

Progresos en Pediatría: *Medicina molecular*

Introducción a la inmunología molecular. II *

Dr. ALBERTO ROSETO#

ARCHARG PEDIATR / 1998 / VOL. 96: 301

LA PROTECCION INMUNITARIA Y LA MEMORIA INMUNOLOGICA (Gráfico 1)

Como vimos, las defensas inmunitarias cooperativas entre la INNE (inmunidad natural no específica) y la IEA (inmunidad específica adquirida), sirven para responder por primera vez y todas las veces que un antígeno determinado vuelva a penetrar un organismo. Esto fue fundamental en la evolución de los seres pluricelulares, es decir, la memoria inmunitaria que un individuo adquiere en su vida y que se la da exclusivamente el IEA.

Los seis tipos de células fenotípicamente y funcionalmente diferentes que participan en la IEA (las efectoras y de memoria de los linfocitos Th, Tc y B) difieren en la longevidad de sus respuestas, tienen distintas moléculas funcionales y de mantenimiento y actúan por diferentes caminos para suministrar protección. Entre ellas, los plasmocitos constituyen la primera línea de defensa contra una infección. En efecto, la preexistencia de anticuerpos neutralizantes u opsonizantes en el sitio de entrada es el mecanismo más efectivo contra la gran mayoría de las infecciones virales y bacterianas. Después de una infección o vacunación, los plasmocitos pueden secretar anticuerpos por décadas, en el suero. En contraste, los anticuerpos de la mucosa desaparecen en semanas y nunca persisten más de un año. Esto, en la práctica tiene importantes consecuencias. No es por azar que la corta inmunidad de las mucosas esté asociada, por ejemplo, con las infecciones de los virus que se replican en ellas: rotavirus, virus sincicial respiratorio (VSR), rinovirus; mientras que la inmunidad de por vida es constatada en las infecciones sistémicas: sarampión, viruela, paperas, rubéola. A estas dos líneas generales les caben, como siempre, las excepciones y variantes pero la norma es esa.

Una vez que nuestras células de la IEA tuvieron su primera experiencia con un antígeno exterior, podrían guardar ese recuerdo toda una vida. Los linfocitos Th, Tc y los linfocitos B pueden guardar el recuerdo del antígeno en sus memorias, sin un aparente nuevo contacto con el mismo antígeno. Muchas son las preguntas que aún quedan por responder en los mecanismos básicos moleculares para conocer en su totalidad el mecanismo global de acción de todos estos componentes. Hablaremos de lo que más se conoce por ahora: las líneas generales de acción.

Como introducción, cabe recordar que los dos fenotipos actuantes, los efectores activos y las células de memoria de los linfocitos T y B, tienen diferentes actuaciones en la protección inmune de las mucosas y en las infecciones sistémicas; la protección inmunitaria contra ciertos gérmenes es por toda la vida y contra otros la inmunidad está limitada en el tiempo.

La memoria de los linfocitos T

Cuando los linfocitos Th y Tc entran en contacto por primera vez con un antígeno exterior pasan por tres fases funcionales: a) la activación y replicación expansiva celular; b) la muerte de la mayoría y c) la entrada en quiescencia celular y de conservación de la memoria inmunitaria de las sobrevivientes. Para la primera fase, las células Th y Tc se expanden entre 100 y 5.000 veces. Posteriormente, más de 90% de ellas mueren por apoptosis entre 7 y 30 días después del contacto antigénico. Este fenómeno se denomina muerte celular inducida por activación (AICD= activation induced cell death) y su función es regular el número y mantener la homeostasis de los linfocitos T. La tercera fase de la respuesta T es la de mantenimiento de un "pool" estable de ellos por muchos años. Una nueva exposición al antígeno encuentra al organismo con mayor número de linfocitos T, más especí-

* La primera parte de este trabajo fue publicada en *Arch Arg Pediatr* 96 (3):177, 1998.

Centre Nationale de la Recherche Scientifique (CNRS), Francia. Area de Medicina Molecular, Hospital Posadas.

ficos (los genes TCRs, al igual que las Igsm, se recombinan, antes de ser estimulados por el encuentro con el primer péptido y generan igual número de 10^{12-15} de TCRs diferentes que pueden adaptarse así a una enorme cantidad de antígenos), por lo que las fases funcionales permiten que se incrementen el número de células y la rapidez en la respuesta en forma considerablemente mayor que con los linfocitos T naives. Desde una perspectiva molecular, el incremento de moléculas ligantes o receptoras de ligantes (moléculas de adhesión) en la superficie de los linfocitos T "de memoria", sumado a la mayor afinidad de los TCR y de los receptores de la IL-2, que les permitiría adherir más fácilmente a las células presentadoras de antígenos (CPA), explicarían esta característica de la respuesta inmune secundaria. Aunque unas diez veces menos que las Igs, los genes V de los TCRs también tendrían su región hipervariable donde ocurren las mutaciones somáticas en los reencuentros con el primer antígeno. Esto, sin embargo, no está bien establecido como un fenómeno general y sobre todo, no ha sido demostrada la hipermutación en los genes V de los TCRs de los Tc. Una observación inmunohistoquímica nos ayuda a definir o diferenciar una célula T activa efectora de una célula de memoria (histológicamente, a grandes rasgos se diferencian porque la primera es más grande que la segunda). El cultivo y la estimulación antigénica *in vitro* sirven para definirlos. Entonces, una célula Th efectora es la que secreta citoquinas y una Th de memoria, la que debe ser estimulada para que lo haga. La célula Tc efectora es citotóxica *per se*, en tanto que la Tc de memoria debe ser estimulada con el antígeno para responder. Vale recordar que las moléculas que actúan estimulando la apoptosis, fundamentalmente las cuplas Fas- FasL y TNF-TNF L, están aumentadas en las células efectoras, que son más propensas a la AICD, que en los linfocitos T de memoria. Las granzimas-perforinas están aumentadas en las Tc efectoras y no en las Tc de memoria.

El modelo aceptado es el que dice que los linfocitos T naive (sean Th o Tc) estimulados se diferencian en T efectores, de los cuales el 90%-95% muere por apoptosis y el resto queda como T de memoria. Es sabido que una cierta cantidad de antígeno, más citoquinas inflamatorias, estimulan la presencia de linfocitos T efectores, mientras que un descenso de antígenos pero con una ligera estimulación y sin presencia de inflamación favorece la aparición de los linfocitos T memoriosos. En definitiva, es de importancia clínica esencial conocer la duración de unos y otros en lo que concierne

a las infecciones y a las vacunaciones. La pregunta es saber si los linfocitos T necesitan de la presencia de antígenos para guardar la memoria. Lo que se sabe al respecto es que los Tc no necesitan del antígeno para guardar la memoria por muchos años, quizás toda la vida (el ejemplo son los Tc de las personas vacunadas contra la viruela humana, virus que no existe en la naturaleza y la vacunación cesó en el año 1977, que reaccionan cuando se los coloca en presencia de células experimentalmente infectadas). Los Th también quedarían como células de memoria por largo tiempo (muchos años), después de la primera estimulación.

La memoria de los linfocitos B

La presencia de una memoria inmunitaria B es fácilmente medible en la práctica a través de la respuesta secundaria a un antígeno que es mucho más precoz que la respuesta primaria; las Igs producidas son mayoritariamente IgG, IgA o IgE y ellas son las de más alta afinidad por el antígeno. La respuesta acelerada es un reencuentro de los linfocitos B de memoria con los Th, a los que les presentan nuevamente el antígeno (esto es cierto para la gran mayoría de los linfocitos B, que son linfocitos T "timo dependientes", es decir que necesitan de los linfocitos T provenientes del timo para secretar Igs; para una pequeña población de linfocitos B "timo independientes" que reaccionan directamente con un antígeno exterior desde el primer contacto antigénico y sin necesidad de los estímulos de los Th, la respuesta secundaria [memoria] es pobre y de corta duración). El proceso de expansión clonal, la hipermutación y el cambio de las Igs ocurre, como vimos, en los centros germinativos (CG) secundarios. Allí nacen del mismo clon los B de memoria y los plasmocitos definitivamente diferenciados en células secretoras de Igs; los pares moleculares CD40 y CD40L, así como el factor de transcripción específico activador del linfocito B, favorecen a los primeros, en tanto que las moléculas de OX40, la CD23 y Blimp 1, a los últimos. Después de partir de los CG, los B de memoria, recirculan por los ganglios linfáticos (GL) secundarios y se ubican en la zona cortical de los mismos. Si bien el cambio ocurre en los CG y fuera de ellos, la hipermutación solamente ocurre en los linfocitos CG, aunque no necesariamente mutan todos los linfocitos B. La presencia de antígenos potencia enormemente la persistencia de los linfocitos B. Se desconoce si el antígeno puede quedar depositado en las CPA (como en las células dendríticas [CD]) y estimular constantemente a los linfocitos Th y B, como ocurriría en las personas en

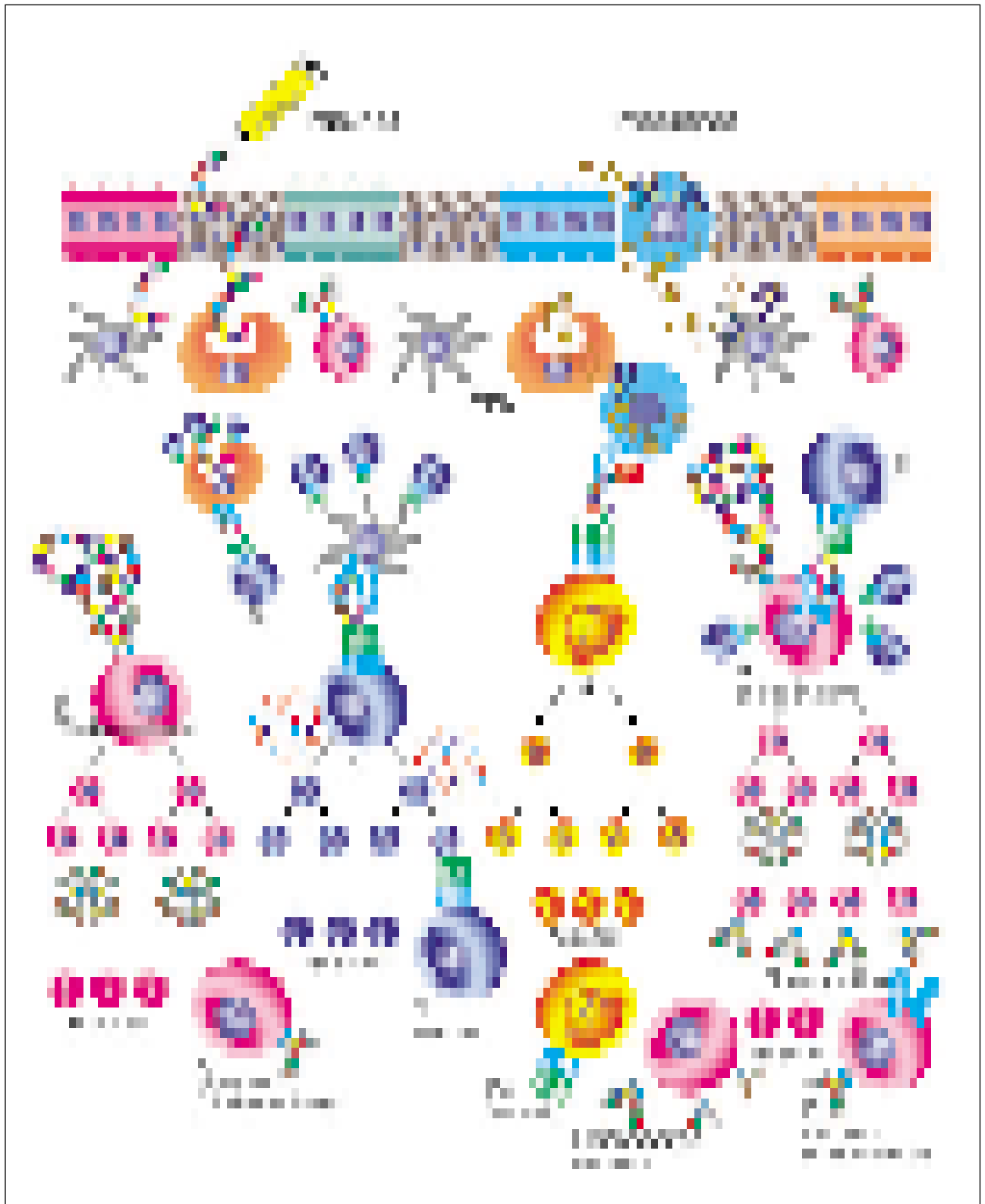


GRÁFICO 1
Respuesta inmunitaria primaria del SI

las que se detectan anticuerpos antitoxina tetánica o diftérica 25-50 años después de la vacunación. Sólo la experiencia empírica nos hace vacunar con 1, 2, 3 o 4 dosis con diferentes vacunas. En efecto, no se conoce exactamente el tiempo de vida de los plasmocitos que, luego de ser producidos en los GL, migran mayoritariamente a la médula ósea (MO), principal abastecedor de anticuerpos circulantes. Allí, la vida media de los plasmocitos sería de 21 a 30 días o tal vez, de muchos años, en tanto los plasmocitos que viajan al bazo, a los otros GL y parte de los de la submucosa intestinal vivirían 10 veces menos. La estimulación constante sería, hasta ahora, la norma para la persistencia de los plasmocitos. No se conoce aún si los linfocitos B de memoria y los plasmocitos viven tanto como los T.

La circulación de los linfocitos en el organismo

Para mantenerse frente a un enorme cantidad de potenciales enemigos externos, la IEA dispone de una cantidad gigantesca de clones de linfocitos con receptores de esos antígenos, pero que es finita. Defender sin agredir al propio organismo, es entonces la tarea fundamental del SI. Para controlar este interjuego de los linfocitos T y B y de las células relacionadas con ellos (como las CPA), su circulación, los sitios donde habitan, las comunicaciones entre ellos y el mantenimiento adecuado de una cantidad constante, la evolución creó finos y complejos microecosistemas (MES). Así, el SI tiene sus MES adaptados a cada tejido, como la piel, el intestino, el pulmón, etc. Allí debe conservar los clones necesarios de linfocitos, aumentarlos en

Gráfico 1: La protección inmunitaria de la IEA

Las verdaderas razones de las diferencias entre la inmunidad en las mucosas y la sistémica son desconocidas. Sí se sabe que los anticuerpos circulantes provienen, en su gran mayoría, de los plasmocitos residentes en la MO, en tanto que los plasmocitos residentes en las submucosas generan los anticuerpos de esos epitelios. La vida de muchos años de los plasmocitos en la MO se vería facilitada por el microsistema, las citoquinas y los intercambios de señales entre las células hematopoyéticas. En cambio, la vida media de los plasmocitos de las mucosas no contaría con un MES tan propicio y es de meses solamente. Se sabe también que luego de una primera infección viral, los plasmocitos memoria migran a la MO, en tanto que los que respondieron por primera vez a un antígeno inerte sólo lo hacen después de un segundo reencuentro con el mismo (las vacunas también nos muestran este ejemplo: es una de las razones para dar dosis sucesivas de vacunaciones). Esto habla de una correlación entre vida media de los plasmocitos en la MO y cantidad de anticuerpos presentes.

Contrariamente a los plasmocitos, los linfocitos T efectores son de vida corta. Esto es lo que se ve luego de infecciones bacterianas y virales (también ocurre lo mismo con las vacunaciones). Pero son sólo los linfocitos T efectores los que tienen una vida de corta duración, no así los linfocitos T memoria, que tienen una vida prolongada. Esto tiene un sentido a la luz de los conocimientos actuales que muestran que una constante producción de citoquinas, así como la presencia de células citotóxicas, tiene efectos nefastos en el propio SI, ya que podrían reaccionar en forma cruzada con las propias células del organismo, más allá de los blancos extranjeros iniciales. Esto explicaría por qué la IEA no corre el riesgo de mantener activos a los linfocitos T efectores. Dado también que las células T de memoria podrían responder rápidamente a una nueva agresión y transformarse en células T efectoras que migran a la nueva puerta de entrada, no es necesario, en la mayoría de los casos, tener células T efectoras circulando o estacionadas. Este concepto es importante, puesto que muchas veces se confunde la breve vida media de los linfocitos T efectores con la verdadera vida prolongada de los T de "memoria". Dentro de las excepciones, están algunas enfermedades virales como las provocadas por los rotavirus y el VSR, en las que experimentalmente se mostraba que había reinfección y en consecuencia no habría memoria T. En realidad estos linfocitos existen, pero tardan en convertirse en T efectores y llegan tarde al sitio de infección. Estos últimos, están presentes estrictamente siempre y cuando hayan antígenos y desaparecen cuando el antígeno no existe más.

Así, ni las células B ni las T de memoria protegen per se de una infección; necesitan expandirse y diferenciarse en plasmocitos y linfocitos T efectores, respectivamente, para responder al germen.

Esto es fundamental en la protección inmunitaria de un individuo. Ambos tipos de células son de larga vida, por eso la protección inmunitaria sistémica o "humoral" es prolongada en el tiempo. Efectivamente, esa inmunidad, como en el caso del sarampión o la polio, protege verdaderamente al organismo, puesto que el daño que causan estos virus en su replicación inicial en las mucosas, que no son sus células receptoras definitivas (el epitelio respiratorio y el epitelio intestinal, respectivamente) no se traduce en ninguna patología (los dos virus tienen otros fenotipos como células receptoras en el cuerpo) y sólo cuando no hay inmunidad sistémica producen enfermedad. En la mayoría de los casos, los linfocitos B y los T de memoria tienen tiempo de replicarse, expandirse y diferenciarse, luego de la reinfección.

Pero, como dijimos, ese período es más breve en algunas enfermedades, como las provocadas por los rotavirus y el VSR (donde los epitelios intestinales y respiratorios son las células receptoras finales y su destrucción se traduce por una patología: diarrea y bronquiolitis, respectivamente), en las cuales el pasaje de célula memoria a célula efectora llega tarde. A pesar de todo, las células T de memoria, que por sí mismas no son capaces de controlar la replicación del germen que produce la patología, van siendo de respuesta más "rápida" en cada nueva reinfección, atenuando así la infección.

Conocer la exacta respuesta inmunitaria contra cada germen y la participación que le cabe a cada una de las células del IEA es fundamental para entender el desarrollo y aplicación racional de nuevas vacunas y tratamientos.

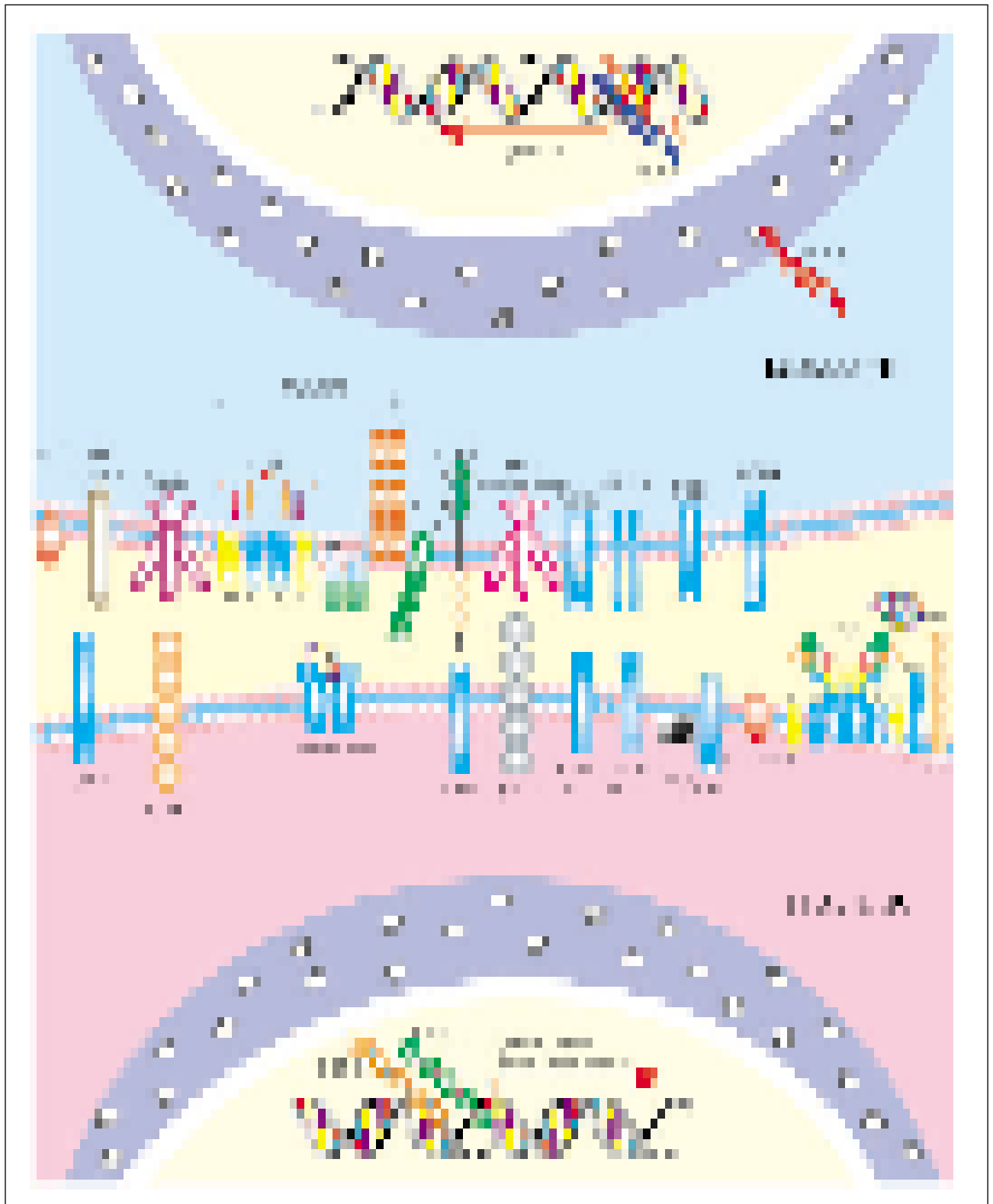


GRÁFICO 2
Interacción molecular entre los linfocitos TH y B

Gráfico 2

El comportamiento de las células está determinado por las relaciones que mantienen con el mundo extracelular. Éste les envía cuatro tipos de señales fisiológicas y un quinto grupo de señales externas patológicas (los agentes infecciosos). Las cuatro primeras son: 1) las hormonas, que comunican a distancia entre las células; 2) los factores de crecimiento que estimulan en las "inmediaciones"; 3) los neurotransmisores que son las señales del sistema nervioso que responden a los estímulos externos e internos, y 4) las moléculas estructurales de la matriz extracelular (MEC). El quinto grupo lo constituyen los estímulos patológicos de las moléculas químicas y físicas del ambiente y los agentes patógenos con sus moléculas propias. Las células perciben estos diversos tipos de señales gracias a las moléculas receptoras de la membrana celular que los transforman en una respuesta intracelular. La noción de receptor, es pues, una proteína capaz de desencadenar un fenómeno fisiológico en la célula donde se encuentra después de ligar específicamente un efector (llamados, señales o ligantes). Hay que recordar que, en general, si los efectores son hidrófilos se unen a los receptores que están sobre la membrana; si son hidrófobos (como las hormonas tiroideas o esteroides) atraviesan la membrana y se ligan a un receptor intracitoplasmático que luego los llevan al núcleo.

Se conocen tres grandes mecanismos de recepción y de transducción de señales extracelulares en la membrana plasmática: los canales iónicos, los receptores acoplados a las proteínas G y los receptores con actividad enzimática propia o ligados a los complejos enzimáticos. El mecanismo común es el siguiente: después de la activación del receptor (unión molecular entre la molécula que llega, el ligante, y la molécula que la recibe, el receptor), la señal es amplificada por una cascada de reacciones entre una molécula y otra. La mayor parte de esas cascadas están regidas por fosforilaciones y desfosforilaciones (quinasas y fosfatasa son las enzimas que las producen, respectivamente), es decir, se agregan o sacan grupos fosfatos a las moléculas de cada una de estas vías. La amplificación es entonces la fosforilación de una primera molécula, ésta fosforila a varias otras de una misma especie, que le siguen en la cascada, éstas a otras de un número aún superior, y así sucesivamente, hasta llegar la información a los genes que serán específicamente estimulados o inhibidos.

Los linfocitos T y B no escapan a estos mecanismos al ser estimulados, por ejemplo, por las citoquinas o los gérmenes. En efecto, como cualquier fenotipo celular, poseen sus propios receptores específicos de interleuquinas, de factores de crecimiento y sobre todo, los que reciben los antígenos, los receptores BCR y los TCR. Las cascadas de transducción intracelulares son como autorrutas comunes por donde viajan y se amplifican las señales específicas que llegan del exterior. Esas autorrutas comunes son muy pocas en relación a los 80.000 genes que en un momento u otro son estimulados para producir sus respectivas proteínas entre los más de 250 fenotipos celulares. Por lo que se conoce, muy parcialmente, una de las razones de la especificidad de estimular un gen preciso y no otro, serían los factores de transcripción, últimos componentes de esa cascada que entran en contacto con el ADN genómico. Por todas estas razones, en los gráficos y en el texto de los temas que trataremos intentaremos señalar esas vías (pathways), sus porciones comunes, sus entrecruzamientos, las principales moléculas que participan (las conocidas y las que restan por conocer) y cómo se irán incorporando a esos caminos. Creemos que esta compleja e integrada forma de comunicación extracelular e intracelular de los organismos multicelulares puede ser mejor memorizada y comprendida si tenemos siempre presentes estos caminos básicos. Las enfermedades ocurren cuando algunas de esas moléculas de las cascadas fallan. Las inmunodeficiencias ligadas al cromosoma X son un ejemplo.

Las moléculas que interactúan cuando se contactan un linfocito T con uno B y otras CPA

Los linfocitos B y T son las únicas células específicas de los antígenos y justamente necesitan ser contactadas con uno de ellos para poder salir de la fase quiescente G0 y comenzar a replicarse, expandirse y cumplir con sus funciones específicas en el SI. Esos antígenos funcionan como señales para las células B y T. Los receptores de esos antígenos (BCR y TCR) son moléculas estructuralmente muy diferentes, que reconocen distintas formas de antígenos. Los BCR de los linfocitos B captan los antígenos extranjeros extracelulares libres (proteínas y carbohidratos, nativos e insolubles); los TCR de los de los linfocitos T, los antígenos extranjeros intracelulares (péptidos ya cortados de entre 9-25 aminoácidos) ligados a una molécula de HLA. Si bien esos receptores son diferentes, las señales intracelulares que siguen son muy similares (señales de transducción). Además de los receptores antigénicos, otras moléculas contribuyen, en forma fundamental, a la buena activación de los linfocitos: a) las que funcionan como correceptores (CD4 y CD8 en los linfocitos T y el CD 19/21 en los B), incrementando la sensibilidad y la afinidad por los antígenos; b) las que incrementan la interacción (LFA-1) con el antígeno o con la CPA; c) las que señalan vías diferentes (CD28, CD40) de transducción intracelular.

Las proteínas fosforiladas en el aminoácido tirosina son fundamentales en estas vías de señalización. Ni el BCR ni el TCR tienen actividad fosforilante per se, es decir, no son quinasas (no son PTK). Ambos deben activar dos familias de PTKs intracitoplasmáticas (las de las familias Src y familia Syk/ZAP-70) y al menos una fosfatasa (CD45), para poder realizar su traducción. Para ello, los BCR y los TCR están asociados a proteínas citoplasmáticas (heterodímeros α , β y el complejo CD3, respectivamente) de 40 a 113 aminoácidos, que tienen los dominios repetitivos llamados ITAM, que los relacionan con las familias de PTKs, nombradas anteriormente. Las similitudes de transducción de ambos linfocitos, están dadas por estos dominios ITAM y las respuestas diferentes de orden cuantitativo, por el número de estos dominios en las diferentes moléculas. Cabe destacar una vez más, cómo el origen ancestral común de estas moléculas presentes en diferentes fenotipos del SI primero y de las moléculas nombradas también se encuentra en las moléculas de receptores de los anticuerpos circulantes, presentes en los macrófagos.

El linfocito B presenta en su membrana, en principio, cuatro moléculas de interacción con el linfocito T, que también están en otras células CPA. Esas proteínas son CD40, B7.2 (CD86), B7.1 (CD80) y B7.3. Cabe destacar aquí que estas moléculas son fundamentales en las diferentes etapas de activación-diferenciación de los linfocitos T y los B. El linfocito B en reposo expresa el BCR, la CD22 y la CD40, que no interactúan con el linfocito T. Cuando el linfocito B es activado por un antígeno, los genes de CD40, HLA II, CD86, CD80, CD54, TNF α R y otros, como muestra la figura, aumentan la producción de sus respectivas proteínas. La activación del linfocito T por una célula CPA o por un linfocito B (que es una CPA y célula secretora de Igs a la vez), hace que sus genes productores de las proteínas CD40L, CTLA-4 (ligante de B7.1 y 2) y TNF α también se activen sobremanera. Finalmente, el conjunto de cuplas de proteínas de ligantes de membrana donde participan más de 30 moléculas diferentes entre las dos membranas (T y B) orquestan la correcta diferenciación, en

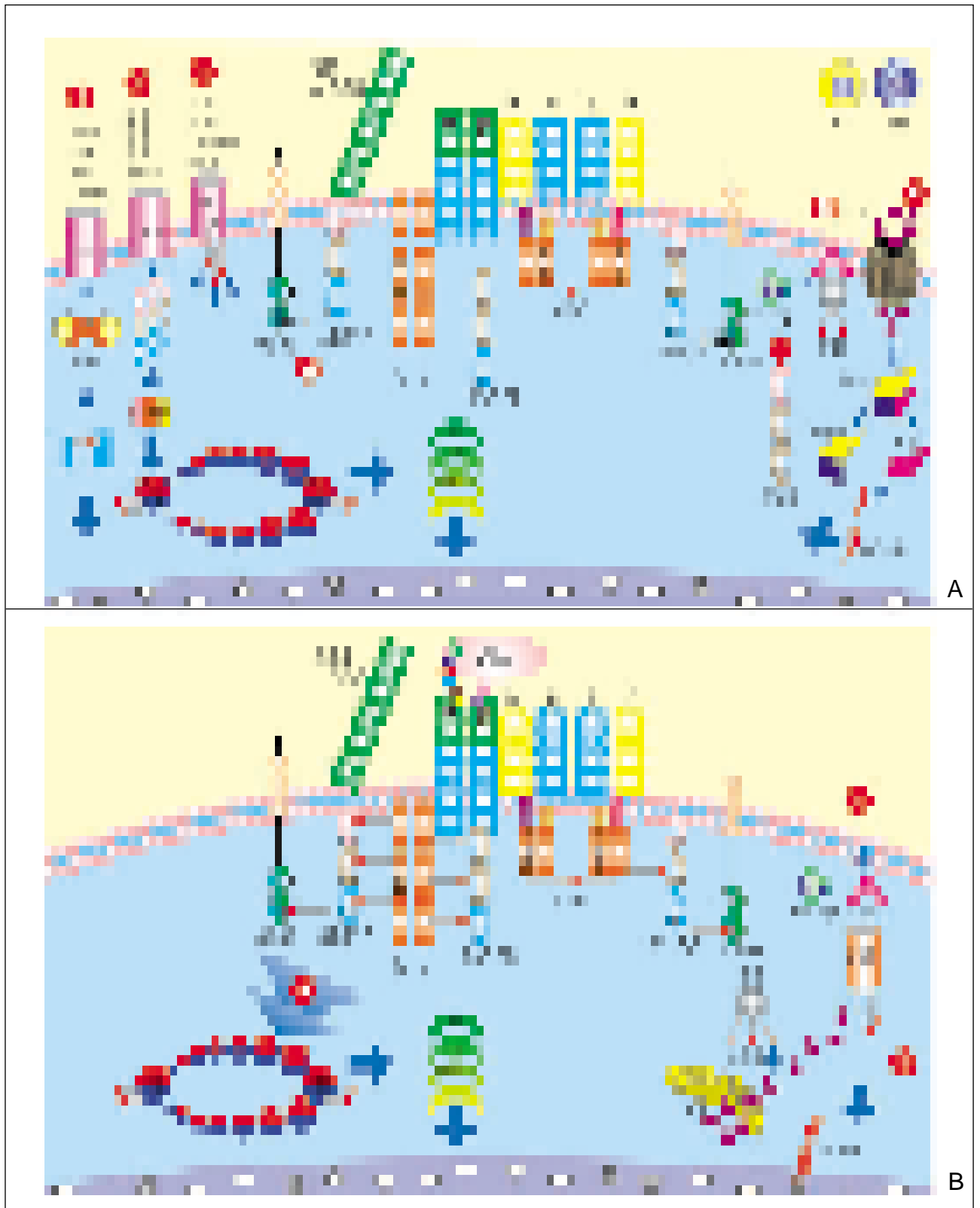


GRÁFICO 3
Activación del linfocito TH (CD4) o del TC (CD8)

cantidad y calidad cuando una nueva reinfección así lo requiera y evitar cualquier sobrecrecimiento. Esos microecosistemas están relacionados entre sí y los linfocitos circulan de uno al otro. La mayoría de los linfocitos del organismo pasa de la sangre a los tejidos (MES) una a dos veces por día. Esta recirculación no es al azar. Es, antes que nada, un

reconocimiento específico de moléculas de adherencia (MA) entre las células del SI y los endotelios de los vasos. Esto es fundamental en todo este circuito. De este modo los linfocitos (IEA) y los neutrófilos (INNE), por ejemplo, salen de los cauces de los vasos (diapédesis) y son dirigidos a sus lugares específicos. Para las células de la

Continuación epígrafe Gráfico 2. Viene de página 306

última instancia, de ambos linajes celulares.

Así, el linfocito B, por intermedio de sus IgsM (BCR), recibe muy específicamente los antígenos conformacionales, los internaliza y en forma de péptidos los presenta, con sus moléculas de HLA II, a los TCR/CD3 de linfocitos T. Decimos que el reconocimiento por el BCR es muy específico y que cuando hay pequeñas cantidades de un antígeno dado, el linfocito B es la CPA más eficiente y abundante de la sangre (en la respuesta secundaria), puesto que ni los macrófagos que tienen receptores (FcεR1 y FcγRIII) para los dominios C de las cadenas H de cualquier Ig circulante, ni las células dendríticas, ni cualquiera de las otras CPA, tienen moléculas tan específicas para captar los antígenos como las IgsM en sus membranas).

En cuanto a la especificidad y variabilidad del TCR de los linfocitos T, globalmente su producción responde a la misma "filosofía evolucionista" y única que comparten con las Ig (*Arch Arg Pediatr* 1998;96(3)). Así, cuatro grupos de genes codifican por las cadenas proteicas de los TCR. En la gran mayoría de los linfocitos T, son α y β y por una pequeña minoría de linfocitos T son γ y δ. Esas cadenas en las membranas de los linfocitos T se asocian a las proteínas γ, δ, ε, y ζ de la molécula CD3 para formar el complejo TCR-CD3.

La conformación general de los genes de los TCR es igual a la de los genes de las cadenas H de las Igs.

Así hay grupos de genes V, D, J y C. La cantidad de cada grupo varía según se trate de la proteína α, β, δ o γ. Dos detalles importantes son que los grupos de genes delta están en el medio del locus que tiene los grupos de genes α, y que el locus de los genes γ no tiene grupo de genes D. Los mecanismos de recombinación de los TCR son muy parecidos a los de las Igs y las enzimas que participan son similares. La diferencia más importante reside en que luego de la primera recombinación somática de esos genes, las mutaciones somáticas en el interior de las regiones V (abundantes y frecuentes en las Igs) no se observan en general en los TCR (aunque recientemente ha sido demostrado que existen). Sin embargo, el número potencial de TCR diferentes que pueden existir en un individuo es tan grande como los que ya dijimos por los anticuerpos. Ese número es de 10^{12} hasta 10^{18-20} y es el resultado de un cálculo combinatorio que es muy superior al número real de linfocitos T que en el curso de la vida el timo puede producir. Por esa razón cabe preguntarse hasta qué punto la recombinación de los genes de los TCR es aleatoria. La respuesta no se conoce bien todavía.

Gráfico 3

En los Gráficos 3 y 4 están señaladas, arbitrariamente, las vías (1),(2),(3),(4),(5) y (6), que volveremos a ver, como dijimos, en muy diferentes situaciones estimulativas en diferentes células. Las siglas son descriptas en el glosario. Las vías señaladas son las que más directamente participan en las primeras etapas de las respuestas del SI. La vía (1) corresponde a los receptores sin actividad quinasa propia, que cuando son contactados por sus ligantes, se activan y se unen a moléculas quinasa de la familia JAKs, STATs y siguen esta vía hasta penetrar al núcleo como factores de transcripción (FT). La vía (2) está constituida por los receptores de ciertas interleuquinas que, por ejemplo, tampoco son quinasa en sí mismas, estimulan una familia de proteínas quinasa, la familia Src (entre las que se encuentra, entre otras, la BTK), y éstas estimulan a otro grupo de proteínas intermediarias, *Grb2*, *Shc* y *Sos*, las cuales desembocan en la vía Ras y ésta estimula, entre otras, la vía de las MAPKs, que amplifican el mensaje hasta el núcleo. La vía (3) incluye a receptores quinasa en sí mismos, es decir, que cuando son activados por sus efectores, son capaces de fosforilar (estimulando o inhibiendo) un cierto número de proteínas que a su vez entran en diferentes vías. La vía (4) engloba tanto al complejo TCR y al BCR, que no poseen moléculas con actividad quinasa en sí mismas, para estimular o inhibir proteínas de la familia Src y ZAP 70, a través de sus dominios ITIM e ITAM, y éstas regulan (por diferentes vías) la respuesta inmune de los linfocitos T y B, al llevar la información hasta el núcleo. Las vías (5) y (6) llevan a la entrada de iones Ca y a la estimulación de la vía CAM y los NF-ATc y NF-ATn. Las vías de las PKC también son estimuladas por estas vías, que van a desembocar a la estimulación de Ras y las MAPKs.

¿Qué ocurre en el linfocito T cuando el TCR (en realidad se puede hablar de TCR/CD3, puesto que el complejo CD3 es el correceptor indispensable al TCR y está compuesto por las proteínas ε, δ, y γ) es "contactado" por un péptido antigénico?

La estimulación que sigue a ese contacto es responsable de la activación de la PTK p56lck (esta última proteína necesita ser desfosforilada en su residuo tirosina próximo a su C-terminal por la CD45 para ser totalmente activa), que fosforila la cadena ζ y ésta puede así interactuar con la PTK ZAP-70. Hay luego una serie de fosforilaciones sobre numerosas proteínas de membrana y citoplasmáticas, sobre sus aminoácidos tirosina, en particular sobre la PLC γ1 y de la p21ras, que participan más tardíamente después del contacto. La proteína PTK p59fyn, además de la p56lck, también participa en este circuito de estímulos secundarios del linfocito T, estimulando la IP3 independientemente de las vías de las fosforilaciones-desfosforilaciones.

Finalmente, la PLCγ1, produce el DAG (diacilglicerol) y el IP3 (fosfatidilinositol 2, 4, 5-trifosfato) al hidrolizar el PIP2 (fosfatidilinositol 4, 5 bifosfato) de la membrana del linfocito T. Las DAG y la IP3 activan la proteína quinasa C (PKC), la p21ras, las cascadas de quinasa y la entrada de calcio para estimular la calcineurina, respectivamente. Ambas vías finalmente desembocan en la activación del NF-AT (nuclear factor activating T) tanto sobre sus formas citoplasmáticas o nucleares. El NF-AT es un factor de transcripción de los genes específicos de la activación del linfocito T, como el gen de la IL-2.

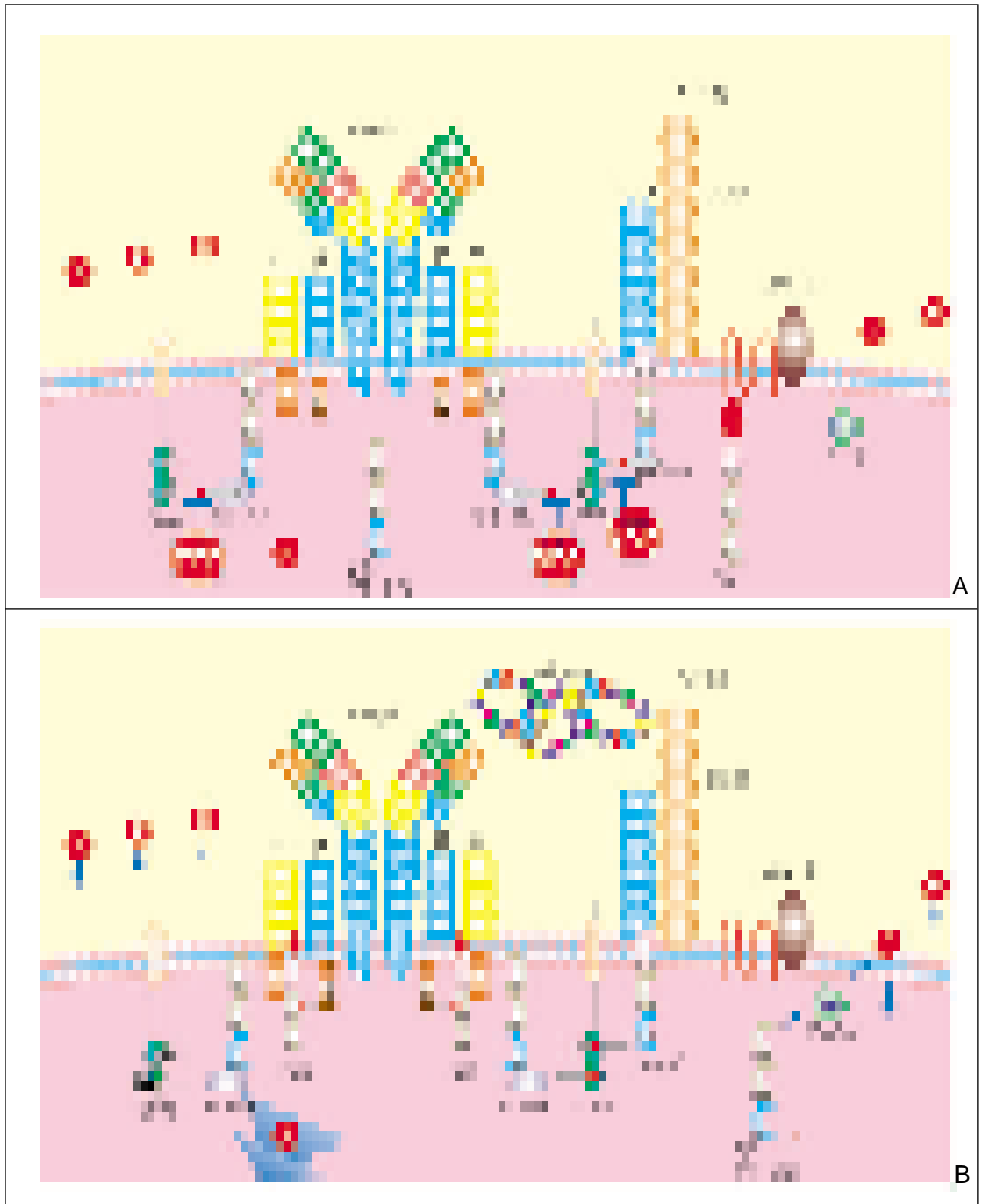


GRÁFICO 4
Activación del linfocito B

INNE, como los neutrófilos y los eosinófilos, el sitio de migración está determinado siempre por la puerta de entrada y la ubicación del agente agresor; en cambio los linfocitos, además de esos llamados, circulan específicamente entre los MES en subpoblaciones que darán la respuesta inmunitaria local y general. Esto, en términos más específicos, significa qué cantidad de linfocitos naives y qué cantidad de linfocitos de memoria/efectores T y B se encuentran en cada sitio. En general, los linfocitos naives están programados para circular entre los GL secundarios (amígdalas, bazo, placas de Peyer y GL en general). Esos órganos juntan todos los antígenos de las mucosas, de los tejidos y de la sangre, para presentarlos a los T y B naives en los MES de esos órganos, para inducir su diferenciación a células efectoras y de memoria. Estas últimas, además de circular entre los GL secundarios, también pueden acceder a sitios extralinfoideos (como la lámina propia intestinal, el intersticio pulmonar, epidermis inflamada, articulaciones). Mientras los linfocitos T y B naives están distribuidos en forma homogénea en todo el organismo, la distribución de los linfocitos T y B de memoria/efectores es extremadamente heterogénea. En efecto, estos últimos se distribuyen en subpoblaciones limitadas a tejidos, donde probablemente tienen más probabilidades de encontrar

(o reencontrar) sus antígenos o de hallar MES más adaptables y eficaces para sus respuestas inmunes, como por ejemplo, las submucosas y no otros tejidos no mucosos. Un claro ejemplo de esto son los plasmocitos que expresan las IgA, que migran a las mucosas del organismo. En el pasaje de naives a células de memoria/efectores durante el desarrollo ontogénico de cada población o de subpoblaciones de linfocitos T y B, la regulación se hace, en más o en menos, en base a la presencia o ausencia de las MA, de las citoquinas y de las quimioquinas secretadas por una u otra de las células implicadas.

La regulación molecular, que rige la salida de las células linfoideas (linfocitos y neutrófilos) para salir del flujo sanguíneo de las vénulas poscapilares, ordenadas en tiempo y espacio sigue un mismo "pathway". Este proceso tiene cuatro etapas diferentes: a) una primera adhesión que dura segundos y es transitoria y reversible, b) una rápida activación de los linfocitos (dura segundos), c) una fijación, estable pero que también puede ser reversible en minutos y d) la diapédesis misma. Este proceso de reclutamiento está regulado por una serie de órdenes positivas (continuar), o de lo contrario, de retornar a la sangre. Recientes estudios han confirmado que una cascada multimolecular de señales entre linfocitos y las células

Gráfico 4

¿Qué es lo que ocurre cuando un antígeno entra en contacto con el BCR?

Las Igsm (M y D en los linfocitos B naives y G, A y E en los linfocitos B memoria) cumplen dos funciones diferentes: a) reciben el antígeno, hacen un proceso de endocitosis y lo presentan de nuevo asociado con la molécula de HLA al linfocito T; b) reciben los estímulos de las moléculas de membrana del linfocito T y citoquinas y, usando vías de transducción hasta el núcleo, señalan los genes necesarios para la secreción de Igs.

Cuando un linfocito B naive o de memoria está en reposo, es decir, sin estar en contacto con un antígeno, las Igs de membrana (IgMm, IgGm, IgAm o IgEm) forman un complejo funcional con dos heterodímeros (α y β) que están en ambos lados de la molécula, que tienen una secuencia ITAM (immuno tyrosine activator motif receptor) que causa la activación de las PTKs. La cadena β es la más cercana a la Igsm y se liga por su extremo terminal a la proteína 40/42 (con función desconocida aún). La cadena α reacciona con las fosfotirosinaquinasas (PTK) de la familia Src, en tanto que otra PTK (PTK 72), se asocia a la parte citoplasmática de las cadenas H de las Igsm (esa corta región citoplasmática de 3 aminoácidos por la IgMm, 11 aminoácidos por la IgAm y 25 aminoácidos por las IgG y E tendría un rol fundamental en la endocitosis y posterior presentación del antígeno). Todas estas proteínas forman el "núcleo" funcional del llamado BCR.

Cuando un antígeno se liga en los dominios V de las cadenas H y L de las Igsm, las PTK de la familia Src se autofosforilan y fosforilan a su vez a los dímeros α y β , que liberan la proteína p40/42. Al mismo tiempo, la activación de la PTK 72 es seguida por la fosforilación de la fosfolipasa C (PLC γ 2), que conduce a la producción de inositol trifosfato (IP3K), otro segundo mensajero de transducción de importancia capital en la célula. Las vías de segundos mensajeros activados, que estimularán directamente o indirectamente a los genes del linfocito B después de la fosforilación de la PTK de la familia Src, son fundamentalmente la vía de Ras y de las MAPKs.

El BCR tiene también moléculas que actúan como correceptores además de los dímeros α y β . Son las proteínas CD19/CD21, la TAPA (por target of antiproliferative antibody o CD81) y la leu13 que, vía la IP3K y/o la PTK 59 Lyn, pueden amplificar la respuesta cuando llega un antígeno. De la misma manera, la proteína CD22 amplifica la respuesta al antígeno, activando la PTK72. En el retrocontrol de una estimulación antigénica participa, sobre todo, la proteína CD45.

En resumen, cuando el antígeno (conformacionalmente no degradado o desnaturalizado insoluble, que es una diferencia capital con respecto a la presentación en pequeños péptidos que necesita el TCR), asociado a los fragmentos del complemento C3d, se une por un lado al BCR y por otro al complejo CD15-CD21, lleva a una estimulación amplificada del linfocito B, que responde con la producción de Igs solubles.

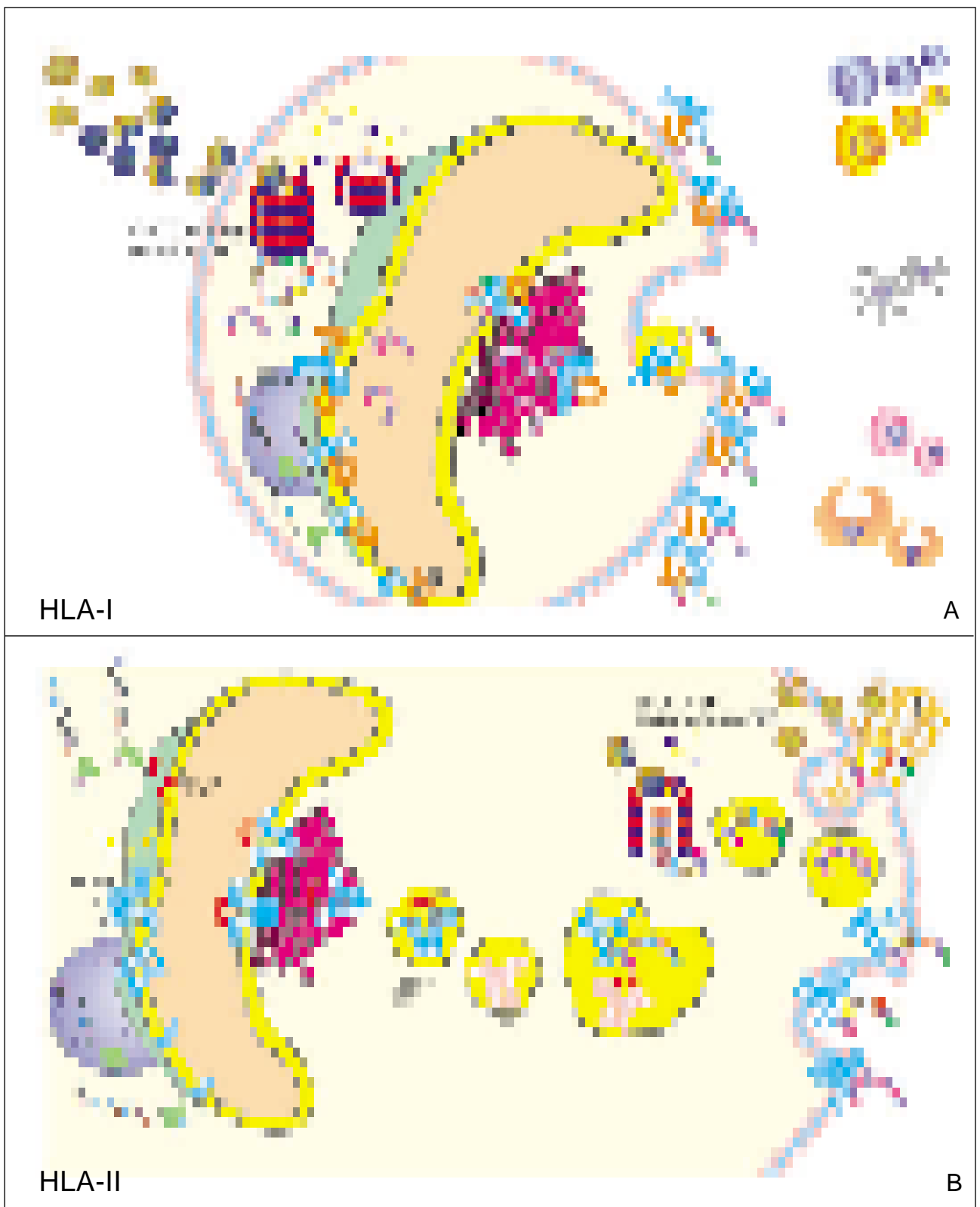


GRÁFICO 5
Presentación de los antígenos por el complejo HLA I y II

endoteliales, con relativamente pocas MA, haciéndolas variar en número y en momentos distintos de esas etapas de circulación, ubican MES específicos y diferentes de órganos y tejidos por vías de circulación diferentes y también específicas.

Homeostasis y auto-tolerancia del SI

En la dinámica de la vida, el SI tiene una extraordinaria capacidad de equilibrio para mantener el número constante de linfocitos frente a los estímulos reiterados de los antígenos externos (a los que debe responder). Se sabe mucho más de los estímulos que hacen activar, crecer y diferenciarse a un linfocito en un clon, que de las señales que le indican cuándo esa respuesta debe cesar. Estos últimos mecanismos son importantes en las dos situaciones capitales de la respuesta inmune: a) después de la respuesta a un antígeno (una infección o una vacunación), el número de linfocitos

debe retornar al mismo nivel que había antes de su ingreso (esto es la homeostasis); así, de los linfocitos activados específicamente se hicieron clones que deben ubicarse y competir por un espacio en los MES con las células ya residentes. Los nuevos residentes son clones de linfocitos de memoria/efectores, cuya cantidad y número no debe hacer variar la homeostasis; b) los linfocitos con receptores capaces de reconocer los auto-antígenos son generados constantemente y, como vimos, sólo deben quedar vivos los que poco o nada reconocen de las moléculas propias del organismo (linfocitos naives), los demás deben morir por apoptosis; de esta manera el SI se mantiene en un estado de "auto-tolerancia", con su propio organismo.

Señales moleculares para la supervivencia, crecimiento y diferenciación de los linfocitos (Gráficos 2 y 3)

Los linfocitos naives pueden vivir mucho tiempo

Gráfico 5

El procesamiento y la presentación antigénica

El número de anticuerpos que se pueden fabricar contra una molécula antigénica es muy elevado (cinco aminoácidos pueden generar un anticuerpo) porque, además, en el espacio tridimensional esa molécula presenta configuraciones diversas según su movilidad molecular. Así, los anticuerpos se fijan sobre epítopes adyacentes o superpuestos y en su gran mayoría conformacionales. Si bien cada sector de un antígeno puede dar lugar a un anticuerpo, éste no es el caso en la naturaleza, donde siempre existen epítopes inmunodominantes para un antígeno dado, es decir, los que frecuentemente en la mayoría de los individuos son presentados al SI. Esos epítopes son, en general, los sectores flexibles y móviles de las moléculas antigénicas, que se unen a las partes variables y adaptables de los TCR y las Igs.

Los anticuerpos y los TCR de los linfocitos Tc están dirigidos contra pequeños sectores diferentes de una misma molécula de un antígeno. Esos sectores se llaman determinantes antigénicos y estructuralmente hablando, epítopes. Esta diferencia en el reconocimiento de uno y otro es debida a la presentación y el reconocimiento que de un antígeno se hace, luego del procesamiento intracelular por las moléculas de HLA. Los Th (CD4) y los Tc (CD8) reconocen las moléculas de clases II y I, respectivamente y, como ya dijimos, cada individuo sólo reconoce sus propias moléculas de HLA. En efecto, las células especializadas que aseguran esta presentación pueden ser las CPA, como cualquier célula del organismo que luego de ser infectada por un virus, por ejemplo, lo procesa y lo presenta a los Tc, por su HLA-I. La presentación de un péptido lineal, muchas veces no accesible en la molécula entera de un antígeno, es la norma en el reconocimiento de los TCR. Esos péptidos, que resultan del cortado de la molécula total, no son todos accesibles a la unión con la molécula de HLA que lo va a presentar a los TCR de los linfocitos. Además de las moléculas de HLA, diferentes haplotipos se asocian a péptidos distintos que pertenecen al mismo antígeno viral. Esta notable capacidad de seleccionar los epítopes que mejor se adaptan a la estructura molecular del HLA de cada individuo hace que la respuesta inmune de un individuo u otro sea igual en los efectos finales (por ejemplo, la protección con una vacuna), pero con moléculas y células efectoras (Igs y Tc) distintas.

Esta producción de péptidos capaces de ligarse al HLA es orquestada en las organelas interiores de las células. En el citoplasma los antígenos son degradados por proteasas en péptidos más pequeños que se ligan al retículo endoplasmático rugoso (RER); en ese mismo lugar se ensamblan las moléculas de HLA I y II. La concepción actual es la siguiente: las proteínas degradadas en péptidos, de origen endógeno o exógeno (virus) en los proteosomas (las proteínas TAP son constituyentes de este complejo proteico) son llevadas al RER por los transportadores ABC (estas son proteínas de la superfamilia de proteínas ABC [por ATP banding cassette]) que son ATP dependientes y que transportan varios sustratos a través de las membranas, como del RER, al aparato de Golgi. Las que participan en este sistema son las proteínas, LMP (2 y 7) y que son codificadas por genes de la región del HLA II. En el RER los péptidos se fijan a las moléculas de HLA I y son transportados en forma de trímeros (una cadena α , una β 2 globulina y el péptido mismo) a la superficie de la célula. Las moléculas de HLA II que son ensambladas en el RER no se fijan a los péptidos derivados de la propia célula, sólo lo hacen con los de origen extranjero. Hoy se sabe que la cavidad estructural de la molécula de HLA II está bloqueada por una proteína invariante, Clip (Class II-associated invariant chain peptide, que es codificada por gen exterior al MHC). Así el trímero HLA II (cadenas α , β y Clip) es transportado a los endosomas y a los lisosomas, donde el pH es mucho más ácido que en el citoplasma. Es aquí donde los péptidos de origen externo, previo al desplazamiento del Clip por la interacción con la proteína DM (codificada por un gen de la región de la clase HLA II), ocupan ese espacio y se ligan al HLA II para ser transportados a la membrana celular.

sin haber sido expuestos a cualquier antígeno externo. Las señales moleculares para que esto ocurra son la presencia del BCR para los B y del HLA, para los T. Esto significa que un pool de linfocitos naives es mantenido vivo antes de cualquier contacto gracias a las moléculas receptoras que servirán para recibir una molécula antigénica, y a las moléculas “señales” extracelulares (que todavía no se conocen con claridad). Como ya vimos, para que una respuesta inmune (IEA) se produzca, dos señales deben llegar al linfocito: a) un antígeno específico (“adaptado” a su receptor) es la primera señal; b) las segundas señales son los propios gérmenes o las moléculas que su llegada produce en la INNE, que los reconoce. Así los linfocitos T se ven coestimulados por moléculas de membranas y citoquinas solubles, para pasar de T naives a T efectores/de memoria. Las coseñales que están claramente definidas son la B7-1 (CD80) y la B7-2 (CD86), que se expresan en las CPA que se unen al CD28 y CTLA-4 de los linfocitos T y las citoquinas que produce la INNE. Esta coestimulación de los linfocitos T en el momento en que su TCR reconoce el complejo del péptido con la molécula de HLA (primera señal), los hace expresar proteínas antiapoptóticas (de la familia Bcl) y la IL-2 que, por un efecto autocrino, inicia el crecimiento y expansión en un clon de ese linfocito T (*Gráfico 1*). Para los linfocitos B, la segunda señal mejor conocida proviene de la INNE y es un producto del complejo del complemento C3d que se une al CD21 de los linfocitos B, y junto con el antígeno que se une al BCR, estimula el crecimiento y diferenciación de estas células (*Gráficos 2 y 4*).

El mantenimiento de la homeostasis cada vez que entra un germen que estimula el crecimiento de múltiples clones de linfocitos y el evitar las reacciones autoinmunes a los antígenos propios siempre presentes, requieren un mecanismo eficaz por parte del SI, para controlar el crecimiento de esos clones y ponerle fin. Este mecanismo puede dividirse en dos grandes categorías: 1) la ausencia o pérdida de las señales de supervivencia de los linfocitos; 2) la activación de señales propias para autocontrolar su crecimiento y la diferenciación de los propios linfocitos.

1. a) *Fallo en la estimulación linfocitaria*

Por no activación se entiende que el linfocito no recibe alguna de las dos señales o ninguna de ellas. En efecto, para que un linfocito responda debe recibir ambas siempre. Así, por ejemplo, muchos virus anulan o bloquean la expresión de los péptidos por el sistema HLA y por lo tanto no

hay primera señal; en otras circunstancias, el antígeno es bien presentado, pero el linfocito no recibe segundas señales, como es el caso de los antígenos inyectados sin adyuvantes, puesto que son estos últimos los que activan las células de la INNE para que secreten citoquinas entre otras moléculas estimulantes de los linfocitos T.

b) *Anergia linfocitaria*

Otros ejemplos parecidos de ausencia de respuesta inmunitaria, por ausencia de segundas señales, es la llamada anergia inmunitaria o estado de tolerancia, donde el IEA “ignora” la presencia del antígeno. Es el caso, en parte, de los antígenos autólogos que son bien presentados por la molécula de HLA al TCR (primera señal) pero son incapaces de estimular (no producen inflamación) a las CPA y/o a las células de la INNE para que envíen las segundas señales a los linfocitos T. Globalmente ocurriría lo mismo con los linfocitos B.

c) *Pérdida de la actividad linfocitaria por apoptosis “pasiva”*

Aproximadamente un linfocito de cada 10^6 es portador del receptor (la “llave”, imperfecta aún) que puede ser activado por cualquier antígeno. Después de que este último (la “cerradura”) se fija a él, la activación de ese linfocito (replicación [clon], diferenciación y recombinación genómica de los genes de los receptores, que perfeccionan la “llave”), lleva esa relación a un linfocito específico entre otros 1.000. Esto ocurre en una semana, después todo regresa a la relación inicial en 1 a 3 meses. La desaparición de ese gran número de linfocitos es debida a la apoptosis por falta de estimulación, no hay más antígeno (primera señal) de coseñales y citoquinas y está ausente la expresión de proteínas antiapoptóticas (Bcl). Sería como una apoptosis “pasiva”, para distinguirla de la AICD, aunque las vías moleculares sean las mismas. (Veremos todo esto en el capítulo Apoptosis).

2. **Terminación activa de una respuesta inmune**

Esta es una exclusiva propiedad de las células linfocitarias: la autorregulación que pone límites a su proliferación y diferenciación, después de que una infección fue superada o de una estimulación antigénica (por ejemplo, de una vacunación). Hasta ahora han sido bien identificados tres mecanismos o vías, que cumplen ese rol: a) la molécula de CTLA-4, que se liga a las de B7, como la CD28, y que tendría una estimulación opuesta a esta última, es decir, inhibiría la estimulación proliferativa

de los linfocitos T, reprimiendo la secreción de IL-2 por ellos; de esta manera no se produciría la estimulación autocrina que mencionamos antes; b) los linfocitos T activados sobremanera por un exceso de antígenos y su propia secreción de IL-2 expresan dos moléculas en su membrana, Fas y FasL, que inducen una apoptosis "activa", tanto en esos mismos linfocitos como en sus vecinos (esto ocurre, como vimos, a pesar de la presencia de proteínas antiapoptóticas, Bcl). Este mecanismo sería el más importante para eliminar los linfocitos T que reaccionan con los antígenos autólogos, puesto que esto no ocurriría con la estimulación antigénica exterior; c) la IL-2 es el factor de crecimiento por excelencia de los linfocitos T estimulados y de las células "bystander". Tiene tanto funciones autocrinas como paracrinas. Tendría un efecto activador y uno inhibitorio (feedback), que actuarían en diferentes fases de la respuesta inmune. En efecto, en bajas concentraciones (al principio del contacto antigénico), estimula el crecimiento y en altas concentraciones (al final de la infección) induce la producción de Fas y FasL, y, como vimos, estas moléculas suprimen la proliferación por apoptosis; d) regulación de la respuesta inmune por citoquinas. La estimulación de los linfocitos T naives con la primera y segunda señales los convierte en T efectores para suprimir el antígeno, pero también algunos de ellos se diferencian en T reguladores con neta actividad inmunosupresiva (linfocitos T supresores, Ts). Las señales que inducen estas células, como la IL-10 y el TGF- β 1, hacen que los macrófagos que actúan al principio de la infección (IEA) dejen de secretar coestimuladores y que los linfocitos T efectores dejen de proliferar. Así todo vuelve al estado normal que había antes de la entrada del antígeno.

Todos estos mecanismos de control y regulación recién comienzan a elucidarse y faltan respuestas a muchas preguntas, como por ejemplo: ¿actúan todos al mismo tiempo?, ¿cómo pueden actuar las mismas moléculas con una activación positiva o negativa según las concentraciones? Será necesario responderlas para comprender el mecanismo de la homeostasis y la respuesta inmune y poder actuar en él.

Vemos entonces que toda respuesta inmune consiste en la eliminación del agresor y la vuelta al estado normal anterior con una diferencia capital: su patrimonio inmunitario se enriquece con cada antígeno y las células naives que fueron implicadas en la respuesta mueren en su gran mayoría, quedando las células de memoria. Todos los mecanismos anteriores explicados son los conocidos

a la hora actual.

Es posible que la sobrevida de los linfocitos naives y de memoria, con mínimos estímulos externos (pequeñas cantidades de antígenos, concentraciones mínimas de moléculas de segundas señales y otras no conocidas) se mantenga en un estado antiapoptótico (expresando el mínimo de Bcl, por ejemplo) pero no pueden proliferar, a menos que sean activados por nuevos antígenos o en forma recidivante.

Los mecanismos para la tolerancia de los antígenos autólogos

Estos mecanismos pueden agruparse, entonces, en tres grandes grupos: a) la tolerancia principal, como ya vimos, se realiza en el timo, cuando desde el nacimiento son eliminados (por apoptosis) todos los linfocitos T que tienen mucha afinidad por los antígenos autólogos; lo mismo ocurre con los linfocitos B en la MO; b) los mecanismos periféricos de tolerancia y anergia que ya explicamos y c) los mecanismos de control de la respuesta inmune que vimos en los párrafos anteriores. Ejemplos clínicos en relación a las moléculas que nombramos son las mutaciones en el gen de Fas que se asocian con un síndrome linfoproliferativo y reacciones autoinmunes; por ejemplo, un polimorfismo del gen de la IL-2 se asocia al locus de la diabetes insulino dependiente (DMID) en el ser humano. Los modelos animales de supresión de los genes (ratitas knock-out), ya sean de CTLA-4, IL-2, Fas y FasL, generan en más o en menos patologías de linfoproliferación y autoinmunidad.

En conclusión, el mantenimiento de la homeostasis, después de pasada y eliminada la agresión por un antígeno cualquiera, se realiza por dos vías principales de terminación de la respuesta inmune: una pasiva, con la caída o desaparición del antígeno, y otra activa, con la supresión proliferativa controlada de los linfocitos estimulados.

En cualquiera de los eslabones puede haber fallas genéticas o inducidas (por los virus, por ejemplo) que causan enfermedades por fallo del SI: no responde o lo hace en demasía.

El procesamiento del antígeno y su presentación por HLA (Gráfico 5)

La sobrevida de un organismo depende de su capacidad para reconocer, interpretar y responder a los cambios del medio ambiente. El sistema nervioso hace eso muy bien cuando los cambios son exteriores. En cambio, cuando el peligro viene del interior no está bien informado para responder. Esto ocurre cada vez que el organismo se infecta. El SI, a la manera de

un sistema nervioso "móvil", se organizó como para cambiar y variar las condiciones ambientales interiores con el fin de eliminar al agresor. Para ello emplea todos los componentes celulares y moléculas solubles de la INNE y de la IEA. Dijimos también que los microorganismos tenían dos maneras de habitar en el organismo multicelular: vivir extracelularmente o intracelularmente. Es esta última situación la que hizo que la evolución seleccionara receptores de membrana capaces de informar al SI que el invasor vivía en el interior de la célula. En efecto, si el SI con las células de la INNE y las Igs (estas últimas como receptores o como moléculas secretadas) pudiera reconocer solamente polisacáridos de las paredes de los gérmenes, proteínas secretadas por éstos o expresadas en el exterior de la célula infectada, los gérmenes intracelulares escaparían a su control y vivirían todos intracelularmente. Para ello, el receptor que "inventó" el SI es el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) o HLA (por human leucocyte antigen). En efecto, la señal para el SI debe ser específica de los microorganismos o sus productos. La evolución fue constatando que, al menos, una molécula o parte de ella de cada germen es diferente y no tiene homólogos en el organismo invadido. De esta manera, bastaba procesar y presentar esa molécula en fracciones más pequeñas (péptidos) en esos receptores-presentadores del HLA para informar de la presencia intracelular de un germen al SI.

Los genes de HLA en el hombre son los terceros grandes miembros de la superfamilia de las Igs (SFIgs). Están todos localizados, uno detrás del otro, dentro del cromosoma 6 y se extienden a lo largo de 3.000 kb. Ellos codifican por tres tipos de moléculas: las proteínas de clases I, II y III. Las proteínas de las clases I (HLA I) y II (HLA II), tienen una enorme diversidad en todas las especies (las más conocidas son las humanas, que todavía no han sido totalmente detectadas). Esa diversidad, a diferencia de las otras dos moléculas fundamentales de la IEA (Igs y los TCR), no es debida a un proceso de recombinación somática de los genes, sino simplemente al gran número ya existente, a los numerosos alelos que existen por cada locus, y a que los dos (materno y paterno) se expresan (no hay exclusión alélica, como con los genes de las Igs). Los HLA I son proteínas que están en la membrana de todas las células del organismo (los adipocitos serían excepciones). Son las moléculas que dan la identidad a cada individuo, los linfocitos Tc de cada organismo deben reconocer esas moléculas como las propias para no atacar a una célula o tejido. Es la base de la aceptación de un injerto autólogo, o de lo contrario, del rechazo de

un trasplante de un tejido heterólogo (reconocimiento del self o non self). Son proteínas monoméricas constituidas por tres dominios homólogos ($\alpha 1$, 2 y 3), tienen unos 90 aminoácidos y fuerte homología con los dominios C de las SFIgs), poseen un dominio transmembranario y uno citosólico. Esta proteína monomérica, que tiene la parte funcional en el dominio extramoleculal, está unida en forma no covalente con la $\beta 2$ microglobulina, que es una proteína circulante.

Los HLA II son proteínas heterodiméricas, constituidas por una cadena α y una β , cuyos dominios tienen homologías con las regiones C de las SFIgs. Su distribución sobre la membrana celular es más limitada, puesto que están en los linfocitos B, en las CPA y en las células epiteliales.

Las genes de clase III del CMH cuentan entre sus miembros a los del complejo de las proteínas del complemento que no tienen similitudes funcionales ni estructurales con las de las clases I y II.

La distribución en el genoma de los genes del CMH, si miramos el cromosoma 6 humano desde el centrómero al telómero, es la siguiente: los genes de la clase I se encuentran hacia esta última región. Hay tres locus principales, HLA-A, HLA-B, HLA-C y otros genes HLA-E, HLA-F y HLA-G que también codifican y/o controlan la síntesis de proteínas de clase I.

Los genes de clase II están localizados más cerca del centrómero, en la región HLA-D. En el interior de esta región hay tres locus principales, DR, DQ y DP, que tienen al menos 6 genes que codifican por la cadena α y 10 genes que lo hacen por la cadena β . Ellos producen las principales proteínas de clase II aunque en esa región existen otros genes, como los TAP y los DM, que tienen otras funciones en el proceso de presentación del antígeno, como veremos más adelante (*Gráfico 5*).

Cada cadena α se asocia a una cadena β de su respectivo locus. Así, el locus DR tiene una sola cadena α (DRA) que forma el heterodímero con una de las cuatro cadenas β (DRB1-DRB4), en tanto que los loci DP y DQ sólo tienen una α y una β , que se asocian respectivamente.

El polimorfismo de HLA

El polimorfismo alélico es la característica principal de los genes HLA clases I y II. En la población humana se han informado más de 300 moléculas entre ambas clases de HLA. Cada individuo tiene 12 alelos (6 del padre y 6 de la madre) y más del 90% es heterocigota. Es decir, que esas personas presentan dos moléculas diferentes codificadas por los principales genes HLA de las clases I y II (A, B, C y DR, DQ, DP, respectivamente). Así el

polimorfismo de la población humana es muy grande, al punto tal que un individuo, excluyendo sus cosanguíneos directos, tiene una chance entre 10^4 y 10^{10} de encontrarse con otro con igual HLA.

El polimorfismo estructural de cada molécula se observa en regiones particulares de las mismas. Así, en los de clase I es en los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y mucho menos en $\alpha 3$. En los de clase II es, en general, en los dominios de la cadena β de los tres locus DR, DQ y DP y la cadena α del DQ y DP; sólo la cadena α del DR es prácticamente invariable.

Estas zonas polimórficas de las moléculas HLA I y II se ubican, sobre todo, en la región que hará el contacto con el péptido que les corresponde presentar (*Gráfico 5*).

Estructura molecular del complejo HLA I y II con sus péptidos

El conocimiento de la estructura tridimensional de estos complejos, más la purificación y el secuenciado de los péptidos presentes en la cavidad de las regiones polimórficas de los HLA, ayudó a comprender cómo las mismas moléculas de HLA por cada individuo, en su gran mayoría heterocigotas, pueden presentar tantos péptidos diferentes. Los péptidos presentados por el HLA I tienen un tamaño de 9 aminoácidos y algunos de ellos, situados en las posiciones de anclaje, son siempre los mismos e independientes del resto. Esas regiones de anclaje dentro de la cavidad están dadas por conformaciones moleculares que otorgan los aminoácidos hidrofílicos, hidrofóbicos o mixtos de un haplotipo de HLA de cada individuo.

Así, las seis moléculas de HLA I de un individuo heterocigota pueden fijar un gran número de péptidos diferentes. Las moléculas de HLA clase II pueden fijar péptidos de 15 a 25 aminoácidos, con los mismos criterios anteriores. Se cree que estos tamaños de los péptidos que el HLA presenta a los TCR no son aleatorios, sino los seleccionados por la evolución para nuestra especie. Por ejemplo, si fuera menor de 9, para los HLA I (por ejemplo 5 aminoácidos) podría coincidir estadísticamente más fácilmente con secuencias de los antígenos propios del organismo y los linfocitos T serían destruidos por selección negativa; al contrario, si el número fuera superior a 9 (por ejemplo 14), los gérmenes tendrían más chances de hacer variar sus antígenos y así escapar al SI.

Vale la pena recordar que una CPA tiene más de 200.000 moléculas de HLA en sus membranas y que entre 15.000 y 60.000 de ellas presentan péptidos diferentes a los linfocitos T que recorren y revisan esa superficie en busca del péptido adecuado para su TCR.

Finalmente, si tenemos en cuenta el mundo actual, con sus múltiples migraciones y mezclas de razas, el polimorfismo del HLA no dejará de crecer y, desde una perspectiva, habrá muchas más moléculas para presentar, viejos y nuevos antígenos (sintéticos, enfermedades emergentes) con los que el SI de los seres humanos se irá confrontando. La evolución sigue su fantástico recorrido y el SI es su ejemplo más elocuente.

GLOSARIO

CAM: Calmodulina.

CAMK: Calmodulina quinasa.

CN: Calcineurina.

DG: Diacil glicerol.

ITAM: Por "immunoreceptor tyrosine-based activator motif". Son dominios que cuando son fosforilados estimulan a proteínas quinastas. Están presentes en los receptores BCR y TCR, son regulados por

los ITIM a través de las fosfatasas SHP1 y SHP2 (por SH phosphatase), que los ITIM reclutan después de ser ellos mismos fosforilados.

ITIM: Por "immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motif". Son dominios que estimulan a fosfatasas. Presentes en muchos receptores hematopoyéticos regulan negativamente la activación de los linfocitos T, B y NK.

JAKs: Janus quinastas (por el dios de la mitología romana, con dos rostros iguales en sentidos

opuestos). Existen las JAKs 1, 2, 3 y Tyk2 (por tyrosine kinase). Están al mismo tiempo en relación a un receptor membranario, sin función quinasa, y con las proteínas intracitoplasmáticas STATs.

MAPKs: Por "mitogen-associated protein kinase".

Quimioquinas: Es una subfamilia de más de 40 pequeñas proteínas dentro de la gran familia de las citoquinas. Su principal función es atraer a los leucocitos. Tienen un dominio con cuatro cisteínas que las caracterizan. Estas hacen dos puentes disulfuro. Las quimioquinas que tienen las cisteínas adyacentes forman el grupo CC, mientras que el grupo CXC posee un aminoácido cualquiera entre las cisteínas. Además de atraer a los linfocitos y de contribuir a su migración y diapédesis, activando el citoesqueleto, estimulan la entrada de Ca y la liberación de radicales oxidativos, proteasas y gránulos bactericidas en los neutrofilos, monocitos basófilos y eosinófilos. La mayoría de las quimioquinas son producidas en situaciones patológicas (infección, por ejemplo). Algunas pocas están presentes en pequeñas cantidades en el organismo normal. Así fisiológicamente participan de la migración y circulación de las células hematopoyéticas en general, entre la MO, el timo y los GL. Sus receptores pertenecen al grupo de proteínas transmembranarias de 7 bucles, ligados a las proteínas G. Hay cinco receptores de quimioquinas CXC y ocho de CC bien caracterizados. Algunos de ellos se hicieron conocidos por ser co-receptores del virus HIV.

PKC: Proteína quinasa C.

PTK: proteínas tirosina quinasa. Existen dos tipos de PTK específicas de los linfocitos T y de los B. Uno es la familia ZAP-70, Syc y el otro el de la familia Src (a la que pertenecen, las proteínas P59 Fyn,

P56 Lck, Btk, Lyn); su estructura está fundada sobre la presencia de dominios muy conservados, que son utilizados para clasificarlos en familias. Ellos son el dominio catalítico SH1 (por "Src homology") y los dominios de interacciones no enzimáticas entre proteínas, SH2 y SH3. La familia Syk-ZAP70 contiene dos dominios SH2 y ninguno SH3. La familia de Src contiene un dominio SH2 y uno SH3. Las dos familias tienen el dominio SH1. Los dominios SH2 interactúan con dominios fosforilados en el aminoácido tirosina de las proteínas con las que se unen.

SOS: por "son of sevenless". Proteína que es reconocida por la proteína Grb2, gracias al SH3 de la sos.

STATs: por "signal transducers and activators of transcription". Son activados por las proteínas JAKs, forman dímeros y penetran al núcleo; allí son FTs.

WASP: La proteína Wiskott-Aldrich, el producto fisiológico del gen, del mismo nombre (ver *Arch Arg Pediatr* 96 (3):1998), puede actuar con diversos números de proteínas que participan en las señales de transducción extracelulares y en la organización del citoesqueleto. La WASP aparece en el citoplasma integrando circuitos básicos de la célula. Los dominios de la WASP son, a partir de NH2: El WH1 (por "WA homology"), que interactúa con PtdIns (4,5) P2 (phosphatidylinositol[4,5]-biphosphate), los dominios Gbd, SH3 y el WH2. Estos tres últimos interactúan con la GTP fosfatasa, las Fyn, Grb2, Itk, y otras, y con la actina (la proteína más abundante de las células eucariontes), componente esencial del citoesqueleto. Todas estas interrelaciones y las diversas mutaciones en estos dominios podrían comenzar a explicar la diversidad de los fenotipos patológicos del síndrome de WA.

BIBLIOGRAFIA

- Kaplan JC, Delpuch M. Biologie moleculaire et medicine. Medicine Sciences Flammarion. 2ed. 1994.
- Lodish H, Baltimore D, Berk A, Laurence Ziparsky S, Matsudaria P, Donnell J. Molecular cell biology. New York: Scientific American Books. 3ed. 1995.
- Pelmont J. Enzymes, catalyseurs du monde vivant. Paris: Press Universitaires de Grenoble. 2ed. 1995.
- Roitt IM, Brostoff J, Male D. Immunology. 3ed. 1993
- Baggiolini M. Chemoquines and leukocyte traffic. Nature 1998; 392: 565-568.
- Kirch Haussen T. Wiskott-Alchich Syndrome: Reviews. Mol Med 1998;4: 300-304.
- Weissman I. Review. Cell 1994;76:207-218.
- Weiss H, Littman DR. Review. Cell 1994;76: 263-274.
- Springer L. Review. Cell 1994; 76: 301-314.
- Fisher A, Malissen B. Natural and engineered disorders of lymphocyte development. Science 1998; 280: 237-243.
- Parijs LV, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. Science 1998; 280: 243-248