ser utilizadas en trasplantes alogénicos o autotrasplantes de pacientes sometidos a quimiorradioterapia. Los protocolos utilizados para incrementar los niveles de células progenitoras en la sangre son muy variados, los mecanismos de este proceso de movilización no se conocen y la caracterización biológica de las células movilizadas es limitada. Ha sido demostrado que los trasplantes realizados con células mononucleares enriquecidas en células progenitoras CD34+ permiten la reconstitución de la hematopoyesis. En estos casos, es de gran importancia cuantificar la población responsable de la reconstitución rápida y sostenida de la hematopoyesis del receptor del trasplante. La medición de las células CD34+ por citometría de flujo provee de un método rápido y reproducible para cuantificar esta población. Para esto se realiza doble marcaje utilizando anticuerpos dirigidos contra CD45 y CD34 y se utiliza un análisis multiparamétrico de la muestra considerando las características de tamaño y granulosidad de las células progenitoras de manera a analizar exclusivamente los leucocitos de la muestra y expresar los resultados en valores absolutos de células CD45+.

3.5. Análisis de contenido de DNA y ciclo celular

Una de las aplicaciones importantes de la citometría de flujo es la evaluación del contenido de DNA y ciclo celular. Las células marcadas con un fluorocromo, que se une estequiométricamente a los ácidos nucleicos, emiten una fluorescencia proporcional al contenido cromosómico global. Las células malignas son con frecuencia afectadas de una anomalía en el contenido de DNA, es decir, son aneuploides. En muchos tumores humanos la ploidía representa un factor pronóstico. La medición del contenido de DNA y del ciclo celular pueden ser combinadas con el estudio simultáneo de la expresión de antígenos de la membrana, citoplasmáticos o nucleares, con lo cual un tipo particular de células puede ser evaluada dentro de una población heterogénea en conjunto con la ploidía y las fases del ciclo celular.

El análisis por citometría de flujo del ciclo celular puede reflejarse en una curva que muestre las variaciones del contenido de DNA versus el número de células analizadas (figura 43-8). Las células que no están creciendo o involucradas en la división celular se denominan en el estado G0. Cuando se gatilla la división, la célula entra primero en el estado G1 del ciclo celular, luego comienza a sintetizar DNA y entra a la fase S del ciclo celular. Durante esta fase el contenido de DNA de la célula aumenta hasta duplicarse, luego la célula ingresa a la fase G2 del ciclo y se prepara finalmente para entrar en mitosis (M) y volver a dividirse retornando a G1 si la célula es estimulada o bien mantenerse en G0.

Las células somáticas son diploides, es decir tienen un número $2n$ de cromosomas. El número de cromosomas de un tumor es con frecuencia mayor que $2n$ (hiperploide) y algunas veces menor (hipoploide). Un número anormal de cromosomas se denomina aneuploidía y refleja cambios en el contenido de DNA. El contenido de DNA de un tumor se expresa como el índice de DNA el cual se define como la razón entre el contenido de DNA de las células tumorales con respecto a células normales diploides. Utilizando la citometría de flujo es posible analizar el contenido de DNA tanto de células frescas como de biopsias en parafina. Para esto es necesario obtener suspensiones de núcleos o células evitando la degradación del DNA. Cuando se estudian tejidos neoplásicos, generalmente éstos contienen algún porcentaje de células normales diploides que sirven como control interno de la muestra. Alternativamente, se

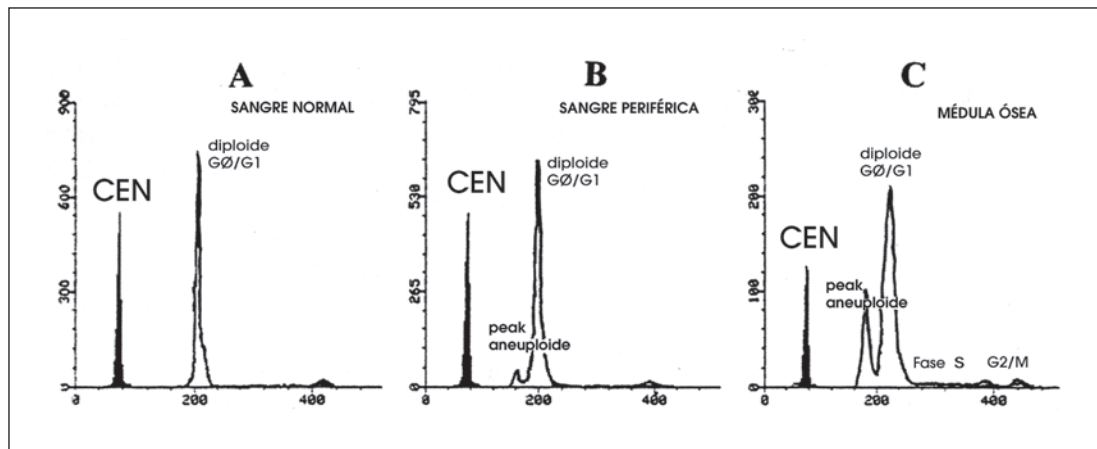


Figura 43-8. Comparación del contenido de DNA. Se muestran células mononucleares de sangre normal (A), células mononucleares de sangre de un paciente con leucemia (B) y médula ósea del mismo paciente (C). En cada gráfico se muestra además el contenido de DNA de núcleos de eritrocitos de pollo (CEN) los cuales se utilizan para la calibración del citómetro de flujo. Se detecta una pequeña población aneuploide (hipodiploide) en ambas muestras del paciente siendo ésta mayor en la médula ósea, concordante con el porcentaje de blastos detectados en la inmunofenotipificación por citometría de flujo.

pueden utilizar otros controles, como linfocitos aislados, eritrocitos u otra célula cuyo contenido de DNA sea estable (figura 43-8).

En líneas generales, la cuantificación de DNA proporciona dos tipos de información biológica distinta: por un lado, nos orienta sobre la existencia o no de anomalías clonales de DNA- aneuploidías- y por otra, nos permite conocer la proporción de células en las distintas fases del ciclo celular. Esta metodología permite obtener además información sobre la dinámica del ciclo celular si se incluye la incorporación de análogos de nucleótidos como la bromodeoxiuridina (BrdU) y así determinar con exactitud las células en fase S. Actualmente se ha incorporado la utilización del compuesto fluorescente verde 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) que se une covalentemente a macromoléculas intracelulares, permitiendo realizar cultivos mixtos de linfocitos y respuesta a mitógenos y aloantígenos en conjunto con el estudio del ciclo celular. Desde el punto de vista pronóstico, la presencia de aneuploidía de DNA dentro de los tumores malignos, se ha asociado con una peor respuesta al tratamiento y con supervivencia más cortas. No obstante, en algunas situaciones concretas como en la leucemia linfoblástica aguda del niño, el mieloma múltiple, el neuroblastoma y el rhabdomyosarcoma, la presencia de aneuploidía, y en particular de hiperploídía, se asocia con un mejor pronóstico de la enfermedad. El estudio del ciclo celular mediante citometría de flujo en lesiones tumorales

ha demostrado poseer una clara utilidad clínica, tanto en su aplicación diagnóstica como pronóstica. La existencia de una elevada tasa proliferativa en tumores sólidos y en hemopatías malignas se asocia globalmente con un diagnóstico histopatológico de malignidad, con características clínicas, biológicas e histológicas de mal pronóstico y en definitiva con una peor evolución de la enfermedad y una supervivencia más corta. Sin embargo, en los síndromes mielodisplásicos, la existencia de una mayor proporción de células en fase S en la médula ósea se asocia con un mejor pronóstico.

Pese a lo prometedor de los resultados obtenidos hasta ahora en este campo, el valor clínico de la detección de aneuploidía debe ser tomado con cautela. Un análisis detallado de la literatura muestra la existencia de un elevado grado de discrepancias en relación tanto, con la incidencia de aneuploidías para un mismo tumor, como en sus posibles implicaciones clínicas. Las causas de estas discrepancias son probablemente metodológicas, van desde la calidad de la muestra, procesamiento y métodos de tinción del DNA, hasta la interpretación de los resultados.

3.6. Análisis de enfermedad residual mínima

El desarrollo actual de tratamientos de quimioterapia muy efectiva ha permitido alcanzar una elevada incidencia de remisiones completas en pacientes con leucemias agudas. Sin embargo,



un porcentaje importante de estos pacientes, luego de alcanzar la remisión completa, recae debido a la persistencia de células tumorales residuales (enfermedad residual mínima o ERM). En la actualidad, la confirmación de la remisión completa se basa en la existencia de menos de 5% de blastos en médula ósea y sangre periférica, detectables por técnicas morfológicas y citoquímicas convencionales, así como por la ausencia de estas células en el líquido cefalorraquídeo. De este modo entre los individuos en remisión completa, se incluye un grupo de pacientes muy heterogéneo cuya masa tumoral residual puede variar desde 10^9 a 10^{11} células leucémicas.

En los últimos años, diversos grupos han volcado sus esfuerzos en la detección de ERM en leucemias agudas. Su interés se ha centrado en el desarrollo de métodos que permitan aumentar la sensibilidad de las técnicas morfológicas y citoquímicas convencionales (1-5%) y en establecer la posible utilidad clínica de este tipo de análisis y sus implicaciones terapéuticas. De entre todos los métodos investigados para la detección de ERM en leucemias agudas, el inmunofenotipo obtenido por citometría de flujo, junto con análisis de biología molecular aparecen como las técnicas más atractivas debido a la rapidez, alta sensibilidad y objetividad de los resultados. Como ha sido mencionado ampliamente, la citometría de flujo permite analizar varios parámetros simultáneamente en una misma célula, cuantificar la expresión de un marcador molecular en un número muy grande de células en corto tiempo, analizar una diversidad de marcadores de superficie o citoplasmáticos, además del contenido de DNA permitiendo así acotar con bastante exactitud la población de células neoplásicas.

En general, la eficacia de cualquier método, cuyo objetivo sea la detección de ERM en leucemias agudas y otras patologías, depende de su especificidad (capacidad para diferenciar entre células normales y células neoplásicas), de su sensibilidad (límite de detección del método), de su reproducibilidad (debe ser objetivo y fácil de estandarizar) y de su aplicabilidad (debe ser rápido y susceptible de ser utilizado en la rutina de un laboratorio clínico).

Las células leucémicas, salvo raras excepciones, no presentan antígenos específicos que permitan diferenciarlas de las células normales. Sin embargo el conocimiento actual

basado en la experiencia de muchos años ha puesto de manifiesto la existencia de múltiples aberraciones antigénicas con respecto a los patrones fenotípicos detectados en las células normales. Este es el eje central para la posterior detección de ERM, el cual necesariamente debe estar apoyado en el inmunofenotipo del paciente al momento del diagnóstico. Los patrones de aberración antigénica en conjunto con otras características celulares son de gran utilidad en la detección de ERM. No obstante lo más acertado es utilizar al menos dos parámetros, para identificar la población neoplásica en la muestra.

Un atractivo complemento a esta estrategia, no disponible aún, sería el empleo de anticuerpos monoclonales contra proteínas de productos de fusión de algunos genes implicados en traslocaciones cromosómicas. Estos anticuerpos serían marcadores leucémicos específicos, ausentes en células normales, y que conjugarían dos requisitos importantes para la investigación de ERM: especificidad y sencillez. Aunque los estudios sobre ERM son escasos en número y el seguimiento de los pacientes incluidos en la mayoría de los estudios es relativamente corto, se ha constatado en forma unánime, que la presencia de células blásticas durante la fase de tratamiento, de mantenimiento o en remisión completa permite anticipar, con una elevada probabilidad, la recaída.

LECTURAS SUGERIDAS

Braylan, R., Benson N. and Iturraspe J., "Analysis of lymphomas by Flow Cytometry: Current and emerging strategies", *Annals of the New York academy of sciences*. 677: 364-378, 1993.

Braylan, R. "Lymphomas" en **Clinical Flow Cytometry: Principles and applications**, pp. 203-234. De Bauerm, K., Duque, R. and Shankey, T., 1993.

Duque R. "Acute Leukemia" en **Clinical Flow Cytometry: Principles and applications**, pp. 235-245. De Bauer, K., Duque, R. and Shankey, T., 1993.

Locken, M., "Immunofluorescence techniques" en **Clinical flow cytometry: Principles and applications**, pp. 341-353. De Bauer, K., Duque, R. and Shankey, T., 1993.



Longobardi, A., **Flow Cytometry: First principles**, Wiley-Liss, Inc., 1992.

Steen, H., “Charateristic of Flow Cytometers” en **Clinical flow cytometry: Principles and applications**, pp. 235-245. De Bauer, K., Duque, R. and Shankey, T., 1993.

Stewart, C. and Stewart, S. “Multiparameter analysis of leucocyte by flow cytometry” en **Methods in cell biology: Flow Cytometry**, Vol. 14, pp. 61-78. Ed. Darzynkiewics, Z., Robinson, J. and Crissman, H., 1994.

Visscher, D. and Crissman, J. “Dissociation of intact cell from tumor and normal tissue” en **Methods in cell biology: Flow Cytometry**, Vol. 14, pp. 1-13. Ed. Darzynkiewics, Z., Robinson, J. and Crissman, H., 1994.





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 44

ANTICUERPOS MONOCLONALES

María Inés Becker C. y Alfredo E. De Ioannes I.

- | | |
|---|--|
| 1. Introducción | 4. Anticuerpos monoclonales versus anticuerpos policlonales |
| 2. Fundamentos del desarrollo de hibridomas | 4.1. Especificidad |
| 2.1. Mielomas | 4.2. Aidez y afinidad |
| 2.2. Fusión celular | 5. Aplicaciones de los anticuerpos monoclonales |
| 2.3. Medio de selección | 5.1. Investigación básica |
| 3. Etapas de la producción de hibridomas murinos | 5.2. Medicina |
| 3.1. Inmunización | 5.3. Biotecnología |
| 3.2. Fusión | 6. Otros tipos de hibridomas |
| 3.3. Selección y crecimiento | 6.1. Heterohibridomas |
| 3.4. Subclonación y congelación | 6.2. Hibridomas humanos |
| 3.5. Cultivo masivo | |





RESUMEN

Durante décadas, uno de los grandes anhelos de los inmunólogos fue producir *in vitro*, anticuerpos monoespecíficos de especificidad predefinida. Sin embargo, su principal problema era que los medios de cultivo disponibles no eran capaces de sustentar el crecimiento de las células productoras de anticuerpos. No fue hasta 1975 que George Köhler y César Milstein publicaron un procedimiento que permitía immortalizar los linfocitos B de ratones previamente inmunizados mediante su fusión con células mielomatosas, constituyéndose de esta forma un hibridoma (o clon de células híbridas) capaz de secretar anticuerpos monoespecíficos (monoclonales) al medio de cultivo.

Desde entonces, los anticuerpos monoclonales han sido una poderosa herramienta de análisis en investigación básica y aplicada en diversas áreas de la biología y biotecnología así como también en medicina, especialmente en el campo del inmunodiagnóstico y la inmunoterapia. Entre las razones de su éxito se debe destacar que debido a su monoespecificidad, tienen la capacidad de interactuar con un solo epítipo del antígeno. Además, como la célula que los secreta es de naturaleza tumoral, brinda la posibilidad de disponer de un anticuerpo homogéneo, que no cambia sus propiedades en el tiempo, en cantidades ilimitadas.

Entre los aspectos más relevantes del desarrollo de los hibridomas se encuentra disponer de un procedimiento que permita crecer sólo a los híbridos. Con este propósito, se utilizan líneas celulares mielomatosas mutantes, con defectos en la producción de las enzimas envueltas en la síntesis *de novo* de nucleótidos. En estas condiciones, es posible inducir las vías de rescate de la síntesis de DNA a partir de nucleósidos exógenos como Timidina e Hipoxantina, sólo si están presentes la enzima Timidina Kinasa para las pirimidinas, o la enzima Hipoxantina-Guanina-Fosforibosil Transferasa para purinas, respectivamente. Habitualmente, para preparar hibridomas, se utilizan células mieloides mutantes para TK o HGPRT que han sido seleccionadas por su sensibilidad a Aminopterina un análogo del ácido fólico -inhibidor de la dihidrofolato reductasa- que bloquea la síntesis de purinas y pirimidinas. De esta forma, en un medio que contiene Aminopterina sólo es posible el crecimiento de los híbridos, que gracias al aporte del linfocito B, poseen todo el panel de enzimas que conforman las vías de rescate de síntesis de DNA y, por lo tanto, pueden utilizar la Hipoxantina y Timidina adicionada al medio de cultivo (medio HAT).

El procedimiento básico en el desarrollo de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales murinos se puede resumir en las siguientes etapas: (i) Inmunización: se debe desarrollar atendiendo cuidadosamente a las propiedades del antígeno y a los propósitos a los cuales está destinado el anticuerpo; (ii) Fusión: se requiere linfocitos esplénicos de un animal inmunizado y células mielomatosas. Como agente fusógeno generalmente se utiliza Polietilenglicol. (iii) Selección en medio HAT, para asegurar que sólo los híbridos crezcan. En torno a los 14 días post-fusión, se inician las pruebas -ya sea mediante ELISA, aglutinación, inmunofluorescencia o alguna otra técnica sencilla- para determinar la especificidad de los sobrenadantes. Posteriormente, todos los microcultivos positivos se expanden a un mayor volumen de medio para continuar con la caracterización del anticuerpo; (iv) Subclonación; procedimiento que se realiza con los hibridomas de interés para asegurar la monoespecificidad del clon y por ende, del anticuerpo que éste secreta; (v) Congelación: Permite preservar por un tiempo indefinido las líneas de hibridomas en presencia de un medio crioprotector; (vi) Cultivo masivo: permite disponer de mayores cantidades de anticuerpo monoclonal ya sea creciendo el hibridoma en grandes volúmenes de medio de cultivo (en frascos o en biorreactores) y también, mediante la inducción de tumores secretores de líquido ascítico, inyectando las células de hibridoma en ratones singénicos.

Por las propiedades de los anticuerpos monoclonales, rápidamente se visualizó su aplicación en inmunoterapia en humanos, sin embargo, éstos, por ser de ratón, son inmunogénicos en humanos, razón que impulsó el desarrollo de los hibridomas humanos con algunos problemas aún no resueltos. Entre los más importantes están la fuente de linfocitos B y la ausencia de líneas mielomatosas de humanos con crecimiento estable. Para salvar estos problemas se está utilizando la ingeniería genética. Es así, como hoy día se dispone de anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos que tienen asociadas moléculas con funciones no inmunológicas y fragmentos que contienen las regiones CDR de un anticuerpo unidas por una molécula ligadora



flexible. Finalmente, para demostrar una vez más que la creatividad humana no tiene límites, actualmente es posible ensamblar anticuerpos en la superficie de fagos filamentosos, procedimiento que permitirá conocer más profundamente sobre los mecanismos involucrados en la maduración de la respuesta inmunológica de los vertebrados.

1. INTRODUCCIÓN

Desde que Burnet en 1959 postuló la teoría de la selección clonal -donde propone que cada linfocito B o su progenie terminalmente diferenciada, la célula plasmática, es capaz de producir sólo un tipo de inmunoglobulina, cuya región constante puede modificarse durante la diferenciación del linfocito pero no así su región variable, la cual mantiene su singular especificidad- surge en Inmunología el concepto de monoclonalidad y la idea de producir anticuerpos monoespecíficos contra un antígeno conocido. El concepto de monoclonalidad permitió comprender la naturaleza de la enfermedad conocida como mieloma, caracterizada por la transformación neoplásica de un clon individual del linaje de los linfocitos B, en que todos secretan la misma inmunoglobulina constituyendo así, la primera fuente conocida de anticuerpos monoclonales, aun cuando se desconoce el antígeno.

Durante años, debido a la imposibilidad de cultivar *in vitro* los linfocitos B, numerosos científicos intentaron modificarlos experimentalmente para lograr su crecimiento estable, asegurando de esta forma una fuente continua de anticuerpos homogéneos. Aplicaron procedimientos tales como la inducción de mielomas en ratón y su posterior crecimiento *in vivo* o *in vitro*, a pesar de que no eran antígeno específicos. También ensayaron procedimientos para transformar linfocitos B, con virus Epstein Barr o SV40, que permitieron establecer algunas líneas productoras de anticuerpos monoespecíficos, pero con un inconveniente: los secretaban en muy pequeñas cantidades.

Sólo en el año 1975, Köhler y Milstein demostraron que la hibridación o fusión de dos células somáticas -entre un linfocito B, que posee la información para sintetizar un solo tipo de anticuerpo y una célula de mieloma, que tiene una capacidad ilimitada de proliferación celular- podía utilizarse para establecer un cultivo continuo de células secretoras de anticuerpos monoclonales de especificidad predefinida. Dichas líneas celu-

lares, en adelante denominadas hibridomas, podían mantenerse en cultivo indefinidamente o congelarse y ser luego recuperadas para crecerlas *in vitro* o *in vivo*, inyectándolas intraperitonealmente en ratones histocompatibles, donde formaban tumores secretores de líquido ascítico enriquecido en el anticuerpo monoclonal original.

Por su trabajo al establecer las bases de la metodología para desarrollar hibridomas, en que se asegura una perpetua fuente de anticuerpos homogéneos, Köhler y Milstein recibieron el Premio Nobel de Medicina en el año 1984.

2. FUNDAMENTOS DEL DESARROLLO DE HIBRIDOMAS

La preparación de hibridomas se sustenta en la aplicación de tres herramientas metodológicas generadas independientemente por biólogos celulares y genetistas: la inducción de mielomas en ratón, la fusión de células somáticas y el uso de medios de cultivo *in vitro* selectivos.

2.1. Mielomas

Los mielomas de ratón, inducidos experimentalmente con aceite mineral, según un procedimiento desarrollado por Potter en 1960, constituyeron un modelo decisivo para estudiar la expresión genética y la regulación de la síntesis de inmunoglobulinas, básicamente, porque estas células podían ser trasplantadas *in vivo* y también porque podían crecer continuamente *in vitro*. Esta última propiedad permitió clonarlas para obtener variantes de la secreción de anticuerpos. Además, podían ser manipuladas genéticamente para obtener mutantes en la estructura de las inmunoglobulinas. El conocimiento surgido de ambas líneas de investigación, llevó a conocer la genética de las células productoras de anticuerpos, cuyos principios se resumen a continuación:

- a) Cuando se fusionan dos células mieloides productoras de anticuerpos, la expresión de las



inmunoglobulinas es codominante; es decir, las inmunoglobulinas de las dos células parentales son expresadas, lo que sugiere estabilidad en la expresión de los anticuerpos y un control independiente de los genes codificadores de anticuerpos en ambas células parentales.

- b) Cuando una línea mieloide no productora de anticuerpos se fusiona con una línea mieloide que sí es productora, la producción de inmunoglobulina no cesa, y tampoco se induce producción en la variante no secretora.
- c) Los híbridos producen sólo aquellas cadenas de inmunoglobulinas codificadas en las células parentales al momento de la fusión, lo cual indica que no se producen nuevas cadenas de inmunoglobulinas.
- d) Los híbridos de dos células parentales productoras de anticuerpos, pueden ensamblar sus cadenas pesadas y livianas en todas las combinaciones posibles, para constituir un anticuerpo completo; aunque lo habitual es que las cadenas parentales se asocien preferencialmente.
- e) La fusión de células de mieloma con otras células que no son del linaje de las células B, tales como células fibroblásticas o epiteliales, inhibe la secreción de inmunoglobulinas.

2.2. Fusión celular

Como se deduce de los antecedentes expuestos anteriormente, otra herramienta fundamental en el desarrollo de la metodología de hibridomas fue la posibilidad de realizar fusión de células *in vitro*, en presencia de agentes que promueven la fusión de la membrana plasmática, para formar híbridos que poseen una comunión de propiedades de las células parentales.

Los primeros hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales se prepararon utilizando como agente fusógeno virus Sendai. Sin embargo, debido a las complicaciones que tiene este tipo de agente, rápidamente se reemplazó por fusógenos como la Isolecitina y el Polietilenglicol (PEG), siendo este último el más utilizado para desarrollar hibridomas murinos. Aunque el mecanismo de fusión vía PEG no está totalmente entendido, se ha postulado que por ser un compuesto altamente hidrofílico, absorbe la capa de agua

en torno a la membrana plasmática de las células permitiendo su aglutinación.

2.3. Medio de selección

Para desarrollar hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales, fue fundamental disponer de un procedimiento que sólo permitiera crecer a los híbridos compuestos de un linfocito B y una célula mieloide. Con este propósito, Köhler y Milstein utilizaron un procedimiento desarrollado en el año 1963 por Littlefield quien aisló, con medios selectivos, líneas celulares fusógenas mutantes, con defectos en la producción de las enzimas envueltas en la síntesis *de novo* de nucleótidos. Como se esquematiza en la figura 44-1, en estas condiciones, es posible inducir en las células de mamíferos las vías de rescate de la síntesis de DNA a partir de nucleósidos exógenos como Timidina (T) e Hipoxantina (H), sólo si están presentes la enzima Timidina Kinasa (TK) para las pirimidinas, o la enzima Hipoxantina-Guanina-Fosforibosil Transferasa (HGPRT) para purinas, respectivamente. Para seleccionar líneas mieloides deficientes en alguna de estas dos enzimas, se cultivan en Bromodeoxiuridina (células TK negativas) y en 8-Azaguanina o Tioguanina (células HGPRT negativas): las células así seleccionadas son incapaces de usar la vía de rescate en la síntesis de ADN.

Para preparar hibridomas, se utilizan células mieloides mutantes para TK o HGPRT que han sido seleccionadas por su sensibilidad a Aminopterina (A), un análogo del ácido fólico que bloquea la síntesis *de novo* de purinas y pirimidinas, inhibiendo la enzima dihidrofolato reductasa. De esta forma, en un medio que contiene Aminopterina sólo es posible el crecimiento de los híbridos, que gracias al aporte del linfocito B, poseen todo el panel de enzimas que conforman las vías de rescate de síntesis de DNA y, por lo tanto, pueden utilizar la Hipoxantina y Timidina adicionada al medio de cultivo. Las células mieloides no fusionadas se mueren y los linfocitos B no fusionados tienen una vida limitada *in vitro*, pues al no estar transformados, no proliferan y eventualmente también mueren. Los compuestos A, H y T componen el medio de selección habitual de los hibridomas murinos conocido como medio HAT.

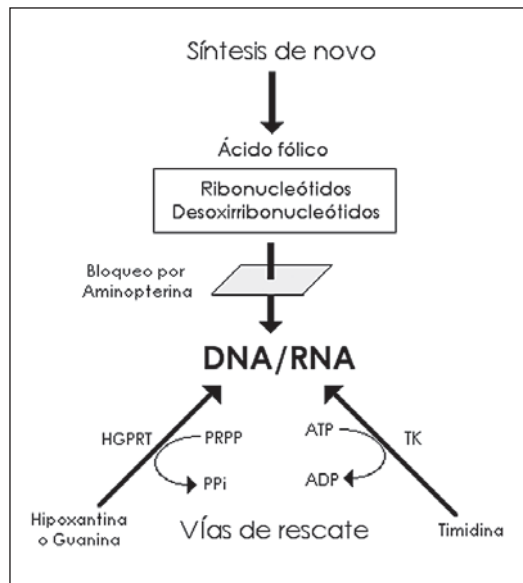


Figura 44-1. Principales vías de rescate envueltas en la síntesis de DNA: Fundamento del medio HAT (Hipoxantina, H; Aminopterina, A; Timidina, T) de selección de hibridomas. HGPRT (Hipoxantina-Guanina-Fosforibosil Transferasa), TK (timidina kinasa), PRPP (5'-Fosforibosil-1-Pirofosfato)

3. ETAPAS DE LA PRODUCCIÓN DE HIBRIDOMAS MURINOS

En la figura 44-2 se ilustra las etapas para preparar hibridomas murinos y, a continuación, se resumen los principales pasos a seguir para que el procedimiento sea exitoso.

3.1. Inmunización

La obtención de anticuerpos monoclonales útiles a nuestros propósitos sólo se logra si el animal de experimentación presenta un título adecuado de anticuerpos. Los animales más frecuentemente utilizados para preparar hibridomas son los ratones, especialmente los de la cepa BALB/c, aunque también se han empleado ratas y hamster. Dado que el período de inmunización puede tomar varios meses, los animales deben presentar buen estado de salud y deben mantenerse en condiciones controladas de higiene, luz, temperatura y alimentación.

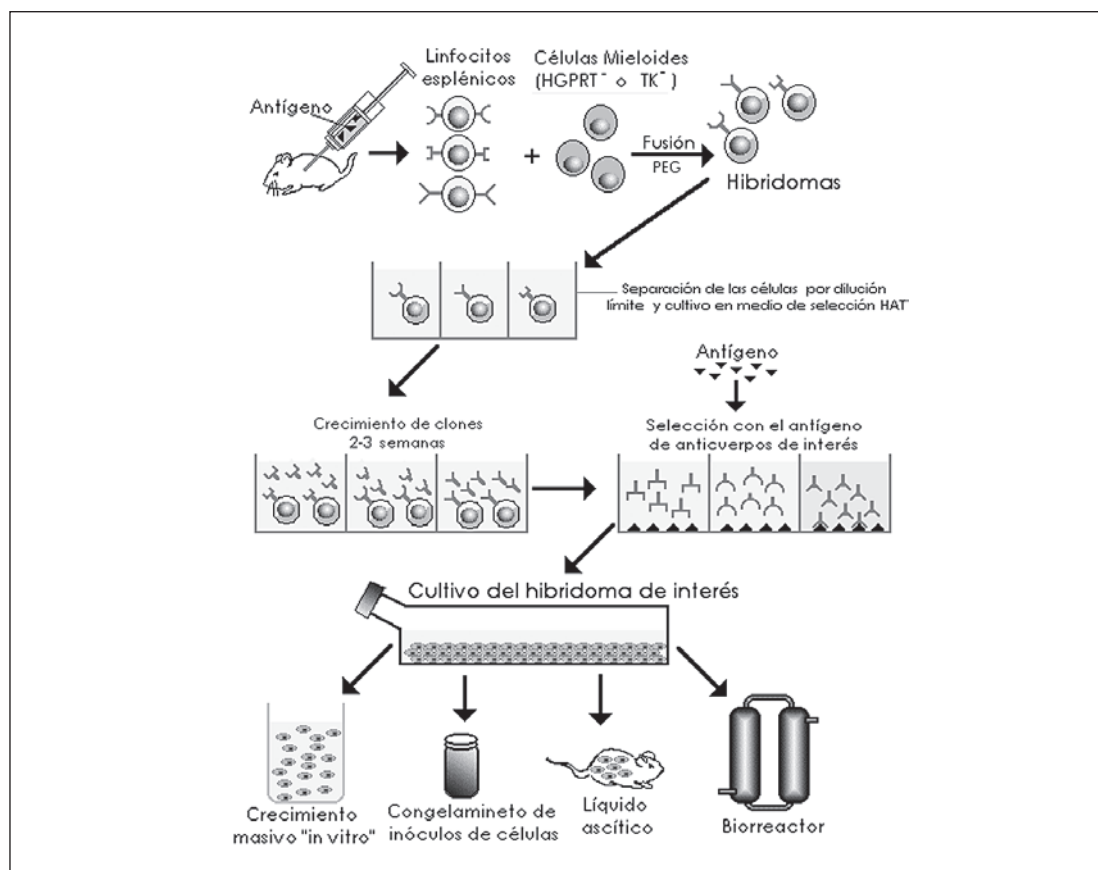


Figura 44-2. Procedimiento general para desarrollar hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales murinos. PEG (Polietilenglicol), HGPRT (Hipoxantina-Guanina-Fosforibosil Transferasa), TK (timidina kinasa), HAT (Hipoxantina, Aminopterina, Timidina)



Antes de iniciar el período de inmunización, es preciso analizar las características del antígeno; entre las más importantes se encuentran su naturaleza química y su tamaño molecular relativo, puesto que si se trata de un hapteno, será necesario acoplarlo químicamente a una proteína transportadora de inmunogenicidad probada. Entre estas proteínas, una de las más utilizadas es la Hemocianina –cuya función es el transporte de oxígeno en moluscos y artrópodos- extraída de una lapa californiana llamada “Keyhole limpet” (*Megathura crenulata*) y se conoce como KLH. Una proteína similar, que ha mostrado excelentes resultados es la Hemocianina que se extrae del molusco Loco (*Concholepas concholepas*). También se debe tener presente la especie de origen del antígeno y su grado de conservación. Si es una proteína de ratón, difícilmente será inmunogénica en esta especie, a menos que se trate de un antígeno de diferenciación o de antígenos tumorales. La solubilidad y toxicidad del antígeno deben ser consideradas.

Debido a la diversidad de antígenos, no es posible definir *a priori* un protocolo de inmunización común para todos, siendo lo habitual administrar al menos dos dosis del antígeno espaciadas por 15 a 30 días. Si el antígeno tiene un alto grado de pureza y es suficientemente inmunogénico, son necesarias dosis en torno a 50 μ g. Sin embargo, es recomendable el uso de coadyuvantes, quienes aportan señales de peligro necesarias para activar vigorosamente la respuesta inmune innata y adaptativa. El más utilizado en animales de experimentación es el coadyuvante completo de Freund’s –consiste de una emulsión de aceite en agua que además contiene *Micobacterium* atenuado- que se emplea en la primera inyección de antígeno. En posteriores inmunizaciones, se utiliza el mismo coadyuvante pero incompleto, es decir sin *Micobacterium*. Unos diez días después de cada inmunización, es aconsejable tomar una muestra de suero de los animales de experimentación y verificar la presencia de anticuerpos contra el antígeno usando una técnica sencilla, como ELISA, IFI o aglutinación. Si el título de anticuerpos es bajo, se administra un par de inyecciones más con el antígeno en coadyuvante incompleto, en dosis y tiempos similares a los descritos anteriormente. Si el título de anticuerpos es adecuado, bastará una inyección de refuerzo con una dosis de unos 100 μ g de antígeno en solución por vía endovenosa, 3 a 4 días antes de la fusión somática.

3.2. Fusión

Habitualmente, alrededor de una semana antes de la fusión somática para preparar hibridomas, se descongela un inóculo de células y se mantiene en crecimiento exponencial (más o menos 500.000 células/ml) para asegurar una alta viabilidad y eficiencia de fusión. En la tabla 44-1 se muestra algunas de las líneas que se han utilizado para preparar hibridomas de diversas especies animales. En cuanto a la selección de la línea mieloide parental a utilizar, el ideal es que no sea secretora de inmunoglobulina. Actualmente para hibridomas de ratón, las más usadas son las líneas NSO/2 y SP2/0 –ambas deficientes en enzima HGPRT- por su crecimiento estable y buena eficiencia de fusión.

Como se señaló anteriormente, la fusión se realiza entre 3 y 4 días después de la última inyección de antígeno, para disponer de suficientes linfoblastos, que corresponden al estado de diferenciación en que los linfocitos B presentan la mejor capacidad de fusión, probablemente por sus características de activa proliferación similares a las de las células mieloides, lo que permitiría una mejor integración del material nuclear. No se debe olvidar que los hibridomas son tetraploides y que, dado que su constitución ocurre totalmente al azar, es frecuente la pérdida de cromosomas, lo que se traduce en inestabilidad e incapacidad de crecer; esto explica en parte el bajo rendimiento de dicha metodología. Aproximadamente el 1% de las células utilizadas se fusionan y sólo 1 de cada 10.000 forma híbridos viables. El bazo es el órgano utilizado de preferencia para las fusiones somáticas por su fácil acceso, menores riesgos de contaminación en comparación con los ganglios o placas de Peyer y por el elevado número de linfocitos B que concentra (en torno a 10^8 linfocitos/bazo).

Antes de la fusión, las células mieloides y los linfocitos esplénicos se mezclan y se lavan rigurosamente para eliminar el suero fetal que se adiciona a los medios de cultivo, porque éste inhibe la acción del PEG. Se debe tener especial cuidado en la elección de este compuesto, ya que su origen y pureza son determinantes para la eficiencia de la fusión. PEG, en un rango de peso entre 4000 y 6000 es el más aconsejable, ya que el PEG de bajo peso molecular es altamente tóxico para las células. En nuestra experiencia, PEG 4.000 a temperatura ambiente, a pH 7,2 en amortiguador fosfato glucosado, a una concentración del 50%, presenta óptimos resultados, es decir, un rendi-



Tabla 44-1. Antisueros convencionales *versus* Anticuerpos Monoclonales

Característica	Antisueros	Monoclonales
Composición	Heterogénea: contiene anticuerpos diferentes para diferentes epítomos de un antígeno.	Homogénea: contiene un solo anticuerpo
Reconocimiento antígeno	Reconocen varios epítomos de un antígeno.	Reconocen un solo epítopo del antígeno.
Especificidad	Variable, depende del animal y la sangría. Reacciones cruzadas parciales.	Estándar Mínimas reacciones cruzadas.
Afinidad	Variable, depende del grado de inmunización.	Se selecciona
Pureza del antígeno	Es esencial	Hasta un 20%
Rendimiento de anticuerpo útil	Hasta 1 mg/mL	Hasta 100 µg/mL en el sobrenadante de cultivo. Hasta 20 mg/mL en ascítico
Inmunoglobulinas contaminantes	Hasta un 100%	Ninguna en cultivo <i>in vitro</i>
Duración	Hasta que se acaba el suero del animal	Ilimitada, es producido por células tumorales.

miento en torno a 2.000 hibridomas cuando se utilizan 10^8 linfocitos esplénicos y $2,5 \times 10^7$ células mieloides.

3.3. Selección y crecimiento

La suspensión de células resultantes de una fusión somática se siembra en placas de micropozos en medio de selección HAT, que permite sólo el crecimiento de los híbridos. Dentro de los 10 a 14 días siguientes, los clones alcanzan un tamaño suficiente -visible a simple vista- para iniciar la selección primaria de los hibridomas de interés. Debido al escaso volumen de medio de las placas de micropozos y a la activa proliferación de los híbridos -con un ciclo celular de alrededor de 10 horas- la selección debe hacerse con una técnica sencilla y rápida para expandirlos a un mayor volumen de medio; de este modo, se asegura que continúen su crecimiento y también se dispone de mayor cantidad de medio de cultivo

enriquecido en el anticuerpo de interés, para determinar sus propiedades.

Para realizar la selección primaria de los hibridomas las técnicas más utilizadas son los ensayos tipo ELISA, ya sea directos, de captura o de competencia. En nuestra experiencia, se debe tener especial cuidado al elegir la técnica para realizar la selección primaria de los hibridomas, porque si ésta no es la adecuada se pierde tiempo, esfuerzo y recursos. A modo de ejemplo. Si se quiere obtener anticuerpos de alta afinidad (sobre 10^8 M^{-1}), lo más aconsejable será la selección por ELISA o RIA y no por aglutinación, en que la avidez de un anticuerpo prima por sobre su afinidad.

Actualmente, existen herramientas más poderosas y sensibles para seleccionar los hibridomas secretores de anticuerpos de interés, como por ejemplo se puede utilizar un equipo separador de células activado por fluorescencia (FACS). En este caso, el antígeno marcado con un fluorocromo se agrega a las células fusionadas y aquellas que ex-



presen en su superficie el anticuerpo blanco pueden ser separadas desde la mezcla de células resultantes de la fusión.

Para un buen crecimiento de los hibridomas los factores más críticos son la calidad del medio de cultivo -que debe ser rico en glucosa, porque los híbridomas utilizan la vía glicolítica como fuente de energía- y la del suero fetal de bovino, que se agrega descomplementado. Es aconsejable probar los sueros antes de realizar una fusión. Con este propósito se utiliza el procedimiento conocido como eficiencia de clonación, que consiste en sembrar mediante dilución límite células mieloides y determinar la capacidad del suero de sustentar el crecimiento de las células en las diluciones mayores (1 a 0,1 células /pozo). Para asegurar un mejor crecimiento de los hibridomas, el medio de cultivo se puede enriquecer con una suspensión de células de bazo de un animal histocompatible no inmune, las que prácticamente no crecen, pero aportan al medio factores de crecimiento, interleuquinas e intermediarios metabólicos.

3.4. Subclonación y congelación

Una vez que se tiene un hibridoma de interés, se debe proceder rápidamente a su reclonación por dilución límite para asegurar la monoespecificidad de la línea celular, puesto que es probable que al sembrar la suspensión de células resultantes de la fusión, caiga por azar más de un híbrido por pozo. Si un híbrido secretor de anticuerpos está mezclado con uno no secretor y de mayor tasa de proliferación, se perderá en el tiempo el hibridoma secretor y por lo tanto, se perderá el anticuerpo monoclonal.

Para asegurar la preservación de una línea de hibridomas, es importante congelar inóculos de células representativos de cada una de las etapas de su crecimiento, esto es, células parentales (pre-subclonamiento) y de los reclones. Con este propósito, se preparan inóculos con una concentración de células totales en torno a 1 ó 2 millones, en presencia de una mezcla crioprotectora, siendo óptima la mezcla compuesta por un 10% de DMSO y un 90% de suero fetal de bovino. Las células así tratadas se mantienen indefinidamente en estanques con N₂ líquido.

3.5. Cultivo masivo

Los hibridomas pueden ser cultivados *in vivo*,

en la cavidad peritoneal de ratones histocompatibles o irradiados, previamente tratados con aceite mineral para inducir la formación de plasmacitomas. En estas condiciones, se alcanzan concentraciones de anticuerpo de hasta 20 mg/ml a diferencia de un sobrenadante de cultivo *in vitro*, en que se obtienen concentraciones entre 20 y 50 µg/ml. Si se precisa aumentar la concentración de anticuerpos obtenidos *in vitro*, los hibridomas deben crecer en biorreactores, los cuales pueden ser del tipo de los fermentadores, en que las células se crecen en suspensión con agitación -individuales o formando acúmulos, encapsuladas en microesferas- o sistemas en que son empacadas e inmovilizadas en columnas de fibra hueca de material semipermeable.

4. ANTICUERPOS MONOCLONALES VERSUS ANTICUERPOS POLICLONALES

En la tabla 44-2 se presenta una comparación de algunas características de los anticuerpos monoclonales con respecto a los antisueros convencionales -también denominados anticuerpos policlonales- y a continuación se comenta los aspectos más destacables.

4.1. Especificidad

Un anticuerpo monoclonal, por su naturaleza monoespecífica, es capaz de interactuar con un solo epítipo de un antígeno; en cambio, un antisuero convencional, debido a su naturaleza policlonal, contiene no sólo anticuerpos que pueden interactuar con varios epítipos de un antígeno, sino que también, contiene una familia de anticuerpos que difieren en estructura, afinidad y avidéz, los que compiten por unirse a cada epítipo del antígeno, como se ilustra en la figura 44-3. Además, no se puede dejar de mencionar que en los sueros convencionales también están presentes los anticuerpos que constituyen la inmunidad humoral natural del animal del cual se obtuvo. Por lo tanto, es posible que se produzcan reacciones cruzadas de los anticuerpos, difíciles de eliminar, cuando se trata de antígenos similares que comparten numerosos epítipos o cuando se trata de antígenos diferentes con un epítipo en común, o muy similar. Este problema puede evitarse con el uso de anticuerpos monoclonales seleccionados por su capacidad de unirse a un epítipo exclusivo de un antígeno. Un ejemplo de esta exquisita es-

Tabla 44-2. Líneas celulares inmortales usadas como parentales para constituir hibridomas

Especie	Línea celular	Fenotipo Celular	Expresión de Ig
Ratón	X653	Mieloma	No
	NS0/2	Mieloma	No
	SP2/0	Mieloma	No
	NS1	Mieloma	IgG ₁ (κ)
Rata	Y3-Ag 1.2.3.	Mieloma	κ
	YB2/0	Mieloma	No
Humana	SK007	Mieloma	IgE (λ)
	RH-L4	Linfoblastoide	IgG(κ) no secretor
	GM1500	Linfoblastoide	IgG(κ)
	KR4	Linfoblastoide	IgG ₂ (κ)
Humana/ratón	SHM-D33	Mieloma híbrido	IgG ₂ (κ)

pecificidad es el caso de los anticuerpos monoclonales que permiten discriminar entre el grupo sanguíneo A y B de humanos, donde la única diferencia en el trisacárido que constituye el determinante antigénico de cada grupo está constituida por un azúcar, N-acetilgalactosamina y Galactosa, respectivamente.

Sin embargo, existen algunos casos en que la especificidad de los anticuerpos monoclonales puede ser cuestionada, por presentar reacciones cruzadas mayores que las observadas con un antisuero convencional, lo que enfatiza la importancia de los procedimientos de selección y caracterización de los anticuerpos monoclonales. Es

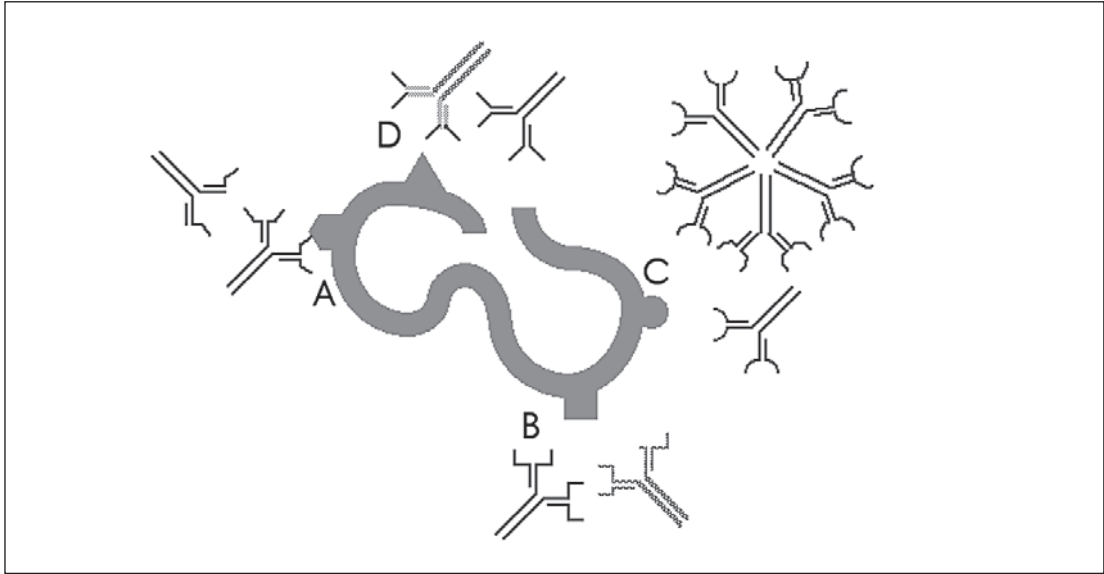


Figura 44-3. Heterogeneidad de anticuerpos presentes en el antisuero de un mamífero. El antígeno esquematizado tiene los epítopos A, B, C y D. En el epítipo A se pueden unir dos anticuerpos de la misma clase pero de diferente especificidad y afinidad. En el epítipo B se pueden unir dos anticuerpos de diferente clase, especificidad y afinidad. En el epítipo C se pueden unir dos anticuerpos de diferente clase pero de la misma afinidad y especificidad y, en el epítipo D, se pueden unir dos anticuerpos de diferente clase pero de la misma especificidad y afinidad.



posible que un anticuerpo muestre reacción cruzada con un epítopo presente en un antígeno que no fue considerado al realizar los estudios de especificidad de dicho anticuerpo. Por ejemplo, en el caso de dos glicoproteínas que comparten una secuencia oligosacárida; si el anticuerpo monoclonal reconoce esta región, es posible observar un 100% de reacción cruzada; en cambio, con el antisuero convencional, que contiene anticuerpos dirigidos contra los epítopos no comunes de ambas glicoproteínas, la reactividad cruzada será menor.

También es posible que un anticuerpo monoclonal totalmente específico con un antígeno en un tipo de ensayo dado, muestre reactividad cruzada con otro al ser utilizado en otro tipo de ensayo, especialmente si la sensibilidad de las técnicas es diferente. Un ejemplo de este fenómeno se observa en algunos anticuerpos monoclonales dirigidos contra la hormona Gonadotropina Coriónica humana (hCG), compuesta por dos subunidades: α y β . En ensayos de aglutinación indirectos, cuando se hace reaccionar a estos anticuerpos con partículas de látex recubiertas con hCG, se produce una reacción de aglutinación altamente específica, ya que, aunque se agreguen elevadas concentraciones de hormona Luteinizante humana (hLH) que comparte la subunidad α con hCG, no se observa inhibición de la aglutinación, pero sí se observa al agregar las mismas concentraciones de hCG. Sin embargo, los mismos anticuerpos se unen a ambas hormonas en ensayos tipo ELISA directo.

4.2. Aidez y Afinidad

La aidez y afinidad de un antisuero es una propiedad promedio del conjunto de anticuerpos específicos que lo componen, sin embargo, los anticuerpos monoclonales responden a las características de un único componente, cuya aidez y afinidad dependerá del grado de inmunización del animal de experimentación utilizado como fuente de linfocitos B y del método de selección utilizado durante su preparación. Un ejemplo ilustrativo de esta información se encuentra en el desarrollo de anticuerpos monoclonales para tipificar grupos sanguíneos humanos mediante aglutinación. Los anticuerpos aglutinantes por excelencia, son los que se producen masivamente en la respuesta primaria contra un antígeno y que corresponden a la clase IgM, cuyas características fundamentales son su gran tamaño y gran aidez. Pues bien, sólo

se logra un número significativo de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales de tipo IgM cuando se realizan protocolos de inmunización cortos, sin estimulaciones reiteradas con el antígeno para evitar una maduración de la respuesta hacia IgG. En cuanto a la selección, si se desea anticuerpos aglutinantes, la selección por ELISA no será apropiada porque el antígeno se presenta en otra configuración, lo que se demuestra al constatar que la mayoría de los anticuerpos seleccionados por ELISA no presentan características aglutinantes.

Finalmente, se pueden preparar mezclas de dos o más monoclonales de especificidad conocida, lo que se denomina reactivo oligoclonal. En ellas es posible combinar y potenciar las características individuales de aidez y afinidad de cada uno de los anticuerpos monoclonales que la componen.

5. APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

5.1. Investigación básica

La metodología de hibridomas ha sido una herramienta insustituible para el avance científico-tecnológico en el campo de la Biología, básicamente por su alto grado de especificidad y porque al aislar varios anticuerpos monoclonales específicos para diferentes epítopos de un antígeno, se puede conocer la estructura y función de diferentes partes de una molécula o tipos celulares. Por ejemplo, se han usado en la purificación y caracterización de receptores de hormonas y factores de crecimiento, con sus respectivos ligandos; en el estudio de vías metabólicas y las enzimas involucradas; en el estudio de la estructura y función de numerosas proteínas; en el conocimiento de la organización del citoesqueleto y de la matriz extracelular; en el desarrollo embrionario de diversos organismos, permitiendo identificar antígenos de diferenciación; en la clasificación y caracterización de numerosas bacterias y sus toxinas; en la caracterización de proteínas de virus que infectan humanos; y así, la lista podría extenderse largamente.

Sin embargo, uno de los campos de la biología donde los hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales han tenido mayor impacto ha sido en el estudio del sistema inmune al permitir, por ejemplo, conocer los mecanismos genéticos



involucrados en la generación de la diversidad de los anticuerpos, en la caracterización del microambiente tímico y, especialmente, en el análisis del linaje de las células B y T mediante la identificación de marcadores de superficie específicos. Éstos han permitido reconocer, aislar y cuantificar subpoblaciones celulares, como en el caso de los anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8, además de un conjunto de otros marcadores. Es importante mencionar también, el desarrollo de numerosos anticuerpos monoclonales específicos contra moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad de clases I y II.

Entre los aspectos de activa investigación con los anticuerpos monoclonales, se encuentra su uso en la construcción de biosensores y también la posibilidad de utilizarlos como enzimas, de ahí su denominación como anticuerpos catalíticos. Se han producido anticuerpos monoclonales específicos de haptenos, que tienen capacidad catalítica en ciertas reacciones que son caracterizadas por estados de transición semejantes a las formas estables del hapteno, tanto por su geometría molecular como carácter electrónico. Este tipo de anticuerpos tienen un potencial ilimitado de aplicación en química y biomedicina. Por ejemplo, ellos podrían proteger células normales de quimiotoxicidad o activar pro-drogas en el sitio blanco.

5.2. Medicina

Los anticuerpos monoclonales han permitido un espectacular avance en la medicina a través del conocimiento de los mecanismos moleculares de numerosas patologías. Poco después de su creación, los anticuerpos monoclonales murinos fueron utilizados en el diagnóstico clínico en humanos, en aspectos como la determinación de hormonas, enzimas, antígenos de grupos sanguíneos y de histocompatibilidad, monitoreo de drogas terapéuticas, antígenos relacionados con enfermedades infecciosas y también en la identificación de marcadores tumorales, entre otros.

Por las propiedades de los anticuerpos monoclonales, muy pronto se visualizaron las posibles aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos monoclonales, que se pueden resumir básicamente en:

a) Anticuerpos monoclonales inmunosupresivos, para el tratamiento de enfermedades autoinmunes

y para la prevención del rechazo de trasplantes. Entre esta familia de anticuerpos, se destaca el anticuerpo anti-CD3 denominado OKT3, que ha sido extensamente utilizado en pacientes trasplantados y que fue uno de los primeros anticuerpos de ratón “humanizado” por las razones que explicaremos más adelante en este capítulo. Más recientemente, se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal murino, denominado anti-Tac, contra un receptor particular de Il-2, Il-2R α . Este receptor no se encuentra en células normales, se expresa en una población de células T envueltas en rechazo de trasplantes, en células T que median enfermedades autoinmunes y también, en ciertas leucemias y linfomas producidos por el retrovirus HTVL-I. El monoclonal anti-Tac ha sido humanizado (Hu-anti-Tac), siendo utilizado exitosamente en la inmunoterapia de algunas leucemias adultas muy agresivas producidas por el virus HTVL-1. Se postula que el anticuerpo previene la interacción de Il-2 con Il-2R α +llevando a una privación de la citoquina que induce a la muerte de la célula tumoral por apoptosis.

b) Anticuerpos monoclonales para el tratamiento de infecciones bacterianas, que inhiben la acumulación de neutrófilos y así se reduce el daño tisular, por ejemplo, en la meningitis y la injuria por reperfusión del miocardio. Recientemente, se han patentado anticuerpos para la prevención de la infección respiratoria producida por el virus sincitial y también para prevenir la infección por citomegalovirus en trasplantados renales.

c) Anticuerpos monoclonales para el tratamiento del cáncer, dirigidos contra antígenos tumorales específicos. Por ejemplo, en el caso del antígeno c-erb B-2 (también conocido como HER-2/*neu*) sobre-expresado en ciertos carcinomas gástricos, pulmonares, mamarios y de próstata, se ha desarrollado un anticuerpo humanizado que contiene las regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo monoclonal murino que se une a Her-2/*neu*, mejorando significativamente la eficacia de la quimioterapia con Taxol y Doxorubicina

d) Anticuerpos que se pueden utilizar en la forma inmunotoxinas, es decir, anticuerpos a los cuales se les adiciona potentes toxinas de plantas o bacterias -como la Ricina, presente en *Ricinus communis* y *Abrus precatorius* o la exotoxina



diférica de *Coynebacterium diphtheriae*-- para que destruyan selectivamente las células que expresan dichos antígenos.

e) Monoclonales como sondas para la localización de tumores y metástasis cuando se les acopla radioisótopos de corta vida media, permitiendo una evaluación dosimétrica precisa de la radioterapia.

5.3. Biotecnología

La incorporación de la tecnología de hibridomas a la investigación, desarrollo y fabricación de vacunas y especialmente de reactivos de inmunodiagnóstico -clásicamente preparados con sueros convencionales- produjo una gran revolución, al simplificar enormemente los procedimientos de producción y control de calidad, ya que las propiedades de un anticuerpo monoclonal no cambian en el tiempo; además, porque han permitido desarrollar test de diagnóstico de mayor especificidad. Por otra parte, su incorporación en numerosos procesos productivos de la industria farmacéutica, alimenticia y petroquímica, entre otras, han simplificado y rebajado los costos de procesos conducentes a la purificación de nume-

rosas moléculas de interés, con la ventaja de un mejor rendimiento: a diferencia de muchos procesos químicos de purificación, los antígenos separados mediante columnas de afinidad con anticuerpos monoclonales mantienen mejor su actividad.

6. OTROS TIPOS DE HIBRIDOMAS

6.1. Heterohibridomas

Al fusionar un hibridoma secretor de anticuerpos contra un antígeno, con otro hibridoma o con linfocitos B de un animal inmunizado contra otro antígeno, se obtiene un heterohibridoma que secreta anticuerpos bifuncionales, capaces de interactuar con dos antígenos diferentes, como se ilustra en la figura 44-4. Este procedimiento fue aplicado pioneramente por Cuello y Milstein para preparar un anticuerpo que se unía a Peroxidasa y a Somatostatina y se utilizó para la detección inmunohistoquímica de Somatostatina. Se preparó fusionando un hibridoma de ratón productor de un monoclonal anti-peroxidasa y linfocitos esplénicos de una rata inmunizada con Somatostatina acoplada a Tiroglobulina.

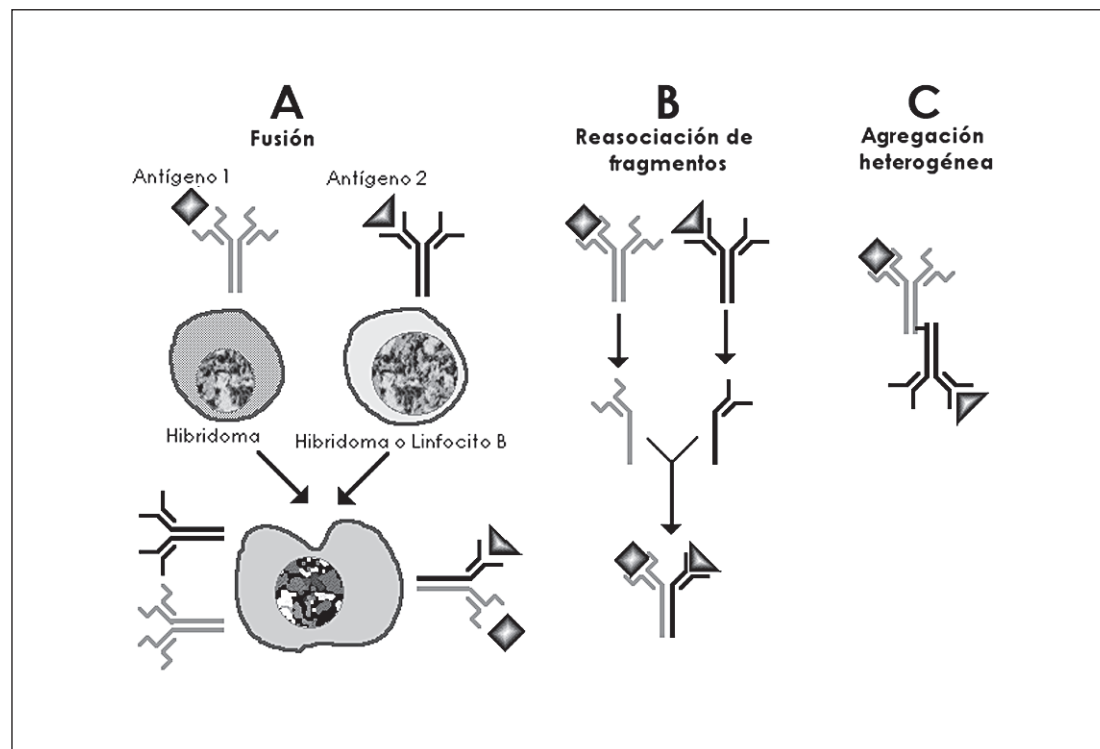


Figura 44-4. Producción de anticuerpos bifuncionales. A: Fusión de dos hibridomas o de un hibridoma y un linfocito B. B: Reasociación química de fragmentos de anticuerpos diferentes. C: agregación química de anticuerpos completos.



Los anticuerpos bifuncionales se pueden producir también por reasociación química de fragmentos monovalentes de anticuerpos, con una desventaja, es muy difícil disociar cadenas de inmunoglobulinas sin provocar algún grado de desnaturación, con la consiguiente pérdida de actividad del anticuerpo. Sin embargo, un método alternativo para evitar estos problemas, consiste en acoplar anticuerpos completos, como se muestra en la figura 44-4.

6.2. Hibridomas humanos

Las principales razones que impulsaron el desarrollo de los hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales humanos fueron las siguientes: En primer lugar, los anticuerpos murinos no son compatibles con los humanos y por lo tanto, inducen una xenosensibilización en los pacientes: estos producen, por una parte, anticuerpos anti-idiotípicos que disminuyen la eficiencia terapéutica del anticuerpo monoclonal, al neutralizar el sitio de combinación con el antígeno; por otra parte, también producen anticuerpos anti-isotipo, los cuales aparentemente neutralizan y eliminan de la circulación los anticuerpos terapéuticos, especialmente en el caso de las IgG. En segundo lugar, para algunos antígenos humanos los ratones no tienen repertorio, lo que provoca la ausencia de respuesta inmune humoral o la producción de anticuerpos de muy baja afinidad. Tal es el caso de los antígenos del sistema Rh de grupo sanguíneo humano. En tercer lugar, la necesidad de substituir o reforzar las fracciones globulínicas de uso terapéutico rutinario, especialmente debido a la posible contaminación de las preparaciones convencionales de anticuerpos humanos con virus como el del SIDA y de la Hepatitis B y C. Finalmente, los anticuerpos monoclonales humanos permitirán conocer las particularidades de la respuesta inmune humana y ciertos aspectos de la estructura antigénica no percibidos por otros animales.

Aunque el problema de la xenosensibilización se controla en parte con drogas inmunosupresivas, la aproximación radical a este problema surgió gracias al avance de la ingeniería genética y a las técnicas de biología molecular, puesto que la producción de hibridomas humanos presenta serios problemas, entre los que se debe destacar: 1. La fuente de células B; a diferencia de los ratones, los humanos no pueden ser inmunizados repetidamente con un antígeno, por lo tanto, los hibridomas humanos se preparan con

linfocitos B periféricos o drenados desde los nódulos linfáticos. 2. La inmunización de humanos con la mayoría de los antígenos no es éticamente posible. 3. Las líneas mieloides humanas no son tan estables como las de ratón. Muchas de ellas no son verdaderos mielomas y carecen de suficiente retículo endoplásmico, mitocondrias y aparato de Golgi para una alta producción y secreción de anticuerpos.

Frente a todos los problemas señalados anteriormente, la estrategia básica de la ingeniería genética ha consistido en rediseñar las partes inmunogénicas de la molécula de anticuerpo y actualmente, ha llevado a la construcción de los diversos tipos de anticuerpos que se muestran en la figura 44-5. Éstos son: Los anticuerpos de tipo quimérico, en los cuales la región variable de ratón es combinada genéticamente con una región constante humana para conservar las funciones efectoras del anticuerpo; los anticuerpos de ratón humanizados, en que se trasplantan las regiones responsables del reconocimiento antigénico del ratón (regiones CDR) en un anticuerpo humano; los anticuerpos con funciones adicionales no inmunes, a los cuales se les puede acoplar una droga o una toxina y, finalmente, los fragmentos Fv en que las regiones variables de la cadena liviana y pesada del anticuerpo -que conforman el sitio activo del anticuerpo- son producidas en bacterias y posteriormente se unen mediante una molécula ligadora sintética, para mantener la conformación de la región de reconocimiento antigénico. Estos anticuerpos, son potencialmente los menos inmunogénicos y, por su pequeño tamaño, tienen la capacidad de penetrar los tejidos del cuerpo que normalmente son restrictivos para moléculas de mayor tamaño.

Otra forma de producir anticuerpos monoclonales alternativa a los hibridomas, es mediante genotecas de expresión en fagos filamentosos -denominados anticuerpos coliclonales- como se ilustra en la figura 44-6. Se preparan a partir de una genoteca de expresión de mRNA de bazo de animales normales o inmunes. Utilizando partidores específicos, se obtiene el cDNA correspondiente a las regiones variables (Fv) de los anticuerpos representados en el mRNA esplénico, los que son ligados a un cosmidio que contiene la información genética del fago filamentosos y permite la expresión de la información genética para las regiones variables de una cadena liviana y una pesada insertadas aleatoriamente. Una vez generados los cosmidios, se reconstituyen las partícu-

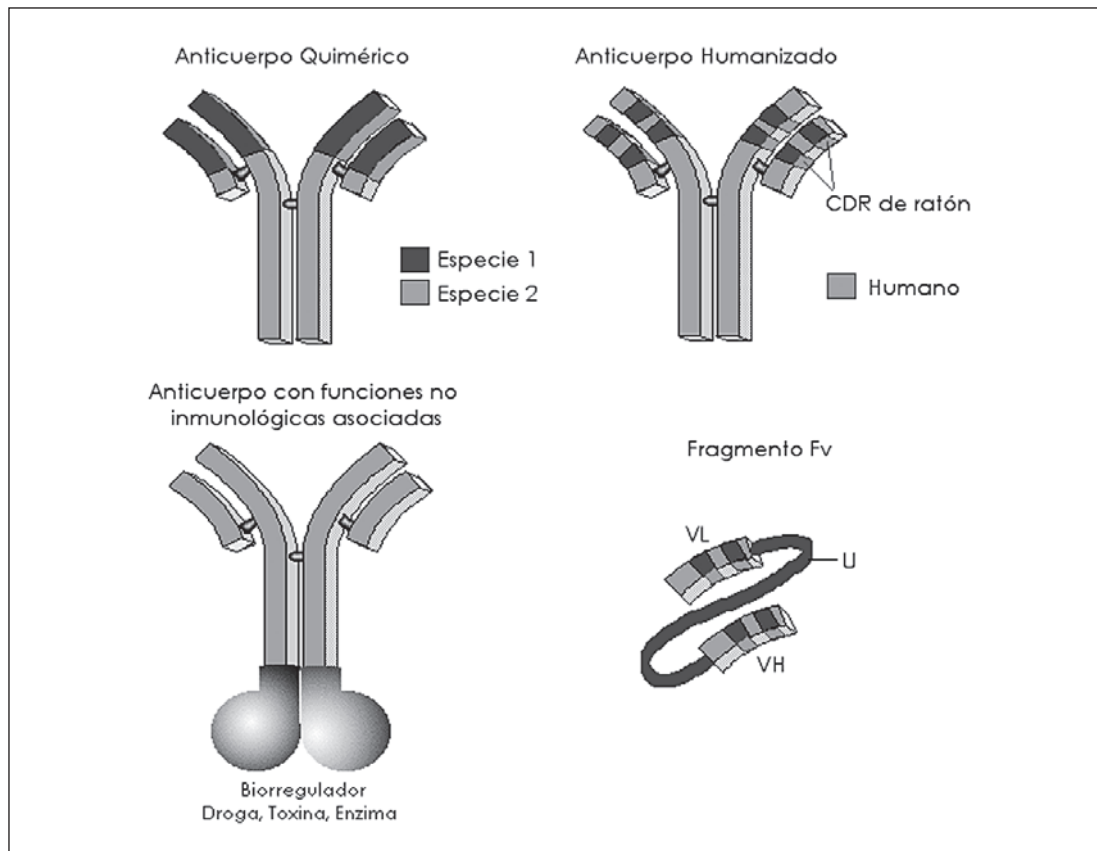


Figura 44-5. Tipos de anticuerpos construidos mediante ingeniería genética. **A:** Anticuerpo quimérico, contiene las regiones variables de ratón y las regiones constantes de humano. **B:** Anticuerpo humanizado, se han reemplazado las secuencias génicas que codifican para las regiones que unen antígeno (CDR) de un anticuerpo humano, por las regiones CDR de un anticuerpo de ratón. **C:** Anticuerpo con funciones adicionales no inmunes, en el cual los dominios CH2 y CH3 de la región constante se han substituido por un gen no relacionado con inmunoglobulinas, que puede ser una droga o toxina. **D:** Fragmento Fv de un anticuerpo producido por la transformación de bacterias con un plasmidio que contiene los genes de las regiones variables de la cadena liviana y pesada (VL y VP) en tándem, separadas por una secuencia codificadora de una molécula ligadora flexible (U), que le permite la formación adecuada del sitio de combinación con el antígeno y le confiere mayor flexibilidad al fragmento.

las virales para su posterior amplificación en bacterias. Los fagos recombinantes expresan en su superficie en forma funcional los fragmentos Fv y de esta manera, es posible seleccionar en forma rápida y eficiente las especificidades presentes en la genoteca. Además, con esta tecnología es posible disponer de las regiones del DNA que codifica para las partes variables de los anticuerpos presentes en la genoteca, lo que permite reinsertar los genes que codifican para las partes variables de los coliclonales seleccionados en plasmidios que expresan las regiones constantes de cualquier clase de anticuerpo.

La metodología señalada anteriormente, a diferencia de la preparación de hibridomas tradicionales, puede ser aplicada a cualquier especie animal

con el solo requisito de disponer de los partidores adecuados. Sin embargo, una limitante importante de este procedimiento es que en la genoteca de expresión no ocurre el proceso de hipermutación somática que ocurre naturalmente en los animales después de una inmunización y que contribuye al aumento de la afinidad de los anticuerpos en la respuesta inmune humoral secundaria. Este problema puede ser solucionado utilizando para construir la genoteca mRNA de animales hiperinmunizados. Actualmente, se investiga activamente en los mecanismos involucrados en la hipermutación somática de los genes de inmunoglobulinas, con el propósito de reproducir este proceso a nivel de las genotecas de expresión para lograr la maduración de la afinidad de los anticuerpos *in vitro*.

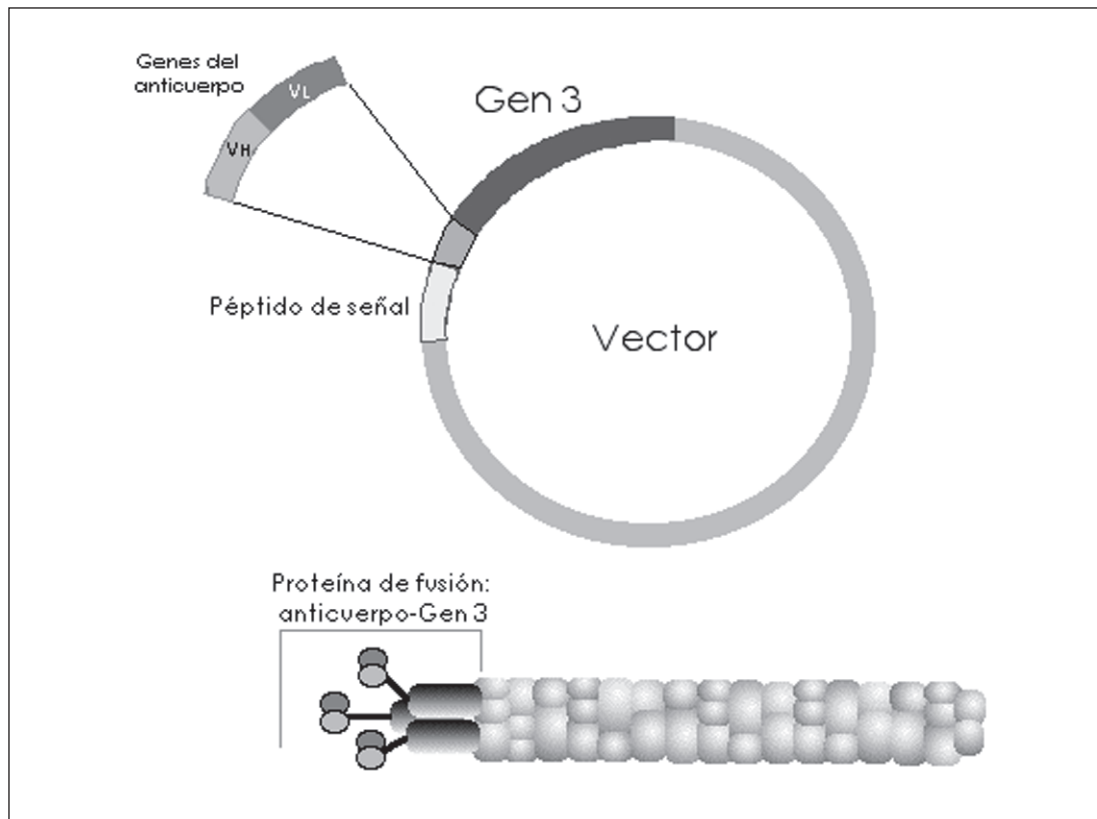


Figura 44-6. Anticuerpos monoclonales preparados en bacterias. En la parte superior de la figura se muestra un elemento representativo de la genoteca recombinante: el vector, que corresponde a la partícula del bacteriofago filamentosos conteniendo una molécula de DNA circular de simple hebra con información para las proteínas estructurales del fago y sus elementos de regulación. En un extremo de la partícula, se encuentran clonadas copias de la proteína menor de la cubierta del fago, codificada por el gen 3' y en su extremo 5' han sido insertados los genes que codifican para las regiones variables del anticuerpo (V_H y V_L). De esta forma, la secuencia señal natural del gen 3 es retenida y por lo tanto, la proteína de fusión madura tiene el dominio N-terminal del anticuerpo seguido por la proteína completa del gen 3. Esta proteína de fusión es ensamblada en la partícula del fago, el cual presenta los fragmentos de anticuerpo sobre su superficie, de la forma que se muestra en el esquema inferior de la figura. Los anticuerpos pueden ser expresados en la forma de cadenas simples (Fvs) en que V_H y V_L se unen vía un péptido ligador flexible o como Fabs, uniendo ya sea V_H - C_H1 o la cadena liviana al gen 3 y expresando la cadena parental en forma soluble. Los anticuerpos expresados de esta forma, mantienen las características de unión del anticuerpo original y debido a la exposición del sitio de unión hacia el medio, permiten su selección por cromatografía de afinidad con el antígeno de interés.

LECTURAS SUGERIDAS

Bach, J.B.; Fracchia, G.N.; Chatenoud, L. "Safety and efficacy of therapeutic monoclonal antibodies in clinical therapy", *Immunology Today* 14: 421 – 425, 1993.

Becker, M.I.; Juica, F.; Jamett, S.; Tzichinovsky, S.; Barros, S.; De Ioannes, A.E., "Development of anti-human B blood group monoclonal antibodies suitable for blood typing reagent", *Hybridoma* 13: 304 – 310, 1994.

Blackburn, G. M.; Kang, A. S.; Kingsbury, G.A.; Burton, D.R., "Catalytic antibodies", *Biochemical Journal* 262: 381 – 390, 1989.

Campbell, A.M., **Monoclonal Antibody Technology. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**, Vol. 13. Editado por R. H. Burdon y P. H. Knippenberg, Elsevier, 1987.

Gavilondo, J.V., "Anticuerpos monoclonales de segunda generación", *Investigación y Ciencia* 169: 72 – 79, 1990.



Köhler, G., Milstein, C., “Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity”, *Nature* 256: 495 – 497, 1975.

Rapley, R., “The biotechnology and applications of antibody engineering”, *Molecular Biotechnology* 3: 139 – 154, 1995.

Sawyer, L.A., “Antibodies for the prevention and treatment of viral diseases”, *Antiviral res.* 47: 57 – 77, 2000

Waldman T.A., “Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy”, *Science* 252: 1657 – 1662, 1991.

Waldman T.A. “Emerging therapies: Spectrum of applications of monoclonal antibody therapy”, *Hematology* 394: 1 –18, 2000.

Wawrzynczak E.J., Derbyshire, E.J., “Immunotoxins: the power and the glory”, *Immunology Today*. 13: 381 – 383, 1992.

Winter G., Milstein C., Man-made antibodies. *Nature* 349: 293 – 299, 1991.

Winter, G., Harris, W.J., “Humanized antibodies”, *Immunology Today* 14: 243 – 246, 1993.

Yelton, D.E., Scharff, M.D., “Monoclonal Antibodies: A powerful new tool in Biology and Medicine. M.D”. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 657 - 680 (1981).





Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica
Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C.,
Mario Rosemblatt S., Ulises Vergara C.
Editorial Universidad de Talca, 2002

Capítulo 45

MÉTODOS FUNDAMENTALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Claudio Vásquez G. y Enrique González V.

- 1. Introducción**
- 2. Bases de la Biología Molecular**
 - 2.1. El DNA es el material genético
 - 2.2. Componentes del DNA
 - 2.3. Estructura del DNA
- 3. Las nuevas tecnologías**
 - 3.1. Endonucleasas de restricción
 - 3.2. Clonamiento del DNA
 - 3.3. Transferencia de “Southern”
 - 3.4. Transformación de células
 - 3.5. Secuenciación de DNA
 - 3.6. Reacción de la polimerasa en cadena
 - 3.7. Animales transgénicos y “knock out” de genes
- 4. La expresión génica en organismos eucarióticos**
 - 4.1. Estructura de los genes eucarióticos
 - 4.2. El proceso de expresión génica y sus etapas
 - 4.3. La expresión diferencial de genes y su regulación
- 5. Métodos de análisis de la expresión génica**
 - 5.1. Hibridación “Northern”
 - 5.2. Reacción de la polimerasa en cadena acoplada a la reacción de la transcriptasa reversa (RT-PCR)
 - 5.3. Análisis del perfil transcripcional mediante el método de “differential display” de mRNAs
 - 5.4. Hibridación sustractiva





RESUMEN

Diffícilmente existe una molécula más importante que el DNA. Ella tiene codificada en su estructura la información hereditaria que determina cómo son, cómo se reproducen y cómo funcionan los organismos vivos. Desde este punto de vista, podemos considerarla la molécula de la vida.

El desarrollo de técnicas de DNA recombinante y su aplicación a la biología, ha traído consigo una revolución de conocimientos que ha hecho que la gente de ciencia se replantee una serie de conceptos acerca del conocimiento que se tiene de los organismos vivos en general. Prácticamente no existen hoy áreas de la biología experimental moderna que no descansen de cierto modo en alguna de estas nuevas tecnologías. Dado que la investigación científica en las ciencias de la vida está sujeta a una dinámica continua, sin duda que este tipo de aproximaciones (y con seguridad otras por desarrollar) ayudarán a entender mejor el enigma del fenómeno vital.

1. INTRODUCCIÓN

Las Ciencias Biológicas han sufrido una verdadera revolución durante las últimas décadas. Esto se ha debido, principalmente, al desarrollo de una serie de metodologías que han permitido una mejor aproximación experimental, para estudiar y comprender los mecanismos y/o estructuras moleculares subyacentes a complejos procesos como el crecimiento, metabolismo, diferenciación y división de la célula. Estas técnicas además han posibilitado manipular y modificar *in vitro* moléculas claves que se encuentran involucradas en dichos procesos. Esto último es importante, pues de este modo se puede correlacionar la estructura y función de estas moléculas al observar los cambios que ocurren en un organismo particular cuando se han reincorporado a él moléculas que han sido alteradas en el tubo de ensayo.

En forma resumida se describirán los métodos fundamentales de la Biología Molecular. Antes se hará una breve reseña de la molécula de DNA.

2. BASES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

Entre los “actores” macromoleculares más importantes de la célula se encuentran los ácidos nucleicos (DNA y RNA) y las proteínas. Ellos son polímeros lineales compuestos por subunidades nucleotídicas y aminoacídicas, respectivamente. Los ácidos nucleicos

codifican la información genética que especifica la estructura primaria de todas las proteínas de un organismo vivo. Desde este punto de vista, la unidad fundamental de información de los organismos vivos es el gen, definido como aquel segmento de DNA que codifica la información necesaria y requerida para producir un producto biológico funcional. Este último puede ser tanto una proteína como una molécula de ácido ribonucleico particular.

Los procesos más importantes que dan cuenta de la utilización de la información genética por parte de la célula, están enmarcados en el llamado “Dogma Central de la Biología Molecular”, el cual resume las rutas generales de flujo de información a través de los complejos procesos celulares de replicación, transcripción y traducción (figura 45-1).

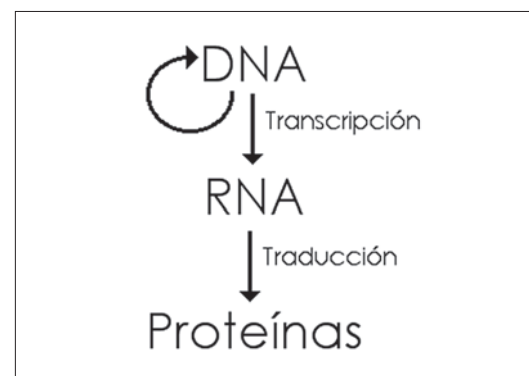


Figura 45-1. El Dogma Central de la Biología Molecular. El DNA se replica obteniéndose una copia idéntica, se transcribe a mRNA y se traduce en una proteína en los ribosomas.

2.1. El DNA es el material genético

Entre las numerosas propiedades de los organismos vivos, hay una que es esencial para la continuación de la vida: un organismo debe ser capaz de replicarse y para hacerlo, debe poseer una descripción completa de sí mismo. Esta descripción es una forma de información, un conjunto de instrucciones que especifican cada paso necesario para que la célula construya una réplica idéntica de sí misma. Como cada generación engendra la siguiente, los descendientes han de recibir una copia del conjunto de instrucciones para que a su vez, puedan replicarse. En una célula, la información necesaria para replicarse se encuentra en el material genético como una macromolécula llamada DNA.

2.2. Componentes del DNA

Este material genético celular, el ácido desoxirribonucleico, es un biopolímero ensambla-

do a partir de 4 desoxirribonucleótidos precursores, los cuales a su vez se encuentran constituidos por una base nitrogenada, un azúcar de 5 átomos de carbono (desoxirribosa) y un grupo fosfato.

Las bases nitrogenadas son compuestos heterocíclicos, planares, que derivan de dos compuestos orgánicos parentales, la purina y la pirimidina. Las bases púricas que se encuentran en el DNA son la adenina y la guanina, mientras que las pirimídicas están representadas por la timina y la citosina (figura 45-2). Las bases se encuentran unidas covalentemente a través de enlaces N-glicosídicos (N1 de las pirimidinas y N9 de las purinas) al carbono 1' de la desoxirribosa. El grupo fosfato entretanto, se encuentra esterificando el carbono 5' del azúcar.

Los desoxirribonucleótidos son así compuestos solubles que, en soluciones acuosas, absorben fuertemente la luz ultravioleta en la región de 260 nm. Es esta propiedad, precisamente, la que es explotada para cuantificar la concentración de ellos

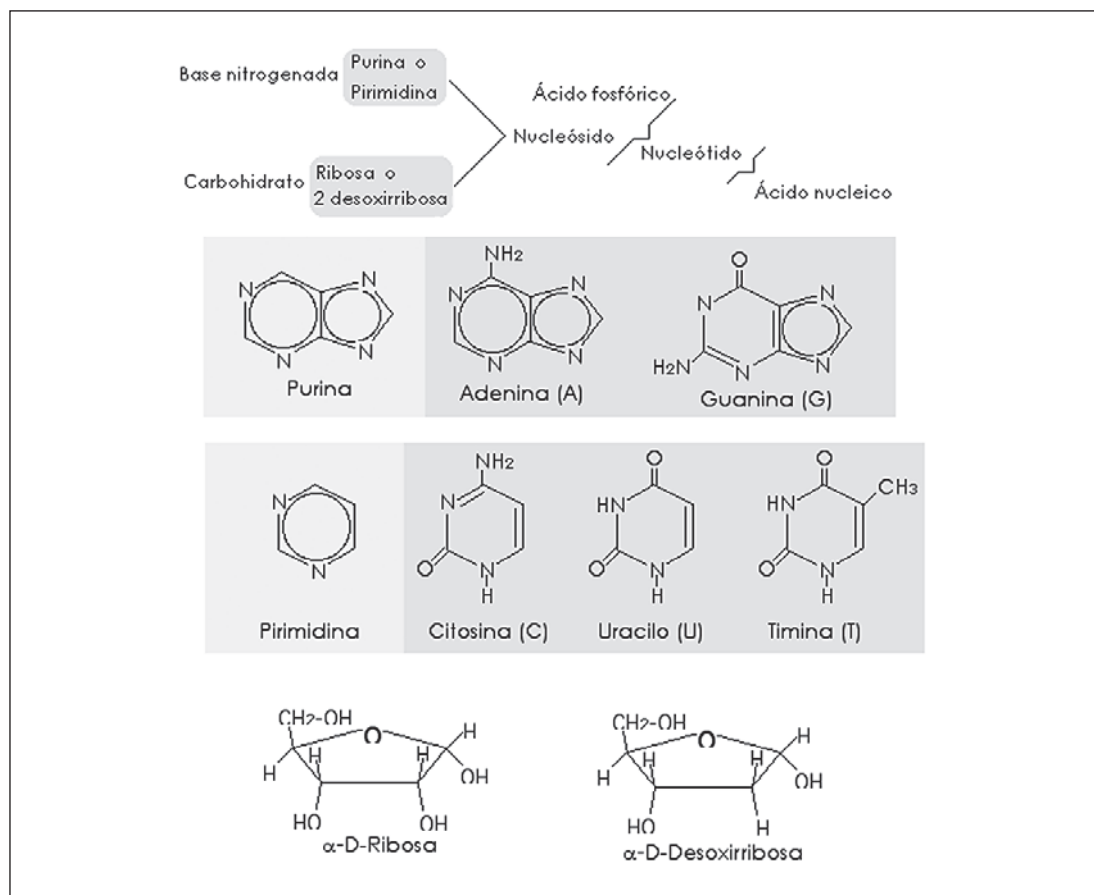


Figura 45-2. Componentes de los ácidos nucleicos. Una base nitrogenada (purina o pirimidina) más un azúcar (ribosa o 2' desoxirribosa) forman un nucleósido, que al unírsele una molécula del ácido fosfórico forma un nucleótido, los cuales estructuran los ácidos nucleicos (DNA y RNA). Se muestran las estructuras de las bases nitrogenadas y azúcares.



(y por ende, de ácidos nucleicos en general) en una fracción de material biológico determinada.

2.3. Estructura del DNA

En la estructura primaria del ácido desoxirribonucleico, los nucleótidos se encuentran enlazados entre sí a través de puentes de grupos fosfato formando largas cadenas. Específicamente, el grupo 5' OH de la desoxirribosa de un residuo está unido al grupo 3' OH del azúcar del nucleótido precedente a través de un enlace fosfodiéster. Todos los enlaces de este tipo en el DNA tienen la misma orientación a lo largo de la cadena, dándole a ésta una polaridad con extremos 5' y 3' bien definidos. Cadenas de estas subunidades de DNA existen como dos hebras asociadas en polaridad opuesta con respecto al esqueleto azúcar-fosfato (antiparalelas), enrolladas una alrededor de la otra formando una estructura de doble hebra o dúplex (figura 45-3).

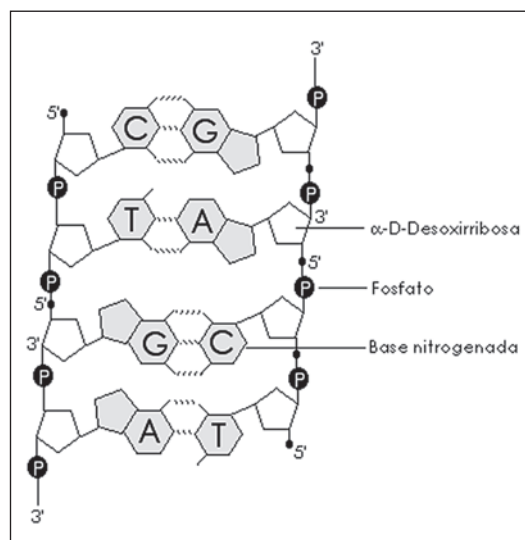


Figura 45-3. Apareamiento específico entre bases complementarias de las hebras antiparalelas del dúplex de DNA. Adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C).

Ambas hebras del dúplex se asocian establemente entre sí, debido al potencial de formación de puentes de hidrógeno entre bases específicas en una hebra con bases definidas en la hebra opuesta o complementaria. La base adenina aparea siempre con timina (2 enlaces de hidrógeno) y guanina siempre lo hace con citosina (3 enlaces de hidrógeno). La fidelidad del correcto apareo de bases está dada por la maquinaria celular encargada de

sintetizar el ácido nucleico en cuestión. Ésta agrega, normalmente, sólo la base correcta, la cual es especificada por la hebra molde durante la elongación de la hebra nueva. Es precisamente la constancia y especificidad de este apareo de bases complementarias lo que constituye la base de la función del DNA como depositario de la información genética.

Una característica crucial de la estructura general del DNA es que ella es independiente de la secuencia particular de los nucleótidos constituyentes, la cual a su vez es importante no sólo en el sentido de la estructura *per se*, sino que ella define la secuencia de aminoácidos que constituye el correspondiente polipéptido. La relación entre la secuencia del DNA y la secuencia de la proteína correspondiente se conoce como código genético.

3. LAS NUEVAS TECNOLOGÍAS

Muchos métodos de amplia utilización en laboratorios de Biología Molecular en general, sacan partido de la relativa simpleza de los sistemas celulares procarióticos como las bacterias. En procariotes, la secuencia lineal de DNA se corresponde directamente con las secuencias lineales del RNA y la proteína. Sin embargo, en eucariotes la información que determina una proteína en el DNA posee a menudo interrupciones (intrones) en la secuencia traducible. El DNA eucariótico es así primero copiado en un transcrito primario (RNA heteronuclear, ARNhn), el cual es procesado en el núcleo por escisión de las secuencias que determinan la proteína (exones). Éstos son unidos linealmente en el RNA maduro, el cual puede seguir siendo procesado antes de ser exportado al citoplasma para su traducción en la proteína correspondiente.

El conocimiento y la comprensión de la estructura, función, regulación y organización de los genes y/o sus productos dentro de la célula, resultan claves para la realización de un estudio serio de un sistema biológico dado. Como punto de partida para ello, el investigador de hoy debe ser capaz de obtener y estudiar un gen determinado en forma aislada *in vitro*.

En este sentido, el desarrollo de técnicas de clonamiento molecular del DNA ha provisto de poderosos mecanismos para aislar segmentos discretos y únicos de DNA desde una población de genes, purificarlos a homogeneidad y amplificar-



los de modo de producir suficiente material para realizar análisis genéticos, químicos y bioquímicos.

3.1. Endonucleasas de restricción

Muchos de los logros de la genética molecular en las últimas décadas se deben al descubrimiento de un tipo especial de enzimas, denominadas endonucleasas de restricción. Estas son enzimas aisladas de bacterias que tienen la habilidad de hidrolizar el ácido desoxirribonucleico en secuencias bien definidas, generando fragmentos discretos de DNA.

Los segmentos de DNA generados por una enzima particular, pueden ser separados en base a sus tamaños relativos por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida, desde donde los fragmentos individuales pueden ser aislados y purificados (figura 45-4). Con los datos obtenidos se puede construir un mapa físico que representa una verdadera "huella digital molecular" del ácido nucleico en cuestión.

3.2. Clonamiento del DNA

En general, el proceso de clonamiento se basa en llevar a cabo determinadas reacciones enzimáticas en el laboratorio, utilizando generalmente enzimas bacterianas específicas y bien ca-

racterizadas para copiar, cortar y unir fragmentos específicos de DNA. Luego de hacer que formen parte de círculos de DNA autorreplicativos (generalmente plasmidios bacterianos o algunos virus), estas moléculas pueden ser introducidas a células vivas mediante la utilización de técnicas relativamente simples de practicar, aun cuando no siempre bien comprendidas. Luego de múltiples ciclos de duplicación celular, las moléculas híbridas pueden ser reaisladas y purificadas, generando cantidades suficientes del material clonado (figura 45-5).

Una vez que se dispone del segmento de DNA aislado y purificado, se puede determinar rápidamente su secuencia nucleotídica, lo cual lleva a la predicción de la secuencia de la proteína codificada. La marcación radiactiva de este fragmento le permite al experimentador buscar copias de secuencias relacionadas en genomas complejos o mRNA entre más de un millón de secuencias no relacionadas. Un ejemplo de ello ha sido el clonamiento, expresión y producción comercial de interleuquinas.

Haciendo ingeniería del DNA clonado se puede permitir su expresión en bacterias o levaduras u otras células eucarióticas, convirtiéndose en fuentes abundantes de grandes cantidades de proteínas puras, las que pueden tener una gran importancia médica y/o económica y que podrían ser difíciles de conseguir por otros medios más tradicionales.

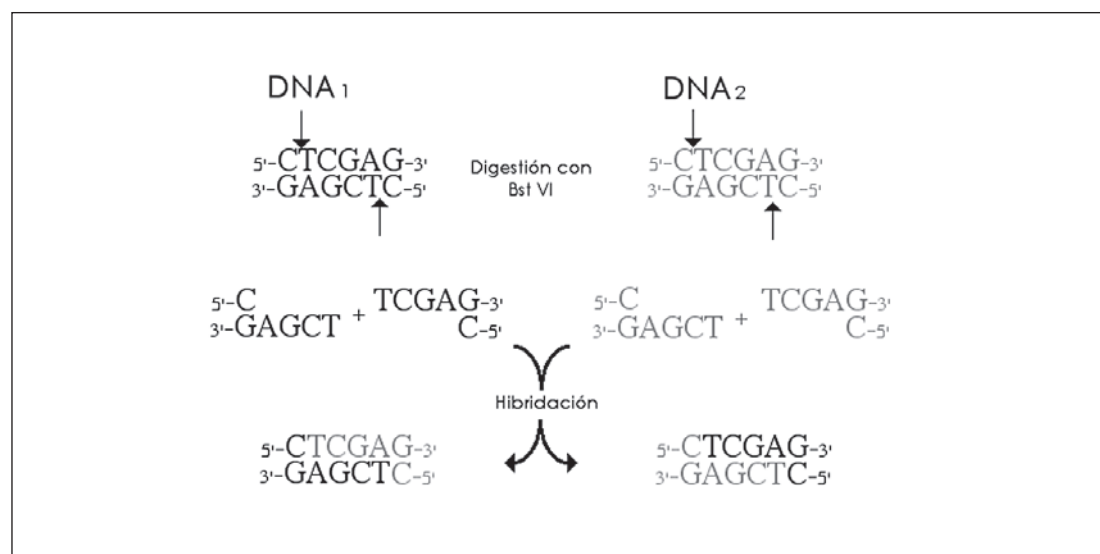


Figura 45-4. Las enzimas de restricción hidrolizan el DNA en secuencias muy específicas. Aquí se muestra el caso de la enzima *Bst* VI, que corta el DNA cada vez que en él está presente la secuencia indicada, generando extremos cohesivos complementarios (a). Esto posibilita la creación de moléculas híbridas de DNA al permitir el apareamiento específico entre diferentes ADNs que han sido previamente tratados con la misma enzima (b).

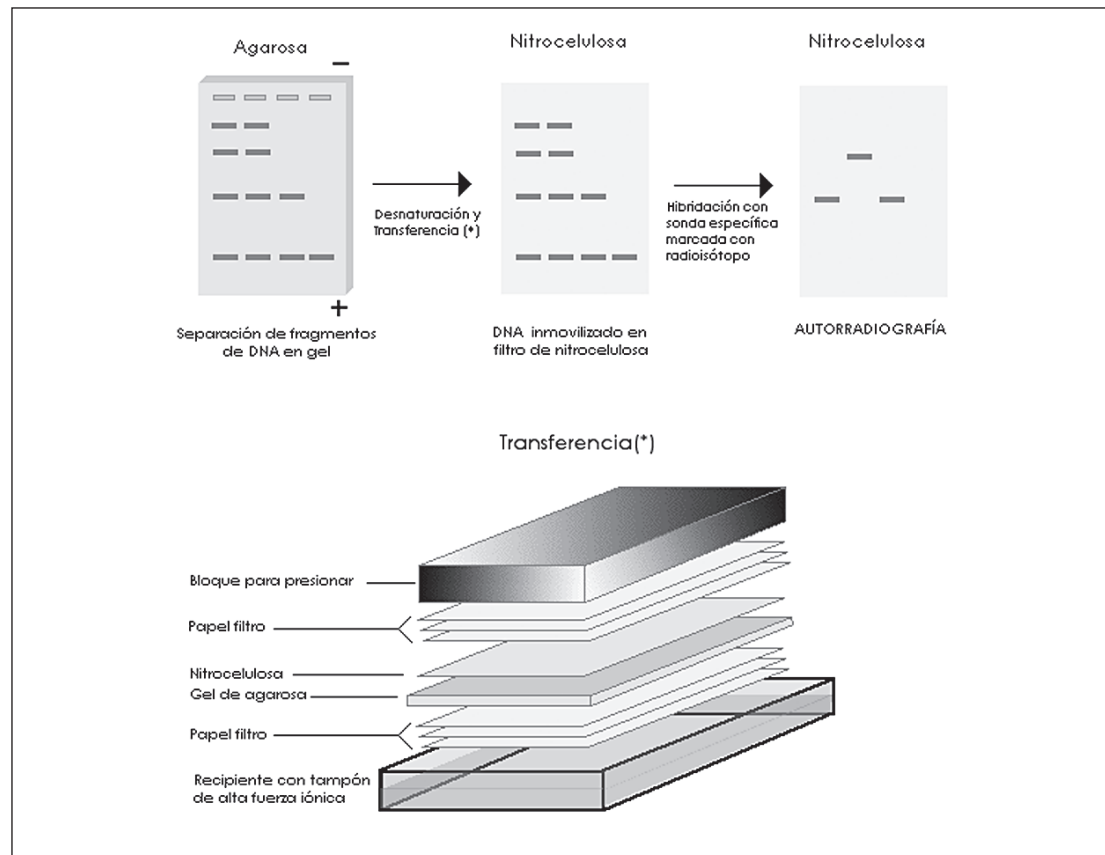


Figura 45-5. Clonamiento del DNA. El DNA a clonar es unido covalentemente a una molécula “portadora” llamada vehículo o vector de clonamiento, la que puede ser un DNA plasmidial o viral. Una vez obtenida la molécula de DNA híbrida, ésta es introducida por transformación a células que han sido preparadas para el efecto, las que luego son presionadas para desarrollarse en un medio que contiene el antibiótico particular. De este modo, sólo aquellas células que hayan incorporado moléculas conteniendo el gen de resistencia (y el DNA clonado) podrán desarrollarse.

También se pueden concebir en el laboratorio versiones alternativas del DNA clonado, ya sea cambiando su estructura y/o secuencia. Estas construcciones pueden ser reintroducidas en células aisladas o en animales vivos para estudiar los resultados de estos cambios (mutaciones) hechos por el hombre y así tratar de entender más cabalmente el complejo fenómeno del funcionamiento y de la regulación de la expresión génica.

3.3. Transferencia de “Southern”

Los fragmentos de DNA que han sido resueltos en un gel de agarosa por ejemplo, pueden ser desnaturados y transferidos a filtros de nitrocelulosa u otro soporte sólido donde quedan inmovilizados. De este modo, mediante la utilización de sondas específicas de DNA marcadas, genes determinados (o partes de

ellos) pueden ser fácilmente identificados (figura 45-6).

3.4. Transformación de células

Moléculas de DNA que han sido manipuladas *in vitro*, pueden ser introducidas de una forma relativamente fácil a células que han sido preparadas para tal efecto. Clásicamente, en el caso de bacterias esto se logra tratando previamente las células con soluciones de cloruro de calcio. En el caso de eucariotes, el mismo efecto se consigue depositando sobre una monocapa de células el DNA a introducir, conjuntamente con sales de fosfato de calcio o mediante el uso de ciertos virus que actúan como vectores.

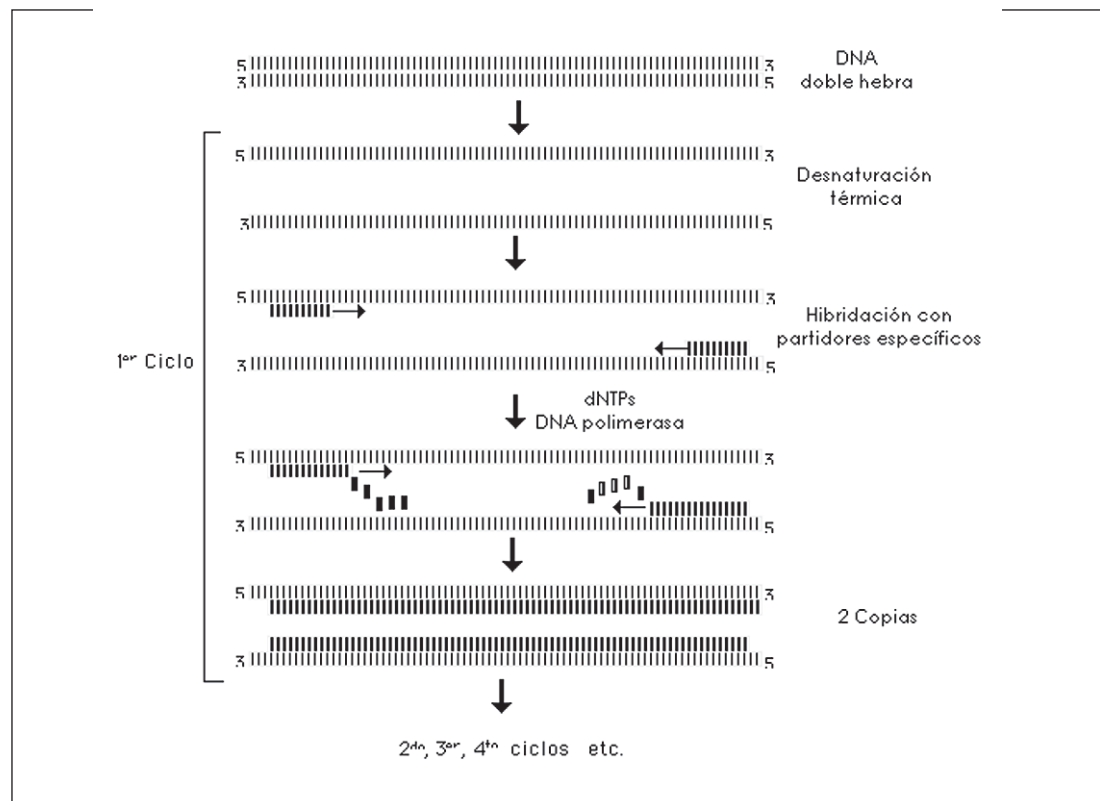


Figura 45-6. Método de transferencia (“blotting”) de “Southern”. Esta metodología permite realizar análisis de hibridación DNA-DNA. Para ello, muestras de DNA de un espécimen dado son hidrolizadas utilizando enzimas de restricción y sometidas a electroforesis en geles de agarosa. Los fragmentos resueltos en el gel son desnaturalados y transferidos a un soporte sólido, usualmente membranas de nitrocelulosa, donde los fragmentos de DNA de una hebra quedan inmovilizados. Mediante el uso de sondas específicas es posible determinar la existencia de secuencias homólogas en el material analizado.

El método ha resultado además una poderosísima herramienta para el análisis de genomas complejos, como el genoma eucariótico. Permite determinar con precisión la existencia y el número de sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción en un gen determinado (los cuales son de mucha utilidad como puntos de referencia moleculares), además del número de copias de éste y otros genes en el genoma. Por otro lado, en combinación con el uso de varias enzimas de restricción, el método de transferencia de “Southern” resulta muy útil para determinar pequeñas variaciones o “polimorfismos” en determinados genes.

3.5. Secuenciación del DNA

La determinación del orden (secuencia) de los desoxirribonucleótidos en la cadena del DNA, resulta de fundamental importancia para conocer detalles íntimos de la estructura y función de esta biomolécula primordial. A partir de ella se puede deducir la existencia de marcos de lectura abiertos en una y otra hebra y por lo tanto, de acuerdo al código genético, la secuencia aminoácida de la(s) proteína(s) codificada(s). También permite determinar dónde empiezan y dónde terminan procesos como la transcripción y traducción, la existencia de intrones, señales de control y procesamiento, etc.

Dos métodos, uno químico (Maxam y Gilbert) y uno enzimático (Sanger) han sido desa-

rollados para alcanzar este objetivo, siendo este último el de mayor aplicación. Aun cuando ambos métodos difieren en su parte operativa, ellos se basan en el mismo principio: la generación de fragmentos discretos de DNA en que cada uno contiene un desoxirribonucleótido más que el anterior.

En el caso particular del método de Sanger, se establecen cuatro mezclas de reacción en que cada una contiene los 4 desoxirribonucleótidos (uno de ellos marcado radiactivamente), el DNA a secuenciar, un iniciador de síntesis específico (partidor o “primer”), una DNA polimerasa, además de un 2'-didesoxirribonucleótido trifosfato por tubo. La presencia de estos últimos causará el término de la elongación de las cadenas prematuramente y al azar, generando segmentos de distin-



tos largos de DNA. Las mezclas obtenidas son posteriormente resueltas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes y analizadas por autorradiografía (figura 45-7).

3.6. Reacción de la polimerasa en cadena

Una de las técnicas más poderosas desarrolladas últimamente es la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), la cual permite amplificar segmentos cortos de DNA genómico. Lo único que se requiere es conocer la secuencia de desoxirribonucleótidos a ambos lados de la región blanco que va a ser amplificada.

Brevemente, el DNA a ser amplificado es

desnaturado térmicamente e hibridado a partidores cortos (20-31 bases) que son complementarios a las hebras del dúplex a ambos lados de la región blanco. Utilizando una DNA polimerasa, se pueden extender las cadenas de DNA partiendo de los extremos 3'OH de cada partidor. Si la enzima utilizada es termoestable, el ciclo completo puede ser repetido una y otra vez, desnaturando por calor los productos de amplificación y permitiendo el apareamiento y reinicio de la síntesis de DNA (figura 45-8). De este modo, una secuencia cualquiera puede ser amplificada más de un millón de veces en unos 25-31 ciclos, lo que constituye una herramienta de elección en el análisis molecular de numerosos procesos biológicos. Manipulando

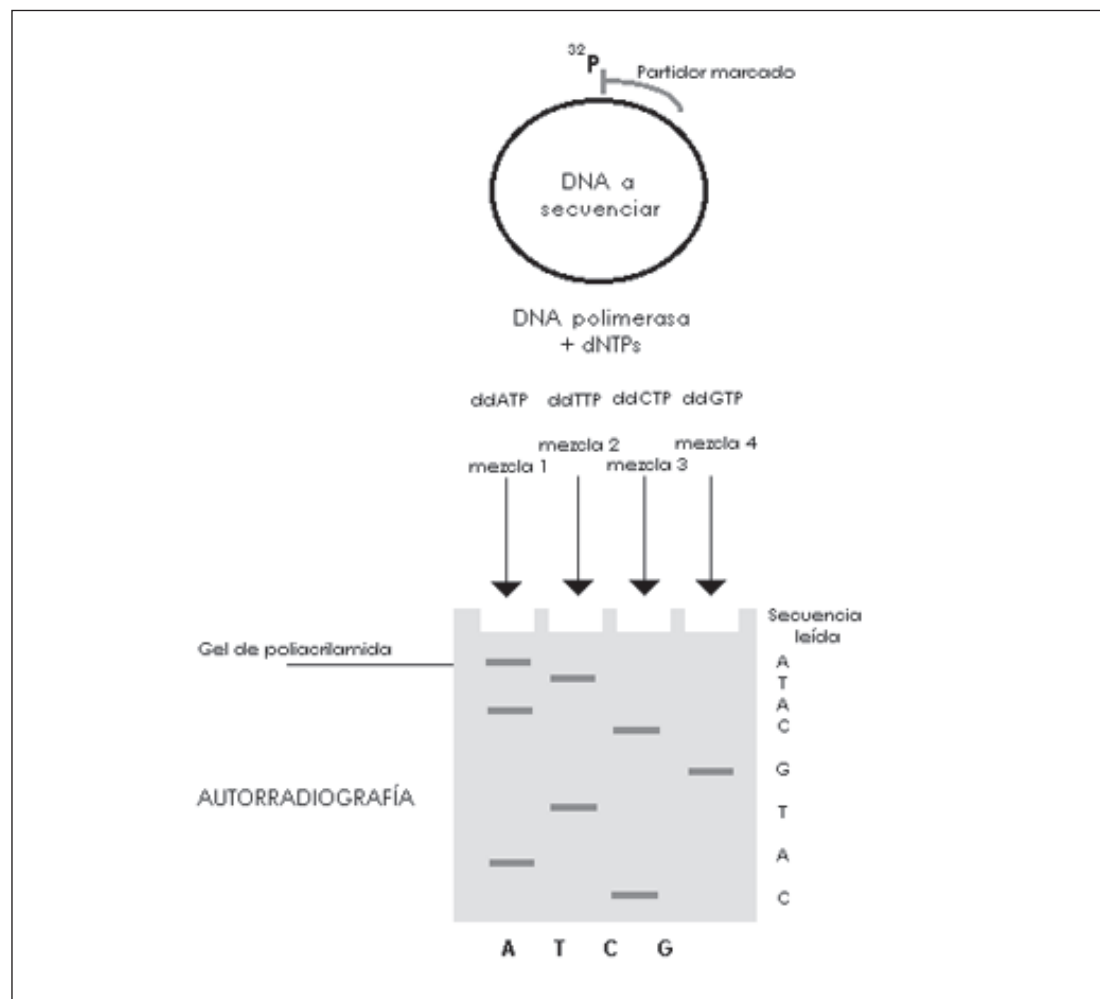


Figura 45-7. Determinación de la secuencia de DNA por el método de los didesoxirribonucleótidos de Sanger. El DNA a secuenciar (generalmente de una hebra) es hibridado a un partidor específico que se encuentra marcado usualmente con ^{32}P en su extremo 5'. Se adiciona una DNA polimerasa capaz de extender las cadenas y la mezcla se distribuye en cuatro tubos que contienen los 4 dNTPs además de uno de los ddNTP por tubo. Una vez finalizada la reacción, las mezclas de fragmentos marcados se resuelven por electroforesis en geles muy delgados de poliacrilamida y la secuencia es finalmente leída del gel luego de la correspondiente autorradiografía.





adecuadamente las condiciones de hibridación de partidores específicos con el templado, el método puede ser utilizado para detectar mutaciones en regiones muy pequeñas y, por lo tanto, resulta adecuado para identificar diferencias de secuencia en posiciones bien definidas del genoma. Una reciente técnica que utiliza estos principios es la hibridación de oligonucleótidos alelo-específica.

3.7. Animales transgénicos y “knock out” de genes

Hoy es posible obtener animales transgénicos introduciendo secuencias nuevas de material hereditario en células de la línea germinal del organismo.

La transferencia de un gen modificado *in vitro*

al genoma de una célula viva, es posible mediante eventos de recombinación de DNA homóloga entre secuencias que residen en el cromosoma y secuencias introducidas a la célula. Si la receptora es una célula troncal derivada del embrión, pluripotencial, se puede transferir un gen modificado específicamente por manipulación en el tubo de ensayo a la línea germinal de un organismo vivo (figura 45-9). Este tipo de células ha sido aislado, a la fecha, de embriones de ratón y de hamster y se investiga sobre la posibilidad de obtenerlas a partir de cerdo, ovejas, vacas, etc. Los animales transgénicos han sido utilizados para un sinnúmero de estudios, como por ejemplo: examinar el efecto de genes que normalmente no se encuentran presentes *in vivo*, para expresar genes normales en células que normalmente no los expresan,

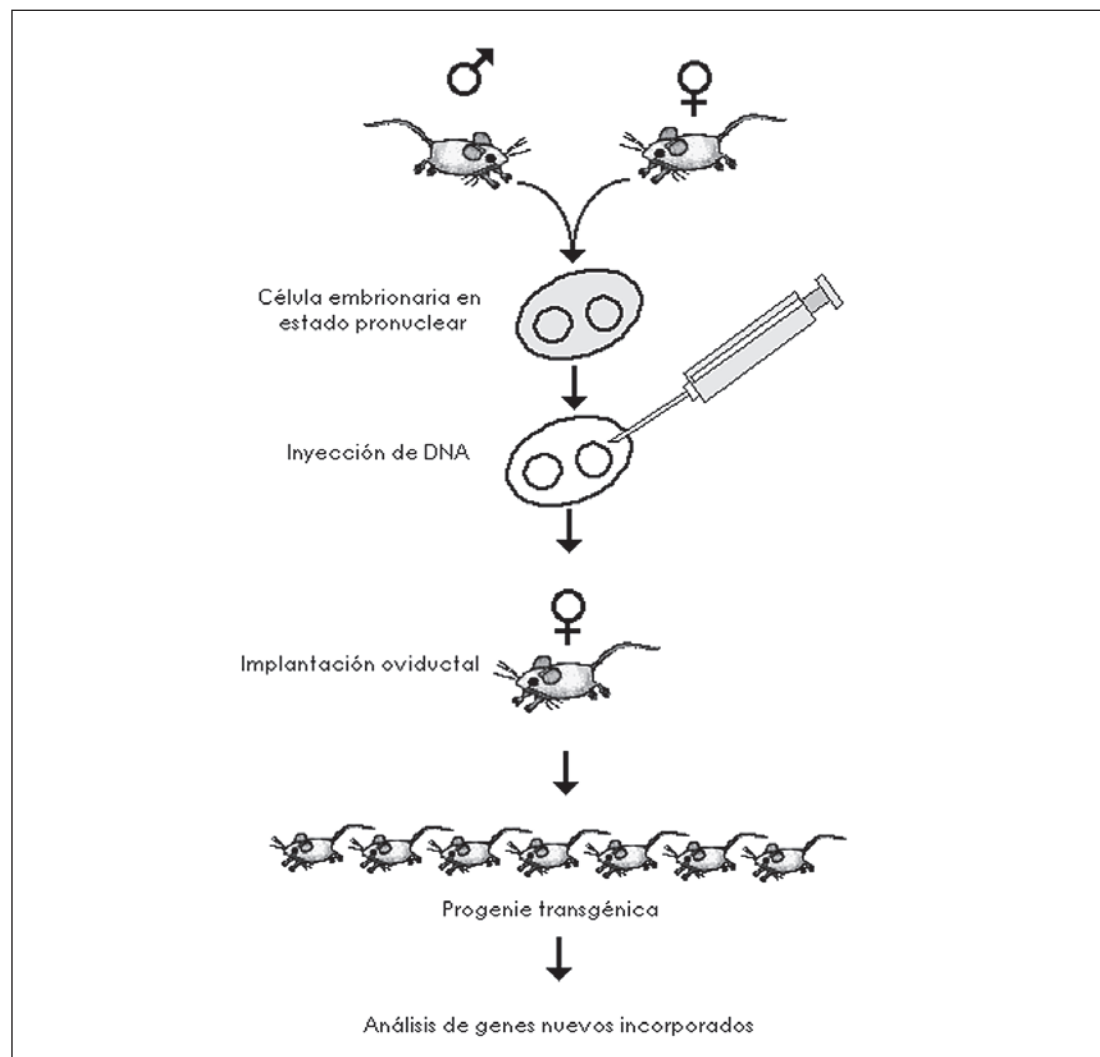


Figura 45-8. Esquema de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Esta es una técnica que representa una manera fácil y eficiente de amplificar enormemente secuencias definidas de DNA (Ver texto).





para suprimir poblaciones de células específicas con transgenes que expresan proteínas tóxicas, etc. Así, los animales transgénicos representan poderosas herramientas (“tubos de ensayo vivos”) para expresar genes que pueden ser dirigidos específicamente a tipos especiales de células o tejidos.

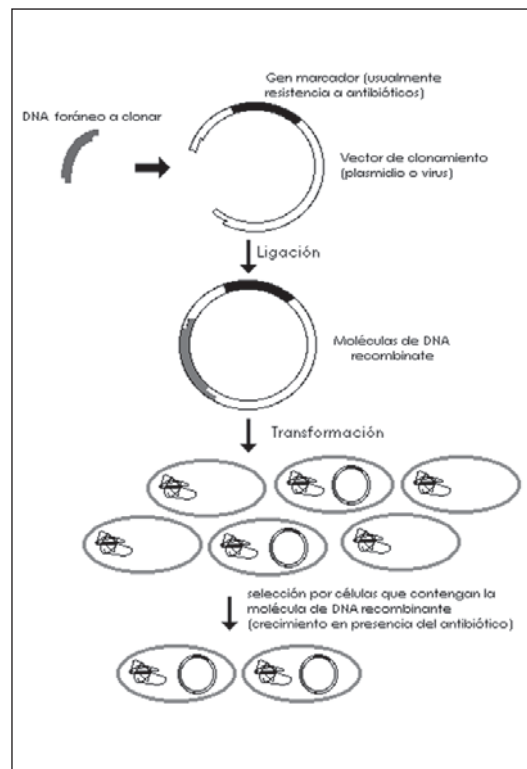


Figura 45-9. Esquema que representa la obtención de ratones transgénicos. En este caso, se muestra la técnica de microinyección de pronúcleos. También es posible lograr transferencias de genes mediadas por retrovirus o por células troncales de la línea germinal del animal.

4. LA EXPRESIÓN GÉNICA EN ORGANISMOS EUCARIÓTICOS

El término “expresión génica” ha sido acuñado para referirse a la sumatoria de eventos que conducen a la aparición del producto codificado por un gen determinado (RNA o proteínas), en su forma activa y en el lugar donde ejercerán su rol biológico. En eucariotes, este proceso reviste especial complejidad a causa de la organización y estructura tanto de la célula eucariótica como de

los genes que ella posee.

4.1. La estructura de los genes eucarióticos

La estructura básica de un gen consta de tres elementos: la región codificadora, la señal control del inicio de la transcripción o promotor transcripcional y la señal de término de la transcripción o terminador (figura 45-10).

La región codificadora contiene la información genética que será transcrita en una molécula de RNA. Esta información está codificada en una de las cadenas del DNA (la hebra codogénica) en tanto que la cadena complementaria (hebra molde) actúa como templado para la generación del RNA respectivo. En el caso de genes que codifican para proteínas, la región codificadora contiene un marco de lectura abierta (ORF) el que corresponde a una sucesión continua de tripletes de bases nitrogenadas o codones, comprendido entre un triplete ATG (inicio del ORF) y un triplete sin sentido (término del ORF). Esta sucesión de codones especifica la estructura primaria de la proteína codificada por el gen de acuerdo a la equivalencia codón:aminoácido establecida en el código genético (figura 45-10a). Una característica importante de algunos genes eucarióticos es la presencia de intrones. Ellos corresponden a secuencias de DNA sin codificación para aminoácidos las que se intercalan en la región codificadora generando interrupciones dentro del ORF. En consecuencia, los genes que contienen tales secuencias poseen una estructura segmentada en la que se alternan exones (segmentos que contienen codificación) e intrones (figura 45-10b). Incluido dentro de la región codificadora, se ubica el terminador transcripcional. Este elemento corresponde a una secuencia particular de bases, las que al ser transcritas permiten la formación de una estructura secundaria en el RNA, la que actúa como señal de término de la transcripción.

En los genes eucarióticos que codifican para proteínas, el promotor transcripcional se localiza previo a la región codificadora, en lo que se denomina región río arriba. Este elemento corresponde a una secuencia particular de bases nitrogenadas, la cual al ser reconocida por el sistema transcripcional establece el punto de inicio de la síntesis de RNA. Su presencia es esencial para la realización del proceso de transcripción.



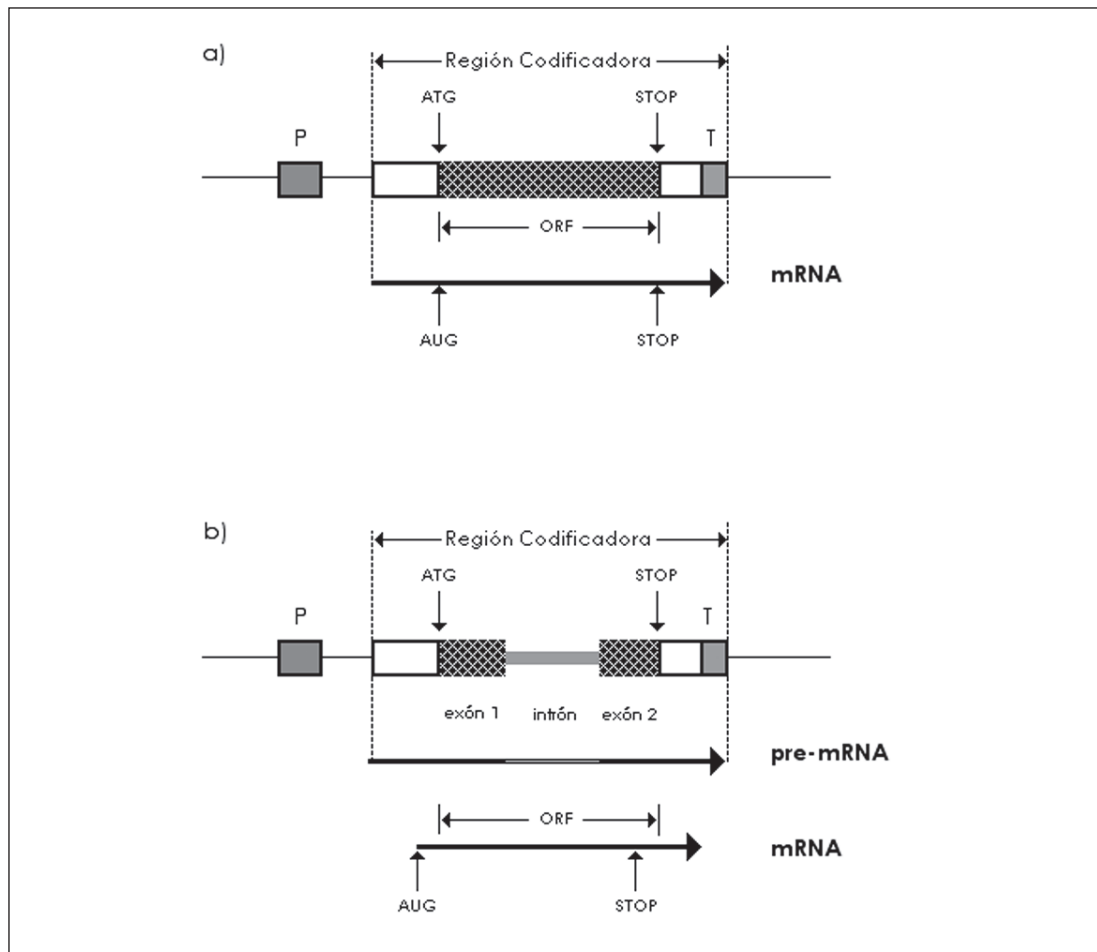


Figura 45-10. Estructura de genes eucarióticos. Dos tipos de genes están presentes en los organismos eucarióticos: genes sin intrones (a) y genes con intrones (b). P: promotor transcripcional, T: terminador de la transcripción.

4.2 El proceso de expresión génica y sus etapas.

En los organismos superiores, la expresión génica es un proceso de alta complejidad que involucra una serie de etapas. Si se considera el caso de genes que codifican para proteínas, la aparición del polipéptido codificado por un gen particular en su forma tridimensional activa y en la localización intra o extracelular donde ejercerá su función incluye los siguientes eventos: a) transcripción, b) procesamiento postranscripcional, c) traducción, d) procesamiento postraduccional, e) transporte de la proteína y f) plegamiento de la proteína (figura 45-11).

- a) **Transcripción.** En el núcleo de la célula eucariótica, existen tres sistemas transcripcionales. Los genes que codifican proteínas

son transcritos por el sistema de la RNA polimerasa II y sus factores de transcripción asociados. En un primer evento, los factores de transcripción generales (comunes para todos los genes transcritos por la RNA polimerasa II) reconocen y se unen en forma secuencial al promotor transcripcional de tales genes generando el complejo de iniciación. En un segundo evento la RNA polimerasa II se une al complejo de iniciación y comienza la síntesis de un RNA complementario a la hebra molde de la región codificadora, la que procede hasta la región del terminador transcripcional. En el caso de genes sin intrones, se sintetiza un precursor de mRNA (pre-mRNA) que contiene un ORF continuo. Para los genes que contienen intrones se producirá un pre-mRNA, también denominado RNA heterogéneo nuclear (hnRNA) el que





contiene secuencias provenientes tanto de los exones como de los intrones y por lo tanto el ORF se encuentra interrumpido.

- b) **Procesamiento postranscripcional.** Previo a abandonar el núcleo, el pre-mRNA debe ser procesado a fin de generar el mRNA maduro. Tal procesamiento implica, la modificación de ambos extremos de la molécula a fin de aumentar su estabilidad. En el extremo 5' se produce la reacción de "capping" que hace al mRNA refractario a la acción de ribonucleasas. En el extremo 3' se realiza la reacción de poliadenilación o adición de una cola de poliAMP, razón por la cual los mRNA también se denominan RNA poliA⁺. En el caso del hnRNA se incluye además el "splicing" o remoción de las secuencias de RNA provenientes de los intrones a fin de generar un ORF continuo. Una vez concluido el procesamiento, el mRNA maduro es transferido al citoplasma para su posterior traducción.
- c) **Traducción.** El mRNA maduro generado en la etapa anterior se une al ribosoma, donde el mensaje contenido en esta molécula es descifrado para sintetizar la proteína codificada. En este proceso, cada triplete del ORF es interpretado de acuerdo al código genético para asignar el aminoácido correspondiente en la estructura primaria del polipéptido. Dependiendo del destino final de la proteína a sintetizar, la traducción se verificará en ribosomas libres (proteínas intracelulares) o en ribosomas unidos al retículo endoplásmico (proteínas de membrana o extracelulares).
- d) **Procesamiento postraduccion.** Un gran número de proteínas y polipéptidos celulares son sintetizados como precursores, por lo que no poseen su estructura tridimensional activa, debiendo ser procesados para cumplir su función biológica. Las modificaciones postraduccionales más comunes son: procesamiento proteolítico, adición de carbohidratos o glicosilación (proteínas de membrana y extracelulares), fosforilaciones, adición de aminoácidos al extremo amino o carboxilo terminal y adición de grupos prostéticos, entre otras.
- e) **Transporte de proteínas.** Con excepción de

algunas proteínas mitocondriales y de cloroplasto en células vegetales, las proteínas localizadas en los diferentes organelos celulares son codificadas por genes nucleares, realizándose su traducción en el citoplasma. En consecuencia, las proteínas sintetizadas deben ser dirigidas hacia los diferentes compartimentos intra o extracelulares donde ejercerán su función. Para ello, en la estructura primaria de cada polipéptido se incluye una secuencia de aminoácidos que actúa como señal de destinación. Así, por ejemplo, las proteínas extracelulares poseen un péptido señal que indica que ellas deben ser sintetizadas en ribosomas asociados al RE y, por consiguiente, son dirigidas hacia la ruta de secreción de proteínas. Por su parte una señal diferente opera para dirigir proteínas hacia el núcleo o mitocondrias. Estas señales de destinación son interpretadas por un complejo sistema de transporte que determina finalmente el tráfico intracelular de proteínas.

- f) **Plegamiento de proteínas.** Esta es última etapa del proceso de expresión génica y se produce en forma coordinada con los eventos de procesamiento pos traduccional y transporte. La proteína expresada adopta finalmente su estructura tridimensional definitiva, lo que le permite cumplir con su rol funcional en la localización que le corresponde. El plegamiento incluye la adopción de la estructura terciaria de la proteína a través de la interacción entre los grupos laterales de los aminoácidos que la constituyen y, en el caso de proteínas que poseen estructura cuaternaria, la interacción entre los diferentes polipéptidos o subunidades que la conforman.

4.3. La expresión diferencial de genes y su regulación

Aún cuando todas las células de un organismo poseen la misma información genética, los distintos tipos celulares que lo componen poseen características estructurales y funcionales diferentes y por consiguiente poseen un patrón de expresión génica que les es característico. Cada célula de un organismo expresa sólo aquella fracción de la información genética contenida en su genoma que le permita producir las proteínas requeridas para el desarrollo de la función que le es propia,

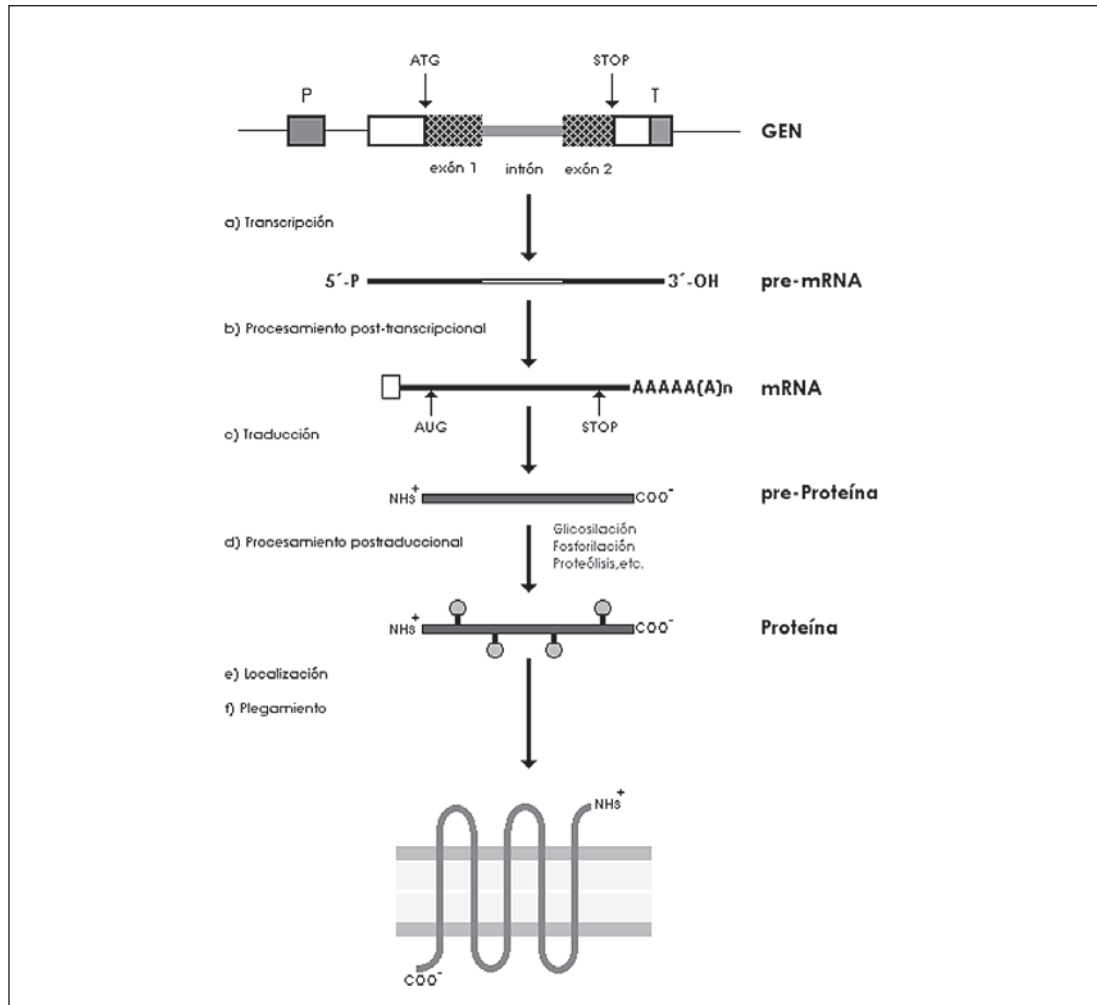


Figura 45-11. Etapas del proceso de expresión génica en eucariotes

generando así un perfil de expresión génica tejido o célula-específico. Del mismo modo, tal patrón de expresión génica puede ser modificado en respuesta tanto a condiciones o señales exógenas (por ej. factores medioambientales), como de naturaleza endógena (por ej. programas de desarrollo y diferenciación celular, estableciendo de esta manera perfiles de expresión estadio-específicos. La expresión tejido y/o estadio específica, es lo que se denomina expresión diferencial de genes.

En el contexto anterior, y considerando su modo de expresión, los genes pueden ser clasificados en dos grupos. La primera categoría corresponde a los denominados genes "housekeeping", la que incluye a todos aquellos que codifican para proteínas esenciales para el funcionamiento basal de la célula por lo que son expresados en forma constante o constitutiva. La segunda categoría in-

cluye a los genes de expresión regulada, esto es, genes cuya expresión no es permanente sino que aparece inducida o reprimida en respuesta a condiciones particulares. No obstante que la regulación de la expresión de estos genes puede ser ejercida a varios niveles dentro de este proceso, la gran mayoría de los mecanismos regulatorios opera a nivel transcripcional. En forma general, tales mecanismos involucran la interacción específica entre dos tipos de elementos regulatorios: elementos *cis* y elementos *trans*. Los elementos *cis*, también denominados "enhancers", corresponden a pequeñas secuencias específicas de bases nitrogenadas, generalmente localizadas río arriba de la región codificadora. Tales elementos (adicionales al promotor transcripcional) son característicos de los genes de expresión regulada y no se encuentran presentes en los genes constituti-



vos. Por su parte, los elementos *trans* corresponden a un tipo particular de proteínas de unión a DNA, las que al reconocer y unirse a un elemento *cis* particular, actúan como factores de transcripción específicos. La interacción entre ambos elementos facilita la unión de los factores de transcripción generales y la RNA polimerasa II al promotor, induciendo la transcripción del gen sometido a regulación (figura. 45-12).

La unión de los factores de transcripción específicos a su respectiva secuencia blanco o “enhancer” corresponde generalmente a la etapa final de una vía de transducción de señales. A modo ejemplo, en el mecanismo de activación de la expresión génica por hormonas esteroidales del tipo glucocorticoides la hormona ingresa al citoplasma de la célula blanco donde se une a su receptor específico, el que corresponde a un elemento *trans* inactivo. El complejo hormona-receptor constituye el factor de transcripción activo que migra al núcleo donde se une al **GRE** (“glucocorticoid responsive element”), elemento

cis presente en todos los genes que responderán a la acción hormonal (figura. 45-13a). En forma análoga, otros sistemas de transducción de señales involucran la participación de proteínas quinasas específicas, las que al fosforilar un factor de transcripción determinado producen su activación, posibilitando su unión a su respectiva secuencia blanco en la región regulatoria de los genes bajo su control (figura. 45-13b)

La capacidad de un organismo para responder a una gran variedad de señales externas e internas determina la existencia de una compleja red de vías de transducción de señales y de mecanismos moduladores de la expresión génica. La diversidad de sistemas regulatorios que operan en un organismo eucariótico requiere de una gran cantidad de elementos *cis* y *trans* distintos. Estimaciones para algunas especies indican que aproximadamente el 10% de los genes presentes en su genoma codifican para factores de transcripción específicos.

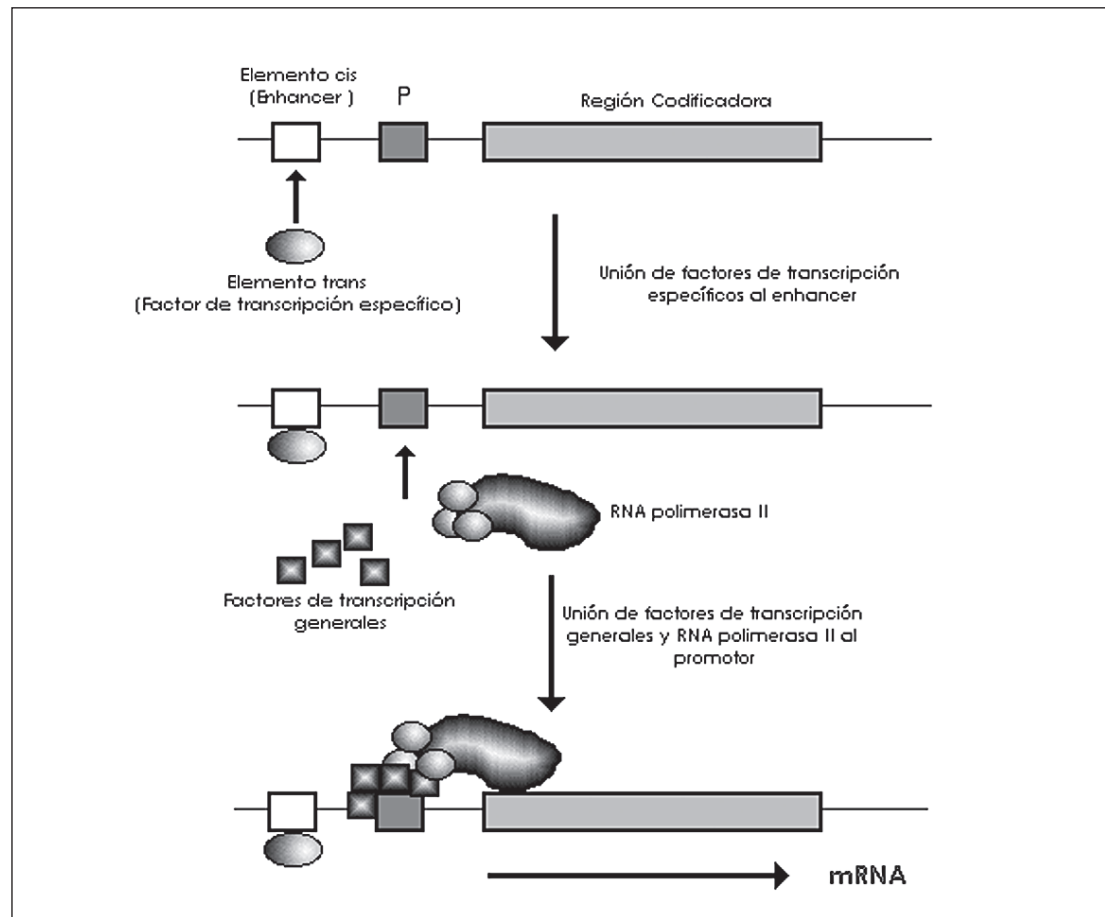


Figura 45-12. Interacción entre elementos reguladores *cis* y *trans* durante la regulación de la expresión génica.



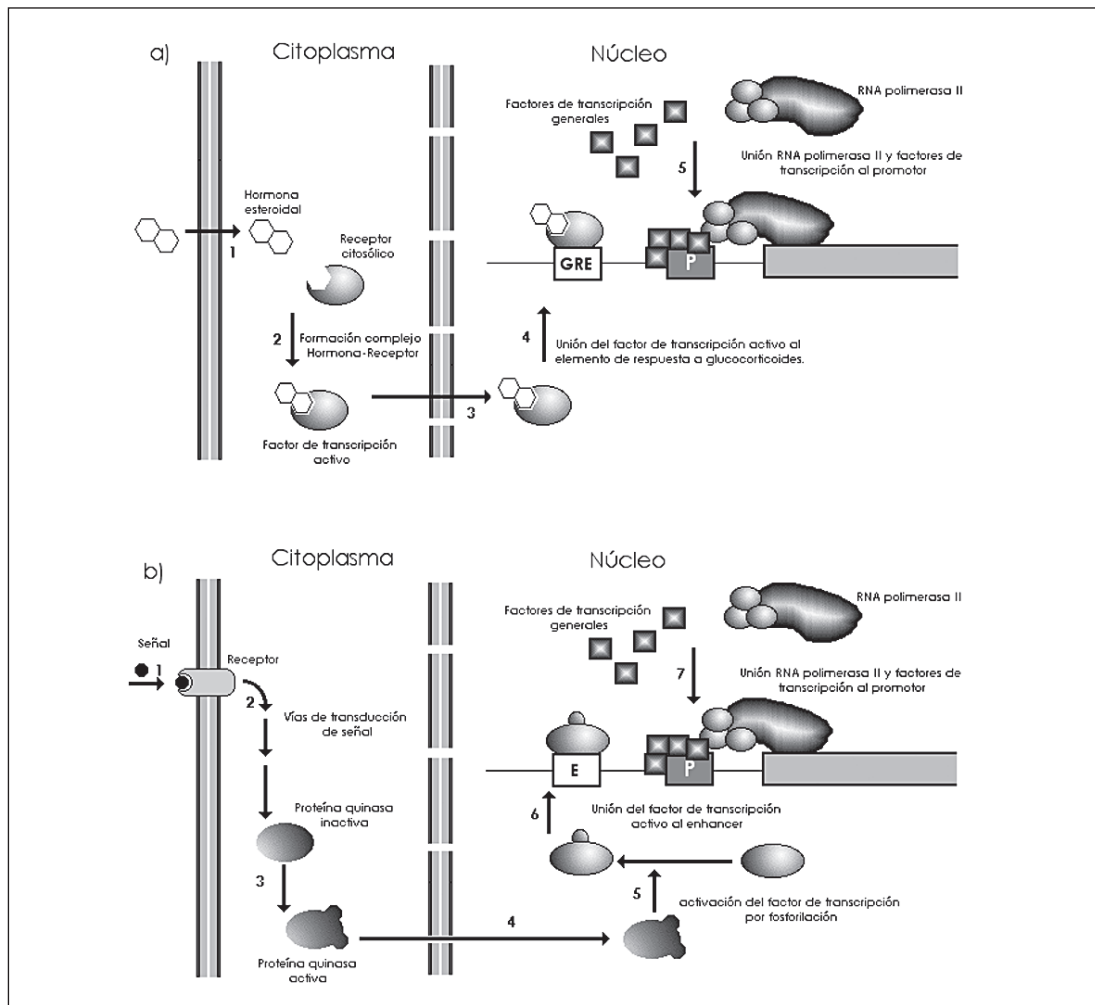


Figura 45-13. Mecanismos de activación de la expresión génica en respuesta a señales externas. a) Activación de la transcripción inducida por hormonas esteroidales y la secuencia de eventos involucrados (etapas 1-5). b) Activación en respuesta a otro tipo de factores exógenos (hormonas peptídicas, señales de estrés, elicitores, etc.). La secuencia de los principales eventos asociados a este tipo de mecanismos se describe en las etapas 1-7.

5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES

Dado que la gran mayoría de los mecanismos regulatorios de la expresión génica operan a nivel de la iniciación de la transcripción, los métodos de análisis de la expresión génica más corrientemente utilizados se dirigen hacia la detección de transcritos de RNA específicamente generados en tejidos determinados y/o en condiciones particulares. Las técnicas a utilizar varían dependiendo del propósito del análisis: el estudio de la expresión de un gen específico o la determinación del perfil global de expresión génica en una muestra determinada.

5.1. Hibridación “Northern”

Esta técnica se derivó de la hibridación “Southern” descrita anteriormente en este capítulo (3.). En este método lo que se persigue es detectar la presencia de un transcrito proveniente de un gen específico dentro de la población total de RNAs presentes en una célula o de un tejido determinado. A diferencia de la hibridación “Southern”, el RNA total obtenido desde las células de un tejido es sometido a un fraccionamiento por tamaño mediante electroforesis en geles desnaturalantes de agarosa/formaldehído. Posteriormente el RNA fraccionado es transferido a una membrana de nailon o un filtro de nitrocelulosa



en forma análoga a como se describe para la transferencia “Southern”. El RNA adherido a la membrana es sometido a hibridación con una sonda molecular la que generalmente corresponde a un fragmento del gen cuya expresión se desea analizar y que ha sido marcado radiactivamente. Tal hibridación es realizada en condiciones de temperatura y fuerza iónica que permitan el apareo de la sonda sólo a moléculas de RNA con las que posea un alto grado de complementariedad. Tras una serie de lavados que remueven la sonda adherida en forma inespecífica la membrana es expuesta a una placa autorradiográfica que permite detectar la presencia de secuencias de RNA complementarias a la sonda molecular (figura 45-14). Este método, aún cuando posee algunas desventajas, es ampliamente utilizado. Su sensibilidad, baja si se compara con otros métodos de reciente desarrollo, dificulta su aplicación para la detección de genes débilmente expresados.

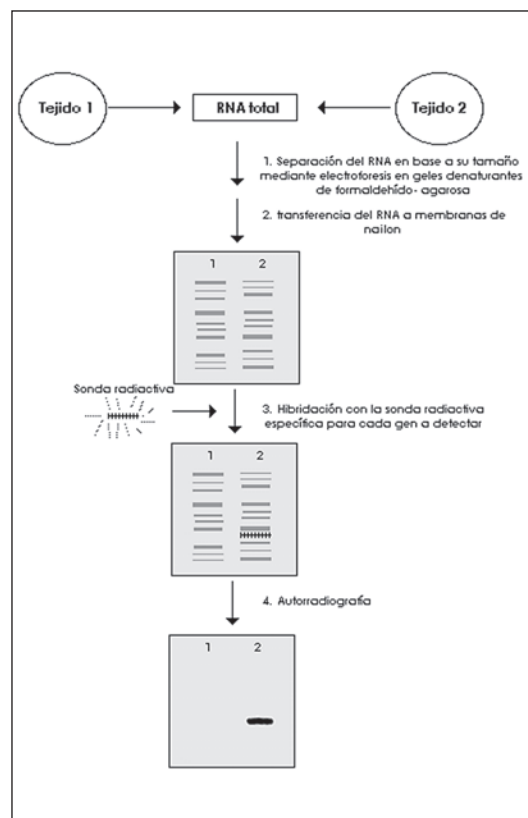


Figura 45-14. Esquema del método para la detección de la expresión específica de genes mediante hibridación “Northern”.

5.2. Reacción de la polimerasa en cadena acoplada a la reacción de la transcriptasa reversa (RT-PCR)

La asociación de la tecnología de PCR a la reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa, ha permitido desarrollar una poderosa herramienta para el análisis de la expresión de un gen en particular. La transcriptasa reversa es una DNA polimerasa sintetizada en células infectadas por retrovirus la que se caracteriza por utilizar mRNA como templado para sintetizar un DNA de doble cadena complementario al molde (cDNA). En la primera etapa de este método, el RNA poliA⁺ (mRNA total) obtenido de las muestras en estudio es utilizado como molde para sintetizar un cDNA de cadena simple complementario, utilizando como partidor oligodT₁₂₋₁₈ (polímero de dTMP de 12-18 nucleótidos de largo), el que se aparea con la extensión de poliadeninas presente en los mRNAs eucarióticos. En esta reacción se obtiene una colección de cDNAs representativa de todos los genes expresados en la muestra analizada. En la segunda etapa se determina si en la población de cDNAs sintetizados por la transcriptasa reversa está representado el producto de expresión de un gen determinado. Para ello la colección de cDNAs es utilizada como molde en una reacción de PCR estándar, en condiciones similares a las descritas anteriormente en este capítulo. Como partidores para la amplificación del DNA se utiliza oligonucleótidos de secuencia complementaria a regiones específicas del gen cuya expresión se investiga. Los productos de amplificación generados son analizados por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. La aparición de un fragmento de DNA del tamaño esperado es indicativo de la efectiva expresión del gen en estudio (figura 45-15). Las principales ventajas de la técnica descrita son su alta sensibilidad y la rapidez del análisis.

5.3. Análisis del perfil transcripcional mediante el método de “differential display” de mRNAs.

Esta técnica corresponde a una variación del método de RT-PCR, adaptada para la detección de grupos de genes cuya expresión es inducida o reprimida en un tejido específico o en determinadas situaciones. Para ello es necesario establecer el perfil de mRNAs presentes tanto en la muestra problema y contrastarlo con el de una muestra

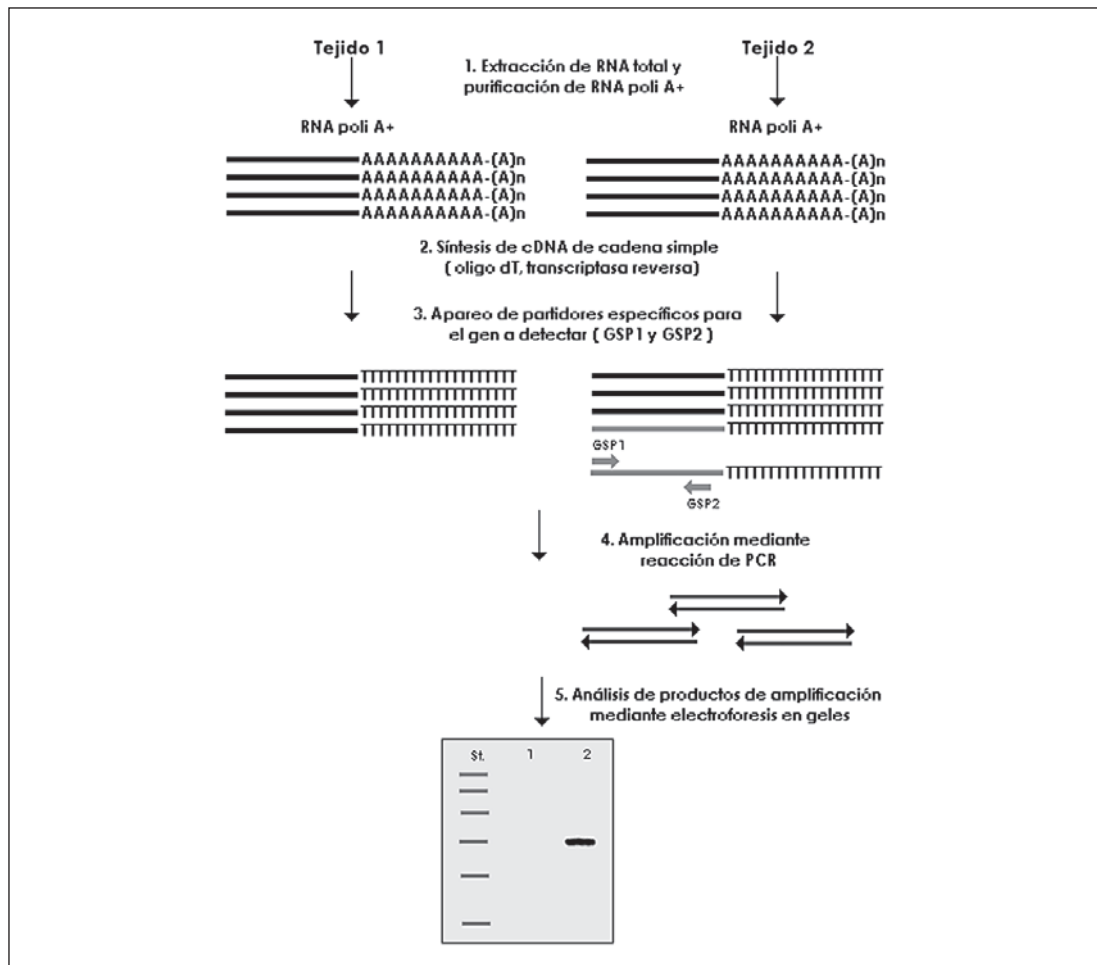


Figura 45-15. Detección de la expresión específica de genes mediante la reacción de la polimerasa en cadena acoplada a la transcriptasa reversa (RT-PCR). La detección de transcritos específicos en el tejido 2 es verificada mediante el uso de partidores específicos para el gen en análisis (GSP1 y GSP2)

control. Ello significa seleccionar dos tejidos diferentes (para el análisis de expresión tejido-específica) o bien el mismo tejido sujeto a dos condiciones experimentales distintas (análisis de expresión inducida por factores exógenos y endógenos). Dado que la cantidad de transcritos distintos presentes en una célula (10-20 mil) excede la capacidad de análisis, la población global de mRNAs debe ser previamente dividida en subpoblaciones. Este fraccionamiento se realiza a nivel de la síntesis de cDNA por la transcriptasa reversa. Para ello se requiere de partidores cuya secuencia nucleotídica corresponde a la estructura general 5'-TTTTTTTTTTTMMN-3', donde M:= A, G o C y N=A, G, C, o T. En consecuencia, existen 12 oligonucleótidos posibles, cada uno de los cuales se apareará sólo a una fracción del RNA poliA+ y generará una subpoblación de cDNAs

de cadena simple. A modo de ejemplo, al emplear el partidor T₁₁CG, se seleccionará como molde para la síntesis de cDNA sólo a los mRNAs que posean en su extremo 3' la secuencia 5'-...CGAAAAAAAAAAAAA-3', por consiguiente los cDNA obtenidos representarán sólo una fracción de los mRNAs presentes en la muestra analizada.

En la segunda etapa de este método, la subpoblación de cDNAs generada en la reacción de la transcriptasa reversa es empleada como sustrato en una reacción de PCR. Como partidores se utilizan el oligonucleótido T₁₁MN empleado para la síntesis de cDNA y un decámero de secuencia arbitraria (AP), el cual se apareará al azar sobre el cDNA molde. Los parámetros de amplificación y en particular la temperatura de apareo se han modificado respecto de una reacción estándar a fin de maximizar la unión de los



partidores al molde. La reacción de PCR se realiza en presencia de S^{35} -a-dATP a fin de generar fragmentos marcados radiactivamente. Los productos de amplificación son analizados mediante electroforesis en geles desnaturantes de poliacrilamida/urea y analizados mediante autorradiografía (figura 45-16). Los resultados que se generan en este análisis corresponden a un perfil parcial de los mRNAs presente en un tejido o tipo celular específico y en una condición experimental determinada. La comparación del patrón obtenido con aquel determinado para otro tejido o para el mismo tipo celular pero en diferentes condiciones experimentales, permite identificar los genes cuya expresión es inducida o reprimida en cada situación.

5.4. Hibridación sustractiva

Esta técnica es una alternativa al “differential display” y como ella se utiliza para detectar e iden-

tificar grupos de genes expresados diferencialmente en un tejido determinado y en una condición experimental particular. Existen numerosas variantes de este método, una de las cuales se describe a continuación (figura 45-17).

Como en el método anterior se requiere una muestra de referencia además de la muestra problema. Ambas muestras son procesadas para la extracción y purificación del RNA poliA⁺. A partir del RNA poliA⁺ total de la muestra problema, se sintetizan los respectivos cDNAs de doble cadena. Tales cDNA son posteriormente ligados a un vector de clonamiento molecular e introducidos mediante transformación en células de *E. coli*, de acuerdo a los métodos descritos anteriormente en este capítulo. Se obtiene así lo que se denomina una genoteca de expresión, esto es, una colección de bacterias que en su conjunto contienen todos los genes expresados en la muestra en estudio. Una réplica de esta genoteca es transferida a un filtro

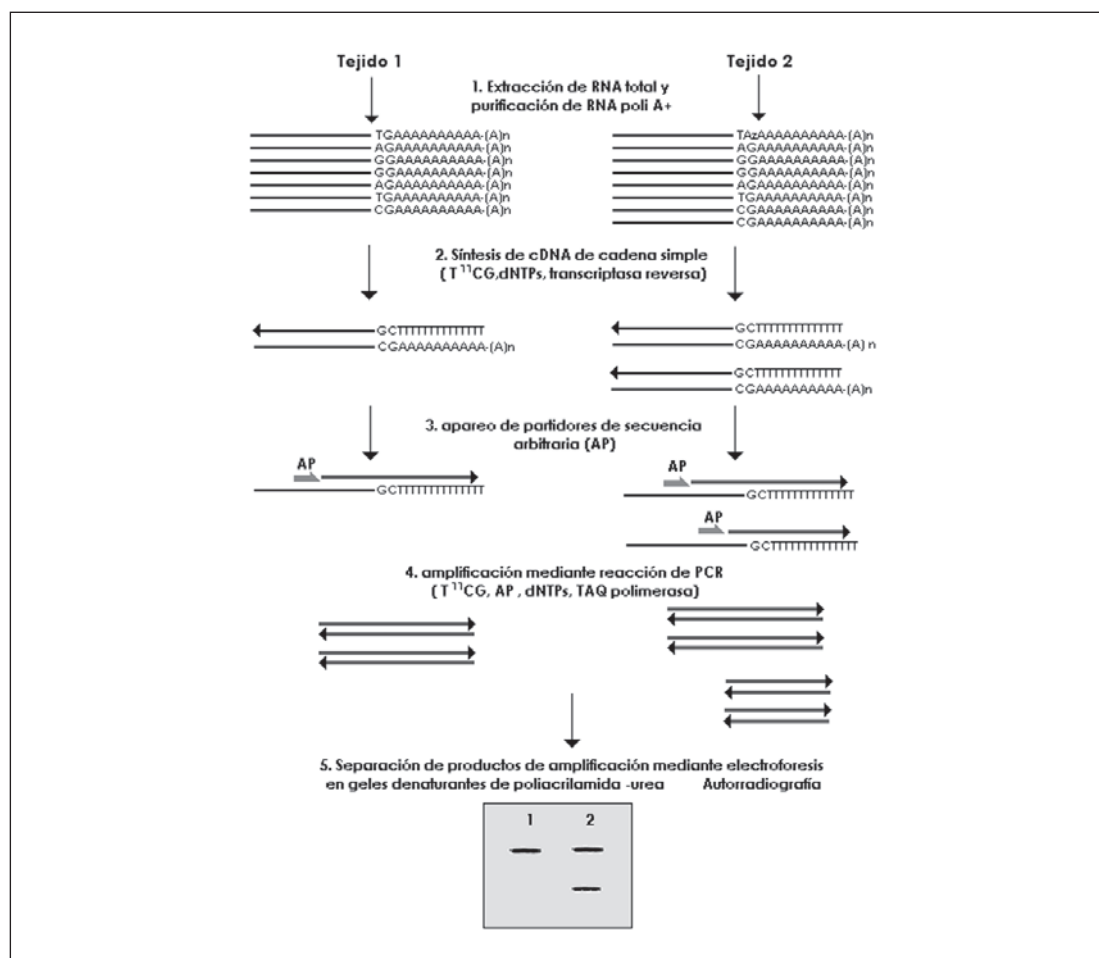


Figura 45-16. Identificación de transcritos diferencialmente expresados mediante la técnica de “differential display” de mRNAs.



de nitrocelulosa y procesada para hibridación. Paralelamente, una fracción del mRNA de la muestra problema es empleada para sintetizar su respectivo cDNA de hebra simple, generando una colección representativa de todos los mRNAs presentes en la muestra problema. Esta colección es hibridada con un gran exceso de RNA poliA⁺ de la muestra de referencia. En estas condiciones todos los mRNAs de la muestra de referencia comunes con los de la muestra problema se aparearán con el respectivo cDNA, formando híbridos cDNA/mRNA. Los cDNAs correspondientes a mRNAs específicos de la muestra problema permanecerán al estado de hebra simple y pueden ser separados de los dúplex cDNA/mRNA. Tales cDNA son marcados radiativamente y utilizados como sondas moleculares para hibridación con los filtros de nitrocelulosa que contienen a la genoteca de expresión. Tras la exposición autorradiográfica, las señales de hibridación positiva indican la presencia de clones bacterianos conteniendo genes

de expresión específica en la muestra problema.

LECTURAS SUGERIDAS

Alberts, A.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J.D., **Molecular Biology of the cell**, 3rd Edition, Garland Publishing Inc., New York, 1994.

Brown, T.A., **Genomes**, Bios Scientific Publishers, John Wiley & Sons Inc., New York, 1999.

Glick, B. y Pasternak, J., **Molecular Biotechnology**, ASM Press, Washington D.C., 1994.

Lewin, B., **Genes VII**, Oxford University Press, 2000.

Watson, J.D., Gilman, M.; Witkowski, J. y Zoller, M., **Recombinant DNA**, 2nd Edition, Scientific American Books, 1992.

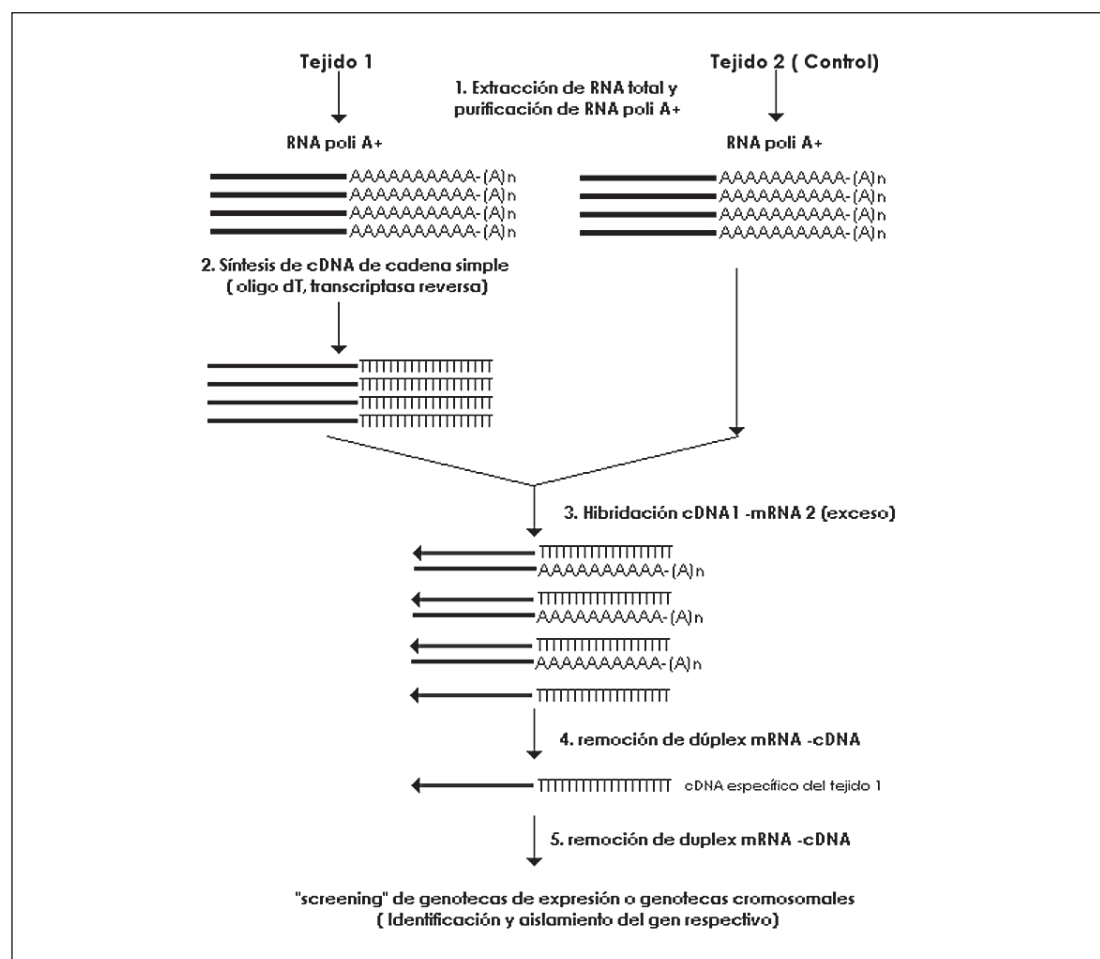


Figura 45-17. Método de hibridación sustractiva para la detección y aislamiento de genes diferencialmente expresados.



Capítulo 46

GRUPOS DE DIFERENCIACIÓN ANTIGÉNICA

Iván Palomo G., Flavio Carrión A. y Cristián Rodríguez G.

1. Introducción

2. Estructura de los antígenos de membrana

- 2.1. Proteínas de transmembrana tipo I
- 2.2. Proteínas de transmembrana tipo II
- 2.3. Proteínas de transmembrana tipo III
- 2.4. Proteínas ancladas a glicofosfatidilinositol

3. Moléculas CD asociadas a líneas celulares

- 3.1. Moléculas CD expresadas principalmente en "stem cell"
- 3.2. Moléculas CD expresadas principalmente en células B

3.3. Moléculas CD expresadas principalmente en células T

3.4. Moléculas CD expresadas principalmente en células NK

3.5. Moléculas CD expresadas principalmente en granulocitos

3.6. Moléculas CD expresadas principalmente en monocitos-macrófagos

3.7. Moléculas CD expresadas principalmente en plaquetas

4. Familias de moléculas CD

5. Algunas aplicaciones de la nomenclatura CD en Inmunología





RESUMEN

En este capítulo se muestra los criterios generales utilizados en la clasificación de las moléculas CD. Fundamentalmente fue la producción de anticuerpos monoclonales por diferentes centros y que reconocían las mismas moléculas lo que impulsó a los investigadores a realizar talleres tendientes a universalizar la nomenclatura a usar.

Como una forma de facilitar la comprensión de las características estructurales de las moléculas CD, se describe las cuatro formas en que las proteínas de membrana se orientan en ella o se unen a la membrana: proteínas de transmembrana tipos I, II y III, y unidas a Proteínas.

Se han descrito más de 240 moléculas CD. De estas moléculas, existen algunas que principalmente se expresan en algunas líneas celulares; a modo de ejemplo: CD19 (LB), CD3 (LT), CD56 (células NK), CD66a (granulocitos), CD14 (monocitos-macrófagos) y CD61 (plaquetas).

Algunas moléculas CD presentan similitud estructural entre sí y en algunos casos con otras proteínas no incluidas en esta clasificación. Así hay moléculas CD que integran algunas familias de proteínas, como por ejemplo: Superfamilia de las Ig, Familia de las lectinas, "Tetra-span family", etc.

En los últimos años, se ha empezado a usar la nomenclatura CD en clínica, así por ejemplo se usa en SIDA, inmunodeficiencias primarias, leucemias agudas, etc.

1. INTRODUCCIÓN

Alrededor de 1980, cinco años después que Kohler y Milstein publicaron un método para obtener anticuerpos monoclonales a partir de la fusión de células de ratón y una línea celular de mieloma múltiple, se iniciaron los trabajos de producción de estos anticuerpos en varios centros de investigación.

La tecnología de los anticuerpos monoclonales (ver capítulo 44) revolucionó la clasificación de los antígenos celulares de superficie. La especificidad de estos anticuerpos permitió identificar y estudiar proteínas de la membrana de linfocitos, plaquetas, monocitos y granulocitos, que usando heteroantisueros preparados en conejos no habían sido descritas.

La producción de anticuerpos monoclonales en diferentes centros, condujo a que anticuerpos con diferente nombre reconocieran una misma molécula, debido a que la denominación de los anticuerpos incluía abreviaciones de los nombres de los investigadores que los producían o de sus instituciones. Esta situación motivó a que en 1982 se realizara en París el Primer Taller ("workshop") Internacional sobre Antígenos de Diferenciación de Leucocitos, que tuvo como propósito com-
rar la reactividad de los anticuerpos monoclonales con células hematopoyéticas de diferentes linajes. Los organizadores del taller separaron los anticuerpos en una serie de paneles codificados sobre la base de especificidad putativa de los anticuerpos. Los paneles fueron distribuidos a investigadores de 55 laboratorios quienes usaron los anticuerpos para inmunotipificación, análisis de unión cuantitativo, estudios inmunoquímicos de las estructuras reconocidas por los anticuerpos y estudios funcionales. Los datos obtenidos en los laboratorios fueron tabulados por los organizadores, quienes desarrollaron una nómina tentativa de especificidades. Los anticuerpos monoclonales que tienen patrones de reactividad similares con varios tejidos, tipos de células y/o moléculas, se asignaron a un grupo de diferenciación ("Cluster of Differentiation", CD), seguido de un número. Se agrega un sufijo "w" a los CD que están siendo sometidos a estudio en los talleres o "workshops". La designación CD también se usa para identificar la molécula que reconoce el anticuerpo monoclonal, y en tal caso es más adecuado hablar de molécula CD. La posterior determinación de la función y estructura molecular de estos antígenos ha permitido un mayor entendimiento de las interacciones celulares involucradas



en la respuesta inmune.

Los “workshops” sobre CD se organizan en secciones dedicadas a: a) células B, b) células T, c) células NK, d) células mieloides, e) plaquetas, f) células endoteliales, g) moléculas de adhesión y h) receptores de citoquinas. El VI “workshop” realizado en Kobe, Japón en noviembre de 1996 privilegió la clasificación de las moléculas CD según participaran en la respuesta inmune y/o res-

puesta inflamatoria. Las bases de datos actualizadas sobre moléculas CD se puede obtener desde Internet a través de algunas de las siguientes direcciones: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/>, <http://www.immunologylink.com/CDantigen.htm>, www.hlda.org o <http://members.aol.com/researchd1/rdicdabs/cdindex.htm>. Actualmente se han descrito más de 240 moléculas CD (tabla 46-1).

Tabla 45-1. Principales características de los antígenos de grupos de diferenciación (CD)

Designación CD (Sinónimo)	Estructura molecular	Principal expresión celular	Función
CD1a CD1b CD1c CD1d	43-49 kDa; asociada a β_2 SFIg	Timocitos corticales, células dendríticas (incluyendo células de Langerhans); LB (CD1c); epitelio intestinal (CD1d)	Molécula MHC clase I asociada a b_2m . Puede participar en la presentación antigénica.
CD2 (T11; LFA 2;receptor de eritrocitos de cordero)	45-58 kDa transmembrana tipo I SFIg	Timocitos, LT, células NK	Molécula de adhesión, ligando de CD58(LFA-3); activación de LT
CD2R (T11-3)	45-58 kDa SFIg	LT activados y algunas células NK	Epítipo conformacional de CD2, dependiente de activación.
CD3 (T3; Leu-4)	Complejo de cinco cadenas (γ , δ , ϵ , ζ , β) de 16-28 kDa c/u	LT, Timocitos	Transducción de la señal como resultado del reconocimiento antigénico por LT
CD4 (T4)	55 kDa; Proteínas transmembrana tipo I SFIg	LT “helper”, macrófagos y células dendríticas	Se une a molécula MHC clase II. Transducción de señal vía lck. Receptor de gp120 de VIH-1 y VIH-2.
CD5 involucrado (T1;Lyt-1)	67 kDa; Proteínas transmembrana tipo I Receptor “scavenger”	LT; subpoblación de células B y timocitos	Ligando de CD72 En la activación celular y/o adhesión.
CD6 (T12)	100-130 kDa; Proteínas transmembrana tipo I Receptor “scavenger”	Subpoblación de LT; timocitos y algunos LB	Posiblemente juega un rol en la transducción de señales
CD7 (Gp40)	40 kDa; Proteínas transmembrana tipo I SFIg	Timocitos, LT, células hematopoyéticas pluri-potenciales	Desconocida. Marcador para células T en LLA y leucemia a células indiferenciadas.
CD8 (T8; Leu-2; Lyt-2)	Compuesto por dos cadenas de 33-34 kDa expresado como dímeros $\alpha\alpha$ o $\alpha\beta$ SFIg	LT citotóxicos y subpoblación de timocitos monocitos,	Adhesión (se une a moléculas MHC clase I); transducción de señales



CD9 (p24)	22-27 kDa; Proteínas transmembrana tipo III Molécula "tetra-span"	Plaquetas, megacariocitos, monocitos, células pre-B, eosinófilos, basófilos y LT activados	Participa en la agregación y activación plaquetaria
CD10 (Neural endopeptidasa; "Common Acute Lymphocytic Leukemia Antigen" o CALLA)	100 kDa; Proteínas transmembrana tipo II	Células pre B, LB de centros germinales, algunos neutrófilos, precursores de LT y células epiteliales	Metaloproteasa dependiente de Zn que rompe enlaces peptídicos en el extremo amino de los aminoácidos hidrofóbicos. Marcador de LLA.
CD11a (cadena α de LFA-1)	180 kDa, asociado con CD18 forma la integrina LFA-1; Proteínas transmembrana tipo I.	Linfocitos, neutrófilos, monocitos y macrófagos	Adhesión: unión a ICAM-1 (CD54), ICAM2 e ICAM-3.
CD11b	170 kDa, asociado con CD18 forma la integrina CR3. Proteínas transmembrana tipo I ver CD11a	Granulocitos, monocitos, células NK y subset de LT y LB	Ligando de CD54, iC3b y proteínas de la matriz extracelular.
CD11c (p150,95; CR4)	150 kDa, asociado a CD18 forma integrina CR4. Proteínas transmembrana tipo I ver CD11a	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK y algunos LT y LB	Función similar a CD11b. Une fibrinógeno
CDw12	90-120 kDa	Monocitos, neutrófilos y plaquetas	Desconocida
CD13 (gp150, aminopeptidasa N)	150-170 kDa; Proteínas transmembrana tipo II	Granulocitos, monocitos y células mielomonocíticas	Participa en la explosión oxidativa
CD14 (Mo2; gp55)	53-55 kDa; Proteínas, unida a Proteínas I	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, algunas LB y células dendríticas	Receptor para lipopolisacárido (LPS) y para el complejo LPS-LBP (LPS-binding protein)
CD15 y CD15S (Lewis X y Sialil Lewis X)	Pentasacárido ramificado expresado en glicolípidos y Proteínas de membrana.	Neutrófilos, eosinófilos y monocitos	Forma parte del grupo Sialil Lewis X; ligando para E-selectina (CD62E)
CD15u (Sulphated CD15)			
CD16a CD16b (Fc γ RIII)	50-65 kDa	Células NK, granulocitos y macrófagos	Componente del receptor Fc γ de baja afinidad: ADCC y activación de células NK
CDw17 (lactosilceramida)	Epítipo carboxi-hidratado	Monocitos, neutrófilos y plaquetas	Lactosilceramida
CD18 (β_2 Integrina)	95 kDa; Proteínas transmembrana tipo I.	La misma distribución que CD11a, CD11b y CD11c combinado	Ver CD11a, CD11b y CD11c



CD19	(B4)	95 kDa; Proteínas transmembrana tipo I SFIg	Todos los LB y sus precursores	Forma complejo con CD21 CR2) y CD81 (TAPA-1). Molécula accesoria de transducción de señales en LB
CD20	(B1; Bp35)	Heterodímero de tres cadenas de 33, 35 y 37 kDa; Proteínas transmembrana tipo I. Molécula "tetra-span"	LB	Posible papel en la regulación de la activación de LB.
CD21	(CR2; Receptor de C3d; B2)	145 kDa; Proteínas transmembrana tipo I. SF de proteínas de control del complemento	LB, células dendríticas foliculares, faríngeas y células epiteliales cervicales, algunos timocitos, y algunas LT	Receptor para C3d, también relacionado con el virus de Epstein-Barr. Con CD19 y CD81 forma correceptor de LB
CD22	(BL-CAM)	135 kDa; Proteínas integral de membrana tipo I. SFIg	LB	Participa en la adhesión celular y activación de LB
CD23	(FcεRII)	45 kDa; Proteínas transmembrana tipo II	LB maduras, macrófagos activados, células dendríticas foliculares y plaquetas	Receptor de baja afinidad para IgE. Ligando para los correceptores CD19,CD21, CD81.
CD24		42 kDa; proteína unida a Proteína tipo I	LB y Pre-B, neutrófilos y al menos el 2% de los timocitos	Puede jugar un rol en la inducción de la proliferación y/o diferenciación de LB
CD25	(TAC; IL-2Rα)	α:55 kDa,SP de control del complemento; Proteínas de transmembrana tipo I.	LT activados, LB y monocitos	Cadena α del receptor para la IL-2. El receptor de alta afinidad para la IL-2 está compuesto por las cadenas α (CD25),y β(CD122) y γ(CD132)
CD26	(Dipeptidilpeptidasa IV)	110 kDa; Proteínas transmembrana tipo II	LT y B activados, macrófagos	Dipeptidilpeptidasa IV, Proteasa implicada en el ingreso de VIH a la célula
CD27		110 kDa (55 cada cadena); Proteínas transmembrana tipo I. SP de receptor NGF	LT maduros, timocitos medulares	Participa como señal coestimuladora en la activación de LT y LB
CD28	(Tp44)	44 kDa; Proteínas transmembrana tipo I SFIg	Subpoblación de LT y timocitos. LB activados	Receptor para señal coestimuladora (segunda señal). Ligando de CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2)
CD29	130 kDa (Integrina β ₁)	Leucocitos	Subunidad β ₁ de integrinas.	Asociada a CD49 a forma VLA-1. Adhesión a las proteínas de la matriz extracelular, adhesión célula-célula.
CD30	(Ki-1)	105-120 kDa. Proteínas transmembrana tipo I. SP de receptor NGF	LB y T activados	Se asocia a proliferación celular y muerte celular en líneas celulares de linfomas.



CD31	(PECAM-1)	130-140 kDa; Proteínas transmembrana tipo I. SFIg	Granulocitos, plaquetas, células endoteliales, monocitos	Participa en la adhesión leucocito-endotelio
CD32	(FcγRII)	40 kDa SFIg	Monocitos, granulocitos, LB, eosinófilos	Receptor Fc de IgG; papel en fagocitosis, ADCC
CD33		67 kDa; Proteínas transmembrana tipo I SFIg	Células mieloides y precursores mieloides	Desconocida
CD34		105-120 kDa	“Stem cells” y endotelio capilar	Ligando para CD62 (L-selectina)
CD35	(CR1)	250 kDa SF de proteínas de control del complemento	Monocitos, granulocitos, células dendríticas, eritrocitos, LB y eosinófilos	Unión y fagocitosis de partículas opsonizadas con C3b y C4b
CD36	(GPIV)	58-90 kDa; Proteínas transmembrana tipo III	Monocitos, plaquetas	Adhesión plaquetaria
CD37		40-52 kDa; proteína tipo III Familia “tetra-span”	LB maduros, algunos LT monocitos y granulocitos	Molécula implicada en la transducción de señales
CD38	(T10)	45 kDa; Proteínas transmembrana tipo II	Células plasmáticas, timocitos, LT y B activados	Molécula implicada en la activación y proliferación celular. También se le asocia con el metabolismo del calcio.
CD39		78 kDa	Macrófagos, células dendríticas, LB maduras y células NK activadas	Puede facilitar la adhesión de LB
CD40		Heterodímero de cadenas de 44 y 48 kDa; Proteínas transmembrana tipo I SF de receptor NGF	LB, monocitos, células dendríticas	Receptor para señal coestimuladora para LB; se une al ligando de CD40 (CD40L) presente en LT
CD41	(ProteínasIIb)	Heterodímero de 120 y 23 kDa:	Plaquetas, megacariocitos	Activación y agregación plaquetaria: receptor de fibrinógeno y fibronectina
CD42a	(GPIX)	17-23 kDa	Plaquetas y megacariocitos	Adhesión plaquetaria, unión a factor von Willebrand
CD42b	(GPIb-α)	160kDa (135,23)	Ver CD42a	
CD42c	(GPIb-b)	22 kDa	Ver CD42a	
CD42d	(GPV)	82 kDa	Ver CD42a	
CD43	(Sialoforina,leuco-sialina)	115-135 kDa (neutrófilos) 95-115 kDa (linfocitos T)	Leucocitos (excepto LB en reposo)	Participa en la adhesión y activación de células T. Se une a CD54 (ICAM-1)
CD44	(Pgp-1; Hermes)	80-100 kDa	Leucocitos, eritrocitos	Receptor de ácido hialurónico, involucrado en metástasis tumoral
CD44R	(CD44v; CD44v9)	85-250 kDa	Leucocitos, eritrocitos	Receptor de ácido hialurónico, involucrado en metástasis tumoral



CD45 (T200, B220, antígeno común leucocitario o LCA)	180-240 kDa	Células epiteliales, monocitos y linfocitos activados	Molécula asociada a la adhesión celular de los leucocitos al endotelio y sitios de inflamación
CD45RO	180 kDa	Subpoblación de LT y LB, monocitos y macrofagos	Isoforma de CD45 la cual contiene los exones A,B y C.
CD45RA (B220)	205-220 kDa	LB, subgrupo de LT CD4 y monocitos. Subpoblación de LT, LB, monocitos, macrofagos,	Isoforma de CD45, contiene exón C. Ver CD45
CD45RB	190-220 kDa	granulocitos	Isoforma de CD45, contiene exón B.
CD45RC			Isoforma de, contiene exón C.
CD46 (MCP)	56-66 kDa	Timocitos, leucocitos, células epiteliales fibroblastos, plaquetas	Proteína cofactor de membrana, se une a C3b y C4b para permitir su degradación por factor I
CD47 (Proteínas 47-52; IAP)	47-52 kDa	No tiene tejidos específicos	Puede participar en el flujo de cationes en la membrana. Se asocian a grupo sanguíneo y Rh
CD47R (MEM-133)		Amplia	Desconocida. Denominación antigua: CDw149
CD48 (BLAST-1)	40-47 kDa; Proteínas unida a Proteínas I	Leucocitos, epitelio bronquial y glándulas salivares	Participa en la adhesión celular vía CD2
CD49a (VLA-1),	210 kDa integrina $\alpha 1$	LT y B activados, monocitos, endotelio neurovascular	Adhesión a colágeno, laminina. Se asocia a CD29
CD49b (VLA-2; gp1a)	160-170 kDa; Proteínas transmembrana tipo I. integrina $\alpha 2$	Plaquetas, LT y B, fibroblastos y células endoteliales	Adhesión a la matriz extracelular: receptor para colágeno. Se asocia a CD29, se une a colágeno y laminina
CD49c (VLA-3)	125 kDa; Proteínas transmembrana tipo I. Integrina $\alpha 3$ membranas basales	LB, glomérulos renales, tiroides y algunas y laminina	Adhesión a fibronectina, laminina. Se asocia a CD29, se une a colágeno
CD49d (VLA-4)	150 kDa(integrina $\alpha 4$)	LT, B, NK, monocitos, eosinófilos, eritroblastos, timocitos y cultivos mieloides	Adhesión a fibronectina, se asocia a CD29, HEV de placas de Peyer y UCAM-1
CD49e (VLA-5)	Dímero de 125 y 35 kDa, asociado a CD29. Integrina $\alpha 5$.	Monocitos, neutrófilos, leucocitos, fibroblastos, plaquetas, mieloblastos y LT de memoria	Adhesión a fibronectina. Se une a CD29
CD49f (VLA-6)	Dímero de 125 y 25 kDa asociado a CD29 Integrina $\alpha 6$	Plaquetas, macrófagos, monocitos, timocitos, LT de memoria	Adhesión a la matriz extracelular: receptor para aminina. Se asocia a CD29



CD50	(ICAM-3)	108-140 kDa; proteína transmembrana tipo Y	Timocitos, LT, B, monocitos y granulocitos	Ligando para CD11a/CD18 (LFA-1)
CD51	(cadena α del receptor de vitronectina)	Heterodímero de 120 y 24 kDa	Células endoteliales, monocitos, macrófagos, plaquetas, algunas células B, osteoclastos y células uterinas	Adhesión: receptor para vitronectina, fibrinógeno, factor von Willebrand y trombospodina. Se asocia a CD61
CD52	(CAMPATH-1)	21-28 kDa	Leucocitos	Blanco para inmunoterapia, mitogénico
CD53	(OX-44; MEM-53)	35-42 kDa; proteína tipo III	Leucocitos, plaquetas, osteoblastos y osteoclastos	Transducción de señales
CD54	(ICAM-1)	85-110 kDa; Proteínas transmembrana tipo I SFIg	Leucocitos y células endoteliales	Adhesión: ligando para CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (Mac-1). Receptor para rinovirus
CD55	(DAF)	70-73 kDa; Proteínas transmembrana unida a Proteínas I	Todas las células hematoyéticas (incluidos los eritrocitos)y no hematopoyéticas	Regulación de la activación del complemento, DAF ("decay accelerating factor"), se une a C3b, desensambla convertasas de C3 y de C5.
CD56	(Leu-19)	Heterodímero de 135 y 220 kDa	Células NK, células embrionarias, mieloblastos, astrocitos, epitelio tiroideo y subgrupo de LT	Adhesión homotípica: isoforma de moléculas de adhesión de células neurales (NCAM)
CD57	(HNK-1; Leu-7)	110 kDa. Oligosacarido presente en glicoproteínas	Células NK, algunos LT, unos pocos LB y monocitos	Desconocida
CD58	(LFA-3)	55-70 kDa; proteína de transmembrana tipo I o unida a Proteínas I	Muchas células hematopoyéticas y fibroblastos	Adhesión: ligando de CD2
CD59	(MEM-43; LY6; MIRL)	19 kDa; Proteínas unida a proteínas I	Muchas células hematopoyéticas incluidos glóbulos rojos, endotelio vascular, células epiteliales y placenta	Regulación de la acción del complemento (formación MAC); se une a C8 y C9.
CD60a	(GD3)	Olígosacarido presente en glucosidos	Subgrupo de LT, algunos monocitos y plaquetas	Anticuerpos anti-CD60 proporcionan una Señal coestimuladora para LT.
CD60b	(9-O-acetyl-GD3)	Olígosacarido presente en glucosidos	Subgrupo de LT, algunos monocitos y plaquetas	Anticuerpos anti-CD60 proporcionan una Señal coestimuladora para LT.
CD60c	(7-O-acetyl-GD3)	Olígosacarido presente en glucosidos	Subgrupo de LT, algunos monocitos y plaquetas	Anticuerpos anti-CD60 proporcionan una Señal coestimuladora para LT.
CD61	(ProteínasIIIa)	105 kDa	Plaquetas, macrófagos megacariocitos, células endoteliales, osteoclastos y células uterinas	Desconocida. Se une a CD51 y CD41
CD62E	(ELAM-1; E-selectina)	140 kDa, lectina tipo C	Endotelio	Adhesión de leucocitos al endotelio; se liga a sialil Lewis x, media el "rolling" de los neutrófilos



CD62L (LAM-1; L-selectina)	150 kDa, lectina tipo C	LB, T, y otros leucocitos	Adhesión de leucocitos al endotelio; se une a CD34, glyCAM-1, media "rolling" de neutrófilos
CD62P (P-selectina;GMP-140), PADGEM	140 kDa, lectina tipo C	Plaquetas activadas, células endoteliales y megacariocitos	Adhesión de monocitos y neutrófilos a plaquetas activadas y células endoteliales, se liga a sialil Lewis x
CD63 (gp53, PMT)	53 kDa	Plaquetas activadas, monocitos, macrófagos, células endoteliales	Facilita la adhesión al endotelio activado, proteína lisosomal translocada a superficie post activación
CD64 (FcγRI)	72 kDa; Proteínas transmembrana tipo I. SFIg	Monocitos, macrófagos, y neutrófilos activados	Receptor Fcγ de alta afinidad: participa en la fagocitosis, ADCC, y activación de macrófagos
CD65 (VIM-2)	Carbohidrato, componente de ceramida dodesacárido	Células mieloides, y algunas células monocíticas, granulocitos	Participa en la activación de neutrófilos
CD65s (sialil-CD65)		Células mieloides, y algunas células monocíticas, granulocitos	Anticuerpos anti-CD65s inhiben fagocitosis
CD66 a,b,c,d,e	220 kDa, Proteínas fosforilada, existen variantes (CD66a - CD 66e)	Granulocitos, neutrofilos. c y e: carcinoma de colon e: epitelio de colon adulto	Participan en la adhesión. Miembro de la familia antígeno carcinoembrionario El CD67 ha sido definido como CD66b
CD68 (KPI)	110 kDa, proteína intracelular, macrosialina	Monocitos, macrófagos, neutrófilo, linfocitos grandes, basófilos	Molécula inductora de activación.
CD69 (AIM)	Homodímeros de 28-34 kDa, Proteínas fosforilada	LT y B activados, macrófagos y células NK	Desconocida. Antígeno de activación temprano
CD70 (Ki-24)	70, 95, 170 kDa	LB y T activados. Macrófagos	Ligando para CD27
CD71 (T9; receptor de	Homodímero de 90-95 kDa; Proteínas transmembrana tipo II	LB y T activados, macrófagos y células proliferativas	Receptor para transferrina: participa en el metabolismo de hierro, crecimiento celular
CD72 (Lyb-2 (ratón), lectina tipo C)	Homodímero de 42 kDa	LB	Ligando para CD5: interacción de LT-LB
CD73 (Ecto-5'-nucleotidasa)	69 kDa; Proteínas de membrana unida a Proteínas I	Algunos LB, T, timocitos, algunas células epiteliales y endoteliales y células dendríticas	Regula el metabolismo de nucleotidos, defosforilandoslos para permitir su liberación
CD74 (cadena MHC clase II invariante (g))	33/35/41 kDa; Proteínas de transmembrana tipo II	LB, monocitos, células dendríticas y LT activadas, macrófagos, células MHC clase II.	Asociado con moléculas de MHC clase II recientemente sintetizadas
CD75 (Lactosaminas)	53 y 87 kDa	LB maduros y algunos LT	Adhesión celular. Ligando para CD22
CD75s (Alpha-2,6 sialylated lactosamines)			



CD77	(Gb3, Grupo sanguíneo Pk)	Epítipo carbohidratado	Células B de centro germinal	Puede actuar como receptor de verotoxina de <i>E. coli</i> y toxina Shiga de <i>S. Dysenteriae</i>
CD79a	(Ig α , MB1)	33-33 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	LB	Molécula accesoria que media la expresión de Ig y la transducción de señales
CD79b (Ig β , B29, IgSF)		37-39 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	LB	Ver CD79a
CD80	(B7; B7-1; BB1)	60 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	Células dendríticas, LB activados y macrófagos	Coestimulador para la activación de linfocitos T; ligando para CD28 y CTLA-4 (CD152)
CD81	(TAPA-1, tetraspasmina)	22 kDa; molécula tipo III	Variados grupos celulares, incluyendo linfocitos	Asociado a CD19 y CD21. Participa en la activación de LB
CD82	(R2)	50-53 kDa; Proteínas transmembrana tipo III	Epitelio, endotelio y linfocitos activados, leucocitos	Transducción de señales
CD83	(HB15)	40-43 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	Algunas líneas celulares B y T activadas, células dendríticas circulantes	Puede participar en la presentación antigénica
CD84	(2G7, Gr6)	73 kDa	Monocitos, linfocitos B circulantes, plaquetas	Desconocida
CD85	(GR4)	120 kDa	Células plasmáticas y dendríticas, LB y monocitos	Existe evidencia de que CD85 participa en la activación de LT. Pertenecer a la familia ILT/LIR
CD86	(FUN-1, GR65, B7-2, B70)	80 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	LB activados, células dendríticas y monocitos	Su unión a CD28 presente en los LT induce una señal coestimuladora mientras que su unión a CD152 (CTLA-4) induce una señal inhibitoria
CD87	(UPA-R)	50-65 kDa; Proteínas unida a Proteínas I	LT activados, monocitos y neutrófilos activados	Receptor para el activador del plasminógeno tipo uroquinasa
CD88	(C5a-R)	40 kDa. SF Rodopsina	Neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, células mastoides	Receptor para el componente del complemento C5a: participa en la inflamación por complemento
CD89	(Fc α R)	50-70 kDa; Proteínas transmembrana tipo I SFIg	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, y algunos LT y B	Citotoxicidad dependiente de IgA (receptor de IgA)
CD90	(Thy-1)	25-35 kDa; proteína unida a Proteínas I SFIg	Timocitos, LT periféricas (ratón), neuronas, protimocitos CD34+	Marcador para LT; rol en la activación de LT
CD91	(α_2 M-R)	600/G kDa (515/85)	Monocitos	Receptor para α_2 -macroglobulina



CD92 (GR9)	70 kDa	Neutrófilos, plaquetas y monocitos	Desconocida
CD93 (GR11)	120 kDa	Neutrófilos, monocitos y células endoteliales	Desconocida
CD94 (Kp43)	Dímero de 43 kDa cada unidad	Células NK y unas pocas LT	El CD94 está implicado en la inhibición de la célula NK
CD95 (APO-1; Antígeno FAS)	42 kDa; proteína de transmembrana tipo I	LT y líneas celulares mieloides	Participa en la muerte celular programada, ligando tipo TNF
CD96 (Tactile)	Formas de 160 kDa; proteína transmembrana tipo I	LT activados	Desconocida
CD97 (GR1)	Formas de 74, 80, 90 kDa	Monocitos y granulocitos maduros células activadas	Niveles altos de expresión de CD97 han sido encontrados en sitios de inflamación como piel y pulmones.
CD98 (4F2, 2F3)	Dímero de 40 y 80 kDa cada subunidad; Proteínas transmembrana tipo II	Monocitos, células endoteliales, LT, B, NK	Involucrado en la activación celular. Potencial transportador de aminoácidos
CD99 (E2; MIC2)	33 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	Timocitos, linfocitos periféricos y células mieloides	Desconocida
CD100 (BB188, CrR3)	150 kDa	LT, B, NK, macrófagos, monocitos, avisa la expresión en células hematopoyéticas	Asociada a actividad AT Pasa y serina quinasa. Coestimula con PMA, CD3 y CD2 para inducir proliferación de LT
CD101 (BB27; BA27, BPC#4)	Dímero de subunidades de 140 kDa	Granulocitos, monocitos y algunos LT	Anticuerpos anti-CD101 inhiben la respuesta T alogénica
CD102 (ICAM-2)	55-65 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	Células endoteliales, monocitos y otros leucocitos	Ligando para integrina CD11a/CD18 (LFA-1) pero no para CD11b/CD18 (Mac-1)
CD103 (HLM-1)	Dímero de subunidades de 150 y 25 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	Linfocitos intra-epiteliales 2-6% linfocitos periféricos, y otros tipos celulares	Junto con la integrina β_7 , forma un receptor que facilita la adhesión al endotelio
CD104 (Integrina β_4)	220 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	Epitelio, timocitos, unas pocas células neuronales, linfocitos, células tumorales	Forma parte de un receptor para laminina, facilitando la adhesión de células a la matriz extracelular
CD105 (Endoglina)	Dímero de 95 kDa; Proteínas transmembrana tipo II	Células epiteliales, macrófagos activados in vitro, células endoteliales subet de células de médula ósea	Jugaría un papel en la adhesión.
CD106 (VCAM-1, IgSF)	90-110 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	Células endoteliales activadas, macrófagos, células dendríticas, estroma medular	Receptor para la integrina VLA-4: rol en la adhesión, activación linfocítica, hematopoyesis
CD107a (LAMP-1)	110 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	Plaquetas activadas	Proteína lisosomal de función desconocida



CD107b (LAMP-2)	120 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	Plaquetas activadas	Proteína lisosomal de función desconocida
CD108 (GR2)	75-83 kDa; Proteínas de membrana unida a Proteínas I	LT activados, algunas células estromales	Posible función en la adhesión celular
CD109 (GR56)	170/150 KDa; Proteínas de membrana unida a Proteínas I	LT activados, plaquetas activadas y células endoteliales	Desconocida
CD110 (MPL, TPO R)	70-95 KDa	“stem cells”, plaquetas y megacariocitos	Receptores para la eritropoyetina
CD111 (PRR1/Nectin1)		Células mieloides	
CD112 (PRR2)	64-72 kDa	Células mieloides, neuronales, epiteliales y endoteliales	Molécula de adhesión intercelular. Receptor 2 relacionado con el poliovirus (PRR2)
CD114 (G-CSFR, CSF3R, HG-CSFR)	130 kDa	Monocitos, granulocitos, plaquetas y células endoteliales	Receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF)
CD115 (c-fms)	150 kDa; Proteínas transmembrana tipo I. SFIg	Placenta, macrófagos, monocitos y sus precursores	Receptor del factor estimulador de colonias de monocitos (M-CSF)
CD116 (GM-CSFR α)	70-85 kDa	Monocitos, granulocitos, células endoteliales, células dendríticas y fibroblastos	Cadena α del receptor de GM-CSF (CSF-R)
CD117 (c-kit)	145 kDa; Proteínas Transmembrana tipo I SFIg	Progenitores hematopoyéticos, células mastoides, melanocitos y algunas células NK	Receptor de factor “stem cell” (SCF)
CD118 (INF α, β R)		Amplio espectro celular	Receptor del interferón β y α
CD119 (IFN- γ R)	90-100 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	Macrófagos, monocitos, LB, células epiteliales, endotelio y fibroblastos	Receptor de IFN- γ
CD120a (TNFR1)	50-60 kDa	Muchos tipos celulares, mayor expresión en células epiteliales	Receptor de TNF α y β
CD120b (TNFR2)	75 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	Muchos tipos celulares, mayor expresión en células mieloides	Receptor de TNF α y β
CD121a (IL-1R, tipo I)	80 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	LT, timocitos, condrocitos, células sinoviales, hepatocitos, fibroblastos	Receptor para IL-1 Tipo I, se une a IL-1 α y β
CDw121b (IL-1R, tipo II)	68 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	LB, monocitos y macrófagos	Receptor para IL-1 Tipo II, se une a IL-1 α y β
CD122 (IL-2R β)	75 kDa; proteína transmembrana tipo I	LT en reposo, LB (algunas líneas), monocitos, y células NK	Cadena β del receptor de IL-2
CD123 (IL-3R)	70 kDa	Células troncales de médula ósea, granulocitos, monocitos, megacariocitos	cadena α + del receptor de la IL-3



CD124 (IL-4R)	130-150 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	LB maduras, LT, epitelio, endotelio, precursores hemopoyéticos y fibroblastos	Receptor de IL-4
CDw125 (IL-5R)	55-60 kDa	Eosinófilos y basófilos	Receptor de IL-5
CD126 (IL-6R)	80 kDa; proteína transmembrana tipo I	Células plasmáticas, leucocitos, células epiteliales, fibroblastos, células nerviosas y hepatocitos	Receptor de IL-6, subunidad α
CD127 (IL-7R, superfamilias de fibronectina tipo II)	75 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	Precusores de LB, timocitos, LT maduros y monocitos	Receptor de IL-7
CDw128a (IL-8RA, CXCR1)	58-67 kDa	Neutrófilos, basófilos, Monocitos y algunos LT	Receptor A de IL-8
CDw128b (IL-8RB, CXCR2)	58-67 kDa	Neutrófilos, basófilos, monocitos, y algunos LT	Receptor B de IL-8
CD130 (gp130, IL-6R β)	130-140 kDa; Proteínas transmembrana tipo I	La mayoría de los leucocitos, células epiteliales, fibroblastos, hepatocitos y células nerviosas, células endoteliales, LB activados y plasmocitos	Receptor de IL-6, subunidad β
CDw131	120 kDa	Células mieloides	Cadena β común de para receptor IL-3, IL-5 y GM-CSF
CD132 (Cadena γ común)	64 kDa	LT, LB, células NK, monocitos y granulocitos “stem cells”	Cadena γ común de receptores para IL-2,IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15
CD133 (AC133)			
CD134	48-50 kDa	Subpoblación de LT activados	Adhesión de LT activados. Ligando de gp34
CD135 (Flt3/Flk2)	130-150 kDa	Subpoblación de células progenitoras	Receptor de tirosina quinasa y factor de crecimiento
CDw136 (MSP-R)	180 kDa	Tejidos epiteliales	Receptor de proteína estimulante de macrófagos
Cdw137 (4-1BB)	30 kDa	Subpoblación de LT	Participa como molécula coestimuladora en la activación de LT.
CD138 (SYNDECAN-1)	20 kDa	Plasmocitos, células epiteliales	Ligando para colágeno tipo I
CD139	209,228 kDa	LB de centros germinales	Desconocida
CD140a	180 kDa	Indetectable en la mayoría de las células normales	Receptor α de PDGF
CD140b	180 kDa	Subpoblación de células endoteliales, células estromales,	Receptor β de PDGF
CD141 (Trombomodulina)	100 kDa	Células endoteliales	Participa en la regulación de la coagulación



CD142 (Factor tisular)	45 kDa	Monocitos activados, células endoteliales activados	El complejo CD142:VIIa inicia la cascada de coagulación
CD143 (ACE)	170 kDa	Subpoblación de células endoteliales	Enzima convertidora de angiotensina (ACE)
CD144 (VE-Cadhesina)	135 kDa	Células endoteliales	Molécula de Adhesión
CDw145	25,90,110 kDa	Células endoteliales, algunas células estromales	Desconocida
CD146 (MUC18/S-endo)	118 kDa	Células endoteliales, LT activados	Participa en la adhesión de LT activados
CD147 (Neurotelina/Basigina)	50-60 kDa	Células endoteliales, monocitos, subpoblación de LT, plaquetas, eritrocitos	Potencial molécula de adhesión
CD148 (HPTP-ETA/DEP-1)		Células hematopoyéticas	Desconocida. Tyrosina phosphatasa RPTPasa, tipo III
CD150 (IPO-3/SLAM)	75-95 kDa	LT, LB, timocitos	Molécula coestimuladora para LB y células dendríticas.
CD151 (PETA-3)	27 kDa	Plaquetas, células endoteliales	Desconocida
CD152 (Proteína-4 asociada a LT citotóxicos o CTLA-4)	44 kDa	LT activados, algunos LB activados	Ligando de CD80 y CD86. Regulador negativo de la activación de los LT
CD153 (CD30L)	40 kDa	LT activados	Ligando de CD30 (CD30L). Función desconocida
CD154 (CD40L)	33 kDa	LT activados, mastocitos, basófilos	Ligando de CD40 (CD40L).
CD155	80-90 kDa	Monocitos, macrófagos, timocitos	Receptor del virus polio (PVR)
CD156a (ADAM-8)	60 kDa	Monocitos, macrófagos, granulocitos	Desconocida
CD156b (TACE/ADAM17)	100-120 kDa	Amplia expresión celular	Proteasa dependiente de Zn. Libera las formas solubles de TNF y TGF- α
CD157 (BST-1)	42-45 kDa	Monocitos, neutrófilos, células endoteliales	Esta molécula tiene actividad de ADP-ribosil ciclase y ADP-ribosa hidrolasa cíclica
CD158		Células NK	Proteína perteneciente a la familia KIR ("Killer cell immunoglobulin (Ig)-like receptors") presente en las células NK
CD158a (p58.1, p50.1)	50-58 kDa	Células NK, subpoblación de LT	Regulación de actividad de las células NK
CD158b (p58.2, p50.2)	50-58 kDa	Células NK, subpoblación de LT	Regulación de actividad de las células NK
CD158c (p58.3, p50.3)	50-58 kDa	Células NK, subpoblación de LT	Regulación de actividad de las células NK
CD159a (NKG2A)		Células NK	



CD160 (BY55)	27 kDa. Glicoptoteína	Células NK y LT CD8+ citotóxicos	Función desconocida. Se encuentra alterada en Hemoglobinuria nocturna paroxística
CD161 (NKR-P1)	60 kDa	Células NK, subpoblación de LT	Regulación de citotoxicidad mediada por células NK
CD162 (PSGL-1)	110 kDa	LT, subpoblación de LB, granulocitos, monocitos	Molécula de adhesión. Ligando de la P-selectina
CD162R (PEN5)		Células NK	Desconocida
CD163 (KiM4)	130 kDa	Monocitos	Desconocida
CD164 (MGC-24)	80 kDa	LT, monocitos, granulocitos, subpoblación de LB, células progenitoras	Molécula de adhesión
CD165 (AD2/gp37)	37 kDa	Células epiteliales tímicas	Molécula implicada en la adhesión timocito-epitelio tímico
CD166 (ALCAM)	100 kDa	Linfocitos T y B activados, células endoteliales, fibroblastos	Molécula de adhesión. Ligando de CD6
CD167a (DDR1)		Células epiteliales	Receptor tirosina quinasa. Es activado por colágeno
CD168 (RHAMM)			Adhesión
CD169 (Sialoadhesina)			Adhesión
CD170 (Siglec-5)			Adhesión
CD171 (L1)	140-230 kDa	Células epiteliales y mielomonocíticas y subsets de LT y LB	Molécula de adhesión implicada en la neurohistogénesis
CD172a (SIRP alpha)			Adhesión
CD173 (Grupo de sangre H tipo 2)			Desconocida
CD174 (Lewis y)			Desconocida
CD175 (Tn)			Desconocida
CD175s (Sialyl-Tn)			Desconocida
CD176 (TF)		Células mieloides	Desconocida
CD177 (NB1)		Linfocitos	Molécula implicada en la muerte celular programada
CD178 (Ligando del Fas)			
CD179a (Vpre-B)	16-18 kDa	Linfocitos pro-B y pre-B	Se une a CD179b para conformar la cadena liviana necesaria para la constitución del receptor de la célula B (BCR)



CD179b (Lambda 5)	22 kDa	Linfocitos pro-B y pre-B	Se une a CD179a para conformar la cadena liviana necesaria para la constitución del receptor de la célula B (BCR)
CD180 (RP105)	95-105 kDa	Linfocitos B, monocitos y células dendríticas	Participa en el reconocimiento de LPS
CD183 (CXCR3)	41 kDa	LT y subsets de LB y NK	Receptor para quimoquinas CXC como IP10, Mig y I-TAC. Se expresa en LT presentes en los sitios de inflamación. Efecto quimiotáctico
CD184 (CXCR4)		LT y subsets de LB y NK	Receptor para quimoquinas CXC.
CD195 (CCR5)		LT	Receptor para quimoquinas CC
CDw197 (CCR7)		LT	Receptor para quimoquinas CC
CD200 (OX2)			Desconocida
CD201 (EPC R)		Células endoteliales	Desconocida
CD202b (Tie2, Tek)		Células endoteliales	Desconocida
CD203c (NPP3, PDNP3)	270 kDa	Células mieloides basófilos	Enzima que cataliza la hidrólisis de oligonucleótidos.
CD204 (“Macrophage scavenger R”)		Células mieloides	
CD205 (DEC205)		Células dendríticas	
CD206 (“Macrophage mannose R”)		Células dendríticas	
CD207 (Langerin)		Células dendríticas	
CD208 (DC-LAMP)		Células dendríticas	
CD209 (DC-SIGN)		Células dendríticas	
CDw210 (IL-10 R)			Receptor de la IL-10
CD212 (IL-12 R)			Receptor de la IL-12
CD213a1 (IL-13 R α 1)			Receptor α 1 de la IL-13
CD213a2 (IL-13 R α 2)			Receptor α 2 de la IL-13
CDw217 (IL-17 R)			Receptor de la IL-17
CD220 (Insulina R)			Receptor de la insulina
CD221 (IGF1 R)			Receptor de IGF1
CD222 (“Mannose-6-phosphate”, IGF2 R)	250-300 kDa		Molécula involucrada en la internalización de proteínas y enzimas hacia los lisosomas.
CD223 (LAG-3)			
CD224 (Gamma-glutamyl transferasa)			



CD225	(Leu13)			
CD226	(DNAM-1, PTA1)	65 kDa. Glicoproteína	Células NK, plaquetas, monocitos y un subset de LT	Adhesión celular
CD227	(MUC.1)	220-350 kDa	Células epiteliales	Adhesión y señalización celular
CD228	(Melanotransferrina)			
CD229	(Ly9)			
CD230	(Proteína Prion)			
CD231	(TALLA-1/A15)		LT de la LLA-T	Función desconocida. Es un marcador específico para la LLA-T
CD232	(VESPR)			
CD233	(Band 3)		Células eritroides	
CD234	(“Fy-glycoprotein” o DARC)		Células eritroides	
CD235a	(Glicoforina A)		Células eritroides	
CD235b	(Glicoforina B)		Células eritroides	
CD235ab	(Glicoforina A/B)		Células eritroides	
CD236	(Glicoforina C/D)		Células eritroides	
CD236R	(Glicoforina C)		Células eritroides	
CD238	(Kell)		Células eritroides	
CD239	(B-CAM)		Células eritroides	
CD240CE	(Rh30CE)		Células eritroides	
CD240D	(Rh30D)		Células eritroides	
CD240DCE	(Rh30D/CE)		Células eritroides	
CD241	(RhAg)		Células eritroides	
CD242	(ICAM-4)		Células eritroides	
CD243	(MDR-1)		“Stem cells”	
CD244	(2B4)		Células NK	
CD245	(p220/240)		Linfocitos T	
CD246	(“Anaplastic lymphoma kinase”)		Linfocitos T	
CD247	(Zeta chain)		Linfocitos T	

AcMo, anticuerpo monoclonal; *ADCC*, citotoxicidad dependiente de anticuerpo; β_2m , Beta 2 microglobulina; *CFS*, factor estimulador de colonias; , cromosoma; *GM*, granulocito-monocito; Proteínas, glicoproteína; *ProteínasI*, glicofosfatidilinositol; HEV, vénula de endotelio columnar; *INF g*, interferón gama; *IL*, interleuquina; LB, linfocito B; LT, linfocito T; *MAC*, complejo de ataque a membrana; *M*, monocito; SF, superfamilia; SFIg, superfamilia de las inmunoglobulinas; *TNF*, factor de necrosis tumoral.



Actualmente se sabe que la mayoría de las moléculas CD reconocidas por anticuerpos monoclonales murinos se expresan en más de una línea celular hematopoyética. Otras moléculas CD también son expresadas por células no hematopoyéticas (ej. células endoteliales, células estromales) que son fundamentales en las respuestas inmune y/o inflamatoria.

2. ESTRUCTURA DE LOS ANTÍGENOS DE MEMBRANA

Las proteínas de membrana se clasifican en cuatro grupos, dependiendo de la orientación de la molécula en la membrana plasmática o de su unión a ella.

2.1. Proteínas de transmembrana tipo I

Las proteínas de transmembrana tipo I tienen el extremo carboxilo en el interior de la célula y el extremo amino en el exterior de la misma (figura 46-1).

Generalmente estas proteínas tienen una secuencia señal en el extremo amino, la que es removida luego que la molécula entra al retículo endoplásmico. Posteriormente, si presenta sitios de glicosilación, puede ser glicosilada en el aparato de Golgi y expresada en la superficie celular.

La mayoría de las moléculas CD son glicoproteínas de transmembrana tipo I. Estas pro-

teínas generalmente participan como receptores de superficie celular y/o ligandos. Varias de ellas pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (SFIg), como por ejemplo las moléculas CD2, CD4, CD8 y CD19.

Las proteínas de transmembrana tipo I, generalmente presentan un dominio de transmembrana de aproximadamente 25 aminoácidos hidrofóbicos, seguido por un grupo de aminoácidos básicos. Estos aminoácidos con carga positiva permiten la unión de estas proteínas a las cargas negativas de los fosfolípidos aniónicos ubicados en la capa interna de la membrana celular.

El dominio de transmembrana no contiene algunos aminoácidos como arginina, asparragina, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, histidina o lisina, excepto cuando está asociado con el dominio de transmembrana de otras proteínas de membrana, formando un complejo multimérico. Por ejemplo, las proteínas del complejo CD3 y las dos proteínas del TCR (ver capítulo 7).

2.2. Proteínas de transmembrana tipo II

Las proteínas de transmembrana tipo II tienen una orientación opuesta a las proteínas de transmembrana tipo I. El extremo amino se encuentra en el interior de la célula y el extremo carboxilo en el exterior de la misma (figura 46-2). Entre las moléculas CD que presentan esta estructura se encuentran CD10, CD13, CD23 y CD26.

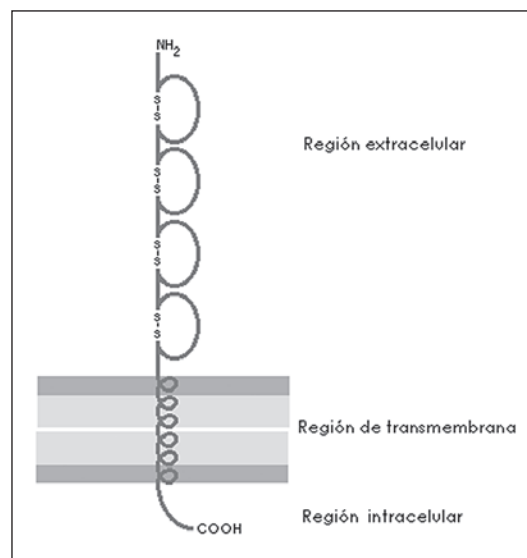


Figura 46-1. Esquema de una proteína de transmembrana tipo I. Estas proteínas tienen el extremo carboxilo orientado hacia el interior y el extremo amino hacia el exterior de la célula. Como ejemplo se muestra la molécula CD4.

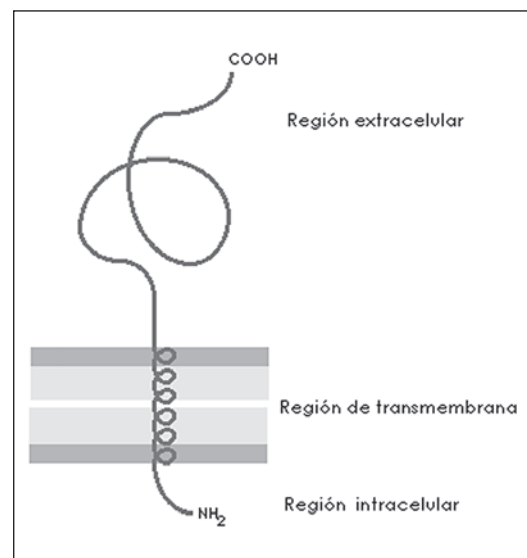


Figura 46-2. Esquema de las proteínas de transmembrana tipo II. Estas proteínas presentan su extremo amino orientado hacia el interior de la célula y el extremo carboxilo hacia el exterior de la misma, respectivamente.



Estas proteínas a menudo presentan secuencias señal para dominios de transmembrana que no han sido removidas lo que permite su remoción y liberación de la superficie celular. Así, estas proteínas se pueden comportar tanto como antígenos de superficie y proteínas plasmáticas.

2.3. Proteínas de transmembrana tipo III

Las proteínas de transmembrana tipo III cruzan la membrana celular más de una vez, pudiendo presentar el extremo carboxilo en el interior de la célula y el extremo amino en el exterior de la misma, o bien ambos extremos en el interior de la célula (figura 46-3). Entre las moléculas CD que presentan esta estructura están: CD9, CD20, CD36, CD37, CD53, CD63 y CD81.

La característica de cruzar más de una vez la membrana, permite a estas proteínas formar ca-

nales a través de la bicapa lipídica, para transporte de iones o moléculas pequeñas.

Un subgrupo de este tipo de proteínas de transmembrana es la denominada “tetra-span family” las cuales se caracterizan por cruzar cuatro veces la membrana y presentar ambos extremos de la molécula hacia el interior de la célula. Un ejemplo de esta familia de moléculas es el CD9.

2.4. Proteínas unidas a glicofosfatidilinositol

Este tipo de proteínas está totalmente expuesto en el exterior de la célula y se une a la bicapa lipídica a través de una unión covalente (vía un oligosacárido específico) a fosfatidilinositol ubicado en la cara externa de la membrana. A esta unión se le llama glicofosfatidilinositol (figura 46-4). Entre las proteínas que presentan esta estructura se encuentran las moléculas CD14, CD24, CD48, CD58 y CD87.

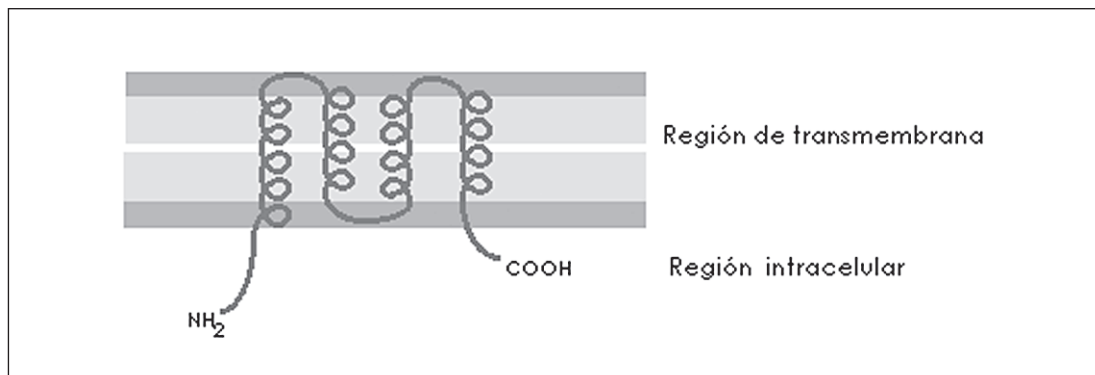


Figura 46-3. Esquema de proteína de transmembrana tipo III. Estas proteínas cruzan la membrana celular más de una vez y pueden presentar sus extremos carboxilo y amino en dos orientaciones: a) El extremo carboxilo en el interior de la célula y el extremo amino en el exterior de la misma, y b) ambos extremos en el interior de la célula.

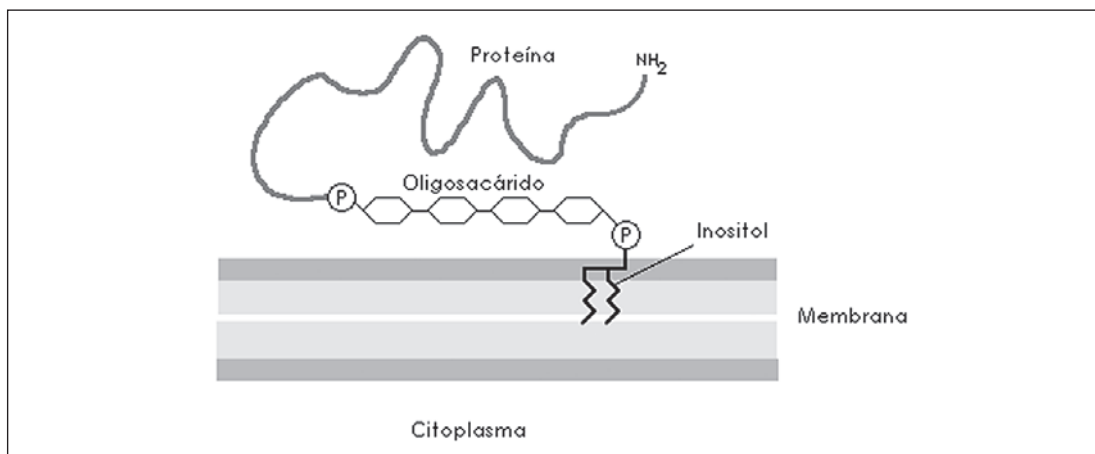


Figura 46-4. Esquema de proteínas ancladas a glicofosfatidilinositol. Este tipo de proteínas se une a la bicapa lipídica de la membrana celular a través de glicofosfatidilinositol (GPI).



Inmediatamente después de finalizada la síntesis proteica, la proteína precursora permanece unida a la membrana del retículo endoplásmico a través de una secuencia de 15-20 aminoácidos hidrofóbicos en su extremo carboxilo mientras que el resto de la proteína se ubica en el lumen del organelo. Inmediatamente, una enzima corta la proteína liberándola del segmento hidrofóbico unido a la membrana mientras que el nuevo extremo carboxilo se une a un grupo amino de una molécula GPI previamente formada.

3. MOLÉCULAS CD ASOCIADAS A LÍNEAS CELULARES

Una de las utilidades de las moléculas CD ha sido el reconocimiento del linaje celular y el estadio madurativo de las células hematopoyéticas, particularmente de los leucocitos. Así por ejemplo el antígeno CD3 identifica a los LT, CD20 a los LB, CD66 de los granulocitos y CD61 a las plaquetas. Sin embargo, la mayoría de los antígenos son expresados en diferente cantidad por varios tipos de células; para la identificación de algunos tipos celulares se requiere la identificación de dos o más antígenos, lo que actualmente se realiza por citometría de flujo (ver capítulo 31). En el capítulo 12 se describe las moléculas CD asociadas a la ontogenia de las células B y T. En el estudio de las leucemias agudas, linfomas, e inmunodeficiencias, es particularmente importante conocer la línea celular afectada.

Además de las moléculas CD asociadas, preferentemente, a ciertas líneas celulares en particular, se han identificado moléculas CD asociadas a la activación de LB, LT y plaquetas.

3.1. Moléculas CD expresadas principalmente en "stem cells"

Molécula CD34. La molécula CD34 es el principal marcador utilizado en el reconocimiento de las células progenitoras hematopoyéticas o "stem cells". Se trata de una sialoglicoproteína de transmembrana de 105-120 kDa (reducida). Forma parte de la familia "cell surface mucin" junto a las moléculas CD43 y CD68. La molécula CD34 es potencialmente adhesiva y probablemente interactúa con CD62E (E-selectina) y CD62L (L-selectina).

Las "stem cells" representan un pequeño porcentaje de las células de la médula ósea y sangre periférica. También se encuentran en el hígado fe-

tal. Actualmente, estas células son utilizadas en trasplantes las cuales son obtenidas a partir de sangre periférica, realizando leucoféresis y seleccionando las células CD34+.

3.2. Moléculas CD expresadas principalmente en linfocitos B

Molécula CD10. La molécula CD10, también conocida como CALLA ("common acute lymphocytic leukemia antigen") tiene un peso molecular de 10 kDa y es miembro de una familia de peptidasas de superficie celular.

Molécula CD19. La molécula CD19 es una glicoproteína de transmembrana tipo I de 95 kDa (reducida). Es miembro de la SFIg; los dos dominios extracelulares que presenta son del tipo inmunoglobulinas.

Su expresión está restringida a las células B normales y neoplásicas. Se expresa desde el estadio de célula pre-B a célula plasmática.

Se asocia no covalentemente con CD21, CD81 y Leu-3; formando un complejo que en forma independiente del BCR (ver capítulo 6) participa en la transducción de señales.

Molécula CD20. La molécula CD20 se encuentra en todas las células B y en algunos precursores de LT. Es una fosfoproteína que se expresa en tres isoformas (33, 35 y 37 kDa) como consecuencia de una diferente fosforilación de las serinas y treoninas existentes en los extremos de la molécula. Esta molécula presenta cuatro dominios transmembrana y los extremos amino y carboxilo se encuentran en el citoplasma. A pesar de su disposición en la membrana, esta molécula no integra la familia "tetra-spans". Su estructura sugiere que podría actuar como canal iónico, particularmente de Ca^{2+} .

Molécula CD21. La molécula CD21 se expresa en una subpoblación de células B. Es una glicoproteína de transmembrana tipo I (140 kDa) que presenta 15 ó 16 dominios de 60-70 aminoácidos (extracelular), seguido por un dominio de transmembrana y 34 aminoácidos intracitoplasmáticos.

La molécula CD21 es el receptor de los fragmentos C3d (CR2), C3dg e iC3b del complemento. A través de un dominio de unión diferente actúa como receptor del virus Epstein-Barr. Es miembro de la familia génica de



reguladores de la activación del complemento, integrada también por las moléculas CD35, CD46 y CD55. También participa como ligando de CD23. Junto con CD19, CD81 y Leu-3, forma parte de un complejo que transduce señales al interior de los LB.

Molécula CD22. La molécula CD22 es una glicoproteína de membrana tipo I de 140 kDa. Es miembro de la familia sialoadhesina (sialoadhesina, CD33, glicoproteína asociada a mielina). Se conocen dos isoformas (α y β); la forma β tiene siete dominios tipo Ig (dos más que la forma α) y una cola citoplasmática 23 aminoácidos más larga que la forma α .

La molécula CD22 se expresa en una subpoblación de las células B y actúa como una molécula de adhesión con capacidad de unión para ácido siálico de carbohidratos que presentan por ejemplo las moléculas CD45RO, CDw75 y CDw76.

Molécula CD23. La molécula CD23 es una glicoproteína de membrana tipo II de 45-50 kDa (reducida). Dado que presenta hacia su extremo carboxilo un dominio tipo lectina, pertenece a la familia de lectinas dependiente de calcio, al igual que las moléculas CD69, CD72 y CD94.

La molécula CD23 se expresa en una subpoblación de LB. Existen dos formas, Fc ϵ RIIa y Fc ϵ RIIb las que difieren sólo en el extremo amino. Continuamente el CD23 está siendo liberado de la superficie celular como un polipéptido de 33 kDa que se ha visto actúa como factor de crecimiento de LB.

Molécula CD24. La molécula CD24 es una glicoproteína unida a GPI. Tiene aproximadamente 42 kDa (reducida) y está marcadamente glicosilada.

Se expresa en células B (desde célula pre-B hasta célula plasmática) y en granulocitos.

Varias proteínas unidas a la membrana a través de ProteínasI, entre ellas CD24, se han encontrado asociadas con proteínas tirosinas kinasas, fundamentales en la transducción de señales y activación celular.

Molécula CD40. La molécula CD40 es una glicoproteína de membrana tipo I de 44-48 kDa (reducida). Integra la familia de receptores TNF/NGF (factor de crecimiento de nervio), al

igual que las moléculas CD27, CD30, CD95, CD120a y CD120b.

El dominio extracelular presenta cuatro repeticiones ricas en cisteína. Es contrareceptor de CD40L (CD154) que se expresa en los LT activados, por lo que está involucrada en la interacción LB-LT durante el cambio de clase de inmunoglobulinas.

Molécula CD72. La molécula CD72 es una proteína de membrana tipo II que tiene la estructura de un homodímero de 39 y 42 kDa (reducida). Junto con las moléculas CD23, CD69 y CD94 integra la familia de lectinas dependiente de calcio. Puede actuar como ligando de la molécula CD5 expresada en todos los LT y en una subpoblación de LB.

Se expresa en todos los estadios madurativos de las células B, excepto en las células plasmáticas.

Molécula CD80. La molécula CD80 es una proteína de membrana tipo I de 60 kDa (reducida). La región extracelular consiste en un dominio tipo variable y un dominio tipo constante de Ig; la cola citoplasmática presenta 16 aminoácidos.

Se expresa en LB en reposo y activados, monocitos, células dendríticas y LT activados.

Actúa como ligando de moléculas accesorias de LT, como son CD28 y CTLA-4 (CD152), regulando así el desarrollo de la respuesta inmune.

3.3. Moléculas CD expresadas principalmente en linfocitos T

Molécula CD3. La molécula CD3 es un heteropentámero formado por las cadenas, γ , δ , ϵ , ξ y ζ , que se encuentra asociado al TCR (ver capítulo 7). Se expresa exclusivamente en las células T.

La mayoría de los anticuerpos CD3 reconocen la cadena ϵ del complejo CD3.

Molécula CD2. La molécula CD2 es una glicoproteína de membrana tipo I de 50 kDa. La región extracelular consiste en un dominio tipo variable y un dominio tipo constante de Ig; presenta una larga cola citoplasmática rica en prolina y aminoácidos básicos.

La molécula CD2 se expresa en todas las células T incluyendo timocitos inmaduros y células de memoria. Además, se expresa en una subpoblación de células NK.



CD2 es el receptor que une eritrocitos de cordero alrededor de los LT formando las denominadas rosetas E, fenómeno que dio origen a uno de los primeros métodos utilizados para reconocer y aislar linfocitos T.

Es una molécula de adhesión que se une a las moléculas CD58 (LFA-3), CD48 y probablemente CD59. Participa en la transducción de señales en las células T, representando una vía alternativa de activación de estas células.

Molécula CD4. La molécula CD4 es una glicoproteína tipo I de 59 kDa (reducida) que pertenece a la superfamilia génica de las Ig. La región extracelular presenta cuatro dominios tipo Ig y el segmento intracitoplasmático tiene un dominio que une la tirosina kinasa p56lck

La molécula CD4 se expresa en una subpoblación de células T, la mayoría LTh. También puede expresarse en bajas concentraciones en monocitos y macrófagos.

Las moléculas CD4 de los LTh se unen a regiones no polimórficas de las moléculas MHC clase II, estabilizando la interacción entre las células T CD4⁺ y las células presentadoras de antígenos (CPA). La molécula CD4 además es el ligando para la gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Molécula CD5. La molécula CD5 es una glicoproteína de transmembrana tipo I de 67 kDa (reducida). Al igual que la molécula CD6 pertenece a la "scavenger receptor family". La región extracelular consiste en tres dominios "scavenger receptor" ricos en cisteína.

La molécula CD5 se expresa en las células T y en una población de LB asociada a enfermedades autoinmunes.

Molécula CD7. La molécula CD7 es una glicoproteína de transmembrana tipo I de 40 kDa (reducida). La región extracelular consiste en un dominio tipo Ig, seguido hacia la membrana de una región O-glicosilada.

La molécula CD7 se expresa en una subpoblación de LT inmaduros que corresponden a precursores pretímicos en la médula ósea.

Molécula CD8. La molécula CD8 es un homodímero (α/α) o heterodímero (α/β , CD8b) unido por un puente disulfuro. La región extracelular (amino terminal) presenta un dominio tipo Ig separado del dominio transmembrana por

una región bisagra. El segmento citoplasmático de la cadena α presenta un dominio para unión de la tirosina kinasa p56lck.

La molécula CD8 se expresa en una subpoblación de las células T, los LTc, y se une a las moléculas MHC clase I de las células blanco, estabilizando la interacción celular.

Molécula CD27. La molécula CD27 es una proteína de transmembrana tipo I de 55 kDa (reducida) que forma homodímeros unidos por puentes disulfuro. Es miembro de la familia de receptores TNF/NGF, al igual que las moléculas CD30, CD40, CD95, CD120a y CD120b. El segmento extracelular presenta dos regiones ricas en cisteína.

La molécula CD27 es ligando para la molécula CD70 que pertenece a la familia TNF (CD30L, CD40L, CD70 y CD95L; L, ligando). Se ha propuesto que esta interacción CD27/CD70 podría ser importante en la regulación de los LT y en facilitar la diferenciación a LTc.

Se expresa en una subpoblación de células T maduras y de timocitos.

Molécula CD28. La molécula CD28 es una glicoproteína de transmembrana tipo I de 44 kDa (reducida) que forma homodímeros por puentes disulfuro. Presenta en la región extracelular un dominio tipo Ig, por lo que pertenece a la SFIg.

Se expresa en una subpoblación de linfocitos T.

Esta molécula participa como ligando de las moléculas CD80, CD86 y B7-3. Es una de las moléculas que participan como señales coestimuladoras en la activación de células T.

3.4. Moléculas CD expresadas principalmente en células NK

Molécula CD16. La molécula CD16 también llamada Fc γ RIIIa es una proteína de transmembrana tipo I de 50-65 kDa (reducida). El segmento extracelular presenta dos dominios tipo Ig. Actúa como receptor de baja afinidad para IgG. También se expresa en monocitos activados y granulocitos.

Molécula CD56. La molécula CD56 es una glicoproteína de 175-185 kDa. El segmento extracelular presenta cinco dominios tipo Ig y dos dominios tipo fibronectina tipo III. Actúa como una molécula de adhesión homotípica. También se expresa en LT activados.



Molécula CD57. La molécula CD57 tiene estructura de carbohidrato, probablemente unida a varias proteínas y lípidos. Tiene un peso molecular de 110 kDa (reducida). Se expresa también en LT y una subpoblación de LB.

3.5. Moléculas CD expresadas principalmente en granulocitos

Molécula CD66. La molécula CD66 es una fosfoproteína de aproximadamente 220 kDa (reducida) marcadamente glicosilada. Integra la familia génica de antígeno carcinoembrionario (ACE). El segmento extracelular presenta cuatro dominios tipo inmunoglobulina, uno variable y tres constantes. Como consecuencia de un procesamiento (“splicing”) alternativo del mRNA se obtienen varias isoformas (CD66a - CD66e).

La molécula CD66 presenta características de una molécula de adhesión y puede unirse a bacterias.

3.6. Moléculas CD expresadas principalmente en monocitos-macrófagos

Molécula CD11b. Las moléculas CD11b tienen un peso molecular de 170 kDa y estructuralmente son proteínas de transmembrana tipo I.

Además de las células monocito-macrófagos, se expresa en las células NK. Junto con CD18 forma una molécula de adhesión (CR3) de la familia de las Integrinas.

Molécula CD14. La molécula CD14 tiene 53-55 kDa y se une a la membrana a través de GPI. Además de los monocitos y macrófagos se expresa en neutrófilos, algunos linfocitos B y células dendríticas.

Molécula CD64. La molécula CD64 tiene 75 kDa y estructuralmente corresponde a una proteína de transmembrana tipo I. Pertenecce a la SFIg y se expresa en monocitos, macrófagos y neutrófilos activados.

Su función es la de actuar como receptor de alta afinidad de IgG (FcγRI).

Molécula CD68. La molécula CD68 es una proteína de transmembrana de 110 kDa (reducida) y que se encuentra marcadamente glicosilada. Junto a las moléculas CD34 y CD43 integran la familia “cell surface mucin”. Además, al igual que las moléculas CD107a y CD107b características de

plaquetas activadas. La molécula CD68 es una proteína asociada a lisosomas, que se traslada a la membrana celular durante la activación.

Molécula CD91. La molécula CD91 es una glicoproteína que sufre una ruptura en el aparato de Golgi en dos cadenas polipeptídicas, la cadena α (85 kDa) y la cadena β (515 kDa), las cuales no están unidas covalentemente. La cadena α presenta varias copias de varios tipos de dominios: rico en cisteína, factor de crecimiento epidermal y repeticiones de YWTD. Actúa como receptor de varias moléculas, entre otras α 2-macroglobulina y activadores del plasminógeno.

3.7. Moléculas CD expresadas principalmente en plaquetas

Molécula CD41. La molécula CD41, también llamada GPIIb (GP: glicoproteína), es un heterodímero de 140 kDa formado por proteínas de transmembrana. El heterodímero (cadena α 120 kDa y cadena β 22 kDa), unido por puente disulfuro, se origina en una ruptura postraduccional de la proteína.

La molécula CD41 forma un complejo dependiente de calcio con la molécula CD61 (GPIIIa). Este complejo une proteínas adhesivas importantes en la hemostasia: fibrinógeno, factor von Willebrand y fibronectina.

Molécula CD42a. La molécula CD42a, también denominada GPIX, es una glicoproteína de transmembrana de 23 kDa (reducida). Esta molécula forma un complejo no covalente (complejo CD42) con las moléculas CD42a y CD42b (unidas covalentemente forman la GPIb) o con la molécula CD42d (GPV). La molécula CD42a se expresa sólo en las plaquetas. El complejo CD42 es responsable de la unión al factor von Willebrand.

Molécula CD42b. La molécula CD42b (GPIb- α) es una proteína de transmembrana de 135 kDa. En su extremo amino presenta el sitio de unión para el factor von Willebrand. Unida covalentemente a la molécula CD42c (GPIb- β) forma la GPIb. La molécula CD42b se expresa sólo en las plaquetas.

Molécula CD42c. La molécula CD42c (GPIb- β) es una glicoproteína de transmembrana de 22 kDa. Al unirse covalentemente a la molécula CD42b



(GPIb- α) forma la GPIb. La molécula CD42c se expresa sólo en las plaquetas.

Molécula CD42d. La molécula CD42d, también denominada GPV es una proteína de transmembrana de 85 kDa (reducida) que al igual que la molécula CD42a (GPIX) se puede unir a la GPIb (CD42b-CD42c) y formar el complejo CD42. La molécula CD42d se expresa sólo en las plaquetas.

Molécula CD51. La molécula CD51, también llamada cadena α del receptor de vitronectina (VnR) es un heterodímero de 125 y 25 kDa (reducida) unido por puente disulfuro. El heterodímero se produce por ruptura postraducciona de la glicoproteína. Puede asociarse no covalentemente con las integrinas $\beta 1$ (CD29), $\beta 3$ (CD61), $\beta 5$, $\beta 6$ o $\beta 8$. El complejo $\alpha \nu \beta 1$ une vitronectina, fibronectina y colágeno tipo I; el complejo $\alpha \nu \beta 3$ (GPIIb-IIIa) une vitronectina, fibronectina, fibrinógeno, factor von Willebrand, trombospondina, osteopontina y colágeno; el complejo $\alpha \nu \beta 5$ une vitronectina y $\alpha \nu \beta 6$ une fibrinógeno.

Molécula CD61. La molécula CD61, también denominada cadena $\beta 3$ de las integrinas y GPIIIa, es una glicoproteína de transmembrana tipo I de 110 kDa (reducida). La molécula CD61 se puede asociar a la molécula CD41 (GPIIb) formando un complejo dependiente de calcio (GPIIb-IIIa) y con la molécula CD51 (integrina $\alpha \nu$) formando el receptor de vitronectina ($\alpha \nu \beta 3$).

4. FAMILIAS DE MOLÉCULAS CD

Las moléculas CD se pueden agrupar independientemente de los anticuerpos monoclonales que las reconocen, en base a su estructura molecular y/o función. Así, se han descrito entre otras, las siguientes familias:

Superfamilia de las Ig. Estas moléculas se caracterizan por presentar en la región extracelular, uno o más dominios tipo Ig. Entre otras moléculas, integran esta familia: CD4, CD8, CD28, CD54 y CD64.

Familia de las lectinas. Las moléculas de esta familia presentan en la región extracelular uno o más dominios tipo lectina. Integran esta familia las moléculas CD23, CD69, CD72 y CD94.

"Tetra-span family". Estas moléculas presentan cuatro dominios transmembrana y ambos extremos, amino y carboxilo, están en el interior de la célula. Integran esta familia las moléculas CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 y CD82.

"Scanaver receptor family". Las moléculas de esta familia se caracterizan por presentar en la región extracelular tres dominios ricos en cisteína. Entre otras moléculas, se incluyen en esta familia las moléculas CD5 y CD6.

Familia de receptores de TNF y NGF. Esta familia la integran CD27, CD30, CD40, CD95, CD120a, CD120b.

Familia de reguladores del complemento. Forman esta familia las moléculas CD21, CD35, CD46 y CD55.

Superfamilia rodopsina. Las moléculas de esta familia se caracterizan por presentar siete dominios de transmembrana y unirse a proteínas que unen GTP. Las moléculas CD incluidas en la familia rodopsina son CD88, CDw128a y CDw128b.

Familia "cell surface mucin". Estas moléculas se caracterizan por ser proteínas de transmembrana tipo I que están marcadamente O-sialitizadas (ácido sialico). Son miembros de esta familia las moléculas CD34, CD43 y CD68

Familia sialoadhesina. Las moléculas que integran esta familia son: sialoadhesina, CD33 y gp asociada a mielina.

5. ALGUNAS APLICACIONES DE LA NOMENCLATURA CD EN INMUNOLOGÍA

El advenimiento de la nomenclatura CD, gracias al desarrollo de los anticuerpos monoclonales y técnicas de la citometría de flujo, la inmunohistoquímica y la biología molecular, se ha acompañado de una acelerada aplicación de estos marcadores en el campo de la investigación básica y la inmunología clínica. Como se describió antes, desde un punto de vista conceptual, la expresión de estas moléculas en células del sistema inmune se puede resumir en la presencia de moléculas de linaje (línea celular), de activación y de madurez.



Las **moléculas de linaje** son aquellas que definen en forma mayoritaria y ocasionalmente excluyente, un tipo celular; por ejemplo CD4 para LT “helper” y CD8 para LT citotóxicos. Estas moléculas pueden aparecer en algún momento del desarrollo y a su vez cumplen funciones biológicas definidas, pueden compartirse con otras células (ej. CD4 expresada en macrófagos/monocitos) si bien con expresión más baja o en un fenotipo morfológico o inmune muy distinto.

Las **moléculas de activación** suelen expresarse frente a estimulación celular y no en forma excluyente de un tipo celular (ej. CD25, CD38, CD71). Algunas de estas moléculas suelen disminuir su expresión en la superficie celular frente a un estado de activación celular ya que son escindidas y pueden detectarse en forma soluble (ej. moléculas de adhesión como la L-selectina (CD62L), o CD23 en linfocitos B. Existe finalmente un conjunto de moléculas que se expresan mayoritariamente durante algunas etapas del desarrollo de las células inmunes, lo que ayuda a definir estadios de madurez celular (ej. CD10, CD34). Sin embargo, debido al estado biológico de las células inmaduras, es factible detectar con mayor frecuencia o intensidad algunos marcadores de activación (ej. CD71).

Finalmente, existen moléculas CD que se asocian a la respuesta inmune específica y son expresadas en los linfocitos, y aquellas que participan en la inflamación, fundamentalmente expresadas en granulocitos, monocitos/macrófagos y células endoteliales.

Algunos usos de las moléculas CD en clínica son los siguientes:

Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Uno de los elementos clásicos en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con SIDA ha sido la cuantificación de LT CD4+ y LT CD8+. Los valores absolutos de estas subpoblaciones al igual que su relación o índice CD4/CD8, han sido utilizados en la determinación de conductas terapéuticas como inicio de tratamiento anti-retroviral o profilaxis antibiótica. Sin embargo, estudios de seguimiento de series grandes de pacientes han detectado que estos valores en ocasiones anticipan lo suficiente para ser útiles. Durante los últimos años, al ir dilucidándose la patogenia del SIDA donde la activación inmune ha sido revelada como factor esencial en la progresión de la enfermedad, se han detectado cambios precoces en la expresión de marcadores de activación linfocitarios en adultos y niños infectados por VIH (Ej. CD38 y HLA-DR en LT CD8+ y CD62L y CD23 en linfocitos B, disminución de expresión de CD25 en LT CD4+ cambio de expresión de CD45RA a CD45RO tanto en LT CD4+ y LT CD8+) (tabla 46-2).

Inmunodeficiencias Primarias. El uso de las moléculas CD ha permitido clasificar en forma más precisa las diversas inmunodeficiencias primarias, tanto celulares como humorales (tabla 46-3). La asociación entre la presencia o ausencia de alguna molécula CD ha permitido en ocasiones dilucidar la función de tal molécula, si ésta se desconocía, o bien si ésta se conocía, explicar el mecanismo subyacente de una inmunodeficiencia en particular.

Leucemias y Linfomas. Las leucemias son un grupo heterogéneo de enfermedades resultantes de

Tabla 46-2. Marcadores inmunofenotípicos utilizados en el estudio y seguimiento de pacientes VIH positivos

Célula	Marcadores de linaje celular	Marcadores de activación
Linfocitos T	CD3, CD4, CD8	CD25, CD38, CD28, CD69 CD45 RA/RO, HL-DR
Linfocitos B	CD19, CD20, CD10	CD23, CD62L, CD69, CD71
Células NK	CD16, CD56	CD57



Tabla 46-3. Marcadores CD usados en Inmunodeficiencias Primarias

Disgenesia Reticular	CD34
Defecto de LT: Inmunodeficiencia Combinada Severa, Anomalía de Di George, otros	CD3, CD4, CD8; CD25; CD152 TCR α/β , TCR δ/γ , CD69, CD132
Deficiencia de LB o Anticuerpos: Agamaglobulinemia ligada a X, Inmunodeficiencia Común Variable	CD19, CD20, CD5.
Síndrome de Hiper IgM	CD19/CD40, CD3/CD154
Deficiencias de Células NK	CD16/CD56
Síndrome de Wiskott Aldrich	CD43
Síndrome de Leucocito Desnudo	HLA clase I y II en LT CD4 y LT CD8; CD74
Defecto de Moléculas de Adhesión	CD11a,b,c; CD18

una proliferación descontrolada de uno o más tipos de células hematopoyéticas. La importancia de clasificar este grupo de enfermedades en distintas categorías radica en que existen modalidades terapéuticas distintas en cada grupo. Igualmente, el pronóstico clínico de las distintas categorías sea esta aguda o crónica, linfóide o mielóide es distinto. Por lo tanto, el propósito de la caracterización de las leucemias es agrupar pacientes con enfermedades similares para optimizar la terapia o identificar aquellos pacientes con peor pronóstico frente a los tratamientos actuales. La forma clásica de clasificar las leucemias es la Franco-Americana-Británica (FAB) que utiliza morfología, histoquímica y algunos marcadores de superficie para clasificar las leucemias mieloides en M0 a M7, y las linfoides en L1 a L3. Sin embargo, la limitante de

esta clasificación es la definición de subgrupos de leucemias linfoides, ej. diferenciación T y B, y requiere de un observador entrenado, siendo además de interpretación subjetiva. El uso de una inmunotipificación en su mayoría con marcadores CD de superficie aporta criterios descriptivos más objetivos de las células leucémicas, en especial si son evaluados por citometría de flujo (ver capítulo 31), que puede analizar dos o más marcadores por célula en forma simultánea (tabla 46-4).

Patología Inflamatoria. En enfermedades inflamatorias como las vasculitis, artritis reumatoídea, lupus eritematoso sistémico, sepsis o rechazo de trasplantes, la pesquisa de la expresión de moléculas de activación (CD25, integrinas, ICAMs, CD64, etc.) tanto en la superficie celular de leucocitos periféricos como

Tabla 46-4. Marcadores CD de linaje y no linaje, usados en la inmunofenotipificación de leucemias agudas

Linfocitos B	Linfocitos T	Célula mielóide	No-linaje
CD19	CD3	CD13	HLA-DR
CD20	CD5	CD33	CD10
CD22	CD7		CD73
CD39			CD38
CD79a,b			

* Las leucemias monoblásticas presentan la molécula CD14.



de tejido, además de la forma soluble en el suero u otros fluidos, se está incorporando como método útil y precoz, y posiblemente específico, para determinar reactivación o respuesta a tratamiento de estas patologías. Estos estudios aún se encuentran en desarrollo, pero es factible postular que a futuro la determinación de estas moléculas serán incluidas en el estudio de todo cuadro inflamatorio.

Trasplantes: En esta área, actualmente se monitorea la efectividad de drogas como anticuerpos anti-CD3, midiendo los niveles de linfocitos CD3 periféricos, con el fin de controlar rechazo agudo de trasplantes.

Otra aplicación es la obtención, desde sangre periférica, de "stem cells" usando como marcador la molécula CD34 que expresan estas células. Las "stem cells" son utilizadas en pacientes a los que debe repoblarse la médula ósea.

Sin duda son numerosas las otras aplicaciones de estas moléculas en investigación y clínica y muchas más están por desarrollarse.

LECTURAS SUGERIDAS

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J., **Molecular Biology of cell**, Chap.10 and 12, Third edition, Garland Publishing Inc., USA, 1994.

Bower, K., Duque, R., Sharkey, T.V., **Clinical Flow Cytometry. Principles and Application**, Williams & Wilkins, 1993.

Kipps, T.J., "The cluster of differentiation (CD) antigens" en **Hematology**, Eds. Beutner, E., Lichtman, M., Collier, B. and Kipps, T., Fifth edition, McGraw-Hill Inc., New York, 1995.

Landay, A. et al., "Application of Flow Cytometry to the Study of HIV infection", *AIDS*, 4:479-497, 1990.

LeBien, T.W., "A little bit of CD history", *Transfusion*. 36(3):197-199, 1996.

Loken, M., et al., "A Selected 12-Reagen Immunophenotyping Panel Facilitates Assignment of Lineage in Acute Leukemia". *Clinical Monograph* N° 3. Becton Dickinson Immunocytometry Systems.

Ochs, H.D., Smith, C.I.E., Puck, J.M., **Primary Immunodeficiency Diseases- A Molecular Approach**, Editorial Oxford University Press, 1999.

Plaeger-Marshall, S. et al., "T cell activation in pediatric AIDS pathogenesis: Three-color immunophenotyping", *Clin Immunol Immunopathol*. 71, 19-26. 1994.

Rich, R., **Clinical Immunology. Principles and Practice**, Editorial Mosby, 1996.

Rodríguez, C. et al., "HIV disease in children is associated with a selective decrease in CD23+ and CD2L+B cells", *Clin Immunol Immunopathol* 81 (2): 191-199. 1996.

Stichm, E., **Immunologic. disorders in Infants and Children**, 4th Edition, WB Saunders, 1996.

Stockinger, H., Majdic, O. and Knapp, W., "Directory for the human leukocyte clusters of differentiation", *Transfusion* 36:268-285, 1996.

Anti-human CD clustered (CD) antibodies. Disponible en <http://members.aol.com/researchd1/rdicdabs/cdindex.htm>

CD antigens. Disponible en <http://www.immunologylink.com/CDantigen.htm>

Protein Reviews on the Web. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/>

Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens. 7th Workshop and Conference. Disponible en www.hlda.org



GLOSARIO

ADCC ("Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity"): Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. Reacción citotóxica en la que células con capacidad lítica, portadoras de receptores para Fc, reconocen las células blanco a través de los anticuerpos específicos que recubren a estas últimas.

Adyuvante: Sustancia que intensifica inespecíficamente la respuesta inmunitaria frente a un antígeno.

Adyuvante completo de Freund's: Emulsión óleo-acuosa que contiene micobacterias muertas y aumenta la respuesta inmune cuando se mezcla en una emulsión que contiene un antígeno.

Afinidad: Expresión termodinámica de la fuerza de unión entre un determinante antigénico (epítipo) y el sitio de combinación del anticuerpo (paratopo) y así, de la compatibilidad estereoquímica entre ellos.

Agammaglobulinemia Ausencia de proteínas plasmáticas en la región gamma de una electroforesis de suero sanguíneo.

Aglutinación: Reacción antígeno-anticuerpo, en la cual un antígeno sólido o particulado forma una malla de interacciones con un anticuerpo que se encuentra en solución. Como la aglutinación es visible fácilmente, es la reacción básica de numerosas pruebas serológicas.

Aglutinación directa: Aglutinación de eritrocitos, microorganismos u otras sustancias, directamente por anticuerpos.

Aglutinación indirecta: Aglutinación de partículas o de eritrocitos recubiertos con un antígeno (adsorbido o acoplado químicamente) por anticuerpos.

Aglutininas frías: Anticuerpos que aglutinan bacterias o eritrocitos más eficientemente a temperaturas inferiores a 37°C.

Agretopo: Porción de un antígeno o fragmento antigénico, que interactúa con una molécula MHC.

Alelo: Uno de los dos genes presente en un locus, que controlan una característica particular.

Alergeno: Agente que provoca una serie de reacciones mediadas por inmunoglobulina E. Ej.: polen, polvo, caspa animal, etc.; o por células T como es el caso de algunos haptenos. Ej.: el compuesto exudado por el litre o compuestos químicos como el dinitrofluorobenceno.

Alergia (Hipersensibilidad tipo I): Enfermedad o reacción causada por una respuesta inmune a uno o más antígenos ambientales, resultando en inflamación tisular y disfunción orgánica.

Aloanticuerpos: Anticuerpos dirigidos contra antígenos presentes en algunos miembros de la misma especie (aloantígenos).

Aloantígenos: Diferentes formas (alélico) de un antígeno codificado por el mismo locus genético, en todos los individuos de una especie.

Alogénico: Se refiere a las variaciones que puede tener un antígeno codificado por un mismo locus de una misma especie.



Aminas vasoactivas: Productos, como la histamina y la 5-hidroxitriptamina, liberados por los basófilos, los mastocitos y las plaquetas, que actúan sobre el endotelio y la musculatura lisa de vasos locales.

Anafilaxia: Reacción inmune aguda y severa, antígeno específica, mediada por IgE, que da lugar a vasodilatación y contracción de los músculos lisos, incluidos los bronquiales, y que puede originar la muerte del animal.

Anafilatoxina: Péptidos del complemento (C3a y C5a) que originan la desgranulación de los mastocitos y la contracción de la musculatura lisa.

Anemia hemolítica autoinmune: Destrucción de eritrocitos, mediada por autoanticuerpos.

Anergia: Un estado de disminución o ausencia de inmunidad mediada por células, mostrado por una ausencia de reacción a varios antígenos diferentes inoculados subcutáneamente.

Anticuerpo: Molécula de inmunoglobulina producida en los vertebrados por las células plasmáticas (estadio final de la diferenciación de los linfocitos B) en respuesta a un antígeno; tiene la propiedad de combinarse específicamente con el antígeno que indujo su formación.

Anticuerpo anti-idiotípico: anticuerpo dirigido contra epítomos (idiotopos) de la región variable de una inmunoglobulina o un receptor linfocitario.

Anticuerpo bifuncional: Anticuerpo preparado a partir de dos anticuerpos, cuya característica es que se une a dos antígenos diferentes.

Anticuerpo catalítico: Anticuerpos con propiedades similares a una enzima.

Anticuerpo humanizado: Anticuerpo de ratón en el cual todas las regiones de las cadenas pesadas y livianas no involucradas en la unión del antígeno, han sido reemplazadas por secuencias humanas.

Anticuerpo natural: Anticuerpo presente en el suero del que se desconoce el antígeno.

Anticuerpo quimérico: Anticuerpo de ratón en el cual las regiones constantes han sido reemplazadas, mediante ingeniería genética, por la región

constante de anticuerpos humanos.

Antigenicidad: Reactividad de un antígeno, es decir, capacidad de unirse en forma específica a los anticuerpos.

Antígeno: Molécula que puede ser reconocida por un anticuerpo o receptor de células T. Si es capaz de estimular la respuesta inmune se le denomina inmunógeno.

Antígeno de diferenciación: Antígeno que permite distinguir un tipo celular de otro.

Antígeno homólogo: Antígeno que reacciona con anticuerpos que él mismo ha inducido.

Antígeno heterólogo: Antígeno que reacciona con anticuerpos que él no ha inducido.

Antígenos T: Antígenos tumorales presentes sólo en células neoplásicas; probablemente proteínas producidas por genoma viral.

Antígenos timo dependientes: Antígenos que dependen de la interacción de las células B con las células T para estimular la síntesis de anticuerpos.

Antígenos timo independientes: Antígenos que pueden inducir una respuesta inmune sin la participación de linfocitos T, aparentemente.

Antisuero: Conjunto de anticuerpos presentes en el suero de un animal que ha sido inmunizado con un antígeno.

Antitoxinas: Anticuerpos que neutralizan las toxinas solubles producidas por las bacterias.

Asociación genética: Término usado para describir la condición en la que determinados genotipos se asocian con ciertos fenómenos, tales como determinadas enfermedades.

Atopia: Manifestación clínica de las reacciones de hipersensibilidad tipo I, incluyendo eccema, asma y rinitis.

Autoanticuerpo: Anticuerpo con especificidad para antígenos propios. *In vitro*, tales anticuerpos son detectados por sus reacciones con antígenos similares obtenidos de otros individuos de la misma especie.



Autoantígenos: Moléculas que son constituyentes normales de un individuo y contra las cuales éste desarrolla una respuesta inmune.

Autólogo: Perteneciente al mismo individuo.

Autorradiografía: Técnica para detectar ácidos nucleicos o proteínas en secciones de tejido o geles con isótopos radiactivos, cuya emisión es grabada en una película fotográfica.

Autosomas: Cromosomas distintos a los cromosomas sexuales X e Y.

Avidez: Fuerza de la unión anticuerpo-antígeno, la cual depende de la afinidad entre epítipo y paratopo, y de las valencias del anticuerpo y del antígeno.

BCG (Bacillus Calmette-Guérin): Cepa atenuada de *Mycobacterium tuberculosis*, usada como vacuna, adyuvante o modificadora de la respuesta inmune.

Beta₂-microglobulina: Polipéptido monomórfico codificado fuera del MHC, que se asocia de modo no covalente con la cadena α codificada por el MHC, formando las moléculas de clase I.

Bolsa (Bursa) equivalente: Órgano análogo a la bolsa de Fabricio existente en aves. En el hombre corresponde a la médula ósea.

Bolsa (Bursa) de Fabricio: Órgano linfopitelial situado entre el intestino posterior y la cloaca de las aves. Constituye el lugar donde maduran las células B.

Bradiquinina: Nonapéptido vasoactivo; es el mediador de la inflamación más importante generado por el sistema de las quininas.

C1-C9: Componentes de las vías clásica y lítica del complemento responsables de mediar las reacciones inflamatorias, la opsonización de las partículas y la lisis de las membranas celulares.

Cadena Invariante (Ii): Glicoproteína de membrana asociada al correcto ensamblaje, transporte y expresión de las moléculas MHC de clase II.

Cadena J: Glicopéptido monomórfico, presente en la IgA e IgM poliméricas.

Cadena kappa (κ): Uno de los isotipos de las cadenas livianas de las inmunoglobulinas.

Cadena lambda (λ): Uno de los isotipos de cadenas livianas de las inmunoglobulinas.

Cadenas livianas (L, “light”): Cadenas polipeptídicas presentes en todas las inmunoglobulinas. Existen dos tipos y en cada especie se ha observado la predominancia de una de ellas; se denominan kappa (κ) y lambda (λ).

Cadenas pesadas (H, “heavy”): Par de cadenas polipeptídicas idénticas que forman parte de las inmunoglobulinas. La cadena pesada contiene aproximadamente el doble del número de aminoácidos de la cadena liviana.

Calnexina: Proteína de 88 kDa que actúa como chaperonina en el correcto ensamblaje y transporte de moléculas MHC y otras proteínas.

Cambio de clase: Proceso por el cual una célula B individual puede unir nuevos genes C (constante) de cadena pesada a su gen V (variable) recombinado, y producir así una clase de inmunoglobulina diferente con la misma especificidad. Este proceso se refleja también en el cambio global de clase que tiene lugar durante la maduración de una respuesta inmune.

Cariotipo: Constitución cromosómica de una célula, que puede variar entre los individuos de una misma especie, dependiendo de la presencia o ausencia de cromosomas sexuales particulares o de la incidencia de traslocaciones entre secciones de cromosomas diferentes.

“Carrier”: Proteína transportadora de alta inmunogenicidad utilizada para inducir respuesta inmune contra haptenos que le han sido acoplados químicamente. Uno de los más utilizados es la hemocianina, proteína que transporta el oxígeno en la mayoría de los moluscos y artrópodos.

Células accesorias: Incluyen eosinófilos, basófilos, células cebadas, plaquetas y células presentadoras de antígeno. Tienen un rol importante tanto en la respuesta inmune innata como adquirida.

Células de Microglia: Son las células fagocíticas que residen en el cerebro. Migran a este órgano



antes del nacimiento y durante el período neonatal.

Células de Kupffer: Macrófagos que tapizan los sinusoides hepáticos.

Células de Langerhans: Células dendríticas de la piel que actúan como células presentadoras del antígeno.

Células dendríticas: Células mononucleares presentadoras de antígeno en tejido linfóide, pero distintas de la línea monocito-macrófago.

Células efectoras: Término que generalmente se refiere a células T capaces de mediar citotoxicidad, supresión, o función de ayuda ("helper").

Células formadoras de placa: Son células secretoras de anticuerpos que se miden en un ensayo en que cada una produce una clara zona de lisis (placa) en una capa de eritrocitos sensibilizados con el antígeno. Es una reacción de una extrema sensibilidad.

Células LAK: (Células asesinas activadas por linfoquinas). Son linfocitos T singénicos generados *in vitro* mediante tratamiento con citoquinas tales como IL-2 e IFN γ .

Célula mastoide (célula cebada o mastocito): Célula tisular que posee receptores de alta afinidad para IgE y genera mediadores inflamatorios en la alergia.

Células NK ("Natural Killer"): Células del linaje linfóide con capacidad intrínseca para reconocer y destruir algunas células tumorales o infectadas por virus.

Células plasmáticas: Células sintetizadoras de anticuerpos. Se diferencian a partir de los linfocitos B.

Células pluripotenciales: Células capaces de autorrenovación y de diferenciación hacia progenitores celulares hematopoyéticos y linfopoyéticos.

Células T $\alpha\beta$: Células T que reordenan y expresan receptor de células T con cadenas alfa y beta. La mayoría de las células T son de este tipo.

Células T citotóxicas: Linfocitos con marcador

celular CD8+, que participan en la inmunidad celular.

Célula T $\gamma\delta$: Células T cuyo receptor de células T está formado por cadenas gamma y delta en el receptor de células T.

Células T "helper" (Cooperadoras): Subpoblación funcional de células T que pueden ayudar a la generación de células T citotóxicas y cooperar con las células B en la producción de una respuesta de anticuerpos.

Células T supresoras: Subpoblación de linfocitos T que suprimen la síntesis de anticuerpos por las células B o inhiben otras reacciones inmunes celulares de células T efectoras.

Centros germinales: Grupo especializado de linfoblastos B, macrófagos y células plasmáticas que aparecen en los folículos primarios de los tejidos linfoides seguido en respuesta a un estímulo antigénico.

Cepa "inbred": Son animales obtenidos por cruzamientos sucesivos entre hermanos, dando una cepa con idénticos sets de autosomas.

Cepa congénica: Son razas idénticas excepto por un cambio en un locus determinado.

Cepas transgénicas: Son derivadas desde animales que han recibido genes que han sido insertados cuando ocurre la fecundación. Todas las células del animal transgénico llevan el nuevo gen, aunque él pueda ser expresado en algunos o en un linaje celular.

Cepas "Knockout": Son animales transgénicos que han sufrido una delección o mutación de genes específicos.

CDR ("Complementary Determining Regions"): Partes de la región variable (V) de las inmunoglobulinas o de los receptores de células T, responsables de la unión con el antígeno.

Ciclofosfamida: Fármaco citotóxico usado frecuentemente como inmunosupresor.

Ciclosporina: Fármaco inmunosupresor particularmente útil para suprimir el rechazo del injerto.



Citometría de Flujo: Es una técnica que mide en un citómetro –equipo específico para este propósito– las características individuales de una población de células, incluyendo tamaño, granularidad y fluorescencia si es que se les ha incorporado una sonda fluorescente.

Citoquinas: Término genérico para designar las moléculas solubles que median las interacciones celulares.

Citostático: Que tiene la capacidad de detener el crecimiento celular.

Citotóxico: Que tiene la capacidad de destruir células.

Clases de inmunoglobulinas: Subdivisión de las inmunoglobulinas, basada en el determinante antigénico de la región Fc de la cadena pesada (H). En humanos son cinco clases de inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.

Clon: Grupo de células que forman parte de la progenie de una sola célula.

Complejo de ataque a membrana: Componentes terminales del sistema del complemento (C5b-C9) que, cuando son activados, causan lisis de la célula blanco.

Complejo inmune: Producto de la unión producida por un anticuerpo con un antígeno. También se le denomina complejo antígeno-anticuerpo.

Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC): Región genética presente en todos los mamíferos, cuyos productos son responsables del rechazo rápido de los injertos entre individuos y que actúan como señales entre los linfocitos y las células que expresan antígenos.

Complemento: Grupo de proteínas séricas que intervienen en el control de la inflamación, en la activación de los fagocitos y en el ataque lítico sobre las membranas celulares. El sistema puede activarse por interacción con el sistema inmunitario.

Componente secretor: Molécula de 95 kDa presente en las células epiteliales y que se asocia a inmunoglobulinas secretoras, particularmente IgA e IgM.

Concanavalina A (Con A): Es una lectina obtenida del poroto *Conavalia eusiformis*, que se une a glicopiranosidos, manopiranosidos y fructopiranosidos. Como éstos son constituyentes habituales de las glicoproteínas de la membrana celular, la Con A se une a ellas. Aglutina células de muchos tipos y actúa como mitógeno para las células T.

Congénico: Animales derivados genéticamente y que difieren sólo en un locus particular.

Conjugado: Reactivo formado por el acoplamiento covalente de dos moléculas diferentes. Ej.: fluoresceína unida a una molécula de inmunoglobulina.

CPA, (Célula presentadora de antígenos): Célula que procesa una proteína antigénica, fragmentándola a péptidos que se presentan en la superficie celular en conjunto con moléculas MHC de clase II, para interactuar con el receptor de células T apropiado. Las células B, células dendríticas, monocitos y macrófagos pueden cumplir esta función.

CR1, CR2, CR3: Receptores para los fragmentos activados del componente C3 del complemento.

Cromatografía de afinidad: Método de purificación en el cual una sustancia con una selectiva afinidad de unión es unida covalentemente a una matriz insoluble como agarosa. Así una sustancia puede ser purificada desde una mezcla.

CSF ("Colony Stimulating Factors"): Grupo de citoquinas que controlan la diferenciación de las células hematopoyéticas.

Chaperoninas: Proteínas que participan en el plegamiento, ensamblaje y/o transporte de otras proteínas.

Delección clonal: Un concepto relacionado con la teoría de la selección clonal de Burnet, la cual sugiere que la tolerancia a un autoantígeno resulta de la delección de clones de linfocitos autorreactivos en la vida embrionaria.

Determinante antigénico: Región del antígeno donde se une un anticuerpo, también se denomina epítipo.



Determinante conformacional: Corresponde a epítopos derivados del arreglo espacial o plegamiento de la cadena peptídica de una proteína, que generalmente se destruyen al desnaturalizarla.

Determinante lineal: Corresponde a epítopos formados por aminoácidos adyacentes (estructura primaria) en la secuencia polipeptídica de una proteína.

Desetopo: Parte de la molécula MHC que se une con el antígeno ya procesado.

Desgranulación: Exocitosis de gránulos a partir de células, tales como mastocitos y basófilos.

Determinante antigénico: Ver epítipo.

DNP (Dinitrofenol): Es un hapteno que se puede unir a los grupos amino de las proteínas.

Domicilinas o Adresinas: Ligandos en las células de la mucosa endotelial para receptores específicos presentes en linfocitos derivados desde las Placas de Peyer.

Dominio: Región de un péptido que tiene una estructura terciaria particular. Las inmunoglobulinas, las moléculas MHC de clases I y II, y otras moléculas de la llamada "superfamilia de las inmunoglobulinas" tienen dominios similares.

Dominios C: Dominios constantes de los anticuerpos y de los receptores de células T. Estos dominios no contribuyen al sitio de unión para el antígeno y presentan una escasa variabilidad.

Dominios V: Dominios N-terminal de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos, y de las cadenas α , β , γ de los receptores de células T. Varían entre los distintos clones y forman el sitio de unión con el antígeno.

DTH ("Delayed Type Hypersensitivity"): Hipersensibilidad de tipo retardada. Término que incluye las reacciones cutáneas retardadas asociadas con la hipersensibilidad tipo IV.

Duplicados en tándem: Copias adyacentes de genes relacionados, unidos en un cromosoma.

Electroforesis: Separación de moléculas en un campo eléctrico.

Electroinmunodifusión: Método de inmunodifusión en el cual un antígeno y un anticuerpo son guiados uno contra el otro en un campo eléctrico. La reacción antígeno-anticuerpo se visualiza como un arco o banda de precipitación.

ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent assay"): Técnica de laboratorio, que permite la detección y cuantificación de inmunoglobulinas contra diferentes antígenos. Es un método muy versátil que permite numerosas variaciones, razón por la cual se ha transformado en el ensayo más utilizado en la detección y cuantificación de numerosos antígenos no sólo de interés clínico, sino que también otros compuestos tales como residuos de alimentos y contaminantes ambientales.

Endocitosis: Proceso por el cual material externo a la célula es internalizado. Puede tomar la forma de pinocitosis (líquidos) y fagocitosis (partículas).

Endógeno: Originado dentro del organismo o dentro de una célula.

Endotelio: Células que tapizan el lumen de los vasos sanguíneos y linfáticos.

Endotoxinas: Lipopolisacáridos derivados desde la pared celular de microorganismos Gram negativos. Tienen un efecto tóxico y pirogénico cuando son inyectados *in vivo*.

Enfermedad de cadenas pesadas: Grupo heterogéneo de desórdenes paraproteicos caracterizado por la presencia de cadenas pesadas monoclonales incompletas, sin cadenas livianas en suero u orina.

Enlaces disulfuro: Enlace químico S-S entre aminoácidos que contienen grupos sulfidrilos, los cuales unen las cadenas H y L, intra-cadenas H-H y L-L, contribuyendo en este caso a la formación de los dominios.

Epítipo: Determinante antigénico presente en una molécula. Es la región del antígeno que se combina con el paratopo del anticuerpo o del receptor de células T.

Exclusión alélica: Es el proceso por el cual una célula usa un gen de su cromosoma materno o uno paterno, pero no ambos. Ocurre en linfocitos B para constituir la cadena pesada y liviana de la



inmunoglobulina y también en linfocitos T, para constituir los dímeros $\alpha\beta$ ó $\gamma\delta$.

Exocitosis: Proceso por el cual material intracelular es llevado al exterior de la célula.

Exón: Segmento del gen que codifica para parte de una proteína.

Fab: Parte de la molécula de inmunoglobulina que contiene el sitio de combinación con el antígeno. Está compuesto por una cadena liviana y parte de la cadena pesada y se obtiene por digestión enzimática (papaína) de las inmunoglobulinas.

Factor activador plaquetario: Mediador inflamatorio que activa plaquetas y células inflamatorias.

Factor inhibidor de la migración (MIF): Grupo de péptidos producidos por los linfocitos que tienen la capacidad de inhibir la migración de los macrófagos.

Factor quimiotáctico de macrófagos (MCF): Linfoquina que atrae selectivamente monocitos o macrófagos al área donde se produjo el factor.

Factores B, P, D, H e I: Componentes de la vía alternativa del complemento.

Fagocitosis: Proceso por el cual las células engloban una partícula y la encierran dentro de una vacuola (fagosoma) citoplasmática.

Fagocitos: Incluyen monocitos sanguíneos, macrófagos y neutrófilos. Su función es incorporar patógenos, antígenos y restos celulares para reducirlos a pequeñas moléculas.

Fagolisosoma: Producto de la fusión de un fagosoma y un lisosoma.

Fenotipo: Características expresadas en un individuo.

Fluorescencia: Emisión de luz de un color, cuando una sustancia es irradiada con una luz de un color diferente.

Fragmento Fc: Región de las inmunoglobulinas que contiene los dominios C_{H2} y C_{H3} de las cadenas pesadas. Es responsable de la unión a los

receptores celulares para inmunoglobulinas y al componente C1q del complemento.

GALT ("Gut Associated Lymphoid Tissue"): Tejido linfoide de la mucosa gastrointestinal.

Gammaglobulinas: Proteínas séricas con movilidad electroforética en la región gamma. La mayoría de las inmunoglobulinas migran en esta región.

Gammapatías monoclonales: Desórdenes que se caracterizan por presentar inmunoglobulinas monoclonales. Un ejemplo de estas enfermedades es el Mieloma múltiple.

Generación de diversidad: Se refiere al proceso mediante el cual se produce un gran número de regiones V de los anticuerpos.

Genes C: Segmentos génicos que codifican la región constante de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas y de las cadenas alfa, beta, gamma y delta de los receptores de células T.

Genes D: Segmentos génicos situados entre los genes V y J en las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, y en los genes de las cadenas beta y gamma de los receptores de las células T, que se recombinan con V y J durante la ontogenia.

Genes J: Segmentos génicos en los genes de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, y en los genes para las cadenas de receptores de células T, que se combinan durante la diferenciación linfocitaria. Codifican parte de los dominios variables.

Genes V: Genes que codifican la mayor parte de los dominios V de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos, y de las cadenas alfa, beta, gamma y delta de los receptores de células T.

Genoma: Todo material genético contenido dentro de la célula.

Genotipo: Material genético heredado de los padres. El individuo no expresa necesariamente todo este material.

Gradiente de Ficoll: Es utilizado para aislar células de diferente densidad. En particular es muy utilizado para separar linfocitos. El Ficoll es un polímero sintético.



Grupo inmunodominante: Elemento estructural de un epítipo que aporta la mayor energía para la interacción con un anticuerpo.

GVH ("Graft Versus Host"): Proceso causado por linfocitos donantes alogénicos que reaccionan contra los tejidos del huésped en un receptor inmunológicamente comprometido.

H-2: Complejo Principal de Histocompatibilidad del ratón.

Haplotipo: Conjunto de determinantes genéticos situados en un solo cromosoma.

Hapteno: Molécula pequeña que puede actuar como epítipo, pero es incapaz de provocar por sí misma una respuesta de anticuerpos.

Hematopoyesis: Proceso por el cual se forman, diferencian y maduran las células sanguíneas.

Hemolisina: Un anticuerpo u otra sustancia capaz de producir lisis eritrocitaria.

HEV ("High Endothelial Venule"): Vénula de endotelio columnar (alto). Área especializada de las vénulas post-capilares, a través de las cuales los linfocitos migran hacia los ganglios linfáticos.

Heterohibridoma: Célula híbrida -constituida por dos hibridomas diferentes- que secreta un anticuerpo bifuncional.

Heterólogo: Se refiere a las diferencias antigénicas intraespecies.

Hibridoma: Línea celular creada *in vitro* mediante fusión de dos tipos de células linfoides, uno de los cuales es tumoral. Los hibridomas más conocidos son aquellos constituidos con un linfocito B, confiriéndoles la propiedad de secretar anticuerpos monoclonales.

Hipersensibilidad inmediata: Sensibilidad inmunológica mediada por anticuerpos que se manifiesta por reacciones tisulares pocos minutos después de la unión antígeno-anticuerpo.

Hipogammaglobulinemia: Deficiencia de las clases mayores de inmunoglobulinas séricas (IgG, IgM, IgA).

Histamina: Amina vasoactiva contenida en los gránulos de mastocitos y basófilos, que causa contracción de la musculatura lisa de bronquiolos humanos y vasos sanguíneos pequeños. Aumenta la permeabilidad capilar y la secreción de glándulas de las mucosas bronquial y nasal.

Hipergammaglobulinemia monoclonal: Incremento de las inmunoglobulinas producidas por un solo clon de células B. Contiene una clase de cadenas H y un tipo de cadenas L.

Hipergammaglobulinemia policlonal: Incremento de las gammaglobulinas de varias clases. Contiene diferentes cadenas H y L.

Hipersensibilidad: Ver alergia.

Histocompatibilidad: Situación que permite que se acepten injertos entre individuos.

HLA ("Human Leukocyte Antigen"): Complejo Principal de Histocompatibilidad humano.

Homólogo: De la misma especie.

Humoral: Relativo a los líquidos extracelulares incluyendo el suero y la linfa.

ICAM-1 ("Intercellular Adhesion Molecule-1"): Molécula de la superficie celular, que se encuentra en varios tipos de leucocitos y en células no hematopoyéticas, que interactúa con LFA-1 e interviene en el tránsito celular.

Idiotipo: Antigenicidad de la región V de un receptor linfocitario T o B. Corresponde al conjunto de idiotopos de ese receptor.

Idiotopo: Determinante antigénico único de la región V de un anticuerpo o de un receptor linfocitario.

IgA: Inmunoglobulina predominante en las secreciones. Se caracteriza por la presencia de cadenas pesadas alfa (α).

IgA secretora: Dímero de moléculas de IgA unidas por una cadena J y que presenta un componente secretor.

IgD: Inmunoglobulinas de 185 kDa y glicosilada en 9-14% . Se encuentra en la membrana de los



linfocitos B circulantes. Tiene cadenas pesadas delta (δ)

IgE: Inmunoglobulina involucrada en reacciones de hipersensibilidad inmediata. Caracterizada por cadenas pesadas de tipo épsilon (ϵ).

IgG: Inmunoglobulina de aproximadamente 150 kDa con capacidad de fijar complemento y atravesar la placenta. Se encuentra predominante en el suero. Presenta cadenas pesadas de tipo gamma (γ).

IgM: Inmunoglobulina pentamérica de 900 kDa que representa aproximadamente el 10% de las inmunoglobulinas presentes en el suero. Sus cadenas pesadas son de tipo mu (μ).

Imagen interna: Anticuerpo anti-idiotípico cuyo sitio de combinación se asemeja o representa al epítipo de un antígeno.

Infección oportunista: Infección producida en individuos inmunodeprimidos, por microorganismos de baja virulencia en individuos inmunocompetentes.

Inflamación: Es la respuesta de un tejido a la injuria, la cual es función de la llegada de moléculas del suero y células del sistema inmune al sitio del daño. La reacción consiste de tres componentes locales: Incremento de la circulación, incremento de la permeabilidad capilar y salida de células desde los vasos sanguíneos al tejido dañado

Inmunidad adquirida o específica: Respuesta inmune mediada por anticuerpos y células T caracterizada por ser específica y presentar memoria.

Inmunidad innata o inespecífica: Mecanismos de defensa presentes desde el nacimiento, los cuales no presentan especificidad ni memoria inmunológica.

Inmunidad mediada por células: Inmunidad en la que predomina la participación de linfocitos y macrófagos.

Inmunidad pasiva: Protección adquirida por la introducción de anticuerpos preformados o células inmunes en individuos no inmunizados.

Inmunización: Administración natural o artificial de un antígeno, para provocar una respuesta inmune; particularmente cuando ésta conlleva a la protección del huésped contra alguna enfermedad como es el caso de las vacunas.

Inmunocomplejo: Complejo antígeno-anticuerpo, que puede contener también componentes del sistema del complemento.

Inmunodeficiencias primarias: Son defectos genéticos del sistema inmune y se manifiestan generalmente en la infancia.

Inmunodeficiencias secundarias: Procesos desarrollados por una variedad de condiciones patológicas, drogas inmunosupresoras o infecciones de las células del sistema inmune.

Inmunodifusión radial: Método para cuantificar antígenos por inmunodifusión, en el cual un antígeno se pone en un gel para que difunda por el agar que contiene el anticuerpo. Los círculos de precipitación resultantes reflejan la concentración del antígeno.

Inmunoelectroforesis: Método que combina una separación electroforética inicial de proteínas seguidas por una inmunodifusión con el resultado de formación de arcos de precipitación.

Inmunofluorescencia: Método que permite la identificación microscópica mediante el microscopio de luz o citometría de flujo, de antígenos localizados en tejidos o células, utilizando anticuerpos conjugados con fluorocromos.

Inmunogenicidad: Capacidad de generar una respuesta inmune específica, que produce anticuerpos y/o linfocitos T-activados.

Inmunógeno: Sustancia que cuando es introducida en un animal, estimula la respuesta inmune.

Inmunoglobulina: Glicoproteína compuesta por cadenas H y L, que actúa como anticuerpo. Los anticuerpos son inmunoglobulinas.

Inoculación: Introducción de un antígeno o antisero en un animal para conferir inmunidad.



Integrinas: Familia de glicoproteínas diméricas de transmembrana que promueven la adhesión celular. Son un tipo de moléculas de adhesión.

Interferones: Grupo heterogéneo de proteínas de bajo peso molecular, elaboradas por células infectadas. Son un tipo de citoquinas.

Interleuquinas (IL): Grupo de moléculas, también denominadas citoquinas que intervienen en la señalización entre las células del sistema inmune.

Intrón: Segmento del gen, ubicado entre los exones, que no codifica ninguna secuencia proteica.

Isoelectroenfoque: Separación de moléculas sobre la base de su carga. A lo largo de un gradiente de pH, cada molécula migra hasta alcanzar una carga neta nula.

Isólogo: De constitución genética idéntica.

Isotipo: Se refiere a la variación genética dentro de una familia de proteínas o péptidos, de forma que cada miembro de la especie tendrá todos los isotipos de la familia representados en su genoma. Ej.: las clases de inmunoglobulinas.

Lectinas: Sustancias derivadas de plantas. Se unen específicamente a azúcares y oligosacáridos, y tienen actividad de pan-aglutinina para eritrocitos. Las lectinas también son comúnmente mitógenos.

LES (Lupus Eritematoso Sistémico): Enfermedad autoinmune del ser humano, en la que habitualmente intervienen anticuerpos antinucleares.

Leucotrienos: Grupo de metabolitos del ácido araquidónico que tienen potentes efectos farmacológicos.

LFA ("Leucocyte Functional Antigens"): Grupo de tres moléculas que median en la adherencia intercelular entre los leucocitos y otras células, de un modo antígeno-inespecífico. Son un tipo de moléculas de adhesión.

LGL ("Large Granular Lymphocytes"): Grupo de linfocitos morfológicamente definidos que contienen la mayor parte de la actividad de las

células K y NK. Poseen marcadores linfocitarios y de monocitos/macrófagos.

Ligamiento: Condición en la que dos genes se hallan muy próximos en un cromosoma y suelen heredarse juntos.

Ligando: Cualquier molécula que forma un complejo con cualquier otra molécula. A esta última se le llama receptor.

Línea celular: Células producidas por crecimiento continuo *in vitro* de un determinado cultivo celular. Las líneas celulares suelen contener varios clones.

Línea germinal: Material genético transmitido a través de los gametos, antes de que sea modificado por recombinaciones somáticas o mutaciones.

Linfoblasto: Precursor inmaduro de los linfocitos, presente normalmente en médula ósea.

Linfoquinas: Término genérico para designar moléculas que transmiten señales entre las células del sistema inmune, es decir son citoquinas y son producidas por los linfocitos.

Linfocito: Son las células fundamentales en una respuesta inmune porque reconocen el antígeno en forma específica vía un receptor localizado en su membrana. Pueden ser de tipo B o T. Célula mononuclear de 7-12 μm de diámetro, que presenta un núcleo con cromatina densamente compacta y escaso citoplasma.

Linfocito activado: Linfocito que ha sido estimulado por un antígeno específico o por un mitógeno no específico, como por ejemplo una lectina.

Linfocito B (Célula B): Células precursoras de las células plasmáticas, productoras de anticuerpos.

Linfocito T (Célula T): Células derivadas del Timo que participan en una variedad de reacciones inmunes mediadas por células.

Lisosoma: Organelo que contiene enzimas hidrolíticas y que está presente en el citoplasma de algunas células, como por ejemplo monocitos y macrófagos.



LPS (Lipopolisacárido): Producto de las paredes celulares de algunas bacterias Gram negativas, capaz de actuar como mitógeno para las células B.

Locus: Sitio del cromosoma en el que se encuentra un determinado gen.

Macrófago: Células fagocíticas mononucleares que se encuentran en algunos tejidos y que derivan de los monocitos. Presentan funciones accesorias en la inmunidad celular.

Maduración de la afinidad: Aumento de la afinidad de los anticuerpos. Se presenta con frecuencia durante una respuesta inmune secundaria.

MALT (“Mucosa Associated Lymphoid Tissue”): Término genérico con que se denomina al tejido linfoide del tubo gastrointestinal, árbol bronquial y otras mucosas.

Marcadores CD (“Cluster of Differentiation”): Moléculas de la superficie celular que pueden distinguirse con la ayuda de anticuerpos específicos. Se utilizan generalmente para diferenciar las distintas poblaciones celulares y estadios de maduración de las células del Sistema Inmune.

Medio HAT: Medio de cultivo utilizado para seleccionar los híbridos de una fusión entre linfocitos B y células mieloides. Contiene Hipoxantina, Aminopterina y Timidina.

Memoria inmunológica: Mayor respuesta de un animal inmune a la segunda o subsecuente administración de un antígeno.

Mieloma múltiple: Tumor de células plasmáticas. Las células del mieloma producen una inmunoglobulina monoclonal llamada paraproteína, la cual es detectable en el suero del paciente (componente monoclonal).

Mimotopo: Péptido sintético que imita o contiene la estructura de un epítipo. Epítipo sintético.

Mitógeno: Sustancia que estimula la síntesis del DNA, transformación blástica y finalmente división de linfocitos.

MLR/MLC (“Mixed Lymphocyte Reaction”/“Mixed Lymphocyte Culture”): Sistema analítico para observar el reconocimiento de las células

las alogénicas, por parte de las células T. La respuesta se mide por la proliferación que se produce en presencia de las células estimulantes.

Moléculas MHC clases I, II, III: Tres clases principales de moléculas codificadas dentro del MHC. Las moléculas de clase I poseen un péptido MHC, asociado con la Beta2-microglobulina; las moléculas de clase II poseen dos péptidos codificados por el MHC, asociados de forma no covalente.

Monoclonal: Derivado de un solo clon, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que son producidos por un único clon de células B y tienen carácter homogéneo.

Mutación genética: Cambio, delección, inserción o inversión de una base o secuencia nucleotídica en la molécula de DNA.

Mutación somática: Proceso que ocurre durante la maduración de las células B y que afecta la región V de los anticuerpos, aumentando la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

Oligoclonal: Conjunto de anticuerpos de especificidad restringida.

Opsonización: Proceso por el cual se facilita la fagocitosis mediante depósito de opsoninas (un Ej.: anticuerpos y C3 b) sobre el antígeno.

Órganos linfoides primarios: Órganos linfoides que son esenciales para la diferenciación de los linfocitos. Estos órganos son el Timo para los linfocitos T y la Médula Ósea, bolsa de Fabricio en las aves, para los linfocitos B.

Órganos linfoides secundarios: Órganos linfoides periféricos en los cuales se producen las respuestas inmunes adquiridas. Estos órganos son el bazo, los ganglios linfáticos y el tejido linfoide asociado a mucosas.

PAF (“Platelet Activating Factor”): Factor activador de las plaquetas. Factor liberado por los basófilos que causa agregación plaquetaria.

Paraproteinemia: Condición presente en un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizada por la presencia de inmunoglobulina monoclonal en el suero u orina.



Paratopo: Parte de la molécula del anticuerpo que se une al epítipo.

Patógeno: Microorganismo que causa enfermedad.

PHA (“Phytohemagglutinin”): Mitógeno para células, principalmente linfocitos T. Estimula la síntesis de DNA y la transformación blástica de los linfocitos.

Pinocitosis: Proceso mediante el cual la célula capta líquidos o partículas muy pequeñas.

Placas de Peyer: Tejido linfoide ubicado en la mucosa del intestino delgado. Contienen todos los elementos involucrados en una respuesta inmune: linfocitos B, células plasmáticas, centros germinales, macrófagos y áreas dependientes de células T, entre otros.

Plásmido: Pequeño DNA circular de origen bacteriano que contiene resistencia a antibióticos. Se utiliza como vector de clonamiento.

Plasmina: Enzima fibrinolítica capaz de digerir proteolíticamente la proteína C1 del complemento.

Policlonal: Se refiere a la activación policlonal y mitosis de células T o B que tienen diferentes receptores en su superficie, es decir, en una respuesta policlonal participan múltiples clones de diferente especificidad.

Presentación antigénica: Proceso por el cual las células presentadoras de antígeno expresan el antígeno en moléculas MHC en su superficie; de esta manera el antígeno es reconocible por los linfocitos T.

Procesamiento antigénico: Modificación del antígeno en una forma que puede ser reconocido por los linfocitos T.

Proteasoma: Es un complejo de proteasas multicatalíticas que rompe proteínas citosólicas en pequeños fragmentos. Dos de sus componentes (LMP-2 y LMP-7) son codificados dentro del MHC. El proteasoma produce trocitos de antígeno que pueden ser cargados sobre moléculas MHC de clase I.

Prostaglandinas: Derivados farmacológicamente activos del ácido araquidónico. Las diferentes prostaglandinas son capaces de modular la movilidad de las células y las respuestas inmunes.

Proteína básica mayor: Proteína tóxica de la membrana de los eosinófilos que produce daño tisular en alergias y enfermedades inflamatorias.

Proteína de Bence-Jones: Cadena liviana monoclonal presente en la orina de pacientes con gammapatías monoclonales.

Proteínas de fase aguda: Proteínas séricas cuyos niveles aumentan durante la infección o las reacciones inflamatorias.

Proteínas G: Proteínas regulatorias que ligan guanidín-nucleótidos, y que acoplan la señal desde el receptor a una activación de enzimas asociadas a la membrana o a la actividad de canales iónicos.

Prueba Coombs: Método para detectar inmunoglobulinas unidas a glóbulos rojos. En la Prueba de Coombs directa, los eritrocitos de un individuo sensibilizado son aglutinados por anticuerpos anti-gammaglobulinas (Suero de Coombs). En la Prueba de Coombs indirecta, el suero del paciente es incubado con eritrocitos normales y las células sensibilizadas son aglutinadas con una anti-inmunoglobulina.

Púrpura trombocitopénico inmune: Síndrome clínico, en el cual existe trombocitopenia persistente asociada a la presencia de autoanticuerpos circulantes.

Quimiotaxis: Aumento de la migración direccional de las células, particularmente en respuesta a gradientes de concentración de ciertos factores quimioattractantes o quimiotácticos.

Quininas: Grupo de mediadores vasoactivos que se producen tras la lesión tisular.

Radioinmunoensayo: Método analítico cuantitativo en el cual un isótopo radiactivo es usado para detectar antígenos o anticuerpos en alguna forma de inmunoensayo.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Método de amplificación de segmentos de DNA



o RNA de composición conocida, usando partidores para iniciar la polimerización por las DNA o RNA polimerasas termoestables.

Reacción cruzada: La reacción de un anticuerpo con un antígeno diferente del que estimuló su secreción.

Receptor: Molécula de la superficie celular que se une específicamente a su ligando (proteínas o péptidos).

Receptor Fc: Receptor para los fragmentos Fc de inmunoglobulinas, presente en varias células.

Receptor de células T: Receptor antigénico de las células T que consta de un dímero alfa/beta (TCR-2) o gamma/delta (TCR-1), asociado al complejo CD3.

Recombinación: Proceso por el cual la información genética se redistribuye durante la meiosis. Este proceso tiene lugar también durante la redistribución somática del DNA, que ocurre en la formación de los genes que codifican las moléculas de anticuerpo y los receptores antigénicos de las células T.

Región constante: Región carboxilo terminal, relativamente invariable de las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas, y las cadenas alfa, beta, gamma y delta de los receptores de células T.

Región hipervariable: Se refiere a las tres zonas más variables de la región V en las cadenas de inmunoglobulinas y de los receptores de células T. Estas regiones contribuyen al sitio de unión con el antígeno.

Repertorio: Es la suma total de receptores para antígeno producido en el sistema inmune de una especie dada. El repertorio inicial está parcialmente determinado por los genes del TCR y por las cadenas H y L de las inmunoglobulinas.

Respuesta inmune celular: Proceso en el cual, la actividad inmune es llevada a cabo por linfocitos T citotóxicos y células NK principalmente.

Respuesta inmune humoral: Proceso en el cual, la actividad inmune es mediada por inmunoglobulinas que se encuentran principal-

mente en el suero, las que pueden activar el sistema del complemento.

Respuesta primaria: Es la respuesta inmune (celular o humoral) que se produce después de un encuentro inicial con un determinado antígeno.

Respuesta secundaria: Respuesta inmunitaria que sigue a un segundo o subsiguiente encuentro con un determinado antígeno.

Respuesta tipo Th1 y tipo Th2: El sub-set de linfocitos Th1 promueve las respuesta de tipo celular, mientras que el sub-set Th2 promueve respuestas mediadas por anticuerpos. Cada modo de respuesta modula a la otra. Por ejemplo, el IFN γ producido por linfocitos Th1 limita la proliferación de células Th2.

Restricción MHC: Los linfocitos T reconocen antígenos asociados con ciertas moléculas MHC. Por ejemplo, un linfocito T que reconoce un antígeno asociado con H-2K^b no lo reconoce si está asociado con H-2D^b ó H-2K^k. La base de esta observación, es que los linfocitos T pueden interactuar con moléculas MHC propias que han sido selectivamente expandidas en el timo, y que están preparadas para responder a antígenos sobre células presentadoras de antígeno que tienen estos mismos MHC.

Retrovirus: Virus que contiene y utiliza una transcriptasa inversa.

Roseta E: Formación de un grupo (roseta) de células consistente en eritrocitos y linfocitos T humanos.

Roseta EAC: Grupo de eritrocitos sensibilizados con anticuerpo y complemento, alrededor de linfocitos B humanos.

Segmentos de andamiaje: Secciones de las regiones V del anticuerpo, situadas entre las regiones hipervariables.

Seudogenes: Genes con estructuras homólogas a las de otros genes, pero que no pueden ser expresados.

S.I.D.A.: Inmunodeficiencia, causada por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).



Sinergismo: Interacción cooperativa.

Singénico: Animal perteneciente a cepas obtenidas mediante procreación endogámica, de forma que las parejas de autosomas dentro de un individuo son idénticas.

Sistema fagocítico mononuclear (SFM): Incluye monocitos y macrófagos.

Sistema linfático: Es el sistema de vasos que recorre el cuerpo y recibe el exudado de los tejidos llevándolo a la sangre. Este líquido transparente recibe el nombre de linfa. Este sistema también actúa como una ruta importante en el movimiento de antígenos desde la periferia a los nódulos linfáticos y en la re-circulación de linfocitos y células dendríticas.

Subclases de inmunoglobulinas: Subdivisión de las clases de inmunoglobulinas basado en diferencias antigénicas y estructurales en las cadenas pesadas (H). En humanos existen cuatro subclases de IgG: IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

Superfamilia de las inmunoglobulinas: Grupos de genes relacionados estructuralmente que codifican a las inmunoglobulinas, receptor de células T, moléculas MHC y otras moléculas.

Supresión: Una subpoblación de linfocitos T (T supresores o Ts) modula la actividad de otros linfocitos.

TAP-1 y TAP-2: (Proteínas transportadoras de antígeno) Son miembros de la familia de transportadores ABC codificados en el MHC. Ellas transfieren péptidos a través de la membrana del retículo endoplásmico, para ser presentados a moléculas MHC de clase I.

Timo: Órgano linfoide primario habitualmente ubicado en la parte superior del tórax, en el cual se produce el desarrollo y maduración de las células T.

Título de anticuerpos: Concentración relativa de los anticuerpos presentes en una muestra de suero u otro fluido.

TNF (“Tumor Necrosis Factor”): Citoquina liberada por los macrófagos activados.

Tolerancia: Falta de respuesta inmune específica.

Toxide: Derivado antigénico no tóxico proveniente de una toxina.

Transcriptasa reversa: Enzima que cataliza la transcripción del RNA a DNA.

Transferencia pasiva: Tratamiento basado en la transferencia de anticuerpos o células inmunes extraídos de un individuo sensibilizado a un antígeno, a otro individuo.

Vacunación: Inmunización con antígenos administrados para la prevención de enfermedades infecciosas.

Vacuna anti-idiotípica: Vacuna que contiene un anticuerpo anti-idiotípico como inmunógeno. El anticuerpo anti-idiotípico es una imagen interna de un antígeno.

Vacuna recombinante: Vacuna que contiene un antígeno preparado mediante tecnología del DNA recombinante o un virus recombinante como inmunógeno.

Vacuna génica: Contiene DNA que codifica un antígeno.

Vacuna sintética: Vacuna que contiene péptidos sintéticos como inmunógeno.

Vía alternativa del complemento: Vía de activación del sistema del complemento en que interviene C3 y los factores B, D, P, H e I. Interactúan en la vecindad de una superficie activadora para constituir una vía alternativa en la formación de la C3-convertasa.

Vía clásica del complemento: Vía por la cual los complejos antígeno-anticuerpo pueden activar el sistema del complemento; en la generación de C3 convertasa participan los componentes C1, C2 y C4.

Vía de la lipoxigenasa: Metabolismo enzimático de la membrana celular. A partir del ácido araquidónico se generan leucotrienos.

Vía lítica: Participan los componentes C5-C9 (Complejo de ataque a membrana), responsable



de la lisis de las membranas en las células sensibilizadas.

Xenogénico: Dícese de las diferencias antigénicas interespecies.

Xenosensibilización: Respuesta inmune de una especie animal contra antígenos de otra especie.

Referencia

Palomo I., Ferreira A., Sepúlveda C., Rosemblatt M., Vergara U., (Eds.), **Fundamentos de Inmunología**, Editorial Universidad de Talca, 1998. Modificado por Palomo I., Carrión F., Becker M. I.





ÍNDICE ALFABÉTICO GENERAL DE MATERIAS

A

ABO (ver Sistema ABO) 111, 440
Activación 65, 195, 202, 205
Adenina 740
Adenosin deaminasa 499
ADN 739
Adyuvante de Freund's 600
Afinidad 136
Agammaglobulinemia 499
Alelos, exclusión 142
Alergeno 114
Alergia 381
Aloinjerto 621
Aloinmunidad 442, 447
Alogénico 621
Anafiláctico, shock 393
Anemia hemolítica inmune 439
Anergia clonal 272
Anticuerpo (ver además Inmunoglobulina)
 afinidad 136
 anti-citoplasma de neutrófilos 455
 antiespermáticos 321
 antifosfolípidos 425
 anti-idiotipo 283
 anti-injerto 623
 avidez 136
 biosíntesis 146
 biotecnología (usos) 731
 cadenas
 livianas 127
 pesadas 127
 clases 130
 diversidad 136
 estructura 120
 monoclonal 721
Antigenicidad 106

Antígeno 105
 asociación MHC 185, 187
 clasificación 113
 características 113
 de diferenciación 759
 determinante antigénico 106
 epítipo (ver en E)
 eritrocitario 111, 439
 hapteno 108
 histocompatibilidad 174
 neutrófilos 453
 plaquetas 446
 procesamiento y presentación
 endógena 185
 exógena 187
Anti-idiotipo 283
Antihistamínicos 381
Apoptosis 271
Artritis Reumatoídea 411
Asma bronquial 381, 395
Atópico 380
Autoanticuerpo 404
Autoantígeno 404
Autotrasplante 621
Autoinmune 404
Autotolerancia 404

B

β 2-microglobulina 171
Bacteria, inmunidad frente a 533
Basófilo 74
Bazo 82



C

C, región
 inmunoglobulina 127
 receptor célula T 152
Cadena
 α
 MHC clase I 174
 MHC clase II 174
 β
 MHC clase II 174
 célula T 152
 δ
 anticuerpo 133
 receptor célula T 153
 γ
 anticuerpo 131
 receptor célula T 153
 Invariante (Ii) 188
 κ 127
 λ 127
Calnexina 188
CD, moléculas 759
CDR 136
Célula
 de Langerhans 65
 endotelial columnar (CEC) 81
 M 304
 métodos de separación 658
 leucocito (ver en L)
 presentadora de antígenos (CPA) 183
Centro germinal 80
CSF 56
CFU 56
Chaperonina 187
Citólisis
 complemento 344
 linfocitos Tc 352
 «natural killer» 358
Citopenia
 inmune 439
Citoquina (ver Interleuquina)
Citosina 740
Citotoxicidad
 análisis de 658
 mediada por célula 349
Clonamiento 742
Colágeno 55
Complejo ataque membrana 344
Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)
 antígeno (o molécula) 169
 clase I 171

 clase II 172
 clase III 173
Complejo inmune 383
Complejo multicatalítico (ver proteasoma)
Complemento
 vía
 alterna 341
 clásica 337
C1 333
C2 333
C3 333
C4 333
C5 333
C6 333
C7 333
C8 333
C9 333

D

D, región
 genes cadenas H de Ig 137
Deficiencia inmunitaria combinada grave (SCID) 498
Déficit
 adenosin desaminasa 498
 adhesión leucocitaria 498
 mieloperoxidasa 498
 purín-nucleósido-fosforilasa 499
Deleción clonal 272
Desoxirribosa 740
Dermatitis por contacto 385
Determinante antigénico (ver Epítipo)
Diacilglicerol 194
Difusión en gel agarosa 643
Di George, anomalía de 507
Disociación, constante de 136
Disgenesia reticular 505
Dominios de inmunoglobulinas
 dominios constantes 130
 dominios variables 128
Donante 621

E

Efecto “carrier” 598
Electroforesis 462
ELISA 650
Endotelio columnar 81
Enzimas de restricción 742
Eosinófilo 73



Epítopo 106
Exon 747

F

Fab 128
Factor
 B (Complemento) 332
 D (Complemento) 332
 estimulante de colonias granulocito/macrófago
 (ver GM-CSF)
 H (Complemento) 332
 I (Complemento) 332
 necrosis tumoral (TNF) 217
 quimiotáctico 67
Fagocitosis 70
 fagosoma 70
 opsonización 70, 330
Fibronectina 55
Fluorescencia 649, 701
Fluorocromos 706
Fusión 725

G

Gammaglobulinas 461
Ganglios linfáticos 80
Gen 739
Glucocorticoides 631
GM-CSF 56
G-CSF 56
Granulocito 65
Guanina 740

H

Hapteno 108
Haplotipo 176, 691
HAT (medio selección) 723
Hemaglutinación 647
Hematopoyesis 55
Heterohibridomas 731
Hibridomas 722
HLA 171, 687

Hipersensibilidad
 manifestaciones orales 749
 tipo I 381
 tipo II 382
 tipo III 383
 tipo IV 384
Hipogammaglobulinemia 498
Histamina 75, 380, 390
“Homing” linfocitario 253

I

Idiotipo 130
Idiotopo 130
IgA secretora 133, 305
Inflamación 96
Inmunidad
 adquirida 58, 100
 innata 87
“Immunoblotting” 651
Inmunodeficiencia
 manifestaciones orales 480
 primaria 497
 secundaria 513
Inmunodifusión 643
Inmunoelectroforesis 463, 644
Imunofluorescencia 649
Imunógeno 590
Imunogenicidad 106
Imunoglobulina (ver además Anticuerpo)
 IgA 132
 IgD 133
 IgE 134
 IgG 131
 IgM 132
 BCR 120
Inmunomodulador 629
Inmunoprecipitación 641
Inmunosupresión 624
Inmunoterapia 613, 629
Inmunotoxinas 614
Infección 533, 547, 559, 569
Inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) 199
Integrinas 245
Interleuquinas 211
Intron 747
Isotipo 130



J

J, cadena
IgA 132
IgM 132

K

Ka (constante de
asociación o afinidad) 136
 κ (cadena Kappa) 127
Kd (constante de disociación) 136

L

λ (cadena Lambda) 127
Laminina 55
Leucocito
basófilo 74
eosinófilo 73
linfocito 57
monocito 62
neutrófilo 65
Leucoplasia pilosa 481
Leucotrieno 90
Linfocito
B
activación 62
de memoria 60
diferenciación 266
función 59
marcadores 777
receptor antigénico (BCR) 120
T
activación 62
citotóxico 59, 352
de memoria 60, 352
diferenciación 59, 269
«helper» 59
moléculas accesorias 163
MHC 181
receptor (TCR) 152
CD3 154
Th1, Th2, Th0 226, 282
Linfoquinas (ver Interleuquina)
LMP 185
Lisozima 93
Litre 114
Lupus Eritematoso Sistémico 402, 416

M

Macrófago 63
MALT (“Mucosal Associated Lymphoid
Tissue”) 83
Mastocito 75, 381, 389
M-CSF 56
Médula ósea 75
Megacariocito 56
MHC (ver Complejo Principal de
Histocompatibilidad)
Mieloma múltiple 467
Moléculas de adhesión
Integrinas 245
Superfamilia de las Ig 246
Selectinas 248
Moléculas CD (ver CD, moléculas)
Monocito 62
Monoclonal (ver anticuerpo monoclonal)

N

“Natural killer” 58, 351
Neutrófilo 65
Neutropenia inmune 453

O

Opsonización 330
Órganos linfoides
primarios 75
secundarios 80

P

Papaína 128
Parásito, respuesta inmune a 569
Paratopo 127
Péptidos
reconocimiento por TCR 181
unión a moléculas MHC 184
vacunas sintéticas 596
Perforina 355
Plaqueta 56, 445
Plasma
proteínas, inflamación 98
Plasmacitoma 470



Polimorfismo
moléculas MHC 170, 687
Polimorfonuclear
separación de 658
evaluación de función 678
Properdina 332
Prostaglandinas 96
Proteasoma 185
Proteína de Bence-Jones 461
Proteína Kinasa 196

Q

Quimioquinas 237
Quimiotaxis 67

R

Radioinmunoanálisis 652
Reacción de la polimerasa en cadena 745
Receptor
de células B (BCR) 120
de células T (TCR) 152
citoquinas 219
Fc 68, 127
fracciones del Complemento 332
moléculas de adhesión 244
Respuesta inmune
células que intervienen 55
funciones efectoras 329, 351, 367
regulación 277
selección clonal 62
Rinitis alérgica 381
Ribosa 740
RNA 739

S

S, proteína 332
Segundo mensajero 199
Selección
clonal 62
negativa 272
positiva 271
Selectinas
E-Selectina 248
L-Selectina 248
P-Selectina 248

Shock anafiláctico (ver, Anafiláctico shock)
SIDA 513
Síndrome
antifosfolípido 425
de Good Pasture 402, 382
de Sjögren 432
de Wiskott-Aldrich 507
Hiper-IgM 501
Inmunodeficiencia adquirida o secundaria 511
Sistema antígeno leucocitario
humano (HLA) 169, 687
Sistema
ABO (grupo sanguíneo) (ver ABO)
complemento 329
endocrino 292
fagocítico-mononuclear 62
inmune, célula 55
linfático 57
quininas 94
“Southern blot” 743
Superantígeno 114
Superfamilia de las Inmunoglobulinas 246

T

Timina 740
Timo
desarrollo célula T 269
estructura 78
Timocito 270
Tiroiditis Hashimoto 402
Tirosina kinasa (ver Proteína Kinasa)
Tolerancia
oral 309
Transgénico 746
Transmigración linfocitaria 250
Trasplante (Inmunología) 621
Trombocitopenia inmune 445
Tumor (Inmunología) 607

U

Úlcera oral recurrente (aftas) 484
Unión, antígeno-anticuerpo 640
Uracilo 740



V

V (región variable)

 inmunoglobulinas *128*

 receptor de células T *152*

Vacunas

 adyuvantes *600*

 anti-idiotípicas *596*

 efecto “carrier” (ver efecto “carrier”)

 naturales (tradicionales) *590*

 recombinantes *593*

 sintéticas *596*

Virus, inmunidad frente a *559*

W

“Western blot” (ver “Immunoblotting”)

X

Xenoantígeno *621*

Xenotrasplante *621*

Z

Zona

 exceso *642*

 equivalencia *642*





Este libro se terminó de imprimir en
Impresora Gutenberg-Talca, en una tirada de
450 ejemplares en Octubre de 2002.