

Presentación

En el año 1994 se publicaba la primera Monografía de la serie Monografías de Actualización en Ciencias Farmacéuticas, coordinada por el Académico D. Arturo Mosqueira, con el Título "Diseño de Medicamentos" y el patrocinio de Farmaindustria. Poco después, y correspondiente al año 1995, sería publicada la segunda Monografía, sobre Proliferación celular y cáncer coordinada por D. Julio Rodríguez Villanueva y Dña. María Cascales Angosto, y patrocinada por la Fundación científica de la Asociación Española contra el cáncer. Al año siguiente, 1996, se publica la tercera, coordinada por D. Antonio Portolés Alonso, patrocinada por la Hermandad Farmacéutica del Mediterráneo y dedicada a glosar los aspectos más actuales, interesantes y prometedores del problema de la Autoinmunidad: algunos aspectos básicos y clínicos.

Al Dr. Portolés corresponde el mérito del trabajo y el honor de la presentación de la Monografía. Pero yo no puedo sustrarme a dos brevísimos comentarios. El primero hace referencia a la confirmación y consolidación de un proyecto: la publicación regular y periódica de una serie de monografías en las que destacados especialistas presentan, discuten y desvelan el momento actual y futuro previsible de investigaciones de vanguardia en el vasto campo de las Ciencias Farmacéuticas.

El segundo, la felicitación al coordinador que, sin regatear esfuerzos, pone a disposición de la Real Academia de Farmacia su tiempo y saberes proponiendo temas, buscando colaboradores y haciendo el silencioso trabajo de coordinación que sólo se vislumbra, pero apenas trasciende, cuando se tiene en la mano una obra bien hecha.

Antes de que seque la tinta de la 3ª Monografía, ya se han comenzado los trabajos de la 4ª a la que, probablemente antes de un año, también daremos la bienvenida.

Como miembro de esta Real Academia de Farmacia, satisfacción por la continuidad de las publicaciones y agradecimientos a los que en ellas trabajan, son los nobles sentimientos que nos embargan y animan a proseguir en tan noble empresa.

Rafael Cadórniga Carro

Prólogo

Me cabe el honor de hacer el ofrecimiento de la obra "Autoinmunidad: algunos aspectos básicos y clínicos" confeccionada y editada por la Fundación "Casares Gil" de la Real Academia de Farmacia, de la que soy patrono.

La obra ha sido patrocinada por el grupo empresarial Hefame que me honro en presidir y que demuestra de este modo su vocación de servicio a la profesión en una diversidad de funciones y facetas.

En efecto, desde la actividad económica que se desarrolla por nuestra cooperativa, dentro del sector de la Distribución Farmacéutica, se están ofreciendo a socios y clientes ayudas materiales y profesionales que hacen viables y rentables a gran número de oficinas de Farmacia y permiten un ejercicio digno de la profesión.

No obstante con ese amplio tipo de servicios no se agota el noble deber de un proyecto que está llamado a ser instrumento al servicio de todo el colectivo farmacéutico y social.

Este patrocinio repito, es una muestra más del indiscutible deseo de participar en la difusión del acervo científico y cultural de la Real Academia de Farmacia en línea con la antedicha vocación.

Francisco J. Vicente Ortega

Introducción

Como es sobradamente conocido, en un determinado momento de la evolución de los seres vivos aparece la posibilidad de un sistema inmune rudimentario que habría de ir plasmándose en receptores superficiales de membrana capaces de distinguir lo propio y lo ajeno. Dicha capacidad, mediante múltiples y sucesivos intentos de adaptación, se fue ampliando y diversificando en su repertorio de elementos hasta llegar a establecerse el papel diferencial de un complejo principal de histocompatibilidad (MHC), como la expresión de una región genética perfectamente definida y que era imprescindible para la supervivencia mediante el control de la organogénesis. Ello no obstante, en ocasiones, este extraordinario sistema de autorreconocimiento, encargado de conservar lo propio y destruir lo extraño, puede experimentar alguna alteración en su fina y equilibrada trama de mensajes moleculares; cuando este equilibrio se rompe aparecen una serie de trastornos que cobran un especial relieve en la progresión de enfermedades autoinmunes, cuya etiopatogenia aparece en constante revisión investigadora por parte de inmunólogos, bioquímicos, biólogos y clínicos.

Muy a principios de este siglo XX es cuando, por primera vez, se llama la atención sobre una serie de respuestas anómalas de autoagresión orgánica que, EHRLICH y MORGENROTH (1901), definirían como "horror autotóxicus" y que pocos años más tarde se atribuirían a autoanticuerpos capaces de actuar frente al propio organismo en determinadas circunstancias patológicas aunque el sistema inmune mantenga activos sus complejos mecanismos de regulación; pero es, durante el último tercio de siglo, cuando los avances en Genética y Biología Molecular empiezan a aclarar multitud de interrogantes en el conocimiento de los fenómenos autoinmunitarios, hasta el punto de llegar a la patogenia de ciertas enfermedades autoinmunes. Así mismo, algunos datos relativos a las interacción receptor-ligando fueron materializándose en nuevos conceptos de patología molecular, ya revisados por ARIENS (1983), que pueden ser traducidos a estados de salud o enfermedad de acuerdo con los mecanis-

mos de regulación inmunitaria y según las claves usadas para interpretación del reconocimiento y comunicación celular dentro de cada organismo. La relación afinidad/avidez de los receptores de las células T, condiciona en un organismo normal una correcta selección tímica positiva o negativa que, en su triple capacidad de retener las células útiles, destruir las perjudiciales o descartar las inútiles, puede, en última instancia, originar un funcionamiento apropiado o erróneo de la respuesta inmune. A ello habrá de sumarse, también, la eliminación o inactivación de células B reactivas que tienen antígenos propios solubles o ligados a membrana para alcanzar un estado de tolerancia: en ningún modelo biológico es tan patente la influencia de las relaciones estructura-función para conseguir tanta versatilidad en señales moleculares, cuya falta de armonía puede desencadenar una enfermedad por autoagresión.

Cada día es más frecuente encontrar en la bibliografía médica numerosos cuadros patológicos que son atribuibles a fenómenos autoinmunitarios, en los que no siempre son conocidos sus más íntimos mecanismos, pudiendo ser organoespecíficos o bien dar lugar a asociaciones anómalas que conduzcan a síndromes autoinmunes de carácter múltiple, en los que influyen ciertas co-localizaciones de regiones cromosómicas para dar lugar a estos cuadros autoinmunes poligénicos en los que puede haber también sutiles cambios en el balance Th1/Th2. Conceptualmente, y de modo resumido, se admite que una reacción autoinmune puede producirse en condiciones patológicas por muy variadas causas, como pueden ser: a) aparición de clones linfocitarios autorreactivos; b) modificaciones en el estado de tolerancia; c) alteraciones en la regulación que conducen a desequilibrios entre las células T supresoras y las T inductoras; d) aparición de neoantígenos por efecto de infecciones virales o microbianas o incluso por alguna acción tóxica.

Parece suficientemente demostrado que la mayoría de las enfermedades autoinmunes órgano-específicas se producen por respuestas inmunológicas inapropiadas contra antígenos del propio organismo para los cuales no se ha establecido una adecuada tolerancia; mientras que en los casos de autoinmunidad sistémica pueden producirse anomalías tales como algún defecto en los mecanismos de apoptosis o incluso reacciones frente

a antígenos propios alterados o neoliberados, existiendo un amplio espectro de hipótesis de trabajo que justifican diversos mecanismos etiológicos potenciales para desencadenar una enfermedad autoinmune. Así, la accesibilidad de ciertos antígenos periféricos, previamente secuestrados tras ciertas barreras anatómicas y que por ello no precisan de tolerancia por no entrar en contacto con las células T en desarrollo, puede ser la causa desencadenante de un estado patológico por **liberación de antígenos anatómicamente secuestrados**. También la existencia de **determinantes crípticos** que por pasar desapercibidos entre los epitopos dominantes no induce tolerancia, hace que en su liberación reaccionen con células T potencialmente reactivas para ellos; dichos antígenos pueden liberarse por efecto de infecciones, tumores o acciones tóxicas y producir una reacción cruzada como antígeno extraño; últimamente parece haberse demostrado que algunos iones metálicos pueden desnaturalizar proteínas y poner de manifiesto determinantes crípticos que permanecían ocultos. Por otra parte, puede haber **situaciones de anergia** o incapacidad para reconocer un determinado epitopo por falta de coestimuladores o ausencia de una segunda señal para la célula T específica que, en estas condiciones, permanece quiescente; aunque si se produjera una presentación adecuada y una coestimulación suficiente esta célula T sería capaz de ponerse en actividad y producir una agresión tisular. Estas dos últimas teorías son compatibles con las hipótesis de **mimetismo molecular** producido por agentes infecciosos que condicionan, no sólo la aparición de determinantes miméticos, sino también alguna lesión de los tejidos y una liberación de antígenos secuestrados e incluso accesibilidad a ciertos determinantes crípticos. También puede producirse ocasionalmente, **redistribución de moléculas intracelulares** con expresión ectópica de las mismas, **aparición de neoantígenos**, **presencia de activadores policlonales** y existencia de **errores en la tolerancia central o periférica**, así como **modificaciones en el espectro de síntesis de las citoquinas** tal como se ha demostrado con las sales de mercurio al modificar los perfiles en la síntesis de estos factores provocando algunos cambios en el balance Th1/Th2.

También existen factores genéticos que contribuyen a la predisposición para enfermedades autoinmunes. Según parece son múltiples los

genes que contribuyen a la inducción de este tipo de enfermedades y no basta una simple anomalía genética, por sí misma, para inducir el estado de enfermedad. Los estudios sobre genoma humano que actualmente se realizan permitirán ir localizando los genes y loci origen de esta predisposición y sus mecanismos.

Está claro que los principales genes que contribuyen a esta predisposición patológica son los mismos del sistema MHC pero ellos no se bastan por sí solos sino que también intervienen otros genes que participan en la codificación de receptores de las células T, de inmunoglobulinas, citoquinas, etc, alterando la regulación del sistema. La acumulación de alteraciones en polimorfismos susceptibles de producir enfermedad dan lugar a alteraciones distintas a las producidas por un gen crítico para la homeostasis inmune. Por ejemplo, una mutación en el gen estructural para la Il-2 puede intervenir en la diabetes espontánea en ratones NOD.

Un interés particular presentan los marcadores informativos de los microsatélites genómicos formados por largos polimorfismos de cadena simple, integrados por secuencias repetidas (usualmente dinucleótidos) y que llegan a producir muy diversos grados de alteraciones moleculares de carácter polimórfico capaces de modificar una respuesta inmune normal. Este tipo de genes se puede identificar en muchas enfermedades ligadas al MHC junto con genes mutantes tales como *lpr*, *gld* y *motheaten*.

Se han identificado enfermedades autoinmunes que tienen un curso monofásico típico en el que linfocitos autoinmunes, como pueden ser los encefalitogénicos, son controlados por células T reguladoras o por el propio tejido diana mediante un mecanismo de apoptosis; sin embargo, no está totalmente esclarecido qué interacciones se requieren para causar apoptosis de células T en el SNC aunque parece que hay intervención de los astrocitos. Por otra parte, también se han identificado defectos en algunos genes relacionados con la apoptosis y éstos, como se puede ver más adelante en esta Monografía, alcanzan a tener una clara intervención en la enfermedad.

Son varios los problemas que se plantean en el estudio de las enfermedades autoinmunitarias, no solo en cuanto a los mecanismos y criterios para su inclusión en un determinado cuadro clínico definido, sino también en cuanto se refiere a precisar la naturaleza de los antígenos

desencadenantes (si éstos son propios, neoformados o extraños), o también la naturaleza de los posibles factores del medio ambiente que pueden iniciar o desencadenar el proceso autoinmunitario. Es interesante conocer exactamente las características estructurales que diferencian los autoanticuerpos patogénicos de los no patogénicos y las variaciones de células T, así como la identidad de genes y mecanismos de acción que predisponen o aceleran la autoinmunidad. Desde un punto de vista etiológico habrá de tenerse en cuenta que pueden existir varias posibilidades no excluyentes entre sí como la predisposición genética y las alteraciones en procesos de apoptosis, así como diversas respuestas inapropiadas de autorreactividad que modifiquen el nivel de inmunotolerancia y la intervención de diversas citoquinas. Por ejemplo, en el proceso de vigilancia inmunológica se ha comprobado la intervención de una proteína de shock térmico, relacionada con tres tipos de genes y con varios alelos (HSP 70-1, HSP 70-2 y HSP HOM), que pueden expresarse por infección, transformación oncogénica o por alteraciones de tolerancia, para dar lugar a lesiones del tipo lupus en macrófagos y linfocitos periféricos.

Alguna de las más interesantes incógnitas aparece asociada al conocimiento de la verdadera naturaleza del antígeno desencadenante, la extraordinaria diversidad de los anticuerpos y la duda de si el disparo inicial tiene alguna relación con el antígeno reconocido por el autoanticuerpo. De hecho, hoy se sabe que los determinantes o epitopos reconocidos por el autoanticuerpo y la célula T cooperadora prerrequerida, pueden residir sobre diferentes moléculas dentro de un complejo supramolecular. Así, por ejemplo, el disparo inicial en casos de lupus eritematoso sistémico para producir los autoanticuerpos anti-DNA reside en la cromatina (complejo del DNA, histonas y otras proteínas del núcleo) más que en la propia molécula nDNA y también, otra prueba, es que los clones de células T cooperadoras para la inducción de estos anticuerpos anti-nDNA secretan interleuquina 2 en presencia de células singeneicas presentadoras de antígenos y nucleosomas, pero no de su nDNA constituyente o de histonas, puesto que el epitopo se encuentra en los péptidos MHC-presentados que se derivan del nucleosoma y no del ácido nucleico *per se*.

Desde una visión polarizada hacia la posible investigación y desarrollo de fármacos, la terapia de las enfermedades autoinmunes se debate entre la corrección de lo sintomático y el control del mecanismo de la agresión. Así, en enfermedades con anomalías en la regulación de la respuesta inmune se acude a la administración de diversos inmunomoduladores e inmunosupresores inespecíficos, alguno de ellos altamente efectivos como el tacrolimus (FK 506), que es un antibiótico macrólido usado en la hepatitis crónica autoinmune y que puede ser 10 a 200 veces más activo que la ciclosporina, o también a una irradiación linfoide total junto a bajas dosis de esteroides.

La inmunoterapia puede ser más o menos selectiva orientándose al bloqueo de ciertas funciones, como los tratamientos con interleuquina 2-toxina, o la inducción de cambios más permanentes haciendo uso de la capacidad de memoria del sistema inmune; así se pueden utilizar anticuerpos contra moléculas de artritis MHC-II asociadas, o diversos anticuerpos bloqueantes anti-CD4 y anti-TCR, o inclusive frente a supuestos autoantígenos previamente detectados en algún cuadro patológico determinado. También se puede acudir a intentar producir tolerancia o pérdida de susceptibilidad utilizando antígenos periféricos asociados a tejidos específicos. Por ejemplo, la inyección intratímica de células de islotes de páncreas puede prevenir la diabetes autoinmune en ratas BB y en ratones diabéticos NOD, modelo sobre el cual se presenta un documentado trabajo en esta monografía. También la encefalitis autoinmune experimental (EAE) fue prevenida en ratas susceptibles mediante una inyección intratímica previa de proteína básica de mielina o de su principal péptido encefalitogénico. Por otra parte, la expresión transgénica en el timo de ciertos antígenos asociados con una enfermedad puede inducir tolerancia a través de delección clonal o anergia, evitando dicha enfermedad.

Aún hoy, pese a los avances conseguidos en investigación inmunológica, todavía existen algunas incógnitas para ciertas enfermedades autoinmunitarias que se relacionan con la naturaleza del antígeno desencadenante y en su interacción con el posible anticuerpo; así, cabría preguntarse: ¿está en dicha interacción el cuadro patológico?, ¿cómo se

responsabiliza, entre los varios autoanticuerpos asociados a una enfermedad, cual es el verdadero responsable?, ¿cual es el agente desencadenante de la reacción inicial entre un neoantígeno y su autoanticuerpo?, y también si ¿resulta ser éste el verdadero origen de la enfermedad?.

En cuanto al tratamiento, el futuro aparece prometedor y aunque la monoterapia universal sea improbable, están siendo desarrollados nuevos inmunosupresores más activos y específicos mientras que la investigación inmunológica aporta cada día más conocimientos a la intimidad de los mecanismos con el fin de alcanzar su control mediante citoquinas involucradas en los propios procesos inflamatorios, permitiendo manipular a los mediadores en estas respuestas de autoagresión.

Con el deseo de aportar nuevos datos para un mejor conocimiento científico de la Autoinmunidad presentamos esta Monografía en la que se exponen algunos recientes avances, junto a oportunas revisiones, y resultados obtenidos por los propios autores de los artículos. Una mirada a los trabajos que se incluyen en esta Monografía, la tercera de la serie que edita la Real Academia de Farmacia, nos permite comprobar la diversidad de temas tratados y la profundidad de su estudio, tanto en investigación inmunológica básica como en ciertos aspectos particulares de algunas enfermedades con gran interés clínico. En relación con algunos aspectos básicos del tema se estudia la asociación de antígenos HLA con la enfermedad y los mecanismos que soportan dicha asociación; el papel de la autorreactividad de células B y T y los posibles desequilibrios en la regulación de las citoquinas para la aparición de cuadros autoinmunes, así como la implicación en ellos de los mecanismos de apoptosis. En relación con otras vertientes del problema, también se estudia la participación de diversas infecciones en la aparición de autoinmunidad; la existencia de autoanticuerpos circulantes que modifican la "cascada factorial" para la formación de fibrina; se hace una puesta a punto de los conocimientos actuales sobre esclerosis múltiple y se investiga la presentación antigénica en un modelo murino de diabetes autoinmune. Es justo, por tanto, agradecer todas estas contribuciones científicas a los investigadores que han colaborado con sus conocimientos y aportaciones experimentales al propósito didáctico de este libro.

No quiero terminar estas reflexiones sin manifestar mi satisfacción porque la Real Academia de Farmacia haya hecho objeto de su elección a tan interesante tema para la tercera Monografía de la "Serie de Actualización en Ciencias Farmacéuticas" y expresar mi sincero reconocimiento a HEFAME, Hermandad Farmacéutica del Mediterráneo, por el desinteresado patrocinio de la edición de esta obra bajo los auspicios de la "Fundación José Casares Gil".

Antonio Portolés Alonso

Enfermedades autoinmunes ligadas al MHC

Por

EDUARDO GÓMEZ CASADO; JORGE MARTÍNEZ LASO Y
ANTONIO ARNAIZ VILLENA

*Hospital Universitario "12 de Octubre".- Servicio de Inmunología.-
Ctra. Andalucía.- 28041 Madrid.*

ÍNDICE

1. EL SISTEMA HLA.
 - 1.1. Generalidades.
 - 1.2. Estructura proteica de los antígenos HLA.
 - 1.2.1. *Antígenos HLA de clase I.*
 - 1.2.2. *Antígenos HLA de clase II.*
 - 1.3. Organización génica de los antígenos HLA.
 - 1.3.1. *Organización génica de los antígenos HLA de clase I.*
 - 1.3.2. *Organización génica de los antígenos HLA de clase II.*
 - 1.4. Polimorfismo del sistema HLA.
2. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN HLA-ENFERMEDAD.
 - 2.1. Consideraciones generales.
 - 2.1.1. *Definición del grupo de pacientes.*
 - 2.1.2. *Definición del grupo de controles.*
 - 2.2. Cálculos estadísticos.
 - 2.2.1. *Estudios de población.*
 - 2.2.2. *Estudios en familias.*
3. MECANISMOS DE ASOCIACIÓN DEL SISTEMA HLA-ENFERMEDAD.
 - 3.1. Modelos experimentales.
 - 3.2. Teorías de asociación del MHC y enfermedad.
 - 3.2.1. *Mimetismo molecular.*
 - 3.2.2. *Moléculas MHC como receptores de virus.*
 - 3.3 Importancia de genes no HLA dentro del MHC humano.
4. HLA Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES.
 - 4.1. Introducción.
 - 4.2. Enfermedades autoinmunes.
 - 4.2.1. *Diabetes mellitus insulino-dependiente.*
 - 4.2.2. *Artritis reumatoide.*
 - 4.2.3. *Espondilitis anquilosante.*
5. HLA Y ENFERMEDADES DEL TEJIDO CONECTIVO.
 - 5.1. Introducción.
 - 5.2. Enfermedades del tejido conectivo.

- 5.2.1. *Lupus eritematoso sistémico.*
- 5.2.2. *Síndrome de Sjögren primario.*
- 5.2.3. *Poliomiositis.*
- 5.2.4. *Esclerosis sistémica.*

6. BIBLIOGRAFÍA.

1. EL SISTEMA HLA.

1.1 Generalidades.

Todo organismo vertebrado posee la capacidad de producir una respuesta de defensa frente a cuerpos extraños, ya sean sustancias exógenas (antígenos) o injertos de trasplante (aloantígenos). Esta capacidad se manifiesta mediante dos tipos de mecanismos, uno de defensa inmune humoral y otro de defensa inmune inmediata mediada por células. En ambos casos estos mecanismos se realizan por células linfoides con una capacidad de respuesta intensa cuando se produce un segundo contacto con el antígeno.

En el caso de rechazo a injertos se observó que existían una serie de moléculas que tenían una importancia predominante a la hora de la supervivencia de los mismos. Estas moléculas eran los productos de una región determinada del genoma a la que se denominó complejo principal de histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex, MHC).

Se han encontrado, en todas las especies de mamíferos estudiadas, sistemas principales de histocompatibilidad análogos. Los más estudiados, en la actualidad, son el de ratón que se denomina H-2 (situado en el cromosoma 17) y el del hombre que se denomina HLA (Human Leukocyte Antigens)(situado en el cromosoma 6, *Ploegh y col., 1981*).

Aunque el complejo principal de histocompatibilidad fue determinado por su papel en el rechazo de los trasplantes, se sabe que los antígenos codificados por esta región intervienen a muchos niveles en el reconocimiento inmunológico.

1.2. Estructura proteica de los antígenos HLA.

El sistema HLA se comporta como un sistema dialélico, autosómico y codominante constituido por una serie de genes que codifican para un amplio grupo de antígenos de la superficie celular que se agrupan

fundamentalmente en 2 clases:

1.2.1. Antígenos HLA de clase I.

Dentro de este grupo se han incluido los antígenos HLA-A, -B, -C, llamados clásicos que se expresan en la superficie de todas las células nucleadas, plaquetas y espermatozoides. Estos actúan de marcadores para el reconocimiento de lo propio frente a lo no propio, necesario al organismo para defenderse de agresiones extrañas y presentan antígenos exógenos principalmente a las células T citotóxicas. Por otra parte se han descrito recientemente otra serie de loci HLA de clase I, llamados no clásicos (denominados HLA-E, -F, -G, -H, -J, -L y -K) de los cuales sólo de algunos se sabe su posible funcionalidad.

Los antígenos HLA de clase I clásicos (HLA-A, -B, -C) son glicoproteínas transmembranales que constan de dos cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente. Una pesada transmembranal de 44kd de masa molecular, llamada cadena α y que se codifica a nivel de los genes del sistema HLA propiamente dicho y una ligera (β 2 microglobulina) de 12 kd de masa molecular codificada por un gen que no pertenece al sistema HLA que se encuentra en el cromosoma 15 (Figura 1). La cadena pesada consta de 3 dominios de igual longitud llamados α 1, α 2 y α 3 (Figura 1). Los dominios α 1 y α 2 no presentan secuencias homólogas con las regiones constantes o variables de las inmunoglobulinas. Los dominios α 3 y β 2 microglobulina presentan secuencias relativamente conservativas y de gran homología con las regiones constantes de las inmunoglobulinas.

Se ha conseguido cristalizar un fragmento soluble de los antígenos HLA-A2, A28 y B27 compuestos de α 1, α 2, α 3 y β 2-microglobulina. Los dominios α 1 y α 2 constan cada uno de una estructura de lámina β antiparalela y una α -hélice (Figura 2, *Bjorkman y col., 1987*). En el dominio α 2 existe un puente disulfuro que une la cadena β -amino terminal y su α -hélice más larga. Las dos estructuras β de α 1 y α 2 forman una única lámina de 8 cadenas y, por encima, paralelas entre ellas mismas están las dos estructuras α -hélice. En el aminoácido 86 (Asparagina) la cadena pesada presenta una ramificación de oligosacáridos. Entre las dos α -hélices aparece una hendidura cuyo fondo viene dado por la lámina β antiparalela. Esta hendidura representa un lugar de unión para un pequeño péptido de un antígeno procesado.

1.2.2. Antígenos HLA de clase II.

El descubrimiento de estos antígenos vino dado por la respuesta linfoproliferativa entre hermanos que eran serológicamente HLA-A y -B idénticos. A este sistema se le denominó HLA-D. Posteriormente se identificaron antígenos relacionados con este HLA-D, denominándose HLA-DR (D "Related"). Estudios similares definieron antígenos que parecían ser especificidades públicas de HLA-DR y se denominaron MT, MB, DC y SB. Sin embargo, se esclareció que eran nuevas series antigénicas que se han denominado HLA-DR52/DR53, -DQ y -DP. Se expresan principalmente en las células que primero entran en contacto con antígenos extraños, estas son: macrófagos, linfocitos B, células endoteliales, células de Langerhans y linfocitos T blastoides activados.

Los antígenos HLA de clase II son glicoproteínas transmembranales que constan de dos cadenas polipeptídicas, una cadena pesada α de aproximadamente 34 kd de masa molecular y una cadena ligera β de 28 kd de masa molecular unidas no covalentemente y ambas codificadas dentro del sistema HLA. Cada molécula α ó β está formada por cuatro dominios, uno aminoterminal, distal a la membrana celular ($\alpha 1$ y $\beta 1$), uno proximal ($\alpha 2$ y $\beta 2$), homólogo a las regiones constantes de inmunoglobulinas, un péptido conector y otra que consta de una región transmembranal y una pequeña región intracitoplasmática. Las distintas cadenas α contienen dos sustituciones de carbohidratos, mientras que las cadenas β sólo presentan una ramificación de oligosacáridos (Figura 3).

Se ha cristalizado la molécula HLA-DR1 resultando tener una estructura tridimensional similar a la de los antígenos HLA de clase I (Figura 4, *Brown, J.H. y col. 1993*). Los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ formarían una estructura análoga a los de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de los antígenos HLA de clase I y $\alpha 2$ y $\beta 2$ a la de los dominios $\alpha 3$ y $\beta 2$ -microglobulina dando lugar a una estructura similar a la de los antígenos HLA de clase I con la misma significación biológica que éstos.

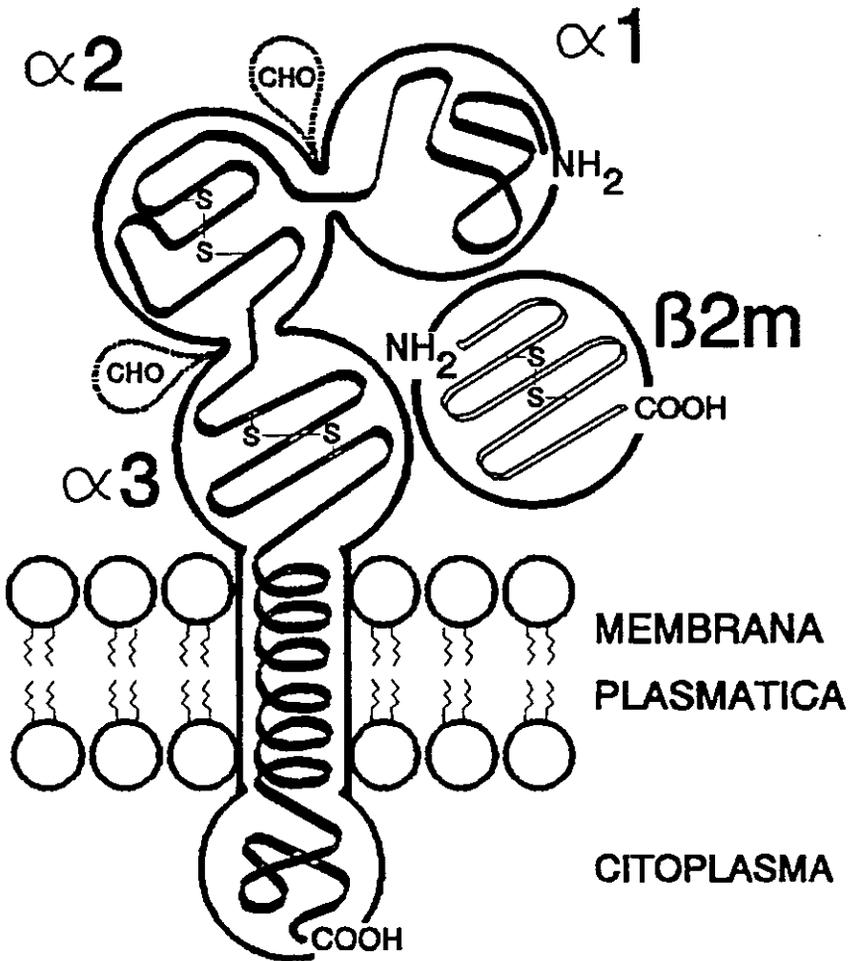


Figura 1.- Estructura esquemática de los antígenos HLA de clase I. Se observan los 3 dominios extracelulares de la cadena α y la β_2 -microglobulina.

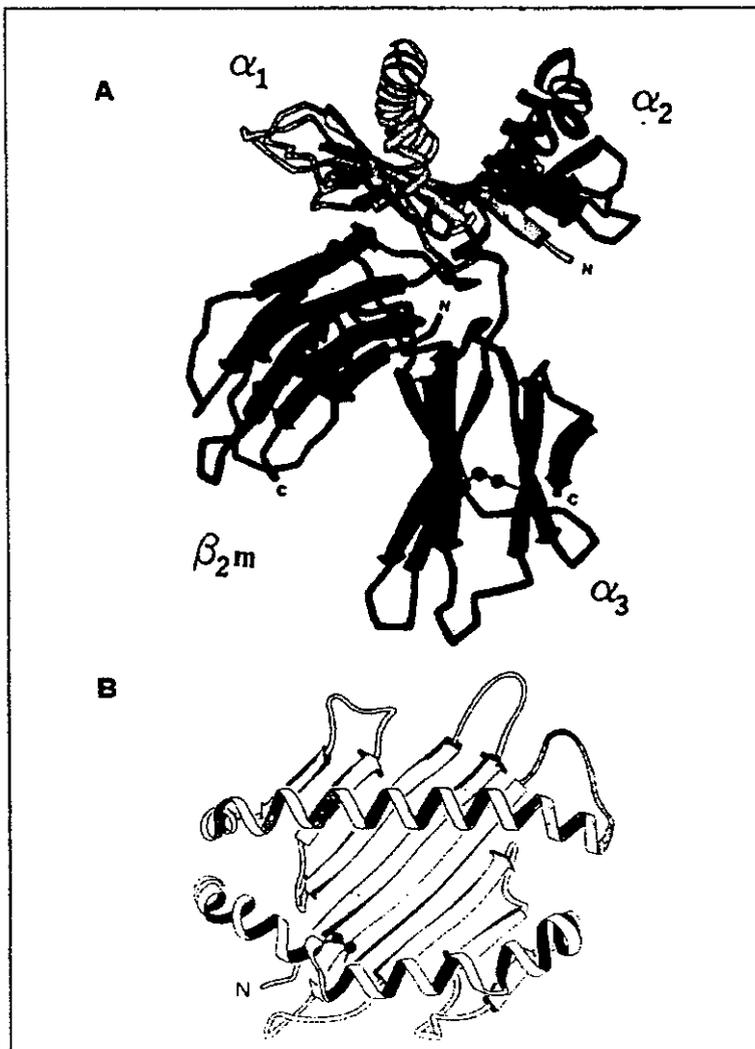


Figura 2.- Estructura tridimensional del antígeno HLA-A2. a) Estructura completa del cristal. La lámina β antiparalela se representa por flechas y las hélices α por lazadas enrolladas. Los puentes disulfuro se representan por dos esferas conectadas. b) Visión superior de la parte más distal de la molécula HLA.

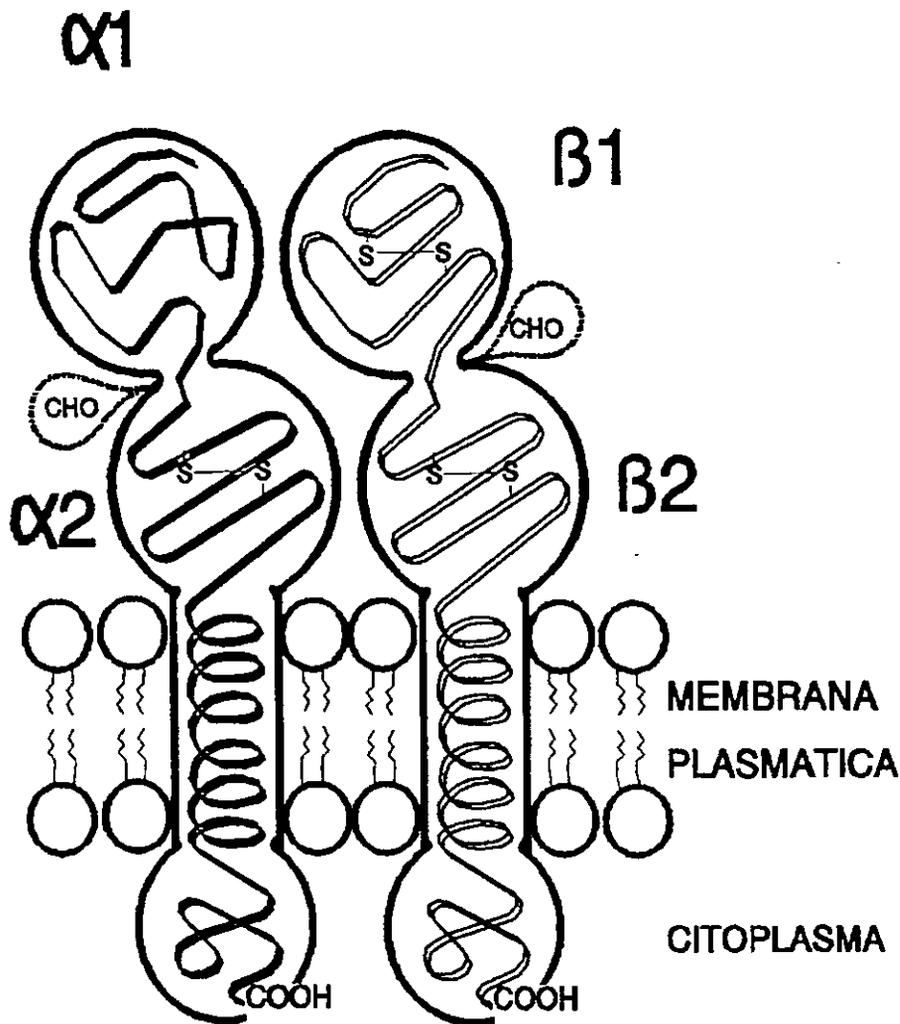


Figura 3.- Estructura esquemática de los antígenos HLA de clase II. Se observan los 4 dominios extracelulares de las cadenas α y β .

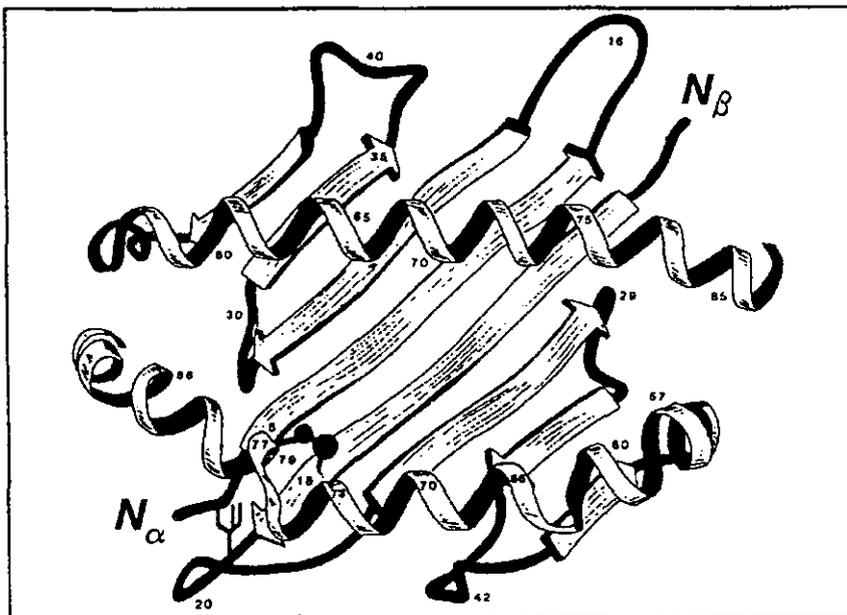


Figura 4.- Estructura tridimensional del antígeno HLA-DR1. Parte distal de la molécula, como se observa su estructura es similar a la de los antígenos HLA de clase I.

1.3. Organización génica del sistema HLA.

Los genes que codifican para los antígenos HLA de clase I, II y III ocupan aproximadamente 2 cM (0.8% del genoma humano)(Figura 5). La causa de la proximidad de estos genes sería debida a la función común de reconocimiento de estructuras extrañas o "no propias" y a que el control de mecanismos específicos de defensa requiere un sistema regulador

finamente ajustado y que sólo podría obtenerse gracias a esta proximidad.

1.3.1. Organización génica de los antígenos HLA de clase I.

Dentro del sistema HLA la región de genes que codifican los antígenos HLA de clase I abarca aproximadamente los 2000 kb más distales al centrómero. Se han descrito alrededor de 20 loci dentro de los cuales existen genes, pseudogenes y fragmentos de genes (Figura 5). Los primeros genes de esta región que se determinaron fueron los que codifican para toda la serie de antígenos detectados serológicamente que se denominan HLA de clase I clásicos y cuya nomenclatura es HLA-A, -B, -C. Existen una serie de genes que se les ha denominado HLA de clase I no clásicos, cuya nomenclatura oficial es HLA-E, -F, -G, -H, -J, -L, -K y otra serie de 7 loci de los cuales 4 están constituidos por pseudogenes (Figura 5).

Organización génica de los antígenos HLA de clase I clásicos. Los genes HLA de clase I que codifican las cadenas α de los antígenos HLA A, B y C constan de un primer exón que codifica un péptido señal y de 7 exones. De éstos, los exones 2 a 5 codifican para los tres dominios extracelulares α_1 , α_2 , α_3 y el dominio hidrofóbico de la región transmembranal. El dominio citoplasmático se codifica por diferentes exones dependiendo del tipo de antígeno. Una característica de los genes HLA de clase I es la homología de secuencias de nucleótidos entre los distintos alelos de la serie HLA-A en su región 3'UT que se diferencia claramente de los alelos de las series HLA-B y -C.

Por otra parte, cabe destacar que los exones 2 y 3 son los más polimórficos, y coinciden con el primero y segundo dominios externos proteicos, el exón 4 que codifica el dominio tercero es el más conservativo dentro de los grandes exones.

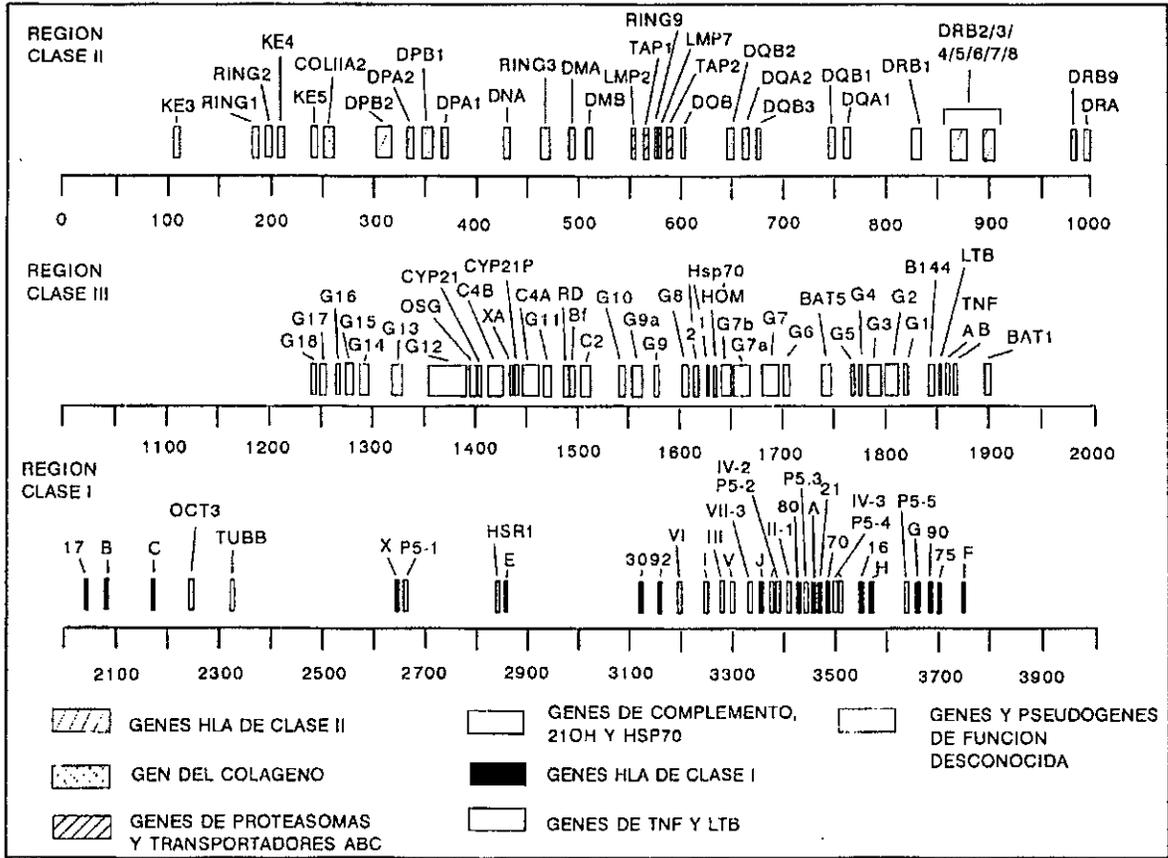


Figura 5.- Mapa genético del Sistema Principal de Histocompatibilidad. Se observan los distintos genes de las diferentes clases de moléculas HLA.

Organización génica de los antígenos HLA de clase I no clásicos. La distribución de intrones/exones de los genes HLA-E, -G, -F, -H y -J es similar a la de los antígenos clásicos de clase I aunque existen determinadas deleciones que producen proteínas de tamaño más pequeño.

Recientemente se ha dado la nomenclatura oficial de HLA-K y -L a otros dos nuevos genes HLA de clase I no clásicos.

1.3.2. Organización génica de los antígenos HLA de clase II.

La región de los genes HLA de clase II (Figura 5) se extiende aproximadamente en las 900 kb más cercanas al centrómero y contiene distintos tipos de genes funcionales, entre ellos los que codifican para los antígenos HLA propiamente dichos y otros de reciente descubrimiento cuya función es el procesamiento de antígenos exógenos y transporte de los péptidos resultantes de esta operación.

Genes que codifican para antígenos HLA de clase II. Los loci que codifican para los antígenos HLA de clase II o región HLA-D contienen 5 subregiones o familias de genes llamados HLA-DR, -DQ, -DP, -DO/DN y DM. Cada una de ellas contiene, al menos, un gen para la cadena pesada (α) y otro para la cadena ligera (β) y se denominan A y B, respectivamente.

Subregión HLA-DR. La subregión DR se compone de 1 gen DRA1 que codifica para la cadena α no polimórfica, 1 gen DRB1 que codifica una cadena β polimórfica que da todas las especificidades DR1-DR18, una serie de genes DRB algunos de los cuales codifican para distintas cadenas β (DRB3, DRB4 y DRB5) y otra serie de pseudogenes DRB, definidos así por tener deleciones o codones de stop (DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 y DRB9), pero no se puede descartar en ellos una posible funcionalidad e incluso expresión proteica. Los genes y pseudogenes DRB se distribuyen de 5 maneras diferentes dependiendo de la especificidad DRB1.

Subregión HLA-DQ. La subregión DQ se compone de cinco genes. DQA1 y DQB1 que codifican para las cadenas β , muy polimórficas, y α , menos polimórficas. DQA2 y DQB2 de los que no hay datos para asegurar que son pseudogenes y cuya expresión, si existe, no se conoce. Más recientemente se ha descrito un quinto gen llamado DQB3 en el que tampoco hay evidencia de su expresión.

Subregión HLA-DP. La subregión DP contiene dos pares de genes A y B. 1 gen A y 1 gen B (A1, B1) que codifican para las correspondientes cadenas α y β funcionales. Los otros dos genes (A2 y B2) parecen ser realmente pseudogenes.

Subregión HLA-DN/DO. Sólo existe un gen para cada loci de esta subregión llamados DNA y DOB. DNA se localiza cercano a DP y DOB cercano a la región DQ. Debido a la distancia entre ambos genes (100 Kb) parece que no se podría formar heterodímeros α/β , pero no hay datos concluyentes al respecto.

Subregión HLA-DM. Los loci de esta subregión, DMA y DMB se han descrito recientemente y se localizan entre los loci DOB y DNA. La comparación de su secuencia con la de los genes de clase I y II los sitúa en una posición intermedia.

Estructura de los genes HLA de clase II. Los genes que codifican las cadenas α de los antígenos HLA de clase II constan de 5 exones que incluyen el péptido líder y la región 5'UT, los exones para los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y un cuarto exón que codifica el péptido conector, la región transmembranal, el dominio citoplasmático y parte de la región 3'UT. Las cadenas β se codifican por un exón para el péptido líder, 2 exones para los dominios proteicos $\beta 1$ y $\beta 2$, un cuarto exón para el péptido conector, el dominio transmembranal y parte del dominio citoplasmático. El resto del dominio citoplasmático se codifica en al menos dos exones más con variaciones dependiendo de la subregión considerada.

1.4. Polimorfismo del sistema HLA.

Una de las características más interesantes del sistema HLA es el gran polimorfismo que posee con la presencia de un gran número de variantes alélicas de cada uno de los loci genéticos. El gran polimorfismo de este sistema ha sido de gran utilidad a nivel inmunológico en la mejora de la supervivencia en los trasplantes de órganos, así como el carácter de determinados alelos como marcadores de enfermedad. Por otra parte gracias a esta gran variabilidad este sistema es de gran ayuda para estudios de medicina legal así como en el estudio de la base genética de las distintas poblaciones mundiales al haber un reparto diferencial de las distintas variantes alélicas.

El polimorfismo de este sistema se detectó originariamente por técnicas llamadas serológicas, que consisten en ensayos de linfocito-toxicidad por anticuerpos mediada por complemento. Con el avance de las técnicas de genética molecular se ha aumentado el polimorfismo detectado por serología. Se describieron por este orden, técnicas de identificación de fragmentos de restricción de longitud polimórfica mediante hibridación con sondas específicas (RFLP) y en segundo lugar secuenciación de exones polimórficos de DNA e hibridación con oligosondas específicas de alelo (oligotipaje) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (*Bodmer, J.G., Marsh, S.G.E., Albert, E. y col., 1995*).

2. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN HLA-ENFERMEDAD.

2.1. Consideraciones generales.

Con la utilización de métodos serológicos, se demostró en 1967 por primera vez una asociación entre antígenos HLA y enfermedad. Este trabajo pionero llevó a una rápida expansión en los estudios de asociación de HLA y diversas enfermedades, sin embargo, estos trabajos se realizaron en grupos de pacientes pobremente definidos, de pequeño número y con controles inadecuados, además solo existía la capacidad de definir pocas especificidades de los antígenos HLA existentes en esa época.

Estos estudios mejoraron, sobre todo en función de tres características fundamentales: 1) los avances de la tecnología (genética molecular) que permitió una definición más precisa de los antígenos HLA, 2) el conocimiento de la estructura tridimensional de las moléculas del MHC y 3) el descubrimiento de un gran número de genes dentro de la región HLA que en desequilibrio de ligamiento con los loci de la misma pudieran ser los genes verdaderos de susceptibilidad a la enfermedad.

Para todo estudio de asociación del sistema HLA y enfermedad hay que tener en cuenta una serie de aspectos como los siguientes:

2.1.1. Definición del grupo de pacientes.

Es necesario establecer unos criterios para la inclusión de los pacientes en cualquier estudio. La prevalencia de la enfermedad a estudio determina el número de pacientes a ser incluido en el estudio. En enfermedades comunes, la muestra de pacientes se puede obtener en un espacio geográfico reducido, sin embargo, en enfermedades raras, no comunes, es necesario recorrer una región geográfica amplia. Por otra parte, también es necesario incluir un número suficiente de pacientes para la utilización de determinados test estadísticos, los cuales son esenciales si se llegan a obtener resultados concluyentes. Como norma general, se deben incluir al menos 50 pacientes en un estudio. Sin embargo, cuando se está estudiando una enfermedad rara, se acepta un número menor de pacientes, particularmente si se encuentra una asociación de determinado antígeno HLA con la enfermedad.

Se pueden realizar estudios en población, aunque los estudios familiares son más efectivos para establecer una asociación del sistema HLA con la enfermedad. Si la patología es claramente heredable, los estudios familiares son esenciales. Si no es así, los estudios familiares pueden establecer el haplotipo asociado a la enfermedad.

Un estudio de asociación HLA-enfermedad en población siempre debe limitarse a un determinado grupo étnico. La frecuencia de los antígenos HLA varía entre las distintas poblaciones humanas y una mezcla étnica introduciría serios errores. Se ha demostrado que un determinado

antígeno HLA se asocia con un determinada enfermedad en una población y con otro en otra población distinta.

2.1.2. Definición del grupo de controles.

El establecimiento de una asociación entre un antígeno HLA y la enfermedad depende de la comparación de los datos obtenidos entre la población sana y la enferma. Normalmente se suele utilizar personal de los laboratorios o del hospital donde se realiza el estudio en la que se puede confirmar el carácter de población sana. También se pueden utilizar los donantes de un banco de sangre, pero podría representar un grupo seleccionado de la población, en orden a evitar transmisiones virales y por lo tanto no llegar a ser un grupo control adecuado. Como se puede deducir, el establecer diferencias en los antígenos HLA y en sus frecuencias génicas dentro de una región geográfica pequeña lleva a la necesidad de obtener un grupo control de esa misma región.

2.2. Cálculos estadísticos.

La consideración de algunos principios estadísticos fundamentales es necesaria en los estudios de asociación HLA y enfermedad. Estos principios darán lugar a la elección del tamaño de la muestra a estudiar, la elección de un estudio basado en poblaciones o en familias y en la selección de los controles.

2.2.1. Estudios en población.

Si los individuos con diferentes antígenos HLA tiene distinta susceptibilidad a padecer la enfermedad, esta diferencia se debería reflejar en la distribución de los distintos antígenos HLA entre la población enferma y la control. El objetivo de los estudios de asociación basado en poblaciones, consiste en la comparación de las frecuencias de los antígenos HLA entre una serie de pacientes y otra de controles sanos. Si la frecuencia de uno o más antígenos HLA se encuentra incrementada en los pacientes respecto a los controles, se puede decir que puede existir una

asociación entre la enfermedad y el sistema HLA. La cuestión principal

TABLA 1

Cálculo de los valores de chi-cuadrado. (Se suele utilizar un valor corregido, chi-cuadrado con la corrección de Yates)

		Enfermos	Pacientes	
Alelo o	+	a	b	$chi^2_{Yates} = \frac{(ad-bc - 0.5N)^2 N}{(a+b)(c+d)N_1 N_2}$
Haplotipo A	-	c	d	
	Total	N_1	N_2	N

radica en saber si esta asociación es estadísticamente significativa o no, para lo cual se realiza una tabla (ver Tabla 1) llamada "tabla de contingencia 2X2".

El concepto de que una asociación sea estadísticamente significativa consiste en estimar la probabilidad de que este patrón de frecuencias de antígeno-positivo y negativo en enfermos y las de antígeno-positivo y negativo en controles pudiera haberse producido solamente al azar. Si la probabilidad de este patrón de secuencias fuera muy baja podríamos concluir que no se produce por azar y que realmente existe la asociación entre el antígeno y la enfermedad. Para realizar este cálculo estadístico se utiliza el test llamado "chi-cuadrado (X^2)" que se basa en la suma de las diferencias existentes entre las frecuencias observadas de los parámetros anteriormente señalados (antígeno-positivo y negativo en pacientes y en controles) con las esperadas (aquellas que teóricamente tendrían si no existiera asociación). Si esta diferencia es grande el test estadístico implica que los datos observados se alejan de los esperados. Para determinar si este valor es "grande" se consultan las tablas de la distribución estadística de chi-cuadrado (ver Tabla 2). Se considera una asociación estadísticamente significativa si la probabilidad de que produzca al azar es menor del 5% lo que corresponde en un grado de libertad a un

valor de chi-cuadrado de 3.841 ($p=0.05$).

TABLA 2

Ejemplo de lo valores tabulados de la distribución de chi-cuadrado.

Grados de libertad	$p=0.05$	$p=0.01$	$p=0.001$
1	3.481	6.635	10.827
2	5.991	9.210	13.815

Medida de la fuerza de asociación. Si existe evidencia de una asociación estadísticamente significativa, se necesita determinar la fuerza de esta asociación. La medida de esta fuerza de asociación es el riesgo a padecer la enfermedad para los individuos que son positivos para ese antígeno comparado con aquellos que son negativos para el mismo. Se dice que una asociación es fuerte si el riesgo entre los portadores es mucho más grande o mucho más pequeño que el riesgo de los no portadores. Este riesgo relativo (RR) viene dado por la fórmula: $RR = ad/bc$ donde a/c expresa la prevalencia de la enfermedad en individuos positivos para ese antígeno y b/d expresa la prevalencia de la enfermedad en individuos con ese antígeno negativo.

Un riesgo relativo cercano a 1 implica que los individuos que portan ese antígeno no tienen aumentado el riesgo a padecer la enfermedad, es decir, no existe una asociación entre el antígeno y la enfermedad. Un riesgo relativo mayor que 1 implica que los individuos que portan el antígeno poseen un elevado riesgo de enfermedad (asociación positiva), mientras que un riesgo relativo de 1 implica que los individuos portadores del antígeno tienen un menor riesgo a padecer la enfermedad que los que no lo llevan (asociación negativa). Cuanto mayor sea el riesgo relativo la asociación será más fuerte.

Interpretación biológica de una asociación entre un antígeno HLA y una enfermedad. La identificación de una asociación estadística entre un antígeno y una enfermedad podría indicar uno de varios fenómenos

biológicos. El primero sería que el antígeno HLA por sí mismo es el responsable de conferir susceptibilidad a la enfermedad. Sin embargo, existe explicación alternativa en la que el locus que fuera susceptible a la enfermedad estuviese dentro de la región HLA pero no formara parte del propio sistema HLA. En este caso, habría un desequilibrio de ligamiento entre el locus "enfermo" y uno o más de los loci HLA, como resultado de una proximidad física entre los loci HLA y el locus responsable de la susceptibilidad a la enfermedad.

2.2.2. *Estudios en familias.*

Si un gen causante de enfermedad no es un gen HLA, pero se encuentra cercano, los estudios familiares suelen ser más convenientes y, con frecuencia, sólo se utilizan para identificar la asociación. El método es útil en genes que se encuentran en desequilibrio de ligamiento, es decir, tienen tendencia a segregarse juntos en familia. Si el desequilibrio de ligamiento es muy fuerte el gen "enfermo" segregará siempre con HLA.

Los estudios familiares se basan en la comparación de la segregación de los antígenos HLA en los hijos enfermos respecto de los sanos. En particular, los hijos afectados con la misma enfermedad deberían mostrar una segregación preferencial de determinados antígenos HLA parentales que los previstos simplemente al azar. La probabilidad teórica de que los hijos compartan dos haplotipos es del 25%, que compartan uno es del 50% y que no compartan ninguno es del 25%. Cualquier evidencia de un exceso respecto a esta distribución es consistente con un ligamiento. Esta comparación entre el grado de compartición de haplotipos esperado y observado se puede testar estadísticamente con la prueba de "chi cuadrado".

3. MECANISMOS DE ASOCIACIÓN DEL SISTEMA HLA-ENFERMEDAD.

El estudio de diversos modelos animales autoinmunes, ha proporcionado mejores conocimientos de los posibles mecanismos de generación y asociación de estas enfermedades al sistema HLA.

Podríamos hacer una clasificación de enfermedades según el

mecanismo de asociación al sistema HLA: autoinmunes, mediadas por inmunocomplejos y no inmunes. Las enfermedades autoinmunes son aquellas cuya patogénesis es resultado de los efectos directos de una respuesta inmune específica (por anticuerpos o células T autorreactivas). Un ejemplo clásico de una enfermedad autoinmune es el síndrome de Goodpasture en el que anticuerpos circulantes dañan la membrana basal de los alvéolos pulmonares y glomérulos renales. Por otra parte, una enfermedad como el lupus eritematoso sistémico (LES) puede afectar a múltiples tejidos por la formación "*in situ*" de inmunocomplejos insolubles, anti-DNA. Los anticuerpos anti-DNA son característicos del LES y su patogenia no es conocida aún. La tercera categoría de enfermedades asociadas al sistema HLA no presenta ningún componente inmune conocido en su patogénesis. La narcolepsia sirve como ejemplo característico, y ha sido bien documentada su fuerte asociación con el antígeno HLA-DR15 (*Juji y col., 1983*). Por otra parte, se ha sugerido un cierto componente autoinmune o la formación de inmunocomplejos asociados a su patogénesis. Algunas de las enfermedades mejor caracterizadas en su asociación al sistema HLA se presentan en la Tabla 3 de acuerdo a los mecanismos involucrados en su patogénesis.

3.1. Modelos experimentales.

Encefalomiелitis alérgica experimental (EAE). Se caracteriza por la infiltración de células mononucleares en el sistema nervioso central (SNC), destruyendo la mielina que recubre las células neuronales produciendo distintos grados de parálisis hasta la muerte. La EAE puede ser inducida por la inyección del autoantígeno de la proteína básica de la mielina (PBM). La ruta de inmunización en la mayoría de los modelos experimentales es intradérmica y requiere el uso de un potente adyuvante como el completo de Freud. Modelos experimentales de esta enfermedad se han llevado a cabo en conejos, ratones y otros animales. La razón del esfuerzo de las investigaciones en caracterizar lo mejor posible esta enfermedad, se debe a la aplicación de los conocimientos a su homóloga en humanos; la esclerosis múltiple (EM).

TABLA 3

Ejemplos de enfermedades asociadas al sistema HLA, de acuerdo a su mecanismo patogénico.

Grupo	Enfermedad	Marcador HLA
Etiología no autoinmune	Deficiencia 21-Hidroxilasa	Delección del gen B de la 21-OH ^a
Etiología autoinmune	Hemocromatosis idiopática	A3
	Espondilitis anquilosante	B27
	Artritis reumatoide	DR4, DR1
	Celiaca	B8 DR3 DQ2
	DMID	DR3,DR4 DQ7/8
	Esclerosis múltiple (en Caucasoides)	DR15 DQ6
	Síndrome de Goodpasture	
Etiología desconocida	Narcolepsia	DR15

^a La delección del gen B de la 21-OH está en desequilibrio de ligamiento con HLA-B47.

En el modelo de EAE de ratón parece claro la existencia de factores genéticos que controlan la susceptibilidad a desarrollar una respuesta autoinmune. El factor genético mejor definido es la posesión de ciertos alelos MHC de clase II H-2A. Dos de estos, llamados H-2A^s y H-2A^u han sido estudiados en detalle, y la especificidad concreta de las células T autoinmunes ha sido determinada (*Zamvil y col., 1988*). Los ratones con el alelo H-2A^s desarrollan una respuesta celular T específica contra una secuencia de la PBM definida por los aminoácidos 89-101 (*Sakai y col., 1988*). Por el contrario, la especificidad de las células T de los ratones que expresan H-2A^u comprende los aminoácidos 1-11 (región N-terminal) del antígeno PBM (*Zamvil y col., 1988*). Estos resultados ilustran la importancia del polimorfismo H-2A en la especificidad de una respuesta autoinmune, indicando que otros tipos H-2A no estarían asociados a la enfermedad pues no presentarían eficientemente estos u otros péptidos relacionados. Alternativamente, la susceptibilidad a la

enfermedad asociada a H-2A^s y H-2A^u puede reflejar la influencia de estos productos MHC sobre la selección del repertorio de células T, o sobre la inducción de células T supresoras.

Un segundo conjunto de observaciones relacionadas con la patogénesis de la EAE centran su atención en el receptor de la célula T (TCR). La gran mayoría de los clones de células T PBM-reactivas obtenidos de ratones y ratas autoinmunes, presentan el mismo segmento V β y uno de los dos segmentos V α (V β 8.2 y V α 2 ó 4)(*Zamvil y col., 1988; Acha-Orbea y col., 1989*). Dada la proporción de células T periféricas de ratón que expresan estos segmentos variables, la frecuencia de células T que poseen estas combinaciones particulares (V β 8.2 y V α 2 ó 4) debería ser de 1 en 1000, asumiendo una asociación al azar de cadenas α - β . Además es sorprendente que en la rata y el ratón, pueda aparecer el mismo receptor en linfocitos T contra la PBM, pues la especificidad de péptidos en ambas especies es diferente y el grado de homología de secuencia en MHC clase II es del 80%. Aunque estas observaciones son difíciles de explicar, sugieren que la selección del repertorio de la célula T esta influenciada por la etiología de la enfermedad.

El tercer conjunto de datos sugiere que las células T supresoras pueden jugar un papel importante en la regulación de la respuesta inmune anti-PBM. La inyección de forma intravenosa del antígeno PBM en animales, antes de su inmunización con el adyuvante completo de Freud, les protegía de la enfermedad. Posteriormente, células T de estos animales conferían protección de la EAE cuando eran inoculados en receptores singénicos sanos (*Arnon., 1981*). Esto ilustra que este tipo de autoinmunidad es susceptible de regulación por células T. El cuidadoso diseño de experimentos en ratones transgénicos puede proporcionarnos, en el futuro, un mejor conocimiento de los mecanismos de susceptibilidad ligados al sistema MHC.

El ratón diabético no obeso. De la misma manera que la EAE sirve de modelo para la esclerosis múltiple, el ratón diabético no obeso (DNO) sirve como modelo experimental de la diabetes mellitus insulino-dependiente humana. La diabetes en estos ratones está caracterizada por una

insulinitis autoinmune con destrucción de las células beta pancreáticas. Al contrario que la EAE, la diabetes en ratones ocurre espontáneamente y coincide con la EAE en que está implicado más de un factor genético de susceptibilidad a la enfermedad. Uno de los genes de susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad en ratones DNO es un único alelo del gen Ab, conocido como Ab^{DNO} (*Acha-Orbea y McDevitt, 1987*). El alelo Ab está acompañado por un gen Aa^d completamente normal. Es de particular interés que la molécula codificada por el gen Ab^{DNO} (Aβ) carece de ácido aspártico (Asp) en la posición 57. En su homólogo humano DQB, la carencia de ácido aspártico parece estar asociada con la susceptibilidad a padecer diabetes mellitus insulino-dependiente (*Todd y col., 1987*). La otra característica dentro de la región génica de clase II en ratones DNO, es un defecto en los genes H-2E, de manera que esta segunda molécula de clase II no es expresada. Hay evidencias para sugerir que la posesión del gen Ab^{DNO} y la carencia de expresión de la molécula H-2E pueden contribuir al desarrollo de la diabetes en estos ratones.

Las investigaciones realizadas no han definido aún los autoantígenos pancreáticos implicados. Por tanto, no es posible obtener clones de células T contra estos antígenos para establecer su especificidad o la variabilidad de su receptor celular (TCR). Los experimentos más informativos en este sentido conllevan la creación de ratones transgénicos que portan el gen H-2A mutado y el normal, y las moléculas H-2E propias. (*Nishimoto y col. 1987*) observaron que proporcionando el gen H-2E a un ratón DNO, se prevenía el desarrollo de insulinitis. Este resultado va en favor de que la carencia de expresión de moléculas H-2E es un factor genético importante para el desarrollo de insulinitis en estos ratones. Estudios posteriores de *Slattery y col. (1990)*, *Nishimoto y col. (1987)* y *Lund y col. (1990)* revelan que la susceptibilidad en ratones DNO puede ser atenuada o eliminada en transgenes H-2A.

La explicación más probable de estos efectos en ratones transgénicos es la alteración del repertorio de células T por la introducción de genes adicionales de clase II en su genoma. El resultado de esta alteración puede dar lugar a delección tímica de células T potencialmente autorreactivas, o seleccionar células T supresoras que prevengan el desarrollo de la enfermedad.

3.2. Teorías de asociación del MHC y enfermedad.

3.2.1. *Mimetismo molecular*

Es conocido que reacciones cruzadas entre antígenos microbianos y autoantígenos pueden dar lugar a una respuesta autoinmune. Dos de los primeros ejemplos en esta clase de mimetismo molecular fueron definidos entre antígenos de *Trypanosoma cruzi* y *Streptococos* y del miocardio, dando lugar a las manifestaciones de la enfermedad de Chagas y fiebre reumática (Williams, 1983). Dos grupos observaron que anticuerpos contra el patógeno intestinal *Klebsiella* reaccionaban con linfocitos de pacientes HLA-B27 positivos que padecían espondilitis anquilosante (Ebringer, 1979; Seagel y col., 1979). Le siguió el hallazgo de que anticuerpos monoclonales dirigidos contra B27 reconocían antígenos expresados por organismos como *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*. Curiosamente estos organismos son los únicos que pueden provocar artritis reactiva en individuos B27 positivos.

Sin embargo, esta hipótesis no es aceptada generalmente. A nivel conceptual no está claro por qué este tipo de reacción cruzada debe dar lugar a una enfermedad que está confinada, en la mayoría de los casos, en las articulaciones. Por otra parte, otros grupos no han conseguido reproducir los mismos resultados en otros pacientes. En otro estudio, mediante anticuerpos específicos, se encontraron epítomos comunes de B27 y *Klebsiella* con igual frecuencia en pacientes y controles (Tsuchiya y col., 1989).

Otro conjunto de moléculas, que han recibido considerable atención en los últimos años por la posibilidad de reacción cruzada con patógenos, son las proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins, HSP). Estas proteínas se mantienen muy conservadas en una gran variedad de organismos, desde las bacterias hasta el hombre. Se ha postulado que la inducción de una respuesta inmune celular contra una proteína HSP de una bacteria o micobacteria podría dar lugar a un reconocimiento de proteínas HSP propias, generando el proceso autoinmune (Kaufman y col., 1991). Hay muchas razones para pensar que la respuesta inicial contra el antígeno

extraño, o la reacción cruzada sobre los autoantígenos, está bajo un control genético de respuesta inmune ligado al sistema HLA.

3.2.2. Moléculas MHC clase I y II como receptores de virus.

El mecanismo por el cual un virus entra en una célula, supone la unión de este a las glicoproteínas de la superficie celular seguido de la fusión de sus membranas. Tales receptores celulares tienen que ser glicoproteínas que se recambien o que conlleven un ligamiento cruzado inducido por el virus después de la endocitosis. Los antígenos HLA responden a estos criterios. Algunas de las moléculas que permiten la entrada del virus en el interior celular son el receptor C3d para el virus Epstein-Barr (*Jonsson y col., 1982*), y la molécula CD4 para el virus VIH-1 (*Dalgleish y col., 1984*). El virus Semliki y el adenovirus tipo 2 se unen a moléculas HLA de clase I (*Helenius y col., 1982; Signas y col., 1982*) y el virus de la lactato deshidrogenasa a moléculas HLA de clase II (*Inada y Mims, 1984*). Es posible que ciertos virus se unan a moléculas HLA específicas, ofreciendo la posibilidad de que algunas moléculas HLA confieran resistencia a la infección de determinados virus. Sin embargo, esto podría dar lugar a una fuerte ventaja selectiva para virus mutantes que escaparían de la restricción alélica. Dado que existe una enorme diferencia en el tiempo de generación entre los virus y los humanos, es difícil ver como glicoproteínas virales y moléculas HLA puedan existir en un balance estable de polimorfismo.

3.3. Importancia de genes no HLA dentro del MHC humano.

Una de las implicaciones más importantes del fuerte desequilibrio de ligamiento que caracteriza la región MHC, es la precaución con la que se debe interpretar una correlación entre un determinado marcador HLA y una enfermedad humana. Muchos genes están presentes dentro de la región MHC junto a aquellos que dan lugar los antígenos HLA. Estos incluyen genes del sistema del complemento que codifican los componentes C2, C4, factor B, factor de necrosis tumoral α y β (TNF- α , - β) y la

proteína de choque térmico 70 (HSP-70). Recientemente se han identificado otros genes dentro de la región de clase II que codifican proteínas transportadoras de péptidos (TAP) y unidades de proteosoma (LMP). Existe la posibilidad de que la verdadera susceptibilidad génica de algunas enfermedades asociadas a HLA resida en genes no HLA. La aparente asociación a HLA puede reflejar que existe un desequilibrio de ligamiento entre variantes alélicas de los genes no HLA y HLA.

El TNF- β es un factor soluble que puede inducir y potenciar la expresión de moléculas de clase II en algunos tipos celulares (*Arenzana-Sciscedos y col., 1988*). Se ha determinado polimorfismo en este locus mediante fragmentos de restricción de longitud variable. Este polimorfismo podría darse en regiones codificantes o en regiones reguladoras, dando lugar a diferencias en la eficiencia de inducción de expresión de moléculas de clase II. Dada la función esencial que las moléculas de clase II ejercen en el sistema inmune, variaciones en los efectos del TNF podrían conllevar el inicio de un proceso autoinmune. En el mismo sentido, la variación alélica del gen que codifica para la HSP-70 podría afectar a la inmunidad celular desencadenando un proceso autoinmune. Recientes estudios sugieren que esta proteína de estrés juega un papel importante en dirigir dentro de la célula al antígeno internalizado. La relevancia de estos y otros genes está siendo caracterizada dentro de la región del sistema principal de histocompatibilidad.

4. HLA Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES.

4.1. Introducción.

Autoinmunidad. La habilidad para discriminar apropiadamente lo propio de lo extraño es crítica para desarrollar un sistema inmune competente, ya que debe responder de manera altamente específica a los antígenos extraños y al mismo tiempo tolerar antígenos inmunogénicos propios. La autoinmunidad describe un proceso en el cual el sistema inmune de un individuo se sensibiliza a los antígenos propios, y da lugar generalmente al desarrollo de un estado patológico. Existen alrededor de 40 enfer-

medades en el hombre de origen autoinmune (*Tiwari y Terasaki, 1985*) que afectan al 5% de la población. Entre estas enfermedades, que pueden evolucionar en cualquier parte del cuerpo, se encuentran la diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM), myasthenia gravis (MG), lupus eritematoso sistémico (LES) y tiroiditis autoinmune. A pesar de su naturaleza aparentemente distinta, se piensa que en todas, la respuesta autoinmune se desarrolla por mecanismos inmunológicos similares.

Las enfermedades autoinmunes humanas pueden ser clasificadas de diversas maneras. Parece existir una distinción fundamental entre enfermedades autoinmunes organo-específicas y las no organo-específicas o multisistémicas. Las primeras se caracterizan por una respuesta inmune dirigida contra un único tejido (proteínas de ese tejido). Los mejores ejemplos están representados por enfermedades endocrinas tales como DMID, tiroiditis, enfermedad de Addison y fallo gonadal primario, en las que se produce una destrucción de un tipo celular determinado. Otras enfermedades, como la EM, parecen ser organo-específicas a pesar de que no ha sido posible identificar el antígeno diana contra el que se desarrolla la respuesta inmune. Las enfermedades autoinmunes multisistémicas parecen estar asociadas a una gran variedad de autoanticuerpos contra moléculas citoplasmáticas y nucleares que participan en la replicación celular. El daño celular puede generarse por distintos mecanismos. En enfermedades organo-específicas actúan células T activadas y anticuerpos con destrucción de células del órgano atacado y pérdida parcial de su función fisiológica normal. Las enfermedades autoinmunes multisistémicas están mediadas también por anticuerpos y células T activadas, encontrándose gran variedad de autoanticuerpos en concentraciones altas.

Asociación entre enfermedades autoinmunes y HLA. La función fisiológica de las moléculas HLA es unir péptidos de pequeño tamaño y presentarlos al receptor de la célula T (TCR; T-cell receptor), situado en su superficie. Moléculas MHC de clase II actúan como elementos de co-reconocimiento, junto con el antígeno, por las células T CD4+, mientras que las moléculas de clase I establecen este co-reconocimiento con las

células T CD8+, fundamentalmente. Además, las moléculas de clase II estimulan reacciones mixtas linfocitarias. Estos hechos nos proporcionan la bases teóricas para una restricción MHC equivalente en el caso de autoantígenos, indicando que los genes que codifican éstas moléculas están implicados en la susceptibilidad a padecer enfermedades autoinmunes. Mientras que los primeros estudios asociaban las moléculas de clase I a diversas de estas patologías, nuevas técnicas de caracterización de los genes de la región MHC demuestran que las moléculas de clase II están, en general, más fuertemente asociadas. Las enfermedades asociadas a moléculas de clase I, particularmente espondilo-artropatías asociadas a HLA-B27 tales como espondilitis anquilosante (EA) y síndrome de Reiter, son mucho menos frecuentes. Este capítulo centrará su análisis en los genes de clase II y su relación con las enfermedades autoinmunes, aunque la EA también será discutida como enfermedad asociada a genes de clase I. En casi todas las enfermedades asociadas a clase II pueden demostrarse fenómenos autoinmunes. Mientras la mayoría de los datos han relacionado la susceptibilidad a enfermedad con alelos individuales, algunos estudios sugieren la posibilidad de que la heterocigosidad incremente el riesgo y existen algunos casos donde la combinación de algunos alelos sobre un haplotipo puede ser importante. Por otra parte, el conocimiento de gran número de secuencias de genes de clase II ha permitido la identificación de sustituciones de nucleótidos que están muy asociados con la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad. Por último, experimentos en ratones demuestran que los genes de clase II pueden actuar por sí solos como factores genéticos de susceptibilidad o resistencia a la enfermedad.

La asociación de determinados productos génicos MHC a la enfermedad ha estado limitada a la caracterización del sistema HLA. En un principio, su determinación se realizaba serológicamente con el uso de anticuerpos policlonales, que permitía detectar considerablemente el polimorfismo de los loci de clase I pero no determinaba fácilmente el polimorfismo de genes de clase II como DQ. Actualmente se dispone de anticuerpos monoclonales específicos y técnicas de genética molecular tales como RFLP, PCR-SSO, PCR-SSP y secuenciación de DNA.

El linfoma de Hodgkin y la leucemia linfoblástica aguda fueron las

primeras enfermedades asociadas al sistema HLA mostrando como antígenos posiblemente implicados HLA-B5, B35, B15 y B18 (Amiel, 1967) y HLA-A2, respectivamente. Posteriormente, fue descubierta la fuerte asociación entre la espondilitis anquilosante y HLA-B27. En la Tabla 4 se muestran las asociaciones más importantes de antígenos HLA de clase I y II con enfermedades autoinmunes. En cada una de ellas hay una evidencia circunstancial de que el sistema inmune reacciona contra determinados autoantígenos. En algunos modelos animales autoinmunes como la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) y la myasthenia gravis alérgica experimental (EAMG), se ha caracterizado el autoantígeno responsable. En la mayoría de las enfermedades autoinmunes humanas los autoantígenos son desconocidos. Algunos de los antígenos asociados mejor conocidos se recogen en la Tabla 5. En muy pocos casos, la evidencia de respuesta inmunológica primaria es muy pequeña o nula y junto a la fuerza de asociación indica que el antígeno HLA podría ser en sí mismo un factor de riesgo en la patogénesis. El ejemplo más notable es el de la narcolepsia, la cual está asociada a HLA-DR2 en el 100% de los casos (Juji y col., 1984). Esto ha permitido especular que los antígenos HLA pueden tener también importantes funciones no inmunes (por ejemplo, pueden servir como antígenos de diferenciación durante la embriogénesis), pero no existen suficientes evidencias que confirmen esta idea.

Genes de clase II: ¿marcadores relacionados o genes de susceptibilidad?

Se describen dos formas de relacionar enfermedad con el sistema HLA. La primera es *asociación*, que es observada como una diferencia en la frecuencia de un particular alelo entre sujetos afectados y controles sanos en estudios de población. El segundo es *desequilibrio de ligamiento*, el cual analiza el patrón de segregación de haplotipos de un número de individuos afectados en una familia respecto al resto de componentes sanos. En el caso de las enfermedades autoinmunes y el sistema HLA, ambas asociaciones se han observado, pero ninguna con la suficiente fuerza sobre la otra para tenerla en cuenta como factor de susceptibilidad absoluto. Mientras que la ausencia de enfermedad en individuos sanos, que portan

un haplotipo asociado a enfermedad, puede justificarse por la carencia del factor medioambiental necesario, la presencia de enfermedad en individuos que carezcan de ese haplotipo no es explicable. Por ejemplo, el 32% de los pacientes Caucasoides con AR no presentan DR4, el 49% de los pacientes con EM no tienen DR2 y el 52% de los que padecen PV (*Pemphigus vulgaris*) no portan DR7 (*Tiwari y Terasaki, 1985*). La debilidad de estas asociaciones es debida en parte a la heterogeneidad de la enfermedad. Un ejemplo de ello sería la AR, presentando en adultos y adolescentes las mismas características clínicas pero distintas formas genéticas. Otra posible explicación de las débiles asociaciones, podría deberse a que la identificación del producto del gen de clase II identificado por antisueros tradicionalmente utilizados no represente el gen de susceptibilidad. En el caso de EM, un posible gen de susceptibilidad podría ser un alelo de otro locus en desequilibrio de ligamiento con DR2 (DQ6). Una propuesta posterior analiza que la susceptibilidad podría estar mediada a través de epítomos de clase II que resultan de la co-expresión de dos o más genes que están generalmente asociados con el haplotipo susceptible de enfermedad, pero también podría encontrarse en otros haplotipos. Finalmente, otra posible explicación podría ser que la susceptibilidad se asocie con una secuencia de aminoácidos que son compartidos por un número de alelos distintos serológicamente.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR; polymerase chain reaction) ha proporcionado el potencial necesario en el desarrollo de técnicas de genética molecular para la caracterización del sistema MHC, haciendo posible la determinación de las secuencias de genes de clase I y II (HLA-DR, -DQ y DP). El análisis de estas secuencias revelan que determinados alelos de clase II no están asociados exclusivamente con enfermedades autoinmunes sino que también están presentes en individuos sanos. Esto va en favor de que la mayoría, si no todas, las enfermedades autoinmunes son poligénicas y que la asociación con los antígenos HLA es sólo uno de los muchos factores implicados en la susceptibilidad a la enfermedad. Todos los datos sugieren que el gen de susceptibilidad es otro gen HLA, o un gen no HLA dentro de la región HLA, que está en fuerte desequilibrio de ligamiento con los genes HLA.

TABLA 4

Antígenos asociados a respuestas inmunes en enfermedades autoinmunes humanas^a.

Enfermedad	Antígeno asociado
Celiaca	α -gliadina
Enfermedad de Hashimoto	Tiroglobulina
Diabetes insulino-dependiente	Descarboxilasa del ac. glutámico
	Receptor de insulina
Esclerosis múltiple	Desconocido
Myasthenia Gravis	Receptor de acetilcolina
Narcolepsia	Mecanismo desconocido
Pénfigo común	Complejo antigénico PeV
Esclerosis sistémica progresiva	DNA topoisomerasa
	RNA polimerasa
Psoriasis común	Desconocido
Artritis reumatoide	Fc de inmunoglobulina
Artritis reumatoide juvenil	Fc de inmunoglobulina
Síndrome Stiff-man	Descarboxilasa del ac. glutámico ^b
Lupus eritematoso sistémico	ds- DNA
Vitíligo	Desconocido

^a Autoanticuerpos descritos en la mayoría de las enfermedades autoinmunes. Sin embargo, las células T autorreactivas pueden ser la anomalía primaria y dominante. ^b Anticuerpos anti-GAD in el síndrome Stiff-man son de mayor afinidad que los vistos en DMID.

Genes no MHC en autoinmunidad. Recientes estudios han demostrado que el TCR está implicado en la susceptibilidad a enfermedad. Asociaciones estadísticas con aloinmunoglobulinas han sido encontradas para muchas enfermedades, pero la fuerza de asociación observada es generalmente menor que con el sistema HLA. El reciente descubrimiento de genes para el transporte intracelular de péptidos (TAP1 y TAP2) y algunos genes que codifican para proteínas de proteosomas pueden estar también involucrados en el aumento de susceptibilidad a padecer enfermedades

autoinmunes.

TABLA 5
Asociaciones HLA-DR predominantes de enfermedades humanas con probables o definitivas patogénesis autoinmunes.

Enfermedad	Antígeno asociado	Riesgo relativo (RR)
Artritis reumatoide	DR4	2-6
	DR1	2-4
Artritis reumatoide juvenil	DR5	3
	DR8	2
Esclerosis sistémica progresiva	DR5	2
Lupus eritematoso sistémico	DR3	2-5
	DR2	2
Diabetes insulino-dependiente	DR3	3-6
	DR4	2-7
Enfermedad de Graves	DR3	4
	DR5 ^a	5-7
Enfermedad de Hashimoto	DR3	3
	DR5	2
Vitíligo	DR4	2
Pénfigo común	DR4	15
	DR6 ^b	5
Psoriasis común	DR7	3-8
Celíaca	DR3 ^{c,d}	12
	DR7	8
Esclerosis múltiple	DR2	2-4
	DR4 ^e	12
	DR6 ^f	5
Myasthenia gravis síndrome Stiff-man	DR3	2-3
	n.d	
Narcolepsia	DR2	130-360
Síndrome de Goodpasture	DR2	14

^a En Japoneses ^b En Judíos no-Ashkenazi ^c RR significativamente mayor en heterocigotos DR3/DR7 ^d puede estar más fuertemente asociada con DP y DQ que con DR ^e En Italianos y Árabes de Jordania ^f En Japoneses n.d No determinado

Factores medioambientales en autoinmunidad. Es generalmente aceptado que las influencias medioambientales pueden ayudar a desencadenar enfermedades autoinmunes. Se ha observado el desarrollo ocasional de DMID posterior a la infección del virus Coxsackie (*Yoon y col., 1979*). Por otra parte, linfocitos de pacientes HLA-B27+ con espondilitis anquilosante, reaccionan con anticuerpos de algunas cepas de Klebsiella (*Grennan y Sanders, 1988*).

Sin embargo, a pesar de los extensos estudios realizados con microorganismos específicos, no se ha podido explicar la etiología de muchas enfermedades autoinmunes.

4.2 Enfermedades autoinmunes.

En esta sección se discute la relación de tres importantes enfermedades autoinmunes con el sistema HLA. La DMID y la AR son las que causan mayor mortalidad, y la EM es la causa más común de disfunción neurológica en población joven. Finalmente, el ejemplo de EA sirve para ilustrar que es improbable un único mecanismo patogénico en la generación de un proceso autoinmune.

4.2.1 Diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID).

La DMID es una enfermedad autoinmune cuyo resultado es la destrucción de células β de los islotes de Langerhans en el páncreas, con la consecuente falta de producción de insulina. Histológicamente, se produce una inflamación por infiltración de gran número de células, linfocitos T y B. Pueden ser detectados anticuerpos anti-células β y anti-insulina incluso antes de la aparición de la diabetes (*Srikanta y col., 1983*). La evidencia de muchas investigaciones sugiere que la DMID es una enfermedad multifactorial, influida por factores medioambientales en individuos genéticamente susceptibles. La infección por virus tales como Coxsackie, rubella, mumps y citomegalovirus precede, en algunos casos, a la aparición de la enfermedad. (*Vague, 1984*). Existe también evidencia de que está determinada en parte genéticamente, aunque el modo de

herencia aún no ha sido establecido. La IDDM tiene una razón de concordancia en gemelos monocigotos de un 30-50%, sustancialmente mayor que el resto de enfermedades autoinmunes. La presencia de genes de susceptibilidad no HLA en la región MHC es una posible explicación, como se ha comentado anteriormente, de la aparición de la enfermedad.

Estudios familiares. El estudio de frecuencias alélicas en familias con enfermos DMID ha revelado una asociación con DR3 y DR4, y un alto riesgo relativo para heterocigotos DR3/DR4. El modo de herencia en estudios familiares no está exento de polémicos resultados, sugiriendo los siguientes mecanismos de aparición: (1) por efecto de un único gen recesivo (*Rubbinstein y col., 1976*), dominante (*Spielman y col., 1979*) o intermedio (*Morton y col., 1983*); (2) por efecto de dos genes, ligados ambos a HLA (*Deschamps y col., 1980*) o un gen HLA y otro no HLA (*Thomson, 1980*); (3) por un efecto de tres genes; o (4) por un modelo epistático en el cual un gen no HLA interacciona con genes HLA (*Suarez y col., 1979*).

Estudios moleculares. Las primeras asociaciones descritas fueron con HLA-B8, -B18 y -B15, pero se encontró posteriormente asociaciones más fuertes con antígenos de clase II DR3 y DR4 (*Tiwari y Terasaki, 1985*). Se asoció la susceptibilidad, en población Caucasoide, a los haplotipos con los antígenos DR4/DQ8, DR3/DQ2, DR1/DQ5 y DR2/DQ5, mientras que DR4/DQ7, DR5/DQ8 y DR2/DQ6 (el más significativo) confieren un carácter protector (*Ilonen y col., 1978; Thomsen y col., 1979*). DR3 y DR4 aparecen asociados con DMID en todas las poblaciones estudiadas, salvo en pacientes Japoneses y Chinos en los que aparece incrementado DR9 (*Aparicio y col., 1988*). Otros haplotipos parecen ser neutros y no conferir riesgo.

El conocimiento de la secuencia de nucleótidos de los genes de clase II DR β , DQ α y DQ β de haplotipos con riesgo positivo, negativo y neutro, llevó a la observación de que la presencia en DQ β de un aminoácido no cargado en la posición 57 podría conferir el riesgo a padecer la enfermedad, mientras que los haplotipos asociados con riesgo

neutro o negativo mostraban en esta posición un aspartato negativamente cargado (Asp-57) (Tabla 6). La sustitución de Asp-57 por Ala-57 provoca la formación de clones T autorreactivos. La importancia del aminoácido 57 de la cadena DQ β radica en que podría formar un puente salino con una arginina en la posición 79 de la cadena de DQ α , además el aminoácido 57 de la cadena de DQ β estaría dirigido hacia el bolsillo de unión del péptido y variaciones en su carga podría dar lugar a "fallos" de unión de los péptidos.

A pesar de las evidencias, un número de observaciones desafían este modelo de susceptibilidad a DMID: 1) ciertos haplotipos Caucasoides, principalmente DR7/DQ2, confieren un riesgo neutro o negativo a pesar de tener un residuo neutro en la posición 57 en DQ β . Sin embargo, otra explicación considera que el riesgo neutro del haplotipo de DR7 con ausencia de Asp-57 está en función de la cadena de DQ α , que al contrario que DQ β , difiere entre los haplotipos DR3/DQ2 y DR7/DQ2; 2) el modelo no puede explicar el incremento del riesgo en individuos DR3/DR4 respecto a individuos DR3/DR3 y DR4/DR4, ya que estos son homocigotos para la ausencia de Asp-57, 3) en un estudio completo de subtipos de DR4 y su asociación a alelos de DQB1, Sheehy y col. (1989) encuentran que la DMID está igualmente asociada a alelos de DRB1 y DQB1, y proponen que la susceptibilidad viene determinada por la interacción entre ciertos alelos de ambos loci. Interesantes estudios realizados en pacientes Japoneses (*Lundin y col., 1989*) revelan que DR4 y DR9 son los antígenos de riesgo positivo. Estos antígenos se encuentran en haplotipos con presencia de Asp-57 en la cadena DQ β y además se encuentran en frecuencias altas tanto en pacientes como en controles. En resumen, aunque hay evidencias a favor del modelo del aminoácido 57 de la cadena de DQ β , la susceptibilidad o resistencia a DMID parece residir en otros mecanismos más complejos que los argumentados en un principio.

4.2.2 Artritis Reumatoide (AR).

La artritis reumatoide es una enfermedad caracterizada por una destrucción erosiva de las articulaciones y una sinovitis crónica. Presenta

una clínica muy heterogénea con varios grados de afección en los tejidos. No existe un único marcador diagnóstico para la AR, pero la mayoría de los pacientes tienen altos títulos de factor reumatoide en sangre; autoanticuerpos que se unen al fragmento Fc de las inmunoglobulinas G (IgG). Su homóloga, la artritis reumatoide juvenil (ARJ), presenta también una clínica muy heterogénea, y ambas pueden ser genéticamente distintas. Como otras enfermedades autoinmunes, la AR tiene un modo de herencia complejo, multifactorial y es probable que la susceptibilidad sea de carácter poligénico.

Los estudios serológicos muestran que el antígeno DR4 presenta la asociación más fuerte en todas las poblaciones estudiadas; Caucasoides, negros Americanos y Africanos, Mexicanos y Japoneses (*Tiwari y Terasaki, 1985*). Los enfermos de ARJ presentan una asociación más fuerte con DR5 y DR8 que con DR4 (*Glass y col., 1980*).

El análisis de secuencias de nucleótidos, al igual que en DMID, proporciona a nivel molecular la posibilidad de encontrar un elemento (común entre los enfermos, y distinto a los sanos) de susceptibilidad ligado a HLA. Al contrario que DMID, el locus de mayor susceptibilidad es DRB1. Los alelos asociados a AR, conservan un motivo que comprende del aminoácido 67 al 75, en la llamada tercera región hipervariable (RHV) de estas secuencias (*Gregersen y col., 1986; Todd y col., 1987*). Por tanto, la susceptibilidad asociada a HLA vendría dada por la presencia de este motivo de secuencia que puede ser compartida por un número determinado de alelos. Si fuera cierta esta hipótesis, los alelos que no comparten este motivo no deben conferir susceptibilidad y los alelos menos comunes que sí lo comparten, deberían conferir susceptibilidad. Ambos casos han resultado ser ciertos (*Wordsworth y col., 1989*). Recientemente se ha descrito que la secuencia de aminoácidos 70-74 (QKRAA) que comparten estos alelos, está también presente en el virus Epstein-Barr (VEB). Es posible que ambos factores deban darse a la vez para desencadenar la respuesta autoinmune a esta enfermedad.

TABLA 6

Relación entre antígenos de DRB1, DQB1 y DQA1, el aminoácido en la posición 57 de la cadena de DQβ1 y el riesgo de padecer DMID.

	DRB1	DQB1	DQβ57	DQA1	Suscep.
Caucasoides	DR1	DQ5	Val	A1	+
	DR2	DQ5	Ser	A1	+
	DR2	DQ6	Asp	A1	-
	DR3	DQ2	Ala	A4	+
	DR4	DQ7	Asp	A3	-
	DR4	DQ8	Ala	A3	+
	DR5	DQ7	Asp	A4	0
	DR6(13)	DQ6	Val	A1	+
	DR6(13)	DQ6	Asp	A1	-
	DR7	DQ2	Ala	A2	0
	DR8	DQ4	Asp	A4	0
	DR9	DQ9	Asp	A3	0
	Negros	DR2	DQ6	Asp	A1
DR3		DQ2	Ala	A4	+
DR4		DQ8	Ala	A3	+
DR6(13)		DQ6	Asp	A1	-
DR7		DQ2	Ala	A3	+
DR7		DQ2	Ala	A2	0
		DQ4			0
	DQ9			0	
Japoneses	DR1	DQ5	Val	A1	+
	DR4	DQ8	Asp	A3	-
	DR4	DQ7	Asp		-
		DQ4			+
		DQ9			+
	DR6	DQ6	Ala	A1	+

4.2.3 *Espondilitis anquilosante (EA).*

La espondilitis anquilosante es una enfermedad inflamatoria y afecta principalmente las uniones de la espina dorsal y la pelvis, aunque otras articulaciones pueden estar también afectadas. La EA difiere del resto de enfermedades autoinmunes previamente discutidas por una serie de factores que incluyen: 1) la fuerza de asociación con HLA; 2) una asociación más fuerte con moléculas de clase I que de clase II; y 3) su relación con agentes infecciosos conocidos.

Asociación a B27

Un estudio realizado en 1973 por *Schlosstein* y colaboradores mostraba que el 97% de los pacientes presentaba B27 frente a sólo el 3% de los controles sanos, estos resultados eran confirmados después en numerosos grupos étnicos (*Tiwari y Terasaki*). Sin embargo, sólo una pequeña proporción de individuos B27 positivos desarrollan la enfermedad, implicando que la presencia de B27 es, en la mayoría de los casos, necesaria pero no suficiente para causar EA. Aunque el antígeno B27 es poco común en Japoneses, la frecuencia de la enfermedad es tan alta como en Caucasoides. La EA es menos frecuente en mujeres que en hombres, aunque la frecuencia de B27 es igual de elevada en ambos sexos (*Levitin y col.*, 1976). La EA está débilmente asociada HLA-Cw1 y Cw2 debido al desequilibrio de ligamiento de ambos loci (*Van den Berg-loonen y col.*, 1977).

Estudios familiares revelan que pueden estar implicados en la susceptibilidad otros genes, puesto que la EA no segrega junto a B27 en muchos casos. Confirma esta idea que la presencia de HLA-B60 incrementa el riesgo de EA, por un factor de tres, en pacientes B27 positivos (*Robinson y col.*, 1989).

Reactividad cruzada entre B27 y Klebsiella.

En 1979 dos grupos independientes observaron que antisueros anti-B27 reaccionaban contra *Klebsiella* y otras enterobacterias, y que anticuerpos anti-*Klebsiella* lisaban linfocitos de enfermos B27-positivos

(*Ebringer., 1979; Geczy y Yap., 1979*). Además, sólo la *Klebsiella* podía ser encontrada en los excrementos de estos pacientes. Esta reactividad cruzada puede ser explicada por el mimetismo molecular existente entre un péptido (QTDRED) encontrado en dos variantes B27 con la *Klebsiella pneumoniae* nitrogenasa (*Chen y col., 1987 ; Schwimbeck y col., 1987*). A pesar de las evidencias, existen observaciones no explicables. En primer lugar, la enfermedad se desarrolla en fluidos sinoviales, mientras que las moléculas de clase I están presentes en variedad de tejidos. En segundo lugar, anticuerpos contra el péptido mencionado han sido encontrados con igual frecuencia en pacientes y controles (*Tsuchiya y col., 1989*).

Es necesario profundizar en el estudio de un posible mecanismo de reacción cruzada, en el que ciertos determinantes antigénicos desencadenen una respuesta inmune asociada a HLA clase I.

5. HLA Y ENFERMEDADES DEL TEJIDO CONECTIVO.

5.1 Introducción.

Los tres grupos de genes situados en la región del sistema principal de histocompatibilidad, son atractivos candidatos como genes de susceptibilidad en el desarrollo de enfermedades del tejido conectivo, algunas de las cuales se piensa que están mediadas por la formación de inmunocomplejos, tales como el lupus eritematoso sistémico (LES). Estudios iniciales establecen que los antígenos HLA-A1, -DR3 y -DR2 están aumentados en pacientes con LES respecto a controles en población Caucasoide. Posteriores estudios mostraron que un determinado haplotipo, HLA-A1, -B8, -DR3 es particularmente común en estos pacientes. Es posible que el gen que confiere la susceptibilidad a la enfermedad se encuentre en este haplotipo. En este sentido, se postula que un alelo del gen C4A pueda ser el responsable.

El objetivo de este capítulo es analizar las aproximaciones que han sido tomadas en cuenta para identificar determinados genes de susceptibilidad a la enfermedad dentro de la región del sistema HLA, cuyos productos (o carencia de ellos) pueden incrementar las oportunidades en

el desarrollo de LES y enfermedades relacionadas. Los argumentos usados pueden ser aplicados generalmente al análisis de asociaciones de polimorfismo de determinados loci con enfermedad. Otras enfermedades consideradas en este capítulo son: el síndrome de Sjögren primario, la polimiositis y la esclerosis sistémica, cada una de las cuales está asociada con la producción de anticuerpos contra antígenos intracelulares. El común denominador de estos autoantígenos es funcional, la mayoría toman parte en los procesos de transcripción de ácidos nucleicos y su traducción a proteínas. Existe una clara evidencia de que los autoanticuerpos que provocan LES causan enfermedad mediante la formación de inmunocomplejos con el autoantígeno relevante.

Proteínas del complemento de la región de clase III

El factor del complemento C4 está codificado por dos genes duplicados en tándem, C4A y C4B, y muestra el mayor grado de polimorfismo de todas las proteínas del complemento. Estos fueron caracterizados inicialmente como grupos sanguíneos Rodgers y Chido y se correlacionaron posteriormente con epítomos localizados sobre C4A y C4B, respectivamente (*O'Neill y col., 1978*).

Las variantes estructurales de C4A y C4B pueden ser detectadas por diferencias en su movilidad electroforética. Incluidas en el polimorfismo de estos genes se encuentran las variantes nulas (C4AQ*0 y C4BQ*0). Hasta el 30% de los individuos Caucasoideos normales pueden presentar un alelo C4 nulo. Aproximadamente el 4% de la población Caucasoide es homocigota para la deficiencia de C4A y el 1% lo es para la deficiencia de C4B. Pueden generarse Aloanticuerpos para estos individuos tras recibir transfusiones sanguíneas.

Las bases moleculares del alelo C4AQ*0, heredado en el común haplotipo MHC Caucasoide HLA-A1, B8, DR3 C4AQ*0, C4B1, C2-1, BfS, residen en la delección del gen C4A (*Carrol y col., 1985; Yu y Campbell, 1987*). Otros haplotipos incluyen tres genes C4, lo que sugiere que en estos casos se ha producido un sobrecruzamiento no homólogo, dando lugar a variación en el número de genes C4. Los dos isotipos de C4

presentan cambios en su funcionalidad; C4A se une mejor a inmunocomplejos, mientras que C4B es más activo hemolíticamente. Estas diferencias se explican por variaciones en los ataques nucleofílicos de los dos isotipos. C4A se une preferentemente a grupos amino (abundantes en proteínas) mientras que C4B se une preferentemente a grupos hidroxilo (predominantes en carbohidratos) (*Isenman y Young, 1984; Law y col., 1984*). Los eritrocitos presentan más carbohidratos que grupos amino, lo que explica la mayor actividad hemolítica de C4B.

Los genes que codifican para C2 y Factor B, probablemente duplicados, se encuentran también en la región MHC. Ambas proteínas presentan polimorfismo, que en el caso de C2 incluye un alelo nulo. Este alelo nulo se encuentra, casi constantemente, dentro del haplotipo Caucasoide HLA-A25, B18, DR2, C4A*4, C4B*2, C2Q*0, BfS (*Hauptmann y col., 1982*). La deficiencia en homocigosis para C2 es la menos común en población Caucasoide y tiene una prevalencia de 1:10000 (*Ruddy y col., 1986*).

5.2 Enfermedades del tejido conectivo.

5.2.1 *Lupus eritematoso sistémico (ES)*.

Deficiencia de complemento en homocigosis y LES. Homocigotos deficientes en C1q y C4 están asociados con una prevalencia de más del 75% y homocigotos en la deficiencia de C2 con un 33% (*Lachmann y Walport, 1987*). Las proteínas del complemento C2 y C4 están codificadas dentro de la región MHC, mientras que C1q está codificada en el cromosoma 1. Alelos nulos de C4 aparecen en distintos haplotipos y, por tanto, parece improbable que los genes MHC sean los responsables de la susceptibilidad a la enfermedad en el contexto de deficiencia de C4 en homocigosis. La deficiencia de C2 ya no puede explicarse de la misma manera, dado que C2 generalmente se hereda en un haplotipo determinado (*Fu y Kunkel, 1975*).

Alelos de C4 nulos y LES. Puesto que C4A y C4B poseen alelos nulos, uno de los dos o ambos loci podrían ser los implicados en la suscep-

tibilidad a la enfermedad. Estudios iniciales en Caucasoides con LES mostraron que había una prevalencia de alelos nulos, principalmente de C4A (Tabla 7), pero también de HLA-DR3 (Fielder y col, 1983).

TABLA 7.
Prevalencia de deficiencia de C4A o C4B en homocigosis en pacientes de diferentes poblaciones con LES.

Deficiencia homocigota de C4A				Deficiencia homocigota de C4B			
Pacientes		Controles		Pacientes		controles	
%	n ^a	%	n	%	n	%	n
14	29	0	42	0	29	0	42
12	41	0	176	5	41	4	176
12	61	0	50	0	51	0	51
2	75	0	76	0	75	0	76
1	35	0	35	-	-	-	-

^a número total de individuos testados.

¿El gen relevante es C4AQ*0 o HLA-DR3? Se realizaron dos estudios para analizar HLA-DR3 y C4AQ*0 como factores genéticos de susceptibilidad. En el primero fueron estudiadas las asociaciones HLA en pacientes con LES de distintos grupos raciales, cuyos haplotipos contenían distintas combinaciones de variantes alotípicas de diferentes productos HLA. El resultado mostraba que la asociación de HLA-DR3 se perdía, mientras que la de C4AQ*0 se mantenía, con la excepción de un estudio realizado por Schur y col. (1990). En el segundo, se seleccionaron pacientes HLA-DR3 negativos y se comprobó que la prevalencia de alelos C4AQ*0 se mantenía elevada, aunque lo hacía sólo junto a C4BQ*0 (Batchelor y col, 1987).

¿Son los alelos C4A los únicos genes MHC implicados en la susceptibilidad a LES ?.

El papel de HLA-DR2 y -DR3. Numerosos estudios han analizado la prevalencia de distintas variantes MHC clase I y clase II en pacientes con LES (Walport y col., 1982; Hartung y col., 1989) (Tabla 8). De estos

estudios en pacientes Caucasoides, se observan dos asociaciones dominantes con el haplotipo HLA-A1, -B8, -DR3, -DQ2 y con HLA-DR2, -DQ1. El aumento de DR3 se debe en la mayoría de los casos a su desequilibrio de ligamiento con el alelo C4AQ*0. Sin embargo, no es así para el caso de HLA-DR2 que no está generalmente asociado con el alelo nulo de C4A, y que aparece como factor de riesgo independiente en algunas poblaciones (*Howard y col., 1986*). Esto sugiere que HLA-DR2, o un producto polimórfico codificado por un gen en fuerte desequilibrio de ligamiento con DR2, puede funcionar como un gen de susceptibilidad a la enfermedad.

Genes TNF y LES. Existen datos que sugieren una relación entre el gen TNF-A (Factor de Necrosis Tumoral α) y LES. Se ha descrito polimorfismo en el gen que codifica para TNF- α , y la variabilidad de su producción por estimulación con mitógenos fue correlacionada con subtipos HLA-DR (*Jacob y col., 1990*). Individuos HLA-DR3 o -DR4 positivos producían gran cantidad de TNF- α , mientras que individuos DR2 positivos presentan una concentración menor. La presencia de niveles anormalmente altos (DR3) o bajos (DR2) de TNF- α podría influir en las manifestaciones clínicas de LES, aunque son necesarios más datos que sustenten esta hipótesis.

¿Existe una producción de autoanticuerpos regulada por genes de respuesta inmune (Ir)?.

Se ha postulado que existe una regulación genética en la expresión de determinados autoanticuerpos. Hay evidencia de que diferentes genes MHC clase II están asociados con el aumento de determinados autoanticuerpos. Por ejemplo, HLA-DR3 con anticuerpos anti-Ro y anti-La (*Bell y Maddison, 1980; Manthorpe y col., 1982*) y HLA-DR4 con anticuerpos anti-RNP (*Genth y col., 1987*). Hay evidencia de que los niveles de anticuerpos anti-Ro y anti-La pueden ser altos en individuos que son heterocigotos para HLA-DQ1/-DQ2 (*Harley y col., 1986; Hamilton y col., 1988*), dando lugar a la posibilidad de que moléculas híbridas DQ (DQ1 α /DQ2 β ó DQ1 β /DQ2 α) puedan ser las causantes de este aumento.

Se ha propuesto que genes de clase II puedan funcionar como genes de respuesta inmune (Ir). Sin embargo, anticuerpos anti-Ro y anti-La son una característica común de LES asociada con la deficiencia en homocigosis para C4, que no muestra ninguna asociación constante con moléculas MHC clase II (Meyer y col., 1985).

TABLA 8
Prevalencia de HLA-DR2 y -DR3 en pacientes LES de diferentes poblaciones.

Referencia	Grupo étnico	Frecuencia de HLA-DR2				Frecuencia de HLA-DR3			
		Pacientes		Controles		Pacientes		controles	
		% ^a	n ^b	%	n	%	n	%	n
1	Caucasiodes ^c	20	40	28	123	43	40	11	123
2	Caucasoides ^d	20	46	28	134	54	46	36	134
3	Caucasoides ^c	46	63	22	63	38	63	25	63
4	Japoneses ^c	51	45	25	36	0	45	0	36
5	Chinos del Sur ^c	62	100	38	100	9	100	8	100
6	Negros ^c	41	37	18	147	62	37	20	117

^a % de individuos positivos. ^b número total de individuos testados. ^c DR determinado por tipaje serológico. ^d DR determinado por tipaje de DNA.

El gran polimorfismo de genes MHC, el número de genes que expresan diferentes moléculas con función diversa, unidos por el desequilibrio de ligamiento, dificulta la identificación de genes implicados en la susceptibilidad a la enfermedad. El más intenso empeño ha sido el dirigido a analizar la estructura, función y asociación de alelos MHC de clase I y II con la susceptibilidad a enfermedad. El análisis de asociaciones HLA con LES y enfermedades relacionadas, ha sugerido la posibilidad de que otros genes dentro de esta región (genes del complemento y TNF-A y -B) jueguen también un papel importante en el aumento de la susceptibilidad a la enfermedad.

5.2.2 *Síndrome de Sjögren primario.*

Existe un alto grado de coincidencia en las manifestaciones clínicas, serológicas e inmunogenéticas entre el síndrome de Sjögren primario y LES. La asociación más fuerte en individuos Caucasoides es con HLA-B8, -DR3, -DR52, a pesar del contraste de un estudio con pacientes Japoneses que muestra una alta prevalencia de HLA-DR53 (*Moriuchi y col., 1986*), molécula expresada en haplotipos que incluyen DR4, DR7 y DR9. La presencia de anticuerpos anti-Ro y anti-La es una de las características serológicas dominantes y otros estudios relatan una gran expresión de estos anticuerpos en heterocigosidad para HLA-DQ1/-DQ2. No ha sido establecida ninguna influencia de productos del complemento C2, C4 y Bf en el síndrome de Sjögren primario.

5.2.3 *Poliomiositis y dermatomiositis.*

Miopatías inflamatorias adultas y juveniles, han sido asociadas en poblaciones Caucasoides con el haplotipo HLA-A1, -B8, -DR3, -C4AQ*0 (*Beham y col., 1978; Hirsch y col., 1981; Friedman y col., 1983; Robb y col., 1988*). No aparece asociación con DR3 en estudios sobre pacientes adultos de raza negra (*Goldstein y col., 1990; Moulds y col., 1990*). La única molécula que permanece aumentada es DR52, producto de un gen clase II (DRB3), encontrada en los haplotipos que llevan DR3, DR5 y DR6 y DR8 (*Goldstein y col., 1990*). Estos genes DRB1 asociados con DR52 comparten una secuencia polimórfica localizada en la primera región hipervariable que constituye parte de la base del bolsillo de las moléculas de clase II donde se unen los péptidos.

5.2.4 *Esclerosis sistémica.*

No existe ninguna asociación consistente que relacione el sistema HLA con esclerosis sistémica y sus variantes. HLA-DR1, -DR3 y -DR5 han sido implicados en estudios de pacientes blancos, mientras que DR2 y DR4 en sujetos Japoneses. El intento de un análisis en cuanto a la clasificación de los pacientes de acuerdo al tipo de enfermedad, sistémica

o limitada, o por anticuerpos anti-centrómero o anti-topoisomerasa I, no ha dado resultados consistentes. De la misma manera, aunque se ha expuesto una asociación con alelos de C4 en Caucasoides (*Briggs y col., 1990*), no ha sido confirmado en otros trabajos.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- (1) ACHA-ORBEA, H., STEINMAN, L. AND MCDEVITT, H. (1989). T cell receptors in murine autoimmune diseases. *Ann. Rev. Immunol.* 7: 371-405.
- (2) AMIEL, J.L. (1967). *Histocompatibility testing 1967* (eds E.S. Curtoni, P.L. Mattiuz and R.M. Tosi), pp. 79-81, Munksgaard, Copenhagen.
- (3) APARICIO, J.M.R., WAKISAKA, A., TOKADA, A. ET AL. (1988). HLA-DQ system and insulin dependent diabetes mellitus in Japanese: does it contribute to the development of IDDM as it does in Caucasians?. *Immunogenetics* 28: 240-246.
- (4) ARNON, R. (1981). Experimental allergic encephalomyelitis-susceptibility and suppresion. *Immunol. Rev.* 55: 5-30.
- (5) BATCHELOR, J.R., FIELDER, A.H., WALPORT, M.J. ET AL. (1987). Family study of the major histocompatibility complex in HLA DR3 negative patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 70: 364-371.
- (6) BELL, D.A. AND MADDISON, P.J. (1980). Serologic subsets in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 23: 1268-1273.
- (7) BJORKMAN, P.J., SAPER, M.A., SAMRAOUI, B. ET AL. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature* 329: 506-512.
- (8) BODMER, J.G., MARSH, S.G.E., ALBERT, E. ET AL. (1995). Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens* 46: 1-18
- (9) BROWN, J.H., JARDETZKY, T.S., GORGA, J.C. ET AL. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364: 33-39.
- (10) CARROLL, M.C., PALSDOTTIR, A., BELT, K.T., ET AL. (1985). Deletion of component C4 and steroid 21-hydroxylase genes in HLA Class III region. *EMBO J.* 4: 2547-2552.
- (11) CHEN, J.H., KONO, D.H., YONG, Z. (1987). A Yersinia pseudotuberculosis protein wich cross-reacts with HLA-B27. *J. Immunol.* 13: 3003-3011.
- (12) DESCHAMPS, I., LESTRADET, H., BONAITI, C. ET AL. (1980). HLA genotype studies in juvenile insulin-dependent diabetes. *Diabetologia.* 19: 189-193.
- (13) EBRINGER, A. (1989). The relationship between Klebsiella infection and ankylosing spondylitis. *Balliere's Clin. Rheumatol.* 3: 321-338.
- (14) FIELDER, A.H.L., WALPORT, M.J., BATCHELOR, J.R. ET AL. (1983). Family study of the major histocompatibility complex in patients with systemic lupus erythematosus: importance of null alleles of C4A and C4B in determining disease

- susceptibility. *Br. Med. J.* 286: 425-428
- (15) FU, S.M. AND KUNKEL, H.G. (1975). Association of the C2 deficiency and the HL-A haplotype 10, W18. *Transplantation* 20: 179-180.
 - (16) GECZY, A.F. AND YAP, J. (1979). HLA-B27, Klebsiella and ankylosing spondylitis. *Lancet* 1: 719-720.
 - (17) GLASS, D., LITVIN, D., WALLACE, K. ET AL. (1980). Early-onset pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis associated with human leukocyte antigen-DRw5, iritis, and antinuclear antibody. *J. Clin. Invest.* 66: 426-429.
 - (18) GREGERSEN, P.K., MORIUCHI, T., KARR, R.W. ET AL. (1986). Polymorphism of HLA-DR β chains in DR4, -DR7, and -9 haplotypes: implications for the mechanisms of allelic variation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83: 9149-9153.
 - (19) GRENNAN, D.M. AND SANDERS, P.A. (1988). *Rheumatoid Arthritis. Bailliere's Clin. Reumathol.* 2: 585-601.
 - (20) HARLEY, J.B., REICHLIN, M., ARNETT, F.C. ET AL. (1986). Gene interaction at HLA-DQ enhances autoantibody production in primary Sjögren's syndrome. *Science* 232: 1145-1147.
 - (21) HAUPTMANN, G., TONGIU, M.M., GOETZ, J. ET AL. (1982). Association of the C2-deficiency gene (C2Q*0) with the C4A*4, C4B*2 genes. *J. Immunogen.* 9: 127-132.
 - (22) HOWARD, P.F., HOCHBERG, M.C., BIAS, W.B. ET AL. (1986). Relationship between C4 null genes, HLA-D region antigens, and genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in Caucasian and black Americans. *Am. J. Med.* 81: 187-193.
 - (23) ILONEN, J., HERVA, E., TIILIKAINEN, A. ET AL. (1978). HLA-Dw2 as a marker of resistance against juvenile diabetes mellitus. *Tissue antigens* 11: 144-146.
 - (24) JACOB, C.O., McDEVITT, H.O. (1988). Tumour necrosis factor- α in murine autoimmune 'lupus' nephritis. *Nature* 331: 356-358.
 - (25) JUJI, T., SATAKE, M., HONDA, Y. ET AL. (1983). HLA antigens in Japanese patients with narcolepsy: all patients were DR2 positive. *Tissue Antigens* 24: 316-319.
 - (26) JUJI, T., SATAKE, M., HONDA, Y. ET AL. (1984). HLA antigens in Japanese patients with narcolepsy. *Tissue Antigens* 24: 316-319.
 - (27) LACHMANN, P.J. AND WALPORT, M.J. (1987). Deficiency of the effector mechanisms of the immune response and autoimmunity. In *Autoimmunity and Autoimmune Disease, Ciba Foundation Symposium, no. 129.* (ed. J. Whelan), pp. 149-171, Wiley, Chichester.
 - (28) LAW, S.K.A., DODDS, A.W. AND PORTER, R.R. (1984). A comparison of the properties of two classes, C4A and C4B, of the complement component C4. *EMBO J.* 3: 1819-1823.
 - (29) LEVITIN, P.M., GOUGH, W.W., AND DAVIS J.S. (1976). HLA-B27 antigen in women with ankylosing spondylitis. *JAMA* 235: 2621-2622.
 - (30) LUND, T., O'REILLY, L., HUTCHINGS., P. ET AL. (1990). Prevention of insulin-

- dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice by transgenes encoding modified I-A β -chain or normal I-E α -chain. *Nature* 345: 727-729.
- (31) LUNDIN, K.E., RONNINGEN, K.S., SPURKLAND, A. ET AL. (1989). HLA-DQ antigens and DQB amino acid 57 of Japanese patients with insulin-dependent diabetes mellitus: detection of a DRw8DQw8 haplotype. *Tissue Antigens* 34: 233-241.
- (32) MEYER, O., HAUPTMANN, G., TAPPEINER, G. ET AL. (1985). Genetic deficiency of C4, C2 or C1q and lupus syndromes association with anti-Ro (SS-A) antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 62: 678-684.
- (33) MORIUCHI, J., ICHIKAWA, Y., TAKAYA, M. ET AL. (1986). Association between HLA and Sjögren's syndrome in Japanese patients. *Arthritis Rheum.* 29: 1518-1521.
- (34) MORTON, N.E., GREEN, A., DUNSWORTH, T ET AL. (1983). Heterozygous expression of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) determinants in the HLA system. *Am. J. Hum. Genet.* 35: 201-213.
- (35) NISHIMOTO, H., KIKURANI, H., YAMAMURA, K. ET AL. (1987). Prevention of autoimmune insulinitis by expression of I-E molecules in NOD mice. *Nature* 328: 432-434.
- (36) O'NEILL, G.J., YANG, S.Y., TEGOLI, J. ET AL. (1978). Chido and Rodgers boold groups are distinct antigenic components of human complement C4. *Nature.* 273: 668-670.
- (37) PLOEGH, H.L., ORR, H.T. AND STROMINGER, J.L. Major histocompatibility antigens in the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. *Cell* 24: 287-292.
- (38) ROBINSON, D.M., VAN DER LINDEN, S.M., KHAN, M.A. ET AL. (1989). HLA-Bw60 increases susceptibility to ankylosig spondylitis in HLA-B27+ patients. *Arthritis Rheum.* 32: 1135-1141.
- (39) RUBINSTEIN, P., SUCIU-FOCA, N., NICHOLSON, J.F. ET AL. The HLA system in the families of patients with juvenile diabetes mellitus. *J. Exp. Med.* 143: 1277-1282.
- (40) RUDDY, S. (1986). Component deficiencies 3. The second component. *Progr. All.* 39: 250-266.
- (41) SAKAI, K., SINHA, A., MITCHELL, D. ET AL. (1988). Involvement of distinct T cell receptors in the autoimmune encephalitogenic response to nested epitopes of myelin basic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8608-8612.
- (42) SCHOLSSTEIN, L., TERASAKI, P.I, BLUESTONE, J. ET AL. (1973). High association of a HLA antigen, w27, with akylosing spondylitis. *N. Engl. J. Med.* 288: 704-706.
- (43) SCHUR, P.H., MARCUS-BAGLEY, D., AWDEH, Z. ET AL. (1990). The effect of ethnicity on major histocompatibility complex complement allotypes and extended haplotypes in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 33: 985-992.
- (44) SCHWIMMBECK, P.L., YU, D.T., AND OLDSTONE, M.B. (1987). Autoantibodies

- to HLA-B27 in the sera HLA-B27 of patients with ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome. Molecular mimicry with *Kleibseilla pneumoniae* as potential mechanism of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 166: 173-181.
- (45) SLATTERY, R., KJER-NIELSEN, L., ALLISON, J. ET AL. (1990). Prevention of diabetes in non-obese diabetic I-A^k transgenic mice. *Nature* 345: 724-727.
- (46) SPIELMAN, R.S., BAKER, L. AND ZMIJEWSKI, C.M. (1979). Inheritance of susceptibility to juvenile onset diabetes. *Prog. Clin. Biol. Res.* 32: 567-585.
- (47) SRIKANTA, S., GANDA, O.P., EISENBARTH, G.S. ET AL. (1983). Islet cell antibodies and beta cell function in monozygotic triplets and twins initially discordant for Type I diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 308: 322-325.
- (48) SUAREZ, B., HODGE, S.E. AND REICH, T. (1979). Is juvenile diabetes determined by a single gene closely linked to HLA?. *Diabetes* 28: 527-532.
- (49) THOMSEN, M., PLATZ, P., CHRISTY, M. ET AL. (1979). HLA-D-associated resistance and susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Transplant. Proc.* 11: 1307-1308.
- (50) THOMSON, G. (1980). A two-locus model for juvenile diabetes. *Ann. Hum. Genet.* 43: 383-398.
- (51) TIWARI, J.L. AND TERASAKI, P.I. (1985). *HLA and disease associations*. Springer Verlag, New York.
- (52) TODD, J.A., BELL, J.I. AND MCDEVITT, H.O. (1987). HLA-DQ gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 329: 599-604.
- (53) TSUCHIYA, N., HUSBY, G. AND WILLIAMS, R.C. (1989). Studies of humoral and cell-mediated immunity to peptides shared by HLA-B27.1 and *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase in ankylosing spondylitis. *Clin. Exp. Immunol.* 76: 354-360.
- (54) VAGUE, P. (1984). *Frontiers in Diabetes*, Vol 4, *Diabetes mellitus: Etiopathogenesis and Metabolic Aspects* (eds F. Belfiore, D.J Galton and G.M. Reaven), pp. 12-25, Karger, Basel.
- (55) VAN DEN BERG-LOONEN, E.M., NIJENHUIS, L.E., ENGELFRIET, C.P. ET AL. (1977). Segregation of HLA haplotypes in 100 families with a myasthenia gravis patient. *J. Immunogenet.* 4: 331-340.
- (56) WILLIAMS, R. (1983). Rheumatic fever and the streptococcus. *Am. J. Med.* 75: 727-730.
- (57) WORDSWORTH, B.P., LANCHBURY, J.S., AND SAKKAS, L.I. (1989). HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10049-10053.
- (58) YOON, J.W., AUSTIN, M., ONODERA, T. ET AL. (1979). Virus-induced diabetes mellitus. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N. Engl. J. Med.* 300: 1173-1179.

- (59) ZAMVIL, S.S., MITCHELL, D.J., POWELL, M.B. ET AL. (1988). Multiple discrete encephalitogenic epitopes of the autoantigen myelin basic protein include a determinant for I-E class II-restricted T cells. *J. Exp. Med.* 168: 1181-1186.

Los linfocitos B en autorreactividad y autoinmunidad

por

SERGIO G. COPÍN, PILAR GÓMEZ, PATRICIA MORALES,
MIGUEL A.R. MARCOS, Y SUSANA MORALES-ALCELAY
Centro de Biología Molecular S.O., CSIC-UAM, Madrid
Instituto Carlos III, Majadahonda, Madrid

ÍNDICE

- 1.- CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTALES DE LA TOLERANCIA INMUNE.
- 2.- DINÁMICA DE LA DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS B.
- 3.- SELECCIÓN DEL REPERTORIO DE ANTICUERPOS.
- 4.- ALTERACIONES DE LOS LINFOCITOS B Y LOS REPERTORIOS DE ANTICUERPOS EN LA PATOGENIA DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES.
- 5.- BIBLIOGRAFÍA.

1. CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTALES DE LA TOLERANCIA INMUNE.

La tolerancia inmune, es decir, la discriminación entre lo propio y lo extraño, presenta varias características fundamentales, en torno a las que deben girar estas líneas. Cualquier fenómeno de tolerancia es antígeno (Ag)-específico, pero ningún aspecto estructural distingue un antígeno del individuo de uno ajeno (a nivel de linfocitos B). La tolerancia no está en los genes, sino que se adquiere naturalmente, se "aprende". Este concepto, revelado por Medawar y cols. condujo a la conclusión de que la tolerancia se puede inducir, y con ello, al desarrollo clínico eficaz de los trasplantes en Medicina (1). En condiciones naturales, la tolerancia a lo propio se establece fundamentalmente en estadios perinatales, de manera que se puede definir un antígeno propio como aquel que fue presentado al sistema al principio de la vida. Esto último implica que la tolerancia mantenida a lo largo de la vida conlleva un componente de memoria de estos eventos

tempranos (2). Como conclusión, se hace evidente que la adquisición de la tolerancia, no impresa en los genes, es un proceso más de desarrollo, y muy en particular, de desarrollo coordinado del sistema linfoide con otros linajes somáticos del individuo. Anomalías en diversos puntos de este desarrollo de linajes celulares subyacen a los diversos procesos clínicos de autoinmunidad.

2. DINÁMICA DE LA DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS B.

Es indudable que las enfermedades autoinmunes (clínicas o experimentales) son procesos T-dependientes. Sin embargo, el compartimento B está indudablemente implicado en muchos de los pasos patogénicos del proceso, y en algunos casos, los autoanticuerpos producidos son claramente un componente efector del daño e.g. miastenia gravis o anemias hemolíticas autoinmunes. La diferenciación B pasa por una fase Ag-independiente a nivel de los precursores de la médula ósea y una fase posterior, Ag-dependiente, que selecciona linfocitos B a la periferia para participar en respuestas inmunes. Tras su activación por contactos antigénicos, el linfocito B maduro se activa, prolifera y se diferencia a célula plasmática, secretora de anticuerpos y a célula de memoria, en el contexto de la reacción del centro germinal (3).

Durante la diferenciación B en la médula ósea, el reordenamiento combinatorial y temporalmente ordenado de los loci V, D y J de la cadena pesada y los V y J de la cadena ligera de las Igs, junto a la adición de nucleótidos no codificados en el genoma por la TdT, la actividad de la exonucleasa, etc. genera el repertorio potencial de Igs del individuo. Los reordenamientos eficaces "señalizan" la inducción de altas tasas de proliferación de precursores, expansión clonal subsecuente, parada de la maquinaria enzimática de reordenamiento ("apagado" de la expresión de RAG-2; 4), y eliminación de una fracción importante de estos precursores por muerte celular programada (ligado a la desaparición de la proteína anti-apoptótica bcl-2) en el estadio de linfocito pre-B tardío o pequeño. Solo una fracción menor de estas células sobreviven probablemente tras contactos con ligandos (pre-antigénicos?) aún no caracterizados (5). Estos procesos se correlacionan con la expresión de un pre-receptor B,

conformado por la cadena pesada de la Ig y los productos de los genes $\lambda 5$ y VpreB. Fundamental para la generación de linfocitos B, la participación del pre-receptor B en proliferación, rescate y/o inducción de muerte y expansión clonal, es objeto de controversia (6). También, recientes experimentos de manipulación genética específica sobre los genes que codifican para diversos factores de transcripción y moléculas de señalización intracelular han evidenciado su requerimiento en la generación y mantenimiento de linfocitos B (7, 8).

Como está bien caracterizado intratímicamente para la generación de linfocitos T, la presencia de un linfocito B maduro en la periferia implica un proceso de selección positiva Ag-dependiente (9), de forma que se puede afirmar que no existen linfocitos B vírgenes o ingenuos ("naive"), como los textos insisten en definir. La dinámica de la población de linfocitos B periféricos está constituida por una fracción mayoritaria de linfocitos B de vida larga y otra, de células de vida corta, es decir, que experimentan una gran recambio. Los encuentros antigénicos ocurren en diferentes puntos de esta secuencia, desde los linfocitos B inmaduros (IgM^+IgD^-) de la médula ósea hasta los centrocitos del centro germinal. Los primeros linfocitos B producidos son exquisitamente sensibles a señales a través del receptor Ig, de manera que el umbral de respuesta es muy inferior al de células IgM^+IgD^+ de la periferia (10). Este hecho subyace en los procesos de selección central del repertorio B. Emigrado a la periferia, el linfocito B está expuesto a nuevos filtros selectivos desencadenados por antígenos. En respuestas T-independientes (sobre todo, ante antígenos con determinantes repetitivos expuestos sobre un esqueleto lineal, e.g., polisacáridos de cápsulas bacterianas), el "cross-linking" de la Ig de membrana parece ser suficiente para la activación, proliferación y diferenciación final. En el curso de la mayor parte de las respuestas, T-dependientes, la unión Ag-Ig de membrana activa el linfocito B, es decir, pasa de fase G0 a G1 del ciclo celular, junto a una serie de cambios en la expresión génica (CD69, IL-2R α). Contactos intercelulares adicionales (e.g. a través de receptores como CD40/CD40L) y/o factores solubles secretados por linfocitos T permiten al linfocito B activado transcurrir por fases G2SM del ciclo celular, es decir, proliferar, experimentar una variable expansión clonal y diferenciarse al estadio efector de célula plas-

mática. A lo largo de estos cambios celulares, tienen lugar nuevos procesos selectivos interclonales y de establecimiento de tolerancia periférica. En la periferia, la activación celular específica está íntimamente ligada a la eliminación de una fracción substancial de estas células, lo que se conoce como AICD ("activation-induced cell death"), debido a la pareja de ligandos Fas/FasL. De nuevo, como a nivel central, parece que el antígeno (sobre todo, presentado en inmunocomplejos Ag-Ac, sobre células foliculares dendríticas -FDC-) rescata los clones de mejor afinidad de la AICD (11, 12).

3. SELECCIÓN DEL REPERTORIO DE ANTICUERPOS.

El establecimiento de tolerancia B en el adulto implica necesariamente procesos de selección de un repertorio potencial de anticuerpos que, salvo algunos condicionantes evolutivos y de desarrollo, se genera estocásticamente. Pero la afirmación inversa es un poco más difícil: no está claro qué filtros selectivos están alterados cuando se produce una reacción autoinmune y cuál es la jerarquía de mecanismos que sostienen la tolerancia inmune. Existen múltiples mecanismos de selección B bien estudiados, como los que se exponen a continuación:

A) Eliminación física de células autorreactivas en la médula ósea (delección clonal). Modelos experimentales de ratones transgénicos con Igs autorreactivas de alta afinidad han demostrado la eliminación selectiva en los órganos primarios (13). Han sido aquí implicados mecanismos de bloqueo de la maduración, muerte celular programada y revisión del receptor ("receptor editing") han sido aquí implicados. La valencia del antígeno (y en particular, su forma soluble o ligado a membranas), la afinidad de la Ig complementaria, la concentración de antígeno, la competición entre antígenos y la modificación de umbrales de activación por varios co-receptores (e.g. PTP1C, CD19, CD45) y/o moléculas señalizadoras son variables relevantes del fenómeno de selección negativa por delección clonal. El interesante mecanismo de "receptor editing" consiste en la revisión de receptores autorreactivos por medio de reordenamientos secundarios sobre nuevos genes V (obviamente, no

deletados anteriormente) hasta obtener una nueva especificidad de Ig no autorreactiva. Esto depende de la nueva expresión de la maquinaria de reordenamiento de DNA (genes RAG) dependiendo del contacto con el antígeno (14).

B) Anergia o inactivación funcional de linfocitos B. El linfocito B autorreactivo no es deletado pero no responde eficazmente al autoantígeno. Se especula que este mecanismo se establece en condiciones de señales menos "intensas" que la delección clonal (menor afinidad, menor concentración de antígeno, etc.), y puede deberse a eliminación de funciones coestimuladoras (e.g. expresión de CD86, que interacciona con CD28 en linfocitos T) o a bloqueo en vías de señalización de proliferación celular (15). Parece que el recambio de estas células anérgicas es mayor al de la población general debido a una vida media acortada.

C) Muerte celular dependiente de activación (AICD). La activación celular en el curso de una respuesta inmune conlleva necesariamente apoptosis, que termina esta respuesta y está probablemente implicada en su control y en el sostenimiento de la tolerancia periférica. AICD depende de interacciones auto/paracrinias a través de la pareja molecular Fas/FasL, que no actúa a nivel de órganos centrales linfopoiéticos. Los linfocitos B autorreactivos expresan Fas tras activación y el contacto con células T, expresando FasL, provocaría su eliminación. Las señales a través de CD40 (receptor fundamental en colaboración T) son altamente inductoras de esta vía mortal en linfocitos B, pero la concurrencia de estímulos a través del receptor específico, Ig, bloquearía la transmisión de esta señal de muerte (16).

D) Control de los números de linfocitos B periféricos. Los compartimentos de linfocitos maduros están construidos sobre el balance de la entrada de nuevas células en el sistema *versus* su salida por utilización y agotamiento por diferenciación, así como sobre las tasas de proliferación *versus* muerte/supervivencia de elementos maduros. Estos números parecen estar regulados exquisitamente, y cambios genéticos específicos conducen a linfo-acumulaciones anómalas y eventos inmunopatológicos. Así, las

delecciones genéticas de las cadenas α (CD25) y β del IL-2R y de CTLA-4, así como la sobre-expresión constitutiva de bcl-2 demuestran la existencia de estos procesos activos de control fisiológico (17-21).

E) Carencia de colaboración T. Durante mucho tiempo, se ha sugerido que la tolerancia debía ocurrir fundamentalmente a nivel T, pues de todos era conocida la existencia de autoanticuerpos en condiciones normales, su aumento en activaciones policlonales sin inducción de enfermedad y las alteraciones T-específicas que generaban autoinmunidad (e.g. timectomías neonatales con autoinmunidad órgano-específica posterior; 22). Es evidente que existe el fenómeno, genéticamente condicionado, de no-respuesta T ante diversos antígenos. Esta falta de respuesta puede ser debida a una particular selección de determinantes antígenos y/o a "agujeros" en el repertorio. Los múltiples pasos moleculares conducentes a la presentación de un repertorio de péptidos por las moléculas del MHC (procesamiento, unión al haplotipo de MHC, competición peptídica, afinidad, etc.) podrían estar alterados en el primer caso y la delección intratímica de TCR de alta afinidad para autoantígenos darían cuenta del segundo.

F) Competición interclonal en el curso de una repuesta inmune en el centro germinal. Los órganos linfoides secundarios están compartimentalizados en microambientes definidos, entre los que resaltan funcionalmente los centros germinales, formados a partir de folículos linfoides, en el curso de respuestas inmunes. Dependiendo de dónde, en qué forma y sobre qué célula presentadora se encuentre el Ag, se genera un proceso competitivo entre los clones B respondedores, con una consiguiente modificación del repertorio de Igs. Linfocitos B autorreactivos, encontrando al antígeno en zonas T peri-foliculares, pueden verse excluidos selectivamente de entrar en el centro germinal, ser atrapados en este área, y sufrir apoptosis (23). Dentro del centro germinal, se generan altas tasas de proliferación en centoblastos, que se diferencian a centrocitots, re-expresan Ig, y mueren salvo que sean rescatados por el antígeno y señales T adicionales (CD40L), lo que les permite evolucionar a células plasmáticas y células de memoria. La deficiencia de linfocitos T específicos para autoantígenos en el centro germinal puede generar una muerte selectiva de

los centrocitos autorreactivos correspondientes (24).

G) Controles activos, dominantes, de la autorreactividad. Una fracción substancial de los repertorios de TCR y de anticuerpos reconocen antígenos propios. Muchos de los mecanimos presentados anteriormente pueden implicarse en una menor o escasa relevancia funcional de estas interacciones autorreactivas. Sin embargo, la existencia de fenómenos activos de control o "supresión" dentro del propio sistema inmune es evidente. En clínica y en sistemas experimentales, la autoinmunidad está intrínsecamente ligada a procesos de inmunodeficiencia. Sirva como ejemplo la inducción de enfermedades órgano-específicas tras la transferencia de poblaciones parciales de linfocitos T (22) o el desarrollo de diabetes mellitus en ratas BB, T-linfopénicas. Aún más concluyente es el experimento de Juan Lafaille et al., en el que la eliminación total del sistema inmune en un fondo genético RAG K.O. permite que un ratón que sólo expresa un TCR anti-proteína básica de la mielina (MBP) desarrolle una encefalomiелitis alérgica, modelo de esclerosis múltiple (25). Un grupo *in crescendo* de enfermedades autoinmunes son tratadas eficazmente con preparaciones de Igs policlonales de múltiples donantes (26, 27).

Las interacciones específicas entre regiones variables (V) de Igs que inevitablemente existen y que han conformado la llamada red idiotípica, pueden jugar un papel relevante en el establecimiento y control dinámico de los repertorios inmunes, y con ello, en el fenómeno de tolerancia a lo propio (28). Los anticuerpos naturales del individuo parecen no reconocer por igual todos los determinantes antígenos propios, sino que se establece una jerarquía de "intereses" en lo que se ha denominado el "inmúnculo", de evidentes consecuencias funcionales para la tolerancia y la respuesta inmune: Los anticuerpos del suero (representantes de las células plasmáticas naturalmente activadas) se focalizan y reconocen preferencialmente unos determinantes autoantigénicos y no otros (29). Dentro de los repertorios de TCR, existe también un mundo de determinantes (péptidos) propios que es críptico y/o subdominante, que no es normalmente "visto" por los linfocitos T, y que, en caso contrario, puede desencadenar un proceso autoinmune (30). La tolerancia se puede inducir por medio de respuestas a componentes propios del sistema, como lo

demuestran los linfocitos T anticlonotípicos que inhiben autoinmunidad, de I.R. Cohen, o la eficacia de transfusiones repetidas en posteriores receptores de injertos de riñón ("vacunas negativas").

Por otra parte, esta autorreactividad está selectivamente incrementada a nivel molecular en estadios tempranos de la ontogenia, precisamente, en aquellos donde, fisiológicamente, la tolerancia se establece en su mayor parte. Más de un tercio de todos los anticuerpos de estadios postnatales reconocen específicamente otros anticuerpos del mismo individuo, muchos son multirreactivos y se ha demostrado su valor funcional, en cuanto a su potencialidad de modificar respuestas inmunes relacionadas a través de redes de interacciones V-V (31, 32). Esta fracción autorreactiva del sistema disminuye relativamente a lo largo de la vida, pero persiste en núcleos funcionales del sistema (blastos activados, linfocitos B-1, etc.) y podría representar el vehículo celular de la memoria de la tolerancia neonatal, que exponíamos al introducir este trabajo.

4.- ALTERACIONES DE LOS LINFOCITOS B Y LOS REPERTORIOS DE ANTICUERPOS EN LA PATOGENIA DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES.

Las enfermedades autoinmunes son procesos multigénicos en su mayor parte. Este hecho sugiere que deben concurrir varias alteraciones patogénicas para llegar a producirse un daño inmunopatológico. Es también interesante considerar que la tolerancia a lo propio es un proceso robusto y nada fácil de desencadenar por cambios puntuales. También y a pesar de las esperanzas puestas en los desarrollos de la terapia génica, no parece evidente a corto plazo su eficacia en este tipo de enfermedades, donde los productos de varios genes actúan de forma combinatorial y cuantitativa. Existen modelos experimentales espontáneos e inducidos. Los primeros mimetizan fielmente los procesos clínicos, pero su patogenia es multifactorial. Los segundos, ya sea por cambios a nivel del fenotipo o por manipulación genética selectiva, son perfectamente desentrañables en cuanto a mecanismos implicados, pero suelen ser "copias" deficientes de las enfermedades humanas que intentamos entender. A pesar de estas dificultades, es indudable el valor de estas aproximaciones, y cada semana, emergen nuevas informaciones sobre los cambios moleculares finos que

conducen a autoinmunidad. Vamos a analizar someramente algunas de las alteraciones en los siete procesos definidos en el párrafo anterior que desembocan en autoinmunidad, desde la perspectiva de linfocitos B.

No es fácil producir autoinmunidad como consecuencia de alteraciones de la selección clonal de especificidades autorreactivas a nivel central. Animales con procesos de autoinmunidad espontánea (e.g. NZB, MRL-lpr) presentan una selección clonal perfectamente eficaz (33, 34). Animales transgénicos para autoanticuerpos "patógenos" de alta afinidad (e.g. anti-dsDNA obtenidos de ratones MRL) son perfectamente normales (35). Un modelo de ratones transgénicos para un anticuerpo anti-eritrocitos es el único descrito en que, en ciertas condiciones, se produce una anemia hemolítica autoinmune (36). Aunque no es descartable su participación en algunos procesos (citopenias hematológicas autoinmunes), no parece que la disrupción de la selección clonal de linfocitos B autorreactivos sea un mecanismo principal de autoinmunidad.

Alteraciones en los umbrales de activación y respuesta de diversos estadios celulares B pueden contribuir a una reactividad exacerbada y daño somático: Los ratones Motheaten presentan una mutación en el gen que codifica para la fosfatasa citoplásmica PTP1C. Esta enzima es responsable de la inhibición de señales a través de la Ig de membrana, de manera que en su defecto, señales "poco intensas" pueden hiperactivar la célula (37). Los Motheaten desarrollan autoinmunidad generalizada, una hiperproliferación de linfocitos B-1, perinatales, y un alto número de células plasmáticas. CD19 es otra molécula de linfocitos B que puede tener un papel similar de "ajustar" los umbrales de respuesta B, pero su eliminación selectiva no tiene los mismos efectos que PTP1C (38). No existen defectos similares descritos en humanos, aunque no son descartables.

Activación, proliferación y muerte están ligadas en la respuesta funcional de los linfocitos B maduros. Cambios en el proceso normal de AICD contribuyen al proceso de autoinmunidad generalizada y (sobre todo) de linfoproliferación presente en los ratones lpr y gld. Ratones MRL/lpr presentan una mutación en el gen que codifica para el receptor Fas, y la situación complementaria se manifiesta en la cepa gld, con una mutación en el gen del ligando (FasL) (39, 40). Ello genera una linfoproliferación fundamentalmente de linfocitos T y defectos intrínsecos a

células B, que contribuyen a una enfermedad que aboca al fallo renal por depósito de inmunocomplejos, y muerte temprana. También, determinadas sublíneas de ratones transgénicos para bcl-2 (gen inhibidor del proceso de muerte celular programada), aparte de linfoacumulaciones excesivas en la periferia y otros defectos en respuestas inmunes, presentan un patrón de daños autoinmunes (21). Todos estos mecanismos participan a nivel periférico, no de selección central. Y además, más que un elemento determinante, se pueden considerar un cofactor patogénico en autoinmunidad.

Posiblemente en relación con el apartado anterior, una interesante serie de manipulaciones genéticas específicas han conducido recientemente a notables disrupciones de la tolerancia a lo propio. La vía de IL-2/IL-2R ha sido clásicamente considerada un componente fundamental de la activación y funcionalidad de linfocitos T. Sorprendentemente, la eliminación selectiva de varios de sus elementos ha conducido a resultados paradójicos y a autoinmunidad. Ratones genéticamente deficientes para IL-2 desarrollan enfermedad inflamatorias intestinales de índole inmunopatológica (41). La eliminación de la cadena β del IL-2R también conduce a la aparición de datos clínicos de autoinmunidad (18). Y, finalmente, la deleción genética de la cadena α (Tac) del IL-2R da lugar a animales en los que los números de linfocitos periféricos aumentan fuera de control y a enfermedad inflamatoria intestinal y anemia autoinmunes (17). CTLA-4 es otro receptor relevante en el control de la activación T, y ratones negativos para la expresión de esta molécula padecen procesos linfoproliferativos, infiltrados inflamatorios tisulares y muerte precoz (19, 20). Los controles del tamaño total y los números celulares de los compartimentos linfoides participan indudablemente en el estado de autorreactividad fisiológica y tolerancia, como se desprende de estos elegantes experimentos. Habrá que elucidar si ocurren alteraciones similares en clínica humana.

Una cuestión central de la biología del desarrollo radica en el juego entre proliferación/diferenciación (divisiones simétricas y asimétricas de una célula) y en el caso de linfocitos B, el balance de activación y expansión clonal *versus* muerte y/o evolución a célula plasmática, secretora de anticuerpos. En este paso crítico, también se debe considerar

el mantenimiento de tolerancia. Lyn es un miembro de la familia Src de moléculas de señalización intracelular, de expresión selectiva en linfocitos B. Su eliminación por manipulación genética reduce la potencialidad proliferativa de las células, pero, sorprendentemente, los linfocitos B maduros aumentan sus tasas de diferenciación final, con una producción incrementada de autoanticuerpos. Como consecuencia, se produce una glomerulonefritis por inmunocomplejos IgG, típica del lupus eritematoso sistémico, en clínica humana (42, 43). Como antes habíamos expuesto para los moduladores de los umbrales de respuesta (PTP1C, CD19), la función de moléculas vehiculadoras dentro de la célula de estas señales debe ser finamente regulada para no desembocar en un proceso patológico.

Finalmente, el papel de mecanismos de tolerancia activa, dominante, dentro del sistema, se ha puesto de manifiesto en innumerables condiciones. Su índole intercelular y el hecho de que en ellos participen múltiples componentes celulares y moleculares, hace obviamente más difícil su análisis, como en los casos anteriormente descritos. Ya mencionamos el caso de los ratones anti-MBP en el fondo genético RAG K.O., desprovisto de cualquier componente endógeno (25), y las ratas diabéticas BB. Animales en los que se elimina todo el repertorio de linfocitos T $\alpha\beta^+$ desarrollan hiperinmunoglobulinemia y autoinmunidad generalizada, probablemente por la liberación de control de linfocitos T $\gamma\delta^+$, cooperando anómalamente, con linfocitos B (44). Ratones negativos para moléculas de MHC de clase I (por delección genética de $\beta 2$ -microglobulina) y que, como consecuencia, reducen a mínimos su población de linfocitos T CD8, desarrollan a lo largo de su vida diabetes mellitus tipo I, autoinmune. Está bien contrastado el hecho de que la autoinmunidad se desarrolla mejor en ambientes "limpios", y que una menor activación global del sistema por repetidos contactos antigénicos, favorece, por ejemplo, la aparición y empeoramiento de diabetes mellitus en las colonias de ratones NOD. Está directamente ligado a este factor o no, el hecho es que las enfermedades autoinmunes están claramente incrementándose en sociedades avanzadas y con mejores condiciones higiénicas y sanitarias. La timectomía neonatal (al 3^{er} día de vida) y transferencias adoptivas de poblaciones linfocitarias selectivas alteran los balances de componentes autoagresivos y reguladores y desembocan en procesos autoinmunes (22).

No sabemos cuántas piezas más nos faltan en el "puzzle" de la patogenicidad autoinmune. Y no sabemos cuáles son las piezas específicamente alteradas en una esclerodermia o en una tiroiditis. Ignoramos, dentro de la combinatorial cuantitativa de co-factores participantes en cada caso de enfermedad autoinmune, cuál es su jerarquía funcional, y cuáles son meros epifenómenos. Sabemos muy poco de la dinámica de células, moléculas y expresión genética a lo largo de la variable tiempo (y la mayor parte de enfermedades autoinmunes tienen un curso cíclico). Pero los modelos experimentales nos están proporcionando una información valiosísima a marchas forzadas. El posible papel de muchos de los factores analizados líneas arriba debe ser investigado en la clínica. Es decir, sabemos, mucho mejor que hace cinco o diez años dónde dirigir nuestros esfuerzos. Esperemos que, como en muchos otros procesos patológicos de base inmunológica, podamos empezar a imaginar y desarrollar aproximaciones terapéuticas más selectivas e inocuas que la mera inmunosupresión generalizada actual.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BILLINGHAM, R.E., BRENT, L., AND MEDAWAR, P.B. (1953) Actively acquired tolerance to foreign cells. *Nature* 172, 603-606.
- (2) COUTINHO, A., COUTINHO, G., GRANDIEN, A., MARCOS, M.A.R., AND BANDEIRA, A. (1992) Some reasons why deletion and anergy do not satisfactorily account for natural tolerance. *Res. Immunol.* 143, 345-354.
- (3) MŠLLER, G., ed. (1994) B cell differentiation. *IMMUNOL. REV.* 137, 5-229.
- (4) LIN, W.C., AND DESIDERIO, S. (1995) V(D)J recombination and the cell cycle. *Immunol. Today* 16, 279-289.
- (5) MERINO, R., DING, L., VEIS, D.J., KORSMEYER, S.J., AND NÚÑEZ, G. (1994) Developmental regulation of the Bcl-2 protein and susceptibility to cell death in B lymphocytes. *EMBO J.* 13, 683-691.
- (6) MELCHERS, F., HAASNER, D., GRAWUNDER, U., KALBERER, C., KARASUYAMA, H., WINKLER, T., AND ROLINK, A.G. (1994) Role of IgH and L chains and of surrogate H and L chains in the development of cells of the B lymphocyte lineage. *Ann. Rev. Immunol.* 12, 209-226.
- (7) DESIDERIO, S. (1995) Transcription factors controlling B-cell development. *Curr. Biol.* 5, 605-608.
- (8) DORSHKIND, K. (1994) Transcriptional control points during lymphopoiesis. *Cell* 79, 751-753. Y artículos acompañantes en el número.

- (9) GU, H., TARLINTON, D., MÿLLER, W., AND RAJEWSKY, K. (1991) Most peripheral B cells are ligand selected. *J. Exp. Med.* 173, 1357-1371.
- (10) RAFF, M.C., OWEN, J.J.T., COOPER, M.D., LAWTON, A.R., MEGSON, M., AND GATHINGS, W.E. (1975) Differences in susceptibility of mature and immature mouse B lymphocytes to anti-immunoglobulin-induced immunoglobulin suppression in vitro. *J. Exp. Med.* 142, 1052-1064.
- (11) GOODNOW, C.C., CYSTER, J.G., HARTLEY, S.B., BELL, S.E., COOKE, M.P., HEALY, J.I., AKKARAJU, S., RATHMELL, J.C., POGUE, S.L., AND SHOKAT, K.P. (1995) Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development. *Adv. Immunol.* 59, 279-368.
- (12) RATHMELL, R.C., AND GOODNOW, C.C. (1995) The Fas track. *Curr. Biol.* 5, 1218-1221.
- (13) NEMAZEE, D.A., AND BURKI, D. (1989) Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody gene. *NATURE* 337, 562-566.
- (14) CHEN, C., NAGY, Z., PRAK, E.L., AND WEIGERT, M. (1995) Immunoglobulin heavy chain gene replacement. *Immunity* 3, 747-755.
- (15) GOODNOW, C.C., CRSOBIE, J., ADELSTEIN, S., LAVOIE, T.B., SMITH-GILL, S.J., BRINK, R.A., PRITCHARD-BRISCOE, H., WOTHERSPOON, J.S., LABLAY, R.H., RAPHAEL, K., TRENT, R.J., AND BASTEN, A. (1988) Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334, 676-682.
- (16) NAGATA, S., AND GOLDSTEIN, P. (1995) The Fas death factor. *SCIENCE* 267, 1449-1456.
- (17) WILLERFORD, D.M., CHEN, J., FERRY, J.A., DAVIDSON, L., MA, A., AND ALT, F.W. (1995) Interleukin-2 receptor α chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3, 521-530.
- (18) SUZUKI, H., KYNDIG, T.M., FURLONGER, C., WAKEHAM, A., TIMMS, E., MATSUYAMA, T., SCHMITS, R., SIMARD, J.J.L., OHASHI, P.S., GRIESSER, H., TANIGUCHI, T., PAIGE, C.J., AND MAK, T.W. (1995) Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor β . *Science* 268, 1472-1476.
- (19) WATERHOUSE, P., PENINGER, J.M., TIMMS, E., WAKEHAM, A., STRAHINIAN, A., LEE, K.P., THOMPSON, C.B., GRIESSER, H., AND MAK, T.W. (1995) Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. *Science* 270, 985-988.
- (20) TIVOL, E.A., BORRIELLO, F., SCHWEITZER, A.N., LYNCH, W.P., BLUESTONE, J.A., AND SHARPE, A.H. (1995) Loss of CTL-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, 541-547.
- (21) STRASSER, A., WHITTINGHAM, S., VAUX, D.L., BATH, M.L., ADAMS, J.M., CORY, S., AND HARRIS, A.W. (1991) Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8661-8665.
- (22) SAKAGUCHI, S., TAKAHASHI, T., AND NISHIZUKA, Y. (1982) Study on the cellular

- event *sin* postthymectomy autoimmune oophoritis.-II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J. Exp. Med.* 156, 1577-1587.
- (23) SHOKAT, K.M., AND GOODNOW, C.C. (1995) Antigen-induced B cell death and elimination during germinal center immune responses. *Nature* 375, 334-339.
- (24) MACLENNAN, I.C.M. (1994) Germinal centers. *Ann. Rev. Immunol.* 12, 117-140.
- (25) LAFAILLE, J.J., NAGASHIMA, M., KATSUKI, M., AND TONEGAWA, S. (1994) High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell* 78, 399-408.
- (26) SUNDBLAD, A., MARCOS, M.A.R., MALANCHERE, E., CASTRO, A., HAURY, M., HUETZ, F., NOBREGA, A., FREITAS, A., AND COUTINHO, A. (1994) Observation on the mode of action of normal immunoglobulin at high doses. *Immunol. Rev.* 139, 125-158.
- (27) DWYER, J. (1992) Manipulating the immune system with immune globulin. *N.E.J.M.* 326, 107-112.
- (28) JERNE, N.K. (1974) Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol.* 125C, 373-389.
- (29) COHEN, I.R. (1992) The cognitive principle challenges clonal selection. *Immunol. Today* 13, 441-444.
- (30) SERCARZ, E.E., LEHMANN, P.V., ANETANI, A., BENICHO, G., MILLER, A., AND MOUDGIL, K. (1993) Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Ann. Rev. Immunol.* 11, 729-766.
- (31) KEARNEY, J.F., AND VAKIL, M. (1986) Idiotype-directed interactions during ontogeny play a major role in the establishment of the adult B cell repertoire. *Immunol. Rev.* 94, 39-50.
- (32) HOLMBERG, D., FREITAS, A.A., PORTNO*, D., JACQUEMART, F., AVRAMEAS, S., AND COUTINHO, A. (1986) Antibody repertoires of normal Balb/c mice: B lymphocyte populations defined by state of activation. *Immunol. Rev.* 93, 147-165.
- (33) KOTZIN, B.L., KAPPLER, J.W., MARRACK, P.C., AND HERRON, L.R. (1989) T cell tolerance to self antigens in New Zealand hybrid mice with lupus-like disease. *J. Immunol.* 143,89-94.
- (34) RATHMELL, J.C., AND GOODNOW, C.C. (1994) Effects of the *lpr* mutation on elimination and inactivation of self-reactive B cells. *J. Immunol.* 153, 2831-2842.
- (35) ILIEV, A., SPATZ, L., RAY, S., AND DIAMOND, B. (1994) Lack of allelic exclusion permits autoreactive B cells to escape deletion. *J. Immunol.* 153, 3551-3556.
- (36) OKAMOTO, M., MURAKAMI, M., SHIMIZY, A., OZAKI, S., TSUBATA, T., KUMAGAI, S., AND HONJO, T. (1992) A transgenic model of autoimmune hemolytic anemia. *J. Exp. Med.* 175, 71-79.
- (37) SHULTZ, L.D., SCHWEITZER, P.A., RAJAN, T.V., YI, T., IHLE, J.N., MATTHEWS, R.J., THOMAS, M.L., AND BEIER, D.R. (1993) Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell* 73, 1445-1454.

- (38) ENGEL, P., ZHOU, L.J., ORD, D.C., SATO, S., KOLLER, B., AND TEDDER, T.F. (1995) Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity* 3, 39-50.
- (39) WATANABE-FUKUNAGA, R., BRANNAN, C.I., COPELAND, N.G., JENKINS, N.A., AND NAGATA, S. (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-317.
- (40) TAKAHASHI, T., TANAKA, M., BRANNAN, C.I., JENKINS, N.A., COPELAND, N.G., SUDA, T., AND NAGATA, S. (1994) Generalized lymphoproliferative disease in mice caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76, 969-976.
- (41) HORAK, I., LŠHLER, J., MA, A., AND SMITH, K.A. (1995) Interleukin-2 deficient mice: A new model to study autoimmunity and self-tolerance. *Immunol. Rev.* 148.
- (42) HIBBS, M.L., TARLINTON, D.M., ARMES, J., GRAIL, D., HODGSON, G., MAGLITTO, R., STACKER, S.A., AND DUNN, A.R. (1995) Multiple defects in the immune system of *Lyn*-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell* 83, 301-311.
- (43) NISHIZUMI, H., TANIUCHI, I., YAMANASHI, Y., KITAMURA, D., ILIC, D., MORI, S., WATANABE, T., AND YAMAMOTO, T. (1995) Impaired proliferation of peripheral B cells and indication of autoimmune disease in *lyn*-deficient mice. *Immunity* 3, 549-560.
- (44) WEN, L., ROBERTS, S.J., VINEY, J.L., WONG, F.S., MALLICK, C., FINDLY, R.C., PENG, Q., CRAFT, J.E., OWEN, M.J., AND HAYDAY, A.C. (1994) Immunoglobulin synthesis and generalized autoimmunity in mice congenitally deficient in $\alpha\beta$ (+) T cells. *Nature* 369, 654-658.

Linfocitos T Autorreactivos

Por

JOSÉ MARÍA ROJO

*Departamento de Inmunología.- Centro de Investigaciones Biológicas,
C.S.I.C.- Velázquez, 144.- 28006 Madrid.*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.
2. MECANISMOS DE TOLERANCIA FRENTE A COMPONENTES PROPIOS.
3. DIFERENCIAS CUANTITATIVAS EN LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T.
4. PEQUEÑOS CAMBIOS CON GRANDES CONSECUENCIAS: DIFERENCIAS CUALITATIVAS EN LOS LIGANDOS DEL TCR.
5. ¿EL CO-RECEPTOR MARCA LA DIFERENCIA?.
6. LINFOCITOS T AUTORREACTIVOS EN ÓRGANOS LINFOIDES PERIFÉRICOS.
7. ¿POR QUÉ NO SON ACTIVADOS LOS LINFOCITOS PERIFÉRICOS AUTORREACTIVOS?.
8. DELECIÓN Y ANERGIA EN LINFOCITOS T PERIFÉRICOS.
9. ROTURA DE LA TOLERANCIA: PAPEL DE LOS AGENTES INFECCIOSOS.
10. ¿ES POSIBLE LA VUELTA ATRÁS?: AUTORREACTIVIDAD EN LINFOCITOS "NO AUTORREACTIVOS".
11. RECAPITULACIÓN.
12. BIBLIOGRAFÍA.

ABREVIATURAS:

- Ag: Antígeno.
EAE: Encefalomiелitis Alérgica Experimental.
GAD: "Glutamic Acid Descarboxylase", descarboxilasa del ácido Glutámico.
HSP: "Heat Shock Protein", proteína de choque térmico.
LCMV: "Lymphocytic Choriomeningitis Murine Virus", virus de la coriomeningitis linfocítica murina.
MBP: "Myelin Basic Protein", proteína básica de mielina.
MHC: "Major Histocompatibility Complex", complejo principal de

histocompatibilidad.

- NOD: "Non-Obese Diabetic", ratones diabéticos no obesos.
 PIA: "Pristane-Induced Arthritis", artritis inducida por Pristano.
 SEB: "Staphylococcus Enterotoxin B", enterotoxina B de estafilococos.
 TAM: "T-cell Activation Motif", motivo de activación de linfocitos T.
 TcR: "T-cell Receptor", receptor para antígeno de linfocitos T.
 Tg: Transgénico.
 TNF: "Tumor Necrosis Factor", factor necrosante de tumores.
 TSST-1: "Toxic Shock Syndrome Toxin-1", toxina 1 del síndrome de choque tóxico.

1. INTRODUCCIÓN.

Desde los tiempos de Erhlich, no ha dejado de intrigar a los inmunólogos la posibilidad de que los elementos del Sistema Inmunitario se vuelvan contra el propio individuo al que, teóricamente, defienden de agresiones externas (*horror autotoxicus*). En los últimos años se han acumulado numerosos datos acerca de los factores, endógenos y exógenos, que influyen en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Una cuestión a determinar es la de si las enfermedades autoinmunes se producen por "errores" del sistema, o bien son la consecuencia de que, en el curso de su funcionamiento normal, se dan situaciones que alteran o sobrepasan los mecanismos de control del propio Sistema. En este caso, serían riesgos inevitables que se asumen por el beneficio que suponen las reacciones inmunitarias.

El "pecado original" de los linfocitos T, y el fundamento último de su posible autorreactividad una vez maduros, es el proceso de *selección positiva* que sufren en el curso de su desarrollo en el timo (Sprent y cols., 1988; von Boehmer, 1990; Jameson y cols., 1995). La base de esa selección positiva es el reconocimiento de péptidos propios asociados a moléculas de histocompatibilidad propias por el receptor de antígeno de linfocitos T (TcR), dando lugar a una señal funcionalmente significativa (Fig. 1A). Es decir: los linfocitos T periféricos, que son estimulados al reconocer antígenos extraños asociados a moléculas de

MHC propias, descienden de precursores tímicos con una afinidad funcional hacia el MHC propio (Zauderer, 1989).

2. MECANISMOS DE TOLERANCIA FRENTE A COMPONENTES PROPIOS.

Básicamente, el problema que se le plantea al Sistema Inmunitario es el de evitar que péptidos de componentes propios (P_1), asociados a las moléculas de histocompatibilidad, y capaces de inducir selección positiva en timocitos, induzcan la activación de los linfocitos T periféricos maduros (Fig. 1B). Esta activación sí ha de tener lugar al reconocer determinados péptidos extraños (Ag, P_2) asociados a los mismos antígenos de histocompatibilidad (Fig. 1C). El esquema de la figura 1 presupone, por una parte, un papel determinante de los péptidos asociados al MHC en la selección positiva ((Ashton-Rickardt y cols., 1993), revisado en (Jameson y cols., 1995)); por otra, que al menos parte de los péptidos propios asociados al MHC son semejantes en el timo y en los órganos linfoides periféricos (Marrack y cols., 1993).

El Sistema Inmunitario ha desarrollado una serie de mecanismos de control, en gran medida redundantes, de *mantenimiento de la tolerancia frente a componentes propios*, precisamente para evitar el ataque autoinmune inherente a los mecanismos de variabilidad del TcR y al proceso de selección positiva de los linfocitos T. Se ha comprobado que estos mecanismos operan tanto en estadios tempranos del desarrollo de los linfocitos en el timo, como en linfocitos T periféricos (Kroemer y Martínez-A., 1992). Básicamente, implican la muerte de los linfocitos (*delección*) o su inactivación funcional (*anergia*) cuando son estimulados a través de su receptor para antígeno en determinadas condiciones, o bien la *ignorancia* de la presencia del antígeno.

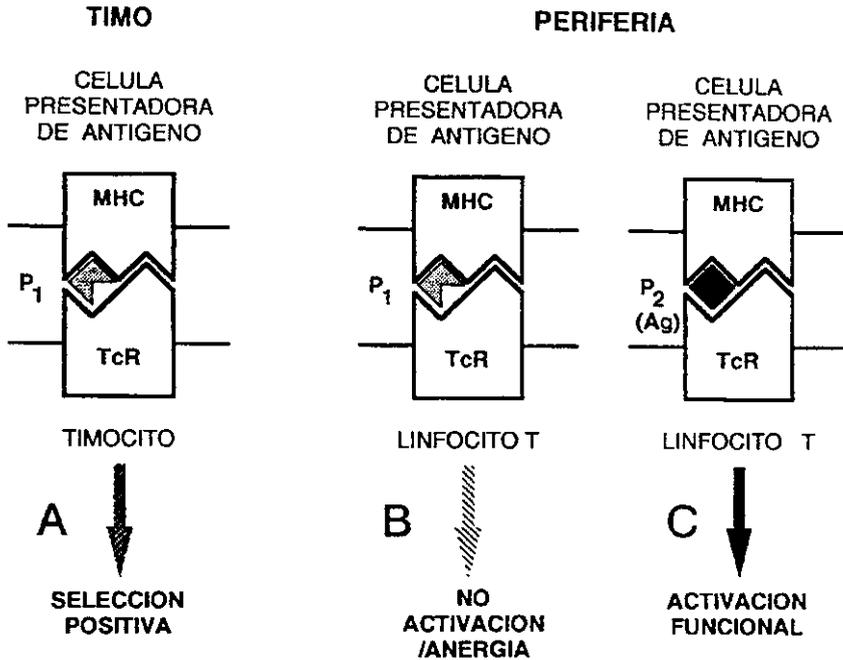


Figura 1.- Señales funcionalmente diferentes generadas por la interacción TcR-ligando en el timo y en los órganos linfoides periféricos. MHC: molécula del sistema principal de histocompatibilidad; TcR: Receptor para antígeno de linfocitos T; P₁: péptido propio asociado a moléculas de histocompatibilidad; P₂: péptido antigénico (Ag).

3. DIFERENCIAS CUANTITATIVAS EN LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T.

Uno de los mecanismos de mantenimiento de la tolerancia frente a componentes propios en los linfocitos T periféricos es el mantenimiento de un alto umbral de activación respecto de los timocitos (Fig. 2). Los timocitos necesitan estímulos del TcR que alcancen un nivel suficiente (estímulo 1, umbral A), para ser seleccionados positivamente y ser rescatados de la muerte celular (revisado en (von Boehmer y cols., 1989; Janeway Jr., 1994)). Si aumenta la avidéz de la interacción (debido, por

ejemplo, a una mayor afinidad TcR-ligando, o bien a una mayor densidad de ligandos), los timocitos pueden alcanzar un nivel de activación por componentes propios que el sistema detecta como peligroso, iniciándose un proceso de selección negativa para eliminarlos (estímulo 2, umbral B). Ejemplos bien ilustrativos de éste fenómeno lo constituyen modelos de ratones transgénicos cuyos linfocitos T expresan mayoritariamente un único TcR de especificidad conocida. Se ha observado cómo, en cultivos de timo, la adición de péptido antigénico en concentraciones bajas puede inducir selección positiva (expansión) de los linfocitos que poseen el TcR relevante. En cambio, si se aumenta la densidad de ligando del TcR (p.e., incrementando la concentración de péptido un orden de magnitud), se produce selección negativa en los mismos cultivos (Ashton-Rikhardt y cols., 1994). Resultados concordantes han sido obtenidos analizando otras combinaciones TcR-MHC:péptido (Sebzda y cols., 1994). Hasta cierto punto, se pueden interpretar en el mismo sentido los resultados obtenidos en ratones transgénicos en los que se produce selección positiva o negativa dependiendo del menor o mayor nivel de expresión del co-receptor CD8 (Robey y cols., 1991; Lee y cols., 1992; Robey y cols., 1992).

El margen de seguridad en la tolerancia hacia los componentes propios se amplía debido a que la avidez en la interacción TcR-ligando necesaria para activar los linfocitos T maduros (Fig.2, Umbral C), es aún superior al umbral de selección de los timocitos (Fig. 2, Umbral B) (Yagi y Janeway, 1990; Pircher y cols., 1991).

4. PEQUEÑOS CAMBIOS CON GRANDES CONSECUENCIAS: DIFERENCIAS CUALITATIVAS EN LOS LIGANDOS DEL TCR.

Los datos expuestos muestran la importancia de la avidez de la interacción TcR-ligando en la selección tímica y en el mantenimiento de la tolerancia. Sin embargo, el panorama es mucho más complejo. El análisis detallado de la especificidad del reconocimiento de péptidos por el TcR de linfocitos T maduros ha permitido detectar no sólo péptidos que actúan como ligandos activadores (*agonistas*), sino también péptidos que, incluso con diferencias mínimas en su secuencia respecto a los anteriores,

actúan como *agonistas parciales* (que inducen algunas, pero no todas las funciones del linfocito), e incluso como *antagonistas* del TcR (bloqueando las funciones del linfocito T) (Evavold y cols., 1993) (Fig. 3). Aunque inicialmente se ha intentado explicar el agonismo parcial y el antagonismo peptídico en términos de su menor afinidad hacia el TcR, ciertos péptidos antagonistas parecen tener una eficiencia incompatible con esta hipótesis (Bertoletti y cols., 1994; Klenerman y cols., 1994). En el mismo sentido, y empleando como ligandos distintos anticuerpos frente al TcR de una línea de linfocitos T, hemos observado diferencias cualitativas entre ellos, de modo que aquellos anticuerpos que inducen señales del activadoras óptimas producen cambios estructurales en el TcR, y no sólo su agregación. Hay que hacer constar que estas diferencias son independientes de la afinidad de cada anticuerpo hacia el TcR (Rojo y Janeway Jr., 1988; Janeway y cols., 1989).

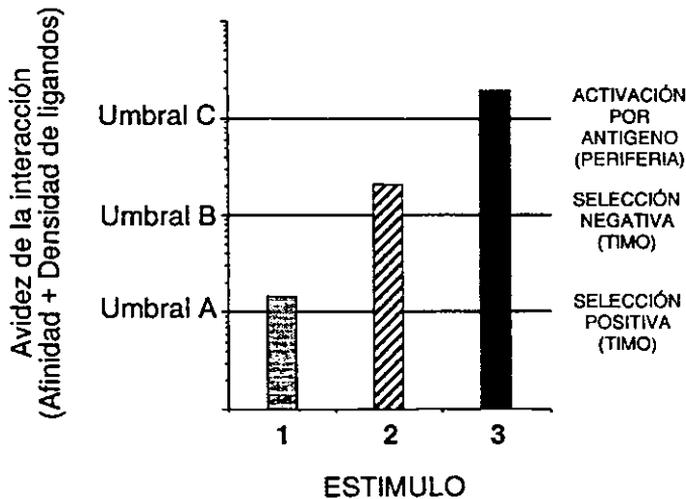


Figura 2.- Relación entre la avidéz de la interacción TcR-MHC:péptido, las señales que producen selección positiva ó negativa en los timocitos, y las que inducen activación de los linfocitos T maduros. 1: Estímulo suficiente para selección positiva en el timo. 2: Estímulo que alcanza el umbral de deleción clonal en el timo. 3: Estímulo capaz de activar linfocitos T maduros.

La relevancia de estos hallazgos en cuanto a los mecanismos de tolerancia y la selección tímica surge de la observación de que, en sistemas de cultivo de timo "in vitro", ciertos péptidos antagonistas inducen selección positiva de los timocitos, mientras que, en las mismas condiciones, los péptidos agonistas producen selección negativa. En el mismo sistema, péptidos agonistas parciales producen selección positiva a baja concentración, y negativa a alta concentración (Hogquist y cols., 1994). Resultados semejantes han sido obtenidos con péptidos débilmente agonistas empleando otras combinaciones de TcR-antígeno (Ashton-Rikhardt y cols., 1994).

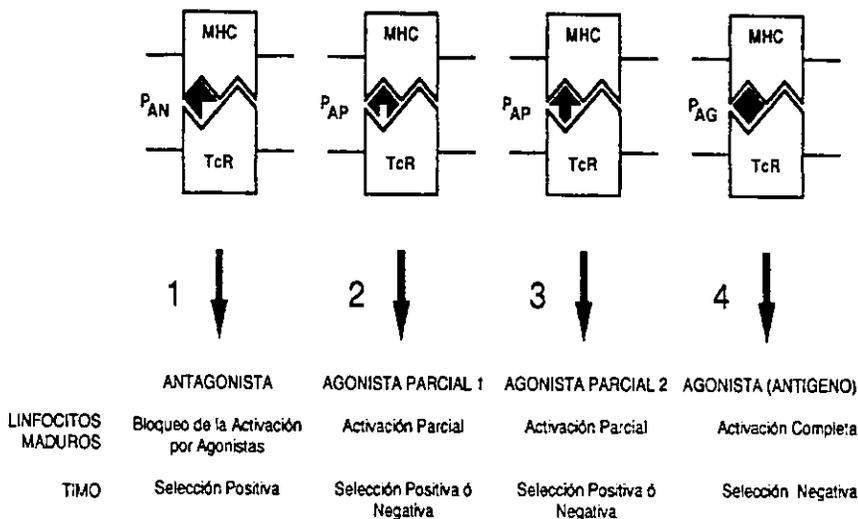


Figura 3.- Ligandos distintos de un mismo TcR inducen efectos biológicos distintos. Los péptidos asociados a una molécula de histocompatibilidad (MHC) pueden: (1) ser antagonistas (P_{AN}) y bloquear la respuesta a antígeno; (2,3) ser agonistas parciales (P_{AP}), estimulando selectivamente ciertos mecanismos de respuesta celular; ó (4) ser agonistas (P_{AG}), estimulando todas las vías de activación posibles en el linfocito T. Estas diferencias pueden ser independientes de la afinidad de la interacción.

¿Cuáles son las diferencias en las señales del TcR inducidas por cada

tipo de ligando?. Aunque este es un campo muy poco explorado, el interés se ha dirigido a los sucesos más tempranos de la activación de los linfocitos T, es decir, la fosforilación de tirosinas de distintos sustratos celulares, que incluyen las cadenas γ , δ , ϵ , y ζ del complejo CD3 asociado al TcR (revisado en (Weiss, 1993; Mustelin, 1994)). Funcionalmente se ha podido establecer que *Lck* y *Fyn*, dos tirosina quinasas de la familia *Src* son, posiblemente, las encargadas de iniciar la cascada de señales activadoras en los linfocitos T maduros. Ambas se asocian físicamente al complejo TcR:CD3 ((Samelson y cols., 1990; Gauen y cols., 1992; Gauen y cols., 1994; Criado y cols., 1995)), y, en el caso de *Lck*, puede asociarse indirectamente al TcR por medio de las moléculas co-receptoras CD4 y CD8 (Díez-Orejas y cols., 1994; Criado y cols., 1995). En las señales tempranas de linfocitos T maduros también aparecen implicadas otras dos tirosina quinasas (ZAP-70 y Syk), aunque, al menos en el caso de ZAP-70, su asociación a las cadenas CD3 ϵ y ζ depende de la fosforilación previa de las tirosinas presentes en los motivos de activación (TAM) de la región intracitoplásmica de éstas moléculas (Kolanus y cols., 1993; Gauen y cols., 1994).

Con base en los resultados de activación por distintos anticuerpos frente a un mismo TcR, propusimos hace tiempo la idea de que la activación eficiente de los linfocitos T implica no sólo la agregación del TcR, sino también cambios en su estructura que permiten o inducen una aproximación de moléculas co-receptoras al TcR (Saizawa y cols., 1987; Rojo y Janeway Jr., 1988; Rojo y cols., 1989; Díez-Orejas y cols., 1994). Si extendemos éste concepto a los procesos de selección tímica, es posible que ligandos que inducen sólo agregación o sólo cambios conformacionales en el TcR den lugar a una señal incompleta, insuficiente para la activación de linfocitos T maduros, pero suficiente para la selección positiva de timocitos (Janeway y cols., 1989). Esta señal incompleta podría derivarse de la interacción de alta densidad del TcR con péptidos antagonistas o agonistas parciales, o bien de la interacción de baja densidad con péptidos agonistas. Por el contrario, las interacciones de alta densidad con ligandos que inducen cambios conformacionales del TcR (p.e. péptidos agonistas) inducirían señales completas y selección negativa.

En este sentido puede ser relevante que, en clones de linfocitos CD4⁺

Th1, ciertos péptidos agonistas parciales capaces de inducir anergia (Sloan-Lancaster y cols., 1993; Sloan-Lancaster y cols., 1994a), inducen patrones de fosforilación temprana de tirosinas alterados y más débiles. En esas condiciones, la tirosina quinasa ZAP-70 no se incorpora al complejo del TcR (Sloan-Lancaster y cols., 1994b). Aunque no existen datos similares acerca de péptidos antagonistas, es razonable pensar que éstos pueden dar lugar a señales del TcR parciales ó alteradas en el patrón de fosforilación, como han sugerido Evavold y cols. (Evavold y cols., 1993) (Fig. 3).

5. ¿EL CO-RECEPTOR MARCA LA DIFERENCIA?.

Observaciones recientes indican que, de alguna manera, los linfocitos T maduros son incapaces de responder a la misma combinación péptido:MHC que encontraron durante la selección positiva (Jameson y cols., 1994). Así, en ratones transgénicos para un TcR específico de un péptido de Ovoalbúmina:H-2^b, los linfocitos seleccionados pueden responder a un determinado péptido, agonista parcial, siempre que éste no haya sido empleado para la selección positiva "in vitro". Sin embargo, cuando la selección positiva se produce en presencia de este agonista parcial, los linfocitos T que maduran son incapaces de responder al péptido empleado en la selección positiva, aunque mantienen la capacidad de respuesta a un péptido antigénico (agonista). Este fenómeno va unido a la selección positiva de linfocitos T que expresan niveles bajos del co-receptor CD8. Es decir, parece que en presencia de un agonista parcial son seleccionadas preferentemente células con sus vías de activación alteradas debido a un déficit de co-receptores. Estos niveles reducidos de co-receptor se han observado también en otros sistemas en los que la selección positiva se lleva a cabo por bajas concentraciones de péptidos agonistas, y abundaría en la necesidad de se-ales incompletas o parciales para la selección positiva (Ashton-Rikhardt y cols., 1994; Sebzda y cols., 1994), así como en la necesidad de los co-receptores para una señal del TcR completa.

Los co-receptores (CD4 y CD8) tienen una importancia decisiva en la selección positiva y negativa de los timocitos, y han de localizarse próximos al TcR para llevar a cabo su función ((Aldrich y cols., 1991;

Ingold y cols., 1991; Killeen y cols., 1992), revisado en (Wallace y cols., 1993)). Esto, en principio, sugiere que la tirosina quinasa Lck asociada a CD4 y CD8 podría intervenir decisivamente en los procesos selectivos de los timocitos (Van Oers y cols., 1992). A pesar de ello, se han de tener presentes ciertos datos que hablan en contra de la participación de tirosina-quinasas en estos procesos. Por ejemplo, ratones transgénicos para formas de CD4 ó CD8 incapaces de unir la tirosina-quinasa Lck, pueden lograr selección positiva siempre que expresen niveles suficientemente altos de estos co-receptores alterados (Chan y cols., 1993; Killeen y Littman, 1993). Además, se ha observado que la selección negativa puede llevarse a cabo en presencia de inhibidores de tirosina-quinasas (Nakayama y Loh, 1992). Todos estos datos han de tomarse con precaución, teniendo en cuenta que la carencia de la tirosina-quinasa ZAP-70 afecta profundamente a los procesos de selección positiva y negativa en el timo (Negishi y cols., 1995).

6. LINFOCITOS T AUTORREACTIVOS EN ÓRGANOS LINFÓIDES PERIFÉRICOS.

A pesar de las barreras de la selección tímica, en los órganos linfoides periféricos podemos encontrar linfocitos T capaces de reaccionar frente a antígenos propios, al menos en condiciones de activación "in vitro" (Hooper, 1987; Hooper y cols., 1987; Zauderer, 1989; Elson y cols., 1995; Steinman, 1995). Las razones de este "escape" de la selección negativa en el timo pueden ser varias. Una de ellas es la existencia de antígenos específicos de tejido que no son expresados en el timo. Si estos antígenos son solubles, pueden alcanzar el timo y ser presentados por células del timo que expresen moléculas de MHC de clase II (Murphy y cols., 1990; von Boehmer y Kisielow, 1990). Esto produciría la delección de los linfocitos T CD4⁺ potencialmente autorreactivos frente a este tipo de antígenos, ya que reconocen péptidos asociados a MHC de clase II (Fig. 4). Sin embargo, éste mecanismo de delección debe ser menos efectivo en el caso de los linfocitos T CD8⁺, que reconocen péptidos asociados a moléculas de MHC de clase I, ya que éstas asocian principalmente péptidos derivados de proteínas sintetizadas endógenamente en la propia célula (Jaraquemada y Martí, 1991).

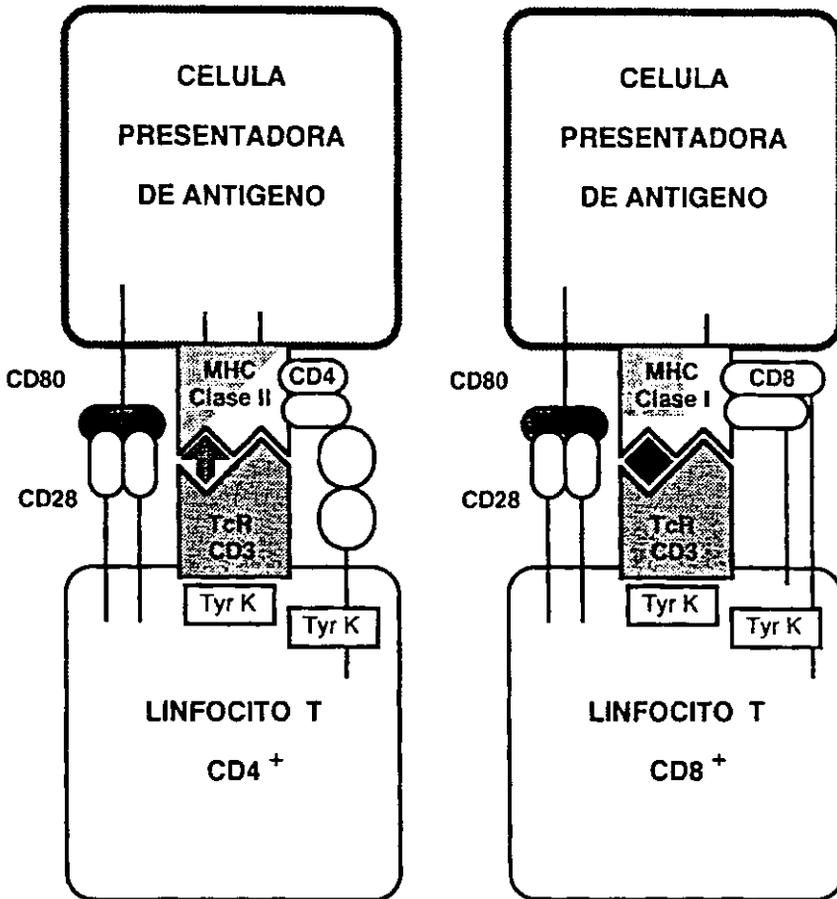


Figura 4.- La activación inicial por antígeno en linfocitos T $CD4^+$ y T $CD8^+$ requiere, además de las señales del TcR junto con las moléculas co-receptoras CD4 y CD8, de otras señales libradas como consecuencia de la interacción de moléculas co-estimuladoras (CD28) con ligandos expresados por células presentadoras de antígeno (CD80 (B7)).

En segundo lugar, ocurre que las proteasas que intervienen en el procesamiento de antígenos propios favorecen la generación de ciertos péptidos, que son los que se asocian preferentemente a las moléculas de

histocompatibilidad. Por tanto, únicamente se genera una tolerancia efectiva en el timo frente a éstos péptidos, pero no frente a otras secuencias dentro de la misma proteína. De este modo, se han podido encontrar linfocitos que reaccionan frente a un péptido del citocromo *c*, pero que no responden cuando se usa como antígeno la proteína entera, debido a que ese péptido particular no es generado en el curso del procesamiento intracelular del citocromo *c* (Mamula, 1993).

7. ¿POR QUÉ NO SON ACTIVADOS LOS LINFOCITOS AUTORREACTIVOS PERIFÉRICOS?

Para conocer mejor los mecanismos de tolerancia de los linfocitos maduros potencialmente autorreactivos han sido particularmente útiles ratones dobles transgénicos que expresan mayoritariamente un único TcR de especificidad conocida frente a un antígeno cuya expresión se induce en tejidos particulares (p.e. la expresión de antígenos en islotes de Langerhans del páncreas bajo la dirección del promotor de insulina). En muchos de estos sistemas, y a pesar de la abundancia de linfocitos T potencialmente autorreactivos en los órganos linfoides periféricos, se observa la ausencia de un ataque efectivo, y no se desarrolla enfermedad autoinmune a no ser que se "prime" a los linfocitos utilizando el mismo antígeno en forma estimuladora.

A este respecto, es necesario recordar que el inicio de la respuesta a antígenos en los linfocitos T maduros únicamente se produce en condiciones muy restrictivas (Fig. 4): Por un lado, la expresión suficiente de receptores para antígeno y de correceptores CD4/CD8, así como densidad de antígeno: MHC adecuada. Por otro lado, se requiere una señal adicional producida como consecuencia de la unión de moléculas co-estimuladoras (CD28) con su ligando (B7, CD80) (revisado en (Allison, 1994)). En condiciones normales, estos ligandos co-estimuladores únicamente se expresan en células presentadoras de antígeno "profesionales", como las células dendríticas, los macrófagos, o los linfocitos B, evitando que cualquier célula pueda iniciar el proceso de activación de aquellos linfocitos T maduros con suficiente avidez hacia MHC:péptido propio. Más aún, en muchos casos el reconocimiento de antígeno o la unión de

ligandos al TcR en ausencia de señales co-estimuladoras adecuadas no induce respuesta, o produce inactivación funcional (anergia) en los linfocitos T maduros (Allison, 1994).

8. TOLERANCIA POR IGNORANCIA.

La falta de ligandos co-estimuladores en las células que expresan un determinado antígeno (y, en el caso de los linfocitos T CD4⁺, la expresión de moléculas de MHC de clase II únicamente en células presentadoras de antígeno "profesionales") puede llevar a que linfocitos T maduros potencialmente autorreactivos "ignoren" el antígeno y no se produzca ataque autoinmune (Tabla I). En estas condiciones, los linfocitos T no responden a un antígeno expresado en un tejido periférico, pero tampoco se encuentran anérgicos, ya que responden al mismo antígeno presentado por células presentadoras de antígeno adecuadas. En este sentido ha sido muy estudiado por Ohashi y cols. un sistema de ratones dobles transgénicos: por una parte, para la glicoproteína de la envuelta del virus de la coriomeningitis linfocítica (gpLCMV), cuya expresión se dirige a las células β de los islotes del páncreas gracias al uso del promotor del gen de la insulina. Por otro lado, los ratones son transgénicos para un TcR específico de un péptido de la misma glicoproteína asociado a moléculas de MHC de clase I (anti-gpLCMV:H-2^b) y dependiente de CD8 ((Ohashi y cols., 1991; Oldstone y cols., 1991), revisado en (Ohashi, 1994)) (Fig. 5). En estos sistemas existen abundantes linfocitos T CD8⁺ maduros específicos de gpLCMV con características normales, que pueden responder a antígeno "in vitro". Además, formas inmunogénicas de la misma proteína (p.e. la infección por el virus LCMV) llevan a una respuesta inmunitaria que produce finalmente diabetes autoinmune. Se han podido determinar algunos de los factores que contribuyen al estado de "ignorancia" de los linfocitos T, tales como el bajo nivel de expresión de MHC de clase I en el órgano diana, la no expresión de ligandos de moléculas co-estimuladoras, o la no secreción por el tejido diana de citoquinas (p.e. TNF- α) que coadyuvan al proceso autoinmune (Ohashi y cols., 1993; Harlan y cols., 1994). Este tipo de "ignorancia" parece funcionar también en otros sistemas de expresión localizada de un

antígeno (Hämmerling y cols., 1991); incluyendo ratones transgénicos para un TcR reactivo frente al epitopo principal de MBP reconocido por los linfocitos T CD4⁺ en el curso de la Encefalomiелitis Alérgica Experimental (EAE), siempre que los animales permanezcan en ausencia de patógenos (Goverman y cols., 1993).

8. DELECIÓN Y ANERGIA EN LINFOCITOS T PERIFÉRICOS.

Aparte de la "ignorancia" a los antígenos, existen abundantes pruebas de otros mecanismos de mantenimiento de la tolerancia, en sistemas transgénicos y no transgénicos, que implican bien la falta de respuesta a antígeno presentado en forma inmunogénica (anergia); bien la muerte (delección) de los linfocitos antígeno específicos periféricos. En la Tabla I se exponen ejemplos de algunos mecanismos mediante los cuales los linfocitos T potencialmente autorreactivos no responden a los antígenos "in vivo". Se incluyen además ciertos casos en que la falta de respuesta a un antígeno "in vivo" no impide la activación por formas inmunogénicas del mismo antígeno "in vitro", y no existe, por tanto, una anergia "sensu stricto". Este conjunto de datos sugiere una gran variabilidad en los mecanismos celulares de tolerancia, con distintos grados de inactivación funcional de las células autorreactivas. Esta gradación puede corresponderse con diversas circunstancias propias de los linfocitos T implicados (p.e. la afinidad del TcR hacia el antígeno), o de las células que lo expresan (p.e. densidad del antígeno). Un buen ejemplo de lo primero es el diferente tipo de anergia que muestran linfocitos periféricos de ratones H-2^b transgénicos para dos TcR anti-H-2^b, uno "dependiente" de CD8 y otro independiente de CD8, estudiados por Schmitt-Verhulst y cols. (Auphan y cols., 1994). La importancia en la tolerancia de las células que expresan el antígeno se demuestra bien por las diferencias en los grados y los mecanismos de tolerancia periférica entre ratones dobles transgénicos (H2^b-TcR anti-H-2^b), de acuerdo con el tejido en el que se expresa el antígeno diana H-2^b (Hämmerling y cols., 1991), Tabla I).

Tabla I: Mecanismos de tolerancia frente a linfocitos T periféricos potencialmente autorreactivos

MECANISMO DE TOLERANCIA	ESPECIFICIDAD ^a TcR	ANTIGENO ^a / EXPRESION	RESPUESTA "In Vitro"	OBSERVACIONES	REFERENCIA
"IGNORANCIA"	α -gpLCMV:H-2D ^b (Tg)	gpLCMV(Tg)/ células de Langerhans	SI	Expresión normal TcR/CD8	(Ohashi y cols., 1991)
	α -H-2K ^b (Tg)	H-2K ^b (Tg)/ epitelio	SI		(Hämmerling y cols., 1991)
ANERGIA	α -H-2K ^b (Tg)	H-2K ^b (Tg)/ neuroectodermo	SI	Modulación TcR/CD8 reversible	(Hämmerling y cols., 1991)
	α -H-2K ^b (Tg)	H-2K ^b (Tg)/ células hepáticas	No	Modulación de CD8 en el timo	(Hämmerling y cols., 1991)
	α -H-2K ^b (Tg)	H-2K ^b (Tg)/ epitelio tímico	No	Modulación TcR/CD8 irreversible	(Hämmerling y cols., 1991)
	α -gpLCMV:H-2D ^b (Tg)	gpLCMV(Tg)/ células de Langerhans	No	Inducida por péptido soluble	(Kyburz y cols., 1993)
	V β 8*	Bazo <i>Mtv-7</i> (Mls-1 ^a)	No	Inducida por transferencia de células	(Rammensee y cols., 1989)
	V β 8*	Enterotoxina B <i>Staphylococcus</i>	No	Inducida por toxina soluble	(Kawabe y Ochi, 1990)
	α -H-Y (Tg)	Bazo de ratones macho	No	Inducida por transferencia de células Modulación TcR/CD8	(Rocha y von Boehmer, 1991)
DELECIÓN	α -gpLCMV:H-2D ^b (Tg)	gpLCMV(Tg)/ células de Langerhans		Inducida por péptido soluble	(Kyburz y cols., 1993)
	V β 8*	Bazo <i>Mtv-7</i> (Mls-1 ^a)		Inducida por transferencia de células	(Webb y cols., 1990)
	V β 8*	Enterotoxina B <i>Staphylococcus</i>	No	Inducida por toxina soluble	(Kawabe y Ochi, 1991)
	α -H-Y (Tg)	Bazo de ratones macho		Inducida por transferencia de células	(Rocha y von Boehmer, 1991)

^a Tg: Transgénico; gpLCMV: glicoproteína de la envuelta viral del virus de la coriomeningitis linfocítica murina.

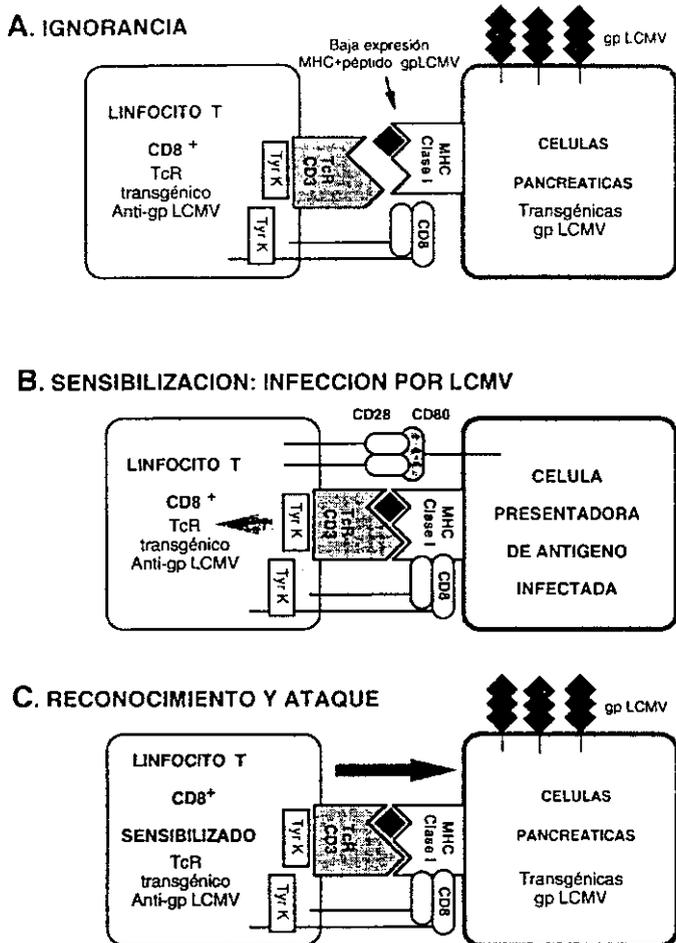


Figura 5.- Tolerancia por "ignorancia" en ratones dobles transgénicos para un TcR específico de un péptido de la glicoproteína de la envuelta del virus de la coriomeningitis linfocítica (gpLCMV) y para la expresión de gpLCMV dirigida por el promotor del gen de insulina. A: En ausencia de otro estímulo, y con baja densidad de MHC:antígeno, los linfocitos T no lo reconocen (lo "ignorán") funcionalmente. B: La infección de células presentadoras de antígeno "profesionales" por LCMV permite una presentación efectiva del antígeno y la sensibilización de los linfocitos T. C: Los linfocitos T, una vez sensibilizados, no requieren de moléculas coestimuladoras para llevar a cabo el ataque de las células pancreáticas que expresan el antígeno.

9. ROTURA DE LA TOLERANCIA: PAPEL DE LOS AGENTES INFECCIOSOS.

Hemos visto cómo existen potentes mecanismos de control que impiden el ataque autoinmune incluso cuando existen abundantes linfocitos maduros que, por la afinidad de sus receptores y su especificidad antigénica, son potencialmente autoagresivos. Distintos modelos experimentales de autoinmunidad espontánea y estudios inmunogenéticos han puesto en evidencia la importancia de factores genéticos muy diversos en la susceptibilidad de los individuos a una determinada enfermedad autoinmune. Sin embargo, los datos de estudios sobre gemelos monocigóticos indican una gran importancia de los factores ambientales en el desarrollo de este tipo de enfermedades. De esta forma, la concordancia para el desarrollo de la enfermedad puede ser muy baja (hasta un 5% para el desarrollo de la esclerosis múltiple, (Sinha y cols., 1990)).

De entre los factores ambientales, los agentes infecciosos son, posiblemente, los más relevantes en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. En ratones transgénicos para un receptor que reconoce el epitopo inmundominante de la MBP se ha observado desarrollo espontáneo de encefalitis alérgica en ratones que se mantienen en condiciones convencionales, pero no en colonias que se mantienen libres de patógenos (Goverman y cols., 1993). De igual modo, la artritis experimental inducida por pristano (Pristane-induced arthritis, PIA) sólo tiene lugar en ratones que han permanecido en instalaciones convencionales, y no en animales que se mantienen en condiciones estériles (Elson y cols., 1995). La necesidad de una flora intestinal normal aparece también en la colitis ulcerosa que desarrollan ratones deficientes en IL-2 (Sadlack y cols., 1993). En la figura 6 se muestran algunos mecanismos, documentados o posibles, mediante los cuales los microorganismos o sus productos pueden inducir o coadyuvar a la instalación de enfermedades autoinmunes. En muchas ocasiones, además, éstos mecanismos no son mutuamente excluyentes, y, probablemente, es necesaria la coincidencia de varios de ellos para que se desarrolle autoinmunidad.

En primer lugar, ciertos productos microbianos muy comunes, como los lipopolisacáridos o los peptidoglicanos, tienen capacidad coadyuvante (Warren y cols., 1986), e inducen la expresión o la secreción

de moléculas co-estimuladoras en linfocitos B y macrófagos, incluyendo CD80, HSA, e IL-1 (Durum y cols., 1985; Warren y cols., 1986; Liu y cols., 1992) (Fig. 6, 1), además de moléculas directamente implicadas en el desarrollo de autoinmunidad, como el Factor Necrosante de Tumores (TNF) (Vasalli, 1992; Ohashi y cols., 1993).

En segundo lugar, se han descrito numerosas moléculas microbianas con secuencias de aminoácidos similares a moléculas propias. La respuesta de linfocitos T a estas secuencias con reacción cruzada puede dar lugar a una activación efectiva ("priming") de linfocitos T que van a ser capaces de reconocer secuencias semejantes de proteínas propias (Fig. 6, 2). Un ejemplo clásico es el desarrollo de EAE mediante inmunización de conejos con una secuencia del virus de la hepatitis B homóloga de la MBP (Fujinami y Oldstone, 1985). Es particularmente interesante el hecho de que la homología suficiente para el desarrollo de esta respuesta puede ser muy baja (hasta 4 de 11 aminoácidos).

Un tercer mecanismo de iniciación/facilitación de la respuesta frente a componentes propios es la producción de "superantígenos" (Herman y cols., 1991; Webb y Gascoigne, 1994). Los superantígenos se unen a las caras laterales de las regiones V β del TcR y de las moléculas del MHC de clase II. De este modo activan los linfocitos T CD4⁺ que poseen regiones V β adecuadas. Los superantígenos conocidos incluyen, entre otros exotoxinas de bacterias gram-positivas, así como proteínas codificadas en las regiones LTR de ciertos virus. En algunos casos, la expansión oligoclonal de linfocitos T por superantígenos puede inducir directamente lesiones autoinmunes. Es el caso de la artritis articular inducida por TSST-1 (Toxina-1 del síndrome tóxico de *Staphylococcus*) que activa linfocitos T V β 11⁺ (Abdelnour y cols., 1994). Otro posible mecanismo de acción de los superantígenos implica una presentación de antígenos más eficiente (Janeway y cols., 1983). En este sentido, se ha observado que la enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB), que activa preferentemente linfocitos T V β 8⁺, induce encefalomiелitis experimental producida por administración de MBP (mediada por linfocitos T V β 8⁺) en ratones que no mostraban signos clínicos de enfermedad, o produce recaídas en ratones en fase de remisión (Brocke y cols., 1993).

LIFONCITOS T AUTORREACTIVOS

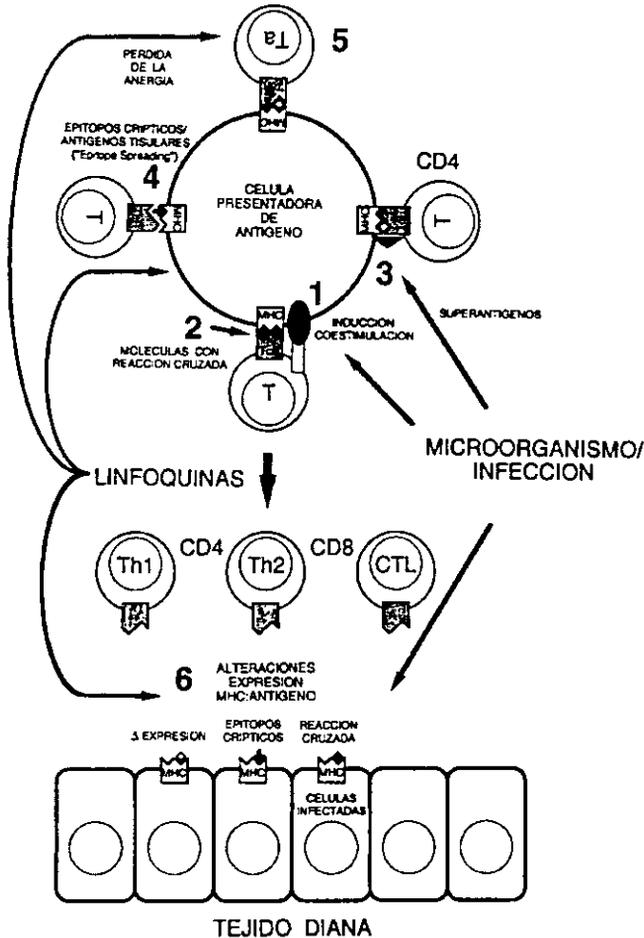


Figura 6.- Vías que pueden utilizar los microorganismos para provocar rotura de la tolerancia hacia componentes propios: 1: inducción de moléculas co-estimuladoras (B7, IL-1) por metabolitos. 2: Procesamiento y expresión de péptidos homólogos de secuencias de proteínas propias. 3: Producción de exotoxinas y otras moléculas de carácter superantigénico. 4: Las linfocinas producidas por los linfocitos T activados pueden contribuir al fenómeno de dispersión de epítopos, dando lugar a la activación de células no tolerizadas que reconocen epítopos "crípticos". Estas linfocinas también pueden contribuir a la activación de linfocitos inactivos (5, Ta: T anérgicos), y a incrementar la expresión de moléculas de MHC:péptido en los tejidos diana (6).

Una vez activada la respuesta frente a un epítipo con reacción cruzada hacia determinantes propios, se puede ampliar la respuesta a epítipos no inmunodominantes (epítipos crípticos) de la molécula propia, frente a los que no se ha generado tolerancia en el timo, o frente a epítipos crípticos de otras moléculas propias del tejido atacado, que son liberadas en el curso de la reacción inflamatoria ("epitope spreading", Fig. 6, 4). Este fenómeno de ampliación del repertorio inicial de epítipos propios (intra- e intermoleculares), frente a los cuales se va extendiendo la respuesta progresivamente, está bien documentado en distintos sistemas antigénicos, incluyendo modelos de autoinmunidad experimental como la EAE en respuesta a un péptido de MBP (Lehmann y cols., 1992); el desarrollo de diabetes autoinmune en ratones NOD, iniciada en respuesta a GAD (Kaufman y cols., 1993); o en la respuesta anti-HSP en la artritis inducida por pristano (PIA) (Elson y cols., 1995).

Para explicar el fenómeno de dispersión de epítipos se han propuesto diversos mecanismos: alteración del procesamiento en antígenos que forman complejos antígeno-anticuerpo (Mamula yJaneway, 1993); o alteración de los mecanismos de procesamiento de antígeno por linfoquinas secretadas por linfocitos T Th1 (Elson y cols., 1995). En ambos casos el resultado es la expresión eficiente de epítipos que habitualmente están "escondidos" desde el punto de vista inmunológico.

En algunos casos, las linfoquinas secretadas por linfocitos T activados pueden romper el estado de tolerancia de linfocitos T periféricos potencialmente autorreactivos, contribuyendo de este modo al reclutamiento de nuevos linfocitos activos funcionalmente (Andreu-Sánchez y cols., 1991) (Fig. 6, 5). En otros, en fin, pueden incrementar la expresión de antígenos de histocompatibilidad en el tejido diana, alterar el procesamiento de antígenos propios, o expresa epítipos ajenos con reacción cruzada (Fig. 6, 6).

10. ¿ES POSIBLE LA VUELTA ATRÁS?: AUTORREACTIVIDAD EN LINFOCITOS "NO AUTORREACTIVOS".

Hemos visto que algunos -o muchos- linfocitos T con afinidad/avidez suficientes para ser autorreactivos pueden madurar y pasar a los

órganos linfoides periféricos. En condiciones adecuadas, estos linfocitos pueden ser activados, iniciándose un ataque autoinmune. No podemos olvidar, sin embargo, que las reacciones de autoagresión sólo pueden ser definidas funcionalmente. Por tanto, cabe pensar en la posibilidad de que ciertos cambios lleven a los linfocitos T maduros a un estado en el que señales débiles ó incompletas, como las que se producen por la interacción TcR-MHC propios, sean suficientes para una activación efectiva. Por el fenómeno descrito antes de "dispersión de epitopos" una respuesta inicial de este tipo podría extenderse a distintos antígenos propios y a linfocitos "auténticamente" autorreactivos. Posiblemente los linfocitos T que lanzan este tipo de "miradas atrás" están condenados, de ordinario, a la neutralización y a la muerte. En caso contrario, y teniendo en cuenta las características de las señales del TcR durante la maduración de los timocitos, se puede anticipar que los cambios necesarios en la maquinaria intracelular han de ir dirigidos a: i) disminuir o eliminar la dependencia de señales coestimuladoras en la activación del TcR; ii) modificar la maquinaria intracelular para disminuir drásticamente el umbral de activación; y iii) simultáneamente, ésta misma maquinaria debe facilitar la proliferación y la secreción de linfoquinas incluso en respuesta a señales incompletas del TcR. En otras palabras, se ha de conseguir que señales del TcR que en los timocitos inmaduros completan el proceso de desarrollo o producen muerte celular, se dirijan hacia la secreción de linfoquinas y la proliferación celular.

Hay que recordar que muchos de los cambios que tienen lugar después de que un linfocito T virgen sea "sensibilizado" ("priming") van orientados a cambiar la maquinaria celular (desde moléculas de adhesión hasta factores de transcripción) y facilitar la activación en encuentros posteriores con el antígeno. Sin considerar la intervención del antígeno, podemos observar que determinados elementos exógenos (p.e. la inserción de promotores virales) cerca de moléculas clave como la tirosina-quinasa p56^{lck} (Voronova y Sefton, 1986), pueden alterar profundamente las características de activación de los linfocitos T.

En otras ocasiones se pueden observar síndromes linfoproliferativos y autoinmunitarios asociados a la disfunción de genes reguladores de la muerte celular, como es el caso de los genes de Fas (ratones MRL-*lpr/lpr*)

(Watanabe-Fukunaga y cols., 1992), y su ligando (FasL, ratones *gld*) (Takahashi y cols., 1994), o de la limitación de las señales co-estimuladoras (ratones deficientes para el gen de CTLA-4) (Waterhouse y cols., 1995).

Los timocitos TcR⁺, CD4⁺CD8⁺ (doble positivos, DP) que sufren los procesos selectivos tienen unos mecanismos de señales intracelulares del TcR peculiares, que se van conociendo poco a poco (revisados en (Rothenberg, 1994; Jameson y cols., 1995), Tabla II). En primer lugar, y como hemos visto anteriormente, los timocitos son mucho más sensibles que los linfocitos T periféricos a los ligandos del receptor, tanto en términos cuantitativos como cualitativos.

TABLA II

Algunas características de la activación funcional en timocitos doble positivos (DP), en linfocitos T maduros, y en una línea de linfocitos T (SR.D10) con propiedades autorreactivas

Característica ^a	Timocitos DP	Linfocitos maduros	TCélulas SR.D10
Umbral de activación por antígeno	Bajo	Alto	Bajo
Activación por MHC:péptido propio (dependiente de CD4 — CD8)	Sí	No	Sí
Requieren co-estimulación por CD28	No	Sí	No
Requieren Tirosin-quinasa	¿No?	Sí	Sí
Respuesta a activadores de PKC	Sí	No	Sí
Respuesta a activadores de PKC + Ionóforos de Ca ⁺⁺	Sí	Sí	Sí

^a La respuesta se mide como selección positiva o negativa en el caso de timocitos, y como proliferación en cultivo en el caso de linfocitos T maduros y de SR.D10.

Hemos mencionado anteriormente que, hasta cierto punto, está en tela de juicio el papel de las tirosina-quinasa en las señales del TcR durante la selección tímica. En linfocitos maduros, el ligamiento del TcR induce la rotura fosfolípidos de inositol (generando inositol 1,4,5 trifosfato y diacylglicerol) de modo dependiente de tirosina quinasa (June y cols., 1990; Mustelin y cols., 1990). Se ha observado, sin embargo, que en timocitos DP la selección negativa en respuesta antígenos depende de la rotura de fosfolípidos (Vasquez y cols., 1994) pero no de la actividad

de tirosina quinasas (Nakayama y Loh, 1992). En vista de estos datos, Vasquez y cols. sugieren la posibilidad de un mecanismo diferente de lisis de fosfolípidos de inositol en timocitos y en linfocitos T maduros. Más aún, observan que mediadores que activan la proteína-quinasa C son suficientes para la deleción, mientras que células T más maduras necesitan adicionalmente incrementos de Ca^{++} intracelular para proliferar (Vasquez y cols., 1994).

Los resultados obtenidos en ratones "knockout" para CD28 o empleando ligandos que bloquean la interacción B7-CD28 muestran que el desarrollo y la selección tímica no precisa de segundas señales a través de estas vías, como ocurre en linfocitos T maduros (Jones y cols., 1993; Shahinian y cols., 1993).

En nuestro laboratorio hemos detectado recientemente una variante clonal autorreactiva (SR.D10) que ha surgido de una línea T $CD4^{+}$ no autorreactiva (Ojeda y cols., 1995). La especificidad y las regiones variables del TcR de esta línea no han cambiado, pero sí ha sufrido cambios en los mecanismos de activación que hacen sospechar que ha sufrido lo que hemos denominado "vuelta atrás", con un claro paralelismo con ciertas características propias de los linfocitos T inmaduros ((Díez-Orejas y cols., 1994; Feito y cols., 1995; Ojeda y cols., 1995), Tabla II). En primer lugar, la reactividad de estas células frente a células singeneicas es dependiente del TcR, del correceptor CD4, y de las moléculas de MHC de clase II de las células activadoras. Esta auto-reactividad va acompañada de una sensible disminución del umbral de activación de las células por antígeno. Igual que ocurre en los timocitos, la activación de proteína-quinasa C es suficiente para dar una señal funcionalmente significativa en SR.D10. Además, la activación de SR.D10 por antígeno u otros ligandos del TcR es independiente en gran medida de señales co-estimuladoras: Así, puede ser activada eficientemente por antígeno presentado por células fijadas (Ojeda y cols., 1995), y no se observa un efecto co-estimulador claro de los anticuerpos anti-CD28 (J.M. Rojo y cols., resultados no publicados). Por otro lado, SR.D10 ha perdido la dependencia de IL-1 como co-estimuladora en la activación por anticuerpos, que poseía la línea original (Ojeda y cols., 1995). En el mismo sentido, recientemente hemos observado que anticuerpos anti-TcR solubles producen un patrón de

fosforilación temprana de tirosinas muy limitado en SR.D10. A pesar de ello, estas señales alteradas o incompletas son suficientes para inducir secreción de linfoquinas y proliferación en esta línea (Feito y cols., 1995). A este conjunto de alteraciones se unen incrementos en la expresión de ciertas moléculas de superficie implicadas en la adhesión intercelular (LFA-1, ICAM-1), y en la respuesta a factores de crecimiento (receptores de IL-2 e IL-4), que pueden favorecer tanto un bajo umbral de activación por antígeno como la independencia de segundas señales co-estimuladoras (Ojeda y cols., 1995). Lo mismo cabe decir de los cambios en las isoformas de CD45 que expresa esta línea, dada su profunda influencia en la activación eficiente por antígeno y por otros ligandos del TcR (Novak y cols., 1994). En conjunto, parece que la maquinaria de transmisión de señales intracelulares, desde las inmediatas al TcR hasta los factores de transcripción nucleares, ha sufrido en estas células un "cambio de programa" orientado a favorecer y facilitar la activación, en línea con los puntos propuestos anteriormente, y con un claro paralelismo hacia lo que ocurre en los timocitos (Rothenberg, 1994).

11. RECAPITULACIÓN.

El riesgo de autoagresión por parte de los linfocitos T se deriva, por una parte, de los mecanismos de variabilidad del receptor para antígeno, y, por otra, de la afinidad hacia componentes propios que supone la selección positiva. Este riesgo se conjura mediante distintas estrategias desplegadas en el desarrollo ontogénico en el timo y en el reconocimiento de antígenos por linfocitos T maduros con el fin de mantener la tolerancia hacia los componentes propios. De ordinario, estas estrategias son suficientes para evitar la autoagresión incluso en condiciones adversas, de existencia de abundantes linfocitos T maduros con afinidad alta hacia componentes propios. En esta revisión hemos querido mostrar cómo el equilibrio, a la vez fuerte y delicado que mantiene la tolerancia, puede romperse por la acumulación de factores de origen endógeno (dotación genética, mutaciones somáticas) y exógeno (p.e. procesos infecciosos) capaces de alterarlo en alguno o algunos de sus mecanismos. Tanto "errores" del Sistema como el funcionamiento normal del mismo pueden

contribuir a la autoagresión.

Agradecimientos.

Agradezco a Sara Ballester, Gabriel Criado, María José Feito, Gloria Ojeda y Pilar Portolés por numerosas sugerencias y aportaciones muy valiosas. El presente trabajo ha sido posible gracias a la financiación aportada por el Plan Nacional de Salud y Farmacia (CICyT) y el Plan Regional de Investigación de la Comunidad Autónoma de Madrid.

12. BIBLIOGRAFÍA.

- (1) ABDELNOUR, A., BREMELL, T., HOLMDAHL, R., Y TARKOWSKI, A. (1994) Clonal expansion of T lymphocytes causes arthritis and mortality in mice infected with toxic shock syndrome toxin-1-producing staphylococci. *Eur. J. Immunol.*, **24**, 1161-1166.
- (2) ALDRICH, C.J., HAMMER, R.E., JONES-YOUNGBLOOD, S., KOSZINOWSKI, U., HOOD, L., STROYNOWSKI, I., Y FORMAN, J. (1991) Negative and positive selection of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes affected by the $\alpha 3$ domain of MHC I molecules. *Nature*, **352**, 718-721.
- (3) ALLISON, J.P. (1994) CD28-B7 interactions in T-cell activation. *Curr. Opinion Immunol.*, **6**, 414-419.
- (4) ANDREU-SÁNCHEZ, J.L., MORENO DE ALBORÁN, I., MARCOS, M.A.R., SÁNCHEZ-MOVILLA, A., MARTÍNEZ-A., C., Y KROEMER, G. (1991) Interleukin 2 abrogates the nonresponsive state of T cells expressing a forbidden T cell receptor repertoire and induces autoimmune disease in neonatally thymectomized mice. *J. Exp. Med.*, **173**, 1323-1329.
- (5) ASHTON-RICKARDT, P.G., VAN KAER, L., SCHUMACHER, T.N.M., PLOEGH, H.L., Y TONEGAWA, S. (1993) Peptide contributes to the specificity of positive selection of CD8⁺ T cells in the thymus. *Cell*, **73**, 1041-1049.
- (6) ASHTON-RIKHARDT, P.G., BANDEIRA, A., DELANEY, J.R., VAN KAER, L., PIRCHER, H.-P., ZINKERNAGEL, R.M., Y TONEGAWA, S. (1994) Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell*, **76**, 651-663.
- (7) AUPHAN, N., CURNOW, J., GUIMEZANES, A., LANGLET, C., MALISSEN, B., MELLOR, A., Y SCHMITT-VERHULST, A.-M. (1994) The degree of CD8 dependence of cytolytic T cell precursors is determined by the nature of the T cell receptor (TCR) and influences negative selection in TCR-transgenic mice. *Eur. J. Immunol.*, **24**, 1572-1577.
- (8) BERTOLETTI, A., SETTE, A., CHISARI, F.V., PENNA, A., LEVRERO, M., DE CARLI, M., FIACCADORI, F., Y FERRARI, C. (1994) Natural variants of cytotoxic epitopes

- are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic cells. *Nature*, **369**, 407-410.
- (9) BROCKE, S., GAUR, A., PIERCY, C., GAUTAM, A., GIJBELS, K., FATHMAN, C.G., Y STEINMAN, L. (1993) Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigens. *Nature*, **365**, 642-644.
- (10) CRIADO, G., FEITO, M.J., Y ROJO, J.M. (1995) CD4-dependent and -independent association of protein tyrosine kinases to the TcR/CD3 complex of CD4⁺ T lymphocytes. (submitted)
- (11) CHAN, I.T., LIMMER, A., LOUIE, M.C., BULLOCK, E.D., FUNG-LEUNG, W.-P., MAK, T.M., Y LOH, D.Y. (1993) Thymic selection of cytotoxic T cells independent of CD8 α -Lck association. *Science*, **261**, 1581-1584.
- (12) DÍEZ-OREJAS, R., BALLESTER, S., FEITO, M.J., RONDA, M., OJEDA, G., CRIADO, G., PORTOLÉS, P., Y ROJO, J.M. (1994) Genetic and immunochemical evidence for CD4-dependent association of p56^{lck} with the $\alpha\beta$ T-cell receptor (TCR): regulation of TCR-induced activation. *EMBO J.*, **13**, 90-99.
- (13) DURUM, S.K., SCHMIDT, J.A., Y OPENHEIM, J.J. (1985) Interleukin 1: An immunological perspective. *Ann. Rev. Immunol.*, **3**, 263-287.
- (14) ELSON, C.J., BARKER, R.N., THOMPSON, S.J., Y WILLIAMS, N.A. (1995) Immunologically ignorant autoreactive T cells, epitope spreading, and repertoire limitation. *Immunol. Today*, **16**, 71-76.
- (15) EVAVOLD, N., SLOAN-LANCASTER, J., Y ALLEN, P.M. (1993) Tickling the TCR: Selective T-cell functions stimulated by altered peptide ligands. *Immunol. Today*, **14**, 602-609.
- (16) FEITO, M.J., BALLESTER, S., DÍEZ-OREJAS, R., OJEDA, G., PORTOLÉS, P., Y ROJO, J.M. (1995) CD4 dependence and signal threshold in T lymphocyte activation by antigen or by syngeneic antigen-presenting cells. (submitted).
- (17) FUJINAMI, R.S., Y OLDSTONE, M.B.A. (1985) Amino acid homology between the encephalitogenic site of Myelin Basic Protein and virus: Mechanism for autoimmunity. *Science*, **230**, 1043-1045.
- (18) GAUEN, L.K.T., TONY KONG, A.-N., SAMELSON, L.E., Y SHAW, A.S. (1992) p59^{lck} tyrosine kinase associates with multiple T-cell receptor subunits through its unique amino-terminal domain. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5438-5446.
- (19) GAUEN, L.K.T., ZHU, Y., LETOURNEUR, F., HU, Q., BOLEN, J.B., MATIS, L.A., KLAUSNER, R.D., Y SHAW, A.S. (1994) Interactions of p59^{lck} and ZAP-70 with T-cell receptor activation motifs: Defining the nature of a signalling motif. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3729-3741.
- (20) GOVERMAN, J., WOODS, A., LARSON, L., WEINER, L.P., HOOD, L., Y ZALLER, D.M. (1993) Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell*, **72**, 551-560.
- (21) HÄMMERLING, G.J., SCHÖNRICH, G., MOMBURG, F., AUPHAN, N., MALISSEN, M., MALISSEN, B., SCHMITT-VERHULST, A.-M., Y ARNOLD, B. (1991) Non-deletional mechanisms of peripheral and central tolerance: Studies with transgenic mice with tissue-specific expression of a foreign MHC class I antigen. *Immunol. Rev.*, **122**,

47-67.

- (22) HARLAN, D.M., HENGARTNER, H., HUANG, M.L., KANG, Y.H., ABE, R., MOREA-DITH, R.W., PIRCHER, H., GRAY, G.S., OHASHI, P.S., FREEMAN, G.J., NADLER, L.M., JUNE, C.H., Y AICHELE, P. (1994) Mice expressing both B7 and viral glycoprotein on pancreatic beta cells along with glycoprotein-specific transgenic T cell receptors develop diabetes due to a breakdown of lymphocyte unresponsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 3137-3141.
- (23) HERMAN, A., KAPPLER, J.W., MARRACK, P., Y PULLEN, A.M. (1991) Superantigens: Mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, **9**, 745-772.
- (24) HOGQUIST, K.A., JAMESON, S.C., HEATH, W.R., HOWARD, J.L., BEVAN, M.J., Y CARBONE, F.R. (1994) T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell*, **76**, 17-27.
- (25) HOOPER, D.C. (1987) Self-tolerance for erythrocytes is not maintained by clonal deletion of T helper cells. *IMMUNOL. TODAY*, **8**, 327-330.
- (26) HOOPER, D.C., YOUNG, J.L., ELSON, C.J., Y TAYLOR, R.B. (1987) Murine T cells reactive against autologous erythrocytes: Evidence for *in vitro* and *in vivo* priming with mouse and rat red blood cells. *Cell. Immunol.*, **106**, 53-61.
- (27) INGOLD, A.L., LANDEL, C., KANLL, C., EVANS, G.A., Y POTTER, T.A. (1991) Co-engagement of CD8 with the T cell receptor is required for negative selection. *Nature*, **352**, 721-723.
- (28) JAMESON, S.C., HOGQUIST, K.A., Y BEVAN, M.J. (1994) Specificity and flexibility in thymic selection. *Nature*, **369**, 750-752.
- (29) JAMESON, S.C., HOGQUIST, K.A., Y BEVAN, M.J. (1995) Positive selection of thymocytes. *Annu. Rev. Immunol.*, **13**, 93-126.
- (30) JANEWAY, C.A., JR., CONRAD, P.J., TITE, J.P., JONES, B., Y MURPHY, D.B. (1983) Efficiency of antigen presentation differs in mice differing at the *Mls* locus. *Nature*, **306**, 80-83.
- (31) JANEWAY, C.A., JR., DIANZANI, U., PORTOLÉS, P., RATH, S., REICH, E.P., ROJO, J.M., YAGI, J., Y MURPHY, D.B. (1989) Cross-linking and conformational change in T cell receptors: Role in activation and repertoire selection. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **54**, 657-666.
- (32) JANEWAY JR., C.A. (1994) Thymic selection: Two pathways to life and two to death. *Immunity*, **1**, 3-6.
- (33) JARAQUEMADA, D., Y MARTÍ, M. (1991) Presentación de antígeno a células T: diferentes vías de procesamiento para moléculas de clase I y clase II del complejo principal de histocompatibilidad. *Inmunología*, **10**, 109-117.
- (34) JONES, L.A., IZON, D.J., NIELAND, J.D., LINSLEY, P.S., Y KRUIBEEK, A.M. (1993) CD28-B7 interactions are not required for intrathymic clonal deletion. *Int. Immunol.*, **5**, 503-512.
- (35) JUNE, C.H., FLETCHER, M.C., LEDBETTER, J.A., SCHIEVER, G.L., SIEGEL, J.N., PHILLIPS, A.F., Y SAMELSON, L.E. (1990) Inhibition of tyrosine phosphorylation

- prevents T-cell receptor-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7722-7726.
- (36) KAUFMAN, D.L., CLARE-SALZLER, M., TIAN, J., FORSTHUBER, T., TING, G.S.P., ROBINSON, P., ATKINSON, M.A., SERCARZ, E.E., TOBIN, A.J., Y LEHMANN, V. (1993) Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature*, **366**, 69-72.
- (37) KAWABE, Y., Y OCHI, A. (1990) Selective anergy of V β 8⁺, CD4⁺ cells in staphylococcus enterotoxin B-primed mice. *J. Exp. Med.*, **172**, 1065-.
- (38) Kawabe, Y., y Ochi, A. (1991) Programmed cell death and extrathymic reduction of V β 8⁺ CD4⁺ T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature*, **349**, 245-.
- (39) KILLEEN, N., Y LITTMAN, D.R. (1993) Helper T-cell development in the absence of CD4-p56^{ck} association. *Nature*, **364**, 729-732.
- (40) KILLEEN, N., MORIARTY, A., TEH, H.-S., Y LITTMAN, D.R. (1992) Requirement for CD8-Major Histocompatibility Complex Class I interaction in positive and negative selection of developing T cells. *J. Exp. Med.*, **176**, 89-97.
- (41) KLENERMAN, P., ROWLAND-JONES, S., MCADAM, S., EDWARDS, J., DAENKE, S., LALLOO, D., KŠPPE, B., ROSENBERG, W., BOYD, D., EDWARDS, A., GIANGRANDE, P., PHILLIPS, R.E., Y MCMICHAEL, A.J. (1994) Cytotoxic T-cell activity antagonized by naturally occurring HIV-1 Gag variants. *Nature*, **369**, 403-407.
- (42) KOLANUS, W., ROMEO, C., Y SEED, B. (1993) T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell*, **74**, 171-183.
- (43) KROEMER, G., Y MARTÍNEZ-A., C. (1992) Clonal deletion, anergy and immunosuppression are connected in series to guarantee self-tolerance. *Res. Immunol.*, **143**, 335-340.
- (44) KYBURZ, D., AICHELE, P., SPEISER, D.E., HENGARTNER, H., ZINKERNAGEL, R.M., Y PIRCHER, H. (1993) T cell immunity after a viral infection versus T cell tolerance induced by soluble viral peptides. *Eur. J. Immunol.*, **23**, 1956-1962.
- (45) LEE, N.A., LOH, D.Y., Y LACY, E. (1992) CD8 surface levels alter the fate of α/β T cell receptor -expressing thymocytes in transgenic mice. *J. Exp. Med.*, **175**, 1013-1025.
- (46) LEHMANN, P.V., FORSTHUBER, T., MILLER, A., Y SERCARZ, E.E. (1992) Spreading of T cell autoimmunity cryptic determinants of an autoantigen. *Nature*, **358**, 155-157.
- (47) LIU, Y., JONES, B., BRADY, W., JANEWAY, C.A., Y LINLEY, P.S. (1992) Co-stimulation of murine CD4 T cell growth: cooperation between B7 and heat-stable antigen. *Eur. J. Immunol.*, **22**, 2855-2859.
- (48) MAMULA, M.J. (1993) The inability to process a self-peptide allows autoreactive T cells to escape tolerance. *J. Exp. Med.*, **177**, 567-571.
- (49) MAMULA, M.J., Y JANEWAY, C.A. (1993) Do B cells drive the diversification of immune responses? *Immunol. Today*, **14**, 151-152.
- (50) MARRACK, P., IGNATOWICZ, L., KAPPLER, J.W., BOYMEL, J., Y FREED, J.H.

- (1993) Comparison of peptides bound to spleen and thymus class II. *J. Exp. Med.*, **178**, 2173-2183.
- (51) MURPHY, K.M., HEIMBERGER, A.B., Y LOH, D.Y. (1990) Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺ TCR^{lo} thymocytes in vivo. *Science*, **250**, 1720-1723.
- (52) MUSTELIN, T. (1994) T cell antigen receptor signaling: Three families of tyrosine kinases and a phosphatase. *Immunity*, **1**, 351-356.
- (53) MUSTELIN, T., COGGESHALL, K.M., ISAKOV, N., Y ALTMAN, A. (1990) T cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C requires tyrosine phosphorylation. *Science*, **247**, 1584-1587.
- (54) NAKAYAMA, K.-I., Y LOH, D.Y. (1992) No requirement for p56^{lck} in the antigen-stimulated clonal deletion of thymocytes. *Science*, **257**, 94-96.
- (55) NEGISHI, I., MOTOYAMA, N., NAKAYAMA, K., NAKAYAMA, K., SENJU, S., HATAKEYAMA, S., ZHANG, Q., CHAN, A.C., Y LOH, D.Y. (1995) Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature*, **376**, 435-438.
- (56) NOVAK, T.J., FARBER, D., LEITENBERG, D., HONG, S.-C., JOHNSON, P., Y BOTTOMLY, K. (1994) Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect T cell recognition. *Immunity*, **1**, 109-111.
- (57) OHASHI, P.S. (1994) "Ignorance is bliss". *The Immunologist*, **2**, 87-92.
- (58) OHASHI, P.S., OEHEN, S., AICHELE, P., PIRCHER, H., ODERMATT, B., HERRERA, P., HIGUCHI, Y., BUERKI, K., HENGARTNER, H., Y ZINKERNAGEL, R.M. (1993) Induction of diabetes is influenced by the infectious virus and local expression of MHC class I and TNF- α . *J. Immunol.*, **150**, 5185-5194.
- (59) OHASHI, P.S., OEHEN, S., BUERKI, K., PIRCHER, H., OHASHI, C.T., ODERMATT, B., MALISSEN, B., ZINKERNAGEL, R.M., Y HENGARTNER, H. (1991) Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell*, **65**, 305-317.
- (60) OJEDA, G., RONDA, M., BALLESTER, S., DÍEZ-OREJAS, R., FEITO, M.J., GARCÍA-ALBERT, L., ROJO, J.M., Y PORTOLÉS, P. (1995) A hyperreactive variant of a CD4⁺ T cell line is activated by syngeneic antigen presenting cells in the absence of antigen. *Cell. Immunol.*, **164**, 265-278.
- (61) OLDSTONE, M.B.A., NERENBERG, M., SOUTHERN, P., PRICE, J., Y LEWICKI, H. (1991) Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: Role of anti-self (virus) immune response. *Cell*, **65**, 319-331.
- (62) PIRCHER, H., HOFFMANN ROHRER, U., MOSKOPHIDIS, D., ZINKERNAGEL, R.M., Y HENGARTNER, H. (1991) Lower receptor avidity required for thymic clonal deletion than for effector T-cell function. *Nature*, **351**, 482-485.
- (63) RAMMENSEE, H.-G., KROSCHEWSKI, R., Y FRANGOULIS, B. (1989) Clonal anergy induced in mature V β 6⁺ T lymphocytes on immunizing Mls-1^b mice with Mls-1^a expressing cells. *Nature*, **339**, 541-.
- (64) ROBEY, E.A., FOWLKES, B.J., GORDON, J.W., KIOUSSIS, D., VON BOEHMER, H.,

- RAMSDELL, F., Y AXEL, R. (1991) Thymic selection in CD8 transgenic mice supports an instructive model of commitment to a CD4 or CD8 lineage. *Cell*, **64**, 99-107.
- (65) ROBEY, E.A., RAMSDELL, F., KIOUSSIS, D., SHA, W.C., LOH, D.Y., AXEL, R., Y FOWLKES, B.J. (1992) The level of CD8 expression can determine the outcome of thymic selection. *Cell*, **69**, 1089-1096.
- (66) ROCHA, B., Y VON BOEHMER, H. (1991) Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science*, **251**, 1225-.
- (67) ROJO, J.M., Y JANEWAY JR., C.A. (1988) The biologic activity of anti-T cell receptor V region monoclonal antibodies is determined by the epitope recognized. *J. Immunol.*, **140**, 1081-1088.
- (68) ROJO, J.M., SAIZAWA, K., Y JANEWAY, C.A., JR. (1989) Physical association of CD4 and the T-cell receptor can be induced by anti-T-cell receptor antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3311-3315.
- (69) ROTHENBERG, E.V. (1994) Signaling mechanisms in thymocyte selection. *Curr. Opinion Immunol.*, **6**, 257-265.
- (70) SADLACK, B., MERZ, H., SCHORLE, H., SCHIMPL, A., FELLER, A., Y HORAK, I. (1993) Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*, **75**, 253-261.
- (71) SAIZAWA, K., ROJO, J.M., Y JANEWAY, C.A., JR. (1987) Evidence for a physical association of CD4 and the CD3: α : β T-cell receptor. *Nature*, **328**, 260-263.
- (72) SAMELSON, L., PHILLIPS, A.F., LUONG, E.T., Y KLAUSNER, R.D. (1990) Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4358-4362.
- (73) SEBZDA, E., WALLACE, V.E., MAYER, J., YEUNG, R.S.M., MAK, T.W., Y OHASHI, P.S. (1994) Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. *Science*, **263**, 1615-1618.
- (74) SHAHINIAN, A., PFEFFER, K., LEE, K.P., KUNDIG, T.M., KISHIHARA, K., WAKEHAM, A., KAWAI, K., OHASHI, P.S., THOMPSON, C., Y MAK, T.M. (1993) Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science*, **261**, 609-612.
- (75) SINHA, A.A., LOPEZ, M.T., Y MCDEVITT, H.O. (1990) Autoimmune diseases: The failure of self tolerance. *Science*, **248**, 1380-1387.
- (76) SLOAN-LANCASTER, J., EVAVOLD, B.D., Y ALLEN, P.D. (1993) Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature*, **363**, 156-159.
- (77) SLOAN-LANCASTER, J., EVAVOLD, B.D., Y ALLEN, P.M. (1994a) Th2 cell clonal anergy as a consequence of partial activation. *J. Exp. Med.*, **180**, 1195-1205.
- (78) SLOAN-LANCASTER, J., SHAW, A.S., ROTHBARD, J.B., Y ALLEN, P.M. (1994b) Partial T cell signaling: Altered phospho- ζ and lack of Zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell*, **79**, 913-922.
- (79) SPRENT, J., LO, D., GAO, E.K., Y RON, Y. (1988) T cell selection in the thymus.

LIFONCITOS T AUTORREACTIVOS

- Immunol. Rev.*, **101**, 173-190.
- (80) STEINMAN, L. (1995) Escape from "Horror Autotoxicus": Pathogenesis and treatment of autoimmune disease. *Cell*, **80**, 7-10.
- (81) TAKAHASHI, T., TANAKA, M., BRANNAN, C.I., JENKINS, N.A., COPELAND, N.G., SUDA, T., Y NAGATA, S. (1994) Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*, **76**, 969-976.
- (82) VAN OERS, N.S.C., GARVIN, A.M., DAVIS, C.B., FORBUSH, K.A., CARLOW, D.A., LITTMAN, D.R., PERLMUTTER, R.M., Y TEH, H.-S. (1992) Disruption of CD8-dependent negative and positive selection of thymocytes is correlated with a decreased association between CD8 and the protein tyrosine kinase, p56^{lck}. *Eur. J. Immunol.*, **22**, 735-743.
- (83) VASALLI, P. (1992) The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.*, **10**, 411-452.
- (84) VASQUEZ, N.J., KANE, L.P., Y HEDRICK, S.M. (1994) Intracellular signals that mediate thymic negative selection. *Immunity*, **1**, 45-56.
- (85) VON BOEHMER, H. (1990) Developmental biology of T cells in T cell-receptor transgenic mice. *Ann. Rev. Immunol.*, **8**, 531-556.
- (86) VON BOEHMER, H., Y KISIELOW, P. (1990) Self-nonself discrimination by T cells. *Science*, **248**, 1369-1373.
- (87) VON BOEHMER, H., TEH, H.S., Y KISIELOW, P. (1989) The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol. Today*, **10**, 57-61.
- (88) VORONOVA, A.F., Y SEFTON, B.M. (1986) Expression of a new tyrosine protein kinase is stimulated by retrovirus promoter insertion. *Nature*, **319**, 682-685.
- (89) WALLACE, V.A., PENNINGER, J., Y MAK, T.W. (1993) CD4, CD8 and tyrosine kinases in thymic selection. *Curr. Opinion Immunol.*, **5**, 235-240.
- (90) WARREN, H.S., VOGEL, F.R., Y CHEDID, L.A. (1986) Current status of immunological adjuvants. *ANN. REV. IMMUNOL.*, **4**, 369-388.
- (91) WATANABE-FUKUNAGA, R., BRANNAN, C.I., COPELAND, N.G., JENKINS, N.A., Y NAGATA, S. (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, **356**, 314-317.
- (92) WATERHOUSE, P., PENNINGER, J.M., TIMMS, E., WAKEHAM, A., SHAHINIAN, A., LEE, K.P., THOMPSON, G.B., GRIESSER, H., Y MAK, T.W. (1995) Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. *Science*, **270**, 985-988.
- (93) WEBB, S.R., Y GASCOIGNE, N.R.J. (1994) T-cell activation by superantigens. *Curr. Opinion Immunol.*, **6**, 467-475.
- (94) WEISS, A. (1993) T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell*, **73**, 209-212.
- (95) YAGI, J., Y JANEWAY, C.A., JR. (1990) Ligand threshold at different stages of T cell development. *Int. Immunol.*, **2**, 83-89.
- (96) ZAUDERER, M. (1989) Origin and significance of autorreactive T cells. *Adv. Immunol.*, **45**, 417-437.

Citoquinas inmunopotenciadoras e inmunosupresoras en autoinmunidad

Por

ABEL GAYO; LOURDES MOZO; CARMEN GUTIÉRREZ
Servicio de Inmunología.- Hospital Central de Asturias.- Celestino Villamil s/n.- 33006 - Oviedo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.
2. CARACTERÍSTICAS DE LAS CITOQUINAS.
3. PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS.
 - 3.1 **Mecanismos moleculares implicados en la síntesis de citoquinas. y su regulación.**
 - 3.2 **Dicotomía Th1/Th2.**
4. RECEPTORES DE CITOQUINAS.
 - 4.1 **Mecanismos de transducción de señales.**
5. MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS.
6. CITOQUINAS Y AUTOINMUNIDAD.
 - 6.1 **Papel de las citoquinas en la autoinmunidad.**
 - 6.1.1 *Esclerosis múltiple.*
 - 6.1.2 *Artritis reumatoide.*
7. INMUNOTERAPIA
8. BIBLIOGRAFÍA

1.- INTRODUCCIÓN

Los diferentes tipos celulares que conforman el sistema inmunológico se comunican entre sí a través de contactos físicos célula-célula constituyendo una verdadera "sinapsis inmunológica". Estas interacciones son posibles gracias a la presencia en la superficie celular de receptores y moléculas de adhesión que se anclan específica y complementariamente. Además, las células pueden comunicarse a través de mediadores solubles de naturaleza polipeptídica denominados genéricamente *citoquinas*. En un

principio estos mediadores fueron denominados *linfoquinas* ya que este término se refería únicamente a los polipéptidos liberados por los linfocitos, y debido a que su función se ejercía entre estas células, recibieron también el nombre de *interleuquinas*. Sin embargo, hoy sabemos que existen otros tipos celulares que no son linfocitos y que también liberan al medio dichos mediadores, por lo que el término más adecuado para catalogar a todos ellos es el de *citoquinas*.

Estas moléculas que participan de manera activa en el sistema inmunológico no solamente producen una amplificación de la respuesta inmune, llevada a cabo por las llamadas citoquinas inmunopotenciadoras, sino que también pueden ejercer una marcada inmunosupresión (citoquinas

Tabla 1

Principales citoquinas inmunopotenciadoras e inmunosupresoras

INMUNOPOTENCIADORAS	INMUNOSUPRESORAS
IL-1	IL-4
IL-2	IL-10
IL-6	IL-13
IL-8	TGF- β
TNF- α	
TNF- β	
IFN- γ	

inmunosupresoras) (tabla 1). La respuesta última que las citoquinas desencadenan depende de gran número de factores, como pueden ser el tipo celular sobre el que actúan, las condiciones de crecimiento del medio, el estado de diferenciación celular, etc, lo que ocasiona, por lo tanto, que citoquinas inmunopotenciadoras puedan desarrollar acciones propias de las

citoquinas inmunosupresoras y viceversa. Además, estas moléculas pueden llevar a cabo diferentes actividades biológicas en diferentes células, fenómeno conocido como pleiotropía y a su vez, diferentes citoquinas pueden ejercer funciones similares sobre un mismo tipo celular (redundancia).

El mecanismo por el cual se origina una pérdida de la tolerancia y se produce un ataque del sistema inmunológico contra el propio organismo sigue siendo un enigma. Sin embargo, las citoquinas parecen jugar un papel muy importante en los procesos autoinmunes tanto en las fases iniciales como, especialmente, en los estadios más avanzados de la enfermedad. Debido a ello, se están llevando a cabo un gran número de investigaciones para elucidar el papel que juega cada una de las citoquinas en el desarrollo y evolución de las diversas enfermedades autoinmunes. Basadas en estos estudios se están desarrollando numerosas terapias experimentales, tanto en modelos animales como en humanos, tendentes a modular la producción y los efectos patológicos de estas importantes moléculas.

2.- CARACTERÍSTICAS DE LAS CITOQUINAS

Las citoquinas representan un grupo muy amplio de moléculas con secuencia aminoacídica y estructura tridimensional variada, aunque presentan algunas características comunes. Todas ellas tienen bajo peso molecular, generalmente entre 15-25 kD y están compuestas por 120-180 aminoácidos. La glicosilación no parece ser esencial para su actividad biológica, aunque confiere mayor estabilidad y solubilidad a la molécula. Actúan a muy bajas concentraciones, del orden de picogramos, debido posiblemente, a la presencia en la superficie celular de receptores de alta afinidad ($k_d = 10^{-9}$ - 10^{-11}) (1).

Las citoquinas se agrupan en familias atendiendo a las células que las producen y sobre todo, atendiendo a ciertas características comunes, como su origen celular, su estructura genómica o su naturaleza bioquímica. Así, la familia de la interleuquina 4 (IL-4), que comprende la IL-4, la IL-3, la IL-5, la IL-13 y el factor estimulador de colonias granulocito-

macrófago (granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) presenta la característica común de poseer una estructura terciaria formada por cuatro hélices, de las cuales la primera y la segunda son paralelas entre sí y a su vez antiparalelas a las dos restantes (2). En cuanto a los genes que codifican estas citoquinas se encuentran físicamente próximos, situados en el brazo largo del cromosoma 5 (5q 23-31), lo que implica que en muchas ocasiones la regulación de uno de estos genes afecte o modifique la de genes próximos (3). En algunas ocasiones, las citoquinas desencadenan funciones muy similares sobre las células diana, como es el caso de la IL-4 y la IL-13. Ambas citoquinas aumentan la proliferación de linfocitos B y de ciertos clones de linfocitos T, favorecen la expresión de moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (major histocompatibility complex, MHC) en monocitos y linfocitos B, e inhiben la producción de linfoquinas por parte de los macrófagos. De forma similar la IL-3, la IL-5 y el GM-CSF tienen un efecto común sobre células precursoras del sistema hematopoyético favoreciendo su proliferación (4).

Las citoquinas, para ejercer su función biológica, adquieren diferentes estructuras cuaternarias. La IL-2, la IL-3 y la IL-4 se presentan como monómeros, mientras que la IL-5 o el factor de crecimiento transformante (transforming growth factor, TGF) lo hacen en forma de homodímeros asociados no covalentemente. En el caso de la IL-12, se produce la formación de un heterodímero formado por dos unidades de 35 y 40 kD asociadas no covalentemente. El factor de necrosis tumoral (tumor necrosis factor, TNF), por su parte, adquiere una estructura final de trímero (5).

3.- PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS

3.1. **Mecanismos moleculares implicados en la síntesis de citoquinas y su regulación**

Las citoquinas no son producidas de forma constitutiva sino que suelen sintetizarse de forma transitoria o inducible, debido a una activación antigénica, a la presencia de endotoxinas, de activadores específicos o de activadores no específicos denominados genéricamente mitógenos. La síntesis de cada citoquina está estrictamente regulada,

Tabla 2
Papel de las citoquinas mejor estudiadas

CITOQUINA	CELULA PRODUCTORA	CELULA DIANA	ACCIONES
IL-1	Monocitos, otra CPA, células somáticas	Linfocitos T, B, neutrófilos, linocitos	Inmunorregulación, inflamación, fiebre
IL-2	Linfocitos T, NK	Linfocitos T, B, monocitos	Proliferación, inflamación
IL-3	Linfocitos T	Células progenitoras	Proliferación
IL-4	Linfocitos T	Linfocitos T, B	Proliferación, diferenciación
IL-5	Linfocitos T	Linfocitos B, eosinófilos	Diferenciación
IL-6	Linfocitos T, CPA, células somáticas	Linfocitos T, B, hepatocitos, timocitos	Diferenciación, síntesis proteínas de fase aguda
IL-8	Macrófagos, células somáticas	Linfocitos T, granulocitos	Quimiotaxis, diferenciación
IL-10	Linfocitos T, B, macrófagos	Linfocitos T, B	Inmunorregulación
IL-13	Linfocitos T, CPA	Linfocitos T, B	Proliferación, diferenciación
IFN- γ	Linfocitos T, NK	Linfocitos T, monocitos, células hístias	Inmunorregulación, acciones antivíricas
TNF- α	Linfocitos T, B, macrófagos	Fibroblastos, células endoteliales	Inmunorregulación, inflamación, catabolismo
TGF- β	Linfocitos T, macrófagos, Plaquetas, células somáticas	Linfocitos, macrófagos CPA, fibroblastos	Quimiotaxis inmunorregulación

CPA: Célula presentadora de antígeno

variando su producción según el tipo de célula productora y el estímulo de activación. Sin embargo, un mismo tipo celular puede secretar más de una citoquina como respuesta a diferentes estímulos. En la tabla 2 se indican las distintas citoquinas, sus principales células productoras y los efectos biológicos más relevantes de cada una de ellas.

La expresión de citoquinas derivadas del linfocito T se regula por la transducción de señales que se inician cuando su receptor de superficie, (T cell receptor, TCR) reconoce un antígeno en conjunción con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad presentes en la célula presentadora del antígeno. Es necesario además, una interacción entre otras moléculas de superficie presentes tanto en el linfocito T como en la célula presentadora de antígeno para que se produzca una correcta estimulación del linfocito T y así se desencadene la producción de citoquinas. Posiblemente la interacción mejor caracterizada es la que ocurre entre las moléculas CD28 en el linfocito T y las moléculas B7 en la célula presentadora. Posteriormente tiene lugar la fosforilación de gran número de proteínas en sus residuos tirosina, proceso que es llevado a cabo por quinasas de tirosina y la activación de fosfolipasas como la fosfolipasa C. La fosforilación de proteínas citoplasmáticas y de factores de transcripción originan, como veremos posteriormente, un aumento en la tasa de transcripción de los genes de citoquinas. La fosfolipasa C, por su parte, hidroliza lípidos de inositol dando lugar a diacilglicerol y trifosfato de inositol, los cuales a su vez aumentan la concentración citoplásmica de segundos mensajeros como la proteína quinasa C y calcio, respectivamente. En la regulación de la producción de IL-2, cuyo promotor es el más conocido, la activación de estos segundos mensajeros conduce a la inducción de gran número de factores de transcripción que interaccionan específicamente con los diferentes elementos de respuesta presentes en el ADN (NF- κ B, AP-1, OCT-1, NF-AT, CD28RE). El resultado inmediato es un aumento en la tasa de transcripción del gen de la IL-2 (fig. 1) (6).

La producción de citoquinas tiene lugar durante un corto periodo de tiempo, estando sometida a una estricta regulación tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. Este estricto control se debe a que siendo estas moléculas extremadamente potentes y capaces de actuar en concentraciones de picogramos, una superproducción podría causar graves daños. Muchas de las citoquinas presentan en la región 3' no traducida de sus RNAm secuencias ricas en AU que facilitan su rápida de-

gradación, evitando, por tanto, una producción exagerada perjudicial para el organismo.

Las funciones biológicas de las citoquinas están también reguladas por la existencia *in vivo* de inhibidores que pueden operar a través de tres modos distintos. Algunos de estos inhibidores se unen a los receptores de citoquinas pero no activan la transducción de señales, por lo que actúan como antagonistas. Así, el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1 receptor antagonist, IL-1RA) compite con ella por su receptor (7). Se han descrito receptores solubles, originados por "splicing alternativo", para la IL-2, la IL-6, la IL-7 y el TNF uniéndose a sus ligandos específicos en el espacio extracelular e impidiendo, de esta manera, su unión al receptor de membrana. Además del papel inhibitor, estos receptores solubles podrían actuar como transportadores de las citoquinas y desempeñar otras funciones aún no determinadas (8). Otros mediadores solubles, que actúan sobre otro tipo de receptores celulares, pueden ejercer un efecto opuesto al que ejerce la citoquina cuando se une a su receptor (fig 2).

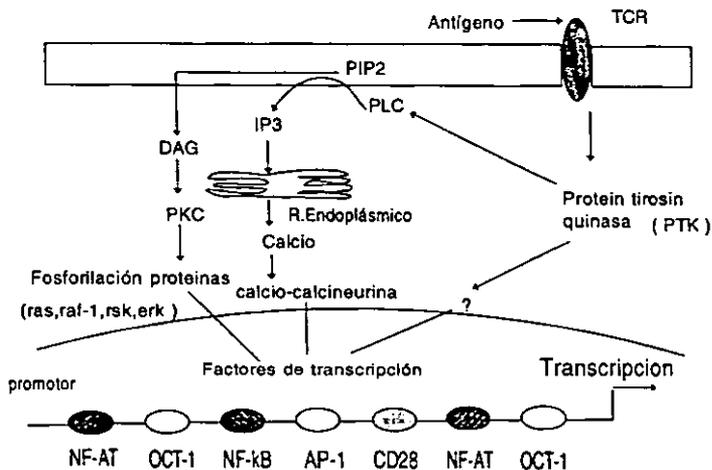


Fig 1.- Señales de transducción originadas tras la activación del linfocito T y que conducen a la expresión de citoquinas. PIP2: Fosfoinositol difosfato; IP3: Trifosfato de inositol. DAG: Diacilglicerol; PTK: protein tyrosin kinase; TCR: Receptor linfocito T; NF-AT, NF-kB, AP-1, OCT-1, CD28: sitios de unión de los factores de transcripción al ADN en el promotor de la IL-2

Una vez liberadas las citoquinas al medio extracelular, estas pueden ejercer su acción sobre las células más próximas a la célula productora (mecanismo paracrino), pero también pueden tener un efecto sobre la propia célula secretora (mecanismo autocrino). En algunos casos las citoquinas pueden actuar en órganos diana alejados de la célula productora a modo de como actúa el sistema endocrino y sus hormonas. Así, la IL-1, la IL-6 y el TNF que son producidas localmente en el lugar de la inflamación, emigran y alcanzan el hígado donde inducen la síntesis de proteínas de fase aguda, o llegan al sistema nervioso central induciendo la generación de un proceso febril. Para alcanzar dichos lugares diana, alejados de la célula productora, las citoquinas se valen de transportadores solubles presentes en el suero, como la beta-2-macroglobulina, o también de receptores solubles específicos para ciertas citoquinas.

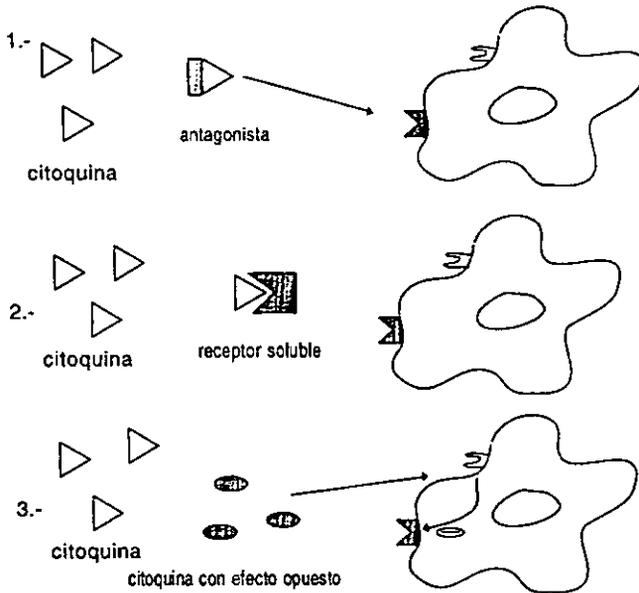


Fig 2.- *Diversos modos de acción de los inhibidores sobre la función de las citoquinas:* 1) antagonista que se une al receptor pero no desencadena la función propia de la citoquina; 2) receptor soluble que secuestra a la citoquina; 3) citoquina que ejerce un efecto opuesto.

3.2- Dicotomía Th1 / Th2

Algunas citoquinas como la IL-1, la IL-6, el TGF- β son producidas virtualmente por todos los tipos celulares, mientras que otras, sin embargo, son sólo producidas por un número restringido de células, como la IL-2, la IL-3, la IL-4, la IL-5 y el IFN- γ . Incluso dentro de una misma estirpe celular pueden existir diferentes subpoblaciones caracterizadas por el patrón de citoquinas que producen (9). Este es el caso de los linfocitos T helper CD4+ (Th-CD4+) que se han clasificado en Th1, secretores principalmente de citoquinas proinflamatorias como la IL-2, el IFN- γ , el TNF- α y el TNF β , y Th2 secretores de citoquinas con propiedades inmunosupresoras como la IL-4, la IL-5, la IL-10 y la IL-13.

Estos subtipos de linfocitos Th se originan de la diferenciación de clones precursores denominados Th0, productores de citoquinas de forma no restringida (10) (figura 3). Una característica importante que poseen

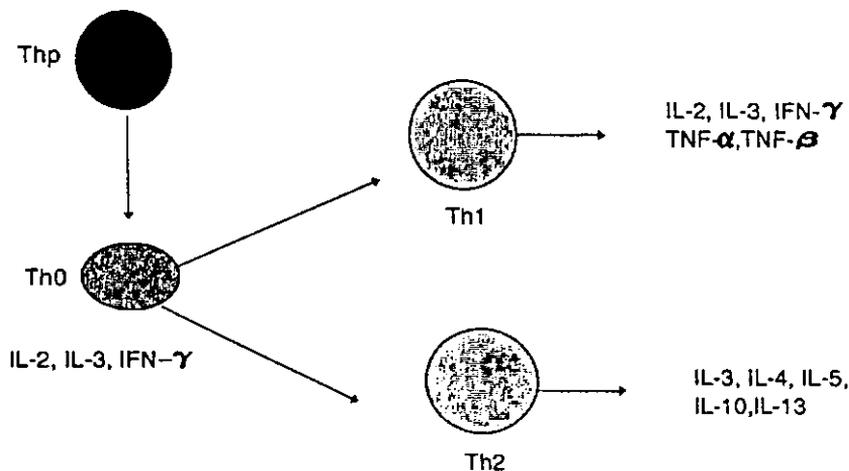


Fig. 3.- Producción de citoquinas proinflamatorias e inmunosupresoras por los diferentes clones de linfocitos helper CD4+.

ambos tipos celulares es su habilidad para regularse mutuamente (11). Así, el IFN- γ inhibe la proliferación de las células Th2, mientras que la IL-10

inhibe la producción de ciertas citoquinas por las células de Th1 (fig. 4). Pero además, las citoquinas producidas por una subpoblación pueden modificar el efecto o mecanismo de acción de las citoquinas producidas por la otra subpoblación, como es el caso del efecto inhibitorio del IFN- γ sobre la inducción de la activación de linfocitos B por la IL-4, mientras que la IL-4 potencia la proliferación inducida por la IL-2 en linfocitos T y B.

La distinta capacidad en la producción de citoquinas hace que tanto las células Th1 como las Th2 ejerzan también funciones efectoras diferentes y que, por lo tanto, se vean involucradas en procesos inmunopatológicos distintos. Las células Th2 participan preferentemente en la respuesta humoral, en reacciones frente a parásitos y en procesos alérgicos, mientras que las Th1 lo hacen en procesos de hipersensibilidad retardada y en reacciones inflamatorias (12).

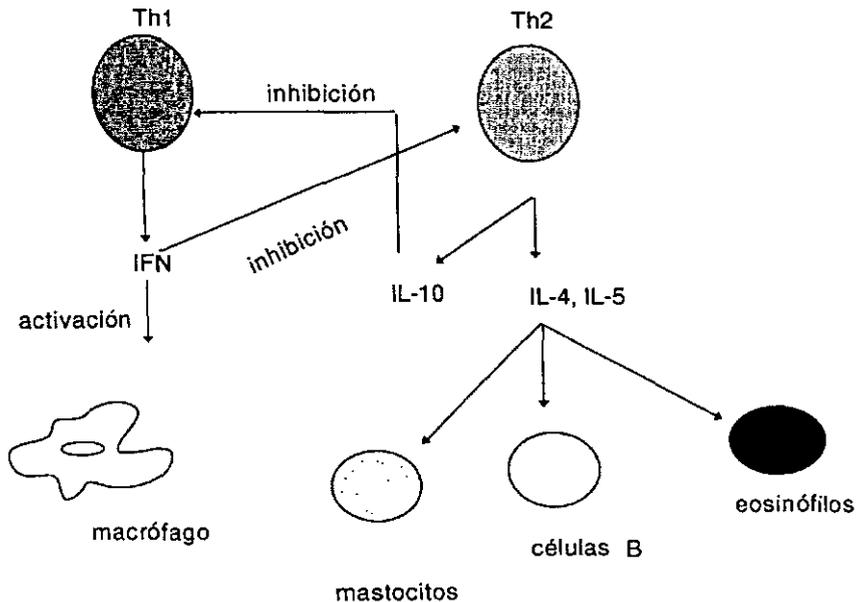


Fig 4.- Interacción entre las diferentes citoquinas secretadas por Th1 y Th2 y diferentes tipos celulares.

4.- RECEPTORES DE CITOQUINAS

Para que las citoquinas puedan ejercer su efecto biológico es necesario que se unan a receptores expresados en la superficie de las células diana. Estas moléculas se expresan en bajo número en la superficie celular, del orden de 100 a 1000 por célula. La mayoría de los receptores de citoquinas son complejos proteicos compuestos por una cadena específica de unión al ligando y una cadena común a varios receptores que es esencial para la transducción de señales. Los receptores para la IL-1, la IL-4 y la IL-6 se expresan en varios tipos celulares y de forma constitutiva, mientras que otros, como los receptores de la IL-2 y de la IL-5, se expresan de forma más restringida. En el caso del receptor para la IL-2 se requiere de una activación celular para que se produzca su expresión.

La clonación de muchos de estos receptores ha permitido clasificarlos en tres familias según su estructura: la del receptor del factor de necrosis tumoral (13), la del supergen de inmunoglobulinas (14) y la del receptor del factor de crecimiento hematopoyético (15). Todos estos receptores son proteínas de membrana glicosiladas con un único dominio transmembranal que separa la región extracitoplásmica, de unión con la citoquina, de la región citoplásmica. Una excepción es el receptor de la IL-8 que contiene 7 dominios transmembranales, característica que también presentan los receptores asociados a proteínas G.

La mayoría de los receptores de citoquinas quedan englobados en la familia del factor de crecimiento hematopoyético, por lo que también se denomina superfamilia de los receptores de citoquinas. Los receptores de esta familia no poseen dominios citoplasmáticos con actividad catalítica y se dividen, según su homología estructural, en dos clases relacionadas evolutivamente. La clase 1 está compuesta fundamentalmente por un gran número de receptores para citoquinas mientras que en la clase 2 se incluyen los receptores para interferones. Dentro de la clase 1 se engloban los siguientes receptores: IL-2R (β y γ), IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-7R, IL-9R, IL-11R, IL-12R, IL-15R, GM-CSFR y los receptores del factor inhibidor de la leucemia (leukemia inhibitory factor receptor, LIFR), de la eritropoyetina (erythropoietin receptor, EPOR), de la oncostatina M (oncostatin M, OMR) y de la trombopoyetina (thrombopoietin receptor, TPOR). Los receptores de estas citoquinas se caracterizan por una región

de homología de aproximadamente 200 aminoácidos en el dominio extracitoplasmático. En concreto, presenta dos pares de cisteínas, conservadas en la región amino terminal y una secuencia Tryp-Ser-X-Tryp-Ser (WSXWS, donde X es un aminoácido no conservado) en la posición carboxiterminal. Estructuralmente esta región está compuesta por dos módulos de fibronectina III (16). Estos módulos tienen un tamaño de 100 aminoácidos, consistentes en 7 cadenas β colocadas antiparalelamente, formando una estructura de barril y conectadas por una región bisagra en la que se encuentra el motivo WSXWS (17). Un estudio cristalográfico del receptor de la hormona del crecimiento reveló que la región de contacto entre el receptor y el ligando reside en esta región bisagra. Por otra parte, los ligandos de estos receptores tienen una estructura común de 4 helices α interconectadas por lazos peptídicos (18).

Dentro de la clase 2 de receptores de la superfamilia de los receptores de citoquinas se incluyen los receptores para los interferones (receptor de tipo I para el IFN- α y β y receptor de tipo II para el IFN- γ), el factor tisular (tissue factor, TF) que es un receptor de membrana para la proteasa del factor VII de coagulación y, posiblemente, el receptor de la IL-10 ya que presenta una elevada homología estructural con estos receptores (19).

4.1- Mecanismos de transducción de señales

Las cadenas que componen los receptores de citoquinas no presentan motivos con actividad tirosina quinasa en su parte citoplasmática. Se han identificado recientemente las quinasas de la familia Janus (Janus Kinase, JAK) y los factores de transcripción STAT (signal transducer activators of transcription) que intervienen de forma específica en la señalización de las citoquinas.

El primer paso en la señalización, tras la unión de la correspondiente citoquina, es la homodimerización de sus receptores (unión de dos cadenas específicas del receptor) o heterodimerización (unión de la cadena específica con otra común a varios receptores). A continuación, el receptor se asocia con una quinasa JAK activándola, esta fosforila los residuos de tirosina del propio receptor y de los STAT, que a su vez se dimerizan y

se translocan al núcleo donde se unen al ADN en los elementos de respuesta a citoquinas. Posteriormente, una vez que el receptor ha sido fosforilado, se produce también la activación de moléculas adaptadoras, principalmente Shc y Grb2, que intervienen en el paso de Ras-GDP(inactivo) a Ras-GTP (activo). Una vez activado, se une a una treonina/serina quinasa, Raf-1, que activa la cascada de quinasas de proteínas activadas por mitógenos (mitogen activated protein kinases, MAPKs). Finalmente las MAPKs activadas se translocan al núcleo donde fosforilan otros factores de transcripción, los cuales, junto con los dímeros de los STATs, modulan la transcripción de los genes respondedores (fig 5).

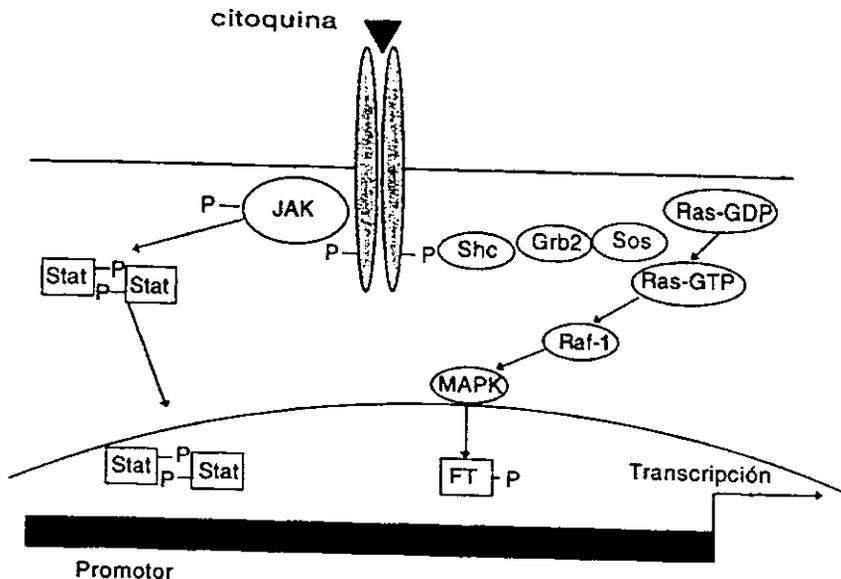


Fig 5.- Esquema general de la señalización por los receptores de citoquinas.

La dimerización del receptor inducida por su unión con el ligando provoca la fosforilación y activación de las JAKs. Estas quinasas fosforilan y activan los Stats que, a continuación, se dimerizan translocándose al núcleo donde se unen a elementos del ADN respondedores de citoquinas afectando a la transcripción. Por otra parte, la fosforilación del receptor, producida probablemente por JAKs, induce su asociación con moléculas adaptadoras de la vía de Ras-GTP, de la quinasa Raf-1 y de la cascada de quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPKs) produciéndose en último término la activación de factores de transcripción (FT).

El hecho de que algunos receptores compartan una misma cadena para la transducción de señales y que la unión del ligando con el receptor active los mismos factores de transcripción puede explicar la redundancia y el pleiotropismo funcional de algunas citoquinas.

5.- MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS

La medición de los niveles de expresión de los genes de citoquinas y su cuantificación en los distintos fluidos corporales y tejidos es esencial para conocer el papel patogénico de estas moléculas en los diferentes procesos autoinmunes. Si a ésto añadimos que muchas enfermedades susceptibles de un tratamiento inmunoterápico se pueden servir de la llamada "terapia anticitoquina", obliga al empleo de métodos de medición sensibles y reproducibles, que permitan su valoración en los diferentes ensayos clínicos (20).

A la hora de efectuar la medición de estos mediadores biológicos deben tenerse en cuenta varias consideraciones. En primer lugar se pueden medir los niveles proteicos en los fluidos corporales, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, etc o la expresión en las células de los órganos diana, siempre que éstas sean accesibles. En algunas ocasiones no existe una buena correlación entre los niveles de citoquinas en los fluidos biológicos y los síntomas clínicos de la enfermedad lo cual puede deberse a la producción local de citoquinas en los órganos afectados (21). En enfermedades autoinmunes del tiroides se han detectado por inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, niveles elevados de ARNm de IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α e IFN- γ . Recientemente se ha demostrado que células epiteliales del tiroides pueden sintetizar citoquinas durante el proceso autoinmune, lo que pone de manifiesto la importancia de la producción local de las citoquinas (22,23).

La expresión de citoquinas y su correspondiente medición puede hacerse a varios niveles:

- *A nivel de ARN mensajero.* Muchas citoquinas son expresadas a niveles tan bajos que la detección protéica de la misma resulta en ocasiones difícil, por lo que se han desarrollado potentes métodos de detección de los niveles de expresión de los diferentes genes que se están

transcribiendo en la célula. El método más comúnmente usado es el Northern blot. Una vez extraído el ARN, se separa mediante una electroforesis en gel de agarosa y, posteriormente, se transfiere a un soporte sólido como puede ser una membrana de nylon donde son detectados mediante sondas radiactivas específicas los distintos transcritos de ARNm.

El hecho de que las citoquinas se produzcan a niveles muy bajos o que el número de células disponibles para estudiar su expresión sea muy pequeño, obliga en ocasiones a la utilización de técnicas más sensibles, como es la de transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (reverse transcriptase - polimerase chain reaction, RT-PCR). En esta técnica se debe sintetizar ADN complementario a partir de ARN, proceso que se lleva a cabo mediante un enzima con actividad retrotranscriptasa. Posteriormente, dos oligonucleótidos que actúan de cebadores para la acción de un enzima con actividad polimerasa se anclan a ambos lados de la secuencia de ADN que se va a amplificar. El enzima extiende ahora la secuencia, flanqueada por los cebadores, utilizando como molde el ADN complementario. Este proceso se puede repetir gran número de veces con lo que se consigue amplificar y detectar la expresión de la citoquina en estudio, aunque ésta se encuentre a niveles bajos difíciles de determinar por métodos menos sensibles.

La hibridación *in situ* ofrece ciertas ventajas respecto a los dos métodos anteriores. Como su nombre indica, la hibridación se realiza sobre las mismas células productoras de los transcritos que se desea estudiar. Este método evita así el aislamiento del ARN, al tiempo que proporciona información sobre las células productoras o la distribución y frecuencia de éstas en el tejido en estudio.

- *A nivel de proteína.* El método más comúnmente usado es el ensayo ELISA (enzyme linked immunoassay). En este ensayo un anticuerpo monoclonal frente a la citoquina en estudio, se fija a un soporte sólido. Una vez que hayan interactuado específicamente el anticuerpo monoclonal con la citoquina, se añade un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente. Esta enzima cataliza ahora una reacción en la cual su sustrato genera un producto que da un color cuya intensidad es fácilmente medible espectrofotométricamente. Valores de espectrofotometría altos se

corresponden con mayores concentraciones de la citoquina en el fluido en estudio. Una variante de este ensayo lo constituye el llamado ELISPOT, que permite conocer la frecuencia de células sintetizadoras de una determinada citoquina. El fundamento del ensayo es similar al ELISA salvo que en este caso se lleva a cabo haciendo crecer las células en pocillos donde previamente se ha fijado un anticuerpo frente a la citoquina. Después de una corta incubación de las células en presencia de mitógenos, la citoquina liberada es "atrapada" por el anticuerpo. El revelado posterior se hace como en el ensayo ELISA, dando lugar a una reacción colorimétrica proporcional al número de células productoras de la citoquina.

Sin embargo, el hecho de que se detecte una citoquina en un fluido corporal o en un tejido, no significa que necesariamente sea una proteína inmunológicamente activa. Para ello se deben realizar ensayos biológicos o bioensayos, que detectan la actividad funcional de las citoquinas sobre líneas celulares respondedoras específicamente a ciertas citoquinas. Dichas líneas responden mediante procesos de proliferación, citotoxicidad o producción de inmunoglobulinas fácilmente medibles en el laboratorio y que nos informan sobre la capacidad funcional de la citoquina en estudio.

A la hora de interpretar los resultados obtenidos se deben tener en cuenta los siguientes aspectos. La presencia de altos niveles de expresión de ARN no siempre se correlacionan con altos niveles de proteína, ya que existen complejos mecanismos postranscripcionales que gobiernan la tasa de la producción proteica. Así, en pacientes con esclerosis múltiple se detectó mediante hibridación *in situ*, gran número de células que expresaban ARNm de IL-4 e IFN- γ , mientras que no se constataron niveles elevados de estas citoquinas a nivel de proteína. Así mismo, niveles detectables de proteína, no siempre se traducen en niveles altos de proteína biológicamente activa. La presencia en el suero de proteasas que degradan las citoquinas hace que muchas veces, las mediciones obtenidas por ELISA no se correspondan con la presencia de proteínas activas detectada en los ensayos biológicos. El almacenaje, pues, de los sueros y demás fluidos deberá hacerse en presencia de inhibidores de estas proteasas.

La presencia de receptores solubles u otras proteínas transportadoras, que hemos venido comentando, también puede alterar los

resultados en las mediciones proteicas, ya que, en estos casos, la no detección de las citoquinas, no significa que no se produzcan, sino que su "secuestro" por parte de estas moléculas impide su detección por los métodos antes mencionados.

Debido a los numerosos problemas expuestos, relacionados con la cuantificación de las citoquinas, creemos conveniente su determinación por más de una técnica, combinando, cuando sea posible, métodos inmunológicos con técnicas funcionales. Es necesario además, avanzar más en la estandarización y reproducibilidad de los métodos, dada la importancia que tiene, para el estudio clínico-evolutivo de ciertas enfermedades la determinación precisa de los niveles de citoquinas, como es el caso de la esclerosis múltiple donde parece que aumentos de TNF- α preceden a periodos de recaídas, a los que pueden seguir periodos de remisión del brote que se correlacionan con incrementos en la síntesis de citoquinas inmunosupresoras como la IL-10 o el TGF-B (24,25).

6.- CITOQUINAS Y AUTOINMUNIDAD

Son varios los mecanismos que conducen al proceso autoinmune en el cual las citoquinas están involucradas: incremento en la expresión de moléculas de clase I del MHC, expresión "aberrante" o ectópica de moléculas de clase II del MHC, regulación de la síntesis de moléculas de adhesión, proliferación y mantenimiento de células autorreactivas, etc. Las citoquinas son además responsables de muchas manifestaciones clínicas que aunque no son exclusivas de las enfermedades autoinmunes, son una clara sintomatología acompañante de estos procesos. Síntomas como fiebre, mialgias, artralgias, letargia, etc, suelen ser efectos secundarios típicos que se producen tras la administración de IFN- α (26). La asociación entre autoinmunidad y terapia con citoquinas está bien establecida. Cuando se trataron con IFN- α pacientes con hepatitis crónica o cáncer, era frecuente encontrar enfermedades autoinmunes del tiroides (hipertiroidismo o hipotiroidismo) (27,28). En la tabla 3 se enumeran diversos efectos adversos autoinmunes en relación con la terapia con IFN- α e IL-2 que pueden exacerbar un cuadro clínico autoinmune preexistente o inducir transitoriamente la aparición del mismo (29-46).

Tabla 3
 efectos adversos relacionados con la administración de IFN- α e IL-2

citoquina	efecto autoinmune relacionado	ref	
IFN- α	Enfermedad autoinmune del tiroides	29,30	
	Lupus eritematoso sistémico	29,31	
	Artropatías poliartricuales	32,33	
	Vasculitis (cutanea y digital)	29,34	
	Crioglobulinemia y fenómeno de Raynaud	35	
	Anemia autoinmune hemolítica	36	
	Trombocitopenia inmune	37,38	
	Anemia aplástica	39	
	Anemia perniciosa	29	
	Hepatitis crónica autoinmune	28	
	Inmunonefritis	40	
	Anticuerpos frente a tiroglobulina, antígeno tiroideo microsomal,ADN, antígenos nucleares,células epiteliales, células parietales y gástricas	29	
	IL-2	Enfermedad autoinmune del tiroides	41,42
		Exacerbación en artritis reumatoide	43
Vasculitis		43	
Exacerbación de la Enfermedad de Crohn		44	
Encefalomiелitis		45	
miocarditis		46	
psoriasis, pénfigo y vitiligo		43	
Autoanticuerpos variados	43		

Son muchas las enfermedades autoinmunes donde se han detectado alteraciones en los niveles de citoquinas. Así en el 60% de los pacientes de lupus eritematoso sistémico (LES), se encontraron altos niveles de IFN- α (47, 48). En la artritis reumatoide (AR), síndrome de Sjögren, esclerodermia, vasculitis, esclerosis múltiple (EM) y miastenia grave, se han encontrado aumentos en la expresión de los diferentes tipos de interferones (49,50). Otras citoquinas como el TNF se encuentran también incrementadas en AR, EM y Guillain-Barre. Altos niveles de IL-2 se detectaron en EM, y esclerodermia (51,52,53), mientras que en LES se han descrito resultados contradictorios. Los primeros estudios realizados en pacientes de LES reflejaron unos niveles bajos de producción de IL-2 que podrían explicarse por un proceso de "agotamiento" producido tras una continua activación sufrida *in vivo*. De esta manera, la continua producción de IL-2 en los estadios inflamatorios de la enfermedad originaría en el linfocito un proceso de retroalimentación negativa que tras la estimulación mitogénica *in vitro* haría que disminuyeran los niveles de IL-2. En la actualidad los niveles bajos de IL-2 en LES pueden explicarse por una hipotética tendencia hacia la diferenciación de Th2 en detrimento de los Th1 en estos pacientes.

6.1.- Papel de las citoquinas en los procesos autoinmunes

La presentación antigénica constituye un aspecto importante en la pérdida de tolerancia y el subsecuente desarrollo del proceso autoinmune. Una mayor presentación antigénica o una inadecuada presentación por células "no profesionales" puede agravar la respuesta autoinmune. Determinadas células como linfocitos B, macrófagos y células dendríticas son consideradas células "profesionales" en la presentación antigénica. Otros tipos celulares como las células de la microglía, astrocitos y ciertas células epiteliales no son células presentadoras de antígeno en condiciones normales, pero sí pueden constituirse en células presentadoras, bajo la influencia de ciertas citoquinas, como el IFN- γ que induce en estas células la expresión de moléculas de clase II del MHC. Esto podría explicar por qué los primeros ensayos llevados a cabo en pacientes de esclerosis múltiple a los que se les administraba IFN- γ , se producía una exacerbación

Tabla 4
 Expresión aberrante de moléculas HLA-DR en órganos diana de las enfermedades autoinmunes

Enfermedad	Células HLA-DR
Enfermedad de Graves y Hashimoto	Folículos tiroideos
Diabetes insulino dependiente	Células β pancreáticas
Cirrosis biliar primaria	Células del conducto biliar
Hepatitis activa crónica	Hepatocitos
Artritis reumatoide	Células sinoviales
Sindromen de Sjögren	Epitelio salivar
Esclerosis múltiple	Células gliales
Síndrome de Guillain-Barre	Células de Schwann
Síndrome de Behcet	Células mucosa oral
Uveítis	Células de la retina
Enfermedad inflamatoria intestinal	Células del colon
Fibrosis pulmonar idiopática	Epitelio alveolar
Cistitis intersticial	Células uroteliales
Psoriasis y lupus discoide	Queratinocitos

enfermedades autoinmunes organoespecíficas, donde existe una expresión "aberrante" de dichas moléculas. El TNF u hormonas, como la hormona estimulante del tiroides, también pueden aumentar la expresión de estas moléculas (55), mientras que otras citoquinas como el IFN- α , el IFN- β , el TGF- β o sustancias como la prostaglandina E, los corticoides y la ciclosporina inhiben esta expresión "aberrante" (56).

Para el desarrollo del proceso autoinmune inflamatorio es necesaria la migración de los linfocitos a los lugares donde tiene lugar la inflamación. Las citoquinas también influyen claramente en este "tráfico de linfocitos". Para que las células linfoides consigan migrar y llegar a determinados puntos donde tiene lugar el daño tisular, son necesarias ciertas moléculas que interaccionen con receptores de superficie situados en los linfocitos y que reciben genéricamente el nombre de "moléculas de adhesión". Dichas moléculas se expresan en células endoteliales, como ELAM-1 (endothelial adhesion molecule-1), en células que recubren vasos, VCAM-1 (vascular adhesion molecule-1) o ICAM-1 (intracelular adhesion molecule-1) y que se engarzan a modo de cremallera con los linfocitos facilitando así su extravasación al lugar de la inflamación. Se ha detectado un aumento en la expresión de estas moléculas, en la sinovia articular reumatoide, en el endotelio de la barrera hematoencefálica, en placas de esclerosis (57,58), etc. Ciertas citoquinas, especialmente el TNF, la IL-1 y el IFN- γ , activan a las células endoteliales a sintetizar estas moléculas de adhesión, permitiendo así un mayor tráfico de linfocitos a las zonas donde está teniendo lugar la injuria tisular.

Una vez detallados los diferentes puntos donde las citoquinas pueden estar involucradas, describiremos con más detalle las alteraciones inmunoreguladoras mediadas por citoquinas en dos importantes enfermedades autoinmunes, la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple, que estamos estudiando en la actualidad en nuestro laboratorio.

6.1.1 Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple es una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central que se caracteriza preferentemente por infiltrados perivasculares de linfocitos T y macrófagos. Dado que los linfocitos no

activados en condiciones normales no consiguen atravesar la barrera hematoencefálica (mecanismo que asegura en parte la tolerancia), es necesaria una activación previa de estas células en la sangre. Una vez activados, bien sea por virus, superantígenos, etc. (aún se desconoce el agente etiológico en el caso de la esclerosis múltiple), los linfocitos comienzan a secretar citoquinas que incrementan la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en las células endoteliales, moléculas necesarias para que se produzca la migración a través de la barrera hematoencefálica. Atravesada dicha barrera, los linfocitos se dirigen hacia los oligodendrocitos que forman la vaina de mielina que recubre a los axones neuronales. En dicha vaina se encuentra el epítipo reconocido por los linfocitos y que es una porción de la llamada proteína básica de la mielina (PBM). Aunque se desconocen las causas del reconocimiento de esta proteína del sistema nervioso, quizás una reacción cruzada con algún componente vírico de estructura similar a la PBM sea la explicación más plausible. Reconocido el epítipo encefalotogénico, los linfocitos sufren una expansión clonal, proceso que es favorecido por la constante liberación de citoquinas (IL-2, IFN- γ , IL-4) por parte de las células infiltradas. Citoquinas como el TNF- α , que atacan directamente a los oligodendrocitos, facilitan la degradación de la mielina y la consecuente generación de nuevos péptidos encefalotogénicos que retroalimentan todo el proceso (fig 6). Los anticuerpos segregados por los linfocitos B que se van infiltrando en estadios más avanzados de la enfermedad, facilitando la formación del complejo de ataque del sistema del complemento, que se deposita sobre la membrana de los oligodendrocitos. El resultado final es una alteración en el bombeo de los iones de calcio hacia el exterior, provocando la destrucción de la célula y por tanto la pérdida de la función neuronal. En nuestro laboratorio estamos estudiando el perfil de citoquinas de un grupo de pacientes con esclerosis múltiple (forma remitente), analizando los niveles protéicos en sangre y líquido cefalorraquídeo mediante ELISA y semicuantificando por densitometría el ARNm amplificado por RT-PCR. Nuestros datos preliminares indicaron que aquellos pacientes en fase de brote de la enfermedad presentaban un mayor incremento en la expresión de citoquinas proinflamatorias como el IFN- γ , la IL-6 y el TNF- α , mientras que la expresión de citoquinas inmunosupresoras, como la IL-10 y la IL-13 sobre todo, se presentaba incrementada en las fases estables de la

enfermedad. Ambos hechos ponen de manifiesto que si bien las citoquinas pueden no ser una causa primaria en la generación de la respuesta autoinmune, juegan un papel importante en la evolución de la enfermedad.

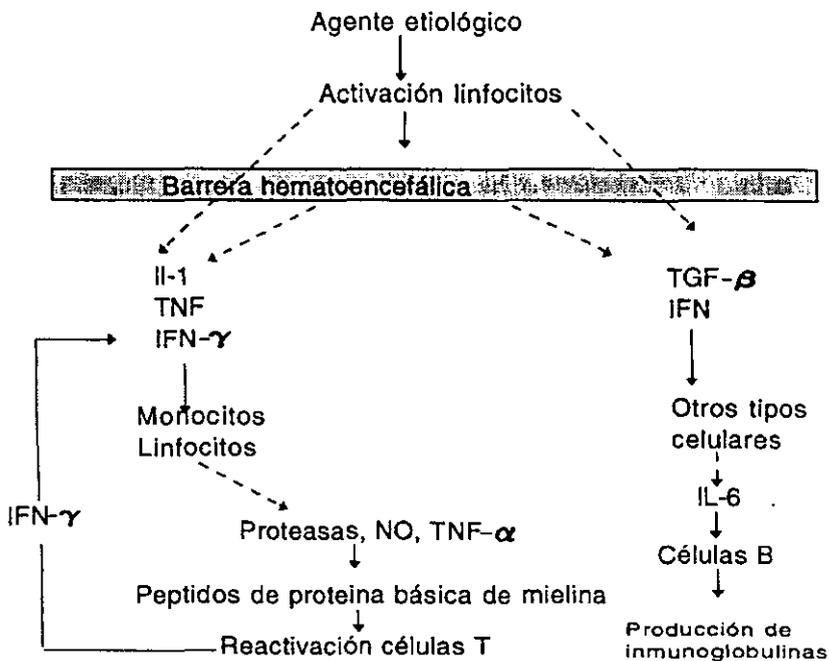


Fig 6.- *Citoquinas inmunopotenciadoras en esclerosis múltiple.* Atravesada la barrera hematoencefálica, los linfocitos comienzan a secretar citoquinas que agravan el proceso de desmielinización.

6.1.2. *Artritis reumatoide*

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica mediada por reacciones inmunológicas que tienen lugar en las articulaciones, causando de forma progresiva una destrucción del cartílago articular. Se han encontrado niveles elevados de citoquinas como la IL-1, la IL-6, la IL-8, el GM-CSF y el TNF- α , tanto en el suero como en el líquido sinovial de pacientes con AR. El TNF- α parece jugar un papel central en el desarrollo de la enfermedad, habiéndose observado que inyecciones de TNF- α agravan seriamente la enfermedad en el modelo experimental de artritis inducida por colágeno (59). Además, el TNF- α induce la expresión de citoquinas proinflamatorias como la IL-1, la IL-6, la IL-8 y el GM-CSF. Los efectos biológicos que estas citoquinas causan en la enfermedad son variados. La IL-1 y el TNF- α inducen la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular, como ICAM-1 y E-Selectinas que facilitan el tráfico celular al interior de la articulación. Además aumentan los niveles de los mediadores de la inflamación como la prostaglandina E2, las colagenasas y el óxido nítrico, al tiempo que disminuyen la síntesis de la matriz en el cartílago y hueso. El resultado de ambos procesos es un aumento del daño tisular y una inadecuada reparación del mismo. La estimulación de linfocitos T y macrófagos por parte de estas citoquinas perpetúan el proceso. Las propiedades quimioatrayentes de la IL-8 aumentan el flujo celular hacia el cartílago. La IL-6, por su parte, induce en el hígado la síntesis de proteínas de fase aguda, como la proteína C reactiva. Una activación de granulocitos y macrófagos y un aumento en la expresión de moléculas de clase II del MHC tienen lugar como consecuencia del incremento en los niveles de GM-CSF. Además de estas citoquinas, con actividades eminentemente proinflamatorias, se ha constatado una producción simultánea de citoquinas con propiedades antiinflamatorias como la IL-10, el TGF- β , o inhibidores de citoquinas como receptores solubles de TNF- α e IL-1 (60, 61). En nuestro laboratorio, hemos detectado un aumento en suero de los niveles de IL-4, así como en la expresión de ARNm-IL-4 mediante RT-PCR en linfocitos de pacientes de AR. Estos datos se acompañaban a su vez de un incremento en la expresión del receptor para IL-4 (IL-4R) en linfocitos T y B (62). De esta forma el sistema inmune tiende al mantenimiento de una homeos-

tasis, de manera que el daño causado por aumentos de las citoquinas proinflamatorias quede amortiguado en parte por estas otras citoquinas con actividad inmunosupresora.

Visto el papel central que juega el TNF- α en la artritis reumatoide, se han diseñado terapias con el fin de bloquear las acciones patológicas de esta citoquina y que comentaremos posteriormente en la llamada "terapia anticitoquina".

7.- INMUNOTERAPIA

Muchas de las enfermedades autoinmunes se tratan actualmente con agentes inmunosupresores como los corticoides, la ciclosporina A, la ciclofosfamida, etc. Estas sustancias tienen un efecto diverso sobre la producción de ciertas citoquinas como es el caso de los corticoides, o sobre alguna de las vías de transducción de señales inducida por la unión de la citoquina a su receptor, como es el caso de la ciclosporina A. Los corticoides, unidos a su receptor citoplasmático, interaccionan con factores de transcripción o se anclan a elementos de respuesta a glucocorticoides (glucocorticoids response elements, GRE), presentes en los promotores de muchas citoquinas, alterando su expresión. La ciclosporina A actúa en la vía del calcio-calmodulina modificando, en última instancia, la unión posterior de factores de transcripción a NF-AT (fig 7).

Los glucocorticoides y la ciclosporina A, aunque son eficaces en el control de ciertas enfermedades autoinmunes, no carecen de efectos secundarios importantes, por lo que es necesario buscar alternativas a estos tratamientos. En la actualidad se está intentando explotar los efectos inmunosupresores e inmunoreguladores de ciertas citoquinas que se consideran de relevancia en el desarrollo de la enfermedad autoinmune. Así, se ha demostrado el efecto inmunosupresor del TGF- β en modelos experimentales de autoinmunidad. Por ejemplo, en la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), un modelo murino utilizado para el estudio de la esclerosis múltiple, el TGF- β causa inhibición de la proliferación y activación celular de linfocitos T, inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias que potencian el daño tisular y previene las recaídas en los ratones a los que se les administra (63). En el modelo experimental de la artritis inducida por colágeno, el TGF- β presentaba efectos inmunosu-

presores sobre el desarrollo de la enfermedad (64). Otra citoquina inmunosupresora como la IL-10, administrada en procesos artríticos experimentales inducía una notable mejoría. El mecanismo de acción en este caso posiblemente sea el de una inhibición en la producción de dos citoquinas proinflamatorias como son la IL-1 y el TNF- α , causantes directas probablemente del daño sufrido por el cartílago articular.

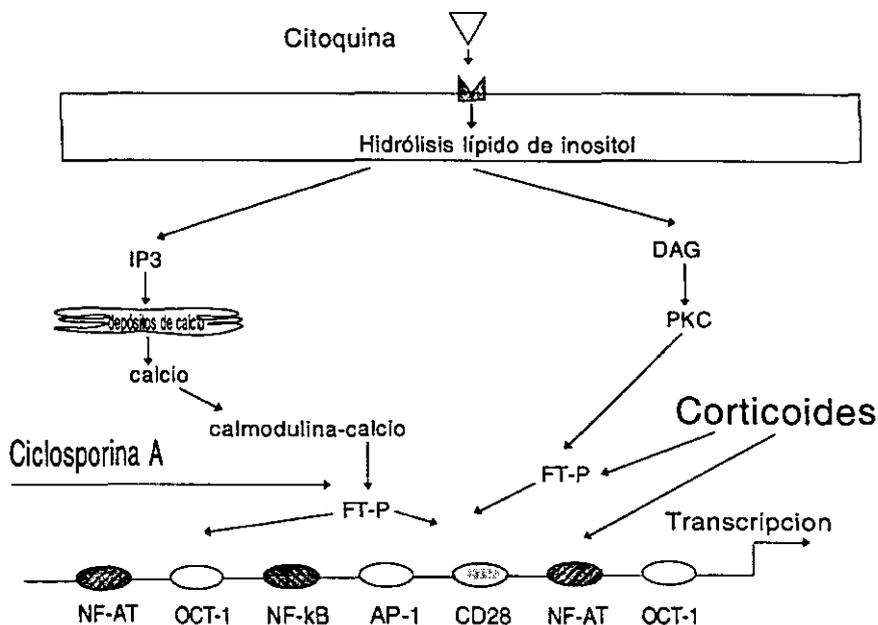


Fig 7.- *Modos de acción de los corticoides y ciclofosfamida.* Los corticoides unidos a su receptor citoplasmático se anclan en los elementos respondedores a glucocorticoides, presentes en los promotores de muchos genes de las citoquinas, o interaccionan con factores de transcripción (FT) alterando su expresión. La ciclosporina actúa en la vía calcio-calmodulina modificando la unión posterior de factores de transcripción a NF-AT. FT-P (factor de transcripción fosforilado)

En enfermos de esclerosis múltiple la administración de IFN- β

recombinante hace que disminuya el número de recaídas así como la frecuencia y la duración de los ataques neurológicos (65). El efecto beneficioso del IFN- β se debe a que además de inhibir la activación de linfocitos T, inhibe la producción de IFN- γ y TNF- α (66, 67). Por otra parte, el IFN- β aumenta la función supresora llevada a cabo por los linfocitos, así como la síntesis de citoquinas como la IL-10 y el TGF- β (68). Todo ello explica en parte el efecto beneficioso del IFN- β sobre la evolución de la enfermedad. El hecho de que el TNF- α tenga un papel

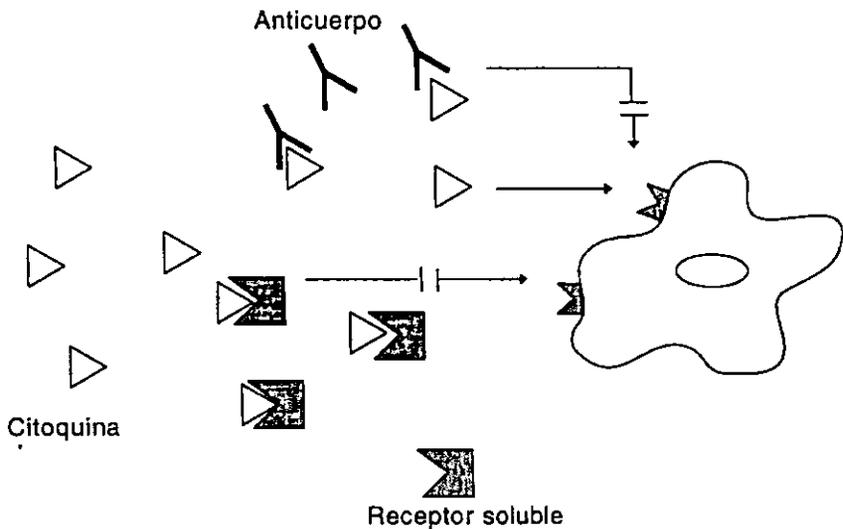


Fig 8.- *Mecanismos de la "terapia anticitoquina"*. La unión de anticuerpos monoclonales o receptores solubles a la citoquina, bloquea la posterior unión de esta con su receptor.

central en la patogenia de la artritis reumatoide promovió el empleo de anticuerpos monoclonales frente a esta citoquina, observándose que tras la administración de dichos anticuerpos, el proceso inflamatorio se reducía

notablemente, si bien este novedoso tratamiento se encuentra todavía en fase de ensayo clínico.

Todas las terapias dirigidas a potenciar o inhibir la acción de una determinada citoquina se engloban dentro de lo que se ha dado en llamar "terapia anticitoquina", pudiendo actuar a diferentes niveles como se indica en la figura 8. Otra estrategia que se puede emplear para controlar el efecto nocivo de ciertas citoquinas es la de bloquear mediante anticuerpos monoclonales los receptores para las mismas. A modo experimental se han empleado los anticuerpos anti-receptor para IL-2 (IL-2R) en pacientes autoinmunes y sobre todo en aquellos que han sido sometidos a transplante de órganos, aunque no se emplean en la actualidad (69). Los anticuerpos anti-receptor u otras moléculas de superficie pueden unirse a toxinas o radioisótopos de tal manera que al reaccionar específicamente con la molécula diana provocan la muerte celular. De esta forma inducen una inmunosupresión selectiva de la respuesta inmune.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ARAI KI, LEE F, MIYAJIMA A, MIYATAKE S, ARAI N, YOKOTA T. (1990) Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 783-836
- (2) WILLIAM E. PAUL AND ROBERT A. SEDER. (1994) Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76, 241-251.
- (3) BOULAY JL AND WILLIAN E. PAUL. (1992) The interleukin -4-related lymphokines and their binding to hematopoietin receptors. *J.Biol.Chem* 267, 20525-20528
- (4) ZURAWSKI G AND E. DE VRIES J. (1994) Interleukin 13, an interleukin 4 like cytokine that acts on monocyte and B cells, but not on T cells. *Immunol. Today* 15, 19-26
- (5) BEUTLER B. (1992) Tumor necrosis factor. The molecules and their emerging role in medicine. Raven Press, New York, p 560 .
- (6) JAMES, D, FRASER, DAVID STRANS AND ARTHUR WEISS. (1993) Signal transduction events leading to T-cell lymphokine gene expresion. *Immunol. Today.* 14, 7, 357-361.
- (7) HANNUM CH, WILCOX CJ, AREND WP ET AL. (1990) Interleukin 1 receptor antagonist activity of a human interleukin 1 inhibitor. *Nature* 343, 336-340.
- (8) COPE AP, ADERKA D, DOHERTY M, ENGELMANN H, GIBBSONS D, JONES AC, BRENNAS FM, MAINI RN, WALLACH D, FELDMANN M. (1992) Increased levels of

- soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheumatism* 35, 1160-1169.
- (9) MOSMANN TR, CHERWISNSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA, AND COFFMAN RL. (1986) Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136, 2348-2357
 - (10) ROMAGNANI S. (1991) Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. *Immunol. Today* 12, 256-257.
 - (11) SEDER RA, GAZZINELLI R, SHER A AND PAUL, W. E. (1993) IL-12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for IFN- γ production and diminishes IL-4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. 90, 10188-10190.
 - (12) SWAN SL, WEINBERG DA, ENGLISH M AND HUSTON, G. (1990) IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* 145, 3796-3806.
 - (13) GRUSS HJ, DOWER SK. (1995) Tumor Necrosis Factor ligand superfamily: Involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 85: 3378-3404.
 - (14) ULRICH A, SCHLESSINGER J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosin kinase activity. *Cell* 1990; 61: 203-212.
 - (15) COSMAN D, LYMAN SD, IZDERDA RL, BECKMANN MP, PARK LS, GOODWIN RG, MARCH CJ. (1990) A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem Sci* 15: 265-270.
 - (16) PATTHY L. (1990) Homology of a domain of the growth hormone/prolactin receptor family with type III modulates fibronectin. *Cell* 61:13-14.
 - (17) BAZAN JF. (1990) Structural design and molecular evolution of cytokine receptor Superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6934-6938.
 - (18) BAZAN JF. (1990) Haematopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today* 11:35-354.
 - (19) HO ASY, LIU Y, KHAN TA, HSU D, BAZAN JF, MOORE KW. (1993) A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11267-11271.
 - (20) FELDMANN FM, BRENNAN M, CHANTRY D ET AL. (1991) Cytokine assays: role in evaluation of the pathogenesis of autoimmunity. *Immunol. Rev.* 119, 106-1231
 - (21) DI GIOVANI, FS, POOLE S, SITUNAYAKE RD ET AL. (1990) Absence of correlation between indices of systemic inflammation and synovial fluid IL-1 α and β in rheumatic diseases. *Rheumatol. Int.* 9, 259-264.
 - (22) ZHENG RQH, ABNEY ER, CHU CQ ET AL. Detection of *in vivo* production of tumor necrosis factor-alpha by human thyroid epithelial cells. *Immunology* 75, 456-462.
 - (23) ZHENG RQH, ABNEY ER, CHU CQ ET AL. (1991) Detection of interleukin-6 and interleukin-1 production in human thyroid epithelial cells by non-radioactive *in situ* hybridization and immunohistochemical methods. *Clin. Exp. Immunol.* 83, 314-319.
 - (24) SHARIEF MK, HENTGES R. (1991) Association between TNF- α and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N. Eng. J. Med* 325, 467-472.

- (25) SELMAJ K, RAINE C, CANELLA B ET AL. (1991) Identification of lymphotoxin and TNF in multiple sclerosis lesion. *J. Clin. Invest.* 87, 949-954
- (26) SCHATTFNER A. (1988) Review: Interferons and autoimmunity. *Am. J. Med. Sci.* 31, 532- 544.
- (27) PAPO T, MARCELLIN P, BERNUAU J, DURAND F, POYNARD T AND BENCHAMOU JP. (1992) Autoimmune chronic hepatitis exacerbated by alpha-interferon. *Ann. Intern. Med.* 116 51-52.
- (28) BARSTCH HH, ADLER M AND KABOTH, U. (1990) Is there a risk for cancer patients treated with recombinant cytokines to develop autoimmunity diseases?. *Nat. Immun. Cell. Growth. Regul* 9,78.
- (29) RONNBLOM, LE, ALM, GV, AND OBERG, KE. (1991) Autoimmunity after alpha-interferon therapy for malignant carcinoid tumor. *Ann. Intern. Med.* 115,178-183.
- (30) GISSLINGER, H, GILLY, B WOLOSZCZUK, W, MAYR, WR, HAVELEC, L, LINKESCH, W, AND WEISSEL, M. (1992) Thyroid autoimmunity and hypothyroidism during long-term treatment with recombinant interferon-alpha. 90, 363-367.
- (31) WANDLE UB, NAGEL-HIEMKE M, MAY D, KREUZFELDER E, KLOKE O, KRANZHOF. M SEEBER, S, AND NIEDERLE, N. (1992) Lupus-like autoimmunity disease induced by interferon therapy for myeloproliferative disorders. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 65, 70-74.
- (32) CONLON, KC, URBA, WJ, SMITH, JW, STEIS, RG, LONGO, DL, AND CLARK, JW. (1990) Exacerbation of symptoms of autoimmune disease in patients receiving alpha-interferon therapy. *Cancer.* 65, 2237-2242.
- (33) CHAZERAIN P, MEYER O, AND KAHN MF. (1992) Rheumatoid arthritis-like disease after alpha-interferon therapy. *Ann. Intern. Med.* 116, 427.
- (34) REID TJ, LOMBARDO FA, REDMOND J, HAMMOND SL AND COFFEY, JL. (1992) Digital vasculitis associated with interferon therapy. *Am. J. Med.* 92, 702 -703.
- (35) ROY V AND NEWLAND AC. (1988) Raynaud's phenomenon and cryoglobulinemia associated with the use of recombinant human alpha-interferon. *Lancet*, 1, 944-945.
- (36) AKARD LP, HOFFMAN R, ELIAS L AND SAIERS JH. (1986) Alpha-interferon and hemolytic anemia. *Ann. Intern. Med.* 105, 306.
- (37) MCLAUGHLIN P, TALPAZ M, QUESADA JR, SALEEM A, BARLOGIE B AND GUTTERMAN, LL. (1985) Immune thrombocytopenia following alpha-interferon therapy in patients with cancer. *J. Am. Med. Assoc.* 254, 1353-1354.
- (38) ABDI EA, BRIEN W, AND VENNER PM. (1986) Autoimmune thrombocytopenia related to interferon therapy. *Scand. J. Haematol.* 36, 515-519.
- (39) ZOUMBOS NC, GASCON P, DJEU JY, TROST SR AND YOUNG, NS. (1985) Circulating activated suppressor T lymphocytes in aplastic anemia. *N. Engl. J. Med.* 312. 257-265.
- (40) HERMAN J AND GABRIEL, F. (1987) Membranoproliferative glomerulonephritis in a patient with hairy-cell leukemia treated with alpha-interferon. *N. Engl. J. Med.* 316, 112-113.

- (41) ATKINS MB, MIER JW, PARKINSON DR, GOULD JA, BERKMAN EM, AND KAPLAN, MM. (1988) Hypotiroidism after treatment with interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. *N. Engl. J. Med.* 318, 1557-1563.
- (42) SAUTER NP, ATKINS MB, MIER JW AND LECHAN, RM. (1992) Transient thyrotoxicosis and persistent hypothyroidism due to autoimmune thyroiditis after IL-2 and interferon- α therapy for metastatic carcinoma: A case report. *Am. J. Med.* 92, 441-444.
- (43) MASSARITTI EM, LIU NY, MIER J, AND ATKINS MB. (1992) Chronic inflammatory arthritis after treatment with high-dose interleukin-2 for malignancy. *Am. J. Med.* 92, 693-697.
- (44) SPARANO JA, BRANDT LJ, DUTCHER JP, DUBOIS JS AND AKINS, MB. (1993) Symptomatic exacerbation of Crohn disease after treatment with high-dose interleukin-2. *Ann. Int. Med.* 118, 617-618.
- (45) VECHT CJ, KEOHANE C, MENON RS, PUNT CJ AND STOTER, G. (1990) Acute fatal leukoencephalopathy after interleukin-2 therapy. *N. Engl. J. Med.* 323, 1146-1147.
- (46) SCHUCHTER LM, HENDRICKS CB, HOLLAND KH, SHELTON BK, HUTCHINS GM, BAUGHMAN KL AND ETTINGER DS. (1990) Eosinophilic myocarditis associated with high-dose interleukin-2 therapy. *Am. J. Med.* 88, 439-440.
- (47) HOOKS JJ, MOUTSOPOULUS HM, GEIS SA, STAHL NI, DECKER JL AND NOTKINS, AL. (1979) Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune diseases. *N. Engl. J. Med.* 301, 5-8.
- (48) PREBLE, OT, BLACK, RJ, FRIEDMAN, RM, KLIPPEL, JH, AND VILCEK, J. (1982) Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. *Science* 216, 429-431.
- (49) HERTZOG PJ, WRIHIT A, HARRIS G, LINNANE AW AND MACKAY, IR. (1991) Intermittent interferonemia and interferon response in multiple sclerosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 58, 18-32.
- (50) KOTT E, HAHN T, HUBERMAN M, LEVIN S AND SCHATTNER A. (1990) Interferon system and natural killer cell activity in myasthenia gravis. *Q. J. Med.* 76, 951-960.
- (51) HUANG YP, PERRIN LH, MIESCHER PA AND ZUBLER, RH. (1988) Correlation of T and B cell activities *in vitro* and serum IL-2 levels in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 141, 827-833.
- (52) NEEDLEMAN BW, WIGLEY FM AND STAIR RW. (1992) Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon gamma levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1992, 35, 67-72.
- (53) GALLO P, PICCINO MG, TAVOLATO B ET AL. (1991) A longitudinal study on IL-2, sIL-2R, IL-4 and IFN gamma in multiple sclerosis CSF and serum. *J. Neurol Sci.* 101, 227-232.
- (54) PANITCH HS, HIRSCH RL, (1987) Schindler J and Johnson KP. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation

- of the immune system. *Neurology* 37,1097.
- (55) FELDMAN M, (1987) Regulation of HLA class II expression and its role in autoimmunity diseases. In "Autoimmunity, Ciba Foundation Symposia", 88-108.
- (56) CZARNIECKI CW, CHIU HH, WONG GH, MC CABE SM AND PALLADINO MA. (1988) Transforming growth factor beta modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. *J. Immunol.* 140, 4217-23.
- (57) CAMPEBELL IL, CUTRI, A, WILKINSON, D ET AL. (1989) Intracellular adhesion molecule 1 is induced on isolated endocrine islet cells by cytokines but not by reovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 4282-4286.
- (58) MORALES-DUCRET J, WAYNER E, ELICES MJ, ALVARO-GRACIA JM, AND FIRESTEIN, GS. (1992) $\alpha 1/\beta 1$ integrin (VLA-4) ligands in arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes. *J. Immunol.* 149, 1424-1431.
- (59) COOPER WO, FAVA RA, GATES CA, ET AL. (1992) Acceleration of onset of collagen-induced arthritis by intra-articular injection of tumour necrosis factor or transforming growth factor-beta. *Clin. Exp. Immunol.* 89:244-250.
- (60) BRENNAN FM, CHANTRY D, TURNER M ET AL. (1990) Detection of TGF- β in rheumatoid arthritis synovial tissue: lack of effect on spontaneous cytokine production in joint cell cultures. *Clin. Exp. Immunol.* 81: 278-285.
- (61) KATSIKIS P, CHU CQ, BRENNAN FM ET AL. (1994) Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* 179:1517-1527.
- (62) RIVAS D, MOZO L, ZAMORANO J, GAYO A, TORRE JC, RODRIGUEZ A AND GUTIERREZ C. (1995) Upregulated expression of IL-4 receptors and increased levels of IL-4 in rheumatoid arthritis patients. *J. Autoimmunity* 8:587-600.
- (63) RACKE, MK, DHIB- JALBUT, S, CANELLA, B ET AL. (1991) Prevention and treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by TGF- β . *J. Immunol.* 146, 3012-3017.
- (64) KURUVILLA AP, SHAH, R, HOCHWALD, GM, ET AL. (1991) Protective effect of TGF-beta on experimental autoimmune disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 2918-2921.
- (65) PATY DW, LI, DKB. (1993) The IFN- β Multiple Sclerosis Study Group. Interferon-beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis; MRI results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 43,662-667.
- (66) NORONDA A, TOSCAS, A JENSEN, MA. (1991) IFN- β down-regulates IFN- γ production by activated T cells in MS 41,219
- (67) NORONHA, A, JENSEN, A, TOSCAS, A, SIHAG, S. (1992) IFN- β down-regulates tumor necrosis factor release. *Neurology* 42, 159.

- (68) NORONDA A, TOSCAS A, JENSEN MA. (1990) Interferon beta augments supresor cell function in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 27. 207-210.
- (69) WALDMANN TA, GOLDMAN CK. (1989) The multichain interleukin-2 receptor: A target for immunotherapy of patients receiving allograts. *Am. J. Kidney. Dis.* 14,45.

Implicaciones de los mecanismos de apoptosis en la Autoinmunidad.

por

ELENA BAIXERAS LLANO

Departamento de Inmunología y Oncología. Centro Nacional de Biotecnología.- Campus de Cantoblanco. 28049, Madrid.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN
2. APOPTOSIS EN EL SISTEMA INMUNE
3. SELECCIÓN NEGATIVA EN LOS LINFOCITOS B
4. SELECCIÓN NEGATIVA EN LOS LINFOCITOS T
5. APOPTOSIS PERIFÉRICA
6. CONTROL DE LA APOPTOSIS DESDE LA MEMBRANA CELULAR
7. PROTEÍNAS INTRACELULARES QUE CONTROLAN LA APOPTOSIS
8. SEÑALES IMPLICADAS EN EL CONTROL DE LA APOPTOSIS
9. INCIDENCIA DE LA INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS EN LA AUTOINMUNIDAD PATOLÓGICA Y SU POSIBLE CONTROL TERAPÉUTICO
10. CONCLUSIONES
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1.- INTRODUCCIÓN

El potencial de reconocimiento antigénico por parte del sistema inmune es teóricamente tan vasto que sin una apropiada regulación podría reaccionar inevitablemente contra lo propio. Es por ello que el desarrollo de los linfocitos T y B debe estar controlado a distintos niveles de forma que se asegure una respuesta frente a una gran cantidad de antígenos extraños, al mismo tiempo que se establezca la tolerancia frente a lo propio. Durante el proceso ontogénico de los linfocitos, la apoptosis o muerte celular juega un papel básico y esencial en la selección negativa de los linfocitos autorreactivos y el descubrimiento de los procesos moleculares que la controlan es fundamental para comprender la organización y funcionamiento normal del sistema inmune. En algunos casos, la resistencia a la apoptosis por parte de los linfocitos puede estar

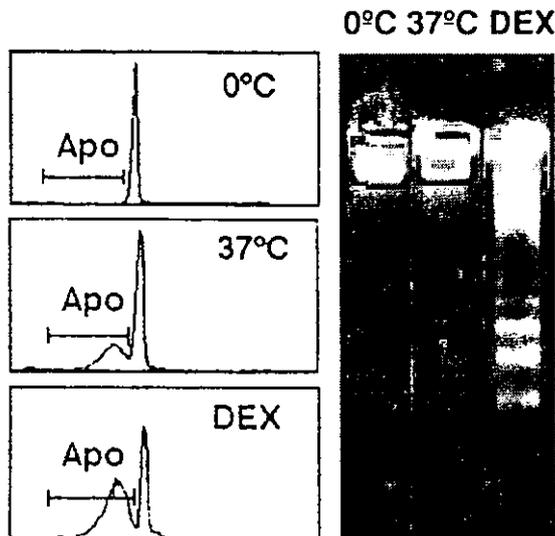
implicada en la patogénesis de enfermedades autoinmunes. Tal es el caso de los ratones MRL/Mp-*lpr/lpr*, que desarrollan una enfermedad análoga al lupus humano y que presentan una deficiencia en el gen *Fas*, implicado en la inducción de la apoptosis. Por el contrario, un aumento en la tasa de apoptosis puede ser la causa de una deficiencia numérica y funcional de linfocitos promovida por la infección de un virus como es el caso del HIV. En este contexto, las drogas que induzcan o inhiban apropiadamente la apoptosis pueden ser de una gran utilidad terapéutica en clínica. En el presente capítulo, se dará una visión general sobre los estadios de diferenciación por los que pasan los linfocitos B y T, incidiendo en los genes y señales que controlan los mecanismos que pueden estar implicados en este proceso de muerte celular los cuales, en conjunto, permiten explicar los fenómenos de tolerancia y autoinmunidad.

2.- LA APOPTOSIS EN EL SISTEMA INMUNE

La **apoptosis** (del griego apo-ptosis= el comienzo de la decadencia) es un término acuñado en 1972 por Kerr (Kerr et al, 1972) para definir morfológicamente un tipo de muerte celular programada y fisiológica. Durante este proceso las células pierden volumen, las membranas sufren cambios en la distribución y orientación de lípidos y el núcleo se colapsa en pequeños corpúsculos refringentes. La cromatina celular es finalmente fragmentada de forma ordenada por la acción de endonucleasas en segmentos múltiples de 180 pares de bases (nucleosomas) que son fácilmente detectables en gel de poliacrilamida por la formación de la denominada "escalera de ADN" (**Fig. 1**). Dentro del organismo, la célula apoptótica jamás se lisa ni deja salir su contenido al exterior. Una vez que el proceso de apoptosis comienza, las células fagocíticas y macrófagos de la vecindad son atraídos por los cambios que se producen en la membrana de la célula apoptótica, como es el cambio de orientación de la fosfatidilserina hacia el exterior de la célula, atrayendo así a los macrofagos que fagocitan a la célula apoptótica y evitando una reacción inflamatoria.

La apoptosis se contrapone a la muerte por necrosis, la cual se produce por causas patológicas que sobrevienen después de sufrir un trauma o cualquier daño mecánico que sea provocado por una causa no

fisiologica. Durante la necrosis, la célula pierde su permeabilidad normal, se hincha hasta lisarse y los componentes internos pierden su integridad liberando al exterior su contenido y provocando, por tanto, una reacción inflamatoria.



Ioduro de Propidio

Figura 1. La figura ilustra dos sistemas para medir la apoptosis celular. Los Histogramas muestran el ciclo celular de timocitos cuyo contenido en ADN ha sido teñido con ioduro de propidio y analizado por citometría de flujo. Las unidades de ADN se muestran en el eje X y el recuento de células en el eje Y. El porcentaje de células en apoptosis se mide por la presencia del pico hipoploide o sub-G₁/G₁ (APO) correspondiente a las células con ADN fragmentado. En los histogramas aparece el ciclo celular de los timocitos mantenidos a 0° C en el que no se aprecia el pico APO, así como el ciclo de timocitos mantenidos en cultivo a 37° C en ausencia o en presencia de dexametasona DEX donde la presencia del pico APO se hace evidente. A la derecha de la figura se muestra el gel de poliácridamida en el que se han migrado los ADN extraídos de los timocitos correspondientes a los tratamientos de 0° C, 37° C, y DEX. En el gel, la presencia de la escalera de ADN no aparece en el caso del tratamiento a 0° C y se aprecia en el caso del tratamiento a 37° C resultando más evidente en el tratamiento con DEX. Ambos sistemas son de uso cotidiano en la detección de apoptosis celular.

Si bien la apoptosis es un mecanismo normal y activo para la eliminación de células sobrantes o no deseables, también puede ser la causa de ciertas patologías cuando su programa se activa o se inhibe indebidamente. Existe una interrelación muy estrecha entre los procesos de apoptosis, autoinmunidad y tolerancia dentro del sistema inmune. Conviene aclarar que ninguno de estos tres fenómenos en sí implica un proceso patológico, sino todo lo contrario. La apoptosis, la autoinmunidad y la tolerancia están sujetos a un control tan riguroso que sólo el desequilibrio en uno de los tres procesos implica la aparición de la enfermedad como tal.

En los organismos más evolucionados el sistema inmune se ha desarrollado como un mecanismo de defensa frente a agentes invasores que son ajenos a los "componentes habituales" del propio organismo. La forma por la cual el sistema inmune discierne lo que es "habitualmente" propio de lo que no lo es, resulta todavía una incógnita y es difícil comprender y descifrar cómo es posible que el sistema inmune no reaccione contra lo propio. No hay que olvidar que el sistema inmune se acostumbra y tolera la presencia de otros microorganismos que pueden ser beneficiosos y conviven habitualmente con el propio organismo, sin generar una respuesta inmune contra los mismos (ejemplo la *E. coli*). Una forma de solventar el problema de la autorrespuesta o autoinmunidad que sobrevino con la aparición del sistema inmune, es la de eliminar o silenciar aquellos clones de linfocitos autorreactivos mediante la delección clonal por apoptosis y la represión funcional o anergia. Pero la cuestión de cómo, quién y cuándo se decide qué linfocito sobrevive a esta selección todavía no está del todo desvelada. El fenómeno de autoinmunidad plantea, por tanto, una serie de cuestiones fundamentales cuya respuesta explicaría el funcionamiento del sistema inmune. De hecho, es el estudio de la etiología de enfermedades autoinmunes e inmunodeficiencias lo que actualmente ayuda enormemente a los inmunólogos a entender el funcionamiento normal y fisiológico del sistema inmune.

En principio, cualquier proteína, muchos carbohidratos y lípidos, así como ácidos nucleicos, son "antígenos potenciales" que pueden generar una respuesta inmune. Esta respuesta está protagonizada por los linfocitos T y B en cuya superficie celular se expresa un receptor específico para un

determinado antígeno (**Fig. 2**). En principio, la interacción de este receptor con su antígeno provoca una reacción inmune contra el mismo. Muchos de los componentes del organismo que están expuestos a los propios linfocitos podrían ser, por tanto, antígenos (**autoantígenos**) capaces de inducir una respuesta autoinmune humoral (**autoanticuerpos** producidos por células B autorreactivas) o celular (**células T autorreactivas**).

No se puede explicar la autoinmunidad sin entender el fenómeno que a ella se contrapone: la **tolerancia**. La tolerancia es el mecanismo por el cual las células autorreactivas son reprimidas a la hora de generar una respuesta inmune. Cuando el mecanismo de tolerancia falla, se produce un desequilibrio que puede dar lugar a la aparición de la enfermedad autoinmune. Sin embargo, la tolerancia es un concepto bastante difícil de entender, debido a que incluso en individuos sanos se encuentran presentes unos niveles determinados de células autorreactivas. Más aún, los linfocitos B autorreactivos (productores de autoanticuerpos) son tan comunes que algunos inmunólogos cuestionan la existencia de la tolerancia en células B. Parece ser que un cierto grado de autorreactividad forma parte de la fisiología normal del sistema inmune. Estos niveles de "autoinmunidad natural" resultan incluso beneficiosos y sólo en casos en los que se produce una respuesta autoinmune exagerada, sobreviene la enfermedad autoinmune como tal. Por tanto, la autoinmunidad en sí no es un fenómeno patológico, sino que incluso es una propiedad inherente al mismo sistema inmune normal.

No existe una teoría clara y convincente que explique el fenómeno de autoinmunidad natural y de la tolerancia. Desde hace más de una treintena de años, se barajan varias hipótesis sobre el fenómeno de tolerancia que no son excluyentes una de la otra necesariamente y que explicarían, en parte las causas de la **no** autoinmunidad patológica (Schwartz, 1993). Aunque el desarrollo de tales hipótesis no son el objetivo de este capítulo, conviene mencionar brevemente algunas de ellas para introducir el concepto y la importancia que los mecanismos que regulan la apoptosis podrían tener sobre la tolerancia y autoinmunidad:

- 1.- Durante las primeras fases del desarrollo, los linfocitos pasan por estados de maduración dentro de un compartimento (la médula ósea, timo y bazo), en el que la gran mayoría de ellos tiene una alta

probabilidad de interaccionar a través de su receptor con su antígeno supuestamente presente en los tejidos normales del propio organismo. En este caso los linfocitos se deleccionarían (por *apoptosis inducida por la señal del receptor antigénico*) o se inactivarían funcionalmente (*anergia*). Como consecuencia, los linfocitos que alcanzaran su estado de madurez serían "no autorreactivos". La autoinmunidad patológica podría sobrevenir en el momento en que uno de los clones autorreactivos que se producen durante la maduración no se deleccionase, por la razón que sea, quedando linfocitos libres y dispuestos para atacar los tejidos propios del organismo. Una de las explicaciones de la existencia de estos "clones prohibidos" sería que sus receptores antigénicos son el resultado de mutaciones somáticas en sus genes, de forma que sus productos protéicos, expresados en la superficie celular, tendrían una afinidad casual pero considerable por un autoantígeno. Por otro lado, se acepta la idea de que los clones de linfocitos anergizados permanecen "dormidos" por un defecto en los mecanismos de señalización a partir de los receptores, de manera que no son funcionales. Si estos mecanismos se restablecieran indebidamente, estos linfocitos se activarían y se volverían autolesivos.

- 2.- Otra hipótesis que explicaría el fenómeno de tolerancia sería la existencia de *clones T supresores* específicos para clones que reaccionan frente a un antígeno determinado. Un fallo en esta supresión de la tolerancia antígeno-específica de unos cuantos clones podría provocar una reacción autoinmune. Aunque esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que algunos pacientes con enfermedad autoinmune frente a un antígeno, no muestran una respuesta inmune exagerada frente a otros antígenos no propios, la existencia de estos clones T supresores permanece aún en duda y la evidencia de que la tolerancia esté causada por este mecanismo parece poco convincente.
- 3.- Otra interesante hipótesis que explica la forma de romper la tolerancia es mediante la "*imitación de autoantígenos*" por parte de antígenos extraños de ciertos microbios invasores. Si los epítotos (zonas concretas del antígeno que son reconocidas de forma específica por los receptores de las células T o por los anticuerpos) de los antígenos no propios emulan a los de los propios, debido a que comparten

estructuras muy parecidas aunque no idénticas, el huesped podría responder inmunológicamente frente a ellos de una forma contundente eliminando al agente invasor, pero al mismo tiempo generando una respuesta autoinmune no deseada frente a tejidos propios que podría quedar de forma permanente.

Las claves del control de la tolerancia y de la autoinmunidad se encuentran en los procesos de selección negativa y positiva que han de soportar los linfocitos durante su diferenciación. Los linfocitos T y B reconocen antígenos de forma diferente a través del receptor antigénico. El receptor de las células T (**TCR**, de "T cell receptor") reconoce péptidos anclados dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presente en la superficie celular de las células presentadoras de antígeno (**APC**, de "Antigen presenting cell). El receptor de las células B (**BCR**, de "B cell receptor") lo constituye una inmunoglobulina que puede reconocer al antígeno en su conformación tridimensional, tanto si está libre en solución, como si se haya en la superficie de una célula (Alzari et al, 1988). En mamíferos, los linfocitos comienzan a generarse en los órganos linfoides primarios: el timo para las células T y la médula ósea para las células B y terminan su desarrollo en los tejidos linfoides secundarios periféricos: nódulos linfáticos, bazo, amígdalas, placas de Peyer. La selección dependerá del reconocimiento del receptor antigénico que, en términos simplistas, podría decirse que durante los primeros estadios de diferenciación dictará la sentencia de muerte del linfocito si éste reconoce un antígeno (por las altas probabilidades de que se trate de un autoantígeno) y en los últimos estadios, por el contrario, determinará las señales de activación, proliferación y reactividad contra el antígeno (por las altas probabilidades de que se trate de un antígeno foráneo). A continuación se expondrán de forma general los mecanismos que controlan los procesos de selección negativa en los linfocitos T y B, que serían los responsables de un sistema inmune "no autorreactivo".

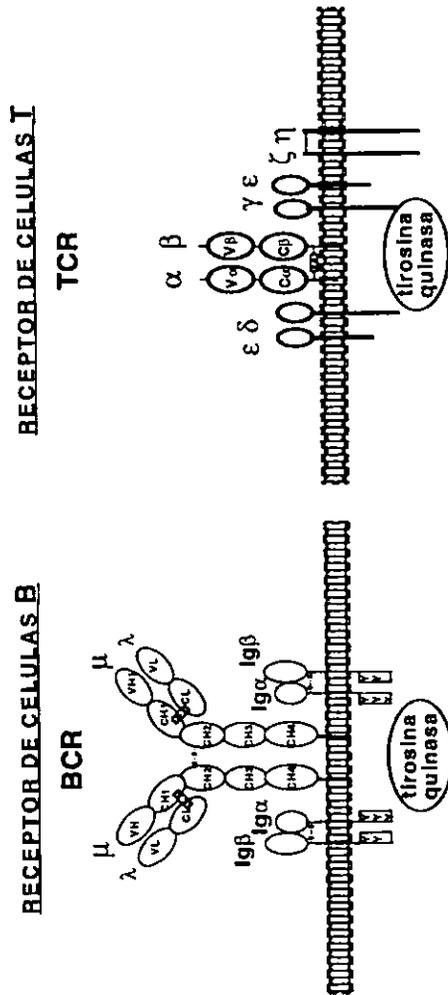


Figura 2. Representación esquemática del receptor para células B (BCR) y para células T (TCR). El BCR está compuesto por una inmunoglobulina M (con dos cadenas μ pesadas y dos cadenas λ ligeras) y por las cadenas auxiliares α y β que están directamente implicadas en la traducción de la señal a través de las tirosina-quinasas. El TCR está compuesto por dos cadenas α y β rodeadas por un conjunto de pequeñas cadenas moleculares $\delta, \epsilon, \gamma, \zeta, \eta$, que en conjunto constituyen el complejo CD3 que está implicado en la transmisión de la señal a través de las tirosina-quinasas.

3.- SELECCIÓN NEGATIVA DE LOS LINFOCITOS B

La diferenciación de linfocitos B se produce a través de múltiples pasos a partir de células precursoras comprometidas hacia la formación de células B plasmáticas secretoras de anticuerpos (**Fig. 3**). Este proceso viene definido por cambios en la expresión de genes específicos del linaje celular (Löffert et al, 1994; Baixeras et al, 1994). Los primeros estadios de maduración de las células B tienen lugar dentro de compartimentos específicos de la médula osea. Es allí donde los precursores linfoides se comprometen a generar el linaje de células B y su consiguiente diferenciación en células que expresan la inmunoglobulina M de superficie o IgM (formada por dos cadenas pesadas μ y dos cadenas ligeras λ ó κ) y que junto a las dos cadenas adicionales α y β constituyen el complejo del receptor de la célula B para el antígeno (BCR, **Fig. 2**). Esta diferenciación consiste en la transición de, desde células pro-B (estadio en el cual los genes de las inmunoglobulinas están todavía en configuración de línea germinal) hacia células pre-B, donde los segmentos genómicos VDJ de la región variable (V_H) de las inmunoglobulinas se recombinan con el locus de la cadena pesada (C_H) para generar la cadena μ que a su vez se expresará en la superficie celular en asociación con cadenas ligeras provisionales V-preB y λ 5 (Sakaguchi & Melchers, 1986) que serán más tarde sustituidas por las cadenas κ o λ . Durante la fase independiente del antígeno en la que la célula B aún no expresa el BCR, la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas está controlada por factores solubles incluyendo IL-3 e IL-7 así como por las interacciones de las células con componentes del estroma (Rosenberg & Kincade, 1994) (**Fig. 3**). Su acción biológica está mediada por distintas señales intracelulares generadas por la unión de otros receptores a sus ligandos (moléculas de adhesión, factores de crecimiento, etc). Un ejemplo claro lo constituye la línea celular pro-B FL5.12 de hígado fetal, que crece en medio condicionado con IL-3 (McKearn et al, 1985). La privación de la IL-3 como factor de crecimiento de estas células determina su muerte celular programada o apoptosis (**Fig. 4**).

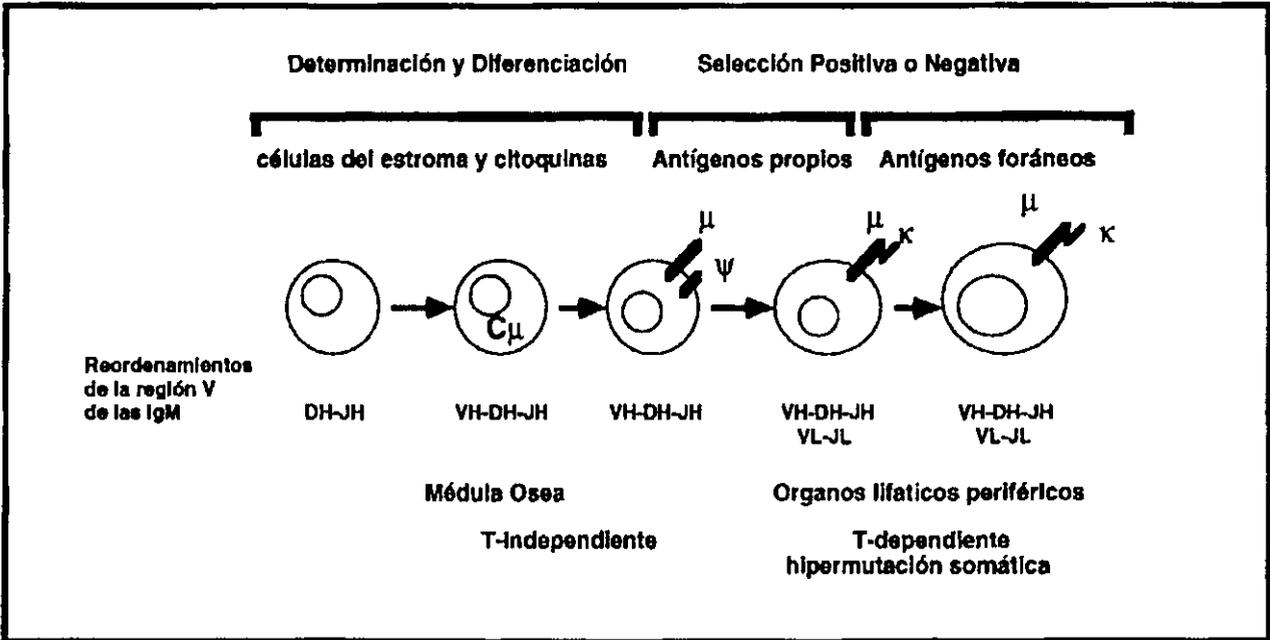


Figura 3. Modelo de diferenciación propuesto por Schwartz y Stollar. Durante los primeros estadios la supervivencia de las células B depende de la presencia de factores de crecimiento provenientes de las células del estroma. La maduración de los linfocitos B está influida por la selección positiva o negativa en el momento que comienza a expresarse la cadena μ de la inmunoglobulina M. Las cadenas ligeras κ también participan en este proceso modificando las propiedades de unión con el antígeno por parte de la cadena μ . La función de las pseudocadenas ψ ligeras resulta controvertida (Schwartz & Stollar, 1994).

En la fase de célula pre-B, es la región variable de la cadena pesada (V_H) la responsable del contacto directo con el antígeno, lo que influirá en el tipo de población de célula B madura IgG. Por tanto, el concepto de selección clonal de las células pre-B mediada por la región V permite explicar los orígenes del repertorio inmune primario (Schwartz & Stollar, 1994). Basándose en estudios recientes, se ha sugerido que en los primeros estadios de célula pre-B, es la cadena μ la que juega un papel muy relevante en la selección negativa al producirse probables interacciones de alta afinidad con antígenos propios presentes en la médula ósea (Fig. 3). Hay evidencias de que la selección positiva y la consiguiente maduración de los linfocitos a partir de células pre-B dependerá en gran medida de la habilidad de la cadena μ para transmitir una señal funcional. La importancia de tal habilidad se ve reflejada en la agammaglobulinemia unida al cromosoma X, una enfermedad en la que los linfocitos B están incapacitados para llegar a su estado maduro debido a una mutación de una proteína de la familia *src* de las tirosina-quinasa que traducen la señal temprana desde el receptor antigénico (Tsukada et al, 1993). No obstante, las células pre-B no sólo requieren de la señalización a través de su receptor antigénico sino además de la presencia de otras moléculas de superficie que participan en la diferenciación mediante la traducción de la señal intracelular después de unirse a sus ligandos correspondientes, tales como los factores de crecimiento. Este último hecho implica la dependencia del contacto directo de las células pre-B con las células del estroma y citoquinas de la médula ósea. Aunque el papel que juegan las cadenas ligeras "provisionales", también llamadas pseudocadenas ligeras, en la señalización es aún bastante controvertido, lo que sí parece indiscutible es que la expresión de la cadena μ es imprescindible para la maduración de las células pre-B (Schwartz & Stollar, 1994).

En la transición de célula pre-B a célula B inmadura, tienen lugar los reordenamientos genéticos correspondientes a las cadenas ligeras definitivas κ y λ . Las cadenas ligeras κ y λ también participan en el proceso de selección mediante la modificación de las propiedades del sitio de unión al antígeno de la cadena μ . Más tarde, la transición de célula B inmadura a célula B madura, se acompaña por los cambios de clase de cadena pesada que define el tipo de inmunoglobulina producida por la

célula B que pasará a coexpresar IgM e IgD en su superficie en una primera fase (Fig. 3). La célula B madura migrará fuera de la médula ósea hacia la periferia llegando a los nódulos linfáticos y al bazo. En estos compartimentos periféricos se producirá el encuentro con el antígeno específico de probable origen externo, así como el diálogo directo con las células T a través de los correceptores que determinarán las últimas fases del desarrollo de células B maduras (Desiderio, 1994; Moller, 1994).

La activación del linfocito B requiere por tanto, una interacción exitosa de las regiones variables V de su receptor BCR con su antígeno específico que puede tratarse tanto de una molécula libre como de una molécula asociada a un sustrato membranal, interaccionando así con estructuras tridimensionales (Alzari et al, 1988). Las consecuencias de la unión del antígeno a su receptor pueden promover tanto la apoptosis como la proliferación o la anergia que dependen a su vez del estadio de maduración de la célula B, así como de la coestimulación a través de otros receptores de la célula que mencionaremos más tarde. Si esto es así, cabe preguntarse cuál es ligando que determina si la selección es negativa o positiva. Schwartz y Stollar proponen que los antígenos propios son los que dirigen la dirección de la selección de los linfocitos B durante los primeros estadios (Schwartz & Stollar, 1994). Parece bastante aceptada la idea de que la selección negativa por apoptosis resulta de la interacción del antígeno con un receptor de alta afinidad para el mismo durante la fase de de célula B μ^+/κ^- o μ^+/κ^+ . Por el contrario, la interacción de antígenos propios con receptores de baja afinidad en este estadio promueve la diferenciación del linfocito B. Más aún, se conoce el hecho de que una alta proporción de los "autoanticuerpos naturales" son anticuerpos IgM de baja afinidad y polirreactivos contra antígenos propios, antígenos bacterianos y haptenos. Por otro lado, en el estadio de μ^+/κ^+ ó μ^+/λ^+ , la célula B con una alta afinidad por el antígeno propio podría evitar su selección mediante un segundo reordenamiento de sus genes V, proceso llamado "edición del receptor" y que implica hipermutaciones somáticas en las regiones V_H (Schwartz & Stollar, 1994).

Esta hipótesis implica que la consecución del proceso de desarrollo de células B está íntimamente asociada a la expresión de su receptor BCR que establece un conjunto de puntos de supervisión o control en base a los

cuales la célula procede al siguiente paso de maduración. Este hecho se ha podido constatar en los ratones que no pueden reordenar genes de regiones variables de las inmunoglobulinas como los ratones SCID (severe combined immunodeficient disease) o ratones homocigotos para anomalías en los genes *RAG-1* y *RAG-2*, cuyos productos proteicos son los responsables de dirigir los reordenamientos génicos de las inmunoglobulinas, y como consecuencia carecen de células B y T maduras (Shinkai et al, 1992; Mombaerts, 1992; Fulop & Philips, 1990).

Las células de linfoma B WEHI-231 constituyen un modelo de células B inmaduras altamente sensibles a la activación de la muerte celular o apoptosis a través de su receptor (De Franco et al, 1987; Hasbold & Klaus, 1990). Esta línea celular se comporta como las células B inmaduras que nunca han interactuado con el antígeno que reconoce su BCR. La señalización de las células WEHI 231 promovida por la interacción de su receptor con un anticuerpo anti-IgM, que emularía a un antígeno de alta afinidad, es interpretada por la célula como un señal negativa que conduce a la interrupción del ciclo celular quedándose en la fase G₀/G₁ del mismo en las primeras 24 hrs (Scott et al, 1986). Este paro en el ciclo celular implica la consiguiente activación del proceso apoptótico (**Fig.4**). En esta fase de B inmaduro la célula interpreta como propio cualquier antígeno que encuentre de alta afinidad, de forma que se autoelimina así misma con el fin de evitar autolesiones. Sin embargo el linfocito B puede tener una oportunidad para su supervivencia si recibe ayuda externa. Esta ayuda puede provenir de los linfocitos T que les informan, mediante la coseñalización a través de otros receptores, de la naturaleza de este antígeno. De hecho, las células WEHI 231 tratadas con anti-IgM pueden ser rescatadas de la muerte si se incuban al mismo tiempo con el ligando para el receptor CD40 (CD40L) que normalmente está presente en las células T (**Fig. 5**) y cuyo importante papel en el rescate de la apoptosis se describirá más adelante. Una vez salvada esta zona de alto peligro de muerte para el linfocito B inmaduro, éste continúa su desarrollo hasta alcanzar su madurez para entrar de nuevo en otro proceso de selección periférica. En el linfocito B maduro, el reconocimiento antigénico confiere la suficiente competencia a la célula para la subsiguiente señalización derivada de la cooperación con la célula T. Esta

cooperación se produce tras la activación previa de los linfocitos T CD4⁺ a través de su propio TCR que ha reconocido el antígeno presentado a su vez por las células APC (Clark & Ledbetter, 1994). Si esto ocurre, las células T podrán "ayudar" a los linfocitos B a no morir cuando estos encuentren el mismo segmento de antígeno que activó a las células T. Más aún, el diálogo entre células T y B a través de correceptores de membrana tales como CD40, enviará señales al núcleo de la célula B para que ésta proliferare, se expanda y fabrique los anticuerpos específicos contra ese antígeno. Sin embargo, queda sin resolver la cuestión de quien informa a las células T de lo que es propio y de lo que es extraño. La clave de este enigma reside en las atroces pruebas de selectividad que han de pasar las células pre-T hasta llegar a células T maduras durante los estadios de maduración dentro de su escuela: el Timo.

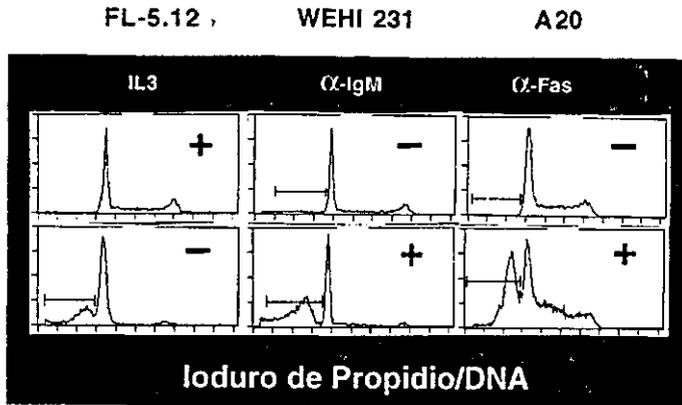


Figura 4.- Histogramas mostrando el ciclo celular de tres líneas de células B: FL-5.12 (Pro-B) que no expresa BCR en su membrana pero es dependiente de la presencia de IL-3 para su supervivencia, WEHI-231 (B inmadura) que expresa IgM en membrana, y A20 (B madura diferenciada) que expresa altos niveles de Fas en superficie. En los tres casos la apoptosis se induce de diferente manera según su estado de diferenciación. La línea Pro-B muere bajo la privación del factor de crecimiento IL-3 (-), la línea B inmadura muere al incubarla en presencia del anticuerpo anti-IgM(+) que emularía a su antígeno específico, y por último la línea B diferenciada moriría en presencia del anticuerpo anti-Fas (+) emulando al ligando de Fas. Mientras los dos primeros casos serían representativos de la selección negativa dentro de la médula ósea, el último caso sería representativo de la selección negativa en la periferia donde Fas parece jugar un papel importante en la inducción de la apoptosis de células maduras activadas.

4.- SELECCIÓN NEGATIVA DE DE LOS LINFOCITOS T

Las células pre-T provenientes de la médula ósea llegan al timo donde se diferenciarán en células inmunocompetentes después de pasar diferentes etapas de selección. Esta selección de los linfocitos T que se produce en el timo, es de tal envergadura que se cree que sólo un 5% consigue "graduarse" y salir al torrente circulatorio y órganos periféricos en calidad de linfocitos T, en principio no autoreactivos o débilmente autoreactivos (revisado en Nagata & Goldstein, 1995). Se supone y se acepta como hipótesis que estos linfocitos nunca han "visto" el antígeno específico que podría ser reconocido por su TCR. En el caso de que así lo hicieran, el antígeno se consideraría de origen foráneo y el linfocito T maduro estaría dispuesto a generar una respuesta agresiva que comprendería: activación de la célula (secreción de linfoquinas que alertarán otras células como a los macrófagos), proliferación y expansión, diálogo con los linfocitos B en el bazo, ayudando a su activación en el caso de que éstos encuentren ese mismo antígeno.

Al igual que los linfocitos B, los linfocitos T poseen un receptor antigénico constituido por dos cadenas: α y β y por el complejo CD3 (formado por las cadenas γ , δ , ϵ , ζ , y η) que en conjunto se conoce como el "TCR" (Fig. 2). A diferencia de las células B que pueden circular libremente y que tienen la capacidad de reconocer el antígeno de forma ubicua, las células T están localizadas en sitios específicos y por tanto su potencial de interacción a través de su TCR con otras células está mucho más limitada. Dentro del timo, si el precursor de la célula T se selecciona de forma positiva, entonces terminará el proceso de diferenciación convirtiéndose en una célula T madura. Si por el contrario la célula T es seleccionada negativamente entonces la célula sufrirá apoptosis (delección clonal) o bien quedará en un estadio de no respuesta (anergia clonal). En ambos casos la célula T necesita estar expresando ya en su membrana su TCR correspondiente así como las moléculas accesorias CD4 y CD8. A diferencia del BCR, el TCR interacciona a través de sus regiones variables (V) con péptidos cortos asociados a estructuras protéicas propias, generalmente el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que se expresa en todas las células presentadoras del antígeno (APC) como las

células epiteliales y macrófagos. La unión del TCR con el MHC+péptido está asistido por los correceptores CD4 y CD8 en la superficie de la célula T. Los péptidos antigénicos son el resultado del procesamiento que sufre el antígeno en cuestión dentro de la célula presentadora del mismo, en la que se degrada en pequeños fragmentos peptídicos que se unen posteriormente a su sitio específico dentro la molécula MHC correspondiente (Mueller et al, 1989). La selección de los linfocitos T dentro del timo está influida por la presencia de estas células APC que portan en su superficie los MHC junto con los pequeños péptidos (normalmente formados por 9 aminoácidos) que son los que tienen la gran responsabilidad de incidir en la decisión de la célula T de continuar su proceso de desarrollo o por el contrario suicidarse en aras de un sistema inmune no autorreactivo. Se supone que en el timo debe existir una representación de casi todos los antígenos propios a modo de "bazar". Son muchos los factores que deben influir en este proceso de tamizado de linfocitos T en el timo. Uno de los factores debe ser el estado de maduración del timocito pues los linfocitos T inmaduros T CD4⁺CD8⁺ (doble positivos) no traducen la señal desde la membrana al núcleo con la misma intensidad o eficacia que lo hacen los linfocitos T maduros (T CD4⁺ o T CD8⁺) posiblemente debido a que además no expresan un número elevado de TCR en su membrana todavía (Finkel et al , 1991). Los linfocitos T que expresan TCRs que no reconocen moléculas del MHC propios se supone que sufren también selección negativa mediante la muerte por apoptosis. De forma similar que para las células B, otro factor que puede determinar el sentido de la selección puede ser la avidez de los TCRs de los linfocitos inmaduros por los complejos MHC+péptido. Actualmente se acepta la idea de que aquellos linfocitos cuyos TCR reconozcan fuertemente los péptidos propios dentro del MHC son eliminados de una forma u otra como resultado del reconocimiento antigénico, evitando la salida del timo de células T potencialmente autorreactivas. Se asume como altamente probable que este es el mecanismo principal de selección negativa (delección clonal) de los linfocitos T autorreactivos y de hecho este mecanismo se puede emular cuando se exponen los linfocitos T inmaduros a anticuerpos que reaccionan contra sus TCRs (Schwartz, 1993). Por el contrario, los linfocitos T que reconozcan de forma parcial o débilmente el péptido antigénico

serán seleccionados positivamente. De esta forma los péptidos autóctonos esculpen el sistema inmune determinando la selección positiva o negativa de los linfocitos T citotóxicos o auxiliares. Por tanto, no es sólo el hecho en sí de reconocer o no un péptido autóctono sino la avidéz con la que este péptido es reconocido (Schwartz, 1993).

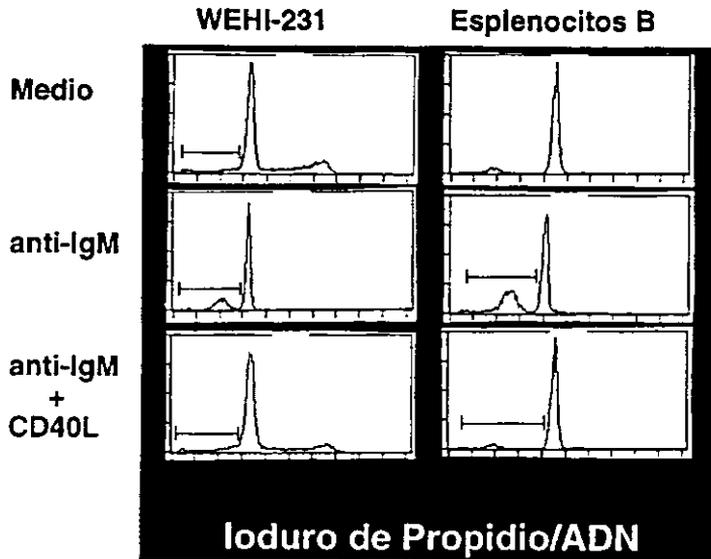


Figura 5. Histogramas mostrando el ciclo celular de células B inmaduras de la línea celular WEHI-231 y de células B de bazo (donde coinciden células B inmaduras, maduras y diferenciadas). En ambos casos el tratamiento con anticuerpos anti-IgM induce la apoptosis y el tratamiento simultáneo con el ligando de CD40 (CD40L) la inhibe.

Por otro lado, se asume además que las señales intracelulares que gobiernan la diferenciación (selección positiva) o la apoptosis (selección negativa) deben ser diferentes y que la avidéz de la adhesión de las células T por las células APC que presentan el antígeno controla su inducción. Existe actualmente mucha controversia sobre cual es en realidad la célula que presenta el antígeno a la célula T en el timo y que por tanto influye en la selección negativa de la misma. Entre los candidatos altamente probables se encuentran las células epiteliales del timo y las células

dendríticas. Algunos autores consideran posible que en el timo sean las células epiteliales las que gobiernen los procesos de anergia clonal y los macrófagos los de apoptosis de las células T, basándose en la diferencia de densidad de MHC+péptido en las membranas de ambos tipos de células APC (Janeway et al, 1992). Otros autores sostienen que las células epiteliales también están implicadas en la selección positiva de los timocitos (von Boehmer, 1994). Las células dendríticas por otra parte juegan un papel opuesto en los linfocitos T maduros de la periferia a los que activan de una forma potente (Nossal, 1994). La razón de estos efectos tan opuestos puede residir en la capacidad del TCR para transmitir un tipo de señal intracelular que puede ser muy distinta si se trata de un linfocito T inmaduro o un linfocito T maduro. En este sentido, se ha sugerido que la señal que transmite el TCR de los timocitos sea una señal incompleta o ambigua que avocaría a la célula a sufrir apoptosis (Smith et al, 1989).

Tal vez la primera sugerencia sobre la eliminación por muerte celular de los timocitos autorreactivos cuando estos reconocen su antígeno surgió de Lederberg en 1959 (Lederberg, 1959). Dos décadas más tarde, la primera indicación de que los linfocitos T se mueren por apoptosis en el timo surgió de los experimentos de Wyllie quien mostró que la administración de glucocorticoides en ratones inducía una muerte masiva y fulminante de los timocitos (Wyllie, 1980). Más recientemente se demostró que la muerte por glucocorticoides es uno de los procesos fisiológicos por los que los linfocitos T sufren delección clonal por apoptosis *in vivo* (Gonzalo et al, 1993; Vacchio et al, 1994), proceso que también puede ser reproducido *in vitro* (Fig.1). Los trabajos de Kappler y colegas demostrando que los superantígenos inducían la muerte masiva sólo de aquellos linfocitos T que portaban en su receptor TCR la region variable V β que se unía a dicho superantígeno, aportaron nuevas evidencias de que la selección negativa de los linfocitos T en el timo se producía por delección clonal específica (Kappler et al, 1987). La administración en ratones de altas dosis de anticuerpos anti-TCR o de superantígenos, como las enterotoxinas de staphylococcus, resulta en la delección en el timo de las células T que expresan el receptor antigénico TCR que se une específicamente al anticuerpo o al superantígeno (Kawabe

& Ochi, 1991; Gonzalo et al, 1994a). Estudios más recientes han aportado datos de que esta delección era causada por muerte apoptótica (Gonzalo, 1992; Gonzalo, 1994a).

Los anticuerpos dirigidos contra el complejo del TCR, si bien no pueden imitar del todo la estimulación que induce un antígeno presentado por la célula a través del MHC, resultan muy útiles para el análisis de la activación de las células T. De hecho se han descrito en muchos trabajos que los anticuerpos anti-TCR (anti-CD3) son capaces de inducir apoptosis en timocitos humanos y murinos en células T transformadas y células T maduras activadas (McConkey et al, 1989; Smith et al, 1989, Newell, 1990, Lenardo, 1991). Mediante este tipo de estudios *in vitro* se ha podido deducir que señales muy diferentes pueden conducir hacia el mismo programa de apoptosis y muy probablemente estas señales estén reguladas por rutas bioquímicas distintas. De hecho, las rutas de señales intracelulares pueden ser activadas de diferente manera si una célula T es activada por anticuerpos anti-TCR, glucocorticoides, o un factor como la IL-2. Además hay evidencias muy claras de que la sensibilidad frente a la inducción de la apoptosis es muy diferente si se trata de una célula T inmadura del timo o una célula T madura de la periferia. Así por ejemplo mientras los timocitos sufren apoptosis en respuesta a un tratamiento con glucocorticoides o anticuerpos anti-TCR (Wyllie, 1980; Smith et al, 1989) los linfocitos maduros de la periferia necesitan ser previamente activados para disparar el programa de muerte celular (Russel et al, 1991; Wesselborg et al, 1993a). Por tanto, la apoptosis es un proceso fisiológico que contribuye al modelado del repertorio del TCR de los linfocitos T que salen a la periferia.

5.- APOPTOSIS PERIFÉRICA

Estudios muy recientes indican que la sensibilidad de los linfocitos T frente a la apoptosis no está restringida solamente a los timocitos. Los linfocitos maduros de la periferia también sufren apoptosis bajo determinadas circunstancias (Kabelitz et al, 1993). Esto conlleva a que la apoptosis juegue todavía un importante papel en la periferia contribuyendo a la regulación de la respuesta inmune incluyendo el establecimiento de

la tolerancia periférica.

No se sabe con certeza si el mecanismo de control del tamaño de las poblaciones T por apoptosis es el responsable del mecanismo de tolerancia periférica frente a antígenos propios específicos de tejidos. Cuando el linfocito T maduro abandona el timo para entrar en la periferia, su TCR podría reaccionar con un péptido "parecido" a aquel con el que interaccionó una vez en el timo, pero esta vez, si la avidéz es fuerte, el linfocito T reaccionará respondiendo a la estimulación antigénica mediante la proliferación, diferenciación en célula efectora, reaccionando contra todo agente tanto invasor como interno que porte ese péptido. No obstante, entre la progenie de células T estimuladas por el antígeno, aún otra vez la gran mayoría de ellas mueren por apoptosis y sólo una pequeña fracción se desarrolla en células efectoras y células de memoria. Este es un proceso de inducción de muerte por activación que puede ser potenciada cuando se expone a estos linfocitos estimulados por el antígeno a factores de crecimiento tales como la interleucina 2 (IL-2) (Lenardo, 1991). Este fenómeno de muerte por apoptosis en linfocitos maduros activados podría ser un mecanismo homeostático que funciona para regular el tamaño de la población de clones T estimulados por un antígeno. Por otro lado, los datos recientes relativos al estudio de ratones MLR-*lpr/lpr*, de los que dedicaremos un espacio en este capítulo, indican que la apoptosis puede ser un mecanismo importante para regular la tolerancia periférica (Nagata & Goldstein, 1995).

Existe, por tanto, el consenso general de que las células T maduras en su estado de reposo no sufren apoptosis mediada por su TCR en respuesta por ejemplo a anticuerpos anti-TCR a no ser que se produzcan otro tipo de señales coactivadoras. Este hecho puede tener consecuencias graves en pacientes de SIDA ya que se ha observado que la estimulación del receptor CD4 facilita la subsecuente apoptosis de las células T maduras en respuesta a anticuerpos anti-TCR (Newell et al, 1990; Oyaizu et al, 1993). Este fenómeno explicaría el hecho de que la unión del receptor CD4 a la proteína gp120 del virus del SIDA promueva la apoptosis cuando la célula T encuentra su antígeno a través de su TCR (Groux et al, 1992; Oyaizu et al, 1993; Gougeon & Montagnier, 1993).

La susceptibilidad a la apoptosis depende también de la fase del

ciclo celular en que se encuentra la célula T o B. Así por ejemplo, las células que se bloquean en fase G₁ del ciclo celular son resistentes a la muerte inducida por la estimulación del TCR, mientras que las células que se bloquean en la fase S del ciclo celular son muy propensas a sufrir apoptosis (von Boehme & Lenardom, 1993). Según los datos publicados existen evidencias que sugieren que las células T maduras se activan primero por el antígeno, proliferan siguiendo varios procesos del division celular hasta adquirir una sensibilidad a las señales de apoptosis de una forma que aún no se comprende bien (Russel et al, 1991; Wesselborg et al, 1993). Muchos datos sugieren que en este tipo de procesos intervienen los niveles de expresión de la molécula Bcl-2 que regula la inhibición de la apoptosis, así como la expresión de la molécula de superficie Fas que induce la apoptosis, correlacionandose también la expresión de ambas proteínas con los niveles de expresión de CD45RO en la superficie celular. Así por ejemplo, las células T que son CD45RO⁺ se caracterizan por expresar niveles muy bajos de Bcl-2 y por tanto son más susceptibles a sufrir muerte por apoptosis (Kabelitz et al, 1994).

Por otra parte, afortunadamente la selección periférica en los linfocitos T no depende solamente de la avidéz del péptido sino también de la cantidad del péptido que se encuentra. Cantidades pequeñas permanentes o intermitentes no consiguen alcanzar el umbral de reacción del sistema inmune. Cantidades altas pueden provocar un "shock" en el sistema inmune induciendo paradójicamente la apoptosis masiva de ciertos clones de células T, al mismo tiempo que la tolerancia y por tanto no responder frente al antígeno. Esta tolerancia específica del antígeno se denomina "supresión por dosis alta" o "zona de alta tolerancia" e implica mecanismos de deleción extratímicos. Parece ser que cantidades intermedias para un determinado antígeno son las que permiten inducir una respuesta inmune. Un ejemplo de la deleción por altas dosis lo constituye la terapia mediante administración de dosis elevadas del péptido MBP que provoca la deleción de células T reactivas para la proteína básica de mielina (MBP), que promueven el desarrollo de la encefalitis alérgica experimental (EAE), una enfermedad autoinmune similar a esclerosis múltiple en humanos (Critchfield et al, 1994).

6.- CONTROL DE LA APOPTOSIS DESDE LA MEMBRANA CELULAR

Según Raff, todas las células del sistema inmune están programadas para responder a una señal que las conduce a la apoptosis (Raff, 1992). Pero el rescate o evasión del programa de apoptosis se puede producir dependiendo del estado de maduración del linfocito cuando combinaciones específicas de moléculas de superficie se unen a sus ligandos al mismo tiempo que se estimula el receptor antigénico. Algunos estudios han identificado ciertas moléculas que contribuyen a la activación del linfocito y que se clasifican como moléculas coestimuladoras (Kroemer & Martinez, 1992; Krammer et al, 1994). Entre estas moléculas se encuentran B7/BB1, HSA (de "heat stable antigen"), CD40, CD20, CD28, CD2 y los receptores de ciertas citoquinas (Janeway & Goldstein, 1992; Genaro et al, 1994; Baixeras et al, 1994).

Desde el año 1962 se conoce que el carácter de extraño o foráneo de una proteína no es suficiente por sí mismo para generar una respuesta inmune (Dresser, 1962). Bretscher y Cohn lanzaron la teoría de la doble señal, según la cual para que un linfocito se active requiere la señal 1 a través de su receptor antigénico y una señal 2 que se genera por el contacto de las membranas del linfocito y otra célula (a través de receptores de membrana) o bien a través de moléculas mensajeras (hoy llamadas linfoquinas) (Bretscher & Cohn, 1970). Ambos autores ya predijeron que el linfocito sería inactivado si sólo recibía la señal 1 y correctamente activado si recibía ambas señales: 1+2. Su teoría explica hoy en día que la unión del receptor con su antígeno en ausencia de una segunda señal provocaría la anergia clonal o incluso la apoptosis (Schwartz, 1990). La naturaleza de la señal 2 puede provenir de productos microbianos tales como los existentes en el adyuvante de Freund o lipopolisacáridos bacterianos de carácter mitogénico, la interleucina 1 (IL-1), la interleucina 2 (IL-2), o CD40, CD20, o de las proteínas de la matriz extracelular como las proteínas de adhesión (ICAM, CD2, CD4, etc). Estas últimas tienen gran relevancia en las células presentadoras de antígeno APC, células T y B, especialmente cuando se activan hasta el punto de que la respuesta del sistema inmune puede estar mediada por las moléculas de adhesión. Así por ejemplo la coligación del TCR e ICAM-1

o V-CAM-1 aumenta la activación de la apoptosis en células T CD4⁺ humanas. La interacción de células T y células APC mediante las moléculas CD28/CTLA4 (en células T) y su ligando B7 (en células APC) parece tener mucha importancia en la activación de ambos tipos de células, si bien los estudios hasta ahora realizados pueden ser todavía un tanto controvertidos debido a identificación de dos ligandos diferentes para CD28/CTLA4 como son el B7-1 y B7-2 que parecen tener un efecto distinto. Pero aún así hay datos que indican que si las células T reciben una estimulación via TCR en ausencia de la interacción **CD28/B7** éstas pueden devenir anérgicas (Linsley & Ledbetter, 1993). En un interesante trabajo, Groux y colegas observaron que el anticuerpo anti-CD28 prevenía la apoptosis de los linfocitos T CD4⁺ activados de pacientes asintomáticos infectados por el virus del SIDA, llegando incluso a restaurar su respuesta proliferativa frente a un estímulo (Groux et al, 1992). Este hecho podría tener importantes implicaciones en el diseño de estrategias terapéuticas dirigidas a la prevención del desarrollo de la enfermedad del SIDA.

Como se menciona anteriormente, en el caso de los linfocitos B, la unión del antígeno a su receptor BCR correspondiente puede iniciar el proceso de la apoptosis. Para escapar de esta apoptosis, la célula B requiere una señal adicional proveniente de la interacción de otra molécula de su superficie con el ligando correspondiente. El diálogo entre el BCR, receptores de citoquinas, y otros receptores de superficie con sus respectivos ligandos, juega un papel crítico en la decisión final de cometer suicidio celular. Una de las moléculas que funcionan como coestimulador en células B y que está implicada en el rescate de la apoptosis inducida por el BCR lo constituye **CD40** (Tsubata et al, 1993). Esta molécula de 45-50 kDa, pertenece a la familia del receptor para el factor necrosante de tumores α (TNF α R) y se expresa desde los estadios tempranos de la maduración de los linfocitos B (revisado en Clark & Ledbetter, 1994; Baixeras et al, 1994). El efecto anti-apoptótico de CD40 resulta paradójico dada su homología estructural con el receptor para TNF y con el receptor Fas/APO-1 cuya interacción con su ligando induce la apoptosis en muchas células incluyendo las células B. El ligando de CD40, CD40L, es una glicoproteína de 39 kDa de tipo II que se expresa transitoriamente sólo en células T CD4⁺ activadas. CD40 no sólo se expresa en las células B sino

también en células dendríticas foliculares, células dendríticas de la médula ósea, macrófagos activados, y células epiteliales del timo. Las interacciones CD40-CD40L pueden por tanto regular la maduración de las células T vía interacciones que no implican las células B (Clark & Ledbetter, 1994).

La interacción de CD40-CD40L transmite una señal en la célula B para la inducción de su activación y producción de inmunoglobulinas (Noelle et al, 1992; Lederman et al, 1994). El sistema CD40-CD40L permite entrar a una gran mayoría de células B en el ciclo celular llegando incluso a proliferar. Cuando esta interacción se hace en presencia de un anticuerpo dirigido contra el BCR o en presencia del antígeno específico, en lugar de producirse apoptosis se produce no sólo un rescate de esta muerte sino también una potenciación de la proliferación celular (Durie et al, 1994). Esto indica la enorme importancia que tienen las interacciones de células T con las células B en el momento en que la célula B se encuentra con su antígeno (Clark & Ledbetter, 1994). De hecho, en el lugar que se produce un daño infeccioso, los agentes patógenos/antígenos son capturados por las células dendríticas que migran a través de los vasos linfáticos hasta las áreas paracorticales de los órganos linfoides secundarios. Una vez allí, las células dendríticas presentan el antígeno procesado a las células T que como consecuencia se activan al reconocer su antígeno. A partir de este momento se inicia toda una serie de activaciones en cadena: la célula T activada expresará en su membrana el CD40L, proceso que a su vez permite concomitantemente la hiperactivación de la célula dendrítica para que presente más antígeno en su superficie; al mismo tiempo se induce la secreción de factores quimiotácticos que pueden atraer otras células como T CD8⁺ y células B. Las células T CD4⁺ pueden también empezar a secretar citoquinas que participan en su proliferación autocrina o bien en la proliferación paracrina y diferenciación de células CD8⁺ y células B reclutadas. La interacción de la célula B con la célula T puede dar lugar en este momento a dos procesos diferentes: uno dará lugar a la generación de blastos plasmáticos que se convertirán en células productoras de anticuerpos, proceso independiente de la interacción CD40-CD40L. Un segundo proceso de activación posible de las células B dará lugar a la generación de células B blásticas que migrarán a los

folículos primarios para iniciar la formación de los centros germinales. Este segundo proceso parece ser estrictamente dependiente de la interacción CD40-CD40L (Banchereau et al, 1994). Estas células B se convierten en centroblastos que entran en un proceso de expansión clonal sufriendo mutaciones somáticas a través de mecanismos aún poco claros. Estos centroblastos se diferencian en centrocitos que dejan de proliferar y que son sometidos a una selección dependiente del antígeno que se encuentra ya presente en forma de inmunocomplejos en la superficie de las células dendríticas foliculares. Las células B no seleccionadas mueren por apoptosis. Por el contrario las células B seleccionadas presentarán en su superficie el antígeno, ya procesado, a las células T que han proliferado durante el proceso extrafolicular y que finalmente migraron a los centros germinales (Fuller et al, 1993). Esta interacción de células B/T probablemente implique a CD40 y como consecuencia se producirá primero la expansión de las células B que portan en su superficie BCR de alta afinidad para el antígeno y, finalmente, el cambio de isotipo de inmunoglobulina. La activación a través de CD40 está probablemente también implicada en la diferenciación del centrocito a célula plasmática o bien a célula B de memoria. De hecho, la doble activación a través del BCR y CD40 induce a los linfocitos B a diferenciarse a células de alta tasa de producción de inmunoglobulinas. Una vez eliminado el antígeno, las células B pasan su diferenciación masiva a células B plasmáticas para revertir a una situación de célula de memoria (Banchereau et al, 1994).

La observación de que las células B de los centros germinales mueren por apoptosis a no ser que sean rescatadas por la interacción del BCR/antígeno y CD40/CD40L refleja al mismo tiempo la eliminación de los linfocitos B circulantes no útiles que no han encontrado su antígeno y que por tanto no han recibido ayuda de las células T (Banchereau et al, 1994). Un ejemplo ilustrativo sobre la capacidad de la molécula CD40 para rescatar la célula B de la apoptosis lo constituyen los ensayos realizados en la línea WEHI 231 y en células B de esplenocitos de ratón en los que el tratamiento in vitro de estas células con anticuerpos anti-BCR y el ligando soluble de CD40 rescatan de la muerte (Fig. 5). Pero la función de la molécula CD40 se ha podido constatar in vivo con la generación de ratones deficientes en la expresión de CD40 o en la

expresión de CD40L (Kawabe et al, 1994; Xu et al, 1994). La caracterización de los ratones deficientes para CD40 muestra que los niveles de anticuerpos IgM frente a antígenos Timo-dependientes estaban algo aumentados, pero no así los de IgG, IgA e IgE que eran bastante inferiores con respecto a ratones normales, lo que indica que CD40 es esencial para la inducción del cambio de clase de inmunoglobulina. Además la formación de los centros germinales en estos mutantes era defectuosa. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos IgM e IgG frente a antígenos timo-independientes resultaba normal. De forma bastante similar los ratones mutantes negativos para CD40L mostraban una respuesta deficiente de anticuerpos IgM frente a antígenos timo-dependientes y una incapacidad para formar centros germinales, aunque respondían de forma normal a antígenos timo-independientes (Xu et al, 1994).

La molécula **CD2** tiene un interés particular. Esta molécula se expresa en células B y T en ratón y sólo en células T y ciertas poblaciones de células B precursoras y células B del timo en humanos. En el sistema murino, CD2 actúa como una molécula de adhesión en las células B y su estimulación por anticuerpos o por su ligando CD48 no parece inducir ninguna de las señales de activación convencionales (movilización de Ca^{2+} , hidrólisis de phosphoinositol, PKC etc; Genaro et al, 1994). Sin embargo, la interacción con su ligando CD48 promueve una señal aún desconocida que rescata de la muerte a linfocitos B maduros cuando se exponen en presencia de su antígeno o de anticuerpos anti-BCR. Además este fenómeno parece ir acompañado con aumentos o al menos con la estabilización de la proteína Bcl-2 citoplásmica que está directamente implicada en la inhibición de la apoptosis en muchos sistemas (Genaro et al, 1994; Baixeras et al, 1994). Más aún, la expresión temprana de CD2 en linfocitos inmaduros coincide con los patrones de expresión de Bcl-2 durante el desarrollo ontogénico de linfocitos B (Merino et al, 1994; Baixeras et al, 1994). En células T humanas, la incidencia de CD2 en la apoptosis depende de la naturaleza del ligando y del estado de activación del linfocito. Parece ser que la combinación específica de dos anticuerpos dirigidos contra epítomos diferentes de CD2 junto con el estado de activación del linfocito pueden ser cruciales para dirigir a la célula T hacia un proceso de proliferación o hacia un proceso de muerte celular

(Wesselborg et al, 1993b).

Otro tipo de co-estimulación inhibitoria de la apoptosis lo constituye la inducida por factores solubles como las **citoquinas** (Baixeras et al, 1993). En el caso de la inducción de la apoptosis a través del receptor antigénico ésta puede ser parcialmente prevenida por las interleuquinas **IL-4**, **IL-5**, o el **TNF α** y **IFN γ** (Baixeras et al, 1993). De nuevo este tipo de coestímulo implica la interacción o colaboración específica de otras células. Así por ejemplo el sobrenadante de células Th2 que contiene **IL-4**, **IL-5**, **IL-6**, **IL-10** y otras linfoquinas protege a las células WEHI 231 de la muerte inducida por anticuerpos anti-IgM que emularían al antígeno propio, sin embargo este efecto no se observa con el sobrenadante de las células Th1 que contiene fundamentalmente **IL-2**, **IFN γ** (Baixeras et al, 1993).

En condiciones puramente fisiológicas la señal de muerte celular no se inicia necesariamente desde el receptor antigénico. Existen otros receptores que de hecho parecen estar presentes en la célula activada con el fin único de asegurar la muerte clonal de la misma. Tal es el caso de los receptores para glucocorticoides, factor transformante del crecimiento **β -1(TGF- β 1)**, factor necrosante de tumor (TNF) y el receptor **Fas/APO-1**. Este último pertenece, al igual que CD40, a la familia del receptor para el TNF. La molécula Fas se expresa en timocitos y en particular está altamente expresada en células T activadas, linfocitos T transformados con el virus de la leucemia HTLV-1, con el virus de la inmunodeficiencia HIV y con el del Epstein-Barr, EBV. Al igual que para el receptor de TNF, la señal específica de muerte reside en un dominio conservado de la zona citoplásmica del receptor. Si bien el tratamiento de células T activadas con anticuerpos anti-Fas induce la apoptosis de las mismas, no ocurre así en células T en reposo (Nagata and Golstein, 1995). La función de Fas juega un importante papel en la eliminación de linfocitos de la periferia que han sido activados por un antígeno extraño, lo que se interpreta como un mecanismo para asegurar que el organismo no se llene de un exceso de linfocitos T activados. De hecho, parece ser que la interacción con el antígeno promueve la sobre-expresión de Fas en la superficie celular haciendo a estos linfocitos más vulnerables a la

muerte mediada por la interacción Fas con su ligando que se expresa también en células T activadas. Si bien Fas parece tener un relevante papel en la periferia, no parece, sin embargo, que juegue un papel importante en la selección negativa dentro del timo como lo demuestran los ensayos realizados en ratones *lpr* que carecen del gen *Fas* (Nagata & Golstein, 1995). El sistema Fas es uno de los mecanismos implicados en la citotoxicidad mediada por las células T y se piensa que mediante un sistema parecido opere a la hora de eliminar las células T activadas. El ligando de Fas (FasL) tiene homología estructural con el CD40L, TNF, CD27, etc, pertenecientes todos a la familia del TNF. Al contrario que el CD40L, el FasL sólo se encuentra en células T activadas, pero no así en macrófagos, células B, fibroblastos células endoteliales, ni en células del estroma tímico, lo que implica que la activación de Fas corre a cargo de células T. De hecho, la interacción Fas/FasL puede ocurrir de tres formas teóricas: bien como un mecanismo mediado por un sistema parecido al de citotoxicidad entre dos células; bien mediante la interacción de los dos receptores en la misma célula a través de un mecanismo no conocido que puede implicar cambios en el plegamiento de las dos moléculas; o bien mediante la secreción de una forma soluble de FasL para actuar sobre la propia célula o sobre otra célula que exprese Fas (Nagata & Golstein, 1995). En ausencia de una apropiada expresión de Fas (ratones mutantes *lpr*) o del ligando de Fas (ratones mutantes *gld*), se produce una acumulación de linfocitos T activados que puede degenerar en procesos autoinmunes patológicos que describiremos mas adelante.

De forma similar, los linfocitos B parecen estar sujetos a la eliminación por la activación de Fas sólo en la periferia cuando éstos son activados por antígenos propios o extraños que asimismo inducen la sobre-expresión de Fas en la superficie. Se piensa que este mecanismo probablemente incida de forma notoria en la eliminación de las células B autorreactivas y este proceso estaría bloqueado en los ratones *lpr* o *gld*, en los que las células B que escapan a esta delección son las responsables de la producción a gran escala de inmunoglobulinas y concretamente, de autoanticuerpos en estos ratones. La función de Fas se hace evidente en la línea celular murina A20 que representa células B maduras y que

expresan Fas en su superficie. Estas células mueren a las 5 horas después de la exposición al anticuerpo anti-Fas (**Fig. 4**).

Por último, merece la pena mencionar a la función y efecto, en el control de la apoptosis que tienen los **receptores para glucocorticoides** en el sistema inmune. En efecto, es conocido desde hace tiempo que la involución inducida por el timo, causada por el estrés, es debida a la producción de glucocorticoides (Jondal et al, 1995). Más recientemente se pudo comprobar que tal involución era debida a la muerte por apoptosis de los timocitos, constituyendo uno de los ejemplos clásicos de muerte por apoptosis *in vivo* (Wyllie et al, 1980). Esta inducción de la apoptosis parecía además ser selectiva dentro del timo ya que la administración en ratones de dosis determinadas de glucocorticoide induce la muerte rápida de los linfocitos T inmaduros $CD4^+CD8^+$, que constituyen el 80% del total de timocitos, pero no así la de los linfocitos precursores que aún no expresan el TCR en su superficie, ni tampoco la de los linfocitos maduros $CD4^+$ o $CD8^+$ (Wyllie et al, 1980). Los linfocitos T maduros de la periferia no son sensibles a los glucocorticoides a no ser que hayan sido previamente activados (Kabelitz, 1993). Algunos mediadores inflamatorios como las interleuquinas, el interferón (IFN) o el TNF son capaces de inducir la secreción del factor CRF (corticotropin releasing factor) del hipotálamo y la hormona ACTH (adrenocorticotropica) de la glándula pituitaria (Jondal et al, 1995). En trabajos recientes, se ha podido demostrar la implicación *in vivo* de los glucocorticoides en la apoptosis clonal de células T periféricas hiperactivadas (Gonzalo et al, 1993). Concretamente, la activación policlonal de células T por inyección de anti-CD3 o de la enterotoxina B (SEB) de *Staphylococcus aureus*, que actúa como un superantígeno, parece inducir un aumento de los niveles de glucocorticoides en sangre (Gonzalo et al, 1993).

Se ha postulado que la selección negativa, en el timo y en la periferia, puede estar parcialmente regulada también por la producción endógena de glucocorticoides. De hecho, algunos datos indican que probablemente los componentes del epitelio del timo produzcan sus propios niveles de glucocorticoides y que estos participen en la selección de los timocitos (Vacchio et al, 1994). Algunos autores han sugerido que

en ausencia de reconocimiento de lo propio, los timocitos serían vulnerables a la apoptosis mediada por tal producción endógena de glucocorticoides. Por el contrario, los timocitos con afinidad intermedia para el antígeno propio se rescatarían de esta apoptosis por señales intracelulares aún no muy bien definidas. Los timocitos, tanto sensibles como resistentes a los glucocorticoides así como los linfocitos T maduros tienen aproximadamente el mismo número de receptores para glucocorticoides y con similar capacidad de unión a las hormonas. Este hecho indicaría que el mecanismo de regulación de la apoptosis por glucocorticoides en timocitos inmaduros es diferente del de los linfocitos T maduros. Probablemente la diferencia reside en el carácter de factor de transcripción inherente al receptor del glucocorticoide, el cual al unirse a su hormona se transloca al núcleo de la célula para unirse a la secuencia de ADN específica del promotor del gen cuya expresión va a regular. Además resulta razonable especular que la exposición libre de dicha secuencia de ADN a la que se tiene que unir el receptor hormonal dependerá del estado de activación y de maduración. Por otro lado, parece ser que los niveles de Bcl-2 juegan un papel en el rescate de la apoptosis inducida por glucocorticoides, debido al hecho de que precisamente los timocitos $CD4^+CD8^+$, que son muy sensibles a glucocorticoides, presentan niveles inapreciables de Bcl-2 mientras que los maduros, que son más resistentes a glucocorticoides, poseen niveles estables de esta molécula inhibidora de la apoptosis. De igual modo, los efectos del glucocorticoide dexametasona en linfocitos B depende de su estado de maduración ya que las células Pre-B y B inmaduras son más sensibles al tratamiento que las células pro-B y B maduras, lo cual al igual que para las células T se correlaciona con los niveles de Bcl-2, altos en Pro-B y B maduras y bajos en Pre-B y B inmaduras (Merino et al, 1994).

Los mecanismos por los que los receptores de membrana inician la señal de muerte o el rescate de la misma aún son una incógnita, pero se conocen ya varias proteínas intracelulares que de algún modo conectan con los receptores de membrana y que son responsables de la decisión de muerte o supervivencia de la célula y que exponemos a continuación.

7.- PROTEÍNAS INTRACELULARES QUE CONTROLAN LA APOPTOSIS.

La maquinaria que utiliza la célula para inducir su propia muerte está bastante conservada durante la evolución desde los nematodos hasta los mamíferos. La apoptosis en nematodos (*C.elegans*) es inhibida por la proteína Ced-4 e inducida por Ced-3, ambas localizadas en el citosol. En mamíferos, la apoptosis es inhibida por Bcl-2, homólogo de Ced-4 e inducida por ICE, homólogo de Ced-3. En un principio se centraron los estudios en la búsqueda de las endonucleasas involucradas en la fragmentación del ADN en nucleosomas dado que ésta era una de las características que definían a la apoptosis, aunque no la única. En estudios recientes se ha podido comprobar que la apoptosis se puede producir también en células anucleadas, lo que indica que la maquinaria así como la decisión de la muerte celular se encuentra en el citosol. A continuación se describen las principales proteínas citosólicas que hasta ahora se conocen como directamente implicadas en la regulación de la apoptosis centrándonos en la familia Bcl-2, la familia ICE y en factores de transcripción.

La familia Bcl-2. El proto-oncogen *Bcl-2* ha sido muy estudiado por su implicación directa en el rescate de la apoptosis inducida bajo ciertas circunstancias. *Bcl-2* fue originariamente identificado como un oncogen presente en linfomas foliculares cuya sobre-expresión se debía a una translocación de su gen al locus de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, quedando así sujeto a la acción del potente promotor del gen para las inmunoglobulinas. El producto de la expresión del gen *Bcl-2* es una proteína de 25 kDa cuya secuencia de aminoácidos se pudo comprobar que poseía cierta homología con una proteína del virus de Epstein Barr (Marchini et al, 1991). A pesar de los exhaustivos estudios a los que se ha sometido esta proteína no se conoce aún su mecanismo de acción. Su estudio ha dado lugar al descubrimiento de toda una familia de proteínas homólogas citosólicas que están directamente involucradas en el control de la apoptosis tanto de forma positiva como negativa (Fig. 6). La proteína Bcl-2 se asocia a membranas y en su localización intracelular se encuentra normalmente asociada a la envuelta nuclear, retículo endoplás-

mico y la membrana interna mitocondrial (Hockenbery et al, 1991; Jacobson et al, 1994).

LA FAMILIA BCL-2

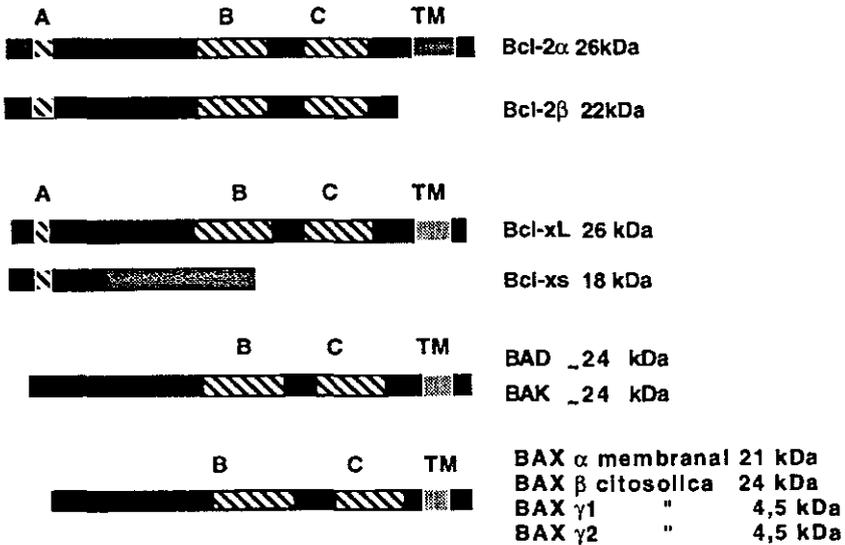


Figura 6. La familia Bcl-2 está representada por varias proteínas citosólicas que presentan homología en sus regiones B y C donde parece residir su capacidad para dimerizar unas con otras. Todas presentan una región hidrofóbica (TM) con cierta homología que parece estar implicada en su asociación a membranas intracelulares. La región A está presente en los miembros de la familia implicados en el rescate de la apoptosis y su función es aún controvertida.

Se sabe que la infección por virus induce normalmente la apoptosis celular (muerte altruista) como un mecanismo de defensa, sin embargo, la homología que Bcl-2 guarda con las proteínas de ciertos virus sugiere que éste sea un mecanismo que utilicen los virus para mantener a su célula huésped viva hasta completar la fase lítica de la infección. De hecho, la sobre-expresión del proto-oncogen *Bcl-2* protege varios tipos de células contra la inducción de la apoptosis (Nuñez et al, 1990; Strasser et al,

1991a). Según estudios recientes parece ser que Bcl-2 protege a las células de la apoptosis alterando la función mitocondrial y por tanto la mitocondria estaría implicada en al apoptosis. En este contexto, más recientemente se ha podido demostrar que *Bcl-2* inhibe la apoptosis previniendo la formación de radicales libres (Kane et al, 1993; Hockenbery et al, 1993).

La inhibición de la apoptosis por Bcl-2 se ha podido demostrar mediante diferentes estrategias experimentales. Las células de línea Pro-B FL-5.12 sufren muerte por apoptosis cuando se las priva de la IL-3 en su medio normal de crecimiento. La transfección del gen *Bcl-2* humano en estas células las salva de la muerte dejándolas en un estado de paro de crecimiento (Hockenbery et al, 1990). De la misma forma que las células B inmaduras, las células WEHI 231 expresan unos niveles bajos de *Bcl-2* endógenos y estos niveles decrecen aún más cuando el receptor de superficie IgM interacciona con el anticuerpo anti-IgM (Cuende et al, 1993). Si se transfectan estas mismas células con el gen del *Bcl-2* humano, la inducción de la muerte celular mediante la eliminación de factores de crecimiento, como el suero, o a través del receptor IgM se hace mucho menos patente o al menos mas ralentizada (Cuende et al, 1993).

En el timo, *Bcl-2* se expresa en los timocitos maduros de la médula ($CD4^+$ y $CD8^+$) mientras que los timocitos inmaduros de la corteza (doble positivos $CD4^+CD8^+$) que mueren mayoritariamente por apoptosis, no lo expresan. Sin embargo, la selección negativa en el timo puede o no depender de *Bcl-2*. En ratones transgénicos para el *Bcl-2*, si bien los timocitos $CD4^+CD8^+$ se hacen más resistentes a la muerte por glucocorticoides (dexametasona), anti-CD3 y por ionóforos del Ca^{2+} , el número de timocitos totales no varía de forma consistente, lo que indica que la selección negativa se sigue produciendo, a pesar de los altos niveles de *Bcl-2* (Strasser et al, 1991a; Sentman et al, 1991). Una interpretación posible a este hecho es que en el timo, la inducción de apoptosis está regulada por diferentes vías que implican seguramente un conjunto de genes distintos. Otra observación interesante es que en estos ratones se detectó un defecto parcial en la eliminación de los linfocitos T portadores de un receptor TCR β autoreactivo. Sin embargo, no parece que estos ratones desarrollaran una enfermedad autoinmune como cabría esperar, lo

que indica que los mecanismos como la inducción de la anergia clonal periférica de células T siguen operando en estos animales para evitar la autoinmunidad. Por otro lado, el hecho de que *Bcl-2* sí bloquee la apoptosis inducida por ionomicina sugiere que *Bcl-2* actúe como un estabilizador de los niveles de Ca^{2+} . Estas observaciones podrían explicar por qué los neoplasmas humanos que sobre-expresan *Bcl-2* son relativamente resistentes a quimioterapia con glucocorticoides.

La expresión de *Bcl-2* en células B de médula ósea es un factor importante en el control de la apoptosis. *Bcl-2* se expresa a altos niveles en las células Pro-B y en las células maduras IgM^+IgD^+ . Sin embargo los niveles bajan de forma drástica en la etapas intermedias desde células Pre-B hasta el estadio de B inmadura IgM^+IgD^- en los que los linfocitos son sensibles a la inducción de la apoptosis por corticoesteroides (Merino et al, 1994). Los ratones transgénicos para *Bcl-2* presentan una resistencia de sus células Pre-B e inmaduras al tratamiento con corticoesteroides al igual que ocurría en los timocitos, así como un aumento considerable de células B maduras en reposo que se acumulan debido a una mayor supervivencia. Además la respuesta humoral resulta más prolongada llegando a desarrollar autoinmunidad patológica por la presencia de autoanticuerpos (Nuñez et al, 1991; Strasser et al, 1994) e incluso un alto grado de linfoma maligno, lo que indica que la supervivencia mantenida de los linfocitos resulta al final oncogénica (McDonnel & Korsmeyer, 1991).

Con el fin de estudiar la relevancia de la proteína *Bcl-2* se han producido también ratones mutantes que carecen de la proteína *Bcl-2* (Veis et al, 1993; Nakayama et al, 1993). En estos ratones el desarrollo embrionario no se ve afectado, pero presentan retraso en el crecimiento y una mortalidad postnatal temprana. La hematopoyesis y la diferenciación de los linfocitos es normal en su estado inicial pero el timo y el bazo sufren una importante involución a las cuatro semanas de edad, debido a una apoptosis masiva de los linfocitos. Por otra parte, se desarrolla también un proceso policístico severo en el riñón y se presenta un defecto en el mecanismo redox en la síntesis de melanina, lo que indica que *Bcl-2* funciona a través de rutas antioxidativas (Veis et al, 1993).

La secuencia de aminoácidos de *Bcl-2* reveló en un principio una proteína sin homología con ninguna otra y sin ningún motivo estructural que le confiriera alguna función bioquímica. Esto hizo pensar en que *Bcl-2* pudiera estar formando parte de algún complejo multimérico y al poco tiempo después se descubrió una nueva proteína de 21 kDa, **Bax**, que se asociaba a *Bcl-2* y que presentaba una homología en dos dominios de *Bcl-2* denominados BH1 y BH2 o también B y C (Oltvai et al, 1993) (Fig. 6). Sin embargo, al contrario que *Bcl-2*, la función de Bax era precisamente inducir la apoptosis. Mediante estudios de mutagénesis dirigida se pudo comprobar que estos dos dominios B y C de *Bcl-2* estaban implicados en la inhibición funcional de la apoptosis y heterodimerización con Bax (Yin et al, 1994). La capacidad de Bax para inhibir el efecto antiapoptótico de *Bcl-2* parecía ser dependiente del equilibrio entre estas dos proteínas. Cuando *Bcl-2* está en exceso el heterodímero Bax/*Bcl-2* se mantiene y las células se protegen frente a la apoptosis. Si la expresión de *Bcl-2* decae, entonces Bax forma homodímeros y como consecuencia la célula muere.

El análisis de la secuencia de los dominios B y C reveló la existencia de una familia de genes (Fig. 6) relacionados estructuralmente con *Bcl-2* entre las que se encuentran: **MCL-1** (humano), *Bcl-2* murino, **Bax** (humano y murino), **Bcl-x** (humano y murino), **A1** (murino), **Ced-9** (*C. elegans*), **LMW5-HL** (del virus de la peste porcina), **BHRF1** (del virus del Epstein Barr), **Bad** (humano y murino) y **Bak** (humano). Algunos de los miembros de esta familia se ha demostrado que pueden interactuar con ellos mismos formando homodímeros o con otros del mismo grupo e incluso de distinto grupo formando heterodímeros. Mediante la técnica de doble-hibridación, el grupo de Reed ha podido demostrar las siguientes interacciones entre los miembros de la familia de *Bcl-2*: *Bcl-2*/*Bcl-2*, *Bcl-2*/*Bcl-xL*, *Bcl-2*/*Bcl-xs*, *Bcl-2*/*Mcl-1*, *Bcl-xL*/*Bcl-xL*, *Bcl-xL*/**Bax**, *Bcl-xL*/*Bcl-xs*, *Bcl-xL*/*Mcl-1*, **Bax**, *Mcl-1* (Sato et al, 1994). En condiciones fisiológicas se han podido demostrar otras interacciones adicionales y la naturaleza de estas dimerizaciones son de crucial importancia para la función, ya que según con quien se dimericen se puede inducir la apoptosis o por el contrario inhibirla. En este sentido por

ejemplo, Bcl-x presenta dos isoformas: corta y larga. Ambas formas de Bcl-x pueden dimerizar con Bcl-2, sin embargo mientras la forma larga (Bcl-xL) inhibe la apoptosis, la forma corta (Bcl-x s) la induce (Boise et al, 1993). La proteína Bak también interacciona con Bcl-xL y promueve la apoptosis, al igual que Bax (Chittenden et al, 1995). Bad puede dimerizar tanto con Bcl-2 como con Bcl-x desplazando a Bax, que al quedar libre forma homodimeros restaurando así el proceso apoptótico.

La homología estructural que relaciona a estas proteínas, reside fundamentalmente en las regiones B y C así como en el dominio hidrofóbico carboxi-terminal (TM) que parece estar implicado en la asociación a membranas intracelulares. Existe otro dominio homólogo en la región amino-terminal (A) entre los genes Bcl-2, Bcl-x, Ced-9, BHRF1 y LMW5-HL que precisamente no existe en las proteínas Bax, Bad que son las que inducen la muerte. El dominio preciso implicado en la dimerización de estas proteínas es todavía objeto de estudio pero según los datos recientes todo parece indicar que los dominios B y C así como la región amino terminal A, juegan un papel importante en la dimerización aunque las consecuencias funcionales de la participación de cada uno de estos dominios en la dimerización puede ser diferente según la proteína (Sato et al, 1994).

Recientemente se han producido ratones deficientes en las proteína Bcl-x y Bax (Motoyama et al, 1995; Knudson et al, 1995). Bcl-x se expresa fundamentalmente durante el desarrollo ontogénico, y en cerebro, timo, y riñón en el adulto. Los ratones carentes de esta proteína, sufren una apoptosis masiva de las células hematopoyéticas inmaduras así como en neuronas inmaduras y mueren alrededor del día 13 del estadio embrionario (Motoyama et al, 1995). Los ratones deficientes de Bax demostraban una hiperplasia selectiva de los timocitos y un aumento en el número de linfocitos B en bazo, aunque aparentemente los ratones adultos eran normales (Knudson et al, 1995).

No se descarta la posibilidad de que Bcl-2 también interaccione con otras proteínas citosólicas o mitocondriales que no tengan homología con Bcl-2 y que explique su mecanismo de acción. Hasta ahora se conoce el hecho de que Bcl-2 se asocia con la proteína GTPasa **R-ras p23** (Fer-

nández-Sarabia & Bischoff, 1993) y con la treonina/serina quinasa **Raf-1** (Wang et al, 1994) lo que indica una relación directa de componentes de la ruta de traducción de la señal en la regulación de la apoptosis por Bcl-2. **BAG-1** es otra proteína citosólica que no tiene homología con Bcl-2 pero que puede interaccionar con Bcl-2 funcionando también como una proteína anti-apoptótica (Takayama et al, 1995).

La familia ICE. Otra serie de proteínas implicadas en el control de la apoptosis celular la constituyen la recientemente descrita familia de **proteasas ICE**. La cisteína-proteasa ICE (de interleucina-1-converting enzyme) es homóloga a la proteasa **Ced-3** de *C. elegans* que está directamente implicada en la inducción de la apoptosis (Yuan et al, 1993). Parece ser que la mediadora de la inducción de la apoptosis a través de la estimulación de la molécula Fas de superficie o del receptor para TNF, es precisamente ICE (Los et al, 1995). Estos dos receptores poseen un dominio citoplásmico similar que está relacionado con la capacidad de ambas moléculas para transmitir la señal de muerte y probablemente utilicen la misma vía para activar ICE. Las técnicas utilizadas para inducir la sobreexpresión de ICE en células han demostrado claramente su implicación en la inducción de la muerte celular. Además esta vía de muerte puede ser inhibida por la proteína crmA de poxvirus que inhibe directamente las proteasas del tipo ICE y la muerte inducida por Fas y el receptor para TNF (Los et al, 1995).

Se están descubriendo nuevos miembros de la familia ICE: **Nedd-2/Ich-1**, **CPP32/Yama**, **Tx/Ich-2** y **Mch-2** (Martin & Green, 1995), que presentan una homología bastante conservada en el péptido pentamérico QACRG que se encuentra en el sitio activo de la proteasa. De la misma forma que ICE, la sobreexpresión de cada una de estas proteasas resulta en la inducción de la apoptosis. El hecho de que existan varios homólogos de ICE sugiere la existencia de un mecanismo redundante de la inducción de la apoptosis propio de mecanismos implicados en procesos vitales en los sistemas más evolucionados. En efecto, parece ser que los ratones deficientes para la molécula ICE se desarrollan normalmente y sus células sufren apoptosis de forma fisiológicamente normal, excepto quizá en la apoptosis de timocitos mediada por Fas (Kuida et al, 1995). No se

excluye sin embargo, la posibilidad de que Fas utilice otro tipo de proteasas parecidas a ICE, o incluso que inactive algún inhibidor de proteasas del tipo crmA en su señal de muerte. Esto indica por tanto que al igual que ocurre con la familia Bcl-2, otras moléculas homólogas a ICE o incluso inhibidores de proteasas (del tipo crmA) están también implicadas muy directamente en los procesos de muerte fisiológica.

Factores de transcripción. La proteína p53 ha sido descrita como el supresor de tumores por autonomasia (Levine et al, 1991). Las alteraciones en el gen *p53* que provocan la inactivación de su proteína constituyen el defecto molecular más comunmente asociado a la aparición de tumores en humanos. La función primordial de p53 consiste en preservar la integridad del genoma de la célula y cualquier daño inducido en el ADN (por luz U.V., irradiación γ , agentes quimioterapéuticos, etoposide) provoca la aparición de p53 y su estabilización. Puede entrar y salir del núcleo celular y se sabe que altera la transcripción de muchos genes actuando como un regulador de la transcripción p53 controla la supresión de tumores a dos niveles: el primero es parando a la célula en la fase G/S del ciclo celular para permitir reparar el daño genómico antes de la replicación del ADN; el segundo es induciendo la apoptosis. De esta forma p53 evita el riesgo de que las células hijas hereden el defecto en el ADN. Curiosamente, dos de los genes sobre los que parece tener incidencia son precisamente Bax y Bcl-2. Mientras p53 parece aumentar la transcripción de Bax, por el contrario es capaz de inhibir la transcripción de Bcl-2 (Miyashita et al, 1994a; Miyashita et al, 1994b; Miyashita & Reed, 1995). De hecho el promotor de *Bcl-2* posee una secuencia para unión de un elemento de respuesta negativa dependiente de p53 (Miyashita et al, 1994b) y *Bax* posee cuatro sitios de unión para p53 (Miyashita y Reed, 1995). En los timocitos y células T periféricas, p53 parece jugar un papel esencial en la inducción de la muerte por apoptosis cuando el daño en el ADN es provocado por causas patológicas (irradiación), pero no por otros estímulos relacionados con la traducción de señal negativa, o tratamiento con glucocorticoides que implicaría una muerte por causas fisiológicas (Lowe et al, 1993). De la misma forma, en las células pre-B de médula ósea, p53 es imprescindible para inducir la muerte de las

células sometidas a irradiación. Por tanto, a pesar de su control sobre genes como *Bcl-2* y *Bax*, *p53* no parece estar involucrado principalmente en el control de la homeostasia normal ni tampoco en la apoptosis inducida por la activación a través del receptor antigénico, sino tan sólo en la apoptosis inducida por daños en el ADN cuya incidencia en la transformación en célula tumoral es alta. Además, la incidencia de la aparición de autoinmunidad en ratones deficientes en *p53* es prácticamente nula (Purdie et al, 1994).

Tanto la inducción de la muerte celular como la expansión clonal requieren de activación celular como lo demuestra la expresión de "genes tempranos" así denominados por la rapidez con la que se expresan (del orden de minutos a horas postactivación celular) no requiriendo de la síntesis *de novo* de proteínas. En muchos casos incluso se superinducen por agentes que inhiben la síntesis de proteínas, sugiriendo un control postraduccional en la expresión de estos genes. Estos genes incluyen desde factores de transcripción hasta proto-oncogenes. Algunos de estos genes tempranos, tales como *c-fos*, *c-myc*, *c-jun* y *Nurr-77*, se han podido relacionar con la muerte celular programada en linfocitos (Colotta et al, 1992; Baixeras et al, 1993). De entre estos genes, *Nur-77* tiene un especial interés actualmente ya que su expresión aparece a los 30-45 min. después de la estimulación con anti-CD3 en células T o con anti-IgM en células B y su presencia se asocia con la inducción de la apoptosis. La proteína *Nur-77* es un receptor de esteroides y actúa como un factor de transcripción uniéndose al ADN y controlando la expresión de varios genes (Woronicz et al, 1994). Poco se sabe de los mecanismos de acción de este factor de transcripción y aún queda por investigar su relación con las señales intracelulares que inducen la apoptosis, o si activa alguna proteasa o si afecta el balance de los dímeros *Bcl-2/Bax* y *Bax/Bax*.

Las diferencias en la expresión de genes relacionados con la proliferación celular, puede explicar al menos en parte las respuestas de crecimiento y proliferación que se observan en los linfocitos B inmaduros con respecto a los B maduros. Esta hipótesis fue inicialmente propuesta por Seyfert (Seyfert et al, 1990) basándose en la expresión del gen temprano *Egr-1*. Este gen es inducible en células B maduras de bazo y

células de línea BAL-17 tras estimulación de sus BCR o por administración in vitro de esteres de forbol (TPA) (observación personal) pero no así en las células inmaduras de médula ósea o células línea WEHI 231 (Seyfert et al, 1990). La falta de expresión de este gen se asoció con la muerte celular programada en las células B inmaduras de la médula ósea (Seyfert et al, 1990).

8.- SEÑALES IMPLICADAS EN EL CONTROL DE LA APOPTOSIS

La caracterización de las señales tempranas que inducen la apoptosis en el linfocito es aún objeto de estudios exhaustivos. Las rutas de señalización desde los receptores de membrana hasta el núcleo de la célula están conectadas fundamentalmente por las proteínas quinasas, capaces de fosforilar en residuos de tirosina, treonina y serina. De esta manera se van activando y desactivando las rutas enzimáticas que transfieren la señal para a su vez activar o desactivar una serie de genes que pueden estar implicados en la proliferación celular. En el caso de los receptores antigénicos de las células del sistema inmune: TCR y BCR, las tirosina-quinasa de la familia *src* se acoplan a éstos mediante las moléculas asociadas del complejo CD3 (γ , δ , ζ) en el caso del TCR, y las cadenas α y β en el caso del BCR. Los dominios citoplásmicos de estas moléculas asociadas poseen unos motivos comunes que parecen ser importantes para su unión con el dominio SH2 de las tirosina-quinasa. (Reth, 1989). Entre las tirosina-quinasa más conocidas que se asocian al receptor antigénico se encuentran p56^{lck}, p59^{fyn}, p53/p56^{lyn}, p55^{shc} (Baixeras et al, 1993). La ocupación del BCR o TCR por su antígeno provoca la fosforilación en residuos de tirosina de ciertas proteínas diana por mediación de estas tirosina-quinasa en cuestión de segundos a minutos. Esta activación de las tirosina-quinasa precede a la generación de segundos mensajeros después de la fosforilación en tirosina de la subunidad p85 de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K), y de la **fosfolipasa-C γ** específica para fosfatidilinositol, que a su vez induce un aumento pasajero de la concentración de Ca²⁺ y diacilglicerol (DAG) en la membrana, ambos activadores de la serina/treonina-quinasa PKC (Cambier

& Rason, 1987; Berridge & Irvine, 1989, Baixeras et al, 1993). Seguramente existen otras rutas de activación alternativas. Así por ejemplo, la activación de células B por ésteres de forbol no implica activación de PLC pero sí un aumento en Ca^{2+} independiente de inositoltrifosfato. Los mitógenos policlonales para células B como los lipopolisacárido, activan los linfocitos B a través de mecanismos independientes de las variaciones en la concentración de Ca^{2+} o generación de DAG, aunque se produce la estimulación de PKC (Boscá et al, 1991).

El rescate o la potenciación de la muerte celular cuando es inducida mediante la estimulación del receptor antigénico del linfocito, puede llevarse a cabo si al mismo tiempo se estimulan determinados receptores de la membrana linfocitaria ya mencionados en este capítulo. Estos incluyen las moléculas de superficie B7/BB1, HSA (Heat stable antigen) CD20, CD2, CD40, CD4, (Janeway & Goldstein, 1992; Schwartz, 1991; Genaro et al, 1994; Clark & Ledbetter, 1994). Es conocido el hecho de que estas moléculas co-estimuladoras pueden unir también proteínas de la familia *src*. Así por ejemplo CD4, CD8, CD2, IL-2R, pueden unir $p56^{lck}$ directamente. Otras veces la relación no es físicamente directa pero pueden estimular la actividad tirosina-quinasa a través de otra molécula acopladora como es el caso de CD40 que estimula $p56^{lck}$ (Ren et al, 1994).

Aunque la activación de tirosina-quinasas, PI-3-k (relacionada con los procesos de proliferación y mitogénesis), y $PLC\gamma$ son a veces factores comunes en la estimulación del receptor antigénico y las moléculas co-estimuladoras, la estimulación por separado de ambos tipos de receptores puede resultar en respuestas biológicas muy diferentes. Así por ejemplo mientras la estimulación del receptor IgM de las células B inmaduras induce la apoptosis, la unión de CD40 a su ligando la previene. Estas diferencias en la actividad biológica sugiere diferencias en componentes de las rutas de señalización. En el caso de CD40 se ha podido identificar la proteína citosólica CRAF-1 como uno de los componentes de esta ruta de señalización (Chen et al, 1995). CRAF-1 se transloca rápidamente al núcleo celular cuando CD40 se liga a su CD40L. Su mecanismo de acción aún no está claro pero lo que sí parece cierto es que las señalizaciones tempranas que implican fosforilaciones en tirosinas

parecen imprescindibles. En este sentido, si se utilizan inhibidores de la fosforilación en tirosina, como la genisteína, se puede inhibir ciertas funciones de CD40. Asimismo, la estimulación de la tirosina-fosfatasa CD45, que contrapone la acción de la tirosina-quinasa, puede inhibir la proliferación, producción de IgE inducidas por CD40 (Knox & Gordon, 1993).

El caso de CD2 en células B resulta interesante debido a que la inhibición de la apoptosis inducida por anticuerpos anti-IgM no parece estar mediada por la activación de PLC γ , ni por la translocación de PKC, movilización de Ca²⁺ ni tampoco por la producción de AMP cíclico (Genaro et al, 1994). La única señal que indica que CD2 es funcional es la actividad de tirosina-quinasa promovida por los anticuerpos anti-CD2 y por su ligando CD48 (Baixeras et al, manuscrito en preparación). Recientemente hemos podido comprobar que los aumentos en AMP cíclico promueven la muerte celular en las células B y esta muerte puede ser inhibida si se estimula CD2 a tiempo. Ensayos recientes nos han demostrado que la señal de CD2 inhibe directamente la producción de AMP cíclico en células B. Por tanto esto indica una forma de atajar la señal de muerte que probablemente esté implicando a las proteínas G estimuladoras de la adenilato ciclasa, lo que confirmaría la importancia de las rutas de señalización a través de adenilato ciclasa-AMPC-proteína quinasa A, en el control de la apoptosis y la regulación del sistema inmune (Kammer, 1988).

Una de las treonina/serina-quinasa que participan en los pasos iniciales de la activación por antígenos, LPS o lipopéptidos sintéticos, es la PKC que es activada por segundos mensajeros que se producen tras la activación de tirosina-quinasa asociadas al receptor. Sin embargo, hay que señalar que existen diferentes isoformas de la PKC que probablemente participan independientemente en distintas rutas de activación, pudiendo tener efectos distintos o incluso opuestos. Así por ejemplo, la activación inducida por el LPS implica la activación de isoformas de PKC independientes de Ca²⁺ (Baixeras et al, 1994) y el patrón de expresión de isoformas de PKC también evoluciona a través de la proliferación/diferenciación de las células B (Baixeras et al, 1994) en este sentido no podemos excluir la

posibilidad de que algunas señales coestimuladoras puedan implicar la activación de distintas isoformas de PKC en su mecanismo de acción que a su vez expliquen su comportamiento como inhibidores o potenciadores de la apoptosis.

Por otro lado, la transmisión de la señal implicada en las interacciones de coestimulación parece que influyen en la expresión de genes tempranos tales como c-myc, c-myb o B-myb (Golay et al, 1992). También, los niveles de algunos factores de transcripción pueden estar controlados por estas interacciones. Así por ejemplo, hay evidencias claras de que el factor de transcripción AP-1 (formado por homodímeros o heterodímeros de la familia jun y fos) está implicado en la apoptosis de las células T y su expresión se mantiene después de la coestimulación que utiliza las rutas de PKC y AMP cíclico (Rincón et al, 1993). La privación de factores de crecimiento está seguida de la expresión de jun y fos, de manera que estos dos factores deben inducir la transcripción de genes implicados en la muerte celular.

El óxido nítrico (NO) constituye una molécula transmisora de la señal intra e intercelular en varios sistemas celulares incluyendo el sistema inmune (Boscá et al, 1995). Debido a que NO es una sustancia gaseosa, actúa no sólo sobre la célula que lo produce (macrófagos, células dendríticas) sino sobre las células íntimamente próximas a través del proceso de difusión. Este tipo de comunicación resulta extremadamente importante en el sistema inmune, donde el reconocimiento intercelular promueve el contacto directo de células permitiendo la liberación y captura de este tipo de mensajeros. Una vez dentro de la célula diana, el NO puede activar en algunos casos la enzima guanilato ciclasa que a su vez puede estar implicada en la estabilización de la molécula Bcl-2 frente a un estímulo negativo (Boscá et al, 1995). En este contexto, se ha podido comprobar que bajo ciertas circunstancias, sustancias inductoras de NO pueden inhibir la apoptosis de células B inducida por la estimulación del BCR (Boscá et al, 1995). Recientemente se ha podido constatar la implicación de este transmisor en la patogénesis de la autoinmunidad desarrollada en los ratones MRL-lpr/lpr (Weinberg et al, 1994). Estos ratones que no expresan la proteína Fas debido a una mutación en el gen

Fas (Watanabe et al ,1992) muestran en suero niveles elevados de IFN γ , TNF α , IL-1 e IL-6 además de altos niveles de nitritos y nitratos y secreción de altas cantidades de estos metabolitos en orina. El tratamiento de estos ratones con dos inhibidores de la NO sintasa (enzima que produce NO), como son aminoguanidina y N-nitroarginina, disminuyeron algunos de los síntomas patológicos asociados con la producción de NO, como por ejemplo la artritis (Boscá et al ,1995).

9.- INCIDENCIA DE LA INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS EN AUTOINMUNIDAD PATOLÓGICA Y SU POSIBLE CONTROL TERAPÉUTICO.

Como ya se ha explicado, la regulación fisiológica de la apoptosis en el sistema inmune es esencial para eliminar tanto los linfocitos potencialmente autorreactivos durante el desarrollo, como aquellos excedentes despues de la conclusión de la respuesta inmune. Tanto el defecto como el exceso en este proceso de eliminación puede suponer un acúmulo de células que se relaciona con la aparición del cáncer, autoinmunidad, y ciertas enfermedades virales (Tabla, Thompson, 1995). En el caso de la autoinmunidad patológica este defecto se produce durante el desarrollo ontogénico de los linfocitos permitiendo la maduración de células autorreactivas. En trabajos recientes, en los que se ha utilizado modelos animales se ha podido constatar la incidencia que tiene la desregulación de los mecanismos de la apoptosis en la etiología de enfermedades autoinmunes. Tal vez el modelo de autoinmunidad patologica mejor estudiado sea el de la encefalitis alérgica experimental (EAE), una enfermedad autoinmune mediada por células T CD4⁺ específicas para la proteína básica de mielina (MBP) y que se asemeja a la esclerosis múltiple en humanos. La muerte de células T activadas puede ser un mecanismo fisiológico de respuesta a la proliferación inducida por IL-2 junto con la ocupación del TCR por su antígeno. Esto conlleva a la atenuación del sistema inmune mediante la apoptosis de células T reactivas que están en ciclo de proliferación. Esta hipótesis formó la base de los magníficos estudios llevados a cabo por Critchfield y cols (Critchfield et al, 1994) quienes demostraron que la inyección de altas dosis repetidas de

MBP puede deleccionar por apoptosis las células T CD4 reactivas contra MBP, *in vivo* reduciendo totalmente los síntomas de la enfermedad autoinmune de encefalitis. Esto conlleva a la esperanza de que las enfermedades autoinmunes derivadas de un fallo en la deleción del clon de células T que provoca la autoinmunidad, se puedan llegar a corregir mediante el tratamiento con el mismo autoantígeno, pudiendo constituir una de las terapias a desarrollar en el futuro.

En ratones transgénicos para Bcl-2 que sobre-expresan esta proteína, se produce un acúmulo (aunque no proliferación) de las células B que deberían ser eliminadas provocando en ciertos casos una enfermedad autoinmune parecida al lupus (Strasser et al, 1991b). Además, análisis parecidos han podido demostrar una asociación entre el locus Bcl-2 y la diabetes autoinmune en ratones NOD (no obese diabetic) (Garchon et al, 1994).

La implicación del gen *Fas* en el desarrollo de enfermedades autoinmunes está claramente definida en el modelo de autoinmunidad en ratones MLR-MP *lpr/lpr* y *gld/gld*. Los ratones *lpr/lpr* se caracterizan por presentar un defecto en la expresión de Fas mientras que los *gld/gld* presentan una carencia en la expresión de su ligando (FasL). La mutación en el gen *Fas* consiste en la inserción de un retrotrasposón en el segundo intrón, lo que provoca una terminación prematura de la transcripción del gen (Nagata & Goldstein, 1995). El defecto *gld* consiste en una mutación puntual en la región correspondiente al dominio extracelular del FasL lo que le incapacita para mediar su función. En ambos casos, *lpr/lpr* y *gld/gld*, se promueve la aparición de enfermedad autoinmune acusada que recuerda al lupus eritematoso sistémico en humanos. La autoinmunidad en estos ratones se caracteriza por una hiperagmaglobulinemia, anticuerpos anti-DNA, inmunocomplejos circulantes, glomerulonefritis, poliartitis necrosante y artritis reumatoide acompañada de presencia de factores reumatoides en suero (Nagata & Goldstein, 1995). En pacientes con lupus eritematoso sistémico se han podido detectar altos niveles de la forma soluble de Fas, lo que provocaría una competición del Fas membranaral por su ligando FasL, inhibiendo las interacciones Fas-FasL normales y por tanto la apoptosis linfocitaria (Nagata & Golstein, 1995). Los ratones

MLR-MP *lpr/lpr* y *gld/gld*, también se caracterizan sobre todo por poseer niveles elevados de células T CD4 autorreactivas que son detectables antes del desarrollo de la linfadenopatía. Las células T CD4 autorreactivas se activan por la presencia de autoantígenos que por un lado provocan su acumulación y por otro interaccionan con los linfocitos B autorreactivos, que tampoco se han delecionado, promoviendo la producción de altos niveles de autoanticuerpos. Las células T CD4 son además resistentes a la apoptosis inducida por anticuerpos anti-CD3 o anti-TCR y el tratamiento con superantígenos no resulta del todo eficaz para provocar la delección de las mismas. Sin embargo, el tratamiento de estos ratones MLR-MP *lpr/lpr* y *gld/gld* con anticuerpos anti-CD4 previene o retarda la enfermedad. Por el contrario, el tratamiento con anti-CD8 previene la linfadenopatía aunque no la autoinmunidad. Por tanto, si bien la autoinmunidad es dependiente de las células T CD4, la linfadenopatía es dependiente de disfunciones en las células T CD4 y T CD8. Por otro lado, el defecto de la inhibición de la apoptosis de las células T parece residir en la periferia más que en el timo ya que en ratones *lpr/lpr* transgénicos que expresan un TCR específico para un péptido+MHC II, las células T CD4 se desarrollan normalmente pero son resistentes a la apoptosis. Cuando se administra a estos ratones el péptido específico a altas dosis se delecionan las células T intratímicas que expresan el TCR transgénico, sin embargo las T CD4 periféricas son resistentes a la delección clonal, lo que no ocurre en ratones transgénicos para ese TCR pero que no portan la mutación *lpr/lpr*. Esto implicaría la importancia de Fas en los procesos de delección clonal periférica, pero no en los procesos de selección negativa en el timo.

Tal vez, el uso de drogas o sustancias que provocan la delección policlonal como los **superantígenos**, podrían ser de gran utilidad en la terapia de enfermedades autoinmunes controlando sus efectos secundarios. Los **superantígenos** son un tipo de moléculas antigénicas que generan un tipo de respuesta inmune no convencional ya que no siguen las reglas de procesamiento y presentación de los antígenos normales. En lugar de ser presentados por los MHC de clase II en la "hendidura" correspondiente al péptido, se adhieren directamente en la zona externa de los MHC-II y a la zona exterior de la cadena V β del TCR, de manera que generan un

"puente de unión artificial" entre la célula presentadora del antígeno y el linfocito T. Los superantígenos generan una respuesta semiespecífica y potente, sobre todos los clones de células T que portasen un V β determinado (todos los TCRV β -8, o todos los TCRV β -17, etc). La respuesta al final degenera en una delección de los clones de células T afectados. El descubrimiento de la potente capacidad de estimulación de los superantígenos para activar las células T fue seguida de la observación de que tales superantígenos eran también potentes inductores de la apoptosis de las mismas células que habían inducido a proliferar (Gonzalo et al, 1994a). Existen muchos ejemplos de proteínas que actúan como superantígenos provenientes de microorganismos que provocando la delección clonal de los linfocitos T logran escapar de la vigilancia inmunológica al establecer así una tolerancia frente a los mismos: entre estos ejemplos constan algunos retrovirus, ciertas micobacterias, enterotoxinas de staphylococcus, proteína M de streptococcus (Herman et al, 1991). El equipo de Kapplery Marrack pudo demostrar que en los ratones que portaban los MHC de clase II para ratón, I-E, carecían de células T con TCRs que portaban el componente V β 17 de la cadena variable. Ambas moléculas I-E y V β 17 parece ser que unen un antígeno semi-propio denominado Mls. Los Mls constituyen un sistema de aloantígenos (Mls^a, Mls^b, y Mls^c) que se expresan principalmente en células B después de haber sido incorporados al contingente de "antígenos propios" provocando una delección policlonal de células T. En realidad son el producto de genes de un tipo de virus del tumor de mama de ratón (un tipo de retrovirus endógeno). Existen varias cepas de virus de tumor de mama en el ratón cada uno de los cuales codifica una proteína con especificidad para diferentes cadenas V β . Así por ejemplo el virus MTV-7 corresponde a Mls^a y MTV-6a Mls^c. De manera que la infección de varios virus de este tipo provocaría una delección importante de células T del repertorio total (Herman et al, 1991).

Hasta la fecha no se ha descrito ningún gen implicado en el control de la apoptosis que esté directamente relacionado con una enfermedad autoinmune en humanos. Pero se están empezando las investigaciones sobre el papel que la apoptosis juega en el desarrollo de enfermedades autoinmunes tales como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reuma-

toide, psoriasis, diabetes melitus. De momento, se tienen datos sobre la incapacidad para sufrir apoptosis *in vitro* en los linfocitos de pacientes que padecen algunas de estas enfermedades (Mountz et al , 1994; Emlen et al, 1994); lo que confirmaría que la causa de la autoinmunidad patológica reside en una disfunción del proceso apoptótico normal.

10.- CONCLUSIONES

Los linfocitos B y T, así como sus precursores dentro de los órganos centrales linfoides, pueden sufrir apoptosis durante la selección positiva o negativa. La decisión de si un linfocito desarrollará una respuesta contra componentes propios, provocando una reacción autoinmune, o si responderá contra agentes patogénicos extraños, o sufrirá una transformación maligna, podría depender del estado funcional de la maquinaria apoptótica dentro de la célula. La resistencia a la apoptosis podría estar asociada al desarrollo de leucemias y linfomas, hiperplasias linfoides y enfermedades autoinmunes. Así por ejemplo ratones homocigotos para la delección del gen *p53* (gen represor de tumores) desarrollan linfomas. Ciertas enfermedades autoinmunes tienen su origen en un defecto en la proteína Fas, que regula la muerte celular y la causa de este defecto reside en la mutación *lpr*. La sobreexpresión del gen *Bcl-2*, que inhibe la apoptosis, puede resultar también en la generación de una enfermedad autoinmune. Por el contrario, un aumento incontrolado de apoptosis celular puede conducir a una disminución patológica de linfocitos como es el caso de la linfopenia causada por la infección por el virus del SIDA.

El estudio del origen de ciertas enfermedades autoinmunes, así como el estudio del descontrol del ciclo celular que aparece en la célula tumoral, es lo que ha ayudado a explicar los procesos normales de apoptosis, autoinmunidad natural y la tolerancia así como su utilidad para guardar un equilibrio homeostático dentro del organismo. Actualmente existen muchos grupos de investigación, entre los cuales se encuentra el nuestro, avocados al estudio de los mecanismos bioquímicos, moleculares y genéticos que controlan la apoptosis, fundamentalmente en el sistema

Enfermedades asociadas a la	
Inhibición de la apoptosis	Incremento de la apoptosis
<p>1.- CANCER linfoma folicular (Bcl2 ▲) carcinoma (mutación p53) tumores dependientes de hormonas cancer de prostata cancer de mama cancer ovario</p> <p>2.- PROCESOS AUTOINMUNES Lupus eritematoso sistémico (Fas ▼) Glomerulonefritis (Fas ▼) Artritis reumatoide (Fas ▼) Diabetes melitus Psoriasis</p> <p>3.- INFECCIONES VIRALES Adenovirus (E1B ~Bcl2) Baculovirus (p35, IAP) Poxvirus (crmA = inhibidor ICE) VPPA (LMWS-HL ~Bcl2) Epstein Barr (BHRF1~Bcl-2) Sindbis virus (Bcl-2 ▲) Herpesvirus y 1 34.5</p>	<p>1.- ENFERMEADES HEPATOTOXICAS Alcoholismo</p> <p>2.- PROCESOS NEURODEGENERATIVOS Alzheimer Parkinson Esclerosis amiotrofica lateral Degeneración cerebral</p> <p>3.- DAÑO ISQUEMICO infarto de miocardio apoplejia</p> <p>4.-INFECCIONES VIRALES procesos T citotóxico SIDA</p>

inmune y en el sistema nervioso. La elucidación de tales mecanismos es un trabajo arduo, pero que está dejando al descubierto la evidencia de un complicado sistema de control que justifica su relevancia en el equilibrio entre la muerte y la proliferación celular dentro de la homeostasia. Ello a su vez conduce al diseño de terapias para controlar e influir en la apoptosis de las células.

AGRADECIMIENTOS. Quisiera expresar mi agradecimiento al Prof. Carlos Martínez-Alonso, cuyas habituales discusiones científicas y espíritu crítico han ayudado a la orientación del presente trabajo.

11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) ALZARI, PM., LASCOMBE, MB., POLJACK, RL. (1988). *Ann. Rev. Immunol.* 6: 555.
- (2) ALES-MARTÍNEZ, JE., SILVER, L, LOCASCIO, N., SCOTT, DW. (1991). *Cell. Immunol.* 135: 402.
- (3) BAIXERAS, E., KROEMER, G., CUENDE, E., MARQUEZ, C., BOSCA, L., ALES-MARTÍNEZ, JE. MARTÍNEZ-A, C. (1993). *Immunol. Rev.* 132: 288.
- (4) BAIXERAS, E., BOSCA, L., STAUBER, C., GONZÁLEZ, A., CARRERA, AC., GONZALO, JA., MARTÍNEZ-A, C. (1994). *Immunol. Rev.* 142: 53
- (5) BANCHEREAU, J., BAZAN, F., BLANCHARD, D., BRIERE, F., GALIZZI, JP., VAN KOOTEN, C., LIU, YJ., ROUSSET, F., SÆLAND, S. (1994). *Annu. Rev. Immunol.* 12: 881.
- (6) BERRIDGE, MJ., IRVIN, RF. (1989). *Nature.* 341: 197.
- (7) BOISE, LH., GONZÁLEZ-GARCÍA, M. POSTEMA, CE., DING, L., LINDSTEIN, T., TURKA, LA., MAO, X., NÚÑEZ, G., THOMPSON, CB. (1993). *Cell.* 74: 597.
- (8) BOSCA, L., MARQUEZ, C. MARTÍNEZ-A, C. (1991). *J. Immunol.* 147: 1463.
- (9) BOSCA, L., STAUBER, C., HORTELANO, S., BAIXERAS, E, MARTÍNEZ-A, C. (1995). *Current Topics in Microbiology and Immunology.* Vol. 200. Kroemer, G and Martínez-A Eds. Apoptosis in Immunology. Springer-Verlag. pp: 39-50.
- (10) BRETSCHER, PA.; COHN, M. (1970). *Science.* 163: 1042.
- (11) CAMBIER, J., RANSOM., JT. (1987). *Annu. Rev. Immunol.* 5: 175.
- (12) CHEN, G., CLEARY, AM., YE, Z., HONG, DI., LEDERMAN, S., BALTIMORE, D. (1995). *Science.* 267: 1494.
- (13) CHITTENDEN, T. HARRINGTON, E, O'CONNOR, R., FLEMINGTON, C. LUTZ, R., EVAN G., GUILD, B. (1995). *Nature.* 374: 733.
- (14) CLARK, E., LEDBETTER, JA. (1994). *Nature.* 367. 425.
- (15) COHEN, DP., ROTHSTEIN TL. (1991). *J. Immun.* 146: 2921.
- (16) COLOTTA, F., POLENTAROTTI, N., SIRONO, M., MANTOVANI, A. (1992). *J. Biol. Chem.* 267: 18278.
- (17) CRITCHFIELD, JM., RACKE, MK., ZUÑIGA-FLUCKER, JC., CANNELLA, B., RAINE, CS., GOVERMAN, J., LENARDO, MJ. (1994). *Science.* 263: 1139.
- (18) CUENDE, E., ALES-MARTÍNEZ, JE., DING, L., GONZÁLEZ-GARCÍA, A., MARTÍNEZ-A., C., NÚÑEZ, G. (1993). *EMBO J.* 12: 1555.
- (19) DEFranco, A., GOLD, M., JAKWAY, J. (1987). *Immunol. Rev.* 95: 156.
- (20) DESIDERIO, S. (1994). *Curr. Opin. Immunology.* 6: 248.
- (21) DRESSER, DW. (1962). *Immunology.* 5: 378.
- (22) DURIE, FH., FOY., TM., MASTERS, SR., LAMAN, JD., NOELLE, RJ. (1994). *Immunol. Today.* 15: 406.
- (23) EMLÉN, W., NIEBURG, J., KADERA, R. (1994). *J. Immunol.* 152: 3685.
- (24) EVAN, GI., WYLLIE, AH., GILBERT, CS., LITTLEWOOD, TD., LAND, H., BROOKS, M., WATERS, CM., PENN, LZ, HANCOCK, DC. (1992). *Cell.* 69: 119.
- (25) FERNÁNDEZ-SARABIA, MJ., BISCHOFF, JR. (1993). *Nature.* 366: 274.

- (26) FINKEL, TH., KUBO, RT., CAMBIER JC. (1991). *Immunol. Today*. 79: 85.
- (27) FREIRE-MOAR, J., CHERWINSKI, H, HWANG, F, RANSOM, J., WEBB, D. (1991). *J. Immunol.* 147: 405.
- (28) FULLER, KA., KANAGAWA, O., NAHM, MH., (1993). *J. Immunol.* 151. 4505.
- (29) FULOP, GM., PHILIPS,R.A. (1990). *Nature*. 347: 1079.
- (30) GARCHON, HJ., LUAN, JJ., ELOY, L., BEDOSSA, P., BACH, JF. (1994). *Eur. J. Immunol.* 24: 380.
- (31) GENARO, AM., GONZALO, JA., BOSCA, L., MARTÍNEZ-A, C. (1994) . *Eur. J. Immunol.* 10: 2515.
- (32) GOLAY, J., GUSMANO, G., INTROMA, M. (1992). *J. Immunol.* 149: 300.
- (33) GONZALO, JA., MORENO, I., ALES-MARTÍNEZ, JE., MARTÍNEZ-A, C., KROEMER, G. (1992). *Eur. J. Immunol.* 22: 1007.
- (34) GONZALO, JA., GONZÁLEZ-GARCÍA, A., MARTÍNEZ-A., KROEMER, G. (1993). *J. Exp. Med.* 177: 1239.
- (35) GONZALO, JA., BAIXERAS, E., GONZÁLEZ-GARCÍA, A., GEORGE-CHANDY, A., VAN ROOIJEN, N., MARTÍNEZ-A, C KROEMER, G. (1994a). *J. Immunol.* 152: 1597.
- (36) GONZALO, JA., MARTÍNEZ-A., C, KROEMER, G. (1994b). *Clin. Immunol. Immunopath.* 71: 176.
- (37) GOUGEON, ML, MONTAIGENIER, L. (1993). *Science*. 260: 1269.
- (38) GROUX, H, TORPIER, G., MONTÉ, D., MOUTON, Y., CAPRON, A., AMEISEN, JC. (1992). *J. Exp. Med.* 175: 331.
- (39) HASBOLD, J.H., KLAUS, GGB. (1990). *Eur. J. Immunol.* 20: 1685.
- (40) HERMAN,A., KAPPLER, JW., MARRACK, P., PULLEN, AM. (1991). *Annu. Rev. Immunol.* 9: 745.
- (41) HOCKENBERY, D., NÚÑEZ, G., MILLIMAN, CL., SCHEIDER, RD., KORSMEYER, SJ. (1990). *Nature*. 348: 334.
- (42) HOCKENBERY, D., ZUTTER, M., HICKEY, WM., KORSMEYER, SJ. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 6961.
- (43) HOCKENBERY, D., ILTVAI, ZN., YIN, X., MLLIMAN, CL., KORSMEYER, SJ. (1993). *Cell.* 75: 241.
- (44) JACOBSON, MD., BURNE, JF., KING, MP., MIYASHITA, T., REED, JC., RAFF, MC. (1994). *Nature*. 361: 365.
- (45) JANEWAY, CA., GOLDSTEIN, P. (1992). *Curr. Opin. Immunol.* 4: 241.
- (46) JANEWAY, CA., RUDENSKY, A., RATH, S., MURPHY, D. (1992). *Curr. Biol.* 2: 26
- (47) JONDAL, M., XUE, Y., MCCONKEY, DJ., OKRET, S. (1995). Current Topics in Microbiology and Immunology. Vol. 200. Kroemer, G and Martinez-A Eds. Apoptosis in Immunology. Springer-Verlag: pp 67-76.
- (48) KABELITZ, D. (1993). *J. Immunol.* 150: 4338.
- (49) KABELITZ, D, PHOL, T., PECHHOLD., K. (1995). Current Topics in Microbiology and Immunology. Vol. 200. Kroemer, G and Martinez-A Eds. Apoptosis in Immunology. Springer-Verlag. pp: 1-14.
- (50) KAMMER, GM. (1988). *Immunol. Today*. 9: 222.

- (51) KANE, DJ., SARAFIAN, TA., ANTON, R., HAHN, H., GRALLA, EB., VALENTINE, JS., ORD, T. BREDSSEN, DE. (1993). *Science*. 262: 1274.
- (52) KAWABE, Y., OCHI, A. (1991). *Nature*. 349: 245.
- (53) KAWABE, T., NAKA, T., YOSHIDA, K., TANAKA, T., FUJIWARA, H., SUEMATSU, S., YOSHIDA, N., KISHIMOTO, T., KIBUTANI, H. (1994). *Immunity*. 1: 167.
- (54) KAPPLER, JW., ROEHM, M., MARRACK, P., (1987). *Cell*. 49: 273.
- (55) KERR, J., WYLLIE, A., CURRIE, A. (1972). *Br. J. Cancer*. 26: 239.
- (56) KRAMMER, P., BEHRMAN, I., DANIEL., P., DHEIN, J., DABAITIN, KM. (1994). *Curr. Opin. Immunol.* 6: 279
- (57) KROEMER, G. MARTÍNEZ, C. (1992). *Res. Immunol.* 143: 288.
- (58) KNOX, KA., GORDON, J. (1993). *Eur. J. Immunol.* 23: 2578.
- (59) KNUDSON, CM., KENNETH, SK., TOURTELLOTE, WG., BROWN, GA., KORSMEYER, SJ. (1995). *Science*. 270: 96.
- (60) KUIDA, K., LPPKE,JA., KU., G., HARDING, MW., LIVINGSTON, DJ., SU, MSS., FLAVELL, RA. (1995). *Science*. 267: 2000.
- (61) LEDERMAN, ,S., YELLIN,MJ., CLEARY, AM., PERNIS, A, INGHIRAMI, G., COHN, LE, COVEY, LR., LEE,JJ., ROTHMAN, P, CHESS,L. (1994). *J. Immunol.* 152: 2163.
- (62) LEDERBERG, J. (1959). *Science*. 1239: 1649.
- (63) LENARDO, MJ. (1991). *Nature*. 353: 858.
- (64) LEVINE, AJ, MOMAND, J., FINLAY, CA. (1991). *Nature*. 351: 453.
- (65) LINSLEY,PS., LEDBETTER, JA. (1993). *Annu. Rev. Immunol.* 11: 191.
- (66) LÖFFERT, D., SCHAAL, S., EHLICH, A., HARDY, RR., ZOU, YR., MÜLLER, W RAJEWSKY, K. (1994). *Immunol. Rev.* 137: 135.
- (67) LOS, M., VAN DE CRAEN, M., PENNING, LC., SCHENK, H., WESTENDORP, M., KRAMMER, PH., FIERS, W., SCHULZE-OSTHOFF, K. (1995). *Nature*. 375: 81.
- (68) LOWE, SW., SCHMITT, EM., SMITH, SW., OSBORNE, BA., JACKS, T. (1993). *Nature*. 362: 847.
- (69) MARCHINI, A., TOMKINSON., B., COHEN, JI., KIEFF, E. (1991). *J. Virol.* 65: 5991.
- (70) MARTIN, SJ., GREEN, DR. (1995). *Cell*. 82: 349.
- (71) MCCONKEY, DJ, HARTZELL, P., ORRENIUS, S., JONDAL, M. (1989). *J. Immunol.* 143: 1801.
- (72) MCDONNELL, TJ., KORSMEYER, SJ. (1991). *Nature*. 349: 254.
- (73) MCKEARN, JP., MCCUBREY., BAGG, B. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 7414.
- (74) MERINO, R., DING., L., VEIS, DJ., KORSMEYER, SJ., NÚÑEZ, G., (1994). *EMBO J.* 23: 683.
- (75) MIYASHITA, T., KRAJEWSKI, S., KRAJEWSKA, M., WANG, HG., LIN, HK., HOFFMAN, B., LIEBERMAN, D., REED, JC. (1994a). *Oncogene*. 9: 1799.
- (76) MIYASHITA, T., HARIGAI, M., HANADA, M., REED, JC. (1994b). *Cancer Re.* 54: 3131.
- (77) MIYASHITA,T., REED, JC.(1995). *Cell*. 80: 293.
- (78) MOINGEON, P. , CHANG, H., SAYRE, PH., CLAYTON, LK., ALCOVER, A., GARDEN,

- P., REINHERZ, EL. (1989). *Immunol. Rev.* 111: 111.
- (79) MOLLER, G. (1994). *Immunol. Rev.* 137: 5.
- (80) MOMBAERTS, P., IACOMINI, J., JOHNSON, RS., ET AL (1992). *Cell.* 68: 869.
- (81) MOTOYAMA, N., WANG, F., ROTH, KA., SAWA, H., NAKAYAMA, K., NAKAYAMA, K., NEGISHI, I., SENJU, S., ZHANG, Q., FUJII, S., LOH, DY. (1995). *Science.* 267: 1506.
- (82) MOUNTZ, JD., WU, J., CHEN, J, ZHOU, T., (1994). *Arthritis Rheum.* 37: 1415.
- (83) MUELLER, DL., JENKINS, MK., SCHWARTZ, RH. (1989). *Ann. Rev. Immunol.* 7: 445.
- (84) NAGATA, S., GOLDSTEIN, P. (1995). *Science.* 267: 1449.
- (85) NAKAYAMA, KI, NAKAYAMA, K., NEGISHI, I., KUIDA, K., SHINKAI, Y., LOUIE, MC., FIELDS, LE., LUCAS, PJ., STEWART, V., ALT. FW. (1993). *Science.* 261: 1584.
- (86) NEWELL, MK., HAUGHN, LJ., MAROUN, CR., JULIUS, MH., (1990). *Nature.* 347: 286.
- (87) NOSSAL, GJV. (1994). *Cell* 76: 229.
- (88) NÚÑEZ, G., LONDON, L., HOCKENBERY, D., ALEXANDER, M., MCKEARN, JP., KORSMEYER, SJ (1990). *J. Immunol.* 144: 3602.
- (89) NÚÑEZ, G., HOKENBERY, D., MCDONELL, TJ., SORENSEN, CM., KORSMEYER, SJ. (1991). *Nature.* 353: 71.
- (90) OLTVAI, ZN., MILLIMAN, CL., KORSMEYER, SJ. (1993). *Cell.* 74: 609.
- (91) OYAZU, N., MCCLOSKEY, TW., CORONESI, M., CHIRMULE, N., KALYANARAMAN, VS., PAHWA, S., (1993). *Blood.* 82: 3392.
- (92) PURDIE, CA., HARRISON., DJ., PETER, A., DOBBIE, L., WHITE, S., HOWIE, SEM., SALTTER, DM., BIRD, CC., WYLIE, AH., HOOPER, ML., CLARKE, AR. (1994). *Oncogene.* 9: 603.
- (93) RAFF, MC. (1992). *Nature.* 356: 397.
- (94) REN, CL., MORIO, T., FU, SM., GEHA, RS. (1994). *J. Exp. Med.* 179: 673.
- (95) RETH, M. (1989). *Nature.* 338: 383.
- (96) RINCÓN, M., TUGORES, A., LANDAZURI, M., LÓPEZ-BOTET, M (1993). *Cell. Immunol.* 149: 343.
- (97) ROSENBERG, N, KINCADE, PW. (1994). *Curr. Opin. Immunol.* 6: 203.
- (98) RUSSELL, JH., WHITE, CL., LOH, DY., MELEDEY-REY, P. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2151.
- (99) SAKAGUCHI, N., MELCHERS, F. (1986). *Nature.* 324: 579.
- (100) SATO, T., HANADA, M., BODRUG, S., IRIE, S., IWAMA, N., BOISE, LH., THOMPSON, CG., GOLEMIS, E., FONG, L., WANG, HG., REED, JC. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 9238.
- (101) SCHWARTZ, RH. (1990). *Science.* 248: 1349.
- (102) SCHWARTZ, RS. (1993). *Fundamental Immunology.* Third Edition. Edited by William E. Paul. Raven Press, Ltd., New York.
- (103) SCHWARTZ, RS., STOLLAR, BD. (1994). *Immunol. Today.* 15: 27.

- (104) SCOTT, DW., LIVNAT, D., PENNELL, C., KENG, P. (1986). *J. Exp. Med.* 164: 156.
- (105) SENTMAN, CL., SHUTER, JR., HOCKENBERY, D., KANAGAWA, O., KORSMEYER, SJ. (1991). *Cell.* 67: 879.
- (106) SEYFERT, VL., MACMAHON, SB., GLENN, WD., YELLEN, AJ., SUKHATME, VP., CAO, X., MONROE, JG. (1990). *Science.* 249: 797.
- (107) SHINKAI, Y., RATHBUN, G., LAM, KP., ET AL. (1992). *Cell.* 68:855.
- (108) SMITH, CA., WILLIAMS, GT., KINGSTON, R., JENKINSON, EJ. OWEN, JTT. (1989). *Nature.* 337: 181.
- (109) STRASSER, A., HARRIS, AW., CORY, S. (1991a). *Cell.* 67: 889.
- (110) STRASSER, A., WHITTINGHAM, S., VAUX, DL., BATH, ML., ADAMS, JM., CORY, S., HARRIS, AW. (1991b). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 8661.
- (111) TAKAYAMA, S., SATO, T., KRAJEWSKI, S., KOCHER, K., IRIE, S., MILLIAM, J. REED, JC. (1995). *Cell.* 80: 279.
- (112) THOMPSON, CB. (1995). *Science.* 267: 1456.
- (113) TSUBATA, T, WU, J., HONJO, T. (1993). *Nature.* 364: 645
- (114) TSUKADA, S., SAFFRAN, DC., RAWLINGS, DJ., ET AL (1993). *Cell.* 72: 279.
- (115) VACCHIO, MS., PAPADOPOULUS, V., ASHWELL, JD. (1994). *J. Exp. Med.* 179: 1835.
- (116) VEISS, DJ., SORENSON, CM., SHUTTER, JR, KORSMEYER, SJ (1993). *Cell.* 75:229.
- (117) VON BOEHMER, H. (1994). *Cell.* 76: 219.
- (118) WANG, HG., MIYASHITA, T., TAKAYAMA, S., SATO, T., TORIGOE, T., KRAJEWSKI, S., TANAKA, S., HOVEY, L., TROPPEMAIR, J., RAPP, UR., REED, JC. (1994). *Oncogene.* 9: 2751.
- (119) WATANABE-FUKUNAGA, R., BRANNAN, CI., COPELAND, NG., JENKINS, NA., NAGATA, S. (1992). *Nature.* 356: 314.
- (120) WESSELBORG, S., JANSSEN, O., KABELITZ, D. (1993a). *J. Immunol.* 150: 4338.
- (121) WESSELBORG, S., PRÜFER, U., WILD, M., SCHRAVEN, M., MEUER, S, KABELITZ, D. (1993b). *Eur. J. Immunol.* 23: 2707.
- (122) WEINBERG, JB., GRANGER, DL., PISETSKY, DS., SELDIN, MF., ET AL. (1994). *J. Exp. Med.* 179: 651.
- (123) WORONICZ, JD., CALNAN, B., NGO, V., WINOTO, A. (1994). *Nature.* 367: 277.
- (124) WYLLIE, AH. (1980). *Nature.* 343: 76.
- (125) XU, J; FOY, TM., LAMAN, JD., ELLIOT, EA., DUNN, JJ., WALDSCHMIDT, TJ., ELSEMORE, J., NOELLE, RJ., FLAVELL, RA. (1994). *Immunity.* 1: 423.
- (126) YIN, X., OLTVAI, ZN., KORSMEYER, SJ. (1994). *Nature.* 369: 321.
- (127) YUAN, J., SHAHAM, S. LEDOUX, S., ELLIS, HM., HORTVITZ, HR. (1993). *Cell.* 75: 641.

Autoinmunidad en enfermedades infecciosas

Por

NÚRIA GIRONÈS, CLARA I. RODRÍGUEZ Y MANUEL FRESNO
*Centro de Biología Molecular, CSIC-Universidad Autónoma de Madrid,
Cantoblanco, 28049 Madrid*

ÍNDICE

- 1.- INTRODUCCIÓN.
- 2.- INMUNIDAD E INFECCIONES.
 - 2.1.- **Mecanismos de respuesta inmune antiinfecciosa.**
 - 2.2.- **Mecanismos de reconocimiento inmune.**
- 3.- RELACIÓN ENTRE INFECCIÓN Y AUTOINMUNIDAD.
 - 3.1.- **Inmunosupresores en enfermedades parasitarias.**
 - 3.2.- **Presentación de autoantígenos crípticos mediada por infección.**
 - 3.3.- **Autoinmunidad y HLA.**
- 4.- DESÓRDENES AUTOINMUNES CON EVIDENCIA DE UNA ETIOLOGÍA INFECCIOSA.
 - 4.1.- **Diabetes mellitus tipo I (IDDM).**
 - 4.2.- **Artritis reumatoide (RA).**
 - 4.3.- **Lupus eritematoso sistémico (LES) y síndrome de Sjögren (pSS).**
- 5.- INFECCIONES CON ASOCIACIÓN AUTOINMUNE CONOCIDA.
 - 5.1.- **Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).**
 - 5.2.- **Enfermedad de "Lyme".**
 - 5.3.- **Espondiloartropatía e infección.**
- 6.- AUTOINMUNIDAD Y ENFERMEDADES CAUSADAS POR PROTOZOOS Y HELMINTOS.
 - 6.1.- **Malaria.**
 - 6.2.- **Leishmaniasis.**
 - 6.3.- **Schistosomiasis.**
 - 6.4.- **Oncocercosis.**
- 7.- TRIPANOSOMIASIS AMERICANA, ENFERMEDAD DE CHAGAS.
 - 7.1.- **Biología de la invasión por *T. cruzi*.**
- 8.- ASPECTOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.
 - 8.1.- **Fase aguda.**
 - 8.2.- **Fase crónica.**
 - 8.3.- **Estudios in vitro.**
 - 8.4.- **Estudios en animales.**

8.5.- **Mecanismo inmune.**

8.6.- **Aspectos autoinmunes en la enfermedad de Chagas.**

9.- BIBLIOGRAFÍA

1.- INTRODUCCIÓN

Muy pronto en la evolución de la vida, se planteó el problema de discriminación entre lo propio y lo no propio en organismos multicelulares. Para afrontar este problema surgió el sistema inmune. Hace unos 600 millones de años los vertebrados celomados desarrollaron un sistema inmune primitivo que les permitía tal discriminación. Desde entonces, ha evolucionado un, cada vez más complejo, sistema inmune capaz de combatir un entorno repleto de cientos de patógenos potencialmente infecciosos.

La habilidad de proteger conlleva la habilidad de destruir. El sistema inmune humano es extremadamente complejo para poder combatir una larga lista de virus, bacterias, parásitos (protozoos y helmintos) y hongos. Sin embargo, inherente a tal complejidad, existe el potencial para que se produzca reacción contra lo propio, un proceso único más evidente en organismos que poseen mecanismos inmunes más desarrollados.

Para un grupo de enfermedades de naturaleza autoinmune, existe evidencia sugestiva, pero no concluyente, de la implicación de agentes infecciosos en la etiología de las mismas. Entre tales enfermedades se encuentran la diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), artritis reumatoide (RA), lupus eritematoso sistémico (LES), y espondilitis anquilosante.

Por otra parte, un número creciente de enfermedades infecciosas tienen rasgos autoinmunes. Ejemplos de tales infecciones son las endocarditis bacterianas, faringitis estreptococales, enfermedad de "lyme", tripanosomiasis, y síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

El presente artículo pretende recopilar los datos recogidos hasta la actualidad en lo que se refiere a autoinmunidad en enfermedades infecciosas y parasitarias, con especial énfasis en el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* causante de la enfermedad de Chagas que constituye un caso típico de autoinmunidad causada por infección.

2.- INMUNIDAD E INFECCIÓN

Los parásitos (virus, bacterias, hongos, protozoos y helmintos) constituyen la principal razón de ser del sistema inmune, ya que deficiencias en éste conducen al crecimiento descontrolado de los mismos, siendo en muchos casos causa de mortandad (revisado en Brostoff J. 1991). Es importante destacar que la muerte del hospedador no forma parte de la estrategia de parásitos importantes, muchos de los cuales han evolucionado a lo largo de millones de años con sus hospedadores para alcanzar un equilibrio relativamente estable. Sin embargo, dicho equilibrio puede alterarse debido a cambios en el parásito (cambios antigénicos del parásito o infección de una nueva especie) o en el hospedador (inmunodeficiencia o vacunación).

La mayoría de la gente se considera la mayor parte del tiempo sana aunque transporte docenas de especies de microorganismos, de modo que la enfermedad no es inevitablemente consecuencia de la infección. Sin embargo, la destrucción de tejidos ocurre frecuentemente en infecciones parasitarias, ya sea como parte del proceso normal de replicación (por ejemplo muchos virus y malaria), o como ayuda a la colonización (amebas), o en un intento de evitar el mecanismo de defensa del hospedador (por ejemplo destrucción de neutrófilos por *Staphylococcus*). A veces la agresión al tejido se debe a exotoxinas, como en el cólera, la difteria, el tétanos y enfermedades causadas por *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Clostridium*. Dichas exotoxinas son una excelente diana para anticuerpos neutralizantes y pueden utilizarse en vacunas una vez inactivadas, sin que se produzca pérdida de antigenicidad.

En muchos casos, sin embargo, el daño al tejido no se debe a la acción directa del parásito sino a elementos del sistema de defensa del organismo. Un ejemplo lo constituye el shock endotóxico causado por la producción del factor de necrosis tumoral (TNF, tumour necrosis factor) en macrófagos, en respuesta a endotoxinas de bacterias Gram-negativas. El TNF juega un papel en la protección contra muchos virus y bacterias, pero en exceso puede dañar el endotelio vascular, dando lugar a colapso y shock (revisado en Brostoff J. 1991).

2.1.- Mecanismos de respuesta inmune antiinfecciosa.

Una gran variedad de mecanismos de defensa del hospedador han evolucionado para limitar selectivamente la entrada y multiplicación de los parásitos, o sea, causando el mínimo daño al hospedador. La mayoría de ellos están completamente desarrollados en los primeros días de vida, son más o menos generales e inespecíficos en sus efectos, y no son significativamente diferentes de un episodio infeccioso al siguiente. Los mecanismos inmunes innatos para evitar la entrada de microorganismos incluyen los productos de secreción de glándulas cutáneas, pH ácido del estómago, cilios y capa mucosa que recubre el epitelio respiratorio, y enzimas como la lisozima en lágrimas y otras secreciones.

Los organismos que penetran en los tejidos son rápidamente expuestos a células fagocíticas, principalmente leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y macrófagos. Estos reconocen, atacan, internalizan y digieren material foráneo de todo tipo, son extremadamente parecidos a protozoos, y deben ser observados como unidades fundamentales de defensa del organismo. Además la respuesta inmune adaptativa debe gran parte de su efectividad a dichas células fagocíticas. Su función resulta potenciada mediante anticuerpos que aumentan el reconocimiento y anclaje, y por células T que activan funciones intracelulares variadas.

Los fagocitos producen una serie de moléculas que median su acción antiparasitaria. Entre ellas se encuentran una serie de compuestos microbicidas extremadamente básicos que incluyen defensinas (un conjunto de péptidos homólogos que dañan a una gran variedad de microorganismos procarióticos y eucarióticos), lisozima, lactoferrina, catepsina y elastasa. También producen complemento (C) que sirve para eliminar ciertas bacterias directamente, o en presencia de anticuerpos (Ac), promover la opsonización e incrementar la permeabilidad celular asociada con las respuestas inflamatorias. Los eosinófilos contienen una serie de proteínas tóxicas que destruyen helmintos. Los mecanismos más importantes de destrucción implican productos derivados del consumo de O_2 , conocido también como explosión respiratoria, como O_2^- , H_2O_2 , y radical hidroxilo. Sin embargo, recientemente un nuevo mecanismo que implica intermediarios reactivos de nitrógeno, como el NO, se ha revelado como

el más importante en la destrucción de patógenos intracelulares por macrófagos.

Otro tipo de moléculas que forman parte de la respuesta inmune adaptativa son los interferones. Estos se definieron en un principio por sus propiedades antivirales y más tarde se subdividieron según su origen celular (α : leucocitos, β : fibroblastos, y γ : linfocitos T). En la actualidad forman parte de un grupo más amplio de citocinas, o mediadores intercelulares, entre los que se encuentran interleucinas (IL), TNF y factores de crecimiento hematopoyéticos. Se ha descrito que interferon γ (IFN- γ) es activo contra el estadio hepático de la malaria. Es probable que existan otras funciones para otras citocinas no descritas todavía; ejemplos conocidos son el efecto de IL-1 y TNF en procesos febriles y de TNF en la estimulación de PMNs y la citotoxicidad de eosinófilos.

Los linfocitos T y B son los elementos cruciales de la respuesta inmune adaptativa. Sus receptores, reordenados individualmente y su potencial casi ilimitado de proliferación clonal confieren la especificidad y memoria al sistema inmune. La primera respuesta a una infección requiere normalmente el reconocimiento de sólo unos pocos antígenos, y por lo tanto un pequeño número de linfocitos precursores, por lo que suele desarrollarse lentamente. Por ejemplo, la respuesta inmune en el resfriado común aparece después de que el virus ha sido controlado. Sin embargo, las respuestas secundarias pueden ser muy rápidas, y frecuentemente se elimina al microorganismo antes de que el organismo se vea afectado; un ejemplo lo constituyen los ataques secundarios de las paperas y el sarampión. Las vacunas normalmente inducen una inmunidad equivalente.

Las respuestas adaptativas inmunes pueden clasificarse en tres grupos, según la célula efectora principal: células B, células T CD8⁺, macrófagos y otras células mieloides. Todas tienen en común la actividad cooperadora proporcionada por células T CD4⁺, a través de varias linfocinas. La característica común de todas estas respuestas es que tienen que ser iniciadas por la activación de un linfocito T cooperador (Th) que produce diferentes linfocinas que activan otros linfocitos y fagocitos necesarios para erradicar la infección. Existen 2 tipos de linfocitos Th, de acuerdo a su patrón de linfocinas. Los linfocitos Th1 producen altas cantidades de INF- γ , y TNF pero no de IL-4. Por el contrario, las células

Th2 secretan preferentemente IL-4, pero no IFN- γ . El entorno de citocinas determina el desarrollo de uno u otro tipo. Así, la activación de Th2 y consiguiente producción de IL-4 conlleva una inhibición de la activación de las Th1. Por el contrario, la inducción de Th1 y la producción de IFN- γ bloquean la inducción de Th2. Las citocinas producidas por macrófagos también modulan estas respuestas. Así IL-10 también inhibe la generación de Th1, aparentemente a través de alteraciones en la función presentadora del macrófago, e IL-12 promueve la generación de Th1. Este entorno de citocinas viene determinado inicialmente por las células que participan en la inmunidad innata a una infección como son mastocitos, células NK y macrófagos, y depende además de factores genéticos, cantidad de inóculo, vía de entrada, etc. Los fagocitos son incapaces de destruir ciertos patógenos pero su capacidad de destrucción aumenta considerablemente si son activados por citocinas secretadas principalmente por linfocitos Th1 como TNF e IFN- γ , por productos bacterianos como endotoxinas y por anticuerpos que les dotan de propiedades efectoras y opsonicas.

Los anticuerpos producidos por linfocitos B con la cooperación de los linfocitos Th2 y en menor medida por los Th1, tienen muchas funciones en la defensa antiinfecciosa: 1) Previenen la unión de parásitos a sus receptores. 2) Neutralizan toxinas. 3) Activan la fijación y el sistema del complemento. 4) Favorecen la fagocitosis (opsonización) a través de la unión a los receptores de Fc (FcR). 5) Promueven la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC).

Por otra parte, las células T CD8⁺ citotóxicas destruyen células infectadas con parásitos intracelulares a través del reconocimiento del antígeno asociado al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), median preferentemente la actividad antiviral. Su acción puede ser directamente citotóxica o debida a la secreción de linfocinas, como IFN- γ o TNF.

La división de las células T CD4⁺ basada en la producción de citocinas ha representado uno de los mayores avances en la comprensión de la respuesta inmune, particularmente en enfermedades infecciosas. El predominio de una u otra subpoblación de linfocitos T (Th1, Th2 o CD8) y de las respectivas linfocinas promueve la resistencia o susceptibilidad en la mayoría de las infecciones por microorganismos (Scott y Kaufmann,

1991). Esto depende del mecanismo de replicación extracelular o intracelular del microorganismo y en este último caso, del tipo de diseminación y tipo de células hospedadoras, más que de la posición taxonómica del microorganismo.

También debe mencionarse la existencia de células T con actividad supresora o reguladora que parecen inhibir la inmunidad natural (pero también la inmunopatológica) en algunas infecciones experimentales y posiblemente en enfermedades humanas como la lepra (revisado en Brostoff J., 1991), aunque sus propiedades fenotípicas y el mecanismo exacto de inmunosupresión son objeto de una gran controversia.

Cuando alguno de estos mecanismos efectores inmunes reacciona contra antígenos propios, por multitud de causas, se puede producir un proceso patológico conocido como autoinmunidad. Existen varios autoantígenos que han sido descritos como diana de la respuesta inmune en enfermedades autoinmunes, algunos de los más representativos se presentan en la Tabla I. Sin embargo, conviene recordar que la presencia de autoanticuerpos o células T autorreactivas no es necesariamente causa de la patología ya que a veces esta autorreactividad puede ser más bien un efecto causado indirectamente por el propio daño tisular.

2.2.- Mecanismos de reconocimiento inmune.

Para funcionar de forma efectiva, el sistema inmune debe ser capaz de distinguir lo propio de lo no propio. Esto es posible gracias a la familia de moléculas MHC, o antígeno leucocitario humano (HLA), como se denomina en humanos.

Los linfocitos T reconocen ambos antígenos propios y no propios sólo cuando se encuentran asociados con moléculas HLA. Durante la vida fetal, tiene lugar un proceso de "educación" de células T, mediante el cual las células T reconocen antígenos propios (asociados a moléculas MHC) que son eliminados, y las células T que reconocen antígenos foráneos en asociación con moléculas HLA son seleccionados. Errores cometidos en la eliminación de antígenos propios pueden dar lugar a la enfermedad autoinmune. El sistema inmune ha desarrollado dos mecanismos distintos para afrontar dos tipos diferentes de antígenos; aquellos predominan-

temente extracelulares, como las bacterias, y los predominantemente intracelulares, como los virus. Antígenos derivados de fuentes extracelulares son procesados a través de la vía exógena y son reconocidos en asociación con moléculas HLA clase II por linfocitos $CD4^+$, que son generalmente cooperadores. En cambio, los antígenos derivados de fuentes intracelulares son procesados, predominantemente, a través de la vía endógena y son reconocidos en asociación con moléculas HLA clase I por linfocitos T $CD8^+$, que generalmente constituyen la población de células T citotóxicas (revisado en Nygard N.R., 1993). Estudios recientes indican que un péptido antigénico procesado, de nueve aminoácidos, se une a un surco de la molécula HLA, y este complejo es reconocido por el receptor de células T. Es importante poner énfasis en que el receptor del antígeno de un linfocito T $CD8^+$ únicamente reconoce y une un péptido antigénico determinado cuando está asociado a una molécula HLA clase I. La clase II posee también un surco que une péptidos antigénicos procesados de aproximadamente 14 aminoácidos. La molécula de clase II y su péptido antigénico unido constituyen el ligando reconocido por el receptor en linfocitos T $CD4^+$.

El receptor de células T que une el complejo HLA/péptido es una estructura de dos cadenas α y β . Las cadenas α y β constan de una región variable (V) y una región "immunoglobuline-like" constante seguida de un péptido y una región de membrana. Existen al menos 25 familias $V\beta$ y 34 familias $V\alpha$ distintas. El lugar de reconocimiento del complejo HLA/péptido está comprendido por las regiones variables de ambas cadenas

Normalmente, un complejo HLA clase II/péptido es reconocido tan sólo por 1 entre 10.000 células T $CD4^+$. Sin embargo, recientemente se ha descubierto un grupo de moléculas denominadas superantígenos que pueden estimular hasta 1 entre 5 células T $CD4^+$. Dichos superantígenos son en su mayor parte proteínas bacterianas y virales, que no sufren procesamiento y que se unen a la parte externa del surco (en lugar de la interna) de las moléculas HLA clase II. Además, también pueden unirse a la parte exterior (en lugar del sitio de reconocimiento) de la región variable de la cadena β del receptor de células T (TcR $V\beta$).

La unión de superantígeno a la apropiada molécula HLA clase II y el apropiado TcRV β estimula la proliferación de células T. Similar estimulación de las células T por superantígenos podría incluir la

proliferación de células T que reconocen autoantígenos y por lo tanto, conducir a la enfermedad autoinmune. Además la estimulación de células T por superantígenos conlleva la muerte de muchas de las células estimuladas, dejando "huecos" en la capacidad de vigilancia del sistema inmune contra agentes infecciosos, que podrían estar involucradas en la patogénesis de ciertas enfermedades autoinmunes (revisado en Nygard N.R., 1993).

TABLA I.
Autoantígenos representativos (modificado de Paul, 1993 y Steinman L., 1995).

Enfermedad	Antígeno
LES	ATPasa/dATPasa citoplásmica; LA
LES	Proteína nuclear de 60 kDa; Ro/SS-A
LES	Polipéptido nuclear 68 kDa; UIRNP
Escleroderma	Proteína ácida nucleolar 75 kDa; PM-Scl
Escleroderma	Topoisomerasa nuclear I; Scl-70
Poliomiositis	tRNA/alanylRNA sintetasa; PL12
Pémfigo vulgar	Cadherina de células epiteliales
Cirrosis Biliar	Acetil transferasa mitocondrial
Hepatitis autoinmune	Citocromo 450 db1 mitocondrial
Diabetes	Acido glutámico decarboxilasa de células β
Tiroiditis autoinmune	peroxidasa del tiroides
Nefritis de Heyman	gp330 "brush border"
Miastenia Gravis	receptor de acetilcolina
Enfermedad de Graves	receptor de la hormona estimuladora de tiroides
Síndrome miastémico	sinaptotagmina de canales de sodio
Lambert-Eaton	
Síndrome de Isaac	canales de potasio
Esclerosis múltiple	proteína básica de mielina
Escleroderma	topoisomerasa I
Uveitis	proteína de unión al interreceptor retinoide y segmento exterior de bastones
Diabetes mellitus dependiente de insulina	ácido glutámico decarboxilasa y proteínas de estrés

3.- RELACION ENTRE INFECCION Y AUTOINMUNIDAD.

Las relaciones entre agentes infecciosos y enfermedades autoinmunes pueden explicarse parcialmente, teniendo en cuenta todo lo mencionado anteriormente. Los agentes infecciosos, potencialmente causantes de enfermedades autoinmunes son sometidos al procesamiento normal de antígenos, y los péptidos antigénicos que se derivan de ellos son presentados a los linfocitos T como parte del complejo molécula HLA/péptido. Las respuestas de los linfocitos T de un individuo determinado frente a dicho complejo son las que determinan el desarrollo de una enfermedad autoinmune u otra. Es posible que una fuerte respuesta inmune contra un complejo en particular pueda causar o prevenir la enfermedad. Y al contrario, es igualmente posible que una respuesta inmune mínima o ausente pueda causar o prevenir la enfermedad. El hecho de que los linfocitos T reconozcan siempre péptidos antigénicos junto con moléculas HLA probablemente explica que muchas enfermedades autoinmunes estén altamente asociadas con un tipo particular de HLA.

Muchas infecciones protozoarias están asociadas a la producción de autoanticuerpos, pero existen pocos casos de células T autorreactivas. En la malaria y la tripanosomiasis africana se han descrito anticuerpos anti inmunoglobulinas, complemento y componentes de varios tejidos (Jayawardena A.N., 1981; Mansfield J.M., 1981). De todas formas no se ha establecido una relación directa de estas actividades y la patología de la enfermedad.

Alternativamente, un agente infeccioso puede producir una molécula que puede actuar como superantígeno. La estimulación y la consiguiente eliminación de células T de una determinada familia V β , podría ser responsable del desarrollo o la prevención de una determinada enfermedad autoinmune.

Aunque se han propuesto muchas hipótesis para explicar la asociación entre agentes infecciosos y enfermedades autoinmunes, una de las más sugestivas es la del mimetismo molecular. Esta hipótesis propone que una molécula propia y una molécula del agente infeccioso etiológico comparten un epítipo inmunológicamente similar (determinante antigéni-

co). La hipótesis del mimetismo molecular conlleva dos posibles alternativas.

En la primera, la similaridad inmunológica entre el epítipo del agente infeccioso y el antígeno propio impide que el agente infeccioso sea reconocido como foráneo, o sea, es reconocido como propio. Por lo tanto, no se produce respuesta inmune, y el agente puede producir enfermedad autoinmune mediante un mecanismo fisiopatológico. Por el contrario, la segunda alternativa sugiere que el epítipo compartido es reconocido como foráneo, y por esa razón, se produce una fuerte respuesta autoinmune contra ese epítipo. De esta forma, debido a la similitud con el epítipo propio, la respuesta inmune reconoce ahora también el antígeno propio como foráneo, y esta respuesta autoinmune produce la enfermedad (Tabla II).

Una segunda hipótesis es que la asociación entre enfermedad autoinmune e infección puede implicar la presentación de antígenos crípticos del hospedador, durante la infección, que normalmente no son accesibles a la vigilancia inmune del mismo. Una forma mediante la cual este mecanismo puede ser operativo implica una expansión de la normalmente limitada distribución de las moléculas HLA clase II. Estas se encuentran normalmente en ciertas células inmunocompetentes (por ejemplo, células B, células dendríticas, macrófagos, monocitos, células Kupffer, y linfocitos humanos activados), y pueden inducirse en células de cierto número de tejidos durante la infección (u otros estados inflamatorios), pudiendo resultar en presentación de antígenos propios por moléculas HLA clase II que normalmente están secuestrados (revisado en Nygard N.R., 1993).

Por otro lado, en un análisis de la base de datos de proteínas, Murphy y col (1993) han demostrado que para un grupo de proteínas de defensa del sistema inmune del hospedador, existe un porcentaje de divergencia tres veces mayor que para la media del resto de proteínas. Además, esto se correlaciona con la identificación de proteínas virales de estadios específicos divergentes y homólogos a las del hospedador. Ello sugiere que el mimetismo molecular puede ser una potente fuerza coevolutiva que promueve la diversidad molecular en muchos miembros de esta clase de proteínas.

TABLA II.

Mimetismo molecular entre proteínas de agentes patógenos y humanas cuya reactividad cruzada ha sido demostrada. Las secuencias de péptidos se expresan en el código de una letra (modificado de Oldstone, M.B.A. , 1987, Cell, 50, 819 y Brostoff et al , Cincal Immunology, Gower Medical Publishing).

Enfermedad	Antígeno huésped/hospedador	Secuencias
BACTERIAS		
Miocarditis estreptococal	<i>Streptococcus</i> Miosina	
Espondilitis anquilosante	<i>K.pneumoniae</i> nitrogenasa HLA-B27	SRQTDREDE KAQTDREDL
Espondilitis anquilosante	<i>Yersinia</i> nitrogenasa HLA-B27	
Tuberculosis	<i>M. tuberculosis</i> 64 kD HSP	
Meningitis	<i>N.meningitidis</i> cerebro embrionario	
"Lyme"	<i>B.burgdorferi</i> HSP	
VIRUS		
Artritis reumatoide	virus Epstein-Barr gp110 HLA-Dw4 DR β-1	QKRAA QKRAA
Miocarditis	Citomegalovirus humano IE2 HLA-DR	PDPLGRPDED VTELGRPDAD
Miastenia gravis	Poliovirus VP2 Receptor de acetilcolina	STTKESRGTT TVIKESRGTK
Diabetes	Papilloma virus E2 Receptor de insulina	SLHLESLKDS VYGLESLKDL
Diabetes	Coxackie P2-C ac. glutámico descarboxilasa 65	KILPEVKEK KILPEVKEK
Rabia	Virus de la rabia Receptor de insulina	TKESLVIIS NKESLVISE
Enfermedad celiaca	Adenovirus 12 E1B α-gliadina	LRRGMFRPSQCN LGQGSFRPSQQN
SIDA	HIV p24 región IgG constante	GVETTTPS GVETTTPS

Paperas	Virus de las paperas corticotropina	LECIRALK LECIRALK
Paperas	Virus de las paperas Proteína básica	EISDNLGQE EISFKLGQE
Miocarditis	Coxackie B4 músculo cardíaco	
PROTOZOOS		
Malaria	<i>P.falciparum</i> Timosina a 1	
Chagas	P0 de <i>T.cruzi</i> receptor β-adrenérgico	AESEE AESDE
Chagas	C terminal FL160 de <i>T.cruzi</i> tejido nervioso	
Chagas	SAPA de <i>T.cruzi</i> Cha-912	STPSTPADSSAHSTPSTPV SLVTCPAQGSLSQSSPSMEI
HELMINTOS		
Schistosomiasis	<i>Schistosoma</i> Glutation transferasa	

3.1.- Inmunosupresión en enfermedades parasitarias.

Muchas infecciones parasitarias, especialmente las causadas por protozoos, están asociadas a una inmunosupresión generalizada de la respuesta inmune. En malaria experimental, tripanosomiasis africana y enfermedad de Chagas, este fenómeno se demuestra claramente y es producto de alteraciones en los compartimentos de células T y B y células adherentes supresoras (Brenner Z., 1980; 1981; Weidanz W.P., 1982; Fernández M. A., 1993a). Por ejemplo, se ha demostrado el importante papel de las células CD8⁺ en la inhibición de la producción de IL-2 durante la infección por *Trypanosoma cruzi*, mientras que los macrófagos juegan un papel menos decisivo. La inmunosupresión generalizada en tripanosomiasis humanas, leishmaniasis y malaria, puede dar lugar a una disminución en la respuesta inmune a antígenos no relacionados directamente con la infección, pero las consecuencias clínicas y la significación de tales disminuciones no se han establecido con seguridad (revisado en Kotb M., 1995).

3.2.- Presentación de autoantígenos crípticos mediada por infección.

La sobreproducción de citocinas inflamatorias como INF γ , TNF, IL-1, y IL-8 durante procesos inflamatorios puede aumentar la expresión de moléculas MHC clase II, factores coestimuladores y moléculas de adhesión. La expresión anormal de moléculas clase II se ha asociado a muchas condiciones autoinmunes como el síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, carditis reumática y otras (Fox R., 1992; Amoils B., 1986; Hanafusa T., 1983 y Herskowitz A., 1990). Aunque la elevada expresión de moléculas MHC clase II pueda aumentar el número de péptidos crípticos que se unen a ellas, es insuficiente para producir la activación de células T, ya que se requiere además la unión a receptores de moléculas coestimuladoras.

La exposición de autoantígenos crípticos puede también deberse a la acción de proteasas liberadas durante procesos inflamatorios o por los mismos agentes infecciosos.

Los procesos inflamatorios también aumentan la expresión de chaperoninas (conocidas también como proteínas de estrés o "heat shock" (HSP's), que además de actuar como dianas de reconocimiento autoinmune, pueden alterar la presentación de proteínas mediante la modulación del transporte y procesamiento de péptidos intracelulares (revisado en Kotb M., 1995).

3.3.- Autoinmunidad y HLA.

La primera asociación significativa de HLA con enfermedad se encontró en 1973. Desde entonces más de 100 enfermedades, la mayoría con algún componente autoinmune, se han asociado con moléculas HLA específicas.

El prototipo de asociación es la de HLA-B27 y la espondilitis anquilosante. Más del 90% de los pacientes con espondilitis anquilosante presenta HLA-B27. Además, HLA-B27 está asociado con el síndrome de Reiter, artritis psoriática, y la artritis asociada a la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), las cuales presentan sacroiliitis como una de las principales manifestaciones (revisado en Nygard N. R., 1993).

4.- DESORDENES AUTOINMUNES CON EVIDENCIA DE UNA ETIOLOGIA INFECCIOSA.

4.1.- **Diabetes mellitus tipo I (IDDM).**

Durante los últimos años es cada vez más evidente que IDDM es una consecuencia de la autoinmunidad dirigida contra las células β de los islotes pancreáticos secretoras de insulina. Sin embargo, IDDM se presenta en sólo un 35% del segundo gemelo en gemelos monocigóticos en los que el primer gemelo lo padece. Esto sugiere la presencia de factores adicionales más allá de una predisposición genética. La existencia de infiltrados celulares inflamatorios en las células de los islotes de pacientes al inicio de la enfermedad fue interpretado, ya en 1965 como el resultado de una respuesta autoinmune a una infección viral de los islotes.

En la actualidad estudios en humanos y modelos animales apoyan ambas ideas. Los pacientes caucasianos con IDDM presentan altas frecuencias de HLA-DR3, -DR4, HLA-DQw2, y HLA-DQw8. Se observan títulos elevados de IgM contra coxsackie virus B4 y B5 en aproximadamente un 30% de los pacientes diagnosticados recientemente con IDDM. También están implicados como agentes causantes de IDDM el virus de la rubéola congénita y el citomegalovirus (revisado en Nygard N.R., 1993).

Por otro lado, se ha descrito que un superantígeno podría estar involucrado en la patogénesis de IDDM, ya que las células β pancreáticas parecen ser particularmente sensibles a los efectos citotóxicos de citocinas como IL-1, IFN- γ y TNF- α , los cuales se producirían tras la estimulación por superantígenos "in vivo" (MacDonald H. R., 1994).

Recientemente se ha propuesto que la similitud de secuencias entre la proteína de coxsackie virus denominada P2-C (Cox P2-C) involucrada en la replicación del virus, y el enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD65), expresado en cerebro y células β pancreáticas, podría desencadenar una reacción cruzada en células T. Esta hipótesis se basa en que ambos antígenos han sido relacionados con la patogénesis de IDDM (Tian J., 1994). Además, se ha descrito que GAD65 es un autoantígeno clave en la inducción de IDDM en ratones diabéticos no obesos (Panina-Bordignon

P., 1995).

4.2.- Artritis reumatoide (RA)

Quizás sea esta enfermedad a la que se le han atribuido más candidatos patógenos como causantes de la misma. La inducción de anticuerpos que poseen actividad de factor reumatoide (RF) y la frecuencia de síntomas reumatoides durante infecciones crónicas (como por ejemplo: endocarditis bacteriana, tuberculosis, sífilis, hepatitis viral, lepra, esquistosomiasis y mononucleosis) aún confunde más la situación. El RF presente en dichas infecciones no es el causante de la artritis autoinmune. Una opinión sobre la aparición de RF en estas enfermedades es que podría ser el vínculo con un mecanismo normal de inhibición de la respuesta inmune primaria del hospedador frente a ciertas infecciones prolongadas. Esta opinión defiende que un grupo de células normales que expresan CD5 son expandidas durante infecciones prolongadas mediante estimulación crónica, produciendo anticuerpos con actividad de RF. Estos factores reumatoides se unen a las IgG que se han unido al patógeno para amplificar la respuesta inmune contra el mismo y promover la presentación de antígenos a células T.

En RA, las células B CD5⁺ están crónicamente estimuladas, produciendo grandes cantidades de RF que puede formar complejos inmunes en todo el organismo. Este proceso es especialmente significativo en las articulaciones. La aparición de RF en respuesta a muchas infecciones sugiere la posibilidad de que una infección crónica pueda estar involucrada en la patogénesis de RA.

La asociación de RA con determinadas moléculas HLA da lugar a algunas especulaciones. En un principio los pacientes presentaban alta frecuencia de HLA-DR4. Más tarde se encontró que RA estaba asociada con subtipos particulares de DR4, y que los pacientes que no presentaban DR4 tenían alta frecuencia de DR1 en comparación con la población normal. La secuenciación de los genes codificantes de los diferentes subtipos DR4 y DR1, reveló la presencia de un fragmento de aminoácidos en las posiciones 69-72, determinante en la susceptibilidad a la enfermedad.

El virus de Epstein-Barr (EBV, o virus linfocitotrópico B) es frecuentemente mencionado como posible agente etiológico de RA. Durante la infección aguda, el virus es un potente activador policlonal de células B, produciéndose muchos anticuerpos, entre ellos el RF. El virus está ampliamente difundido en la población humana, infectando del 85% al 95% de los adultos en occidente. Una vez se produce la infección, el hospedador retiene el genoma de EBV en una pequeña fracción de células B, y retiene una población de células T que suprimen cualquier posible rebrote tras la infección aguda en el hospedador normal.

Los pacientes con RA poseen una regulación aberrante del estado infeccioso latente de EBV. Además, la población de células B periférica en pacientes de RA posee un elevado número de células B con infección latente por EBV. Finalmente, se observan elevados niveles de anticuerpos contra antígenos nucleares asociados a EBV en pacientes con RA.

Roudier y col (1989) encontraron que la glicoproteína de EBV gp110 posee 5 aminoácidos idénticos a la secuencia de la cadena β del subtipo DR4-Dw4 incluyendo el motivo asociado con RA. Anticuerpos contra este epítipo y células T reactivas contra gp110 y HLA-Dw4 fueron encontrados en humanos con evidencia serológica de infección por EBV. La hipótesis de que el agente causante de RA pudiera ser EBV es un ejemplo de cómo el mimetismo molecular entre moléculas del patógeno y del hospedador puede inducir autoinmunidad, aunque aún tiene que ser probado.

Otro modelo que postula la infección en la etiología de RA se deriva de un estudio de las frecuencias de la cadena TcR V β . Se observó que la frecuencia de células T V β 14 era mucho más baja en sangre de pacientes con RA DR4⁺ que en sangre de individuos normales. En cambio, se encontraban con alta frecuencia en líquido sinovial de pacientes con RA. Estas observaciones sugirieron la posibilidad de que un superantígeno fuera responsable de RA. A la vista de estos descubrimientos, es digno de mencionar que frecuencias de células T, con determinada cadena V β , aberrantes, son observadas en la enfermedad de Kawasaki, y sarcoidosis, sugiriendo la posibilidad de que infecciones y superantígenos puedan jugar un papel en dichas enfermedades (revisado en Nygard N.R., 1993).

4.3.- **Lupus eritomatoso sistémico (LES) y síndrome de Sjögren (pSS).**

LES ha sido considerada durante mucho tiempo como el prototipo de enfermedad autoinmune sistémica. Se piensa que muchos autoanticuerpos contribuyen a la patología en diferentes tejidos según se observa en esta enfermedad. Se creía que dichos autoanticuerpos eran resultado de una simple activación policlonal de células B, pero estudios recientes muestran que muchos de estos autoanticuerpos específicos son claramente dependientes de antígeno. Por lo tanto la infección podría ser un desencadenante del descenso de la tolerancia a lo propio que puede dar lugar a la autoinmunidad en LES.

La infección por el virus de la estomatitis vesicular (VSV) también se ha asociado con LES en modelos murinos, aunque no existe evidencia directa en humanos, sugiriendo que el mimetismo molecular podría dar lugar a la aparición de autoanticuerpos en LES (revisado en Nygard N.R., 1993). También EBV, así como retrovirus endógenos y exógenos, son considerados como posibles causantes de LES. En general se predice que el mimetismo molecular entre virus y antígenos propios da lugar a los autoanticuerpos observados en LES. Entre ellos se encuentran los anticuerpos antinucleares (ANA's), también presentes en el síndrome primario de Sjögren (pSS). Una de las dianas del sistema ANA's es el autoantígeno nuclear La/SS-B involucrado en la transcripción y terminación de la ARN polimerasa III. Recientemente se ha aislado un ARNm alternativo de La/SS-B que contiene nuevos sitios de unión a ADN entre los que se encuentra NF-kB. Estos resultados sugieren que la expresión del gen La/SS-B se ve alterada en función de las condiciones de la enfermedad (Tröster y col., 1994).

5.- INFECCIONES CON ASOCIACION AUTOINMUNE CONOCIDA.

5.1.- **Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).**

Desde que se detectó el primer caso en 1981, un conjunto cada día más numeroso de fenómenos autoinmunes están asociados con la infección

por el virus de inmunodeficiencia humano (HIV). Una de las primeras observaciones fue la presencia de numerosos autoanticuerpos en el suero de pacientes infectados con HIV, incluyendo ANA's, RF, anticuerpos antiplaquetas, antieritrocitos, antineutrófilos, antilinfocitos, anticolágeno, y anticardiolipina. Los anticuerpos aparecen en los inicios de la activación policlonal de células B que ocurre en la infección de HIV. Muchos mecanismos parecen ser responsables de dicha activación policlonal de células B. Primero, la replicación del virus HIV en monocitos y macrófagos induce la producción de IL-6 que actúa como un potente activador de células B. Segundo, existe evidencia de que HIV estimula directamente las células B periféricas. Finalmente, la desaparición de linfocitos T CD4⁺ conlleva la pérdida de regulación de las células B así como la reactivación de infecciones latentes, causadas por el virus de Epstein-Barr (EBV) y el citomegalovirus (CMV), que son capaces de estimular directamente la activación de células B.

Debido a que los autoanticuerpos en SIDA se dan en los inicios de la activación policlonal de células B, resulta difícil discernir hasta que punto tales anticuerpos son simplemente un epifenómeno, o si son causa de patogénesis. En la mayoría de los casos, por ejemplo, el RF y los ANA's que se dan en los pacientes de SIDA, parecen ser resultado de la activación policlonal de células B y su significado no está probado. Sin embargo, muchos de los otros factores se han asociado con descubrimientos clínicos en SIDA, sugiriendo que además son patogénicos.

En estudios recientes parece claro que la progresión de la infección HIV conduce a alteraciones autoinmunes variadas en grupos de pacientes. Dichos desórdenes incluyen el síndrome de Reiter, un desorden parecido al síndrome de Sjögren o denominado síndrome de linfocitosis infiltrativa difusa (DILS), dermatopolimiositis, y psoriasis. El hecho de que estas enfermedades puedan presentarse en el inicio de la desaparición de células T CD4⁺ sugiere que las células T CD4⁺ juegan un papel protector, mientras que las CD8⁺ podrían estar activamente involucradas en la patogénesis de la enfermedad. Por lo tanto, la desaparición de células T CD4⁺ causada por HIV puede inducir la enfermedad autoinmune mediante dos posibles mecanismos: primero, la desaparición de células T CD4⁺ produce inmunosupresión y aumenta la susceptibilidad a enfermedades del

organismo, y segundo, permitiendo la proliferación del subgrupo CD8⁺.

El síndrome de linfocitosis infiltrativa difusa en SIDA es parecido al de Sjögren, presentándose un engrandecimiento de las glándulas parótidas, síndrome de sicca, e infiltración linfocitaria de las glándulas salivares y viscerales. Los pacientes que presentan DILS parecen tener mejor diagnóstico por el hecho de conservar CD4⁺ y tienen mayor esperanza de vida. Esto puede estar relacionado con el tipo de HLA (ausencia de HLA-B35 y alta frecuencia de HLA-DR5, -DR6, y -DR7). Por el contrario, los que poseen HLA-B35 tienen peor diagnóstico, progresión hacia SIDA y muerte.

Recientemente, muchos estudios sugieren que la pérdida de CD4⁺ no debe atribuirse por completo al virus HIV, sino a la respuesta individual contra sus células T CD4⁺. Como hemos mencionado anteriormente, se han aislado anticuerpos antilinfocitos de pacientes infectados por HIV. Un grupo de dichos anticuerpos parece ser reactivo con la porción extracelular de la molécula CD4 y puede inducir citotoxicidad retardada dependiente de anticuerpo, haciendo desaparecer la población CD4⁺. Dichas observaciones sugieren que el hospedador desarrolla una respuesta inmune contra las células T CD4⁺ propias, en la infección por HIV. Debido a que esta reacción no se limita a las células CD4⁺, y ataca también a las células no infectadas, parece posible que la autoinmunidad pueda también participar en la patogénesis del SIDA.

Golding y col (1988) descubrieron otro posible mecanismo mediante el cual la respuesta del sistema inmune de los pacientes infectados por HIV podría producir una disminución de la función linfocitaria: la existencia de epítomos compartidos entre proteínas de la cápsida del virus HIV y moléculas HLA clase II. En particular una región de 5 aminoácidos de la cadena β comparte homología con el carboxilo terminal de la proteína de la cápsida de HIV. Debido a este mimetismo molecular, anticuerpos contra HIV reconocen moléculas clase II y pueden producir inmunosupresión.

Recientemente, Barnaba y col (1994) han aislado clones de células T específicos para determinantes humanos de CD4 que reconocen células B que han internalizado y presentan moléculas CD4 solubles recombinantes. Sin embargo, estos clones no reconocen células T que expresan CD4

y moléculas clase II en presencia de IL-2. Estos resultados sugieren que los epítomos definidos por dichos clones son crípticos, ya que no se generan en el procesamiento constitutivo de CD4 endógeno. Además dichos epítomos son generados por células T activadas cuando hay una disminución de la expresión de CD4 por HIV-gp120 o anticuerpo contra CD4 (revisado en Lanzavecchia A. 1995).

En resumen, aunque la patogenia del SIDA es extremadamente compleja, existen muchas posibles causas que pueden contribuir a ella y es posible que también estén involucrados fenómenos autoinmunes.

5.2.- Enfermedad de "Lyme".

El complejo de síntomas de esta enfermedad fue descrito por vez primera en 1977 y presentaba muchas facetas de tipo autoinmune. La rápida identificación del agente infeccioso causante de la enfermedad constituye un hito en la medicina moderna. La espiroqueta causante de la enfermedad, *Borrellia burgdorferi*, fue objeto de intenso estudio durante muchos años hasta que Burgdorfer y colaboradores aislaron concluyentemente el parásito de la garrapata *Ixodes dammini*. La enfermedad se caracteriza por la infección crónica y la tardanza en la desaparición del parásito.

La enfermedad puede dividirse en tres estadios. El primero se caracteriza por lesiones en la piel, fiebre, artralgias, adenopatías, y rigidez de cuello. Durante este estadio inicial la respuesta inmune del hospedador está suprimida. El segundo estadio tiene lugar semanas o meses más tarde, y se caracteriza por anomalías neurológicas y cardíacas. Durante este período la inmunosupresión del hospedador revierte y se observa inmunoreactividad contra *B. burgdorferi*. El tercer estadio tiene lugar meses o años después del segundo y se caracteriza por algo parecido a una artritis reumatoide crónica. Todos estos síntomas sugieren un origen autoinmune de la enfermedad.

Se ha postulado que el mimetismo molecular podría explicar la autoinmunidad observada en la enfermedad de "Lyme". La familia de las HSPs está muy conservada en la evolución, y es utilizada por procariotas y eucariotas para proteger funciones vitales de las células en momentos de

estrés. Debido a que están tan conservadas, una respuesta inmune dirigida contra dichas proteínas de *Borrelia* puede reaccionar de forma cruzada con las del hospedador, produciendo una respuesta autoinmune.

La identificación de anticuerpos específicos contra proteínas de espiroquetas (incluyendo HSPs) en el líquido sinovial de pacientes con artritis apoya esta idea. De forma análoga, se ha sugerido una respuesta autoinmune contra HSP en RA, LES y las espondiloartropatías seronegativas.

Se ha descrito otro epítipo de *Borrelia* que comparte homología con miosina, sugiriendo que una respuesta inmune contra ese epítipo pueda ser la causa de carditis en la enfermedad de "Lyme". En pacientes con neuropatías, se ha observado la presencia de anticuerpos contra proteína mielínica básica (MBP) y axones en líquido cerebrospinal.

En algunos casos la enfermedad se ha visto asociada a tipos HLA particulares. Los pacientes que presentan artritis crónica poseen frecuentemente el alelo HLA-DR2 y -DR4. Los pacientes con DR4 no responden al tratamiento con antibióticos. Debido a que DR4 se ha asociado también con RA, se postula la existencia de un mecanismo patogénico similar que desencadenaría sinovitis (revisado en Nygard N.R., 1993).

5.3.- Espondiloartropatía e infección.

El ejemplo más claro de correlación entre un determinado tipo de HLA y enfermedad infecciosa asociada a autoinmunidad es el síndrome de Reiter. Más del 70% de pacientes de raza blanca y 40% de color con esta enfermedad posee HLA-B27, comparado con el 8% y el 2% respectivamente de individuos normales que poseen esta molécula. Las infecciones por *Chlamydia trachomatis*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella sp.*, *Shigella flexneri*, y *Campylobacter* se han correlacionado como agentes etiológicos de esta enfermedad.

Dichos organismos comparten características comunes que pueden contribuir a la patogénesis de la enfermedad, entre las que se encuentran, la propensión a infectar superficies mucosas, una localización intracelular en el hospedador durante la infección, y la presencia de lipopolisacáridos (LPS, un potente inductor de la respuesta inmune del hospedador) en su

membrana externa. La localización intracelular permite al parásito evadir los mecanismos de eliminación normales del hospedador, lo que favorece la persistencia de antígenos bacterianos que podrían provocar la aparición de artritis. Además, las infecciones de *Yersinia*, *Salmonella* y *Chlamydia* se caracterizan por la capacidad de ser transportadas del lugar inicial de la infección a compartimentos reticuloendoteliales, vía fagocitosis. En cambio el caso de *Shigella* es diferente, ya que sólo un pequeño porcentaje de pacientes presenta artritis. En 1989, Stieglitz y colaboradores demostraron la presencia de un plásmido denominado pHS-2 en las cepas artrogénicas de *Shigella*. Este plásmido codifica un péptido de 22 aminoácidos que posee cinco aminoácidos idénticos a los residuos 71-75 del dominio polimórfico $\alpha 1$ de HLA-B27. En otro trabajo se ha demostrado que un hexapéptido es compartido entre el antígeno de histocompatibilidad HLA-B27 y la nitrogenasa de *Klebsiella pneumoniae*. Dicha bacteria está involucrada según algunos autores, en la etiología de la espondilitis anquilosante (revisado en Nygard N. R., 1993).

6.- AUTOINMUNIDAD Y ENFERMEDADES CAUSADAS POR PROTOZOOS Y HELMINTOS.

6.1.- Malaria.

La malaria es una enfermedad producida por el parásito *Plasmodium falciparum* y transmitida a los seres humanos mediante la picadura del mosquito *Anopheles*. Se caracteriza por fiebre, escalofríos, esplenomegalia y recaídas periódicas. La respuesta inmune en la malaria se caracteriza por hiper IgG e IgM globulinemia. Sólo una pequeña proporción de estos anticuerpos posee actividad antimalaria. El resto muestra autorreactividad mediante autoanticuerpos anti IgG (RF), ANA, anti Sm/RNP (partículas de ribonucleoproteínas), anti células parietales, anti linfocitos y anti eritrocitos (RBC).

Existe una correlación significativa entre la presencia de autoanticuerpos y el alto título de anticuerpos antimalaria, sugiriendo que la producción de ANAs está relacionada con la infección. La persistencia de dichos autoanticuerpos no se correlaciona con parasitemia una vez que la

infección es tratada. Se desconoce el significado clínico de los autoanticuerpos en malaria. La presencia de autoanticuerpos anti RBC puede jugar un papel en la anemia producida en la infección.

La enfermedad renal en malaria es una de las causas de mayor mortandad. Se produce un síndrome nefrótico debido a la deposición de complejos inmunes en el glomérulo renal. Se asume que estos complejos inmunes se componen de anticuerpos específicos contra el parásito, sin embargo, en la fase crónica en la que no hay parasitemia, parece que la presencia de autoanticuerpos pueda jugar un papel en la aparición de la glomerulonefritis en malaria.

Se ha descrito la presencia de anticuerpos antiADN en glomérulos en infecciones crónicas murinas con afecciones renales. También se detectaron autoanticuerpos antiADN en biopsias de riñón de pacientes con LES. Inyecciones seriadas de anticuerpos antiADN del idiotipo 16/6 Id en cepas murinas no susceptibles a autoinmunidad produjeron síntomas parecidos a LES. En otras infecciones parasitarias como esquistosomiasis y filariasis también se detectan altos niveles de anticuerpos antiADN del idiotipo 16/6 Id (revisado en Abu-Shakra, 1991).

6.2.- Leishmaniasis.

Leishmania es un protozoo intracelular que reside en fagocitos mononucleares. La enfermedad puede ser localizada o diseminada en función de la especie. La primera fase de la enfermedad se caracteriza por afecciones cutáneas y mucocutáneas. Las leishmaniasis viscerales o Kala-azar están causadas principalmente por *L. donovani*. Se caracterizan por la presencia de altos títulos de inmunoglobulinas no específicas y en menor grado, anticuerpos específicos contra el parásito. Las leishmaniasis cutáneas, en cambio, presentan anticuerpos específicos contra el parásito y niveles normales de inmunoglobulinas.

Como en el caso de la malaria, también se detectan muchos autoanticuerpos en los sueros de pacientes, entre los que se encuentran anti IgG (factor reumatoide), anti-tubulina, anti-actina, anti-ADN, anti Sm/RNP, anti SSA/SSB (Ro y La) y anti músculo liso. También se

detectan complejos inmunes circulantes (CICs) en sueros de pacientes que presentan lesiones mucocutáneas, que se correlacionan con altos niveles de Ac anti IgG. Esto sugiere una asociación entre las lesiones mucocutáneas severas y la aparición de CICs. En las leishmaniasis viscerales se observan lesiones glomerulares con deposición de inmunoglobulinas y componentes del complemento en los glomérulos (revisado en Abu-Shakra, 1991).

6.3.- Schistosomiasis.

Ciertas especies de *Schistosoma* (*S. mansoni*, *S. japonicum*) infectan hígado, mientras que *S. haematobium* infecta vénulas del tracto urinario causando enfermedad del uréter y la vejiga.

Al igual que en la malaria y la leishmaniasis, se produce glomerulonefritis asociada a la deposición de complejos inmunes. También se ha descrito la presencia de autoanticuerpos en humanos y en modelos experimentales, como anti ADN, RF, anti-esperma, anti-linfocitos y anti-colágeno. Recientemente se ha encontrado un alto nivel de anticuerpos anti-ADN del idiotipo 16/6 y anti-cardiolipina. El papel que desempeña el RF no está claro, parece ser el producto de una activación policlonal, no específica, de células B que podría contribuir a aumentar el tamaño de los complejos inmunes circulantes.

Se ha sugerido que algún mecanismo autoinmune podría jugar un papel en la patogénesis de la fibrosis visceral, ya que se ha descrito la presencia de anticuerpos y células T reactivas contra colágeno en ratones infectados con *S. mansoni*. Dichos autoanticuerpos están presentes también en otros desórdenes como artritis reumatoide, escleroderma, fibrosis pulmonar idiopática y policondritis (revisado en Abu-Shakra, 1991).

6.4.- Oncocercosis.

La infección por *Oncocerca volvulus* afecta a unos 30-50 millones de personas en todo el mundo. En áreas hiperendémicas el 10% de las personas infectadas y el 50% de los mayores de 40 años son ciegos debido

a lesiones inflamatorias de la cornea o la retina causadas por el parásito. La enfermedad puede presentarse como una keratitis puntual o escleroide. La primera aparece en infecciones de duración inferior a 10 años y la segunda en las de duración superior a 10 años. Mecanismos inmunológicos mediados por anticuerpos del tipo IgE y eosinófilos son candidatos en la patogénesis de la keratitis.

Se ha sugerido que mecanismos autoinmunes pueden estar involucrados en el desarrollo de lesiones oculares. La similitud entre oncocercosis y otras infecciones parasíticas es significativa ya que se detectan anticuerpos anti-tubulina en el 67% de pacientes con leishmaniasis visceral, 60% de leishmaniasis cutáneas, 89% con oncocercosis, 100% con esquistosomiasis y 94% de pacientes con lepra. En cambio no se detectan en pacientes de malaria.

Aunque es evidente la presencia elevada de autoanticuerpos en enfermedades causadas por protozoos y helmintos, su papel en la patología de la enfermedad no es tan evidente y podría tratarse de un epifenómeno asociado a la propia destrucción tisular durante la infección.

7.- TRIPANOSOMIASIS AMERICANA, ENFERMEDAD DE CHAGAS.

La infección por *Trypanosoma cruzi*, un protozoo hemoflagelado que causa la enfermedad de Chagas, es una de las principales causas de afección cardíaca en América Latina. Aproximadamente unos 20 millones de individuos están infectados con el parásito y 50.000 muertes anuales están asociadas con esta infección. La incidencia de la enfermedad se ha estimado en unos 120.000 casos nuevos por año. En la actualidad todavía no existe una vacuna para prevenir la transmisión, así como tampoco hay ninguna droga quimioproliférica a pesar del considerable trabajo experimental que se está llevando a cabo.

Los responsables invertebrados de la transmisión de *T. cruzi* son insectos hematófagos, pertenecientes a la familia *Reduviidae*, subfamilia *triatominae*. La transmisión natural de *T. cruzi* a los humanos está asociada con la picadura de un insecto de la familia *Reduviidae*, denominado vulgarmente "vinchuca", el cual deposita heces que contienen tripomas-

tigotes metacíclicos infecciosos en la piel del hospedador, que después contaminarán el lugar de la picadura así como las superficies mucosas. Recientemente se han encontrado casos de transmisión de la enfermedad por transfusiones sanguíneas. En América del Sur también se han encontrado numerosos casos de enfermedad congénita asociada con nacimientos prematuros, abortos y placentitis. Otros modos de transmisión menos frecuentes son el amamantamiento, el transplante de órganos y los accidentes en laboratorios de investigación.

En el complejo ciclo de vida de *T. cruzi*, podemos encontrar 3 formas morfogénicas distintas. Los tripomastigotes (formas extracelulares que no pueden dividirse) y amastigotes (formas replicativas intracelulares) se encuentran en los hospedadores mamíferos, mientras que los epimastigotes se dividen en el intestino medio de los insectos de la familia Reduviidae. Cuando el insecto vector produce una picadura a un mamífero infectado toma tripomastigotes del torrente sanguíneo, los parásitos se transforman en epimastigotes que se multiplican en el intestino medio del insecto. Después de 3 o 4 semanas los tripomastigotes metacíclicos estarán presentes en el extremo posterior del intestino del vector. Estos son depositados durante las siguientes picaduras pudiendo infectar a nuevos hospedadores mamíferos. Los tripomastigotes pueden ser fagocitados por macrófagos o pueden directamente penetrar células, en las cuales se transformarán en amastigotes intracelulares (Figura 1).

Desde el punto de vista clínico, las infecciones por *T. cruzi* se producen en dos fases: aguda y crónica. La fase aguda (1-3 meses de duración en humanos) se caracteriza por una activación policlonal masiva de linfocitos B y T, con un aumento en la producción de autoanticuerpos, observándose asimismo una severa inmunosupresión de las respuestas humorales y celulares. Además, se caracteriza por la presencia de tripomastigotes circulando en sangre y por la inflamación local en los puntos de infección (Koberle, 1968). Los parásitos proliferan en macrófagos, células endoteliales, musculatura lisa de los vasos sanguíneos y posteriormente, en musculatura esquelética y tejido nervioso. Al término de la fase aguda se produce una reducción en la parasitemia mediante mecanismos aún desconocidos. Claramente hay un componente inmune,

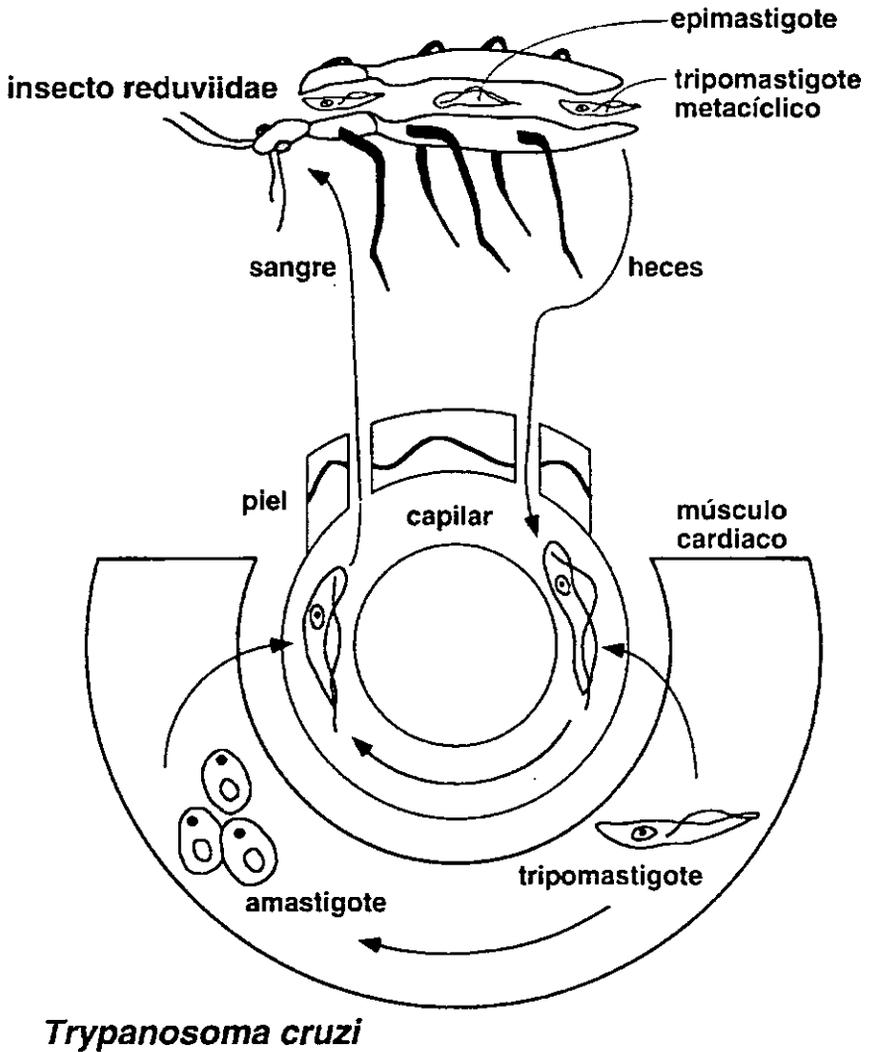


Figura 1.- Ciclo vital de *T. cruzi*

ya que la inmunosupresión conlleva el restablecimiento de la parasitemia (Brenner, 1973). La desaparición de parásitos en la fase aguda nunca es total. La fase crónica dura toda la vida del individuo infectado y en ella no se observan parásitos circulantes en sangre aunque se produce un deterioro progresivo en tejidos del esófago, colon, corazón y sistema nervioso. Sin embargo, la presencia de parásitos se revela mediante xenodiagnóstico, y recientemente por PCR. La infección crónica es a menudo asintomática, aunque un 10-20% de los casos presentan patología evidente. La cardiopatología es una de las formas más severas de la fase crónica. La miocarditis en la enfermedad de Chagas se caracteriza por la presencia de infiltrados de células mononucleares y linfocitarias, con destrucción de tejido miocárdico que es reemplazado por tejido fibroso. Este proceso va acompañado de la aparición de anticuerpos reactivos con miocardio (Hudson, 1985). El descubrimiento de anticuerpos autorreactivos, así como la ausencia de parásitos en corazón infectado, conducen a la hipótesis de que la autoinmunidad es la causa de la patología cardíaca de la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

El tracto digestivo es frecuentemente diana durante los procesos patogénicos en la enfermedad de Chagas y conduce a megasíndromes del esófago y colon (Rezende, 1984). En este caso el plexo mesentérico parece ser la diana, y una vez más, existe una asociación de autoanticuerpos que reconocen procesos nerviosos y autoinmunidad. La naturaleza autoinmune de la neuropatología en ratones infectados crónicamente se ha demostrado mediante transferencia adoptiva de células T cooperadoras a ratones normales (Said, 1985, y Hontebeyrie-Joskowicz, 1985). Se cree que los efectos combinados de la activación policlonal y la presencia crónica de anticuerpos de reactividad cruzada dan lugar a la patología de la enfermedad de Chagas.

7.1.- Biología de la invasión por *T. cruzi*.

La biología del parásito por sí misma puede explicar parte de la patogénesis de la enfermedad. Los tripanosomas contienen una gran variedad de enzimas como proteasas, gelatinasas y colagenasas capaces de

degradar colágenos de tipo I y colágeno de tipo IV. También se han detectado actividades proteolíticas contra laminina y fibronectina. Estas enzimas juegan un papel importante en la degradación de la matriz extracelular (ECM) y en la subsiguiente invasión tisular por el parásito. Se ha propuesto que la degradación de la matriz de colágeno, la cual es evidente durante la fase aguda de la enfermedad chagásica murina, puede dar lugar a alteraciones patológicas crónicas como el debilitamiento de la ECM.

Finalmente, sobrenadantes de cultivos de fibroblastos, células del músculo liso y células del miocardio infectados (pero no los controles) estimulan la síntesis de ADN de fibroblastos, así como la síntesis de proteínas y la proliferación celular. Esto sugiere la existencia de un mecanismo por el cual puede producirse fibrosis en la cardiomiopatía chagásica crónica.

Otros enzimas pueden causar daños tisulares y celulares. Por ejemplo, la neuraminidasa de los tripomastigotes elimina moléculas de ácido siálico, para la síntesis del cual *T. cruzi* es defectivo (Schauer R., 1983), de la superficie de las células endoteliales cardíacas. La pérdida de ácido siálico por parte de los cardiocitos altera la homeostasis del calcio intracelular y la función del miocardio.

La neuraminidasa de *T. cruzi* es inhibida por anticuerpos anti-neuraminidasa y por lipoproteínas de alta densidad (HDL), las cuales están asociadas con el aumento de la infectividad celular in vitro. Está comprobado que ratones con niveles altos de HDL son más susceptibles a la infección por *T. cruzi*. Aunque todavía no está clara la relación entre la síntesis de estas enzimas parasitarias y la patogénesis de la enfermedad.

La entrada y replicación intracelular de *T. cruzi* en las células de mamífero es fundamental para la infectividad del parásito, su supervivencia y la continuación de su ciclo vital. Sin embargo, el mecanismo por el cual *T. cruzi* entra en las células es desconocido y también lo son los mecanismos que evitan su destrucción por los sistemas microbicidas de la célula. Recientemente se ha descrito que *T. cruzi* entra en los macrófagos por un proceso activo dirigido por el mismo parásito.

La entrada del parásito a la célula hospedadora es un proceso complejo que conlleva gran variedad de factores. Se sospecha que varias

moléculas de la membrana celular del hospedador pueden ser importantes en los procesos de entrada del parásito. A este respecto, los componentes del suero tales como fibronectinas o C1q (Ortega-Barria E., 1991; Hall B. F., 1993) pueden modular la invasión del parásito a las células del hospedador, aumentando la internalización de los tripomastigotes tanto en células fagocíticas como no fagocíticas, pudiendo actuar como puentes para facilitar la unión del parásito a la célula diana del hospedador. Schenkman y col (1991) han demostrado que los tripomastigotes entran en las células de una manera polarizada preferentemente a través de la membrana basolateral, donde la fibronectina y los receptores celulares del hospedador están concentrados. Estos resultados han sido confirmados recientemente por nosotros, al demostrar que *T. cruzi* utiliza las b1 integrinas, receptores de fibronectina y C1q, para ganar acceso al interior celular (Fernández M. A., 1993b).

Varias glicoproteínas de membrana de *T. cruzi* han sido implicadas en los mecanismos de entrada, entre ellas GP85, GP83 y glicoconjugados de aproximadamente 35-50kD. Ortega-Barria y Pereira han encontrado en *T. cruzi* una proteína de superficie de 60KDa (penetrina) la cual promueve la adhesión e invasión de las células hospedadoras. Esta proteína de 60kD, se une selectiva y directamente a colágeno y glucosaminoglicanos, promoviendo su adhesión al sustrato. Además, expresada en *E. coli* permite a esta bacteria unirse y penetrar en fibroblastos no fagocíticos (Ruíz R. de C., 1993). También se ha comprobado que la transialidasa de superficie, que transfiere ácido siálico derivado del hospedador a las moléculas de la superficie del parásito parece ser necesaria para la invasión (Schenkman S., 1991; Cross G.A., 1993).

También se sabe que hay glicanos implicados en el fenómeno de reconocimiento (Hall B. F., 1993). Muy recientemente hemos identificado una serie de proteínas, específicas en la membrana de *T. cruzi*, de unión a carbohidratos (PUC) que podrían estar implicadas en el proceso de reconocimiento, unión, adhesión y penetración del parásito a la célula hospedadora (Bonay P., 1995).

Los parásitos pueden ser eliminados mediante mecanismos citocídicos como la producción de peróxido de hidrógeno. La entrada de tripomastigotes dentro de la células no parece asociada a un aumento de la

actividad respiratoria, sugiriendo que mecanismos intracelulares no oxidativos pueden ser importantes en la limitación de la infección intracelular. También se ha descrito la participación del óxido nítrico en la muerte intracelular del parásito. En el modelo de ratón se ha observado que los niveles de NO (Muñoz-Fernández M. A., 1992) en el plasma y sobrenadantes de ratones resistentes a la infección por *T. cruzi* son mayores que en los de los ratones susceptibles a la infección. El tratamiento de ratones infectados con inhibidores de la NO sintasa aumenta la parasitemia y la mortalidad.

8.- ASPECTOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

8.1.- Fase aguda.

En el lugar donde se ha producido la picadura puede desarrollarse una lesión inflamatoria conocida como chagoma. El proceso de inflamación se expande localmente, siendo evidente una linfadenopatía. Los ciclos asincrónicos de la multiplicación del parásito, destrucción celular y reinfección ocurren dentro del sistema reticuloendotelial.

La mayoría de las personas con enfermedad de Chagas en fase aguda no poseen una sintomatología de la enfermedad. Sin embargo los niños y menos frecuentemente algunos adultos, pueden desarrollar una severa sintomatología después de un período de incubación de 7 a 14 días. Esta sintomatología incluye edema periorbital indoloro unilateral (la señal de Romaña) y conjuntivitis. Otras manifestaciones de la enfermedad son fiebre, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, náusea, vómitos, diarrea, erupción cutánea, lasitud, e irritación meningeal.

Además, un pequeño número de pacientes que padecen la enfermedad de Chagas en fase aguda desarrollan una miocarditis severa y puede ser evidente un foco de necrosis miocitolítica, degeneración acompañada de inflamación celular, así como la parasitemia de las miofibras. También puede encontrarse en las fibras degeneradas una mezcla de exudado inflamatorio con leucocitos polimorfonucleares (PMN_s), células mononucleares y pseudoquistes conteniendo amastigotes. En el modelo de ratón, podemos encontrar también eosinófilos, pero se desconoce su relevancia

en la enfermedad humana. La miocarditis puede ser clínicamente evidente, pudiendo incluir taquicardia, fallo cardiaco y cardiomegalia. La aparición de arritmias, paros cardiacos y congestiones cardiacas progresivas en la fase temprana de la enfermedad son indicadores de pronóstico grave. La presencia de miocarditis en la fase aguda puede no estar relacionada con el subsiguiente desarrollo de la cardiomiopatía chagásica crónica. Un pequeño porcentaje de individuos con enfermedad aguda muere por complicaciones asociadas con miocarditis aguda o meningoencefalitis. Es importante resaltar que la mayoría de los pacientes con Chagas en fase aguda se recupera completamente en 3 ó 4 meses y que ignoran que han sufrido una infección. En aquellos que mueren durante la fase aguda, podemos encontrar amastigotes en el músculo cardiaco y esquelético, así como en las células gliales y en las del músculo liso.

8.2.- Fase crónica

La enfermedad de Chagas en fase crónica puede presentar arritmias, tromboembolias y/o fallos cardiacos. La cardiomiopatía dilatada es una clara manifestación de la enfermedad de Chagas en fase crónica, que ocurre años después de la enfermedad aguda. También es frecuente encontrarse en esta fase un aneurisma apical en el ventrículo izquierdo. Se piensa que el infarto de miocardio en esta fase es debido a una embolia que se produce en el ventrículo izquierdo. También se han descrito en esta fase arterioesclerosis y arteriolitis. La mayoría de los infartos de miocardio ocurren en presencia de arterias coronarias normales. En el modelo canino de la enfermedad se da la vasculitis de la microvasculatura coronaria. La enfermedad de Chagas crónica puede además estar acompañada de mionecrosis, miocitolisis, y necrosis de las bandas de contracción. Pueden verse áreas focales y difusas de hipertrofia miocelular con o sin infiltrados inflamatorios. Además es evidente la fibrosis focal reemplazando al tejido miocárdico previamente dañado. También puede observarse la colagenolisis y la invasión por macrófagos. Todas las áreas del corazón, incluyendo las vías de conducción, pueden resultar dañadas dando lugar a alteraciones en la conducción.

Para entender las manifestaciones clínicas de la enfermedad crónica,

se ha estudiado la disfunción del sistema nervioso autónomo asociada a la infección por *T.cruzi*. La depleción de colina acetiltransferasa y acetilcolina cardíaca, vista en experimentación animal, podría afectar la función del sistema nervioso parasimpático. La disfunción del sistema nervioso autónomo ha llevado a la hipótesis de que la cardiomiopatía chagásica pueda deberse al daño neuronal autónomo al corazón. Esta hipótesis está apoyada por estudios que demuestran la destrucción de los ganglios cardíacos. Sin embargo, se han visto variaciones en la densidad de los ganglios vagos del miocardio. La denervación vaga se ha observado en otras cardiomiopatías debidas a diferentes causas. En pacientes chagásicos se han observado anormalidades en el componente simpático del sistema nervioso autónomo, como son la aparente reducción en los niveles de norepinefrina plasmática y una reducción de la presión sanguínea diastólica en posición erguida.

8.3.- Estudios in vitro.

Durante la infección aguda, el daño patológico parece estar correlacionado con la presencia de parásitos. Por ello se ha estudiado el efecto de la infección en la función de las células musculares. En los mioblastos infectados hay una reducción en la cantidad de mRNAs específicos del músculo (la cadena pesada de miosina y la alfa actina) que está asociada con la inhibición de la diferenciación a miotúbulos.

Otro aspecto del metabolismo celular que se ve alterado por la infección es la respuesta celular a un estímulo externo, incluyendo el mecanismo de transducción de señales.

La infección se asocia con alteraciones en las funciones mediadas por proteína G. A este respecto, se han demostrado alteraciones en la generación de cAMP en mioblastos y células endoteliales. Además, la generación de cAMP, en respuesta a un estímulo hormonal, está reducida en células infectadas debido al aumento de fosfodiesterasa endógena. También hay alteraciones asociadas a la infección en la movilización intracelular de calcio y en la producción de prostaciclina. Las alteraciones asociadas a la infección en los mecanismos de transducción de señales de las células endoteliales contribuye a focalizar anormalidades, lo cual puede incluir el

espasmo microvascular coronario descrito en la infección murina aguda.

Los cambios patológicos que se observan en la cardiomiopatía de la enfermedad de Chagas sugieren que también son debidos, en parte, al espasmo microvascular coronario.

Se ha estudiado la influencia de la ECM para conocer los efectos de la infección celular del hospedador en células no infectadas adyacentes. Se ha visto que la infección de cultivos celulares endoteliales altera su capacidad de síntesis. Un ejemplo es el aumento de la sulfatación de la cadena glucosaminoglicana del heparan sulfato depositada en la ECM de las células endoteliales. Además, cuando las células endoteliales no infectadas se cultivan en la ECM depositada por células endoteliales infectadas, las células endoteliales no infectadas producen una ECM idéntica a la sintetizada por las células endoteliales infectadas, lo cual sugiere que las señales responsables de la orden de sintetizar este proteoglicano alterado, residen en la ECM. Unas pocas células infectadas pueden influir en un gran número de células no infectadas, gracias a la ECM.

Las uniones tipo "gap" (uniones en hendidura) entre las células hospedadoras no infectadas también se encuentran bajo la influencia de las células hospedadoras infectadas. Se sabe que la infección de los cardiocitos neonatales de rata altera la propagación de la onda contráctil. También se ha visto una disminución de la concentración de uniones tipo gap en corazones murinos infectados. Estas alteraciones en las comunicaciones intercelulares proporcionan una base celular para el estudio de las alteraciones asociadas a la enfermedad de Chagas.

8.4.- Estudios en animales.

En la enfermedad experimental, se han relacionado algunas variaciones bioquímicas del miocardio con la cardiomiopatía crónica. Por ejemplo, en modelos animales, se observa una reducción de los niveles de acetiltransferasa colina, acetilcolina, norepinefrina y los del complejo adenilato ciclasa receptor β -adrenérgico del tejido cardíaco. En numerosas ocasiones, las anormalidades bioquímicas preceden a cambios morfológicos. Algunos cambios morfológicos durante la infección aguda

tienen implicaciones en la patogénesis de la cardiomiopatía chagásica crónica. Por ejemplo, la destrucción de los ganglios autonómicos puede tener repercusión no sólo en el desarrollo de la enfermedad cardíaca, sino también a nivel gastrointestinal. Además, se ha demostrado que durante la fase aguda de la enfermedad murina, las células endoteliales que revisten la vasculatura coronaria están infectadas y pueden estar asociadas con alteraciones focales en la microvasculatura coronaria, aumentando la agregación plaquetaria y la adherencia.

8.5.- Mecanismo inmune

Los mecanismos inmunes también participan en la patogénesis de la enfermedad de Chagas. Durante los últimos 20 años se ha estudiado la inmunología de la infección, tanto en el modelo murino como en el humano.

En el modelo de ratón es evidente que tanto los componentes humorales como los mediados por células del sistema inmune, son importantes en la resistencia del hospedador, así como los antecedentes genéticos.

Tarleton y col (1990) sugieren un papel importante de las células T CD8⁺ en la patogénesis de la infección. Ratones infectados que tienen las células CD8⁺ deplecionadas mediante el tratamiento con anticuerpos y ratones deficientes en β_2 -microglobulina, carecen de células T CD8⁺ maduras, sufren una alta parasitemia y una muerte temprana. Además los tejidos parasitados carecen de una respuesta inflamatoria.

Por otra parte, Ben Younes-Chennoufi y col (1988) demostraron que la mayoría de las células T infiltradas en el corazón, en el curso de una infección experimental, son CD4⁺. Recientemente se han desarrollado líneas celulares Th2 CD4⁺ específicas para *T. cruzi* que tras ser inyectadas sistémicamente, o en neuronas de receptores normales, inducen infiltrados mononucleares inflamatorios similares a los que se encuentran en los ratones infectados por *T. cruzi*. Ratones infectados crónicamente por *T. cruzi* rechazan transplantes de corazón provenientes de donantes singénicos recién nacidos, mediante una reacción dependiente de CD4⁺ (pero no CD8⁺). La especificidad de estas células T no ha sido identificada, aunque

se asume que son autoinmunes en su reactividad. Una posibilidad radica en que las células T CD4⁺ que median en esta patología son expandidas, como consecuencia de una activación policlonal, ocurrida durante la infección aguda por *T. cruzi*. La depleción de las células T CD8⁺ y CD4⁺ aumenta la susceptibilidad a la infección pero modera la inflamación del miocardio durante la fase aguda. Sin embargo, la depleción continúa en las fases postaguda y crónica dando lugar a una exacerbación de la patología y un aumento del parasitismo miocárdico.

En los últimos años, se está investigando intensamente el papel de las citocinas en la patogénesis de la infección por *T. cruzi*. Tanto la respuesta humoral como celular están suprimidas en las infecciones experimentales; este estado inmunosuprimido está asociado con concentraciones anormalmente bajas de IL-2. Se cree que IL-2 puede participar en fenómenos autoinmunes relacionados con la enfermedad. Además el aumento de los niveles de TNF, IL-5 e IFN- γ durante la infección murina contribuye a la patogénesis de la enfermedad. También se han encontrado niveles altos de IL-1 β e IL-6. A los altos niveles de IL-1, TNF y IL-6 se les atribuye las alteraciones en las funciones celulares endoteliales en humanos, como son el reclutamiento de leucocitos, la coagulación y la proliferación del músculo liso, las cuales pueden tener importantes implicaciones en la patogénesis de la enfermedad de Chagas. Se ha descrito que tanto el IFN- γ como el GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos) palían en parte las consecuencias de las infecciones experimentales en murinos. A la vista de experimentos en los cuales se demuestra que citocinas como el IFN- γ aumentan la muerte celular de *T. cruzi* tanto in vitro como en el modelo murino, se les ha atribuido un efecto protector ante la infección por *T. cruzi*.

La citocina IL-10 tiene un especial interés en la infección por *T. cruzi* ya que puede interferir tanto en la producción como en la utilización de IFN- γ . Se ha demostrado la producción de IL-10 biológicamente activa por ratones susceptibles genéticamente a *T. cruzi* durante la infección aguda por este parásito, mientras que apenas se produjo IL-10 en ratones resistentes. Los macrófagos son la fuente principal de IL-10 que se produce después de la infección; aunque las células B del bazo y las células T también producen IL-10 durante la infección aguda. Se ha

establecido un papel esencial para IL-10 en la mediación de la susceptibilidad en la infección aguda por *T. cruzi* ya que el tratamiento in vivo con anticuerpos monoclonales antiIL-10 reduce la parasitemia sanguínea y previene la muerte en cepas de ratón susceptibles a la infección.

El papel de las células Th1 y Th2 en *T. cruzi* no está tan claro como en otras infecciones, tales como leishmaniasis, esquistosomiasis y malaria, donde parece que están involucradas en el desarrollo de inmunidad o inmunopatología (Scott P., 1991; Fresno M., 1996). La inducción diferencial de estas 2 subpoblaciones podría explicar el porqué algunos antígenos inducen diferencialmente una serie de respuestas que pueden conducir a patología o a protección en *T. cruzi*. Los clones Th1, que secretan IL-2, IL-3, IFN γ y TNF- α son protectores y activadores de macrófagos mientras que los Th2, que secretan, IL-4, IL-5, IL-6, no lo son. Nuestros resultados indican que TNF- α e IFN- γ son las linfocinas responsables secretadas por células Th1 que activan de modo sinérgico la capacidad tripanocida de los macrófagos a través de un mecanismo dependiente de óxido nítrico (NO) (Muñoz-Fernández M. A., 1992). Esta evidencia experimental sugiere que la patología podría estar causada por una excesiva estimulación de las Th2, por células B CD5⁺ (Minoprio P., 1989), productoras de IL-4 e IL-10 y puede conducir a la supresión de las células Th1, productores de IFN- γ , que parecen ser las inductoras de protección, esto ha sido confirmado por otros autores "in vivo" e "in vitro" (Silva J. S., 1992; Nickell S. P., 1993).

La inmunosupresión es una de las principales características de la infección aguda por *T. cruzi*, aunque los mecanismos responsables distan de estar completamente aclarados. En estudios in vitro se ha observado que *T. cruzi* induce importantes alteraciones en linfocitos T y B humanos activados e inhibe su capacidad proliferativa. Algunos autores sugieren que estos efectos son debidos a una proteína liberada espontáneamente por el parásito, llamada TIF (factor inmunosupresivo tripanosomal). Se han encontrado anticuerpos neutralizantes de TIF durante la fase crónica, pero no en la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, por lo que esto puede ser una de las razones de que la inmunosupresión esté confinada a la fase aguda de la infección.

Recientemente, hemos caracterizado un antígeno mayoritario de la

membrana de *T. cruzi*, reconocido por varios anticuerpos monoclonales (AcM), GP50/55 (Hernández-Munáin C., 1991). Uno de estos AcM presenta reacción cruzada con una proteína (p28) que se expresa en la superficie de los linfocitos T y B después de su activación (Hernández-Munáin C., 1991). Además, este anticuerpo es capaz de inhibir la activación de todos los linfocitos T y B. También hemos detectado anticuerpos de similar especificidad en todos los pacientes chagásicos estudiados y en ratones infectados, aunque su título y capacidad inmunosupresora pueden variar (Hernandez-Munáin C., 1992). Tenemos evidencia de que este fenómeno no es único. Así, otros AcMs y los sueros chagásicos reconocen varios antígenos en leucocitos. Se ha sugerido que la inmunosupresión podría disminuir las defensas del huésped y ayudar a diseminar la infección y causar patología. Sin embargo, las bases moleculares de esta inmunosupresión no han sido caracterizadas. Nuestros resultados indican que *T. cruzi* posee antígenos en su membrana que presentan epítomos similares a proteínas de la membrana de los linfocitos T y B del hospedador e inducen autoanticuerpos frente a los mismos, impidiendo su activación. Este fenómeno puede dar como resultado la modulación de modo directo o indirecto, de la respuesta inmune y representa un nuevo mecanismo alternativo para las alteraciones inmunes asociadas a esta enfermedad.

Por otro lado, la muerte de las células T CD4⁺ por apoptosis, en la infección por *T.cruzi* ayudaría al parásito a escapar de su destrucción dentro de las células del hospedador infectado, así como podría contribuir a la persistencia del parásito en el estado crónico de la infección.

8.6.- Aspectos autoinmunes en la enfermedad de Chagas.

El origen de la patología autoinmune en la enfermedad de Chagas es aún desconocido. Dos elementos están posiblemente involucrados. Primeramente, una fuerte respuesta policlonal de linfocitos dependiente de células T cooperadoras durante las fases aguda y crónica de la infección podría desencadenar una expansión descontrolada de clones autorreactivos (D'Imperio Lima, 1985,1986; Minoprio, 1987,1988). Y segundo, la presencia de muchos antígenos que presentan reacción cruzada entre el

parásito y el hospedador podría desencadenar autoinmunidad (Hudson, 1985 y Eisen, 1990).

La cardiomiopatía chagásica crónica no parece estar asociada a parasitemia, lo cual refuerza la teoría de que la patogénesis de la enfermedad es de origen autoinmune. Inicialmente se pensó en una autoinmunidad humoral. Dicha teoría se basó originariamente en la existencia de anticuerpos que reaccionaban con estructuras intersticiales y vasculares en pacientes con enfermedad cardíaca chagásica. Sin embargo, este concepto fue modificado, para incluir una autoinmunidad celular, ya que linfocitos CD4⁺ de pacientes chagásicos destruían células cardíacas normales. Además, células del bazo, de ratones infectados, eran citotóxicas para el músculo cardíaco neonatal. Las células T CD4⁺, de ratones infectados crónicamente, proliferan como respuesta a miosina (Gea S., 1993). Se han descrito numerosos autoanticuerpos con reactividad cruzada entre *T. cruzi* y el hospedador. Así, se ha encontrado en el suero de pacientes con enfermedad muscular primaria o con cardiomiopatía chagásica un anticuerpo con reactividad cruzada a un polipéptido de *T. cruzi* de 25 KDa. También se han descrito anticuerpos con reactividad cruzada contra *T. cruzi* y el retículo sarcoplásmico muscular. Se han descrito una gran variedad de anticuerpos cocirculantes con reactividad cruzada. Por ejemplo, Szarfman y col (1987) han descrito anticuerpos antilaminina y Mesri y col (1987) han encontrado anticuerpos anti proteínas ribosomales (P) en pacientes con enfermedad de Chagas. Todo ello sugiere que los autoanticuerpos y las células T CD4⁺ juegan un papel importante en la patología.

La existencia de muchos anticuerpos con reactividad cruzada en los sueros de pacientes chagásicos y animales infectados, parece indicar que el parásito utiliza el mimetismo antigénico para protegerse del sistema inmune del hospedador. De manera que un parásito circulante, recubierto con antígenos similares al hospedador, sería débilmente reconocido. Aunque esto constituye un modelo muy atractivo, resulta bastante simple si se tiene en cuenta la complejidad, tanto de *T. cruzi* como del sistema inmune, ya que el parásito posee un amplio espectro de hospedadores, siendo capaz de infectar a muchos, sino a todos, los vertebrados. Sin embargo, la patología asociada en cada caso es variable. Es poco probable que todos los hospedadores posean antígenos idénticos, y debido a que la

naturaleza de dichos antígenos no puede anticiparse, *T. cruzi* no puede estar preparado para todo tipo de hospedador (revisado en Eisen, 1991).

El examen de varios antígenos con reactividad cruzada que han sido caracterizados en *T. cruzi* y en mamíferos permite clasificarlos en tres grupos: a) los antígenos no han sido bien definidos; b) son moléculas sencillas; c) son epítomos de ciertas proteínas. Se ha demostrado que anticuerpos con reactividad cruzada contra laminina reconocen carbohidratos en lugar de su esqueleto polipeptídico (Szarfman, 1982 y Towbin, 1987). Se ha descrito que una proteína flagelar del parásito, de 160 kDa, presenta reactividad cruzada con una proteína de 49kDa del sistema nervioso de mamíferos (Van Voorhis W., 1989). Estudios posteriores demuestran que la región de reactividad cruzada entre las dos proteínas es de sólo 7-9 aminoácidos (Van Voorhis W., 1990).

De los antígenos con reactividad cruzada de *T. cruzi* que han sido caracterizados, los glicolípidos son probablemente los que juegan un papel más obvio en mimetismo molecular. Así, se han caracterizado amplias familias de sulfátidos y de glicolípidos, que contienen galactosa, ricos en α -OH, que están en la superficie del parásito y que están ampliamente distribuidos entre mamíferos (Eisen, 1990; Petry 1988 y 1989). Estos fueron identificados al ser reconocidos por sueros de animales infectados y además tales glicolípidos no son normalmente muy antigénicos. Es más probable que su antigenicidad en animales infectados por *T. cruzi* sea resultado de perturbaciones en el sistema inmune del hospedador.

Otra hipótesis consiste en que *T. cruzi* no utiliza el mimetismo como un medio para eludir el sistema inmune, sino que, por el contrario, sus efectos sobre el sistema inmune son tales que moléculas normalmente neutras son reconocidas. Es posible que la activación policlonal producida por el parásito sea responsable del funcionamiento defectuoso en la autotolerancia, y que la aparición de mimetismo sea resultado de dicho funcionamiento defectuoso. Se ha propuesto que los efectos combinados de la activación policlonal y la presencia crónica de antígenos con reactividad cruzada pueden dar lugar a la patología autoinmune de la enfermedad de Chagas (Eisen, 1990).

Otro tipo de mimetismo molecular, denominado mimetismo funcional, parece tener un papel en el desarrollo de *T. cruzi* en mamíferos en

beneficio del parásito. Existe un número creciente de proteínas de *T. cruzi* cuyas funciones mimetizan aquellas de proteínas normales del hospedador, aunque sólo algunas de ellas han sido identificadas y caracterizadas.

T. cruzi se localiza en las vacuolas de la célula infectada, pero su replicación tiene lugar en el citosol (Brenner, 1973). Los mecanismos implicados en este proceso no han sido determinados. Estudios preliminares indicaron que en mamíferos los parásitos liberaban una población heterogénea de proteínas y factores al medio circundante, y muchos de estos poseen un potencial para alterar las funciones normales del hospedador: TC TOX, CCI y sialidasa son liberadas por la forma infectiva del parásito. Las tres parecen estar reguladas durante el desarrollo del mismo. Al contrario que las proteínas funcionales análogas del hospedador, la expresión y liberación controlada de dichas proteínas, permite al parásito utilizarlas en beneficio propio y someter al hospedador. Debido a que las proteínas del parásito son funcionalmente análogas a las del hospedador es posible predecir motivos estructurales conservados entre ambos. Estas regiones estructurales conservadas pueden contribuir a la aparición de autoantígenos durante la infección por *T. cruzi*.

TC TOX, identificada como una proteína de 75 kDa con actividad hemolisina, presenta reactividad cruzada con la forma reducida y alquilada de C9 humano. Como C9, TC TOX produce grandes poros en la membrana de una gran variedad de tipos celulares. Su actividad es máxima a pH 5.5 lo que sugiere un papel en la huida del parásito de vacuolas acídicas (Andrews 1990)

CCI es una proteína de 87 kDa que interfiere en la formación y acelera la degradación de la convertasa C3 (Joiner, 1988). Dicha función es análoga a la de DAF (decay accelerating factor), una proteína de mamíferos que previene la destrucción autóloga de células por complemento (Nicholson-Weller A., 1982 y Medof M.E., 1984). Las observaciones iniciales que llevaron a la caracterización de CCI destacaban que los parásitos del estadio mamífero (tripomastigotes) eran resistentes a lisis por complemento, mientras que los epimastigotes eran sensibles. La gp72 de superficie de epimastigotes une más C3 que la gp72 de tripomastigotes metacíclicos. Esto ocurre porque C3 de tripomastigotes no se une al factor B de amplificación (Joiner, 1986), al interferir un complejo de glicoproteí-

nas secretado por ellos (Joiner, 1988). Además, CCI se puede inmunoprecipitar de suero de pacientes chagásicos.

La neuraminidasa/transialidasa de *T. cruzi*, descrita inicialmente por Pereira (1983), se expresa en tripomastigotes metacíclicos y se libera de la superficie del parásito (Libby, 1986). Dicho enzima esta funcionalmente relacionado con las sialidasas del hospedador. Los estudios sobre la sialidasa son abundantes y describen una familia de proteínas relacionadas con el denominado "major 85 kDa surface antigen" (Peterson D.S., 1986; Takel G.B., 1989; Kahn S., 1990; revisado en Cross, 1993). El análisis de las secuencias de ADN revela una gran homología con las sialidasas bacterianas (Kahn S., 1991). Además dicho análisis de secuencias muestra que la sialidasa de *T. cruzi* es una familia heterogénea de sialidasas (Kahn S., 1991; 1990). Esto sugiere que el parásito produce sialidasas con especificidades variables que pueden, por consiguiente, jugar un papel en el amplio espectro de hospedadores del parásito. Su secuencia también revela la presencia de repeticiones ricas en cisteína en su amino terminal. Dichas repeticiones muestran un 30% de homología con la neuraminidasa de *Clostridium perfringens*, tres motivos altamente conservados en neuraminidasas virales y bacterianas, y dos segmentos similares a las repeticiones YWTD presentes en el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Este dominio está relacionado mediante una estructura característica del receptor de tipo III para fibronectina al LTR (long terminal repeat). La secuencia LTR consta de 44 copias de repeticiones de 12 aminoácidos ricos en serina, treonina y prolina, con 117 sitios potenciales de fosforilación. En el extremo C-terminal hay 35 aminoácidos hidrofóbicos que podrían mediar el anclaje de neuraminidasa a membranas vía GPI. Estos datos sugieren que las proteínas de la familia neuraminidasa/transialidasa de *T. cruzi* podrían tener funciones adicionales a las de su actividad catalítica, como interacciones entre proteínas, y podrían jugar un papel en la unión de *T. cruzi* a las células del hospedador (Pereira M. E., 1991).

Recientemente, hemos aislado un autoantígeno chagásico linfocitario humano (Cha-912) que presenta un 52% de homología con la repetición de doce aminoácidos del C-terminal de cierta sialidasa TCSAPA ("shed acute phase antigen") de *T. cruzi*. Anticuerpos contra TCSAPA están

presentes en todos los pacientes chagásicos y en un 60% de ellos se hallan presentes anticuerpos que dan reacción cruzada con Cha-912.

También se ha descrito que el C-terminal de la proteína asociada al flagelo de *T. cruzi*, denominada FL-160-1, posee un epítipo, definido por 12 aminoácidos (TPQRKTTEDRPQ), que mimetiza un antígeno de 48 kDa presente en tejido nervioso, en especial en el plexo mesentérico del intestino, nervio ciático, y un subgrupo de células del sistema nervioso central. También, se observó que FL-160 constituye una familia de genes altamente relacionados. Se conoce la secuencia de aminoácidos completa de FL-160-2 y se dispone de secuencias parciales de otros tres miembros de la familia. Estos presentan entre ellos aproximadamente un 80% de homología, pero ésta es del 100% en el dodecapéptido del C-terminal responsable del mimetismo molecular. Dicho dodecapéptido presenta homología con sialidasas bacterianas (27%), miembros de la familia de genes SA85 (25-30%) y la familia de las neuraminidasa/transialidasas/SAPA (25-30%). Anticuerpos contra los extremos terminales amino y carboxilo de FL-160 reconocen el antígeno en membrana y bolsillo flagelar de *T. cruzi*, pero muestran un patrón distinto en epineurio y nervio ciático. Esto sugiere que existen al menos dos epítipos distintos en FL-160 que mimetizan tejidos nerviosos (Wesley, 1993).

Recientemente también se ha encontrado que un péptido de trece aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína ribosomal de bajo peso molecular de *T. cruzi* genera anticuerpos que presentan reacción cruzada con sus homólogos humanos (Bonfa, 1993; Mesri, E.A., 1990; Levitus G. 1991; Levin M.E., 1993).

Otra proteína ribosomal del parásito, denominada PO, con un peso molecular de 38 kDa, es también antigénica en la infección humana por *T. cruzi* (Schijman A.G., 1992; Skeiky Y.A.W., 1992). Dicha proteína posee largos fragmentos de su secuencia cargados negativamente que se han relacionado con los autoantígenos de LES (Brendel, 1991) y con la producción de autoantígenos polireactivos tras la infección experimental de *T. cruzi* (Kahn S., 1991)

Por otra parte, anticuerpos contra el receptor β adrenérgico (Magnusson 1990) y el receptor de acetilcolina M2 (Fu, 1993) son detectados en pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática, una forma similar a la

cardiomiopatía chagásica. Estos anticuerpos podrían estar dirigidos contra las regiones de carga negativa del segundo bucle extracelular de dichos receptores (Fu M.L.X., 1994). Además se han observado autoanticuerpos activamente funcionales contra el receptor β adrenérgico (Borda E. S., 1984; Rosenbaum M.B., 1994) y el receptor muscarínico M2 (Goin J.C., 1994) en pacientes de la enfermedad de Chagas, cuyos epítomos se localizan en la misma región del receptor. Es más, un péptido correspondiente al segundo bucle extracelular del receptor β adrenérgico fue utilizado para el screening de la presencia de anticuerpos anti receptor β adrenérgico y para su purificación en columna de afinidad a partir de los sueros chagásicos. La comparación de las secuencias protéicas muestra la presencia de un pentapéptido altamente homólogo entre PO de *T. cruzi* (AESEE) y el receptor β adrenérgico humano (AESDE) que parece ser el responsable de la inducción de autoanticuerpos contra el receptor β adrenérgico (Ferrari I., 1995). Estos anticuerpos tienen actividad cronotrópica, con lo cual podrían explicar muy bien las alteraciones miocárdicas en Chagas sin necesidad de implicar ningún daño tisular.

En resumen, existen numerosas enfermedades infecciosas que dan lugar a fenómenos autoinmunes, por varios mecanismos. Entre ellas, la enfermedad de Chagas es aquella en la que está más claro el fenómeno autoinmune como causa de la patología, y en el que éste es debido en gran parte a un mimetismo molecular. Por otro lado, cada vez surgen más evidencias que sugieren la posible implicación de un agente infeccioso como causa detonante del proceso autoinmune en las clásicas enfermedades autoinmunes.

AGRADECIMIENTOS:

Los trabajos de los autores reflejados en este artículo han sido financiados por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Comunidad Autónoma de Madrid, Fondo de Investigaciones Sanitarias, Comunidad Económica Europea y Fundación Ramón Areces.

9.- BIBLIOGRAFÍA

- (1) ABU-SHAKRA M. Y SHOENFELD Y. (1991) *Autoimmunity* 9: 337-344.
- (2) AMOILS B., MORRISON M.C., WADEE A.A. y col (1986) *Clin Exp Immunol* 66:88-94.
- (3) ANDREWS NW., ABRAMS C. K. Y COL (1990) *Cell* 61:1277-1287.
- (4) BEN YOUNES-CHENNOUFI A., SAID G. Y COL (1988) *Trans R Soc Tro Med Hyg* 82: 84-89.
- (5) BONAY P. Y FRESNO M. (1995) *J Biol Chem* 270: 11062-11070.
- (6) BONFA E., VIANA V. S. T. Y COL (1993) *J Immunol* 150: 3917-1923.
- (7) BORDA E. S., PASCUAL P. M. Y COL (1984) *Clin Exp Immunol* 57: 679-686.
- (8) BRENNER Z.A. (1973) *Annu. Rev. Microbiol.* 27: 347-382.
- (9) BRENNER Z.A. (1980) *Adv Parasitol* 247-292.
- (10) BROSTOFF J., SCADING G.K., MALE D. Y COL (1991) *Clinical Immunology Gower Med. Pub.*
- (11) CAZZULO J. J. (1994) *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, Vol. 26, Nº 2, 157-165.
- (12) CROSS G. A. Y TAKLE G. B. (1993) *Annu Rev Microbiol* 47: 385-411.
- (13) DE CASTRO S.L. (1993) *Acta Tropica*, 53, 83-98.
- (14) D'IMPERIO LIMA MR., COUTINHO A. Y COL (1985) *Eur J Immunol* 15:201-203.
- (15) D'IMPERIO LIMA MR., EISEN H. Y COL (1985) *J Immunol* 137: 353-358.
- (16) EISEN H., PETRY K. Y VAN VOORHIS (1990) New York Academic Press 91-103
- (17) EISEN H. (1991) *Curr Op Immunol* 3: 507-510.
- (18) FERNÁNDEZ M. A., MUÑOZ-FERNÁNDEZ M. A. Y FRESNO M. (1993a) en "Parasitología Molecular" (López M. C. y Rivas L., eds) pp 247-270 (C.S.I.C., Madrid)
- (19) FERNÁNDEZ M. A., MUÑOZ-FERNÁNDEZ M. A. Y FRESNO M. (1993b) *Eur J Immunol* 23: 552-557.
- (20) FERRARI I., LEVIN M. J. Y COL (1995) *J Exp Med* 182: 59-65.
- (21) FOX R.I., LUPPI M., PISA P. Y COL (1992) *J Rheumatol Suppl* 32: 18-24
- (22) FRAINDENRAICH D., PEÑA C., ISOLA E. L. Y COL (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol.90, pp. 10140-10144.
- (23) FRESNO M. (1996) *Anales Acad Farm* (en prensa).
- (24) FU M. L. X., MAGNUSSON Y. Y COL (1993) *J Clin Invest* 91: 1964-1968.
- (25) FU M. L. X., HOEBEKE J. Y COL (1994) *Clin Immunol Immunopatol* 72:15-20.
- (26) GOING J. C., BORDA E. Y COL (1994) *J Auton Nerv Syst* 47:45-52.
- (27) GEA S., ORDONEZ P. Y COL (1993) *Am J Trop Med Hyg* 49:581-588.
- (28) GOLDING H., ROBNEY F. A. Y COL (1988) *J Exp Med* 167: 914-923.
- (29) HALL B. F. (1993) *Semin Cell Biol* 4: 323-333.
- (30) HANAFUSA T., PUJOL-BORRELL R., CHIORATO L. Y COL (1983) *Lancet* 2: 1111-1115.
- (31) HERNÁNDEZ-MUNAIN C., FERNÁNDEZ M. A. Y FRESNO M. (1991) *Infect Immun* 59: 1409-1416.

- (32) HERNÁNDEZ-MUNAIN C., DE DIEGO J. L. Y COL (1992) *J Exp Med* 175: 1473-1482.
- (33) HERSKOWITZ A., AHMED-AUSARI A., NEWMAN D.A. Y COL (1990) *J Am Coll Cardiol* 15:624-632.
- (34) HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M. (1987) *Eur J Immunol* 17: 1027-1033.
- (35) HUDSON L. (1985) *Parasitol Today* 1: 6-9.
- (36) JAYAWARDENA A.N. (1981) *Parasitic diseases vol 1: The Immunology*. New York: Marcel Dekker, 1981; 85-136
- (37) JOINER K., SHER A. Y COL (1986) *Proc Nat Acad Sci USA* 83: 6593-6597.
- (38) JOINER KA., DA SILVA W. D. Y COL (1988) *J Biol Chem* 263: 11327-11335.
- (39) KHAN S., VAN VOORHIS W. C. Y EUSEN H. (1990) *J Exp Med* 172: 589-597.
- (40) KAHN S. (1991) *Proc Natl Acad Sci* 88: 4481-4485.
- (41) KAHN S., KAHN J. Y EISEN H. (1992) *Eur J Immunol* 22:3051-3056.
- (42) KIERSZENBAUM, H. MEJIA LOPEZ Y SZTEIN M. B. (1994) *Immunology*, 81, 462-467.
- (43) KOTB M. (1995) *Clin Immunol Immunopatol* 74: 10-22
- (44) KOBERLE F. (1968) *Adv Parasitol* 6:63-116.
- (45) LANZAVECCHIA A. (1994) *J Exp Med* 181: 1945-1948.
- (46) LEVIN M. J., KAPLAN D. Y COL (1993) *Immunol Med Microbiol* 7:205-210.
- (47) LEVITUS G., HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ Y COL (1991) *Clin Exp Immunol* 85: 413-417.
- (48) LIBBY P., ALROY J. Y PEREIRA M. E. A. (1986) *J Clin Invest* 77:127-135.
- (49) LOPES M., DA VEIGA V.F., SANTOS A.R. Y COL (1995) *The Journal of Immunology*, 154: 744-752.
- (50) MACDONALD H.R., Y ACHA-ORBEA H. (1994) *Nature* 371: 283.
- (51) MAGNUSSON Y., MARULLO S. Y COL (1990) *J Clin Invest* 91:1964-1968.
- (52) MANSFIELD J. M. (1981) *Parasitic diseases vol 1: The Immunology*. New York: Marcel Dekker, 1981; 167-226
- (53) MEDOF M. E., KINOSHITA T. Y NUSSENSWEIG V. (1984) *J Exp Med* 160: 1558-1578.
- (54) MESRI E. A., LEVITUS G. Y COL (1987) *J Clin Microbiol* 28: 1219-1224.
- (55) METZE K., Y MACIEL J A. JR (1993) *Neurology* 43, 447-448.
- (56) MIERCIO E., PEREIRA A Y MEJIA S. A. (1991) *J Exp Med* 174: 179-191.
- (57) MINOPRIO P., EISEN H., FORNI L. Y COL (1986) *Scand. J. Immunol.*, 24, 661.
- (58) MINOPRIO P., COUTINHO A., JOSKOWICZ M. Y COL (1986) *Scand. J. Immunol.*, 24, 669.
- (59) MINOPRIO P. (1987) *J Immunol* 139:545-550.
- (60) MINOPRIO P. (1988) *Scand J Immunol* 28:553-561.
- (61) MINOPRIO P., ITOHARA S. Y COL (1989) *Immunol Rev* 112: 183-207.
- (62) MUÑOZ-FERNÁNDEZ M. A., FERNÁNDEZ M.A Y FRESNO M. (1992) *Eur J Immunol* 22:301-307.
- (63) MURPHY P. M. (1993) *Cell* 72: 823-826.
- (64) NICHOLSON-WELLER A., BURGE J. Y COL (1982) *J Immunol* 129: 184-189

- (65) NICKELL S. P., KEANE M. Y COL (1993) *Infect Immun* 61: 3250-3258.
- (66) NYGARD N.R Y SCHWARTZ B.D. (1993) *Adv. Int. Med.* 38: 337-359.
- (67) OLDSTONE M. B. A. (1987) *Cell* 50: 819.
- (68) ORTEGA-BARRIA E. Y PEREIRA M. E. A. (1991) *Cell* 67: 411-421.
- (69) PAUL W. E. (1993) *Fundamental Immunology* 3 Ed Raven Press New York.
- (70) PANINA-BORDIGNON P., LANG R. Y COL (1995) *J Exp Med* 181: 1923-1927.
- (71) PEREIRA M. E. A. (1983) *Science* 219: 1444-1446.
- (72) PETERSON D. S., WRIGHTSMAN R. A. Y MANNINGS J. E. (1986) *Nature* 322:566-568.
- (73) PETRY K., NUDELMAN E. Y COL (1988) *Mol Biochem Parasitol* 30:113-122.
- (74) PETRY K. Y EISEN H. (1989) *Parasitol Today* 5: 111-116.
- (75) REED S.G., BROWNELL C. E., RUSSO D. M. Y COL (1994) *The Journal of Immunology*; 153: 3135-3140.
- (76) REZENDE J.M. (1984) *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79:97-106.
- (77) ROSENBAUM M. B., CHIALE P. A. Y COL (1994) *J Cardiovasc Electrophysiol* 5:367-375.
- (78) ROUDIER J., PETERSEN J., RHODES G.H. Y COL (1989) *Proc Nat Acad Sci* 86: 5104-5108.
- (79) RUIZ R. DE C., RIGONI V. L. Y COL (1993) *Parasite Immunol* 15: 121-125.
- (80) SAID G. JOSKOWICZ M. Y COL (1985) *Annu Neurol* 18: 676-683.
- (81) SALEMI S., CAPOROSSI A. P. Y COL (1995) *J Exp Med* 181: 2253-2257.
- (82) SCHAUER R., REUTER G. Y COL (1983) *Hoppe Seyler's Z. Physiol Chem* 364:1053-1057.
- (83) SCHENKMAN S., ANDREWS N. W. Y COL (1988) *Cell* 55: 157-165.
- (84) SCHENKMAN S., ROBBINS E. S. Y COL (1991) *Cell* 65:1117-1125.
- (85) SCHIJMAN A. G., LEVITUS G. Y LEVIN M. J. (1992) *Immunol Lett* 33:15-20.
- (86) SCOTT P. Y KAUFFMANN S. H. E. (1991) *Immunol Today* 12: 346-348.
- (87) SILVA J. S., MORRISEY P. J. Y COL (1992) *J Exp Med* 175: 169-174.
- (88) SKEIKY Y. A. W., BENSON D. R. Y COL (1991) *Proc Nat Acad Sci USA* 88:1536-1540.
- (89) SOONG L. Y TARLETON R. L. (1994) *Eur. J. Immunol.* 1994. 24:16-23.
- (90) STEINMAN L. (1995) *Cell* 80:7-10.
- (91) SYIEGLITZ H., FOSMIRE S. Y LIPSKY P. (1989) *Arthritis Rheum* 32: 937-946.
- (92) SZARFMAN A. (1982) *J Exp Med* 155:1161-1171.
- (93) SZARFMAN A., TERRANOVA V. P. Y COL (1987) *J Exp Med* 155:1161-1171.
- (94) TAKLE G. B., YOUNG A. Y COL (1989) *Mol Biochem Parasitol* 32: 57-64.
- (95) TANOWITZ H.B., KIRCHHOFF L.V., SIMON D. Y COL (1992) *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 5, Nº4, p: 400-419.
- (96) TARLETON R. L. (1990) *J Immunol* 144: 717-724.
- (97) TIAN J., LEHMAN P. V. Y KAUFFMAN D. L. (1994) *J Exp Med* 180: 1979-1984.
- (98) TOWBIN H. (1987) *J Exp Med* 166: 419-432.
- (99) TRÖSTER H., METZGER T. E. Y COL (1994) *J Exp Med* 180:2059-2067.
- (100) VAN VOORHIS W. Y HEISEN H. (1989) *J Exp Med* 169:641-652.

AUTOINMUNIDAD EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

- (101) VAN VOORHIS W.SCHLEKEWY L. Y TRONG H. L. (1991) *Proc Natl Acad Sci* 88: 5993-5997.
- (102) VIEIRA M. C. F., DE CARVALHO T. U. Y SOUZA W. (1994) *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 203, N°2, pages 967-971.
- (103) WEIDANZ W.P. (1982) *Br Med Bull* 38: 167-172
- (104) WESLEY C., VAN VOORHIS W. C. Y COL (1993) *J Exp Med* 178: 681-694.
- (105) WUCHERPENNING K. W. Y STROMINGER J. L. (1995) *Cell* 80:695-705.

La esclerosis múltiple, 130 años después

por

JAVIER GONZALO OCEJO VINYALS Y JESÚS MERINO PÉREZ
*S. Immunología.- Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.-
Santander*

ÍNDICE

- 1.- INTRODUCCIÓN
- 2.- DEFINICIÓN, HISTORIA Y CONSIDERACIONES GENERALES
- 3.- EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOPATOGÉNICA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE
 - 3.1.- **Incidencia, prevalencia y distribución**
 - 3.2.- **Hipótesis etiológicas**
 - 3.3.- **Estructura y función de la mielina en el sistema nervioso central**
 - 3.4.- **Factores genéticos versus factores ambientales**
 - 3.5.- **Mecanismos inmunológicos en la EM**
 - 3.5.1.- *Mecanismos autoinmunes*
 - 3.5.2.- *Autoantígenos*
 - 3.6.- **Proteínas de estrés y esclerosis múltiple**
 - 3.7.- **La encefalomiелitis alérgica experimental (EAE)**
- 4.- ASPECTOS CLÍNICOS DE LA EM
- 5.- MÉTODOS DIAGNÓSTICOS
 - 5.1.- **Hallazgos neurorradiológicos**
 - 5.2.- **Hallazgos inmunológicos**
- 6.- TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE
 - 6.1.- **El interferón-beta-1b (IFN-β1b) en el tratamiento de la EM**
 - 6.2.- **Tratamiento de la EM con copolímero 1 (COP-1)**
 - 6.3.- **Tratamiento de las enfermedades autoinmunes órgano-específicas mediante administración oral de autoantígenos**
 - 6.4.- **Otras perspectivas futuras en el tratamiento de la EM.**
 - 6.4.1.- *Limitación del daño neurológico*
 - 6.4.2.- *Estímulo de la remielinización*
 - 6.4.3.- *Implantes gliales*
 - 6.4.4.- *Prevención de la EM mediante terapia génica*
- 7.- BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN

La desmielinización primaria en el sistema nervioso central (SNC) es el resultado de un daño en la vaina de mielina o en la oligodendroglía y puede ser producida por una variedad de mecanismos, que incluyen alteraciones metabólicas, tóxicos, infecciones y fenómenos autoinmunes. La esclerosis múltiple (EM), definida en 1966 por Vulpian, es la enfermedad desmielinizante que con mayor frecuencia afecta al SNC. Aunque la etiología de la EM no está aun completamente esclarecida, existen datos que señalan un papel relevante de factores genéticos y ambientales en la patogenia de la enfermedad. La hipótesis etiológica más aceptada actualmente implica una acción combinada de agentes infecciosos, fundamentalmente víricos, y mecanismos autoinmunes, en el contexto de una predisposición genética, aparentemente de tipo poligénico. Aunque existe un amplio conocimiento de los mecanismos inmunológicos implicados en la patogenia y fisiopatología de la enfermedad, aún no se dispone de un tratamiento eficaz que consiga frenar la evolución del proceso.

En el presente capítulo, se comentan aspectos de la historia, epidemiología y etiopatogenia de esta enfermedad, centrandó la exposición fundamentalmente en los aspectos inmunológicos. Se mencionan brevemente las características clínicas y pruebas diagnósticas de la EM, terminando con algunas consideraciones sobre la terapéutica actual y futuras perspectivas terapéuticas.

2. DEFINICIÓN, HISTORIA Y CONSIDERACIONES GENERALES

La EM, también llamada esclerosis en placas, esclerosis insular o esclerosis diseminada, es por muchas razones una de las enfermedades más características que afectan al sistema nervioso. Por un lado, es una de las alteraciones neurológicas "primarias" de mayor prevalencia. Por el otro, afecta normalmente a adultos jóvenes, en los que puede seguir diferentes tipos de evolución clínica, siendo capaz de originar morbilidad e incapacidad severas. Dadas las grandes incógnitas que existen sobre su

etiología, no se dispone aún de un tratamiento específico.

La enfermedad puede afectar a varias regiones del sistema nervioso, como la médula espinal, el tronco encefálico, el cerebro, el cerebelo y los nervios ópticos; los nervios periféricos se ven raramente afectados. En los estudios anatomopatológicos es característica la presencia de numerosas lesiones, ampliamente distribuidas a través del eje cerebroespinal, conocidas como placas. Una de las características más importantes de estas placas es la pérdida de la mielina y de las células de la oligodendroglía. Es por ello, que la EM se ha clasificado como enfermedad desmielinizante (Schumacher 1962), aunque no debe olvidarse que la desmielinización dentro del sistema nervioso central puede ser el resultado de diferentes factores etiológicos (Korey 1959, Rose and Pearson 1963).

La presencia de estos focos de desmielinización diseminados a través del sistema nervioso central da lugar a múltiples y diferentes síntomas y signos clínicos de disfunción nerviosa, con un patrón evolutivo variable, bien en forma de exacerbaciones y remisiones, o siguiendo un curso progresivo sin recuperación de la lesión tras un episodio de crisis.

Como ocurre con otras muchas enfermedades, es difícil asegurar quién fue el autor de la primera descripción de la sintomatología clínica o de la naturaleza patológica de la EM. La mayoría de los autores han atribuido a Cruveilhier (1829 y 1842) y Carswell (1838) las primeras descripciones clínicas y patológicas, cuyos relatos fueron efectuados casi simultáneamente en el año 1835. Sin embargo, pueden haber existido con anterioridad descripciones aisladas de la enfermedad. Charcot, en 1868, fue el primero en establecer una descripción detallada de las manifestaciones clínicas de la EM, correlacionándolas con las alteraciones anatomopatológicas de la enfermedad.

La primera vez que aparece el término de "esclerosis múltiple" en la literatura médica es probablemente en la presentación de Vulpian, el 9 de mayo de 1866, ante la Société Médicale des Hôpitaux. No obstante, aunque Vulpian fué el autor del artículo y el responsable de la discusión, la mayoría de los casos clínicos fueron presentados por Charcot. A finales del siglo XIX la enfermedad ya era bien conocida en la literatura médica internacional, en lo referente a sus manifestaciones clínicas, lesiones

anatómicas y prevalencia

Sin embargo las teorías etiopatogénicas y las tendencias terapéuticas continuaron siendo un tema controvertido (Brain 1930, Reese 1952, Lehoczky 1957, Scheinberg y Korey 1962). Básicamente, estas teorías se dividen entre los que postularon un mecanismo tóxico, los que invocaron alteraciones metabólicas o los que trataron de relacionarla con la carga hereditaria, aunque la mayoría de las hipótesis etiopatogénicas han involucrado una etiología infecciosa. Charcot fué el primero en asociar a la EM con un antecedente de enfermedad aguda y enumeró casos que se habían desarrollado siguiendo episodios de fiebres tifoideas, cólera y viruela. También apuntó como posibles agentes etiológicos, la exposición al frío y los factores emocionales (desgracias personales, shock y vejaciones) señalando la escasa probabilidad de que este proceso tuviera un componente hereditario. Oppenheim, en 1887, fue el primero en sugerir que la enfermedad podría ser consecuencia del envenenamiento por metales (plomo, mercurio, zinc, manganeso, dióxido de carbono y cianuro), al igual que por toxinas endógenas relacionadas con procesos infecciosos dentales y amigdalares. En 1906 Marburg había sugerido la teoría de que la enfermedad estaba asociada con la difusión de una toxina mielínolítica circulante. Esta teoría fue de nuevo postulada por Brickner en 1931, cuando demostró la degeneración de las vainas de mielina en la médula espinal de ratas tratadas con plasma de pacientes con EM. Otros investigadores han sugerido una relación con la deficiencia de cobalto, cobre y vitaminas esenciales.

Gowers, en 1888, en la primera edición de su "Manual de Enfermedades del Sistema Nervioso" coincidía con Charcot en la mayor parte de sus apreciaciones. Strümpell (1896) y Muller (1904), postularon la existencia de una peculiaridad constitucional y sugirieron la teoría del "desarrollo glial displásico" como una tendencia endógena a la hiperplasia glial que llevaría, de forma secundaria, a una compresión de las vainas de mielina. Curtius, en 1933, llama la atención sobre la asociación familiar en algunos casos, así como la presencia de defectos neuropáticos o heredo-degenerativos en las familias de los pacientes con EM. Curschmann (1920) también había observado esta incidencia familiar. La proximidad

de las placas típicas de esta enfermedad a los vasos de pequeño calibre hizo postular un origen vascular para la EM. Putnam (1933) y Franklin y Brickner (1947) asociaron la producción de EM con trombosis venular y vasoespasma, respectivamente. Sin embargo, estas teorías fueron descartadas posteriormente.

La relación con procesos infecciosos fue observada desde un principio. Marie, en 1884, señaló que la enfermedad podría ser una complicación de numerosos procesos infecciosos agudos y crónicos. Sífilis y tuberculosis fueron dos de las infecciones relacionadas con la enfermedad (Dattner, 1937). Bullock, en 1913, y Gye, en 1921, consiguieron transmitir la enfermedad del hombre a conejos, mediante inyección subdural y subcutánea de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM. Ellos concluyeron que probablemente se trataba de un proceso infeccioso y que el germen causante se encontraría en el LCR. Kuhn y Steiner (1917) y más tarde Steiner (1928), consiguieron transmitir la enfermedad a conejos y cobayas, y posteriormente a monos mediante inyección de sangre y LCR de pacientes con EM. Las lesiones en los monos eran indistinguibles de las observadas en humanos. Además, observaron la presencia de espiroquetas en sangre de los animales afectados y posteriormente en cerebro, médula espinal y LCR de pacientes con la enfermedad. Este hallazgo no se confirmó por otros autores, lo cual hizo pensar en contaminación o artefactos en las preparaciones. A pesar de la falta de identificación de un organismo específico como agente responsable de la enfermedad, muchos investigadores pensaron que, tanto la distribución geográfica (aparición más frecuente en climas fríos, donde ciertos tipos de infecciones son más prevalentes) como la incidencia estacional, apoyaban un origen infeccioso en la EM. En los últimos años ha existido un interés creciente en los virus "lentos" o "latentes" (Gajdusek, 1965), habiendo sido valorada también la posible implicación de infecciones víricas comunes, sarampión y paperas (Sever y Kurtzke, 1969).

Hoy en día, no se conoce la causa de la enfermedad y se postulan dos teorías en el contexto de una susceptibilidad genética multifactorial, la infecciosa y la autoinmunitaria como posibles etiologías, sin que ambas sean excluyentes. Estos aspectos de la etiopatogenia de la enfermedad

serán tratados más adelante.

3. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOPATOGENIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

3.1. Incidencia, prevalencia y distribución

La valoración de la incidencia real de esta enfermedad en la población general encuentra una serie de dificultades. Una de ellas es debida a que la EM es una enfermedad infrecuente, y salvo que la población objeto de estudio sea muy amplia o estudiada durante largo tiempo, solamente aparecerán unos pocos casos. El segundo problema radica en la dificultad de establecer un diagnóstico definitivo en los primeros estadios de la enfermedad. Por lo tanto, la mayoría de autores utilizan la prevalencia como un índice de frecuencia de la enfermedad, a pesar de los inconvenientes que su uso conlleva (diferencias en la calidad sanitaria entre distintas áreas, duración de la enfermedad, cambios en la estructura de edades, diferencias en la determinación de casos, migraciones, etc.). Otros índices, como el de admisión hospitalaria y datos de mortalidad, son menos utilizados.

La prevalencia es normalmente menor de 100 casos por cada 100.000 habitantes, siendo de 1,9 a 3,1 veces más frecuente en las mujeres que en los hombres (Acheson, 1977; Skegg y cols., 1987; Hader y cols., 1988). El comienzo de la enfermedad es infrecuente antes de la pubertad, aunque posteriormente la incidencia aumenta rápidamente hasta alcanzar un pico alrededor de los 30 años, se mantiene durante la cuarta década y luego disminuye paulatinamente. Por encima de los 60 años la incidencia es insignificante.

Existen diferencias geográficas en la prevalencia de EM. Generalmente se ha utilizado la definición de áreas de alto riesgo (prevalencia igual o mayor de 30 casos/100.000 habitantes), riesgo medio (5-25 casos/100.000 habitantes) y riesgo bajo (menos de 5 casos/100.000 habitantes). Esta clasificación tiene sus inconvenientes, ya que dentro de un área de alto riesgo existen regiones con grandes diferencias en la frecuencia de EM. Hasta hace pocos años ha habido una simplificación, ampliamente aceptada por la comunidad científica, en cuanto a que la

distribución de la EM estaba relacionada con la latitud geográfica (Kurtzke, 1980). Hasta la década de los ochenta, se aceptaba la idea de que en los países situados entre 36 y 46° de latitud norte la prevalencia de la enfermedad era mucho menor que en países más septentrionales. Estudios actuales indican que la distribución de la EM es mucho más compleja de lo que se suponía en el pasado, no existiendo una clara relación con la latitud. Sin embargo, parece que la etnicidad es importante en la distribución de la enfermedad (Rosati, 1994). Las mayores tasas de prevalencia de EM se encuentran en Islandia, Escandinavia, Islas Británicas y en países colonizados en el pasado por los habitantes de estos países (Estados Unidos, Canadá, Australia y Nueva Zelanda). Este hecho ha llevado a algunos autores a pensar que los vikingos pueden haber sido el instrumento que diseminó la susceptibilidad genética de la enfermedad a estas y otras áreas del mundo (Poser, 1994). Los vikingos invadieron la mayor parte de los países europeos y se establecieron en Normandía, Sicilia y en el sur de Italia. Comerciaron con los pueblos árabes, y se adentraron en Persia, India y probablemente China. También emigraron hacia el este y se establecieron en Rusia. Bajo el nombre de Varangianos, formaron parte del imperio bizantino. Participaron en las cruzadas y constituyeron un regimiento del ejército mongol. La costumbre de capturar y conservar o vender a las mujeres y a los niños, lo cual era muy frecuente durante la Edad Media, al igual que el floreciente comercio de esclavos, pudieron ser factores importantes en la diseminación genética de la EM.

3.2. Hipótesis etiológicas

Como se comentó previamente, desde la descripción de la enfermedad se han postulado numerosas hipótesis como causa de la EM, a menudo influenciadas por las tendencias científicas de cada momento. Desde una visión eminentemente crítica, una hipótesis etiológica satisfactoria para la EM debería de explicar una serie de aspectos, como el modelo predominante de evolución recurrente-remitente de la enfermedad, las anomalías inmunológicas encontradas en el LCR, las anomalías recurrentes clínicas y subclínicas que aparecen en los estudios de

resonancia magnética nuclear (RMN), la clásica distribución en placas de la desmielinización en el SNC, la adicional patología difusa del SNC y la periflebitis retiniana (Allen, 1992). Una posible idea de conjunto puede ser la siguiente: la incidencia de la enfermedad, 15 a 20 veces mayor entre parientes inmediatos de pacientes con EM que en la población general, evidencia una predisposición genética (probablemente poligénica). Sobre esta base genética podrían influir una serie de factores ambientales, fundamentalmente infecciones virales, que en el contexto de una función alterada del sistema inmunológico provocarían el daño tisular característico de la enfermedad (Poser, 1986; Sayetta, 1986).

Para una mejor comprensión de estos mecanismos, de una forma esquemática podríamos clasificar las hipótesis etiológicas actuales de la siguiente forma:

- 1- Etiología infecciosa
- 2- Etiología autoinmune
- 3- Etiología combinada infecciosa-autoinmune
- 4- Etiología metabólica o tóxica

Ninguna de estas hipótesis ha sido completamente demostrada o descartada, contando cada una de ellas con una serie de evidencias a favor (Tabla 1).

Durante casi un siglo, diferentes microorganismos han sido considerados agentes etiológicos en la EM (Johnson, 1994). Sobre todos ellos destaca el posible papel etiopatogénico de los virus (Bebbe, 1967; Dean, 1971; Sibley, 1985; Andersen, 1993). Este concepto se apoya en las siguientes premisas:

1- La exposición a infecciones virales durante la infancia o pubertad está relacionada con el padecimiento de la enfermedad y puede precipitar exacerbaciones de la misma.

2- Infecciones experimentales en animales e infecciones naturales en humanos pueden, tras largos períodos de incubación, causar enfermedad neurológica con cursos remitentes y recurrentes y desmielinización.

3- Los pacientes con EM tienen alterada la respuesta inmunológica frente a virus a distintos niveles.

Tabla 1.
Hipótesis etiológicas en la esclerosis múltiple

Hipótesis	Evidencias a favor
INFECCIOSA	<ul style="list-style-type: none"> - Anticuerpos antivirales - Aislados de tejidos - Persistencia viral-antígeno - Persistencia viral-genoma - Disfunción inmune asociada a virus - Modelos experimentales inducidos por virus
AUTOINMUNE	<ul style="list-style-type: none"> - Incidencia aumentada de otras enfermedades autoinmunes - Predisposición genética, asociación con genes de MHC y TCR - Disregulación del sistema inmune - Autoantígenos identificables - Modelos experimentales animales y humanos de origen autoinmune - Tratamiento eficaz por inducción de tolerancia o por eliminación de linfocitos T autorreactivos
COMBINADA	<ul style="list-style-type: none"> - Evidencia de otras enfermedades desmielinizantes - Modelos experimentales inducidos por virus en los que ocurren reacciones autoinmunes

Como se ha comentado en el punto 2, estudios en pacientes y en una amplia variedad de modelos experimentales animales (tabla 2), han demostrado que ciertos virus, tras largos períodos de incubación y utilizando una amplia variedad de mecanismos, pueden causar enfermedades con un curso remitente y recurrente y con destrucción de la vaina de mielina. Diversos estudios en pacientes con EM, han revelado la presencia en el suero y líquido cefalorraquídeo de altos títulos de

anticuerpos contra varios virus, como el virus del sarampión entre otros (tabla 3). Así mismo, utilizando distintos métodos de cultivo, en pacientes con EM se ha logrado aislar una amplia gama de virus, según se expone en la tabla 4.

Tabla 2.
Virus implicados en modelos experimentales de enfermedades desmielinizantes agudas o crónicas

Estirpe	Virus y especie animal afectada
PAPOVAVIRUS	SV40 en macacos
PARAMYXOVIRUS	Virus del moquillo en perros
CORONAVIRUS	Virus de la hepatitis murina en cepas JHM
PICORNAVIRUS	Virus de Theiler en ratones Virus de encefalomiocarditis murina
TOGAVIRUS	Virus Semliki Forest murino Virus Ross River murino
RHABDOVIRUS	Chandipura
LENTIVIRUS	Virus Visna en ovejas Virus de artritis-encefalitis caprina

La hipótesis más aceptada actualmente es la combinada infecciosa-autoinmune. Tras procesos infecciosos, fundamentalmente víricos, se originarían una serie de anomalías en la respuesta del sistema inmunológico. El punto de partida puede ser la similitud existente entre ciertas proteínas virales y proteínas propias de la mielina (mimetismo antigénico) capaz de originar respuestas de reactividad cruzada entre estas proteínas y las proteínas de la mielina. Junto a esto, se precisaría la concurrencia de determinadas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), capaces de presentar estos antígenos *compartidos* a los

componentes específicos del sistema inmunitario, con mayor eficacia que otras moléculas MHC, no asociadas al padecimiento de la enfermedad. El resultado final sería el desencadenamiento de una reacción autoinmune que originaría la desmielinización de ciertas áreas del SNC. En este fenómeno de destrucción de la vaina de mielina participarían, en primer lugar, las células presentadoras de los antígenos de la mielina, los cuales serían reconocidos por linfocitos T CD4⁺ autorreactivos. Estas células serían capaces de estimular la respuesta citotóxica de las células CD8⁺ y de las propias células CD4⁺, así como la producción de anticuerpos frente a constituyentes de la mielina, que llevarían a cabo el proceso final de destrucción de la vaina de mielina.

Tabla 3.
Virus frente a los cuales se han encontrado títulos elevados de antifuerpos en pacientes con EM

LCR	SUERO
SARAMPION	SARAMPION
PARAINFLUENZA 1, 2, 3	PARAINFLUENZA 3
INFLUENZA A, B	INFLUENZA C
VARICELA	VARICELA
HERPES SIMPLE	HERPES SIMPLE
RUBEOLA	RUBEOLA
EPSTEIN-BARR	EPSTEIN-BARR
PAPERAS	
RESPIRATORIO SINCICIAL	
CORONAVIRUS	
ADENOVIRUS	
HTLV-1 (gag)	HTLV-1 (gag)
	HTLV-II
SIMIÁN VIRUS 5	

Tabla 4.
Virus identificados en pacientes con esclerosis múltiple

VIRUS	Método de aislamiento o de identificación
Virus de la rabia	Encefalitis en ratones inoculados con sangre o cerebro
Virus de la rabia	Cambios citopáticos en cultivo celular inoculado con homogeneizado cerebral
Agente del Scrapie	Desarrollo de scrapie en ovejas 16-21 meses tras inoculación con cerebro
Agente asociado a EM	Disminución en células PMN en ratones inoculados con tejido de EM
Virus Parainfluenza 1	Cultivos celulares de tejido cerebral de dos pacientes fusionados con otras células y recuperación del virus
Virus del Sarampión	Cambios citopáticos en células de riñón de mono inoculadas con un homogeneizado de biopsia cerebral
Simian virus 5	Formación de sincitios en cultivo de células MRC5 inoculadas con células de médula ósea de pacientes
CMV de chimpancé	Chimpancés neonatos inoculados con células cerebrales de pacientes que tres años más tarde desarrollaron un cuadro de parálisis
Coronavirus	Cerebros frescos inoculados en ratones y crecidos en cultivo producían virus
Virus semejante al de la neuropatía mielo-óptica subaguda	Cambios citopáticos en células MRC5 inoculadas con LCR
Flavivirus de la encefalitis Tick-borne	Sangre de dos pacientes inoculada intracerebralmente en ratones
HTLV-I	RNA identificado en linf. T de LCR
LM7 (retrovirus)	Identificado en líneas celulares de LCR
HSV-1	Aislado de LCR durante el primer brote
Herpesvirus-6	DNA aislado de placas desmielinizantes

3.3. Estructura y función de la mielina en el sistema nervioso central.

Un hecho central en la patogenia de la EM es el reconocimiento, por parte del sistema inmunológico, de antígenos lipídicos o proteicos específicos de la mielina, especialmente los derivados de la proteína básica de la mielina (PBM). La mielina es un sistema multilamelar de membranas proteolípídicas que envuelve los axones a lo largo de todo el SNC y de los nervios periféricos (revisado en Williams, 1993). El papel de la vaina de mielina es múltiple, actuando como un aislante eléctrico y a la vez controlando y aumentando la velocidad de la transmisión de la señal desde el "cuerpo" de la neurona hasta la unión sináptica, a lo largo del axón. Así mismo, favorece una serie de procesos dinámicos, que incluyen traducción de la señal, modificaciones post-traduccionales y metabolismo lipídico.

La mielinización del SNC comienza cuando las células oligodendrogliales dirigen extensiones de la membrana plasmática neuronal, de apariencia frágil, hacia los axones y proceden a envolver el cilindro axonal con un continuo enrollamiento de estas extensiones. Posteriormente, estas membranas se compactan desapareciendo el espacio citoplásmico. En el SNP, el proceso de mielinización se produce a partir de las células de Schwann.

La mielina deshidratada se compone en un 75-80% de lípidos y en un 20-25% de proteínas. Los lípidos más importantes son: colesterol, cerebrósido, fosfatidil-etanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, plasmalógenos, esfingomielina y gangliósidos. La fracción proteica consta fundamentalmente de proteína básica de mielina (PBM), proteolípido proteico o lipofilina (PLP), y glicoproteínas asociadas a la mielina o al oligodendrocito y mielina (GAM y GOM).

La PBM es una proteína extrínseca de membrana localizada en el citoplasma de la mielina. Está presente en varias isoformas (proteínas de diferente peso molecular, derivadas de un ajuste alternativo del RNA mensajero de la PBM). Estas isoformas tienen un peso molecular de 21,5, 20,2, 18,5 y 17,2 kDa, cuyas secuencias de aminoácidos son conocidas (Kamholz y col. 1986, Roth y col. 1987). La isoforma más frecuente en los seres humanos es la de 18,5 kDa. La PBM representa un 25-30% del

total de las proteínas de la mielina, contiene 170 aminoácidos y muestra un alto grado de conservación entre diferentes especies, principalmente en su mitad carboxilo-terminal. Además de la variedad de isoformas, existen una serie de microheterómeros o distintas formas químicas que se diferencian en su potencial catiónico, lo cual conduce a un distinto grado de fosforilación, distinta capacidad para estabilizar la multicapa de la mielina y un papel distinto en la traducción de la señal en la mielina. Procesos de fosforilación y metilación de diferentes residuos de la PBM parecen intervenir en interacciones entre proteínas y lípidos, los cuales juegan un importante papel en la formación de la mielina.

Estudios bioquímicos de la PBM, obtenida del cerebro de individuos con o sin EM, han demostrado que la PBM de sujetos con EM es frecuentemente menos catiónica y relativamente menos eficaz en su capacidad para unir lípidos que la procedente de individuos sin EM (Moscarello, 1986). Sin embargo, aunque ésta y otras observaciones podrían implicar alguna relación entre la naturaleza de la PBM y la actividad de la enfermedad, sería prematuro asumir que alteraciones primarias de la PBM pudieran representar un mecanismo desencadenante en la etiología de la EM. La actividad encefalitogénica de la PBM ha sido puesta en evidencia mediante el estudio de diferentes modelos experimentales en animales, en los cuales la inmunización con PBM o péptidos derivados de la misma consigue inducir una enfermedad desmielinizante, la encefalomielitis alérgica experimental (EAE), cuyas manifestaciones clínicas son superponibles a las observadas en la EM (Maugh, 1977). Este modelo experimental de EM ha sido el centro de una extensa investigación en los últimos años, con un énfasis particular en el desarrollo de estrategias terapéuticas encaminadas a suprimir la enfermedad. Los aspectos relacionados con estos modelos experimentales se abordarán posteriormente con mayor profundidad.

La lipofilina o proteínas proteolipídicas (PLP) comprenden casi un 50% del total de proteínas de la mielina. Estas proteínas promueven la aposición de las superficies extracelulares de la vaina de mielina y además intervienen en la regulación de los flujos de calcio. Su papel en la EM ha sido sugerido tras la inducción de encefalitis alérgica experimental (EAE)

al administrar lipofilina en animales de experimentación o por transferencia pasiva de linfocitos T sensibilizados frente a PLP (Yamamura, 1986; Trotter, 1987). Al igual que ocurre con la PBM, la PLP presenta varias isoformas, las cuales pueden tener diferentes funciones. La PLP une lípidos de forma primaria a través de interacciones con su lado hidrofóbico. La parte hidrofílica, cargada positivamente, puede también participar en interacciones electrostáticas con fosfolípidos. Igualmente, la fracción proteolipídica de la mielina se ha aislado junto con un pequeño porcentaje de ácidos grasos. Esta unión a ácidos grasos es un proceso dinámico que parece estar implicado en el mantenimiento y función de la mielina. Durante la formación de la vaina de mielina, la PLP puede participar en interacciones proteína-proteína, tales como la asociación específica entre PLP y PBM. Como se mencionó anteriormente, la actividad encefalitogénica de la PLP, tras inoculación a animales de experimentación, está asociada a una respuesta similar a la observada en la EAE inducida por PBM. Una comparación entre la secuencia de aminoácidos de la PLP y ciertas proteínas virales ha evidenciado varias similitudes entre su secuencia primaria y los virus de Epstein-Barr, influenza A, VIH y adenovirus (Shaw, 1986). De este modo, podría explicarse porqué la respuesta observada frente a la PLP en la EAE sería un reflejo de una respuesta autoinmune potencial, similar a la relación propuesta entre la PBM y varios virus infecciosos.

Otras proteínas, tales como GAM y GOM, han sido implicadas en funciones de reconocimiento del antígeno y adhesión intercelular. En virtud de la presencia de estas proteínas en el espacio extracelular, han sido propuestas como candidatas a servir de diana en los procesos de desmielinización inducida por anticuerpos (Edwards, 1989). GAM es una proteína de membrana altamente glicosilada. Su región extracelular tiene un dominio del tipo de las inmunoglobulinas, y una secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) característica de las moléculas de adhesión. GAM se expresa primariamente en regiones periaxoniales y se le atribuye una función en el reconocimiento y adhesión de los componentes de la oligodendroglía a los axones durante la formación de la mielina. También ha sido involucrada en fenómenos de desmielinización, al haberse demos-

trado la presencia de células productoras de anticuerpos anti-GAM en pacientes con EM (Baig, 1991). GOM está implicada en la extensión de la membrana de mielina, apareciendo también como una buena candidata a diana antigénica en la desmielinización inducida por anticuerpos (Kerlero, 1990).

Con respecto a los lípidos constituyentes de la mielina, numerosas investigaciones han señalado su posible papel patogénico, como potenciales autoantígenos, en los procesos de desmielinización (Hosein, 1984; Kasai, 1986) y se han encontrado variantes estructurales diferentes en tejido nervioso de pacientes con EM (Wood, 1984; Sourander, 1990).

En las áreas de tejido desmielinizando y en las zonas circundantes a estas placas se encuentran una serie de anomalías lipídicas. Estas incluyen: disminución en los lípidos totales, menor relación lípido/proteína, incremento en la cantidad de ésteres de colesterol, disminución en la concentración de fosfolípidos, disminución en la cantidad de cerebrósidos y sulfátidos, niveles alterados de ácidos grasos y cambios significativos en la concentración de gangliósidos (particularmente GM₄) (Wilson, 1991; Davison, 1962, Wender, 1974; Shah, 1980; Sappey, 1990; Denisova, 1990; Yu, 1974). Las lesiones desmielinizantes muestran un contenido aumentado de agua. Por otro lado, se han encontrado anticuerpos anti-cerebrósido y anti-gangliósido GM₄ en el LCR de pacientes con EM (Kasai, 1986).

3.4. Factores genéticos versus factores ambientales

El posible papel de los factores genéticos en la etiología de la EM ha sido discutido durante muchos años. Actualmente hay bastante uniformidad de criterios entre los distintos grupos que investigan la etiopatogenia de esta enfermedad respecto a considerar que en el desencadenamiento de la EM deben existir interacciones entre factores genéticos y ambientales. Es probable que la susceptibilidad a la EM esté bajo el control de varios genes codificados dentro y fuera del MHC, los cuales conferirían cierta vulnerabilidad ante determinados estímulos inmunológicos, cuya consecuencia final sería la desmielinización. Sin embargo, es

bastante improbable que la EM tenga una causa exclusivamente transmisible por factores genéticos. Así, las tasas de incidencia entre gemelos dizigóticos y en descendientes de parejas con elevada consanguinidad no son lo suficientemente altas para justificar una única asociación. No obstante la tasa relativa de incidencia entre parientes en segundo y tercer grado de pacientes con EM es lo suficientemente elevada para considerar que los factores genéticos deban jugar un papel patogénico destacado. Por otro lado, se han identificado grupos resistentes a EM en áreas geográficas de alto riesgo (asiáticos y amerindios en Norteamérica, lapones en Escandinavia, gitanos en Hungría) (Sadovnick, 1994).

Si la susceptibilidad a la EM está determinada por varios genes, tal y como parece evidente, presumiblemente cada locus diferirá en el efecto ejercido sobre dicha susceptibilidad. Un hecho bien documentado es la mayor prevalencia de la enfermedad en mujeres, lo cual ha llevado a pensar en un factor genético de susceptibilidad ligado al cromosoma X. Otro dato de interés es la tasa de concordancia, de aproximadamente un 26% en gemelos monozigóticos, frente al 2,4% observado en gemelos dizigóticos de idéntico sexo, porcentaje similar al de hermanos no gemelos de pacientes con EM. Esta diferencia sugiere claramente que la susceptibilidad a la EM está muy influenciada genéticamente y que no es probable que un único gen dominante o recesivo sea el responsable del efecto.

Pero quizás el papel más importante se le haya dado a los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), habiéndose relacionado la susceptibilidad a padecer la EM con la presencia de determinados alelos del MHC. Referente a las moléculas de clase I del MHC, las primeras observaciones establecieron una relación entre la EM y los antígenos HLA-A3 y -B7, definidos por serología. Posteriormente, esta relación quedó relegada a un plano secundario, en favor de asociaciones más fuertes de la enfermedad con moléculas de clase II del MHC (HLA-DR2) (Tiwari, 1985). Así, en la mayoría de las poblaciones estudiadas, la frecuencia de HLA-DR2 en individuos con EM es de aproximadamente el doble que en controles sanos.

Respecto a los patrones de evolución de la enfermedad, algunos

estudios han reportado una asociación del haplotipo DR4 con una evolución de tipo crónico-progresiva primaria, mientras que el haplotipo DR3 parece asociarse con una evolución de tipo recurrente-remitente. Recientemente, se ha observado que la expresión de moléculas HLA de clase I unidas a péptidos está disminuida en la superficie de células de pacientes con EM (Li, 1995), sugiriendo que los pacientes con EM tienen una presentación anómala de autoantígenos. Este hecho, común a varias enfermedades autoinmunes ligadas al HLA, se ha asociado a defectos en los mecanismos de tolerancia hacia antígenos propios y a una "inadecuada educación de los linfocitos T", secundaria a la falta de ensamblaje de moléculas de clase I del HLA, controlada por genes ligados a los genes de clase II.

La asociación de la EM con el MHC se ha definido mucho mejor a partir de la introducción de las técnicas de análisis del DNA mediante secuenciación o de amplificación mediante técnica de PCR. De esta forma se ha visto que el haplotipo que comporta mayor riesgo de EM es el HLA-DR2 DRB1*1501/DRB5*0101 -DQA1*0102-DQB1*0602 (Haegert, 1994). En la población de individuos con EM en Cerdeña, se ha encontrado una asociación con DR4-DQA1*0301-DQB1*0302/0201. En chinos y algunos caucásicos que carecen del alelo DQB1*0602, se ha encontrado cierta relación con alelos DPB1 (Dekker, 1993). En general, parece que la predisposición vendría determinada por la asociación de un alelo DQA1 determinado con un alelo DQB1 concreto.

En cuanto a la relación de los diferentes haplotipos con el pronóstico de la enfermedad, no se ha encontrado ninguna influencia del haplotipo DR15-DQ6. Por el contrario, pacientes con EM que expresan los haplotipos DR17-DQ2 y DR1-DQ5, los cuales son mucho menos frecuentes en individuos con EM, parecen tener un peor pronóstico (Runmaker, 1994).

También se ha estudiado si otros genes, distintos de los del MHC, pudieran estar implicados en el desencadenamiento o en la evolución de la EM. En este sentido, han aparecido resultados contradictorios en cuanto al gen de la PBM, aunque no parecen existir polimorfismos en este gen que puedan relacionarse con la enfermedad. Tampoco se han encontrado

pruebas evidentes de polimorfismos genéticos en las moléculas transportadoras asociadas con el procesamiento antigénico (TAP) o en las proteasas grandes multifuncionales (LMP). También se han estudiado los genes de ciertas citocinas (TNF- α entre otros), aunque los resultados preliminares tampoco parecen evidenciar alteraciones a estos niveles. Por último, se han investigado polimorfismos en los genes del receptor del linfocito T para el antígeno (TCR) con resultados contradictorios (Oksenberg, 1989; Hillert, 1992).

Recientemente, algunos autores han evidenciado una heterogeneidad de la región determinante de complementariedad 3 en la cadena α del TCR en linfocitos T específicos de PBM, que se incrementa en paralelo con la severidad de la enfermedad (Utz, 1994). Este hallazgo sugiere que la severidad de la enfermedad pudiera estar asociada con un aumento de la heterogeneidad de linfocitos T específicos frente a la PBM.

3.5. Mecanismos inmunológicos en la EM

3.5.1. Mecanismos autoinmunes.

La EM es una enfermedad inflamatoria crónica del SNC caracterizada por infiltrados focales de linfocitos T y macrófagos, que conducen a la desmielinización y pérdida de función neurológica (Adams, 1989; Prineas, 1976, 1978). En las placas de desmielinización agudas se ha demostrado la presencia de linfocitos T activados que secretan diversas linfocinas y expresan receptores para factores de crecimiento, como IL-2. Igualmente están presentes células mononucleares activadas, que expresan moléculas de clase II del MHC y el antígeno de membrana B7 y que igualmente secretan citocinas inmunorreguladoras, tales como IL-12 (Woodroffe, 1986; Hofman, 1986, 1989, Windhagen, 1995).

El proceso inflamatorio se circunscribe a la sustancia blanca del SNC y no afecta al SNP o a otros órganos. Aunque es ampliamente aceptada la idea de que el proceso inflamatorio conduce a la desmielinización y es el causante de las alteraciones neurológicas en la EM, los mecanismos subyacentes responsables del inicio y mantenimiento de la

enfermedad no han sido esclarecidos completamente.

En la actualidad, los intentos de explicar la etiopatogenia de las enfermedades autoinmunes humanas se apoyan en una serie de factores etiológicos. El primero de ellos se sustenta en la existencia de una posible infección del órgano o tejido afecto por un virus u otro agente infeccioso. Mediante alteración de los antígenos propios, mimetismo antigénico o alteración de los patrones normales de respuesta inmunológica, este proceso infeccioso iniciaría la cascada de sucesos que llevarían al desarrollo de una enfermedad autoinmune órganoespecífica.

Otra base etiopatogénica de la autoinmunidad se sustenta en la consideración de que las células infiltrantes son de naturaleza autoinmune por haber escapado a los procesos normales de eliminación clonal que deben tener lugar en los órganos linfoides primarios durante los procesos de diferenciación y maduración de los linfocitos T y B. Estas células autorreactivas podrían reconocer proteínas específicas del órgano diana, con ayuda de las células presentadoras de antígeno, necesarias para la activación de los linfocitos T-CD4⁺.

Ambas hipótesis son aplicables a la EM. Además, una vez que la cascada autoinmune comienza, tiene lugar una diseminación de autoantígenos intracelulares, que en condiciones normales son inaccesibles a los linfocitos T específicos. La activación de estas células incrementaría la severidad del proceso. Es probable que los virus y otros agentes infecciosos que actúan como superantígenos, inicien la activación o dirijan el proceso autoinmune en lugar de ser los objetivos primarios de las células infiltrantes. Un aspecto importante a considerar es el hecho de que en individuos normales existe una frecuencia de linfocitos T reactivos frente a autoantígenos semejante a la encontrada en sujetos con enfermedades autoinmunes. El factor determinante de la producción o no de enfermedad sería el estado de activación y la secreción de citocinas específicas por parte de estas células autorreactivas. Este estado de activación sería diferente en individuos normales y sujetos con la enfermedad.

Las células componentes de la microglía (células especializadas del sistema retículo-endotelial en el SNC) son susceptibles de fagocitar productos de degradación de la mielina y de presentar péptidos antigénicos

a los linfocitos T específicos (Woodroffe, 1986; Hickey, 1988). De forma alternativa, los astrocitos, células gliales equivalentes a las células dendríticas de los órganos linfoides, expresan antígenos de clase II del MHC y por lo tanto están también plenamente capacitadas para presentar antígenos a los linfocitos T cooperadores (Fontana, 1984; Fierz, 1985).

3.5.2. *Autoantígenos*

En 1993, Sercarz y colaboradores definieron en modelos murinos el concepto de antígenos inmunodominantes y crípticos, basándose en el reconocimiento de péptidos tras estimulación primaria in vivo con proteína intacta o péptidos. La respuesta de linfocitos T se centraba inicialmente en epítomos inmunodominantes, pero con el tiempo se extendía a otros epítomos crípticos (Lehmann, 1992). Curiosamente, los linfocitos T que reconocían epítomos crípticos no reconocían la proteína intacta. Con estos resultados, se ha postulado que los antígenos proteicos son reconocidos in vivo como epítomos inmunodominantes, tras su procesamiento por células presentadoras de antígeno, y como epítomos crípticos tras procesamiento por enzimas proteolíticas extracelulares.

Una serie de proteínas del SNC, como la PBM (Ben-Nun, 1981; Vandebark, 1985), PLP (Sobel, 1990; Trotter, 1991; Kuchroo, 1991), GOM (Linnington, 1992, 1993) y S-100 (Linnington, 1994), pueden ser reconocidas en el SNC por linfocitos T, provocando la activación de éstos. Se ha demostrado que PBM y PLP, administradas con adyuvantes, pueden inducir fácilmente EAE en animales, mientras que la inflamación del SNC inducida con S-100 parece requerir transferencia adoptiva, de linfocitos T activados in vitro frente al antígeno, a animales no primados. Además, mientras la activación de linfocitos T con reactividad frente a un antígeno del SNC puede iniciar la enfermedad autoinmune, con el tiempo, las células T con reactividad frente a otros antígenos podrían ser activadas y tener también la capacidad de provocar destrucción tisular de tipo autoinmune.

La PBM es quizás el antígeno mejor caracterizado del SNC y es uno de los autoantígenos más frecuentemente implicados en la patogenia

de la EM, debido sobre todo a su capacidad para inducir EAE. La reactividad de las células T de sujetos con EM frente a PBM se ha evaluado valorando la respuesta de estas células en ensayos de proliferación in vitro de células mononucleares estimuladas con PBM (Lisak, 1977, Johnson, 1986). Estos experimentos mostraron una respuesta mas marcada de las células T de pacientes con EM frente a PBM humana que los linfocitos T de sujetos normales o con otras enfermedades neurológicas. Sin embargo, las diferencias observadas no fueron muy marcadas.

Los epítomos inmunodominantes de la PBM han sido situados detalladamente en mapas. Las regiones de mayor inmunogenicidad se encuentran localizadas entre los residuos 84-106 y 143-172, cerca del extremo carboxilo-terminal (Ota, 1990; Martin, 1991; Jaraquemada, 1990; Pette, 1990; Zhang, 1994; Wucherpfennig, 1991). En individuos DR2⁺, una alta proporción de clones de linfocitos T reactivos frente a PBM reconocían la región 84-106, con independencia de padecer o no la enfermedad. Los antígenos DR y DQ parecen ser elementos restrictivos que indican los péptidos inmunodominantes de la PBM que pueden ser presentados por diferentes moléculas de clase II. Igualmente, linfocitos T de individuos genéticamente diferentes responden a distintos epítomos de PBM humana y esta respuesta se asocia a distintas moléculas MHC de clase II. Se ha demostrado que DR2 posee una capacidad de restringir todos los epítomos identificados en PBM; además distintas especificidades alélicas de DR2 tienen la capacidad de presentar diferentes epítomos de PBM.

La respuesta inmune frente a la PLP ha sido investigada recientemente, siendo inmunodominantes los epítomos comprendidos entre los residuos 31-50 y 81-120. Llama la atención que la frecuencia de linfocitos T reactivos frente a PLP es similar en individuos normales y pacientes con EM. Sin embargo la patogenicidad de estas células depende de su activación in vivo, dado que sólo las células activadas parecen capaces de cruzar la barrera hemato-encefálica. Por lo tanto, en ausencia del autoantígeno, la activación del sistema inmunitario deberá supeditarse a otro tipo de factores, Es aquí donde las infecciones externas pueden jugar un papel desencadenante, mediante los siguientes mecanismos:

* **Mimetismo molecular o antigénico.** Este mecanismo implica que epítomos de agentes infecciosos, capaces de inducir una respuesta inmune, son compartidos por proteínas propias del hospedador. La reactividad cruzada con el agente infeccioso exógeno puede poner en marcha la activación de las células con potencial autorreactivo y por tanto inducir autoinmunidad. Este mecanismo puede explicar la respuesta autoinmune observada en la encefalomiелitis postviral, la cual tiene lugar coincidiendo con la eliminación del virus, como resultado de la respuesta inmune antiviral del hospedador. Un ejemplo más que ilustra este mecanismo es el de la polimerasa del virus de la hepatitis B, que tiene reactividad cruzada con un epítomo de la PBM. La inyección en conejos de esta polimerasa, junto con adyuvante, desencadena una enfermedad inflamatoria del SNC (Fujinami, 1985). Otra observación en este sentido es la proliferación observada cuando clones de linfocitos T específicos frente a PBM fueron enfrentados a diversas proteínas virales (Wucherpfennig, 1995).

* **Activación por superantígenos.** Los superantígenos se unen a antígenos MHC de clase II y segmentos V β específicos del receptor de la célula T, activando directamente a los linfocitos T (Pullen, 1990). Esta activación por superantígenos puede ocurrir durante el curso de infecciones bacterianas o víricas. Además, la inyección de superantígenos puede desencadenar brotes de EAE en cepas de ratones susceptibles (Brocke, 1993). Debido a que los superantígenos inducen la expansión de linfocitos T con un TCR determinado, es posible que las células oligoclonales presentes en la sangre y LCR de pacientes con EM se originen por exposición a este tipo de antígenos.

* **Activación de los linfocitos autorreactivos por la vía del CD2.** Además de la vía convencional o clásica de activación de los linfocitos T, a través del complejo CD3/TCR, se ha descrito una vía de activación "bystander" a través del CD2 (Weiss, 1984; Meuer, 1984; Hunig, 1987). Los linfocitos T activados vía CD2, mediante la unión de células T activadas que expresan en su superficie una alta densidad de moléculas de adhesión, tipo LFA-3, pueden activar a los linfocitos T en reposo e inducirlos a proliferar (Brod, 1990). Los linfocitos B activados también

pueden utilizar este mecanismo para estimular a las células T. De este modo, la activación de las células T, en asociación con una infección de tipo vírico o bacteriano, podría en teoría inducir la activación de linfocitos T autorreactivos y por tanto desencadenar una respuesta autoinmune.

La caracterización del receptor de la célula T en linfocitos autorreactivos de pacientes con EM parece reflejar un uso moderadamente restringido de ciertos TCRs para regiones inmunodominantes de la PBM (Wucherpfennig, 1990; Ben Nun, 1991, Kotzin, 1991). Se puede encontrar un repertorio más amplio de TCRs entre distintos individuos que reconocen el mismo péptido de PBM, aunque de nuevo, este uso de TCRs no parece ser totalmente aleatorio. La mayor parte de las líneas de linfocitos T específicos de PBM reconocen los péptidos inmunodominantes PBM(84-102) y PBM(143-168) y están restringidos por HLA-DR. Aunque las células T reactivas frente a esos epítomos expresan diferentes cadenas $V\alpha$ y $V\beta$ del TCR, $V\alpha 3.1$ y $V\alpha 8$ son las observadas con mayor frecuencia, mientras que el repertorio $V\beta$ es más variado.

Estudios realizados en el SNC de pacientes con EM indican que existe una expansión clonal de linfocitos T, tanto de tipo $\alpha\beta$ como $\gamma\delta$ (Hafler, 1988; Oksenberg, 1990; Wucherpfennig, 1992). El análisis comparativo de las secuencias "motif", encontradas en los linfocitos T aislados del cerebro de pacientes con EM, muestran algún grado de homología con las secuencias clonadas de células T reactivas frente a PLP y PBM, aunque aún no se ha determinado si estas similitudes en la estructura del TCR definen una reactividad antigénica.

Para que se produzca la activación de los linfocitos T, su proliferación y su diferenciación hacia células efectoras, se requieren dos tipos distintos de señales: una señal específica del antígeno, mediada a través del receptor del linfocito T, y una segunda señal coestimuladora no específica de antígeno. Una de las señales coestimuladoras más importantes para las células T cooperadoras se genera a través de la vía CD28-B7.1/B7.2. Todas las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ expresan CD28 de forma constitutiva. La coestimulación a través de esta vía es crítica para la secreción de IL-2, puesto que B7 induce la transcripción del gen de esta linfocina. Por el contrario, la estimulación antigénica en ausencia de B7

puede inducir anergia (Freeman, 1993). En muestras de SNC obtenidas de pacientes con EM se ha encontrado un aumento en la expresión de RNA mensajero de B7.1 y B7.2, localizada fundamentalmente en las áreas de desmielinización (Windhagen, datos no publicados). Según se ha señalado previamente, se encuentran linfocitos T autorreactivos con igual frecuencia en pacientes con EM que en individuos sanos. Basándose en esto, cabría esperar que la exposición de estos linfocitos T a la mielina, que puede ocurrir tras accidentes cerebrovasculares, traumas o tumores, tuviese por resultado desmielinización autoinmune. Sin embargo, ésto generalmente no ocurre. Este hecho podría estar relacionado con la falta de expresión de B7 en las zonas lesionales. En cambio, si existe una expresión adecuada de B7 podría iniciarse una enfermedad autoinmune.

En lo referente al papel de las linfoquinas en la fisiopatología de la EM, existen múltiples estudios que implican a un gran número de estas moléculas. En este sentido, se han definido dos patrones de activación de los linfocitos T-CD4⁺, en función de los tipos de citocinas secretadas por ellos, cada uno de los cuales se va a traducir en distintas formas de regulación de la respuesta inmunitaria. El patrón T-helper de tipo 1 (Th1), en el que las células secretan predominantemente IL-2 e IFN- γ , está implicado en las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado. Por el contrario, en el patrón de activación de tipo Th2, las células secretan fundamentalmente IL-4, IL-5 e IL-10, induciendo la diferenciación de células B hacia células productoras de anticuerpos. Es notorio el que algunas de las citocinas producidas en este tipo de respuestas tienen capacidad inhibitoria del tipo de respuesta contraria. Así IFN- γ inhibe diferenciación a Th2, mientras IL-4 e IL-10 inhiben diferenciación hacia Th1 (Romagnani, 1994 Mossmann, 1986). De este modo, las citocinas secretadas por los linfocitos T activados influyen cualitativamente sobre la naturaleza de la respuesta inmune. Existen una serie de factores que determinan la maduración y diferenciación de las células T "vírgenes" (Th0) hacia células de respuesta Th1 o Th2. Entre estos factores destacan la dosis y tipo de antígeno, la vía de administración del mismo, el tipo de célula presentadora de antígeno y la presencia de células o moléculas coestimuladoras, particularmente citocinas (p. ej. la IL-12 induce diferen-

ciación hacia Th1). No obstante, la diferenciación de una célula CD4⁺ hacia uno de estos patrones de respuesta no es un proceso irreversible, de tal forma que la re-estimulación de la misma célula, en condiciones distintas a las del estímulo primario, puede modificar el patrón de respuesta en cualquiera de los dos sentidos (Kelso, 1995).

En cualquier caso, la secreción de citocinas por los linfocitos T debe jugar un papel relevante en la regulación del proceso inflamatorio autoinmune, el cual está mediado por células T autorreactivas que reconocen autoantígenos específicos de tejidos junto a moléculas de clase II del MHC. En la EM parece predominar una respuesta de perfil Th1 mediada por IL-12, con la consiguiente producción de IFN γ , aunque varios estudios han aportado pruebas en favor de la coexistencia de patrones de activación de tipo Th2. La producción de IFN γ ha sido puesta en evidencia en áreas de desmielinización, mediante técnicas inmunohistoquímicas (Traugott, 1988) y se ha demostrado un número aumentado de células secretoras de IFN γ en el LCR de individuos con EM comparado con controles sanos (Olsson, 1990). Si el IFN γ promueve o no el desarrollo de la lesión en EM permanece por esclarecer, aunque una serie de estudios realizados en pacientes sugieren un papel preponderante del IFN γ en las exacerbaciones de la enfermedad (Panitch, 1987).

Otras citocinas tales como TNF α y TNF β parecen tener también un papel patogénico en la EM. Ambas citocinas han sido identificadas en lesiones agudas y crónicas activas, estando ausentes en lesiones crónicas silentes (Hofman, 1989; Selmaj, 1991). Niveles aumentados de TNF α y células productoras de TNF α se han encontrado en el LCR de pacientes con EM; demostrándose una correlación entre la intensidad de elevación del TNF α y la actividad de la enfermedad (Sharief, 1991). Incluso, los niveles de TNF α se correlacionaron con signos de alteración en la barrera hemato-encefálica (Sharief, 1992).

Así mismo, en las lesiones tisulares de los pacientes con EM se ha investigado la presencia de citocinas con capacidad de limitar el proceso inflamatorio, tales como TGF β e IL-10. Recientemente, se ha demostrado que pacientes con EM severa tienen menor número de células que expresen RNA mensajero para TGF β , comparado con pacientes con

incapacidad ligera o sin incapacidad (Link, 1994). Un patrón similar se ha observado en la expresión de RNA mensajero para IL-10 (Navikas, 1995). Estos hallazgos se correlacionan con los de Rieckman (1994) quien obtiene altos niveles de RNA mensajero para TGF β e IL-10 en pacientes con EM estable.

En resumen, el tipo de interacción entre los linfocitos T-CD4 autorreactivos y las células presentadoras de antígeno puede determinar el patrón de respuesta de estas células CD4, hecho que puede resultar decisivo para la evolución de la enfermedad. Datos obtenidos de la EAE sugieren que un patrón de respuesta de tipo Th1 podría tener un efecto más nocivo, mientras que una respuesta de tipo Th2 podría contribuir a limitar la enfermedad. Sería de un enorme interés correlacionar las respuestas clínicas con los perfiles de producción de las diferentes citocinas en los ensayos terapéuticos en EM, tratando de relacionarlos con variables inmunogenéticas. La confirmación de la hipótesis de un efecto beneficioso de los patrones Th2, podría permitir nuevas estrategias terapéuticas, bien inhibiendo citocinas promotoras de enfermedad, bien estimulando la producción de citocinas inhibitoras de la misma.

3.6. Proteínas de estrés y esclerosis múltiple

Las proteínas de estrés, chaperonas o *heat-shock proteins* (HSP) son un grupo heterogéneo de proteínas cuya denominación individual está en función de su peso molecular. Se reconocen grupos de 25-45 KDa, 60 KDa, 70 KDa y 90-110 KDa. Algunas de estas proteínas son componentes constitutivos de la célula, pero la producción de muchas HSP aumenta notablemente por la acción de agentes estresantes ambientales, tales como la temperatura (de ahí su nombre). Las HSP reúnen una serie de características que les confieren un gran interés:

- * Son proteínas muy conservadas entre especies, presentando en su secuencia de aminoácidos niveles de identidad, entre bacterias y mamíferos, superiores al 50%.

- * Son extraordinariamente inmunogénicas.

- * Su expresión aumenta de forma notable durante procesos

infecciosos, tanto por parte del patógeno como del hospedador.

* Su intervención ha sido evidenciada en modelos animales de autoinmunidad.

La función de las HSP está relacionada con el plegamiento, desplegamiento y ensamblaje de proteínas intracelulares, así como en la traslocación entre diferentes compartimentos subcelulares. La desnaturación de proteínas es un fenómeno común que sigue a la acción de muchos agentes estresantes para la célula. De forma simplificada, las HSP elevarían el umbral para la muerte celular protegiendo a la célula contra la degradación o ensamblaje incorrecto de proteínas. La infección por numerosos micro-organismos proporciona suficientes estímulos para la expresión de HSP por parte del patógeno y del hospedador. Estos estímulos incluyen entre otros: citocinas, elevación de la temperatura e hipoxia. Al ser muy inmunogénicas, estas proteínas entrañan un gran riesgo de desencadenar fenómenos de naturaleza autoinmune, dada la gran homología entre las especies (fenómeno de mimetismo molecular).

Existen varios hechos que apoyan la existencia de un papel de estas proteínas en la patogenia de la EM. Así, con una cierta frecuencia se observan exacerbaciones clínicas siguiendo a procesos infecciosos en pacientes con EM. Sería tentador especular que la inmunidad frente a HSP podría estar mediando, en parte, estas exacerbaciones. Basándose en la demostración de que líneas de células T específicas frente a determinantes de micobacterias respondían frente a un péptido de la PBM, también se ha sugerido la posibilidad de que exista reactividad cruzada entre HSP y epítomos de la mielina (Liblau, 1991). Además, en la oligodendroglía de lesiones de EM se ha demostrado la vecindad de ciertas HSP con una expansión clonal de linfocitos $T\gamma\delta$, los cuales responden frecuentemente a estas proteínas (Selmaj, 1991; Wucherpfennig, 1992). Igualmente, se ha demostrado que linfocitos T de algunos pacientes responden a antígenos de micobacterias (Birnbaum, 1993) y que en EM existe una respuesta humoral frente a la HSP 60-65 KDa, aunque esta respuesta es poco específica (Gao, 1994).

3.7. La encefalomiелitis alérgica experimental (EAE)

La primera descripción de la EAE se realizó en seres humanos como consecuencia de un hecho fortuito: la inducción de una encefalomiелitis tras vacunación antirrábica con una preparación contaminada con componentes de médula espinal (Horack, 1930; Stuart, 1928). El modelo experimental comenzó de la misma manera, inyectando homogeneizados de médula espinal en los animales de experimentación. Posteriormente, tras la descripción de los componentes antigénicos principales de la mielina, el modelo se ha ido reproduciendo con moléculas concretas purificadas.

La EAE puede ser inducida, bien como una enfermedad aguda, con la aparición de un período restringido de parálisis, de 9-14 días, tras la inmunización, o como una enfermedad crónica recurrente con progresión continua en forma de brotes. En muchas cepas de ratones, esta evolución crónica recurrente se desarrolla tras inmunización con médula espinal autóloga, siempre que los ratones sean sensibilizados con un potente adyuvante, p.e. toxina pertussis (Levine, 1973). La enfermedad puede ser transferida mediante células T específicas de proteína de mielina (Mokhtarian, 1984), pero no con suero inmune. De hecho, células T clonales, específicas para ciertos péptidos/complejos MHC de clase II, inducen encefalomiелitis, la cual en algunos casos es crónica (Whitham, 1991). Sin embargo, la asociación de la EAE inducida por médula espinal con determinados haplotipos del MHC es débil, comparada con la influencia de genes no MHC (Baker, 1990). Una explicación podría ser que la enfermedad puede ser inducida por péptidos derivados de muchas proteínas diferentes de la mielina, cada uno de los cuales puede ser presentado por diferentes moléculas de clase II del MHC.

La inducción de EAE con proteínas de la mielina o con péptidos de éstas, normalmente induce una enfermedad aguda, pero en algunos casos da lugar a una enfermedad de tipo crónico. Las principales proteínas encefalitogénicas son la PLP (Endoh, 1986, Yamamura, 1986), la PBM (Pettinelli, 1982) y GOM (Linington, 1993). Varios péptidos de estas proteínas han demostrado ser encefalitogénicos en varias cepas de ratas y

ratones (Fritz, 1989), dependiendo sobre todo del tipo de unión entre la secuencia del péptido y las moléculas de clase II del MHC. Por ejemplo, las cepas de ratones con un haplotipo H-2^k y H-2^u reconocen como epítipo principal al fragmento PBM (1-9) y de forma minoritaria al fragmento PBM (35-47), mientras que las cepas H-2^s, H-2^q y H-2^r reconocen como epítipo principal al fragmento PBM (89-101) (Fritz, 1985; Jansson, 1991; Sakai, 1988; Zamvil, 1988). De los péptidos derivados de la molécula PLP, los fragmentos PLP (139-151) y PLP (178-191) inducen enfermedad en los ratones H-2^s (Greer, 1992; Tuohy, 1989), PLP (103-116) en los ratones H-2^q (Tuohy, 1992), PLP (43-64) en ratones H-2^u (Whitham, 1991) y PLP (56-70) en los ratones H-2^{g7} (Amor, 1993). En ratas, aquellas portadoras de los haplotipos RT1^a, RT1^c, y RT1^l responden al péptido PBM (63-88) (Mustafa, 1993, 1994) mientras que el péptido PBM (89-101) es presentado por la molécula DR en otro grupo de haplotipos RT1 (Offner, 1989).

Tras inmunización intradérmica con médula espinal más adyuvante, es probable que antígenos de la médula espinal sean transportados hacia los ganglios linfáticos y creen un reservorio de autoantígenos los cuales podrían activar linfocitos T efectores y mantener una respuesta autoinmune (Tew, 1990). Además del desarrollo de células T encefalitogénicas patológicas, persiste una respuesta de linfocitos B frente a antígenos de la mielina (Endoh, 1986). Aunque los anticuerpos frente a proteínas de la mielina no pueden iniciar la EAE, varias evidencias les atribuyen un papel relevante en el mantenimiento de la desmielinización en la fase crónica de la enfermedad. Así, anticuerpos anti-PBM se acumulan en el LCR durante la EAE crónica-recurrente y la eliminación del complemento bloquea la inducción de la EAE. Por otro lado, la transferencia de anticuerpos monoclonales frente a GOM es capaz de inducir desmielinización y aparición de brotes en ratones con EAE inducida por PBM. Estos y otros experimentos, demuestran que la inmunidad humoral juega también un importante papel durante el desarrollo de la enfermedad.

En la mayor parte de los casos, los péptidos administrados (p.ej. PBM (1-9)) dan lugar a una enfermedad aguda, sin la aparición posterior de nuevos brotes de desmielinización. Sin embargo existen otros péptidos

capaces de dar lugar a una enfermedad de tipo crónico-recurrente, la cual mimetiza mejor la situación patológica humana. Entre estos, se encuentran el péptido PLP (43-64) en los ratones PL/J y el péptido PLP (139-151) en los ratones SJL; igualmente, péptidos derivados de la PBM como el PBM (89-101) inducen una enfermedad crónica-recurrente en los ratones B10.RIII. Como se ha mencionado anteriormente, para el mantenimiento de la enfermedad y desarrollo de cronicidad parece ser necesaria la participación de los linfocitos B.

Un problema aún no resuelto en el conocimiento de los modelos experimentales de autoinmunidad, relacionados con enfermedades en los seres humanos, es el tratar de explicar la asociación entre el MHC y la enfermedad. Si varios péptidos son capaces de inducir cronicidad, ¿por qué la enfermedad se asocia solamente con un alelo MHC?. La enfermedad crónica inducida por péptidos se asocia más claramente al MHC que la enfermedad inducida por administración de médula espinal. Además, la EAE crónica-recurrente implica probablemente el reconocimiento de diferentes péptidos. Una explicación interesante podría ser que la asociación al MHC esté relacionada con un grupo de péptidos, los cuales se unen a una molécula de clase II determinada, pero de forma jerarquizada. Además, ninguno de estos péptidos daría lugar a una respuesta de linfocitos T que pudiera inhibir el desarrollo de la enfermedad (Holmdahl, 1995). Es interesante comentar que ciertos haplotipos MHC en la rata confieren protección contra la EAE, mediante la activación de células T específicas con un patrón de secreción de citocinas Th2 o bien con secreción de TGF β (Mustafa, 1993, 1994)

4.- ASPECTOS CLÍNICOS DE LA EM

Los síntomas y signos de comienzo de la EM han sido analizados en muchas series clínicas. Sin embargo, existen muchas fuentes de error, de los cuales una de los más frecuentes es la naturaleza retrospectiva de la historia clínica cuando se llega al diagnóstico (Matthews, 1991). McAlpine, en una revisión de los estudios publicados anteriormente, encontró que la incidencia de los síntomas de comienzo de la enfermedad era más

o menos la siguiente :

- 1 - Debilidad en uno o más miembros, 40%
- 2 - Neuritis óptica, 22%
- 3 - Parestesias, 21%
- 4 - Diplopia, 12%
- 5 - Vértigo, 5%
- 6 - Alteraciones de la micción, 5%

La incidencia de síntomas individuales en el curso de la enfermedad puede ser expresada de diferentes formas. En general, los signos de afectación piramidal, incluyendo debilidad y cambios en los reflejos, están presentes en un 83% de los casos, los cambios sensoriales en un 80%, los signos cerebelosos en un 67%, la afectación del tronco del encéfalo en un 65%, las alteraciones de los esfínteres en un 56% y las alteraciones mentales en un 30% (Matthews, 1991).

En la historia natural de la enfermedad existen una serie de factores que se asocian con el comienzo o con el desencadenamiento de un brote de la enfermedad. Entre estos caben destacar las infecciones. Las mejores documentadas son las infecciones del tracto respiratorio superior, las cuales pueden estimular la producción de diversas citocinas por parte de células del sistema inmune (Panitch, 1994), iniciando un proceso de desmielinización. Otros factores desencadenantes son las vacunaciones, el período postparto y los traumatismos, no de índole mecánica o física, sino de carácter quirúrgico, emocional o las descargas eléctricas. El ejercicio excesivo, la fatiga y el calor, también pueden contribuir al desencadenamiento de un brote.

En lo referente al curso clínico de la enfermedad, se reconoce habitualmente que éste puede ser remitente-recurrente, remitente-progresivo o progresivo desde el comienzo de la EM, pero existe poco acuerdo en la forma de definir estas categorías. Existen varias escalas que valoran el grado de afectación o incapacidad de los enfermos con EM y de su resultado se puede deducir con mayor o menor precisión el pronóstico de cada paciente.

El diagnóstico diferencial de la EM ha de realizarse con enfermedades que causan múltiples lesiones (lupus eritematoso sistémico,

síndrome de Sjögren, panarteritis nodosa, enfermedad de Behçet, SIDA, sarcoidosis, paraparesia espástica tropical, encefalomiелitis diseminada aguda, enfermedad de Lyme, enfermedades cerebrovasculares, etc.), enfermedades sistematizadas (ataxia de Friedreich, degeneración combinada subaguda de la médula espinal, leucodistrofia), enfermedades que originan lesiones aisladas o únicas del SNC, con un curso recurrente-remitente (tumores del SNC, malformaciones arterio-venosas, quistes aracnoideos), lesiones únicas con un curso progresivo (tumores, malformación de Chiari), etc. Por otro lado, se deben descartar todas aquellas enfermedades que puedan ser la causa de síntomas de presentación única en EM (vértigo, fallo visual, diplopia, síntomas sensoriales, etc.)

5.- MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

El diagnóstico y seguimiento de los pacientes con EM se ha visto facilitado en los últimos años, debido fundamentalmente al perfeccionamiento de las técnicas de imagen, como la tomografía axial computerizada (TAC) y sobre todo la resonancia magnética nuclear (RMN). Además, se han ido desarrollando otros métodos diagnósticos complementarios, basados en estudios electrofisiológicos o en técnicas de laboratorio, fundamentalmente inmunológicas. Entre los primeros, son de especial interés el estudio de los potenciales evocados (visuales, somatosensoriales, auditivos), el análisis de la conducción motora, test visuales psico-físicos, test de funcionamiento del troncoencéfalo, electroencefalografía o el test del baño caliente.

Basándose en los hallazgos clínicos y en los datos aportados por estos métodos diagnósticos, se han elaborado unos criterios diagnósticos para la EM (Poser, 1983). Según estos criterios, se ha clasificado la enfermedad en:

- A) clínicamente definida
- B) definida con apoyo de laboratorio
- C) clínicamente probable
- D) probable con apoyo de laboratorio

Esta clasificación se basa en la evidencia de brotes (teniendo en

cuenta el número de los mismos), evidencia de afectación neurológica, tanto desde un punto de vista clínico (examen neurológico demostrando afectación del SNC), como paraclínico (demostración por medio de varios tests y procedimientos, de la existencia de lesión en el SNC que no ha producido signos de afectación neurológica, pudiendo no haber causado síntomas en el pasado). Estos últimos procedimientos incluyen: baño de agua caliente, potenciales evocados y procedimientos de imagen. En esta clasificación también se considera la presencia de bandas oligoclonales de IgG en el LCR.

5.1. Hallazgos neurorradiológicos.

La sensibilidad de la RMN en la detección de áreas lesionales de desmielinización ha desplazado el uso de la TAC. Esta técnica permite detectar lesiones de pequeño tamaño (figura 1a), diferenciar pequeñas lesiones múltiples (figura 1b) o distinguir con precisión los límites de una lesión extensa (figura 1c). Proporciona un método objetivo de evaluación en la monitorización de la respuesta a los diferentes tratamientos en los pacientes y en la valoración de los diferentes ensayos clínicos, puesto que es más sensible que la valoración de la actividad de la enfermedad mediante parámetros clínicos. La RMN detecta una gran cantidad de lesiones activas que no cursan acompañadas de manifestación clínica alguna (brotos subclínicos), evidenciando la discordancia clínico-neurorradiológica, característica de esta enfermedad. Este hallazgo apoya fuertemente la idea de algunos autores acerca de la actividad continua de los fenómenos inflamatorios en la EM. Así mismo, estos datos ponen en evidencia que la aparición de una crisis y la intensidad de las manifestaciones clínicas durante la misma, guardan una mayor relación con la localización anatómica de la placa de desmielinización que con su tamaño. La introducción de la captación con gadolinio DTPA parece haber mejorado la identificación de nuevas lesiones desmielinizantes. Esta técnica es reconocida actualmente como el marcador de actividad clínica de mayor utilidad y parece tener un importante papel en la monitorización de los diferentes ensayos terapéuticos.

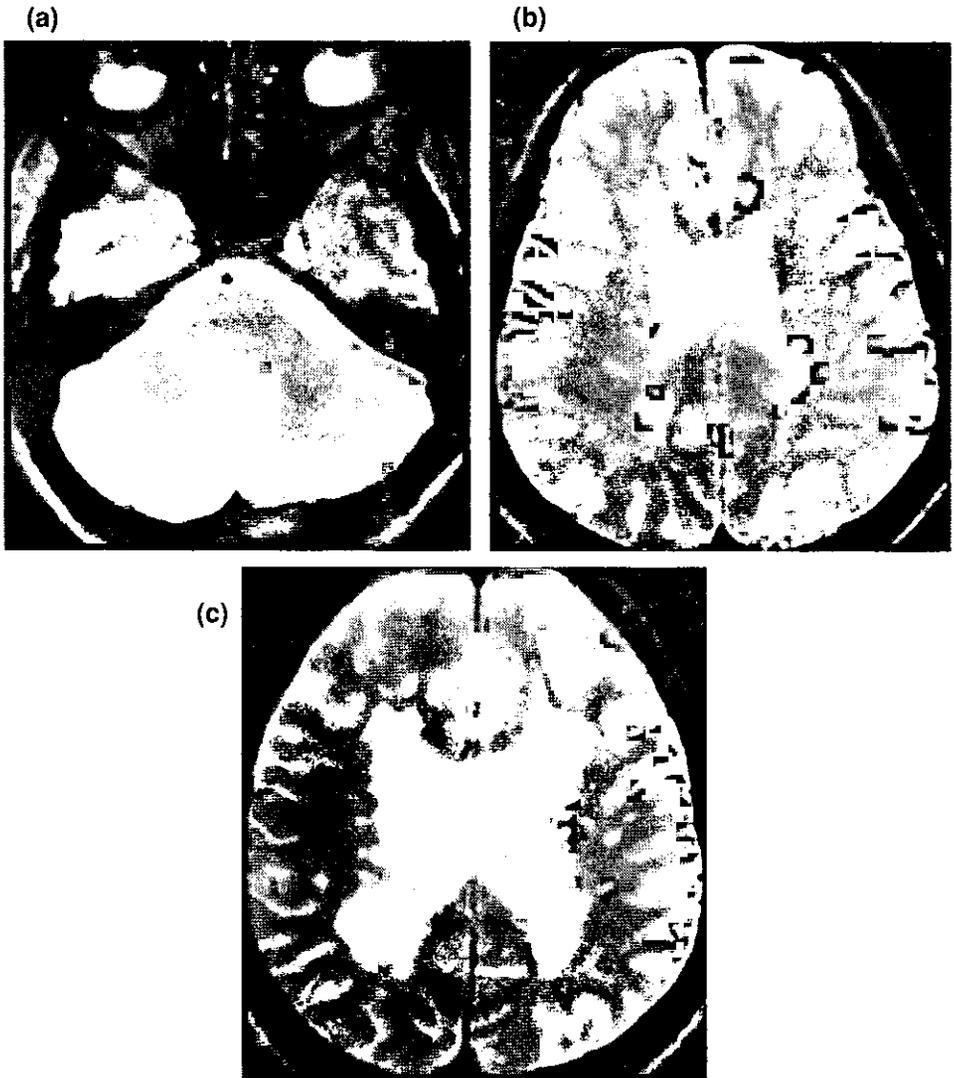


Figura 1.- Placas de desmielinización demostradas mediante RMN en pacientes con EM. (a) Placa de escasas dimensiones en el cerebelo. (b) Numerosas placas localizadas en ambos hemisferios cerebrales. (c) Extensas placas de desmielinización rodeando ambos ventrículos laterales.

5.2. Hallazgos inmunológicos.

La EM se caracteriza por la pobreza de hallazgos analíticos en la sangre que faciliten el diagnóstico de la enfermedad. Aún a pesar de ser considerada una enfermedad de etiopatogenia autoinmune, la aparición de otros fenómenos de la misma naturaleza no es mucho más frecuente que en la población general. Anticuerpos anti-nucleares se han encontrado en el 27% de 150 pacientes con EM recurrente-remitente y en el 30% de 23 pacientes con EM crónico-progresiva. Estos pacientes tenían EM clínicamente definida y no tenían lupus eritematoso sistémico ni otro tipo de enfermedad del colágeno. Puesto que los anticuerpos anti-nucleares no son relevantes en la patogenia de la EM, pueden ser considerados como falsos positivos, y probablemente reflejen una desregulación del sistema inmunitario en los enfermos con EM. Además, en aquellos pacientes en los que se detectaba la presencia de estos autoanticuerpos los títulos eran muy bajos (Barned, 1995). Los estudios de subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo (análisis de la clonalidad linfocitaria y del repertorio V α y V β del TCR) aportan datos interesantes sobre la patogenia de la enfermedad, aunque de cara al diagnóstico son de escasa utilidad.

El análisis del LCR proporciona la oportunidad de analizar de forma más directa los acontecimientos que tienen lugar dentro del SNC en la EM, como consecuencia de la reacción del sistema inmunológico frente a los componentes de la mielina. Su análisis repetido proporciona alguna información sobre la dinámica de la actividad inmunológica en el SNC, pero nunca podrá revelar si estos cambios son causa o consecuencia del daño en la mielina. Anomalías cualitativas y cuantitativas de células o proteínas en el LCR se han usado durante décadas para suplementar la evidencia clínica del diagnóstico y para medir los efectos de distintos tratamientos. Alrededor de un 65% de pacientes con EM tienen un exceso de células inflamatorias, fundamentalmente linfocitos, en el LCR. Existen diferentes opiniones acerca de si estas alteraciones son más probables de encontrar durante períodos de mayor actividad de la enfermedad. La distinción es difícil, puesto que la punción lumbar tiende a ser realizada durante el brote, pero, por otro lado, la evolución de la enfermedad,

probablemente reflejada por cambios en el LCR, se correlaciona pobremente con la actividad clínica.

En el LCR se observa un aumento moderado de la celularidad, fundamentalmente a expensas de los linfocitos T, pero también pueden encontrarse elevadas las cifras de células plasmáticas, macrófagos y ocasionalmente leucocitos polimorfonucleares. El número total de células generalmente se encuentra entre 5 y 50/mm³, lo cual dista mucho de los niveles observados en procesos inflamatorios de otra índole, como las meningitis. Mediante estudios de citometría de flujo, se ha visto que estos linfocitos son fundamentalmente células T-CD4⁺ activadas. La síntesis intratecal de inmunoglobulina IgG se encuentra también elevada. El índice de IgG, que se calcula como $\text{IgG LCR} : \text{IgG plasma} / \text{albúmina LCR} : \text{albúmina plasma}$, se encuentra elevado en el 70% de los pacientes con EM. La presencia de bandas oligoclonales de IgG en el LCR (determinadas por isoelectroenfoque, transferencia a membranas de nitrocelulosa e inmunotinción) se detecta en casi un 95% de pacientes (figura 2). Es importante realizar siempre esta electroforesis en paralelo con una muestra de plasma del mismo individuo, ya que en determinadas condiciones existen bandas similares en ambas muestras, indicando que el patrón no se corresponde con una síntesis intratecal de inmunoglobulinas. Teniendo en cuenta estas consideraciones técnicas, la presencia de bandas oligoclonales en el LCR apoya el diagnóstico de EM, aunque no es específica de esta enfermedad, ya que puede aparecer también, entre otras, en la neuroborreliosis, la neurosífilis, infecciones por VIH o enfermedades del tejido conectivo.

Finalmente, un aspecto fundamental dentro del seguimiento clínico de los pacientes con EM, es el del diagnóstico de "alerta" del posible desencadenamiento de un nuevo brote o de una re-exacerbación de la enfermedad. Ello, como veremos más tarde, podría posibilitar determinados tipos de conductas terapéuticas. En este sentido, en los últimos años se han llevado a cabo varios intentos de correlacionar los niveles de citocinas o de moléculas de adhesión solubles y receptores solubles de citocinas con el desencadenamiento de las crisis (Beck, 1988; Maimone, 1991; Sharief, 1991; Trotter, 1991; Tsukada, 1991, 1993; Chofflon, 1992; Rudick, 1992; Suzumara, 1993; Maimone, 1993; Gusev, 1994; Rieckman,

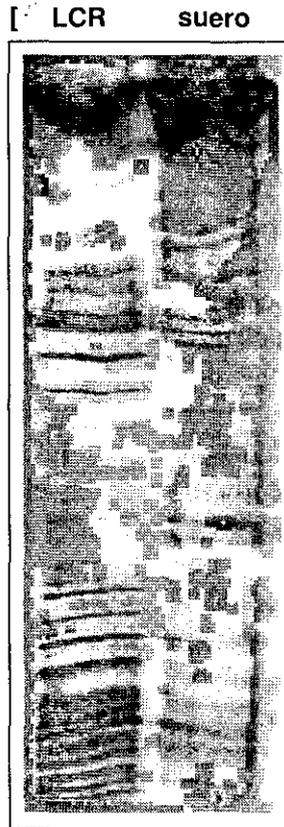


Figura 2.- Isoelectroenfoque del LCR y el suero en un paciente con esclerosis múltiple. Se observan múltiples bandas oligoclonales solamente en la muestra del LCR.

1994, 1995). Estas valoraciones se han realizado en muestras de suero, plasma y LCR o incluso tras estimulación de sangre completa *ex vivo* con mitógenos y/o antígenos específicos. Algunos de los resultados son ciertamente esperanzadores, habiéndose observado un aumento en la expresión de RNA mensajero y en la secreción de ciertas citocinas, tales como TNF- α e IFN- γ , precediendo a las manifestaciones clínicas propias de la enfermedad (Beck, 1988; Sharief, 1991; Grau, 1992; Rieckman, 1994; Ocejo-Vinyals, en prensa).

Algunos de estos estudios implican directamente a estas citocinas

en la producción de las lesiones desmielinizantes y basándose en ello se ha planteado la posible utilidad de la determinación periódica de los niveles de ciertas linfocinas para monitorizar la evolución clínica de la enfermedad. Algunas críticas pueden hacerse a estos trabajos. Por un lado, la mayor parte de los estudios se han realizado en pacientes en los que se había retirado cualquier tratamiento de tipo inmunosupresor. Esta actitud conlleva el hecho de dejar a los pacientes expuestos a la evolución natural de la enfermedad durante el tiempo de seguimiento del estudio, en general durante más de un año, con el consiguiente riesgo de un empeoramiento acelerado de su situación clínica. Además, la posible aplicación de estos resultados a la práctica médica habitual es muy cuestionable, teniendo en cuenta que los pacientes con EM reciben habitualmente una o más drogas inmunosupresoras. Finalmente, ninguno de estos estudios distingue entre brote clínico y re-exacerbación, circunstancias que parecen tener un mecanismo fisiopatológico distinto.

En un estudio reciente, hemos demostrado que la sensibilidad de la determinación de los niveles de TNF- α , producidos *ex vivo* tras estimulación de sangre completa con mitógenos (fitohemaglutinina), no es tan útil para la predicción de la evolución clínica de la EM como la encontrada anteriormente por otros autores. Nosotros hemos realizado el seguimiento de un amplio grupo de pacientes durante dos años, la mayoría de los cuales recibió tratamiento con alguna droga inmunosupresora a lo largo o en algún momento del estudio. Los resultados demuestran una elevación en los niveles de TNF- α precediendo a la aparición de un brote clínico en casi un 80% de los casos. Sin embargo esta sensibilidad es mucho menor (alrededor del 15%) si se analizan las re-exacerbaciones. Estos datos apoyarían la idea de mecanismos fisiopatológicos distintos en los brotes y en las re-exacerbaciones. Por otra parte, la especificidad del ensayo no es tan alta como la encontrada por otros autores. Así, fue muy elevada la frecuencia de incrementos en los niveles de TNF- α que no fueron seguidas de un aumento en la actividad clínica de la enfermedad. Este último dato podría indicar la existencia de brotes subclínicos, hecho que ha sido demostrado en estudios de RMN. No obstante, aún son necesarios estudios más amplios y de mayor duración para confirmar o desestimar la utilidad de estos parámetros en la predicción de las

exacerbaciones clínicas en la EM.

Recientemente, se ha mostrado que la cuantificación en orina de proteínas semejantes a la PBM, podría servir como un marcador para detectar re-exacerbaciones o indicar la transición a una fase progresiva de la EM (Whitaker, 1995).

6. TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

A pesar de la evidente base inmunológica en la patogenia de la EM y del conocimiento cada día mayor de los mecanismos de control de la respuesta inmunológica, el desarrollo de herramientas terapéuticas que permitan, no ya una curación de la enfermedad, sino un control eficaz de la misma, dista aún mucho de ser satisfactorio. Se han realizado numerosos intentos terapéuticos actuando sobre el sistema inmune en general o en zonas selectivas del mismo. Las primeras drogas inmunomoduladoras que se utilizaron, fueron los glucocorticoides y las drogas inmunosupresoras clásicas (ciclofosfamida, azatioprina, metotrexate, clorambucil, mitroxantona). Estas drogas siguen ocupando actualmente un papel central en la terapéutica de la EM. Otra maniobra terapéutica global sobre la respuesta inmunológica ha sido la irradiación, aunque su uso fue rápidamente abandonado por la elevada incidencia de efectos adversos.

En la actualidad se están llevando a cabo una serie de ensayos clínicos con inmunomoduladores :

- Modificación del microambiente en el que se desenvuelve la respuesta inmunológica, mediante la utilización de plasmaféresis y administración de inmunoglobulinas intravenosas.
- Alteración de los procesos que rodean la presentación antigénica, mediante administración de inhibidores de proteinasas, agentes bloqueantes del MHC, epítomos modificados o anticuerpos frente a las moléculas de clase II del MHC.
- Alteración de otros procesos de la respuesta inmunológica, como la proliferación celular o la llegada de células inmunocompetentes a los tejidos inflamados. En este sentido, se han empleado: la vacunación con células T, citocinas supresoras, antagonistas de receptores, la inmunización con péptidos del TCR, o la administración de anticuerpos monoclonales

dirigidos frente a distintas moléculas (CD3, CD4, TCR, moléculas de adhesión, CTLA-4, citocinas) o agentes anti-linfocíticos:

Más que sentar las pautas terapéuticas habituales en el tratamiento de la EM, en este capítulo se pretende comentar con mayor amplitud una serie de opciones que en un futuro próximo pudieran tener utilidad terapéutica: el interferón- β 1b, el copolímero-1 y la tolerización por vía oral frente a la mielina o a productos derivados de la misma.

6.1. El interferón-beta-1b (IFN- β 1b) en el tratamiento de la EM

En el año 1990 se comenzó un ensayo multicéntrico en 372 pacientes con EM recurrente-remitente los cuales fueron divididos, de forma randomizada, en tres grupos, uno de los cuales recibió placebo, mientras en los otros dos se utilizaron bien dosis altas [8 millones de unidades internacionales (MIU)] o dosis bajas (1,6 MIU) de IFN- β 1b (IFN- β Multiple Sclerosis Study Group, 1995. *Neurology*. 45, 1277). El tiempo medio de seguimiento fué de 46 meses. En este estudio se puso en evidencia una disminución de la frecuencia y severidad de los brotes clínicos, así como un claro descenso de la actividad en los estudios de RMN. Además, los pacientes estuvieron prácticamente libres de efectos colaterales. Con el tratamiento de 8 MIU de IFN- β 1b la tasa de exacerbaciones se reduce en una tercera parte comparado con el grupo placebo.

En un 38% de pacientes aparecieron anticuerpos neutralizantes anti-interferón alrededor del tercer año de tratamiento. Este hecho debería de haberse asociado a una disminución de la eficacia del tratamiento. Sin embargo, la reducción en la tasa de exacerbación se aproxima a un 50% en el grupo de 8 MIU que no presentan anticuerpos neutralizantes. En resumen, estos estudios muestran que la administración de IFN- β 1b a dosis de 8 MIU consigue frenar la progresión de la enfermedad, abriendo una perspectiva esperanzadora en el tratamiento de la EM. No obstante, queda por definir la capacidad del IFN- β 1b para interferir a más largo plazo en la progresión de la enfermedad, siendo necesarios estudios más largos para valorar con mayor precisión la eficacia de este tipo de tratamiento.

6.2. Tratamiento de la EM con copolímero 1 (COP-1) (The Copolymer 1 MS Study Group, Neurology, 1995, 45, 1268)

El COP-1 es una sustancia constituida por varios péptidos inmunogénicos de la PBM, que se asemeja bastante a la estructura antigénica de ésta. Por lo tanto, podría reaccionar de forma cruzada con anticuerpos y linfocitos T generados frente a la PBM. Este compuesto podría también inducir *in vivo* la generación de células supresoras específicas de la PBM. Datos recientes, sugieren que el COP-1 puede unirse directamente a proteínas de clase II del MHC y ejercer un efecto de inhibición competitiva en la presentación de péptidos encefalitogénicos de la PBM y otros antígenos relacionados.

Recientemente se ha realizado un estudio multicéntrico, en el que 125 pacientes con EM remitente-recurrente, con incapacidad leve, fueron tratados con COP-1 mediante inyección subcutánea diaria de 20 mg, durante 2 años. Este estudio se realizó a doble ciego, administrando placebo a otros 126 enfermos. Los resultados mostraron una disminución en la frecuencia de brotes en los pacientes que recibieron tratamiento con COP-1 ($1,19 \pm 0,13$) con respecto a aquellos que recibieron placebo ($1,68 \pm 0,13$), (29% de reducción, $p = 0,007$). Además los enfermos tratados con COP-1 mostraron mejoría en su incapacidad. La tendencia en la proporción de pacientes libres de brotes y el tiempo medio hasta la aparición del primer brote era superior en los pacientes tratados. El tratamiento fue bien tolerado y los efectos secundarios despreciables (ligeras reacciones locales en el lugar de inyección). Este riguroso estudio ha confirmado los hallazgos de otro estudio piloto previo y ha demostrado que el tratamiento con COP-1 puede alterar de forma significativa y beneficiosa el curso de la EM recurrente-remitente, con una buena tolerancia al tratamiento

6.3. Tratamiento de enfermedades autoinmunes órgano-específicas mediante administración oral de autoantígenos.

El fenómeno de la tolerancia oral fue descrito en 1911 por Wells como una situación en la cual una reacción de anafilaxia, provocada por inyección i.v. de clara de huevo en cobayas, podía ser prevenida mediante la alimentación con proteínas de la clara de huevo (Wells, 1911).

Posteriormente Chase, en 1946, consiguió suprimir un cuadro de dermatitis de contacto administrando previamente el agente sensibilizante con la alimentación. Desde entonces, se han realizado numerosos estudios encaminados al tratamiento de ciertas enfermedades, particularmente de origen autoinmune, mediante este tipo de intervención terapéutica (Mowat, 1987; Weiner, 1992).

La tolerancia oral se fundamenta en el hecho de que la puerta de entrada del antígeno sea el tejido linfoide asociado a la mucosa del intestino, es decir, las placas de Peyer. Este tejido consiste en nódulos linfoides, con una estructura perfectamente organizada como se observa en otros órganos linfoides secundarios. Estos acúmulos están recubiertos por células epiteliales membranosas que captan y transfieren el antígeno a los macrófagos y células dendríticas subyacentes. Las células más abundantes son los linfocitos T en la zona más alejada de la mucosa y los linfocitos B, próximos a la mucosa y capaces de organizar centros germinales de proliferación similares a los del bazo o ganglios linfáticos.

El mecanismo de tolerancia que actúe a estos niveles no afecta a las líneas germinales, sino que es adquirido a nivel periférico. Se han propuesto tres mecanismos para explicar la tolerancia a antígenos administrados a través de esta vía (Kroemer, 1992; Miller, 1992):

- 1º) **Eliminación clonal.** Aunque este fenómeno puede ocurrir sobre células T y B maduras y por lo tanto debe ser considerado entre los posibles mecanismos que expliquen la tolerancia oral, la mayor parte de las investigaciones apuntan hacia un papel preponderante de los otros dos mecanismos (Friedman, 1993).
- 2º) **Anergia clonal.** El factor determinante del tipo de mecanismo de tolerancia periférica que sigue a la administración oral del antígeno parece ser la dosis del mismo. Bajas dosis de antígeno inducen la generación de una supresión activa o tolerancia dirigida por células reguladoras, mientras que altas dosis de antígeno favorecen los fenómenos de tolerancia oral mediados por anergia. La administración oral de altas dosis de antígeno da lugar a una presentación sistémica del antígeno después de que éste haya pasado a través de la pared intestinal y entrado en la circulación general, bien como proteína intacta, o como fragmentos antigénicos. Altas dosis de antígeno inducen una falta de respuesta de las células Th1

proinflamatorias, principalmente a través de una anergia de clones reactivos. Los mecanismos que subyacen en este fenómeno aún no han sido completamente esclarecidos.

- 3º) **Supresión activa.** Este mecanismo se fundamenta en la intervención de células reguladoras, las cuales, tras un reconocimiento del antígeno sobre las células presentadoras, secretan una citocina supresora, el TGF β . Además, se produce una respuesta de los linfocitos T siguiendo un patrón de activación de tipo Th2, con la consiguiente secreción de IL-4 e IL-10. Estas células reguladoras específicas del antígeno serán capaces de migrar hacia órganos linfoides y suprimir respuestas inmunes, al interferir la generación de células efectoras. Igualmente podrán dirigirse hacia los órganos diana y suprimir la enfermedad liberando citocinas con actividad inhibitoria (supresión "bystander"). Estos dos mecanismos de tolerancia no son excluyentes entre sí, pudiendo ocurrir simultáneamente.

En distintos modelos animales de EM, la administración oral de PBM o de fragmentos inmunogénicos con actividad encefalitogénica derivados de la PBM, consigue prevenir e incluso revertir los síntomas de la enfermedad (Higgins, 1988; Bitar, 1988; Fuller, 1990; Brod, 1992; Miller, 1992). Basándose en estos hallazgos, se comenzaron una serie de estudios preliminares en pacientes con EM. Durante los años 1992-1993, Weiner y cols. trataron a 30 pacientes con EM recurrente-remitente, mediante la administración oral de 300 mg/día de mielina bovina, durante un año. Los resultados demostraron una disminución en el número de células reactivas frente a PBM en la sangre de pacientes con EM tratados con mielina, comparado con aquellos a los que se les administró un placebo. No hubo evidencia de sensibilización a la mielina bovina, según se constató al final del estudio, por la ausencia de anticuerpos frente a PBM o PLP y por la falta de aumento en la respuesta proliferativa in vitro frente al antígeno. Se observó que 12 de 15 pacientes que recibieron placebo tuvieron brotes de EM, mientras que sólo 6 de 15, en el grupo tratado con mielina, presentaron brotes ($p = 0,06$). En principio, parecía que los varones y los individuos DR2 respondían mejor a la tolerización. Sin embargo, el tamaño de la muestra era muy pequeño, el tiempo de seguimiento muy corto y la evaluación de los resultados un tanto grosera.

Estos trabajos han estimulado finalmente la realización de un estudio prospectivo multicéntrico, controlado y a doble ciego, en 300 pacientes con una forma recurrente-remitente de la enfermedad. Este estudio es randomizado para el haplotipo DR. Es de esperar que los primeros resultados de este trabajo aparezcan en breve.

6.4. Otras perspectivas futuras en el tratamiento de la EM.

En el momento actual no se vislumbran aún soluciones definitivas al problema de la EM. No obstante, el continuo avance de los conocimientos sobre esta enfermedad hace probable que una convergencia de ideas de origen inmunológico, neurobiológico, genético, neurorradiológico y de experimentación animal aclaren completamente los mecanismos patogénicos y sugieran vías para estabilizar la evolución de la enfermedad, reparar el daño neurológico y prevenir la EM. Seguidamente se comentan algunas de las líneas de investigación, con un enfoque eminentemente terapéutico, que se siguen en la actualidad en diversos grupos.

6.4.1. Limitación del daño neurológico.

Puesto que resolver el problema de la EM en individuos con afectación severa requiere limitar el proceso inflamatorio y reparar la lesión, parece poco sensato elaborar estrategias para potenciar los procesos de reparación sin haber frenado previamente la evolución de la enfermedad. Igualmente, controlar la evolución de la enfermedad sin intentar restaurar el daño estructural y funcional es poco ambicioso. En este sentido se está investigando el efecto de anticuerpos monoclonales anti-CD4 linfocitotóxicos de tipo quimérico, aunque los resultados no parecen muy esperanzadores. Estos anticuerpos intentarían interferir con los mecanismos de reclutamiento o activación de los linfocitos implicados en la producción del daño neurológico y por otro lado carecerían de los efectos secundarios de los anticuerpos monoclonales clásicos. El uso de anticuerpos linfocitotóxicos humanizados representa uno de los nuevos métodos de tratamiento inmunológico dirigido, que es de esperar, aumente el beneficio terapéutico y disminuya los efectos adversos de otros tratamientos menos específicos. Los anticuerpos quiméricos son aquellos

cuyo fragmento Fab de la molécula anti-humana, generalmente de origen murina, está unida a un fragmento Fc humano (mediante técnicas de ingeniería genética). En este sentido, también se ha utilizado un anticuerpo monoclonal "humanizado" dirigido contra linfocitos T (CAMPATH-1H) en una serie de pacientes, que aunque escasa, parece haber tenido buenos resultados (Moreau, datos no publicados). Este tipo de tratamiento abre las puertas a otros, en los cuales las moléculas diana, puedan ser efectoras en el daño de la vaina de mielina (anti-TNF α , anti-IFN γ , etc.)

6.4.2. *Estímulo de la remielinización*

Estudios histológicos en EM han mostrado que la remielinización es una característica de la lesión postinflamatoria temprana, e incluso una alta proporción, si no todas, las áreas de inflamación maduran hacia áreas de desmielinización con cicatrización astrocítica y degeneración axonal. La remielinización transitoria en las placas subagudas arroja una importante cuestión sobre cuál es la célula responsable de este proceso de reparación. Una serie de estudios han revelado que esta célula es una célula glial precursora y no el oligodendrocito maduro. Las células progenitoras mantienen la capacidad de proliferar, migrar, y diferenciarse en respuesta a diferentes factores de crecimiento y diferenciación. Terapias potenciales con factores de crecimiento (factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor básico de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento semejante a la insulina-1, factor de transformación de células nerviosas, factor inhibidor leucocitario, NT3, etc.) podrían estimular estos procesos de reparación. En este sentido, se han iniciado varias líneas de investigación cuyos resultados aclararán en parte estas cuestiones (Grinspan, 1994).

6.4.3. *Implantes gliales*

En modelos experimentales se está utilizando esta técnica con diferentes resultados, dependiendo del tipo celular implantado (Blakemore, 1991). Estudios experimentales usando lesiones en las cuales la inyección focal de bromuro de etidio en médula espinal de ratas daba lugar a regiones gliopénicas desmielinizadas; esto permitía a las células de

Schwann vecinas migrar alrededor de la lesión y dar lugar a un cierto grado de remielinización. El implante en estas lesiones de una mezcla de células que contenía un número razonable de células gliales no aumentaba la remielinización, puesto que las células de Schwann competían y evitaban que los oligodendrocitos pudieran alcanzar los axones desnudos. Experimentalmente, este fenómeno de inhibición pudo ser superado irradiando la lesión, evitando así que las células de Schwann alcanzasen ésta. Injertando posteriormente estas áreas, se pudo observar un aumento de la remielinización por acción de los oligodendrocitos (Blakemore, 1988, 1991). Otros estudios posteriores han permitido conocer más en profundidad aspectos relacionados con este tipo de intervención (Franklin, 1991; Groves, 1993). En general, los datos obtenidos permiten albergar cierto optimismo y es de esperar que la utilización de esta técnica, implantando células progenitoras junto con la administración de factores que potencien la remielinización pueda en un futuro próximo mejorar las expectativas de regeneración de las áreas desmielinizadas.

6.4.4. Prevención de la EM mediante terapia génica

Existen escasas perspectivas de que los descubrimientos sobre la causa o causas de la EM sean inminentes o que estas líneas de investigación proporcionen nuevas estrategias de cara a la prevención de esta enfermedad. Aunque los genes implicados que determinan la susceptibilidad puedan ser caracterizados en breve, estos no parecen ser genes mutantes susceptibles de establecer pautas de terapia génica; más bien parece que la causa pueda radicar en polimorfismos normales cuyos productos son claves para la integridad de sistemas fisiológicos vitales.

El riesgo de recurrencia en parientes de pacientes con EM es consistente con un modelo en el cual más de un gen contribuya a la susceptibilidad. Las evidencias obtenidas en estudios de poblaciones, analizadas conjuntamente con los estudios de ligamiento genético en familias, confirman la implicación de que varios genes participan en la patogenia de la EM, uno o más de los cuales regula la restricción genética de la respuesta inmune. La contribución aportada por aquellos genes de susceptibilidad que han sido identificados, actuando de forma independiente o combinada, puede solamente dar cuenta de una proporción del

riesgo aumentado de EM en estudios familiares y parece probable que otra serie de genes, aún no identificados, contribuyan de igual modo a la susceptibilidad a padecer EM. Aunque se han propuesto varios genes candidatos, existen escasas perspectivas de identificar, en individuos susceptibles, un desencadenante de la enfermedad que pudiera ser diana para procedimientos de manipulación genética. No obstante, los sorprendentes avances en los últimos años en este terreno permiten tener esperanzas, a medio o largo plazo, para el hallazgo de una terapia genética en el tratamiento de la EM u otras enfermedades autoinmunes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Fundación de Esclerosis Múltiple la concesión de una Beca Cajal de Investigación básica y/o clínica en Esclerosis Múltiple a Javier Gonzalo Ocejo Vinyals. Queremos agradecer especialmente al Dr Julio Miró Jornet su enorme y desinteresada dedicación a los pacientes con esclerosis múltiple. Sobre esta enfermedad él nos ha enseñado muchas cosas, algunas de las cuales, fruto de más de 10 años de experiencia en el tema, no vienen en ningún libro.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ACHENSON, E.D. (1977) *Brit. Med. Bull.* 33, 9.
- (2) ADAMS, C.W.; POSTON, R.N.; BUK, S.J. (1989) *J. Natural. Sci.* 92, 291.
- (3) ALLEN, I.V.; KIRK, J. (1992) In: Adams, J.H., Duchen, L.W. eds. *Greenfield's neuropathology, fifth edition*, 447.
- (4) AMOR, S.; BAKER, D.; GROOME, N. ET AL. (1993) *J. Immunol.* 150, 5666.
- (5) ANDERSEN, O.; LYGNER, P-E.; BERGSTRÖM, T. ET AL. (1993). *J. Neurol.* 240, 417.
- (6) BAIG, S.; OLSSON, T.; YU, P.J. ET AL. (1991) *Scand. J. Immunol.* 33, 73.
- (7) BAKER, D.; O'NEILL, J.K.; GSCHMEISSNER, S.E. ET AL. (1990) *J. Neuroimmunol.* 28, 261.
- (8) BARNED, S.; GOODMAN, A.D.; MATTSON, D.H. (1995) *Neurology.* 45, 384.
- (9) BEBBE, G.W.; KURTZKE, J.F.; KURLAND, L.T. ET AL. (1967) *Neurology.* 17, 1.
- (10) BECK, J.; RONDOT, P.; CATINOT, L. ET AL. (1988) *Acta Neurol. Scand.* 78, 318.
- (11) BEN-NUN, A.; WEKERLE, H.; COHEN, I.R. (1981) *Eur. J. Immunol.* 11, 195.
- (12) BEN-NUN, A.; LIBLAU, R.S.; COHEN, L. ET AL. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 2466.
- (13) BIRNBAUM, G.; KOTILINEK, L; ALBRECHT, L. (1993) *Ann. Neurol.* 34, 18

- (14) BITAR, D.M.; WHITACRE, C.C. (1988) *Cell. Immunol.* 112, 364.
- (15) BLAKEMORE, W.F.; CRANG, A.J. (1988) *Dev. Neurosci.* 10, 1.
- (16) BLAKEMORE, W.F.; FRANKLIN, R.J.M. (1991) *Trends Neurosci.* 14, 323
- (17) BRAIN, W.R. (1930) *Quart. J. Med.* 23, 343.
- (18) BRICKNER, R.M. (1931) *Bull. Neurol. Inst. N.Y.* 1, 105.
- (19) BROCKE, S.; GAUR, A.; PIERCY, C. ET AL. (1993) *Nature.* 365, 642.
- (20) BROD, S.A.; PURVEE, M.; BENJAMIN, D. ET AL. (1990) *Eur. J. Immunol.* 20, 2259.
- (21) BROD, S.A.; AL-SABBGH, A.; SOBEL, R.A. ET AL. (1992) *Ann. Neurol.* 29, 615.
- (22) BULLOCK, W.E. (1913) *Lancet.* 2, 1185.
- (23) CARSWELL, R. (1838) In: London, Longman, Orme, Brown, Green and Longman.
- (24) CHARCOT, J.-M. (1868) *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 20, 13.
- (25) CHARCOT, J.-M. (1868) *Gaz. Hôp. (Paris)* 41, 554, 557, 566.
- (26) CHARCOT, J.-M. (1877) In: The New Sydenham Society.
- (27) CHASE, M.W. (1946) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 61, 257.
- (28) CHOFFLON, M.; JUILLARD, C.; JUILLARD, P. ET AL. (1992) *Eur. Cytokine Netw.* 3, 523.
- (29) CRUVEILHIER, J. (1829-1842) In: J. B. Baillière. Paris.
- (30) CURSCHMANN, H. (1920) *Dtsch. Z. Nervenheilk.* 66, 225.
- (31) CURTIUS, F. (1933) In: Thieme, Leipzig.
- (32) DATTNER, B. (1937) *Wien. Klin. Wschr.* 50, 87.
- (33) DAVISON, A.W.; WAJDA, M. (1962) *J. Neurochem.* 9, 427.
- (34) DEAN, G.; KURTZKE, J.F. (1971) *Br. Med. J.* 3, 725.
- (35) DEKKER, J.W.; EASTEAL, S.; JAKOBSEN, I.B. ET AL. (1993) *Tissue Antigens.* 41, 31.
- (36) DENISOVA, N.A. (1990) *Int. J. Biochem.* 22, 439.
- (37) ENDOH, M.; TABIRA, T.; KUNISHITA, T. (1986) *J. Neurol. Sci.* 73, 31.
- (38) ENDOH, M.; TABIRA, T.; KUNISHITA, T. ET AL. (1986) *J. Immunol.* 137, 3832.
- (39) EDWARDS, A.M.; BRAUN, P.E.; BELL, J.C. (1989) *J. Neurochem.* 52, 317.
- (40) FIERZ, W.; ENDLER, B.; RESKE, K. ET AL. (1985) *J. Immunol.* 134, 3785.
- (41) FONTANA, A.; FIERZ, W.; WERLEKE, H. (1984) *Nature.* 307, 273.
- (42) FRANKLIN, C.R.; BRICKNER, R.B. (1947) *Arch. Neurol. Psychiat (Chic.)* 58, 125.
- (43) FRANKLIN, R.J.M.; CRANG, A.J.; BLAKEMORE, W.F. (1991) *J. Neurocytol.* 20, 420.
- (44) FREEDMAN, M.; RUIJS, T.; SELIN, L. ET AL. (1991) *Ann. Neurol.* 30, 794.
- (45) FREEMAN, G.J.; GRIBBEN, J.G.; BOUSSIOTIS, V.A. ET AL. (1993) *Science.* 262, 909.
- (46) FRIEDMAN, A.; WEINER, H.L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*
- (47) FRITZ, R.B.; MCFARLIN, D.E. (1989) In: Sercarz, E. ed. Antigenic determinants and immune regulation, Karger, Basel, 101.
- (48) FRITZ, R.B.; SKEEN, M.J.; CHOU, C.H.J. ET AL. (1985) *J. Immunol.* 134, 2328.
- (49) FUJINAMI, R.S.; OLDSTONE, M.B.A. (1985) *Science.* 230, 1043.
- (50) FULLER, K.A.; PEARL, D.; WHITACRE, C.C. (1990) *J. Neuroimmunol.* 28, 15.
- (51) GAJDUSEK, D.C.; GIBBS, C.J.; ALPERS, M. (1965) In: Washington, D.C., U.S. Department of Health, Education and Welfare.
- (52) GAO, Y.L.; RAINE, C.S.; BROSANAN, C.F. (1994) *Neurology.* 44, 941.

- (53) GOWERS, W.R. (1888) In: J. and A. Churchill, London.
- (54) GREER, J.; KUCHROO, V.; SOBEL, R. ET AL. (1992) *J. Immunol.* 149, 783.
- (55) GRINSPAN, J.B.; STERN, J.; FRANCESCHINI, B. ET AL. (1994) *Ann. Neurol.* 36, S140.
- (56) GROVES, A.K.; BARNETT, S.C.; FRANKLIN, R.J.M. (1993) *Nature.* 362, 453.
- (57) GUSEV, E.I.; DEMINA, T.L.; BOIKO, A.N. ET AL. (1994) *J. Neurol.* 241, 500.
- (58) GYE, W.E. (1921) *Brain.* 44, 213.
- (59) HADER, W.J.; ELLIOT, M.; EBERS, G.C. (1988) *Neurology.* 38, 617.
- (60) HAEGERT, D.G.; MARROSU, M.G. (1994). *Ann. Neurol.* 36 (S2), S204.
- (61) HAFLER, D.A.; DUBY, A.D.; LEE, S.J. ET AL. (1988) *J. Exp. Med.* 167, 1313.
- (62) HICKEY, W.F.; KIMURA, H.P. (1988) *Science.* 239, 290.
- (63) HIGGINS, P.; WEINER, H.L. (1988) *J. Immunol.* 140, 440.
- (64) HILLERT, J.; LENG, C.; OLERUP, O. (1992) *Neurology.* 42, 80.
- (65) HOFMAN, F.M.; VON HANWEHR, R.I.; DINARELLO, C.A. ET AL. (1986) *J. Immunol.* 136, 3239.
- (66) HOFMAN, F.M.; HINTON, D.R.; JOHNSON, K. ET AL. (1989) *J. Exp. Med.* 170, 607.
- (67) HOLMDAHL, R.; VINGSBO, C.; MO, J.A. ET AL. (1995) *Immunol. Rev.* 144, 109.
- (68) HORACK, H.M. (1930) *Am. J. Med. Sci.* 197, 672.
- (69) HOSEIN, Z.Z.; GILBERT, J.J.; STREJAN, G.H. (1984) In: EAE: A Useful Model for Multiple Sclerosis. New York: Alan R. Liss. pp. 49.
- (70) HUNIG, T.G.; TIEFENTHALER, G.; MEYER, SUM BUSCHENFELDE, K.H. ET AL. (1987) *Nature.* 326, 298.
- (71) IMAMURA, K.; SUZUMURA, A.; HAYASHI, F. ET AL. (1993) *Acta Neurol. Scand.* 87, 281.
- (72) JANSSON, L.; OLSSON, T.; HÖJEBERG, B. ET AL. (1991) *Eur. J. Immunol.* 21, 693.
- (73) JARAQUEMADA, D.; MARTIN, R.; ROSEN BRONSON, S. ET AL. (1990) *J. Immunol.* 145, 2880.
- (74) JOHNSON, D.; HAFLER, D.A.; FALLIS, R.J. ET AL. (1986) *J. Neuroimmunol.* 13, 99.
- (75) JOHNSON, R.T. (1994) *Ann. Neurol.* 36, S54.
- (76) KAMHOLZ, J.; DE FERRA, F.; PUCKETT, C. ET AL. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 4962.
- (77) KASAI, N.; PACHNER, A.R.; YU, R.K. (1986) *J. Neurol. Sci.* 75, 33.
- (78) KELSO, A. (1995) *Immunol. Today.* 16, 374.
- (79) KERLERO, DRN; HONEGGER, P.; LASSMANN, H. ET AL. (1990) *J. Neurochem.* 55, 583.
- (80) KOREY, S.R. (1959) In: Paul B. Hoeber, Inc., New York.
- (81) KOTZIN, B.L.; KARUTURI, S.; CHOU, Y.K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 9161.
- (82) KROEMER, G.; MARTINEZ, A.C. (1992) *Immunol. Today.* 13, 401.
- (83) KUCHROO, V.K.; SOBEL, R.A.; YAMAMURA, T. ET AL. (1991) *Pathobiology.* 59, 305.
- (84) KUHN, P.; STEINER, G. (1917) *Med. Klin.* 13, 1007.
- (85) KURTZKE, J.F. (1980) *Neurology.* 30, 61.

- (86) LEHMANN, P.V.; FORSTHUBER, T.; MILLER, A. ET AL. (1992) *Nature*. 358, 155.
- (87) LEHOCZKY, T. (1957) *Postgrad. Med.* 21, 69.
- (88) LEVINE, S.; SOWINSKI, R. (1973) *J. Immunol.* 110, 139.
- (89) LI, F.; LINAN, M.J.; STEIN, M.C. ET AL. (1995) *Ann. Neurol.* 38, 147.
- (90) LININGTON, C.; ENGELHARDT, B.; KAPOCS, G. ET AL. (1992) *J. Neuroimmunol.* 40, 2.
- (91) LININGTON, C.; BERGER, T.; PERRY, L. ET AL. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23, 1364.
- (92) LINK, J.; FREDRIKSON, S.; SÖDERSTRÖM, M. ET AL. (1994) *Ann. Neurol.* 35, 197.
- (93) LINK, J.; SÖDERSTRÖM, M.; OLSSON, T. ET AL. (1994) *Ann. Neurol.* 36, 379.
- (94) LISAK, R.P.; ZWEIMAN, B. (1977) *N. Engl. J. Med.* 297, 850.
- (95) MAIMONE, D.; GREGORY, S.; ARNASON B.G.W. ET AL. (1991) *J. Neuroimmunol.* 32, 67.
- (96) MAIMONE, D.; REDER, A.T.; GREGORY, S. (1993) *Cell. Immunol.* 146, 96.
- (97) MARBURG, O. (1906) *Jb. Psychiat. Neurol.* 27, 213.
- (98) MARIE, P. (1884) *Prog. méd.* (Paris) 12, 287, 305, 349, 365.
- (99) MARTIN, R.; HOWELL, M.D.; JARAQUEMADA, D. ET AL. (1991) *J. Exp. Med.* 173, 19.
- (100) MATTHEWS, W.B.; COMPSTON, A.; ALLEN, I.V. ET AL (1991) In: McAlpine's Multiple sclerosis. Churchill Livingstone.
- (101) MAUGH, T.H. (1977) *Science*. 195, 969.
- (102) MEUER, S.C.; HUSSEY, R.E.; FABBI, M. (1984) *Cell*. 36, 897.
- (103) MILLER, J.F.A.P.; MORAHAM, G. (1992) *Annu. Rev. Immunol.* 10, 51.
- (104) MILLER, A.; LIDER, O.; AL-SABBGH, A. ET AL. (1992) *J. Neuroimmunol.* 39, 243.
- (105) MOKHTARIAN, F.; MCFARLIN, D.E.; RAINE, C.S. (1984) *Nature*. 309, 356.
- (106) MOSCARELLO, M.A.; BRADY, G.W.; FEIN, D.B. ET AL. (1986) *J. Neurosci. Res.* 15, 87.
- (107) MOSSMANN, T.R.; CHERWINSKY, H.; BOND, M.W. ET AL. (1986) *J. Immunol.* 136, 2348.
- (108) MOWAT, A.M. (1987) *Immunol. Today*. 8, 93.
- (109) MÜLLER, E. (1904) In: G. Fischer, Jena.
- (110) MUSTAFA, M.; VINGSBO, C; OLSSON, T. ET AL. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23, 3089.
- (111) MUSTAFA, M.; VINGSBO, C; OLSSON, T. ET AL. (1994) *J. Immunol.* 153, 3337.
- (112) NAVIKAS, V.; LINK, J.; PALASIK, W. ET AL. (1995) *Scand. J. Immunol.* 41, 171.
- (113) OFFNER, H.; HASHIM, G.A.; CELNIK, B. ET AL. (1989) *J. Exp. Med.* 170, 355.
- (114) OKSENBERG, J.R.; SHERRITT, M.; BEGOVICH, A.B. ET AL. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 988.
- (115) OKSENBERG, J.R.; STUART, S.; BEGOVICH, A.B. ET AL. (1990) *Nature*. 345, 344.
- (116) OLSSON, T; WANG, W.Z.; HÖJEBERG, B. ET AL. (1990) *J. Clin. Invest.* 86, 981.
- (117) OPPENHEIM, J. (1887) *Berl. Klin. Wschr.* 24, 904.
- (118) OTA, K.; MATSUI, M.; MILFORD, E.L. ET AL. (1990) *Nature*. 346, 183.
- (119) PANITCH, H.S.; HIRSCH, R.L.; SCHINDLER, J. ET AL. (1987) *Neurology*. 37, 1097.
- (120) PANITCH, H.S. (1994) *Ann. Neurol.* 36, S25.

- (121) PETTE, M.; FUJITA, K.; WILKINSON, D. ET AL. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 7968.
- (122) PETTINELLI, C.B.; FRITZ, R.B.; CHOU, C.H.J. ET AL. (1982) *J. Immunol.* 129, 1209.
- (123) POSER, C.M. (1986) *Acta Neuropathol.* 71, 1.
- (124) POSER, C.M. (1994) *Ann. Neurol.* 36 (S2), S231.
- (125) PRINEAS, J.W.; RAINE, C.S. (1976) *Neurology.* 26, 29.
- (126) PRINEAS, J.W.; WRIGHT, R.G. (1978) *Lab. Invest.* 38, 409.
- (127) PULLEN, A.M.; WADE, T.; MARRACK, P. ET AL. (1990) *Cell.* 61, 1365.
- (128) PUTNAM, T.J. (1933) *New Engl. J. Med.* 209, 786.
- (129) REESE, H.H. (1952) *Amer. J. Med.* 12, 572.
- (130) RIECKMAN, P.; ALBRECHT, M.; KITZE, B. ET AL. (1994) *Neurology.* 44, 1523.
- (131) RIECKMAN, P.; MARTIN, S.; WEICHELSEBRAUN, I. ET AL (1994) *Neurology.* 44, 2367.
- (132) RIECKMAN, P.; ALBRECHT, M.; KITZE, B. ET AL. (1995) *Ann. Neurol.* 37, 82.
- (133) ROMAGNANI, S. (1994) *Ann. Rev. Immunol.* 12, 227.
- (134) ROSATI, G. (1994) *Ann. Neurol.* 36 (S2), S164.
- (135) ROSE, A.S.; PEARSON, C.M. (1963) In: McGraw-Hill Book Co., New York.
- (136) ROTH, H.J.; KRONQUIST, K.E.; KERLERO DE ROSBO, N. ET AL. (1987) *J. Neurosci. Res.* 17, 321.
- (137) RUDICK, R.A.; RANSOHOFF, R.M. (1992) *Arch. Neurol.* 49, 265.
- (138) RUNMAKER, B.; MARTINSSON, T; WAHLSTRÖM, J. ET AL (1994) *J. Neurol.* 241, 385.
- (139) SADOVMICK, A.D. (1994) *Ann. Neurol.* 36 (S2), S194.
- (140) SAKAI, K.; ZAMVIL, S.S; MITCHEL, D.J. ET AL. (1988) *J. Neuroimmunol.* 19, 21.
- (141) SAPPEY, M.D. (1990) *Magn. Reson. Med.* 15, 229.
- (142) SAYETTA, R.B. (1986) *J. Clin. Lab. Immunol.* 21, 55.
- (143) SCHEINBERG, L.C.; KOREY, S.R. (1962) *Ann. Rev. Med.* 13, 411.
- (144) SCHUMACHER, G.A. (1962) In: A.B. Baker, ed: Clinical neurology, vol.3. New York, Hoeber-Harper, pp. 1226.
- (145) SELMAJ, K.; BROSANAN, C.F.; RAINE, C.S. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 6452.
- (146) SELMAJ, K.; RAINE, C.; CANELLA, B. ET AL. (1991) *J. Clin. Invest.* 87, 949.
- (147) SERCARZ, E.E.; LEHMANN, P.V.; AMETANI, A. ET AL. (1993) *Annu. Rev. Immunol.* 11, 729.
- (148) SEVER, J.L.; KURTZKE, J.F. (1969) *Neurology.* 19, 113.
- (149) SHAH, S.N.; JOHNSON, R.C. (1980) *Exp. Neurol.* 68, 601.
- (150) SHARIEF, M.K.; HENTGES, R. (1991) *New. Engl. J. Med.* 325, 467.
- (151) SHARIEF, M.K.; THOMPSON, E.J. (1992) *J. Neuroimmunol.* 38, 27.
- (152) SHAW, S-Y; LAURSEN, R.A.; LEES, M.B. (1986) *FEBS Lett.* 207, 266.
- (153) SIBLEY, W.A.; BAMFORD, C.R.; CLARK, K. (1985) *Lancet.* 2, 1313.
- (154) SKEGG, D.C.G.; CORWIN, P.A.; CRAVEN, R.S.; MALLOCH, J.A.; POLLOCK, M. (1987) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 50, 134.
- (155) SOBEL, R.A.; TUOHY, V.K.; LU, Z.J. ET AL. (1990) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*

49, 468.

- (156) SOURANDER, P. (1990) *Ups. J. Med. Sci. Suppl.* 48, 145.
- (157) STEINER, G. (1928) *Dtsch. Z. Nervenheilk.* 107, 112.
- (158) STRÜMPELL, A. (1896) *Neurol. Cbl.* 15, 961.
- (159) STUART, G.; KRİKORIAN, K.S. (1928) *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 22, 327.
- (160) TEW, J.G.; KOSCO, M.H.; BURTON, G.F. ET AL. (1990) *Immunol. Rev.* 117, 185.
- (162) TĪWARI, J.L.; TERASAKI, P.I. (1985) In: HLA and disease associations. New York: Springer. 185.
- (163) TRAUGOTT, U; LEBON, P. (1988) *Ann. Neurol.* 24, 243.
- (164) TROTTER, J.L.; CLARK, H.B.; COLLINS, K.G. ET AL. (1987) *J. Neurol. Sci.* 79, 173.
- (165) TROTTER, J.L.; HICKEY, W.F.; VAN DER VEEN, R.C. ET AL. (1991) *J. Neuroimmunol.* 33, 55.
- (166) TROTTER, J.L.; COLLINS, K.G.; VAN DER VEEN, R.C. (1991) *J. Neuroimmunol.* 33, 29.
- (167) TSUKADA, N.; MIYAGI, K.; MATSUDA, M. ET AL. (1991) *J. Neurol. Sci.* 102, 230.
- (168) TSUKADA, N; MATSUDA, M; MIYAGI, K. ET AL. (1993) *Neurology.* 43, 2679.
- (169) TUOHY, V.K.; LU, Z.; SOBEL, R.A. ET AL. (1989) *J. Immunol.* 142, 1523.
- (170) TUOHY, V.K.; SOBEL, R.A.; LU, Z. ET AL. (1992) *J. Neuroimmunol.* 39, 67.
- (171) UTZ, U.; BROOKS, J.A.; MCFARLAND, H.F. ET AL. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 5567.
- (172) VANDERBARK, A.A.; OFFNER, H.; RESHEF, T. ET AL. (1985) *J. Immunol.* 135, 229.
- (173) VULPIAN, E.-F. (1866) *Un. méd. Prat. franç.* 30, 459, 475, 541.
- (174) WEINER, H.L.; MILLER, A.; KHOURY, S.J. ET AL. (1992) In: Progress in Immunology VIII, 8th Int. Congress of Immunology, Budapest, ed. J. Gergely, et al. pp. 627.
- (175) WEINER, H.L.; MACKIN, G.A.; MATSUI, M. ET AL. (1993) *Science.* 259, 1321.
- (176) WEISS, A.; IMBODEN, J.; SHOBACK, D. ET AL. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 4169.
- (177) WELLS, H. (1911) *J. Infect. Dis.* 9, 147.
- (178) WENDER, M; FILIPEK-WENDER, H.; STANISLAWSKA, J. (1974) *Clin. Chim. Acta.* 54, 269.
- (179) WHITAKER, J.N.; KACHELHOFER, R.D.; BRADLEY, E.L. ET AL. (1995) *Ann. Neurol.* 38, 625
- (180) WHITHAM, R.H.; JONES, R.; HASHIM, G.A. ET AL (1991) *J. Immunol.* 147, 3803.
- (181) WHITHAM, R.H.; BOURDETTE, D.N.; HASHIM, G.A. ET AL. (1991) *J. Immunol.* 146, 101.
- (182) WILLIAMS, K.A.; DEBER, C.M. (1993) *Clin. Lab. Sci.* 30, 29.
- (183) WINDHAGEN, A; SCHOLZ, C.; HOLLSBERG, P. ET AL. (1995) *Immunity.* 2, 373.
- (184) WOOD, D.D., MOSCARELLO, M.A. (1984) *J. Membr. Biol.* 79, 195.
- (185) WOODROOFE, M.N.; BELLAMY, A.S.; FELDMANN, M. ET AL. (1986) *J. Neurol. Sci.* 74, 135.
- (186) WUCHERPFENNIG, K.W.; OTA, K.; ENDO, N. ET AL. (1990) *Science.* 248, 1016

- (187) WUCHERPFENNIG, K.W.; WEINER, H.L.; HAFLER, D.A. (1991) *Immunol. Today*. 12, 277.
- (188) WUCHERPFENNIG, K.W.; NEWCOMBE, J; KEDDY, C. ET AL. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89, 4588.
- (189) WUCHERPFENNIG, K.W.; STROMINGER, J.S. (1995) *Cell*. 695.
- (190) YAMAMURA, T.; NAMIKAWA, T.; ENDOH, M. ET AL. (1986) *J. Neurol. Sci.* 76, 269.
- (191) YAMAMURA, T.; NAMIKAWA, T.; ENDOH, M. ET AL. (1986) *J. Neuroimmunol.* 12, 143.
- (192) YU, R.K.; LEDEEN, R.W.; ENG, L.F. (1974) *J. Neurochem.* 23, 169.
- (193) ZAMVIL, S.S.; MITCHEL, D.J.; POWELL, M.B. ET AL. (1988) *J. Exp. Med.* 168, 1181.
- (194) ZHANG, J.; MARKOVIC, S.; RAUS, J. ET AL. (1994) *J. Exp. Med.* 179, 973.

Patología inmune de la coagulación: Los anticoagulantes circulantes

Por

D. ESPINÓS

Cat. de Patología y Clínica Médicas.- Facultad de Medicina.- UCM.

J. ALCALÁ COCHO

Hospital Universitario San Carlos.- Madrid.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN
2. LOS ANTICOAGULANTES CIRCULANTES: VISIÓN GLOBAL.
3. ANTICOAGULANTES CIRCULANTES FRENTE AL FACTOR VIII.
4. INHIBIDORES DEL FACTOR WILLEBRAND.
5. ANTICOAGULANTES ANTIFIBRINÓGENO.
6. INHIBIDORES FRENTE AL FACTOR II.
7. ANTICUERPOS FRENTE AL FACTOR V.
8. INHIBIDORES FRENTE AL FACTOR VII.
9. ANTICOAGULANTES CIRCULANTES FRENTE AL FACTOR IX.
10. INHIBIDORES FRENTE AL FACTOR XI.
11. INHIBIDORES FRENTE AL FACTOR XIII.
12. ANTICUERPOS ANTITROMBINA.
13. ANTICOAGULANTES TIPO HEPARINA.
14. ANTICOAGULANTE LÚPICO.
15. CONSIDERACIÓN FINAL.
16. BIBLIOGRAFÍA.

1. INTRODUCCIÓN

La sangre, cuya misión fundamental es la de transportar oxígeno desde el exterior -los pulmones- al seno de los tejidos, se mantiene en estado fluido, en el interior de los vasos sanguíneos gracias a un perfecto equilibrio que recae en lo que llamamos "balance hemostático". En el balance hemostático, junto a la acción directa de las plaquetas -trombo

plaquetar- y de los vasos -vasoconstricción- la coagulación de la sangre, manifestada por la formación de fibrina, tiene un papel preponderante ya que es la responsable del trombo estable. La fibrina procede del fibrinógeno por la acción enzimática -hidrolítica- de la trombina. Ésta libera dos pequeños fragmentos de cada una de las cadenas α y β , son el "fibrinopéptido A" y el "fibrinopéptido B", que pueden ser valorados en el laboratorio (1).

Por su parte, la "trombina" proviene de la "protrombina". Ésta que es el factor II, se activa a trombina por la acción de la "protrombinasa". La actividad "protrombinasa" es un complejo formado por el factor Va, el factor Xa, los fosfolípidos y el calcio iónico. Este complejo libera dos fragmentos de la molécula de protrombina -factor II- que pueden valorarse y medirse mediante técnicas analíticas. La "protrombinasa" se genera por dos caminos o vías diferentes, la "endógena" y la "exógena". Las dos vías, "endógena" y "exógena", convergen en un punto común que es la activación del factor X. Éste pasa a su forma activa -Xa- por la acción de dos complejos moleculares diferentes, el VIIIa/IXa -vía endógena- y el VIIa/factor tisular -vía exógena-. Los dos complejos moleculares se forman sobre la superficie fosfolipídica del endotelio vascular, lo que potencia tremendamente su activación y su capacidad funcional y además, de este modo, la coagulación queda limitada a la zona en la que se ha producido la activación factorial, lugar de activación por la lesión endotelial, evitando una coagulación más extensa (2).

Junto a estos mecanismos de control-fijación factorial sobre la superficie endotelial y limpieza de factores activados en el balance hemostático por el Sistema Mononuclear Fagocítico existen, por un lado, actividades anticoagulantes y, por otro, un sistema encargado de fragmentar y disolver la fibrina, el sistema de la fibrinólisis. La fibrinólisis es un proceso biológico encargado de eliminar los depósitos de fibrina, se realiza por intervención de la "plasmina", capaz de hidrolizar la fibrina en fragmentos solubles. La plasmina se forma por activación del plasminógeno. El plasminógeno es una glicoproteína de 92.000 dalton. Se encuentra en sangre a una concentración de 200 ng/cc y se activa por la uroquinasa, producida en el riñón, en los fibroblastos y en el pulmón y por un "factor tisular" producido por las células endoteliales, llamado

Activador Tisular del Plasminógeno -tPA-. El tPA se libera por el estrés, la isquemia, la histamina y tiene varios inhibidores. Hay una serie de anticoagulantes fisiológicos que evitan una coagulación masiva, como las antitrombinas, en especial la antitrombina III y la proteína C con su cofactor la proteína S.

En condiciones normales podemos afirmar que existe un auténtico equilibrio entre los potenciales coagulantes, los anticoagulantes y la fibrinolisis. Cuando la actividad coagulante se reduce en relación a los otros dos, habrá tendencia hemorrágica, mientras que si hay incremento de la actividad coagulante o los anticoagulantes y/o la fibrinolisis se reducen, habrá tendencia "trombótica" y hablaremos de "estado pretrombótico" o "trombofilico".

En la clínica encontramos alteraciones del "balance hemostático" tendentes a la hemorragia o a la trombosis. Las hemorragias se producen por reducción de los niveles en sangre de algún o algunos de los factores de la coagulación. Esta situación se produce por trastorno congénito -hereditario- o adquirido -hepatopatías, administración de anticoagulantes-. También, pero mucho menos frecuente, por fallo funcional de algún factor o por alteración de la estructura molecular del factor. También hay hemorragia en las trombopenias y en las trombopatías, así como también cuando hay activación excesiva de la fibrinolisis, situación que aparece en hepatopatías, inflamación.

La trombosis se produce por reducción de dos factores anticoagulantes fisiológicos o por excesiva activación de la coagulación, tal como ocurre en patología vascular.

Un capítulo de la coagulación, pequeño por su escasa frecuencia y relegado a un mínimo comentario en los tratados de Medicina, es el de los anticoagulantes circulantes adquiridos, que aparecen de manera secundaria ante transfusiones, especialmente en enfermos carentes de un factor, o de manera espontánea, ya secundaria o idiopática. Las formas secundarias, las más frecuentes, se producen en el marco de enfermedades con alteración inmunológica y constituyen una verdadera "patología inmune" de la coagulación, más correctamente "AUTOINMUNE".

Hacemos también referencia a un anticoagulante, ciertamente descrito inicialmente como anticoagulante, pero cuya expresión clínica

fundamental es la de originar trombosis. Se trata del anticoagulante lúpico. De todo ello, nos ocupamos en este trabajo sin apenas referencia al tratamiento. Excluimos la patología de base inmune de las plaquetas.

2. LOS ANTICOAGULANTES CIRCULANTES: VISIÓN GLOBAL

Los inhibidores de la coagulación sanguínea, más corrientemente llamados "anticoagulantes circulantes", son proteínas -inmunoglobulinas- que tienen la propiedad de inhibir a un determinado factor coagulante o de bloquear la reacción que produce. En ocasiones, uniéndose al factor de la coagulación aceleran su captación por el Sistema Mononuclear Fagocítico, incrementando así su consumo, con el consiguiente descenso de su nivel en sangre. Estas proteínas son inmunoglobulinas que se comportan como anticuerpos o autoanticuerpos. La más frecuente es la IgG y dentro de ésta, el subgrupo IgG4, pudiendo ser la cadena ligera tanto κ como λ . Es sorprendente que el anticuerpo IgG4 sea el más frecuente, ya que esta inmunoglobulina representan sólo el 4% de ellas. Esto puede deberse, fundamentalmente en los enfermos transfundidos, al estímulo antigénico permanente que representa las repetidas transfusiones (3).

En general los anticuerpos anticoagulantes se producen después de la realización de transfusiones de sangre, plasma o de concentrados factoriales, a individuos con carencia congénita del factor, y por lo tanto, sin la capacidad de reconocimiento de dicha proteína como propia. La tendencia a la aparición de anticuerpos, así como su intensidad es mayor en los enfermos en los que la base genética de su defecto es una "deleción". En otras ocasiones el anticuerpo se produce de un modo secundario, por alteración del mecanismo de la "inmuno-competencia" acompañando, en general, a enfermedades sistémicas o del sistema linfático. Finalmente, los anticoagulantes circulantes pueden aparecer de manera espontánea, sin causa justificada. En el embarazo y, en especial, en el postparto, aparecen anticoagulantes circulantes con relativa frecuencia.

"In vitro", los anticoagulantes circulantes, pueden demostrar su acción inhibidora de manera rápida, casi instantánea, pero en ocasiones

requieren una preincubación de 1-2 horas para actuar, como es el caso de los anticoagulantes frente al factor VIII. Algunos anticoagulantes en su unión con el antígeno activan el complemento, pudiendo desencadenar manifestaciones propias de la "enfermedad del suero". Otros, como se ha señalado más arriba, forman macromoléculas que, con rapidez, son barridas de la circulación por la acción del Sistema Mononuclear Fagocítico, como es el caso de los anticuerpos frente al factor von Willebrand (4).

En los enfermos con déficit factorial congénito es frecuente una respuesta "anamnésica" tras la transfusión de sangre o concentrados factoriales, circunstancia que no se da en los enfermos que adquieren el anticoagulante de manera espontánea, lo que permite más fácilmente la administración de concentrados factoriales cuando la situación hemorrágica es grave. Por otro lado, de una manera global, podemos afirmar que los anticoagulantes que aparecen de forma secundaria o espontánea responden, en gran medida, a la administración de inmunodepresores, esteroides, ciclofosfamida, azotioprina e incluso ciclosporina (3).

3. ANTICOAGULANTES CIRCULANTES FRENTE AL FACTOR VIII

Estos anticoagulantes, los más frecuentes en la clínica, aparecen en los hemofílicos, que han sido tratados con concentrados de Factor VIII, en enfermos afectados de enfermedades inmunológicas, en el postparto y de forma "idiopática". Los anticuerpos son en general policlonales, pero de clonalidad restringida. En su mayoría son IgG, pero pueden ser IgM. Cumpliendo un principio general, el subgrupo IgG4 es el más frecuente, más del 50%, siendo raro el IgG3 y aún más el IgG2. Pueden tener la cadena ligera Kappa o Lambda, pero preferentemente Kappa.

En los hemofílicos aparece el anticoagulante, antiFactor VIII, en el 5-10%, siendo esta cifra del 15% en los hemofílicos con cifras de globulina antihemofílica igual o inferior al 3%. El título de anticoagulante es también mayor en los enfermos con hemofilia grave, siendo más difícil que desaparezca con el tiempo, hecho que puede ocurrir con mayor facilidad en los hemofílicos leves. Por otro lado, algunos hemofílicos tienen una respuesta inmune a las transfusiones de concentrados de factor

VIII de escasa intensidad, son los "respondedores bajos". Hay otros que responden muy intensamente, en especial cuando se repiten las transfusiones. Estos son los "respondedores fuertes", en los que el anticoagulante puede perdurar, incluso más de dos años, aún sin recibir ninguna transfusión. Los enfermos con respuesta intensa, se corresponden con los que tienen como base de su trastorno genético una "deleción", pero por el momento, no se ha podido caracterizar ninguna alteración típica que se correlacione con la aparición del anticoagulante. Los anticuerpos actúan sobre epítomos situados en los diferentes dominios del factor VIII (3). Así, lo hacen sobre el dominio A2 o sobre la porción carboxiterminal de la cadena ligera, que corresponde al dominio C2. Algunos autoanticuerpos pueden tener un amplio margen de acción, actuando sobre los dos dominios, A2 y C2. Los anticuerpos frente al dominio C2 dificultan la fijación del factor VIII sobre los fosfolípidos, lo que reduce tremendamente su capacidad funcional.

En un examen más detenido, a nivel molecular, se han podido caracterizar los fragmentos, con sus epítomos, derivados de la hidrólisis producida por la trombina. La acción activadora que la trombina realiza sobre el factor VIII es hidrolizar la globulina antihemofílica en los puntos Arg 372, Arg 740, Arg 878, Arg 740, Arg 1648 y Arg 1689 (5). Esta última hidrólisis es la que deja libre la macromolécula del factor von Willebrand.

En un estudio sobre 76 anticuerpos anti F-VIII, con intención de estudiar los epítomos, se demostró que éstos actúan frente al polipéptido 92-kDa y dentro de éste frente a la fracción 54-kDa y/o 44-kDa de los fragmentos producidos por la trombina (5). Los anticuerpos IgG4 reaccionan con mayor intensidad frente al polipéptido 92-kDa. El anticuerpo puede actuar también frente al polipéptido 82-kDa y dentro de él sobre su fragmento 72-kDa, producido también por la hidrólisis dependiente de la trombina. Hay casos en los que el anticuerpo actúa frente a estos dos polipéptidos.

El anticuerpo sólo es específico frente a la molécula del factor VIII y no del factor Willebrand, por esto el tiempo de hemorragia nos se afecta. No fija el complemento y tiene cierta especificidad de especie, por lo que es más intenso frente al factor VIII humano. Ello permite que, en

situaciones graves, se pueda utilizar el factor VIII porcino con mayor éxito que el factor VIII humano.

Los anticoagulantes, frente al factor VIII, adquiridos de manera espontánea son poco frecuentes. El primer caso de anticoagulante circulante espontáneo frente al factor antihemofílico, fue descrito por Lozner -año 1940- en un enfermo de 61 años de edad, que presentó una hemorragia severa después de la extracción de un ganglio linfático para su estudio histológico. La incidencia es mayor en el postparto, pero también aparece en el curso de enfermedades sistémicas de base inmune -Lupus eritematoso, asma-. El cuadro clínico suele ser leve, pero puede ser grave.

En el año 1981 los autores David Green y Klaus Lechner (6) publicaron una encuesta realizada con la participación de Centros Antihemofílicos Europeos y Norteamericanos con el fin de conocer la frecuencia real de los anticuerpos "espontáneos" frente al factor VIII, así como su marco clínico y la respuesta a diferentes protocolos terapéuticos. Curiosamente de los 118 centros que contestaron, 55 indicaron no haber tenido ningún caso de anticuerpo circulante. El total de casos fue de 215 enfermos. No había diferencias de sexos, ya que el 52,7% eran varones y el 47,3% hembras. Por edades, la frecuencia mayor estaba en los 50 y 70 años, habiendo un pico de incidencia en la década de los 20. Éstos se corresponden a los anticuerpos aparecidos en el período de postparto. Los anticoagulantes circulantes, aparecidos en el postparto, pueden hacer su aparición pasado cierto tiempo, incluso meses, después del parto. En general mejoran, incluso desaparecen de manera espontánea entre los 12 y 18 meses. Un embarazo posterior no va necesariamente acompañado de la reaparición del anticuerpo.

El factor VIII no pasa la barrera placentaria, por lo que la inmunización debe producirse en el momento del parto o por roturas placentarias producidas poco tiempo antes del alumbramiento.

Por orden de frecuencia las circunstancias clínicas en las cuales aparecen son: 46,1% de causa desconocida, 7,9% en artritis reumatoide, 7,3% en el postparto, 6,5% en procesos malignos, fundamentalmente en linfomas, leucemia linfática crónica y, entre los tumores sólidos, cáncer de pulmón, colon y de riñón. En este grupo había un 5,6% producido por fármacos, entre los que hay que señalar la penicilina, la ampicilina, el

cloranfenicol y la fenitoína. En el Lupus Eritematoso Sistémico -LES- se presentó en el 5,6% de los casos y en otro grupo de enfermedades de base inmune, como colitis ulcerosa dermatomiositis, arteritis temporal, polimiositis, miastenia gravis, síndrome de Sjögren, en el 4,5%. Había un 4,1% en enfermedades dermatológicas como la psoriasis, el pénfigo, la dermatitis exfoliativa, el eritema anular centrífugo. Las enfermedades respiratorias eran causa desencadenante de anticuerpos, frente a la globulina antihemofílica, en el 3,9% de los casos, siendo el asma la más importante, seguida de la sarcoidosis y de la insuficiencia respiratoria de causa no determinada. Las transfusiones, en individuos no afectados de hemofilia congénita fueron factor desencadenante de anticuerpo frente al factor VIII en el 2,8% de los casos. Señalaron los autores un grupo misceláneo en el que se incluye la diabetes, la hepatitis, la hiperglobulinemia, la glomerulonefritis, la policitemia, en total representaban el 5,1%.

El cuadro clínico se expresa por hemorragias y aparecen todas las manifestaciones que se dan en la hemofilia congénita, incluidos los hemartros, si bien algunos autores los citan como menos frecuentes que en la hemofilia clásica. Probablemente el factor edad sea un factor a tener en cuenta a la hora de interpretar esta diferencia entre la hemofilia clásica o congénita y la adquirida. Las manifestaciones hemorrágicas pueden ser graves, ya que en este estudio se realizaron transfusiones, de concentrado factorial, en el 87% y un 22% de los enfermos murieron como consecuencia de las hemorragias.

Interesante es comentar los aspectos evolutivos del inhibidor en relación a la actitud terapéutica. En el grupo de enfermos que se sometieron sólo a observación o a transfusión de concentrado de factor VIII, el anticoagulante perduró entre 1 y 156, meses con un valor medio de 36 meses. En un grupo pequeño desapareció espontáneamente después de un período medio de 14 meses, entre 1 y 48 meses de valores extremos. Los casos en los que desapareció espontáneamente se correspondían con episodios desencadenados en el período postparto, en el asma, en enfermos tratados con ampicilina, en la hiperglobulinemia o de causa no identificada. En enfermos no tratados la cifra era de 32 casos, el resto fue sometido a tratamiento, todos recibieron en algún momento esteroides. Esta fue la única medida farmacológica en 45 de ellos, en los restantes se

asoció, por falta de respuesta, a otros inmunosupresores como azotioprina, ciclofosfamida. La respuesta fue (7) (8) bastante significativa en un porcentaje alto, llegando a desaparecer en 22 casos que se correspondían con colitis ulcerosa, transfusiones múltiples, postparto, lupus eritematoso y diabetes. El inhibidor perduró durante tiempo en las formas de artritis reumatoide, arteritis temporal, sarcoidosis, asma. Podemos decir que no existe un patrón etiológico determinado que indique el tipo de respuesta terapéutica, salvo en las formas de causa desconocida, en las secundarias al parto o en las debidas a la administración de fármacos.

La unión del anticuerpo con el antígeno no activa el complemento y no forma inmunoprecipitados. Hay que señalar que la actividad anti factor VIII, es decir el bloqueo funcional, no se realiza de manera instantánea sino lentamente.

4. INHIBIDORES DEL FACTOR WILLEBRAND

En la enfermedad de von Willebrand, que es la más frecuente de las enfermedades congénitas, la aparición de anticuerpos está motivada por transfusiones repetidas. Aparecen con mayor frecuencia en las formas con delección homocigótica, que tienen ausencia de la proteína, por ésto la intolerancia inmunológica a las transfusiones o concentrados es grande. El anticuerpo es una inmunoglobulina IgG de carácter policlonal y tiene la propiedad de inhibir al factor von Willebrand. Hay especial tendencia a la aparición del anticuerpo tras las transfusiones.

Las formas de aparición espontánea son escasas y se dan en enfermedades inmunes, LES, en síndromes linfoproliferativos y mieloproliferativos, en el hipotiroidismo y también en la enfermedad de Graves (9) (10) (11). En el síndrome de von Willebrand adquirido, la edad de los enfermos es en general superior a los 55 años. Las manifestaciones clínicas se caracterizan por hemorragias de mucosas, epistaxis, gingivorragias tras la extracción dentaria, hematomas y, ocasionalmente, hemorragias digestivas.

El anticuerpo produce alargamiento del tiempo de hemorragia, el F VIII.C está bajo y el FvW:Ag es muy bajo (6) o nulo y el FvW:RiCof es nulo. Está reducida la agregación plaquetaria con ristocetina. Hay

alargamiento del TTPa (tiempo parcial de tromboplastina) que en parte se rectifica con la adición de plasma normal.

El anticuerpo puede no expresar su acción inhibitoria frente a las estructuras multiméricas del factor vWf, lo que se corresponde con el tipo I de la enfermedad congénita de von Willebrand (12), mientras que otros presentan la acción frente a las formas multiméricas, correspondientes con el tipo II. Todo esto evidencia que los anticuerpos pueden actuar sobre diferentes epítomos de la molécula, pudiendo producir diversos grados de inactivación biológica. En algunos casos el gran tamaño del complejo antígeno-anticuerpo favorece una rápida limpieza o barrido de la circulación, por el Sistema Mononuclear Fagocítico, con reducción significativa de los niveles de vW en sangre. Ocasionalmente el anticuerpo se fija sobre superficies celulares como se ha descrito en la macroglobulinemia de Waldenström. Los trastornos de la coagulación en la enfermedad de von Willebrand adquirida no guardan paralelismo con el tiempo de hemorragia, ya que el factor vW existente en las plaquetas no es inhibido al 100% por el anticuerpo. En el momento de la activación plaquetaria, la concentración de vW es muy grande, en un espacio muy pequeño, sobrepasa la actividad del anticoagulante. La formación de inmunocomplejos puede presentar, en ocasiones, manifestaciones propias de la enfermedad del suero como son las vasculitis.

5. ANTICOAGULANTES ANTIFIBRINÓGENO

La formación de fibrina defectuosa, en presencia de cantidades suficientes de trombina, es una expresión de disfibrinogenemia por alteración estructural del fibrinógeno. Igual situación puede producirse ante la presencia de anticuerpos circulantes, de autoanticuerpos, que dificultan su activación o su polimerización.

El fibrinógeno consta de tres pares de cadenas, la $A\alpha$, $B\beta$ y $\gamma\gamma$ (2). Su función en la coagulación de la sangre, y aún más, en la hemostasia, es la de formar una amplia red de fibras de fibrina -el trombo hemostático- que materialmente cierra las soluciones de continuidad que pueden aparecer en el árbol vascular. Para que esta red pueda producirse, el fibrinógeno necesita activarse -pasar a fibrina- por la acción de la

trombina. Cada molécula de fibrinógeno produce un monómero de fibrina. Los monómeros de fibrina tienden espontáneamente a polimerizarse, formando una red inicialmente inestable, soluble en urea, para posteriormente pasar a formar el polímero estable por la acción estabilizadora del factor XIII activo -XIIIa-.

Desde el fibrinógeno, molécula soluble, hasta la formación de la de red estable de fibrina se producen cuatro hechos consecutivos. Los dos primeros requieren la intervención activa de la trombina, el cuarto la intervención del factor XIII activado, y el tercero, la polimerización de los monómeros de fibrina. Esta polimerización es espontánea y sólo necesita una correcta integridad estructural de la molécula.

La trombina libera en primer lugar, del extremo amino terminal de la cadena $A\alpha$, un pequeño polipéptido -fibrinopéptido A- por hidrólisis de la unión Arg 16-Gli 17 (2). Posteriormente, ejerce una acción similar sobre la cadena $B\beta$, en la unión Arg 14-Gli 15, liberando el fibronopéptido B. La trombina ejerce esta doble acción proteolítica uniéndose al "dominio central" del fibrinógeno. La hidrólisis y liberación de los fibrinopéptidos A y B dan origen al monómero de fibrina, quedando así expuestos, en la zona aminoterminal, lugares complementarios con las zonas carboxiterminales de otros monómeros de fibrina, lo que permite la polimerización de los mismos formando una protofibrilla de doble estructura. Esta unión con superposición mitad a mitad, de cada monómero de fibrina, vista al microscopio electrónico, da el aspecto de una larga fibra con bandas intermedias.

El factor XIIIa es el encargado de estabilizar al polímero de fibrina. Está formado por dos cadenas α y dos β . Las cadenas α contienen el lugar activo que queda libre al ser activado por la trombina, la cual hidroliza al polipéptido en la unión Arg 37-Gli 38. El factor XIIIa es una endo-gamma-carboxiglutamil: aminolisil transferasa, que actúa como transamidasa, capaz de formar uniones aniónicas entre la carboxiglutamina y la aminolisina, no sólo de la fibrina sino también de otras moléculas como la miosina, la fibronectina, el factor vW, el factor V, el colágeno y la α 2-antiplasmina, pero fundamentalmente, el fibrinógeno y la fibrina.

Las cadenas $B\beta$ generan uniones en su porción carboxi-terminal al igual que las α , que tienen tres residuos de glutamina en el apéndice polar

$A\alpha$. Estas uniones dificultan la acción fibrinolítica de la plasmina, inhibición que está amplificada por la propia unión del factor XIIIa a la α_2 -antiplasmina.

Hay varios tipos de autoanticuerpos capaces de entorpecer la formación de la red de fibrina. Un primer tipo se fija sobre la molécula de fibrinógeno, impidiendo o dificultando, por su situación topográfica sobre la cadena $A\alpha$, la hidrólisis entre la Arg 16-Gli 17. Al no liberarse adecuadamente el fibrinopéptido A, se enlentece la formación de los monómeros de fibrina, lo que conduce a una deficiente formación de la red de fibrina, es decir del coágulo o trombo hemostático (13). El fibrinopéptido A, por su situación espacial en la molécula de fibrinógeno, tapa o dificulta la exposición de los puntos de la molécula que interviene en la polimerización del monómero de fibrina. La clínica hemorrágica no es muy importante, menos que la que se produce en los defectos primarios de agregación de los monómeros. La alteración en la liberación del fibrinopéptido A, fue primeramente señalada por E. Marciniak, en una enferma con síndrome de Down (13). La fracción IgG del plasma de la enferma tenía la propiedad de dificultar la liberación del fibrinopéptido A. Curiosamente la cantidad total del fibrinopéptido liberado es igual que en las situaciones normales, lo que pasa es que se libera con mayor lentitud.

Un segundo tipo de autoanticuerpo inhibe la hidrólisis entre la Arg-14-Gli 15 de la cadena $B\beta$, con la consiguiente dificultad para la formación del coágulo. En enfermos con LES se ha descrito la aparición de autoanticuerpos que bloquean la polimerización de los monómeros de fibrina, lo que produce una defectuosa red de fibrina (14). Un efecto similar se produce en casos de marcada dis o paraproteinemia, aún sin actividad de autoanticuerpos (15). El fragmento Fab de estas inmunoglobulinas monoclonales, tipo IgG y propias de discrasias plasmáticas, impiden la polimerización de los monómeros de fibrina con mayor intensidad que lo hace el fragmento Fc.

6. INHIBIDORES FRENTE AL FACTOR II

De manera aislada son muy poco frecuentes ya que se presentan en el marco del "anticoagulante lúpico". En los casos descritos este inhibidor

se comporta con un alargamiento del tiempo de protrombina (TP), del tiempo de trombina (TT), del tiempo parcial de tromboplastina (TTa) y con normalidad del tiempo de reptilase (16). Este anticoagulante no tiene actividad antifosfolipídica, como ocurre con el "anticoagulante lúpico". El anticuerpo se fija sobre la protrombina y también puede hacerlo sobre la trombina, uniéndose a la zona aminoterminal de la molécula de protrombina y no a la carboxiterminal, como lo hace el anticoagulante lúpico. El complejo anticoagulante-protrombina es secuestrado por el Sistema Mononuclear Fagocítico con el consiguiente descenso de los niveles óptimos de protrombina, siendo esta hipoprotrombinemia la causa del trastorno hemorrágico y no la inactivación funcional, ya que el anticuerpo no se une sobre epítomos funcionalmente activos de la molécula de protrombina, como ocurre con la mayoría de los anticoagulantes (17).

7. ANTICUERPOS FRENTE AL FACTOR V

El factor V es un cofactor de la cascada factorial y, actuando como cofactor de serin proteasas, interviene en la formación de la protrombinasa. El factor V tiene tres dominios A, B y C, con gran similitud en su composición y en la secuencia de aminoácidos, especialmente en sus dominios A y C. Circula como una molécula única. Es sintetizado por las células endoteliales y por los megacariocitos, por lo que se encuentra en los gránulos α de las plaquetas. Es activado por la trombina y por el factor Xa. La trombina lo hidroliza en los puntos Arg 713, Arg 1536, dejando dos péptidos muy glicosilados, la cadena pesada de 100.5 kDa y la ligera de 71 kDa. El factor Va, fijado sobre estructuras fosfolipídicas, se une al factor Xa por intermedio de la cadena pesada y ligera. La unión a los fosfolípidos se realiza por intermedio del dominio C de la cadena ligera, lo que potencia la activación de la protrombina en 300.000 veces más que si lo hace en solución. Se ha visto que los anticuerpos, que se fijan sobre las diferentes zonas funcionales del Va, impiden su acción (18). En algunos casos esta fijación se realiza sobre la cadena pesada, en la zona donde debe unirse al factor Xa, lo que impide la formación del complejo protrombinasa. En otras ocasiones el anticuerpo se fija sobre el dominio C, en la cadena ligera, en la zona por la que se fija a los

fosfolípidos. Esto impide igualmente la formación del complejo protrombinasa.

La aparición de anticoagulantes frente al factor V, en enfermos afectos de déficit congénito se da con muy poca frecuencia. Los casos descritos en la literatura corresponden fundamentalmente a individuos no afectos de la enfermedad congénita, es decir aparecen de manera espontánea y recae especialmente en la edad avanzada. Aparece este anticuerpo en individuos sin enfermedad alguna, que han tomado medicamentos con gentamicina, estreptomycin, penicilina o que han sido sometidos a cirugía. También en casos que han recibido transfusiones o han tenido algún tipo de infección. El anticoagulante desaparece espontáneamente, alrededor de las diez semanas o bajo los efectos de una terapia inmunosupresora.

Un hecho importante es la gran variabilidad en su expresión clínica, hemorrágica, habiendo formas severas (4). En algunos casos el anticoagulante no plantea problemas clínicos. Esto es debido a la presencia de factor V en el interior de las plaquetas, lo que le hace inaccesible a la acción inhibitoria del anticoagulante circulante. Recordaremos que el factor V se encuentra en circulación en un 80%, el 20% restante está en el interior de las plaquetas. Esto explica el que enfermos con una cuantía de factor V circulante, inferior al 1%, pueden ser sometidos a cirugía menor sin que se produzcan hemorragias importantes. Las plaquetas contienen el 20% del factor V de la sangre, pero representan el 0,16 del volumen de la sangre total, lo que hace que la concentración del factor V en las mismas sea 100 veces mayor que la concentración del mismo en el plasma y permite comprender que, tras la activación de las plaquetas, la alta concentración del factor V, aún en presencia del inactivador o del anticoagulante, sea eficaz para la formación de la protrombinasa.

El laboratorio demuestra el alargamiento del tiempo de protrombina (TP) y el tiempo parcial de tromboplastina (TTPa) que no se corrigen con la mezcla de plasma normal. El tiempo de trombina (TT) es normal.

El anticuerpo es una inmunoglobulina policlonal IgG, pero puede ser también IgE e IgM e inclusive IgA (3). Actúa frente a epítomos de la cadena pesada o de la cadena ligera del factor V activado, inhibiendo la formación del complejo protrombinasa formado por -Xa-Va-Ca⁺⁺-vesículas

de fosfolípidos. Por lo indicado anteriormente, se comprende que la transfusión de plaquetas pueda normalizar la tendencia hemorrágica en enfermos afectados de anticoagulante frente al factor V.

8. INHIBIDORES FRENTE AL FACTOR VII

Se ha descrito la aparición de anticoagulantes tipo IgG, que inhiben la actividad procoagulante del factor VII. No se une a epítopos activos de la molécula pero sí a la molécula, con la formación de macrocomplejos que son aclarados rápidamente por el Sistema Mononuclear Fagocítico, con descenso del factor VII en el plasma (3).

9. ANTICOAGULANTES CIRCULANTES FRENTE AL FACTOR IX

El factor IX o factor Christmas, cuyo déficit congénito produce la hemofilia B, es una enzima, serin-proteasa, que se une al factor VIIIa sobre superficies fosfolipídicas. En los enfermos con hemofilia B los anticuerpos se presentan con una incidencia del 2 a 3%, alcanzando el 12% en los casos graves.

El primer caso de anticuerpo frente al factor IX, aparecido de manera espontánea, fue descrito en el año 1957 por Formanek en una niña de cuatro años. La enfermita presentó un importante cuadro purpúrico durante el período de curación de una hepatitis, pero con evolución posterior favorable. El caso descrito por Largo y colaboradores, en 1974 (19) corresponde también a una niña de seis años y medio en la que posteriormente apareció una enfermedad multisistémica de base inmune. La prednisona redujo la actividad del anticoagulante, pero falleció a la edad de 9 años como consecuencia de la enfermedad base. Al igual que ocurre con otros anticoagulantes espontáneos, el anticuerpo frente al factor IX, que es muy poco frecuente, aparece en general durante la evolución del Lupus Eritematoso Sistémico -LES-, especialmente durante el embarazo y el período postparto. El anticuerpo, que es oliclonal o también policlonal y preferencialmente es IgG, subgrupo IgG4, forma precipitados al unirse con el antígeno.

10. INHIBIDORES FRENTE AL FACTOR IX

Son muy poco frecuentes y se pueden producir en individuos transfundidos afectos de déficit congénito del factor XI. Su aparición espontánea es menos frecuente, produciéndose en enfermos de Lupus Eritematoso Sistémico -LES-. (4). El anticuerpo se une al factor IX, en epítomos localizados en la cadena pesada. Las manifestaciones clínicas son escasas.

11. INHIBIDORES FRENTE AL FACTOR XIII

En algunos enfermos que toman isoniazida, penicilina o toman hidantoínas, se ha descrito un cuadro hemorrágico por la aparición de autoanticuerpos frente al factor XIII (3) (4).

El inhibidor puede actuar frente al XIIIa o anular los puntos de unión entre los monómeros de fibrina. Otros anticuerpos actúan impidiendo la activación del factor XIII por la trombina.

En casos de disproteinemia, la paraproteína puede bloquear la activación del mismo o impedir su actividad, uniéndose a los puntos funcionales del factor XIIIa.

12. ANTICUERPOS ANTITROMBINA

Es curiosa la aparición de anticuerpos frente a la trombina en enfermos a los que se les ha aplicado trombina bovina tópica, práctica relativamente frecuente en determinados actos quirúrgicos. Se produce alargamiento del tiempo de protrombina (TP), del tiempo parcial de tromboplastina (TTpa) y del tiempo de trombina (TT). El anticuerpo que se produce frente a la trombina bovina, actúa también frente a la trombina humana porque el anticuerpo comparte el mismo epítomo.

Las manifestaciones hemorrágicas, como hemorragias por los puntos de sutura, salida de sangre por las sondas de aspiración, desaparecen pasados 6-7 días, pero pueden ser tremendamente graves, especialmente si se forman también anticuerpos frente al factor V, como en el caso descrito por Zehder y Leung (20).

Conviene señalar que es muy importante el papel del factor V en

la coagulación. El factor V, como se sabe, da origen a una cadena pesada, de 100,5 kDa, y a una ligera de 71 kDa, unidas por enlaces no covalentes y calcio iónico. La cadena ligera se une a los fosfolípidos de las plaquetas y también al factor X activado. La cadena pesada se une a la protrombina. Esta unión de moléculas sobre la superficie fosfolipídica aumenta la transformación de la protrombina a trombina en 300.000 veces más que si esto lo hiciese en solución.

El anticuerpo que aparece frente al factor V es de consecuencias graves, perdura poco y desaparece espontáneamente al cabo de pocas semanas. Es una IgG que se une activamente a la cadena ligera de factor Va. En el caso que comentamos fue necesaria la práctica de plasmaféresis, ya que ni las transfusiones ni los inmunosupresores consiguieron controlar la severa hemorragia. La aparición del anticuerpo frente al factor V, con el empleo de trombina bovina local, se debe a que en muchos productos comerciales la trombina lleva también factor V bovino.

13. ANTICOAGULANTES TIPO HEPARINA

Son de escasa frecuencia. Se trata realmente de sustancias con actividad de "glicosaminoglicanos". Se han descrito en enfermos afectos de cáncer, así como en hepatópatas (21). Es posible que no sean las células cancerosas las que liberen las sustancias anticoagulantes, tipo heparina, sino que el propio tumor estimule, en cierta medida, a las células endoteliales y sean éstas las que liberen las sustancias heparinoides tipo "glicosaminoglicanos". Lo interesante de estos (22) enfermos es que el tiempo de trombina (TT), que está extraordinariamente alargado, se puede corregir con la adición de protamina o de heparinasa.

Las manifestaciones clínicas son importantes y se caracterizan fundamentalmente por hemorragias en mucosas, musculares y viscerales.

En algunos casos la sustancia inhibidora aparece en enfermos afectos de patología hepática y la actividad anticoagulante, tipo heparina, se puede contrarrestar por la administración de heparinasa o condroitinasa, lo que indica que la molécula anticoagulante tiene una estructura tipo heparasulfato o dermatan sulfato (23). Posiblemente la lesión hepática permite la liberación de glicosaminoglicanos que no son adecuadamente catabolizados.

14. ANTICOAGULANTE LÚPICO

En el año 1952 se describió, en enfermas afectas de LES, la presencia de un anticoagulante al que se llamó "anticoagulante lúpico" (24). Pronto se vió que la acción anticoagulante se manifestaba más en el laboratorio que en la clínica y paradójicamente, la presencia del "anticoagulante lúpico" se asociaba más a fenómenos trombóticos, tanto venosos como arteriales, que hemorrágicos (25) (26).

Es un anticuerpo inhibidor de las reacciones que en los ensayos analíticos, es decir "in vitro", necesitan fosfolípidos, es un antifosfolípido. No reacciona frente a todos los fosfolípidos, sólo frente a los aniónicos como la fosfatidilserina, el fosfatidilinositol, el ácido fosfatídico. Por ésto no reacciona frente a la fosfatidilcolina ni frente a la fosfatidiletanolamina (27). Su actividad biológica impide la unión calcio dependiente de la protrombina y del factor Xa con los fosfolípidos, como se ha visto "in vitro" utilizando micelas de fosfolípidos (28).

El anticoagulante lúpico o antifosfolípido se presenta, en general, acompañando a enfermedades sistémicas o de base inmune, pero en ocasiones aparece de manera aislada y constituye el "síndrome antifosfolípido primario".

Conviene señalar, ya desde el principio, que pese al deterioro de la coagulación tal como se demuestra "in vitro", en el laboratorio, la expresión clínica hemorrágica es prácticamente nula y desde luego carece siempre de interés. Los portadores de anticoagulante lúpico que necesiten la práctica de cualquier actividad quirúrgica pueden someterse a la misma, sin grandes problemas. En los casos en los que hay clínica hemorrágica ésta depende de la trombopenia asociada, de la trombopatía o del déficit de protrombina (29) (30) (31).

Pronto se asoció la presencia del anticoagulante lúpico con la falsa positividad del test biológico de la sífilis, que aparece en algunos enfermos con LES. Esto condujo a Harris, en el año 1983, a elaborar un test antifosfolípido en el que éstos estaban representados por cardiolipina, ya que es este el fosfolípido que se emplea en la prueba biológica de la sífilis. A este test se le ha reconocido como el de la "anticardiolipina". No existe una relación 100% entre el test de la anticardiolipina y la presencia del anticoagulante lúpico valorado por técnicas de coagulación. Hay

enfermos con el test positivo en los que no se encuentra anticoagulante lúpico, así como también se da la situación inversa. El "anticuerpo anticardiolipina" es un anticuerpo de carácter policlonal antifosfolípido y puede ser IgG, IgA, IgM. No parece que exista una relación entre el tipo de idiotipo (32) y las manifestaciones clínicas.

En los últimos años el interés por el estudio de la anticardiolipina ha permitido agrupar un amplio abanico de manifestaciones clínicas, insospechadas en las fases iniciales.

Desde que en el año 1963 se describió la presencia de trombosis en los enfermos con anticoagulante lúpico, la importancia y la frecuencia de esta complicación ha sido reconocida con toda claridad. Las trombosis se dan tanto en el territorio arterial como en el venoso, son recurrentes. Cuando ésto ocurre suele producirse en el mismo territorio. Los lugares preferentes son el árbol vascular cerebral, las venas profundas de las extremidades inferiores y también los vasos de la retina, pudiendo producirse en cualquier lugar de la economía. En los enfermos con LES y anticoagulante lúpico o anticardiolipina, la frecuencia de los episodios trombóticos es importante, entre 40-42%. La frecuencia no es tan elevada en enfermos con anticoagulante lúpico, asociado a enfermedades autoinmunes diferentes al LES, como es el caso de la artritis reumatoide y de las formas de lupus asociado a fármacos (32).

Otra importante y característica manifestación clínica es la aparición de abortos espontáneos. La frecuencia de abortos en las enfermas con Lupus es elevada, aumentando ésta si las enfermas son portadoras de "anticardiolipina" (34) (35). En enfermas con lupus, embarazadas y portadoras de anticoagulante lúpico el aborto alcanza el 38% frente al 16% en las que el Lupus no va asociado al anticoagulante lúpico.

Junto a la trombosis de las venas profundas de las extremidades superiores e inferiores están las de la vena cava inferior, pudiendo complicarse con embolia pulmonar. También se producen trombosis en las venas suprahepáticas, con producción del síndrome de Budd-Chiari, de la vena porta, de los senos venosos intracraneales, de la vena renal y de la vena retiniana. No son raras las trombosis en el territorio arterial, siendo lugares preferentes las cerebrales, las coronarias, las braquiales -subclavia axilar-, la de la retina y las arterias del arco supraaórtico. También se han señalado trombosis mesentérica de la aorta y de las extremidades

inferiores.

Se ha demostrado que la reoclusión, tras cirugía coronaria, es más frecuente en los enfermos que tienen positivo el test de la anticardiolipina y en especial en los que ya lo tenían antes de la realización de la cirugía. Los que sobreviven a un infarto de miocardio, en especial individuos jóvenes, con anticardiolipina positiva, tienen en un 61% la posibilidad de presentar un episodio trombótico coronario, cerebral o en extremidades inferiores (36). La aparición de valvulopatías en LES se acompaña a la anticardiolipina en el 89% de los casos. En el síndrome de "anticardiolipina primario", la patología valvular se da en el 36%. Por el contrario, en los enfermos con LES sin positividad a la anticardiolipina, la valvulopatía es más inferior (37). No existe asociación entre la positividad de la anticardiolipina y la presencia de factor antinuclear.

Corresponde aquí el síndrome de Sneddon, caracterizado por trombosis recurrentes arteriales y venosas, valvulopatías, trombosis cerebro-vascular e hipertensión arterial de carácter esencial.

En la piel, las manifestaciones que aparecen son de base vascular, presentándose placas necróticas -púrpura necrotizante-, úlceras necróticas en partes distales, como en las zonas maleolares, necrosis en la matriz ungueal, nódulos subcutáneos dolorosos, livedo reticularis. Estas manifestaciones pueden presentarse de manera aislada o asociada a trombosis venosa profunda.

También se ha relacionado con el anticuerpo anticardiolipina la necrosis colágena cutánea con atrofia dérmica sin infiltrados inflamatorios, con trombosis vasculocerebral o mesentérica, lo que constituye la enfermedad de Degos (38).

Las manifestaciones neurológicas son muy variadas, se incluyen aquí las convulsiones, la migraña, el síndrome de Guillain-Barré, la neuritis óptica, la trombosis recidivante cerebral, la demencia por trombosis recidivante y la mielitis transversa (39). Parece ser que en el "síndrome antifosfolípido primario", se afectan grandes vasos, mientras que cuando los anticuerpos antifosfolípidos se presentan asociados a otras enfermedades, fuera del síndrome primario, los vasos son de calibre medio, como ocurre en el síndrome de Sneddon (40) (41).

Las embarazadas tienen abortos en el primer trimestre y son después propensas a la repetición del mismo. Parece que la base patoge-

nética es la de una vasculitis placentaria.

Experimentalmente se ha demostrado con claridad que la anticardiolipina tiene capacidad patogénica para producir el síndrome antifosfolípido. En ratas embarazadas la inyección de anticardiolipina produce trombopenia, alargamiento del tiempo parcial de tromboplastina -TTPA- y muerte fetal. El mismo resultado se obtiene inmunizando a los animales con suero de enfermos o con un anticuerpo monoclonal anticardiolipina. La heparina y la IL-3 son capaces de prevenir o evitar la muerte fetal.

También se ha visto que en el síndrome antifosfolípido, la pérdida fetal, en estos animales, se incrementa cuando la producción de interleucina-3 -IL-3- y de factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos -GM-CSF-, como en la respuesta a la concanavalina, están reducidas (42). Una situación parecida se produce en la clínica, así en las mujeres embarazadas, afectas de lupus eritematoso, niveles bajos de C3 o de C4, así como un título elevado de anticardiolipina, son factores de mal pronóstico e indicadores de pérdida fetal.

En estos casos el estudio "doppler" de la arteria umbilical y de las uterinas, a partir de la decimocuarta semana de embarazo, sirve para monitorizar el futuro del feto (43).

La actividad trombogénica del anticuerpo antifosfolípido se realiza en gran medida por activación o estimulación de las células endoteliales. Uno de los mecanismos de activación plaquetar es por intermedio del Factor de Activación de las Plaquetas -PAF-, ya que la anticardiolipina estimula las células endoteliales con producción de PAF. Estudios experimentales "in vitro", utilizando células endoteliales de la vena umbilical, muestran que la producción de PAF se incrementa con la adición de suero con anticardiolipina. Es importante saber que el ácido acetil salicílico es capaz de frenar esta sensibilización (44).

Otra prueba de la acción de la anticardiolipina sobre las células endoteliales es la elevación del factor von Willebrand, producido y liberado desde el endotelio. La IgG de enfermos con síndrome anticardiolipina o con lupus eritematoso tienen esta propiedad (45). También se ha demostrado que la anticardiolipina impide que la trombomodulina module la acción activadora de la proteína C por la trombina (46), lo que representa la anulación, o disminución, de un importante mecanismo

natural antitrombótico. Igualmente se ha señalado que favorece la actividad trombofílica de la anticardiolipina la producción y expresión, sobre la célula endotelial, del Factor Tisular o Factor III. Por otro, lado la anticardiolipina disminuye la fibrinólisis, primero por la disminución de la activación de la proteína C y, segundo, porque disminuye la producción, por la célula endotelial, del Activador Tisular del Plasminógeno -tPA-. La capacidad de producción de prostaciclina por la célula endotelial también se encuentra reducida por la acción del antifosfolípido.

La relación del LES con la anticardiolipina es muy grande. Se encuentra positivo en un 60% de los enfermos y la IgG de los mismos se une intensamente al fosfolípido cardiolipina. Esta unión necesita un cofactor que se encuentra en el suero de los fetos de vaca, en el suero normal humano y en la fracción lipoproteica obtenida por ultracentrifugación del suero normal. Estudios de caracterización han demostrado que este cofactor está en la fracción β -2 de la glicoproteína I (β 2 GPI) (47). La glicoproteína β 2-GPI tiene 50 kDa, con 326 aminoácidos. Se encuentran en una concentración plasmática de 200 mcg/ml. Se considera como cofactor de la anticardiolipina y probablemente al fijarse sobre los fosfolípidos los hace más inmunogénicos. Parece ser que epítomos formados entre la cardiolipina y la β 2-GPI son el punto de acción o dianas de los anticuerpos antifosfolípidos (48).

Está perfectamente claro que la actividad antifosfolípica, del anticuerpo antifosfolípido, se ejerce frente a diferentes fosfolípidos y no sólo frente a la cardiolipina. De hecho, en un porcentaje elevado de casos no tiene actividad anticardiolipina, pero sí antifosfolípido. El anticuerpo antifosfolípido puede ser anticardiolipina, antifosfatidilserina, antifosfatidilinositol, antifosfatidiletanolamina, antifosfatidilglicerol y anti ácido fosfatídico. El estudio de la IgM, IgG e IgA de estos enfermos demuestra que pueden ser anticuerpos y que, en los casos de positividad, el anticuerpo es eficaz por los menos frente a uno de los seis fosfolípidos. En el 60% de casos positivos, lo es frente a fosfolípidos diferentes a la cardiolipina. Cuando el anticuerpo es de la clase IgG la especificidad más frecuente es frente a la fosfatidilserina, seguida de la fosfatidiletanolamina y de la cardiolipina (49).

16. BIBLIOGRAFÍA

- (1) ESPINÓS, D. (1994) Nuevas perspectivas en el diagnóstico de los estados de hipercoagulabilidad. *Mañre Medicina* 5: 68.
- (2) MANN, K.G.; GAFFNEY, D.; BOVILL, E.G. (1995) Molecular biology, biochemistry, and lifespan of plasma coagulation factors. En Williams. Hematology 5ª ed. MacGraw Gill. New York. 1206-1266.
- (3) HOYER, L.W. (1995) Acquired anticoagulants. En Williams. Hematology 5ª ed. MacGraw Hill. New York 1485-1496.
- (4) FEINSTEIN, D.I. (1994) Immune coagulation disorders. En Hemostasis and Thrombosis. Basic principles and clinical practice. W. Colman, J. Hirsh, VJ. Marder, EW. Salzman 3ª ed. Philadelphia 44: 881-905.
- (5) SCANDELLA, D.; MATTINGLY, M.; DE GRAAF, S.; FULCHER CA. (1989) Localization of epitopes for human factor VIII inhibitor antibodies by immunoblotting and antibody neutralization. *Blood* 74: 1618.
- (6) GREEN, D.; LECHNER, K. (1981) A survey of 215 non-hemophilic patients with inhibitors to factor VIII. *Thromb. Haemost.* 45: 200.
- (7) GREEN, D. (1991) Cytotoxic suppression of acquired factor VIII:C inhibitors. *Am. J. Med.* 91: 5A-14S.
- (8) NAKAMURA, S.; KATO, A.; SAKATA, Y.; AOKI, N. (1988) Bleeding tendency caused by IgG inhibitor to factor VIII, treated successfully by cyclophosphamide. *Br. J. Haematol.* 68: 313.
- (9) FRICKE WA.; BRINKHOUS, KM.; GARRIS, JB.; ROBERTS, HR. (1985) Comparison of inhibitory and binding characteristics of an antibody causing acquired von Willebrand syndrome: An assay for von Willebrand factor binding by antibody. *Blood* 66: 562.
- (10) JOIST, JH.; COWAN, JF.; ZIMMERMAN, TS. (1978) Acquired von Willebrand's disease. *N. Engl. J. Med.* 298: 988.
- (11) MARTÍNEZ-MURILLO, C.; AMBRIZ, R.; QUINTANA, S.; DOMÍNGUEZ, V.; RODRÍGUEZ, H.; ARIAS, A.; GUTIÉRREZ, M.; BASURTO, ML. (1994) Enfermedad de von Willebrand adquirido asociado a enfermedad de Graves. *Rev. Iberoamer. Tromb. Hemostasia* 7: 240-244.
- (12) GOUDEMANT, J.; SAMOR, B.; CARON, C. ET AL. (1988) Acquired type II von Willebrand's disease: Demonstration of a complexed inhibitor of the von Willebrand factor-platelet interaction and response to treatment. *Br. J. Haematol.* 68: 227.
- (13) MARCINIAK, E.; GREENWOOD, MF. (1979) Acquired coagulation inhibitor delaying fibropeptide release. *Blood* 53: 81.
- (14) NAWARAWONG, W.; WYSHOCK, E.; MELONI, FJ. ET AL. (1991) The rate of fibrinopeptide B release modulates the rate of clot formation: a study with an acquired inhibitor to fibrinopeptide B release *Br. J. Haematol.* 79: 296.
- (15) GHOSH, S.; MCEVOY, P.; MC VERRY, BA. (1983) Idiopathic autoantibody that inhibits fibrin monomer polymerization. *Br. J. Haematol.* 53: 65.
- (16) SCULLY, MF; ELLIS, V.; KAKKAR, VV. (1986) An acquired coagulation inhibitor to factor II. *Br. J. haematol.* 50: 655.

- (17) BAJAJ, SP.; RAPAPORT, SI; BARCLAY, S.; HERBST, KD. (1985) Acquired hypoprothrombinemia due to nonneutralizing antibodies to prothrombin: Mechanism and management. *Blood* 65: 1538.
- (18) NESHEIM, ME.; NICHOLS, WL.; COLE, TL. ET AL. (1986) Isolation and study of an acquired inhibitor of human coagulation factor V. *J. Clin. Invest.* 77: 405.
- (19) LARGO, R.; SIGG, P.; VON FELTON, A.; STRAUB, PW. (1974) Acquired factor IX inhibitor in a nonhaemophilic patient with autoimmune disease. *Br. J. Haematol.* 26: 129.
- (20) ZEHNDER, JL.; LEUNG, LLK. (1990) Development of antibodies to thrombin and factor V with recurrent bleeding in a patient exposed to topical bovine thrombin. *Blood* 76: 2011.
- (21) KAUFMAN, PA.; GOCKERMAN, JP.; GREENBERG, CS. (1989) Production of a novel anticoagulant by neoplastic plasma cells: Report of a case and review of the literature. *Am. J. Med.* 86:
- (22) HORNE, MK III; STEIN, CA.; LARocca, RV.; MYERS, CE. (1988) Circulating glycosaminoglycan anticoagulants associated with suramin treatment. *Blood* 71: 273.
- (23) PALMER, RN.; RICK, PD. ET AL. (1984) Circulating heparan sulfate anticoagulant in a patient with a fatal bleeding disorder. *N. Engl. J. Med.* 310: 1696.
- (24) CONLEY, CL.; HARTMANN, RC. (1952) A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J. clin. Invest.* 31: 621.
- (25) BOWIE, EJW.; THOMPSON, JH.; PASCUZZI, CA.; OWEN, CA. (1963) Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J. Lab. Clin. Med.* 62: 416.
- (26) BOWIE, EJW.; THOMPSON, JH.; PASCUZZI, CA. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulant. *J. lab. Clin. Med.* 62: 416.
- (27) MCNEIL, HP.; CHESTERMAN, CN.; KRILIS, SA. (1989) Anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulants comprise antibody subgroups with different phospholipid binding characteristics. *Br. J. Haematol.* 73: 506.
- (28) OOSTING, JD.; DERKSEN, RHWL.; BOBBINK, IWG. ET AL. (1993) Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C or protein S: An explanation for their pathogenic mechanism?. *Blood* 81: 2618.
- (29) HARRIS, EN; GHARAVI, AE.; HEDGE, U. (1985) Anticardiolipin antibodies in autoimmune thrombocytopenia purpura. *Br. J. Haematol.* 59: 231.
- (30) FLECK, RA; RAPAPORT, SI.; RAO, LVM (1988) Anti-prothrombin antibodies and the lupus anticoagulant *Blood* 71: 512.
- (31) BEVERS, EM; GALLI, M.; BARBUI, T. ET AL. (1991) Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb. Haemost.* 66: 629.
- (32) WEIDMANN, CE.; WALLACE, D.; PETER, J. (1988) Studies of IgG, IgM and IgA antiphospholipid antibody isotypes in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 15: 74.
- (33) BELL, WR.; BOSS, GR.; WOLFSON, JS. (1977) Circulating anticoagulant in the procainamide-induced lupus syndrome. *Arch. Intern. Med.* 137: 1471.

- (34) FEINSTEIN, DI. (1992) Lupus anticoagulant, anticardiolipin antibodies, fetal loss and systemic lupus erythematosus. *Blood* 80: 859.
- (35) INFANTE-RIVARD, C.; DAVID, M.; GAUTHEIR, R.; RIVAR, GE. Lupus anticoagulants, anticardiolipin antibodies and fetal loss. *N. Engl. J. Med.* 325: 1063.
- (36) HAMSTEN, A.; NORBER, R.; BJORKHOLM, M. (1986) Antibodies to cardiolipin in young survivors of myocardial infarction: an association with recurrent cardiovascular events. *Lancet* 1: 113.
- (37) REISNER, SA.; BLUMENFELD, Z.; BRENNER, B. (1990) Cardiac involvement in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Circulation* 82 (Suppl. III): 398.
- (38) ENGLERT, H.; HAWKES, C.; BOEY, M. (1984) Dagos' disease: association with anticardiolipin antibodies and the lupus anticoagulant. *Br. Med. J.* 289: 576.
- (39) LEVINE, SK.; WELCH, K. (1987) The spectrum of neurologic disease associated with anticardiolipin antibodies. *Arch. Neurol.* 44: 876.
- (40) MORAL, A. (1991) Sneddon's syndrome with antiphospholipid antibodies and arteriopathy. *Stroke* 22: 1327.
- (41) ASHERSON, RA.; KHAMASHTA, MA.; HUGHES GRV. (1989) Sneddon's syndrome. *Neurology* 39: 1138.
- (42) FISHMAN, P.; BAKIMER, R.; BLANK, M.; SREDNI, D.; DJALDETTI, M.; SCHOENFELD. (1992) The putative role of cytokines in the induction of primaty anti-phospholipid syndrome in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 90: 266-270.
- (43) KERSLAKE, S.; MORTON, KE., VERSI, E.; BUCHANAN, NM.; KHAMASHTA, M.; BAGULEY, E. (1992) Early doppler studies in lupus pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 28: 172-175.
- (44) SILVER, RK., O'CONNEL PD.; CAPLAN, MS. (1993) Acetylsalicylic acid inhibits anticardiolipin antibody-induced platelet-activating factor (PAF) synthesis. *Prostaglandins* 45: 143-151.
- (45) LINDSEY NJ.; DAWSON, RA.; HENDERSON, FI; GREAVES, M.; HUGHES, P. (1993) Stimulation of von Willebrand factor antigen release by immunoglobulin from thrombosis prone patients with systemic lupus erythematosus and the anti-phospholipid syndrome. *Br. J. Rheumatol.* 32: 123-126.
- (46) TOYOSHIMA, K.; MAKINO, T.; OZAWA, N.; UMEUCHI, M.; NOZAWA, S. (1993) Effect of anticardiolipin antibody in patients with recurrent fetal loss on thrombomodulin-dependet protein C activation. *J. Clin. Lab. Anal.* 7: 57-59.
- (47) JONES, JV.; (1992) Antiphospholipid antibodies: new perspectives on antigenic specificity. *J. Rheumatol.* 19: 1774-1777.
- (48) SUGAI S. (1992) Antiphospholipid antibody and antiphospholipid antibody syndrome. *Curr. Opin. Rheumatol.* 4: 666-671.
- (49) GILMAN-SACHS A.; LUBINSKI, J.; BEER, AE.; BREND, S.; BEAMAN, KD. (1991) Patterns of anti-phospholipid antibody specificities. *J. Clin. Lab. Immunol.* 35: 83-88.

Presentación antigénica en un modelo experimental (ratones NOD) de diabetes autoinmune tipo I

Por

EUGENIO CARRASCO-MARÍN

*Departamento de Patología.- Washington University School of
Medicine.- Saint Louis*

FRANCISCO LEYVA-COBIÁN

*Servicio de Inmunología, Hospital Universitario "Marqués de
Valdecilla", Santander*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.
2. ORÍGENES DE LOS RATONES.
3. CÉLULAS IMPLICADAS.
 - 3.1 Células β pancreáticas.
 - 3.2 Células presentadoras de antígeno.
 - 3.3 Células T.
4. ANTÍGENOS.
5. GENÉTICA DE LA DIABETES EN EL RATÓN NOD.
6. CONCLUSIONES.
7. BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN

Los ratones diabéticos no obesos (NOD) son un modelo experimental de la diabetes mellitus humana dependiente de insulina (IDDM) o diabetes tipo I. Estos ratones desarrollan espontáneamente diabetes autoinmune. Esta enfermedad autoinmune (tanto en el caso de los ratones NOD como en el caso de la IDDM) se caracteriza principalmente por una destrucción de las células β pancreáticas de los islotes de Langerhans, atribuible a linfocitos T autoreactivos que desemboca en una hiperglucemia aguda debida a la ausencia de insulina. Asimismo, la destrucción de

las células β pancreáticas conlleva una autoinmunidad generalizada que produce lesiones renales (por acumulación de complejos inmunes), neurológicas y oculares (ceguera debida a una retinopatía proliferativa) (1,2).

El desarrollo de la diabetes en los ratones NOD, a semejanza de lo que ocurre en la diabetes humana, comienza con una insulinitis. En los ratones NOD esta insulinitis puede ser detectada a las 3-4 semanas de edad, y a los 3 meses de edad, está instaurada en prácticamente todos ellos (3,4).

Aunque la mayoría de las células del infiltrado son linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$, es posible detectar también células B, macrófagos ($M\emptyset$) y células dendríticas (DC). No se sabe exactamente porqué se produce una masiva y específica infiltración de los islotes de Langerhans.

Gran parte de las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ que se aíslan clonalmente del infiltrado no son clones T autoreactivos frente a las células β pancreáticas. Por tanto, la infiltración de los islotes parece un proceso un tanto "inespecífico" puesto que parece que la mayoría de las células T reclutadas no son autoreactivas frente a las células β , las principales dianas en la diabetes autoinmune. Parece tratarse más bien de un proceso mediado por alguna linfocina y/o monocina secretada en el microambiente del islote pancreático que reclutaría inespecíficamente células T $CD4^+$, $CD8^+$, linfocitos B y $M\emptyset$.

El proceso de insulinitis no conduce necesariamente a la destrucción de las células β pancreáticas. Manipulaciones experimentales en el ratón NOD permiten evitar la diabetes clínica y aunque histológicamente exista insulinitis, en ningún caso hay destrucción de las células β de los islotes de Langenhans (5-7).

Entre los posibles mecanismos que impedirían la progresión de insulinitis a diabetes, algunos investigadores han sugerido que la presencia de linfocitos T reguladores inhibirían la actividad de los linfocitos T autoreactivos contra las células β pancreáticas (este punto se discutirá más adelante). Como se ha mencionado anteriormente, el infiltrado está compuesto principalmente por células T, B y $M\emptyset$. Una de las características de la diabetes es también una producción generalizada de anticuerpos frente a autoantígenos tales como insulina, glutámico-descarboxilasa (GAD), carboxipeptidasa H (CPH), proteínas de choque

térmico (hsp), periferina, así como anticuerpos contra glicolípidos que incluyen ciertos gangliósidos presentes en la células β pancreáticas. Sin embargo, aunque el papel de la inmunidad humoral en la diabetes es relevante y participa, colateralmente, en importantes daños tisulares, se ha demostrado claramente que la diabetes es un proceso estrictamente dependiente de linfocitos T en el que los linfocitos B no son necesarios. Los datos experimentales que lo apoyan son: (a) los ratones atímicos (NOD-nu/nu o timectomizados) no desarrollan diabetes (7-9), (b) el tratamiento con anticuerpos contra las células T previenen la diabetes (10,11) y (c) lo que es más importante, la diabetes puede ser transferida por células T a ratones NOD.SCID (animales que en condiciones naturales no desarrollan diabetes y que carecen de células B y células T) (12).

2. ORIGEN DE LOS RATONES NOD

Los ratones NOD fueron obtenidos "accidentalmente" durante la selección de una cepa de ratones ICR con una alta incidencia de cataratas. Durante el proceso de selección se obtuvieron tres cepas de ratones: los CTS (Catarata Shionogi), los NON (no obesos, no diabéticos), que tienen una ligera hiperglucemia y los ratones NOD que eran normoglucémicos (13,14). Por sucesivos cruces de ratones NOD, en la quinta generación se obtuvo una cepa de ratón NOD que desarrollaba espontáneamente diabetes.

La incidencia de diabetes en estos ratones es aproximadamente del 70-80% en las hembras y el 30-40% en los machos (15). Esta diferencia en la incidencia de diabetes entre machos y hembras ha sido atribuida a la diferente regulación del metabolismo de la glucosa ejercida por andrógenos y progestágenos (16). A partir de los primeros ratones NOD procedentes de los laboratorios Shionogi en Japón, se han establecido diferentes colonias de NOD en diferentes laboratorios del mundo. Curiosamente, dependiendo de la colonia, la incidencia de la diabetes es variable, e incluso dentro de la misma colonia se producen frecuentes fluctuaciones. Las variaciones en la incidencia espontánea de la diabetes en los ratones NOD, probablemente se debe a factores medioambientales (dieta, infecciones virales y temperatura) que inciden en la expresión fenotípica de determinados genes asociados con el desarrollo de diabetes

(17,18). Baste mencionar como muestra de la complejidad del proceso, que hasta la fecha se han descrito al menos quince regiones genéticas implicadas en la diabetes (19). Sin embargo, la mayoría de los ratones NOD presentan una profunda insulinitis a las 12-14 semanas de edad, independientemente de que posteriormente desarrollen o no un cuadro clínico de diabetes (20).

Como se ha mencionado, la insulinitis no conduce necesariamente al desarrollo de hiperglucemia. Se ha sugerido que en esta enfermedad poligénica, la insulinitis estaría determinada por una serie de genes que actuarían independientemente de los factores genéticos de susceptibilidad a diabetes, siendo en el ratón NOD donde se conjugan y complementan todos a la vez para expresar la clínica y la patología de la diabetes (21,22). A favor de esta hipótesis están los datos de los híbridos F1 de NOD con otras cepas de ratón (C3H, Balb/c, NON, C57BL/6): En general y salvo algunas excepciones encontradas en la literatura, el heterocigoto F1 NOD no desarrolla diabetes, y sólo alrededor del 3-12% de los F2, dependiendo de la cepa de ratón, la desarrollan (23-25). Sin embargo, si bien la diabetes no se presenta en los heterocigotos, no sucede lo mismo con la insulinitis; es decir, los ratones F1 no diabéticos presentan insulinitis (26).

3. CÉLULAS IMPLICADAS

Los ratones NOD.SCID, que carecen de células T y de células B, no desarrollan diabetes. Sin embargo, si se les transfieren células T CD4⁺ específicas frente a antígenos de las células β pancreáticas, si la padecen. Parece evidente que las células B no son necesarias para desencadenar la diabetes autoinmune aunque, como consecuencia del daño tisular, en condiciones normales se genera una respuesta B humoral, con producción de autoanticuerpos.

3.1. Células β pancreáticas

Se ha descrito que las células β pancreáticas expresan moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II (MHC-II) y por tanto actuarían como células presentadoras de antígeno (APC). Si

bien es cierto que *in vitro*, debido a determinados estímulos tales como IFN- γ , es posible hacer que las células β pancreáticas expresen moléculas MHC-II, se ha demostrado recientemente que las células β pancreáticas de los islotes de Langerhans teñidas *in situ*, no expresan moléculas MHC-II, incluso ni en aquellos ratones que ya han desarrollado diabetes (27,28). Por consiguiente, las células β pancreáticas en el curso de la diabetes, no actúan como APC, sino como fuente de antígeno y como células dianas. Hay, aproximadamente, unas 4 a 5 APC por islote, tanto en los ratones NOD como en los NOD.SCID. Las APC están interdigitadas entre las células β y poseen un fenotipo característico de M \emptyset y/o de DC: MHC-II⁺, F4/80⁺, CD45⁺, B7.1⁺, B7.2⁺ (Figura 1).

Los resultados obtenidos en el ratón NOD.SCID permiten concluir que las APC de los islotes pancreáticos procesan y presentan el antígeno diabético independientemente de la presencia de linfocitos T.

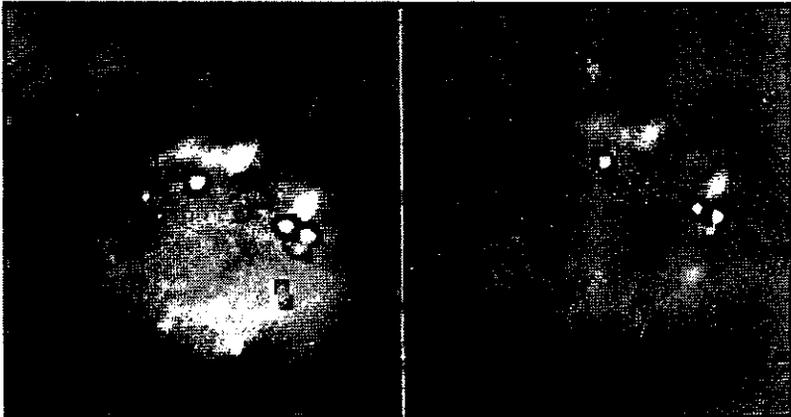


Figura 1. Número de células IA^{B7} positivas en los islotes pancreáticos.

Mediante inmunofluorescencia se detectan las APC de los islotes teñidas con el anticuerpo 10.3.62 que reconoce moléculas IA^{B7}. Las células β pancreáticas no expresan moléculas IA^{B7}. La tinción positiva se restringe a células de pequeño tamaño y de forma irregular, redonda u ovoidea. La mayor parte de ellas presentan prolongaciones dendríticas (panel izquierdo). Esas mismas células resultan también teñidas con anticuerpos contra los antígenos F4/80 (panel derecho), B7.1, B7.2 y CD45 (no mostrados).

3.2. Células presentadoras de antígeno

Se ha propuesto que determinados defectos genéticos en las APC podrían ser los responsables del proceso diabético debido a una deficiente presentación del antígeno lo que, a su vez, favorecería la persistencia de las células T autoreactivas. La primera evidencia de que dichas APC podrían tener algún defecto se observó en los MØ de los ratones NOD. Tras estimularlos con lipopolisacárido (LPS), la secreción de IL-1 fue anormalmente baja (29). Debido a que la capacidad de los MØ para producir IL-1 β no se adquiere hasta estadios tardíos de su diferenciación, se sugirió que las APC de los ratones diabéticos podrían no estar completamente diferenciadas (30). Un análisis posterior indicó que el defecto residía en los precursores hematopoyéticos de dichos ratones, los cuales presentaban una menor sensibilidad a estímulos tales como el factor hematopoyético de crecimiento o factor estimulador de colonias (CSF-1). Esto se traducía en una incapacidad para generar un número adecuado de MØ fenotípicamente maduros (31). Además de esta disfunción cuantitativa, los MØ presentaban una anomalía cualitativa consistente en que a pesar de ser activados con IFN- γ , el número de moléculas MHC-I permanecía significativamente disminuido. Por otra parte, la incapacidad para responder al CSF-1 y al IFN- γ , se correlacionaba con la imposibilidad para aumentar el número de receptores para ambas citocinas. Sin embargo, el número de transcritos para dichos receptores tras estimulación simultánea con CSF-1 e IFN- γ era normal; aunque las actividades de la proteína-kinasa C (PKC) acoplada a dichos receptores estaban disminuidas de forma generalizada (32). Estos hallazgos llevaron a formular la hipótesis de que los defectos, tanto en el desarrollo como en la función de los MØ, harían que posiblemente dichas APC procesaran y presentaran antígenos de forma ineficaz; puesto que aún cuando les fuera posible estimular respuestas T proliferativas en la periferia, serían incapaces de inducir tolerancia (31).

No obstante, a pesar de las numerosas deficiencias descritas en los MØ del ratón NOD, no ha sido posible demostrar experimentalmente que las APC de estos animales sean deficientes en el procesamiento y en la presentación del antígeno (33).

¿Son necesarios el daño tisular y la destrucción de las células β pancreáticas y la liberación del antígeno, para desencadenar el proceso diabético?. En una serie de experimentos utilizando islotes pancreáticos de ratones NOD.SCID se ha demostrado que: (a) se produce una transferencia de antígeno desde la célula β a la APC, posiblemente a través del proceso de degranulación de la célula β pancreática y (b) las APC de los islotes pancreáticos de los ratones NOD.SCID, que carecen de células B y células T, poseen el antígeno asociado con las moléculas MHC-II. Esto significa que no es necesario un contacto previo con la célula T y que no es necesaria la destrucción previa de la célula β pancreática (12).

Además, las APC esplénicas de los ratones diabéticos no estimularon a clones $CD4^+$ diabetogénicos. Sin embargo, el tratamiento de los ratones con estreptozotocina (un fármaco que produce la destrucción de las células β pancreáticas) permite la liberación de antígenos y el procesamiento y presentación de los mismos por APC esplénicas. Estos resultados demuestran claramente que las etapas iniciales del proceso diabético se circunscriben al microambiente del islote pancreático y a las APC del mismo que presentan el antígeno.

3.3. Células T

La diabetes es un proceso T dependiente. Se ha producido una gran controversia sobre qué células T son las células efectoras, si lo son los linfocitos $CD4^+$ o si, por el contrario, lo son los linfocitos $CD8^+$.

Además, parece que tanto las moléculas MHC-I como las MHC-II del haplotipo H-2^{b7} contribuyen a la susceptibilidad de la IDDM humana y murina. Esto sugiere que la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas está mediada por una combinación de células T $CD4^+$ y células $CD8^+$ (3,13,34).

Ciertos estudios indican que para realizar una óptima transferencia experimental de la diabetes, ambos tipos celulares T $CD4^+$ y $CD8^+$ han de ser inyectados simultáneamente. Cuando se analizaron las interacciones entre dichas células T $CD4^+$ y las $CD8^+$ con los islotes pancreáticos de ratones NOD, se observó que los clones T $CD8^+$ reconocían un antígeno

restringido por moléculas MHC-I en sus células dianas, pero que se necesitaba el efecto coestimulador de las APC (33).

Para que las células CD4⁺ fueran capaces de reconocer el antígeno restringido por moléculas MHC-II, el antígeno debía ser transferido desde los islotes pancreáticos a las APC; éstas, en última instancia, son las que realizan la presentación antigénica. Estos resultados indican que el antígeno reconocido por ambos grupos de células T debe ser diferente.

Otros investigadores observaron que cuando se utilizaban una serie de clones T autorreactivos frente a células β pancreáticas aislados de lesiones de insulinitis de ratones NOD adultos, se necesitaba cotransferir ambos grupos de células T (los linfocitos T CD4⁺ y los CD8⁺) para acelerar el desarrollo de la IDDM en los animales receptores recién nacidos (3, 35). Por el contrario, otros han propuesto que las APC de los ratones NOD procesan y presentan los antígenos solubles en el contexto de su moléculas MHC-II especiales (las moléculas IA^{B7}) a linfocitos T CD4⁺, los cuales median la destrucción de las células β de forma análoga a lo que ocurre en una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (36). Esta hipótesis se fundamenta en que clones T CD4⁺ aislados de los bazos de los ratones NOD diabéticos son suficientes para transferir la IDDM y mediar el rechazo de injertos de islotes (37,38). Esta hipótesis está sustentada también por el hecho de que la diabetes se desarrolla con mayor frecuencia en los ratones NOD transgénicos, en los que más del 95% de las células T expresan el reordenamiento de genes del TCR α y β para uno de estos clones T autorreactivos CD4⁺ (39).

Sin embargo, cuando se han utilizado ratones en los que el gen de la b₂microglobulina ha sido mutado, parece que las células efectoras son los linfocitos CD8⁺. Estos ratones no desarrollan espontáneamente diabetes y no es posible transferirla con linfocitos CD4⁺ (40).

Finalmente, para conciliar las diferentes observaciones, se ha pretendido que el desarrollo de la diabetes estaría en función del desequilibrio entre las poblaciones de linfocitos CD4⁺, TH1 y TH2.

Numerosas evidencias experimentales indican que los linfocitos TH1 producirían IL-2, IFN- γ y TNF e intervendrían en los procesos de hipersensibilidad de tipo retardada, favoreciendo una respuesta mediada

por anticuerpos IgG_{2a}. Por el contrario, los linfocitos TH2 segregarían IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y facilitarían una respuesta mediada por anticuerpos IgG₁ e IgE. Los factores que modulan el desarrollo de las poblaciones TH1 y TH2 serían las linfocinas del medio. Así, el IFN- γ inhibiría el desarrollo y función de los linfocitos TH2, mientras que la IL-4, IL-10 e IL-13 inhibirían el desarrollo de la respuesta TH1. Por otra parte, el IFN- γ y la IL-12 favorecerían el desarrollo de una respuesta TH1. Por tanto, la regulación de la respuesta TH1 y TH2 estaría ejercida por el propio balance TH1/ TH2.

En la diabetes, la respuesta que se encuentra es básicamente del tipo TH1 (41). En un estudio reciente en el que se analizó la respuesta T y B frente a la GAD (un antígeno supuestamente clave en el proceso diabético) se encontró una respuesta típicamente TH1 con una alta producción de IFN- γ . Aunque el mecanismo de protección no se comprende completamente, de hecho la diabetes puede ser prevenida mediante la administración de anticuerpos anti-IFN- γ (42). La importancia de estos argumentos se ha reforzado con el hallazgo de clones T capaces de acelerar el desarrollo de la diabetes en ratones NOD recién nacidos. El análisis de la producción de citocinas de dichas células T, tras coinubación con islotes pancreáticos y APC, reveló una producción típica de una respuesta TH1 (43).

Otro tipo de estudios han demostrado que la administración de IL-4 evita el desarrollo de diabetes en las hembras de ratones NOD. Lo que indicaría, por el contrario, una respuesta TH2 (44). Además los ratones NOD transgénicos que llevan un alelo de IA^{g7} mutado en las posiciones 56 y 57, quedan protegidos frente al desarrollo de diabetes. Cuando se analizaron las citocinas producidas por las células T de estos ratones, se observó que eran incapaces de producir IFN- γ y, además, los autoanticuerpos frente a glutámico Descarboxilasa eran de los isotipos IgG₁ e IgE, lo que concuerda más con una respuesta TH2 que con una respuesta TH1 (45). Por lo tanto y a pesar de todos estos estudios, la participación de una respuesta Th1, Th2 o ambas en el proceso diabético, permanece aún sin ser explicada satisfactoriamente.

4. ANTÍGENOS

El antígeno que dispara el proceso diabético es desconocido. Se sabe que el antígeno está en el gránulo de la célula β pancreática, puesto que gránulos aislados son capaces de desencadenar respuesta de clones T diabetogénicos (33). Antígenos hipotéticamente responsables, como se ha mencionado, serían la insulina, la hsp-65, la GAD, la CPH, la periferina y, en algunos casos, otros de origen desconocido.

Como una primera aproximación para identificar aquellos antígenos de las células β reconocidos por las células T autoreactivas frente a los islotes pancreáticos, se consideró importante analizar -tanto en ratones NOD, como en los pacientes con diabetes tipo I- los antígenos dianas frente a los que reaccionaban los autoanticuerpos encontrados en los ratones NOD y en los enfermos diabéticos. La mayoría de los anticuerpos se dirigen frente a ciertos productos de las células β tales como la insulina, la CPH, la ICA69, la ICA512 y la GAD (47-50). Además la mayoría de estos autoanticuerpos presentan isotipos que corresponderían a una respuesta T cooperadora. Así, dichos antígenos constituyen un punto de partida para identificar aquellos frente a los que las células T autorreactivas reaccionan.

Se han detectado células T específicas para la insulina, las cuáles podrían ser las responsables, al menos en parte, de la destrucción de las células β pancreáticas y por lo tanto de iniciar el proceso diabético. La mayoría de los clones T específicos para insulina reaccionan frente al péptido 9-23 de la cadena B de la insulina (51). Sin embargo, otros estudios realizados en ratones NOD, señalaron la imposibilidad de encontrar clones T específicos que reaccionaran con la insulina. Esto indica que tampoco está claro el que la insulina sea el antígeno principal en el establecimiento de la diabetes (52).

Otra proteína, la GAD, ha sido recientemente descrita como el antígeno primario frente al que reaccionan los clones T autoreactivos en los ratones NOD, ya que los esplenocitos aislados de dichos ratones responden significativamente frente a la GAD recombinante, y más específicamente frente a la isoforma GAD65, mucho antes de que sea

posible detectar una respuesta frente a otros antígenos. Además, al hacer a ratones NOD recién nacidos, tolerantes a la GAD, se confiere protección frente al desarrollo de la diabetes (53). Sin embargo, este antígeno tampoco ha escapado a las críticas, puesto que estudios realizados por otros investigadores indican que pese a encontrarse en los ratones NOD células T reactivas frente a insulina, no se pudo detectar ningún tipo de respuesta T frente a los epítomos dominantes de la GAD (51). Finalmente, tampoco se ha demostrado que las células T específicas para los susodichos péptidos de la GAD, tengan capacidad de transferir la diabetes.

Algunos investigadores, han obtenido clones T CD4⁺ que son capaces de transferir diabetes cuando se inoculan en ratones NOD.SCID. Estos clones T, sin embargo, no reconocen ningún péptido de la GAD65, de la CPH o de la periferina (33,39).

Se sabe que el posible antígeno se encuentra en las células β pancreáticas y por experimentos de subfraccionamiento, ha sido localizado en el gránulo de secreción que contiene un 95% de insulina. Sin embargo, ni la insulina como proteína, ni utilizando péptidos solapantes de insulina son capaces de estimular clones CD4⁺ diabetogénicos. Sorprendentemente, la actividad antigénica que reside en el gránulo no está limitada a las células β pancreáticas del ratón NOD; es decir, gránulos aislados de ratones con otros haplotipos, son capaces de estimular los clones T CD4⁺, pero con restricción específica en el contexto de las moléculas IA⁸⁷. Más aún, gránulos obtenidos de otras especies (ratas, por ejemplo) y los obtenidos de líneas tumorales de células β (insulinomas) también funcionan adecuadamente como antígenos. Sin embargo, la utilización de estas líneas celulares es muy limitada, puesto que en cultivo pierden rápidamente la capacidad de sintetizar el gránulo, y desafortunadamente no expresan moléculas MHC-II, que serían la fuente ideal para purificar el péptido que estimulara a los clones T CD4⁺ diabetogénicos. Hasta ahora, todos los intentos realizados para purificar el antígeno a partir del gránulo han sido fallidos. Por tanto, por alguna razón desconocida, la actividad antigénica que estimula los clones T CD4⁺, desaparece en el proceso de solubilización del gránulo y purificación de

las proteínas. Similares resultados han sido obtenidos en otros laboratorios que también poseen clones T CD4⁺ diabetogénicos que no reconocen GAD, CPH, periferina o insulina.

Otra estrategia que se ha llevado a cabo para intentar identificar aquellos antígenos frente a los que reaccionan las células T autoreactivas en la diabetes tipo I, ha sido analizar aquellos péptidos que pudieran ser eluidos de moléculas IA^{g7} de ratones NOD, así como de las moléculas MHC-I, K^d. De las moléculas K^d, solo se detectaron tres péptidos: JAK1 (355-363), colágeno tipo I (4-12) y otro péptido de una proteína no identificada. De las moléculas IA^{g7} se aislaron siete péptidos: HSA (560-574), transferrina (55-68), hnRNP (31-43), hnRNP (51-63), hnRNP (44-59), hnRNP (7-21) y β -globina (33-45) (54).

Igualmente, se analizó la capacidad de competición de estos péptidos en un ensayo de células T específicas para el péptido E α (52-68). Sorprendentemente, tan sólo 5 de los 7 péptidos y a altas concentraciones, fueron capaces de competir, indicando que posiblemente alguno de los péptidos aislados era un artefacto del proceso de aislamiento. Aunque se trató de definir una posible secuencia motivo, el análisis obtenido de los péptidos eluidos no permitió definir ninguna secuencia motivo. Tampoco se ha demostrado que ninguno de estos péptidos intervenga en el proceso diabético.

En la experiencia de uno de nosotros (E.C.M.), realizando experimentos de unión de estos péptidos con moléculas IA^{g7} purificadas o con linfomas B transfectados con las moléculas IA^{g7}, no se ha encontrado que ninguno de estos péptidos tenga una gran capacidad de unión. Posiblemente por esta razón, en los experimentos anteriormente mencionados, se necesitasen concentraciones de péptido cercanas a 1 mg/ml para obtener competición. Como se mencionará más adelante, esta propiedad de unir débilmente péptidos hace que la molécula IA^{g7}, en comparación con otras moléculas MHC-II murinas, sea extremadamente peculiar.

La búsqueda del antígeno diabetogénico es una de las tareas que más intensamente se están desarrollando. Si bien es cierto que se ha presentado a la GAD como la responsable de la iniciación del proceso

diabético, y que tanto en el hombre como en el ratón, es un marcador temprano de autoanticuerpos, paradójicamente no se ha detectado RNA para GAD en las células β de los islotes de Langerhans.

5. GENÉTICA DE LA DIABETES EN EL RATON NOD

La diabetes autoinmune desarrollada por los ratones NOD es un proceso multifactorial y poligénico. El haplotipo del MHC del ratón NOD, H-2^{g7}, codifica las moléculas IA^{g7}, K^d, D^b e IE^c.

El análisis de los cruces con otros ratones, ha demostrado que las moléculas IA^{g7} representan el principal factor de susceptibilidad a padecer diabetes. Es decir, no existe diabetes en ausencia de IA^{g7}. Existe discusión, eso sí, sobre si el alelo IA^{g7} es un gen recesivo o no. Para algunos autores, éste sería el caso (6,55), mientras que para otros el alelo IA^{g7} sería dominante, pero con una baja penetrancia (23,56). En cualquier caso, en lo que todos los investigadores están de acuerdo es en la importancia de la molécula IA^{g7} como factor de susceptibilidad a diabetes. El primer gen de susceptibilidad descrito se encontró que mapeaba en la región de las moléculas MHC-II. Años más tarde, Acha-Orbea y McDevitt demostraron que la molécula de clase II de los ratones NOD es única desde el punto de vista de su secuencia aminoacídica (57).

La molécula MHC-II es un dímero formado por una cadena α y por una cadena β . En los ratones NOD, la cadena α es idéntica a la de los ratones de haplotipo H-2^d, es decir, α^d . Sin embargo, la cadena β es única en secuencia aminoacídica, no encontrándose en ningún ratón de otro haplotipo: k, d, b, q, r, s, u (58).

La principal característica que la distingue del resto de las cadenas β descritas es la ausencia del residuo aspártico 57, presente en todos los demás haplotipos y la presencia, en su lugar, de un residuo de serina (59). Asimismo, la posición 56, también es única por la presencia de una histidina, que en el resto de los haplotipos es una prolina, excepto en los ratones H-2^f que poseen una serina (tabla 1). La ausencia de este aspártico 57 en la cadena β de las moléculas de MHC-II, podría pasar desapercibida y ser atribuida a una pequeña peculiaridad más del ratón NOD, si no fuera porque en el hombre existe una fuerte correlación entre la ausencia del

aspártico en la posición 57 y la susceptibilidad a padecer diabetes de tipo I (60). En el hombre se ha establecido también que la presencia de una arginina en la posición 52 en la cadena α de las moléculas DQ sería otro posible factor de riesgo.

TABLA 1

Comparación de las secuencias aminoacídicas de la cadena β de los distintos haplotipos murinos.

	49	64
d	A V T E L G R P D A E Y W N S Q	
b	A V T E L G R P D A E Y W N S Q	
f	A V T E L G R <u>S</u> D A E Y <u>Y</u> N <u>K</u> Q	
k	A V T E L G R P D A E Y W N <u>K</u> Q	
p	A V T E L G R P D A E Y W N S Q	
q	A V T E L G R P D A E Y W N S Q	
r	A V T E L G R P D <u>P</u> E Y <u>Y</u> N <u>K</u> Q	
s	A V T E L G R P D A E Y <u>Y</u> N <u>K</u> Q	
u	A V T E L G R P D A E Y <u>Y</u> N <u>K</u> Q	
nod	A V T E L G R <u>H</u> <u>S</u> A E Y <u>Y</u> N <u>K</u> Q	

En cualquier caso lo que si parece claro es que la presencia en homocigosis de la arginina 52 en la cadena α junto con la ausencia de un residuo aspártico en la posición 57 de la cadena β es el mayor factor de riesgo para desarrollar diabetes. Pero, además, el ratón NOD posee una arginina en la posición 48. Basándose en la estructura cristalográfica de las moléculas DR, se podría considerar la posición 48 de la cadena α de la molécula MHC-II del ratón, homóloga a la posición 52 de la cadena DR α humana. No obstante, hasta que no se consiga cristalografiar las moléculas MHC-II del ratón NOD, la homología no puede ser considerada como definitiva. Por supuesto, otros ratones con haplotipos que expresan α^d , es decir todos los ratones H-2^d, no desarrollan diabetes. Por tanto, lo único que se sabe con certeza es que la molécula IA^{E7} es el principal gen

de susceptibilidad para el desarrollo de la diabetes, siendo la cadena β^{g7} única en secuencia aminoacídica, y a la cual se le atribuyen las propiedades diabetogénicas de las moléculas IA^{g7}.

Se ha postulado que la ausencia del aspártico 57 en la cadena β impediría la formación del puente salino observado en la estructura cristalográfica de las moléculas HLA-DR1 entre el residuo arginina 76 de la cadena α y el residuo aspártico 57 de la cadena β (61). Esta "deficiencia" en el NOD, por tanto, afectaría a la unión de péptidos a la molécula IA^{g7} (más adelante se discutirá este punto).

Investigaciones recientes utilizando ratones transgénicos han demostrado el papel protector frente al desarrollo de la diabetes mediante la expresión de cadenas β^{g7} que codifican para las posiciones prolina 56 y/o aspártico 57 (62).

En ambos casos se obtuvo protección frente a la diabetes a las 12 semanas, pero paradójicamente, todos los ratones desarrollaron insulinitis. Este mecanismo de protección, es decir, ausencia de hiperglucemia pero presencia de insulinitis, es un hecho general que ocurre en la mayoría de las manipulaciones genéticas y no genéticas que se realizan para evitar la diabetes.

La expresión de transgenes IE o IA^b protege frente a la diabetes y la expresión de transgenes IA^k protege sólo parcialmente (63-65). Además, la inoculación con adyuvante completo de Freund (CFA) también resulta protectora. Sin embargo, en todos los casos los ratones siguen desarrollando insulinitis (66). El mecanismo exacto de protección por los transgenes y por CFA no se conoce con certeza. Se supone que la presencia de los transgenes favorecería la eliminación de clones T autorreactivos, pero no hay ningún experimento que lo haya comprobado puesto que el problema teóricamente más simple en la diabetes, es -en la práctica- el más complejo y enigmático: ¿Cuál es el antígeno que dispara la patología diabética?

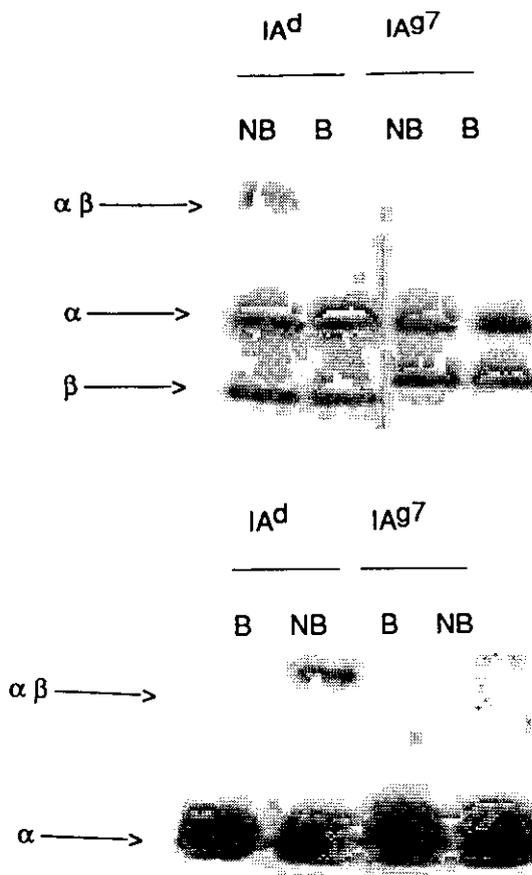


Figura 2. Diferencias en el porcentaje de dímeros $\alpha\beta$ estables en células de diferentes haplotipos murinos.

Esplenocitos de ratones NOD (I-A^{g7}) o Balb/c (I-A^d) se marcaron metabólicamente con ³H-leucina durante 30 minutos, se lavaron e incubaron durante 4 horas más. Posteriormente, las moléculas MHC-II fueron inmunoprecipitadas y analizadas mediante SDS-PAGE (panel superior) o mediante inmunotransferencia tipo Western (panel inferior) utilizando un anticuerpo frente a la región citoplasmática de la cadena α de las moléculas MHC-II. B= muestras calentadas; NB= muestras no calentadas.

Los porcentajes de dímeros $\alpha\beta$ estables obtenidos mediante la inmunoprecipitación fueron 12% para I-A^d y 0% para I-A^{g7}. Los porcentajes de dímeros $\alpha\beta$ estables obtenidos mediante inmunotransferencia tipo Western fueron 18% para el I-A^d y 0% para el I-A^{g7}.

Aunque el mayor factor de riesgo para el desarrollo de la IDDM de tipo I es claramente el debido a determinadas moléculas MHC-II, se han descrito recientemente otros genes de susceptibilidad y de protección. Un aspecto particularmente interesante es lo que ocurre con los ratones F1. En general, un 95% de todos los ratones F1 obtenidos por cruces entre ratones NOD y otras cepas murinas, no desarrollan IDDM. Esto es debido no a que los genes de susceptibilidad a diabetes, incluidos los genes MHC-II, sean recesivos, sino al menor grado de fijación de los alelos de susceptibilidad (67,68).

Mediante el uso de cepas congénicas tales como NOD.H-2^b se ha demostrado que aunque estos ratones no desarrollan ni diabetes ni insulinitis, sí presentan fenómenos autoinmunes similares a los del NOD.H-2^{g7}. Por tanto, existen otros genes que, en mayor o menor medida, participarían en el desarrollo de la insulinitis (26).

TABLA 2
Cromosomas ligados a la diabetes murina tipo I o a insulinitis.

<u>LocusIdd</u>	<u>Cromosoma</u>	<u>Diabetes</u>	<u>Insulitis</u>	<u>alelo NOD</u>
<i>Idd 1</i>	17	+	+	susceptible
<i>Idd 2</i>	9	+	-	susceptible
<i>Idd 3</i>	3	+	+	susceptible
<i>Idd 4</i>	11	+	-	susceptible
<i>Idd 5</i>	1	+	+	susceptible
<i>Idd 6</i>	6	+	-	susceptible
<i>Idd 7</i>	7	+	-	protector
<i>Idd 8</i>	14	+	-	protector
<i>Idd 9</i>	4	+	ND	susceptible
<i>Idd 10</i>	3	+	+	susceptible
<i>Idd 11</i>	4	+	ND	susceptible
<i>Idd 12</i>	14	+	ND	susceptible
<i>Idd 13</i>	2	+	-	susceptible
<i>Idd 14</i>	13	+	-	susceptible

Los símbolos (+) y (-) indican ligamiento o no ligamiento, respectivamente, a diabetes o insulinitis.- ND, no determinado.

Hasta la fecha se han descrito en el ratón al menos 14 regiones cromosómicas que contienen genes de resistencia y de susceptibilidad. Sin embargo, estos datos se basan en técnicas de mapeo cromosómico y probablemente cada uno de los alelos de resistencia y susceptibilidad contengan más de un gen. Algunas de estas regiones han sido descritas tanto en el hombre como en modelos experimentales (en las ratas BB y en los ratones NOD)(tabla 2).

Uno de nosotros (E.C.M.) ha demostrado recientemente que las moléculas IA^{g7}, cuando son comparadas con las moléculas MHC-II de otros haplotipos, posee unas características únicas (27). Una de las propiedades características de las moléculas MHC-II es su capacidad para unir péptidos procesados. Esta unión puede ser medida mediante parámetros físico-químicos. Algunos péptidos son capaces de unirse y estabilizar la molécula, mientras que otros péptidos son incapaces de hacerlo. Conviene recordar que la molécula MHC-II, cuando carece de un péptido unido, migra, en condiciones de SDS-PAGE, como un monómero, α y β . Los péptidos capaces de estabilizarla, hacen que la molécula migre en los geles como un dímero $\alpha\beta$, mientras que aquellos péptidos que no la estabilizan hacen que el dímero se disocie en monómeros α , β (69).

Utilizando esta técnica se han comparado los comportamientos de moléculas MHC-II de diferentes haplotipos murinos. En la tabla 3 se muestra el porcentaje de dímeros estables encontrados en los diferentes haplotipos murinos. Como puede observarse, las moléculas MHC-II del ratón NOD, IA^{g7}, apenas poseen dímeros estables en las condiciones de SDS-PAGE. Un aspecto interesante fue comparar cuidadosamente los haplotipos d y g⁷, ya que poseen una cadena α^d similar, diferenciándose en la cadena β , β^d y β^{g7} respectivamente. En la figura 2 se muestra un experimento de pulso y caza, inmunoprecipitando las moléculas MHC-II. Con esta técnica se detectan las moléculas de clase II sintetizadas *de novo*. Se realizó además una inmunotransferencia tipo Western utilizando un anticuerpo que reconoce la cadena α^d . Se valoró, así, el "pool" total de moléculas MHC-II. Estos experimentos demuestran que las moléculas IA^{g7}, unen péptidos principalmente de manera inestable. Se obtuvo una estimación de cómo las moléculas MHC-II unen los péptidos provenientes

de proteínas autólogas y, a continuación, se estudiaron las propiedades de unión de péptidos a la moléculas IA^{g7} purificadas. Para ello se utilizaron péptidos autólogos, péptidos de proteínas inmunogénicas en el ratón NOD y péptidos que han sido relacionados con la diátesis diabética autoinmune (tabla 4).

TABLA 3
Porcentaje de moléculas estables en condiciones de SDS-PAGE en diferentes haplotipos murinos.

Haplotipo	H-2 ^b	H-2 ^d	H-2 ^f	H-2 ^{g7}	H-2 ^k	H-2 ^s	H-2 ^q
% MHCII estable ^a	70	12	88	1	40	89	94

^aEsplenocitos procedentes de ratones del haplotipo indicado, se marcaron durante 30 min con ³H-leucina y 4 horas más tarde las moléculas MHC-II fueron inmunoprecipitadas y analizadas mediante SDS-PAGE.

El resultado más inesperado fue que en todos los casos la molécula IA^{g7} une péptidos muy débilmente y que, además, lo hace de manera inestable. Pero, ¿cuál es el significado fisiológico de la unión estable/inestable de los péptidos a las moléculas MHC-II?. Recientemente en el laboratorio de E. Unanue se ha demostrado que aquellos péptidos que se unen establemente poseen una vida media más larga en la superficie de las APC, mientras que aquellos que se unen inestablemente permanecen en la superficie de la APC durante un periodo de tiempo muy limitado (potencia inmunológica) (70). En la tabla 5 se muestra la vida media de los péptidos autólogos de los haplotipos murinos H-2^b, H-2^d y H-2^{g7}. Como se puede observar, la molécula IA^{g7} posee una vida media muy corta. También se ha comprobado -en experimentos con ratones (NODxB6)F1 y/o (NODxBALB/c)F1- que estas propiedades de la molécula IA^{g7} son intrínsecas, y no se deben a ningún defecto en el procesamiento y la presentación de antígenos por las APC. Además, el "background" genético del NOD no afecta ni a la expresión de la otra molécula de clase II en dichos ratones F1, IA^b y/o IA^d en cada caso, ni a

la capacidad de unión de péptidos a estas dos moléculas MHC-II.

Se ha podido descartar que la inestabilidad de las moléculas IA^{g7} se pueda corregir por complementación con otros alelos procedentes de los haplotipos k, d ó b. Por supuesto, tampoco ningún alelo del ratón NOD interfiere con la estabilidad del IA^d, IA^k ó IA^b. Algunos investigadores postulan que el ratón NOD presenta un defecto en los transportadores de péptidos, TAP-I y TAP-II, en la presentación de antígenos restringida por moléculas MHC-I. Sin embargo, esta hipótesis está basada en un estudio de los fragmentos de restricción de estos transportadores que, desde luego, no tiene ningún significado funcional. De hecho, nadie ha demostrado ningún defecto en el procesamiento y presentación de antígeno restringidos por moléculas MHC-I en el ratón NOD y tampoco existe ningún resultado convincente sobre el posible papel de estos transportadores en el procesamiento y presentación restringidos por moléculas MHC-II (71).

TABLA 4
Unión de diferentes péptidos a las moléculas IA^{g7}.

<u>Péptidos^a</u>	<u>Respuesta de células T^b</u>
HEL (11-25)	3 μ M
CPH (362-382)	1 μ M
CPH (440-464)	0.3 μ M
GAD (524-543)	7 μ M
HSP (437-460)	1 μ M
OVA (323-339)	0.03-0.3 μ M
transferrina (55-68)	23 μ M
MSA (560-574)	46 μ M

^aHEL, lisozima de clara de huevo; CPH, carboxipeptidasa H; GAD, glutámico-descarboxilasa; HSP, proteína de choque térmico; OVA, albúmina de clara de huevo; MSA, albúmina sérica murina

^bConcentración de péptido necesaria para obtener el 50% de la máxima respuesta.

Se ha descrito que los ratones en los que se ha hecho una mutagénesis dirigida al gen de la cadena invariante, no expresan correctamente moléculas MHC-II, o que el mecanismo de carga de péptidos a las moléculas MHC-II está impedido. Por tanto, en las condiciones de la SDS-PAGE, estas moléculas MHC-II vacías, migrarían como monómeros α y β libres (72,73). Esta posibilidad fué analizada en las APC del ratón NOD, y el resultado que se obtuvo fué que ni la asociación de la molécula de IA^{g7} a la cadena invariante, ni la carga a las moléculas IA^{g7} de péptidos generados durante el procesamiento del antígeno, están bloqueados.

TABLA 5

Vida media de las moléculas de MHC-II en distintos haplotipos murinos.

Haplotipo	H-2 ^b	H-2 ^d 2 ^{g7}	H-
Vida media (horas) ^a	13.4	9.3	5.5

^aEsplenocitos de ratones con los indicados haplotipos se marcaron durante 30 minutos con ³H-leucina y a diferentes tiempos las moléculas MHC-II fueron inmunoprecipitadas.

El término vida media, se refiere al tiempo necesario para obtener una disminución del 50% en las moléculas MHC-II inmunoprecipitadas.

Se ha especulado también que la ausencia del aspártico 57 de la cadena β de las moléculas IA^{g7} impediría la formación del puente salino con la arginina 81 de la cadena α (de acuerdo con datos de la cristalografía de las moléculas HLA-DR1) afectando a la unión de los péptidos. Uno de nosotros (E.C.M.) mediante mutagénesis dirigida ha modificado los residuos His 56, Ser 57 a la secuencia consenso Pro 56, Asp 57. Esta cadena β mutante fué transfectada en células M12C3 que expresan cadena α^d . El análisis mediante métodos convencionales de esta molécula indican que la modificación de esos residuos no afecta ni a la inestabilidad de la molécula, ni a la unión débil a péptidos. Desde luego podría ser que los residuos de anclaje del péptido estuviesen en la cadena α^d , siendo la cadena β la que generaría la especificidad de la respuesta T, al igual que en el modelo IA^k. Otra posible explicación de las características únicas de

la molécula IA^{g7} es que fuera precisamente el péptido diabetogénico y sólo este, el único capaz de unirse establemente a la molécula IA^{g7}. Esta posibilidad fue estudiada aislando APC de los islotes pancreáticos y tras analizar la molécula IA^{g7} expresada en dichas APC, se comprobó que también es inestable. Por tanto, no parece que el antígeno diabetogénico tenga ninguna propiedad especial en cuanto a su unión a la molécula IA^{g7}.

La interpretación más lógica es que precisamente las propiedades de la molécula IA^{g7} (unión inestable de péptidos, unión débil de los mismos y vida media muy corta) son las que favorecerían que los clones T autorreactivos escaparan a la selección T, bien sea tímica o periférica (por ahora carecemos de datos sobre si la selección de clones T autorreactivos en el modelo murino diabético se produce en el timo o en la periferia). En cualquier caso esto favorecería un estado de tolerancia frente a clones T autorreactivos, que por sucesivas reestimulaciones pasarían de un estado en reposo a un estado activo, produciéndose la diabetes autoinmune. Basta recordar que la diabetes, tanto experimental como humana, es un proceso lento y progresivo.

Finalmente, mencionar que un aspecto interesante que merecería ser estudiado es el papel de las moléculas DM en la carga de péptidos a la molécula IA^{g7}. Estas moléculas, ha sido recientemente descrita tanto en el hombre como en el ratón.

6. CONCLUSIONES

El ratón NOD es un valioso y válido modelo para estudiar la diabetes autoinmune humana tipo I. Esta enfermedad es un proceso T dependiente. Sin embargo, no existe consenso sobre si las células efectoras e importantes son los linfocitos T CD4 o por el contrario los linfocitos T CD8.

La destrucción de la célula β pancreática es un proceso todavía no muy bien comprendido, desconociéndose cuál es la célula efectora que daña específicamente la célula β .

En el desarrollo de la diabetes espontánea del ratón NOD intervienen al menos 14 loci, que generan susceptibilidad y resistencia. Algunos genes regulan el proceso de insulinitis, mientras que otros regulan

el proceso que lleva a la diabetes mellitus (hiperglucemia por destrucción de las células β pancreáticas).

La naturaleza del antígeno no es conocida. Con base en la producción de anticuerpos y aislamiento de clones T reactivos frente a islotes pancreáticos, se han descrito como antígenos, entre otros, la GAD65, la CPH, la periferina y la insulina. En otros casos, los clones T diabetogénicos aislados no reconocen ninguna de éstas proteínas y la capacidad antigénica reside en el gránulo de la célula β pancreática.

El gen de susceptibilidad más importante en la diabetes es la molécula MHC-II IA^{g7}. Esta molécula es extremadamente inestable, una péptidos muy débilmente y posee una vida media muy corta. Estas características pudieran favorecer la no eliminación de clones T autorreactivos. Esta hipótesis, así como la causa molecular de las propiedades únicas de la molécula de clase II IA^{g7}, está siendo analizada actualmente.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) CASTAÑO, L. Y EISENBARTH, G.S. (1990). *Ann. Rev. Immunol.* 8: 647.
- (2) FUJITA, T., KUSUMOTO, Y.R., SERIZAWA, Y., MAKINO, S Y TOCHINO, Y. (1982). *Biomed. Res.* 3: 429.
- (3) MILLER, B.J., APPEL, M.C., O'NEIL, J.J. Y WICKER, L.S. (1988). *J. Immunol.* 140: 52.
- (4) LO, D., REILLY, C.R., SCOTT, B., LIBLAU, R., MCDEVITT, H.O. Y BURKLY, L.C. *Eur. J. Immunol.* 23: 1693.
- (5) NISHIMOTO, H., KIKUTANI, H., YAMAMURA, K. Y KISHIMOTO, T. (1987). *Nature* 328: 432.
- (6) PROCHAZKA, M., LEITER, E.H., SERREZE, D.V. Y COLEMAN, D.L. (1987). *Science* 237: 286.
- (7) MAKINO, S., HARADA, M., KISHIMOTO, Y. Y HAYASHI, Y. (1986). *Exp. Anim.* 35: 495.
- (8) DARDENNE, M., LEPAULT, F., BENDELAC, A. Y BACH, J.F. (1989). *Eur. J. Immunol.* 19: 889.
- (9) OGAWA, M., MARUYAMA, T., HASEGAWA, T., KANAYA, T., KOBAYASHI, F., TOCHINO, Y. Y UDA, H. (1985). *Biomed. Res.* 6: 103.
- (10) HARADA, M. Y MAKINO, S. (1986). *Exp. Anim.* 35: 501.
- (11) SHIZURU, J.A., TAYLOR-EDWARDS, C., BANKS, B.A., GREGORY, A.K. Y FATHMAN, C.G. (1988). *Science* 240: 659.
- (12) SHIMIZU, J., CARRASCO-MARIN, E., KANAGAWA, O. Y UNANUE, E.R. (1995). *J. Immunol.* 155: 4095.

- (13) KIKUTANI, H. Y MAKINO, S. (1992). *Adv. Immunol.* 51: 285.
- (14) MAKINO, S., KUNIMOTO, K., MURAOKA, Y., MIZUSHIMA, Y., KATAGIRI, K. Y TOCHINO, Y. (1980). *Exp. Anim.* 29: 1.
- (15) POZZILLI, P., SIGNORE, A., WILLIAMS, A.J.K. Y BEALES, P.E. (1993). *Immunol Today* 14:193.
- (16) LEITER, E.H., COLEMAN, D.L. Y HUMMEL, K.P. (1989). *Endocrinology* 124: 912.
- (17) TODD, J.A. (1991). *Diabetic. Med.* 8: 906.
- (18) BOWMAN, M.A., LEITER, E.H. Y ATKINSON, M.A. 1994. *Immunol Today* 15: 115.
- (19) WICKER, L.S., TODD, J.A. Y PETERSON, L.B. (1995). *Ann. Rev. Immunol.* 13: 179.
- (20) LEITER, E.H. Y SERREZE, D.V. (1992). *Reg. Immunol.* 4: 263.
- (21) LEITER, E.H., SERREZE, D.V. Y PROCHAZKA, M. (1990). *Immunol. Today* 11:147.
- (22) LEITER, E.H. (1989). *Faseb J.* 3: 2231.
- (23) WICKER, L.S., MILLER, B.J., COKER, L.Z., MCNALLY, S.E., SCOTT, S., MULLEN, Y. Y APPEL, M.C. (1987). *J. Exp. Med.* 165: 1639.
- (24) TOCHINO, Y. (1987). *CRC Crit. Rev. Immunol.* 8: 49.
- (25) IKGAMI, H. Y MAKINO, S. (1993). En *Lessons from Animal Diabetes*, ed. E. Shafir, pg. 39. London. Smith-Gordon.
- (26) WICKER, L.S., APPEL, M.C., DOTTA, F., PRESSEY, A., MILLER, B. J., DELARATO, N.H., FISCHER, P.A., BOLTZ, R.C. Y PETERSON, L.B. (1992). *J. Exp. Med.* 176: 67.
- (27) CARRASCO-MARIN, E., SHIMIZU, J., KANAGAWA, O. Y UNANUE E.R. *J. Immunol* (en prensa).
- (28) SERREZE, D.V. Y LEITER, E.H. (1988). *J. Immunol.* 140: 3801.
- (29) JACOB, C.O., AISO, S., MICHIE, S.A., MCDEVITT, H.O. Y ACHA-ORBEA, H. (1990). *PNAS* 67: 968.
- (30) WITSELL, AA.L. Y SCHOOK, L.B. (1991). *PNAS.* 88: 1963.
- (31) SERREZE, D.V., GASKINS, H.R. Y LEITER, E.H. (1993). *J. Immunol.* 150: 2534.
- (32) SERREZE, D.V., GAEDEKE, J.W. Y LEITER, E.H. (1993). *PNAS* 90: 9625.
- (33) SHIMIZU, J., KANAGAWA, O. Y UNANUE, E.R. (1993). *J. Immunol.* 151: 1723.
- (34) BENDELAC, A.C., CARNAUD, C., BOITRAD, C. Y BACH, J.F. (1987). *J. Exp. Med.* 166: 823.
- (35) BOITRAD, C., BENDELAC, A., RICHARD, M., CARNAUD, F. Y BACH J.F. 1988. *PNAS* 85: 9719.
- (36) BRADLEY, B.J., HASKINS, K., LA ROSA, F.G., LAFFERTY, K.J. (1992). *Diabetes*, 41: 1603.
- (37) HASKINS, K., PORTAS, M., BERGMAN, B., LAFFERTY, K.J. Y BRADLEY, B. (1989). *PNAS* 86: 8000.
- (38) BRADLEY, B.J., WANG, Y., LAFFERTY, K.J. Y HASKINS, K. (1990). *J. Autoimmun.* 3: 449.
- (39) KATZ, J.D., WANG, B., HASKINS, K., BENOIST, C. Y MATHIS, D. (1993). *Cell* 74: 1089.
- (40) FAUSTMAN, D., LI, X., LIN, H.F., FU, Y., EISENBARTH, G., AVRUCH, I. Y GUO, J. (1991). *Science* 254: 1756.

- (41) BERGMAN, B. Y HASKINS, K. (1994). *Diabetes* 43: 197.
- (42) THAI, AC. Y EISENBARTH, E.H. (1993). *Diabetes Rev.* 1:1.
- (43) DEBRAY-SACHS, M., CARNAUD, C., BOITARD, C. ET AL. (1991). *J. Autoimmun.* 4: 237.
- (44) CAMPBELL, I.L., KAY, T.W.H., OXBROW, L Y HARRISON, L.C. (1991). *J. Clin. Invest.* 87: 739.
- (45) RAPOPORT, M.J., JARAMILLO, A. Y ZIPRIS, D ET AL. (1993). *J. Exp. Med.* 178: 87.
- (46) TISCH, R. YANG, X.D, SINGER, SM., LIBLAU, R.S., FUGGER, L. Y MCDEVITT, H.O. (1993). *Nature* 366: 72.
- (47) PALMER, J.P., ASPLIN, C.M., CLEMONS, P. LYEN, K., TATPATI, O, RAGHU, P.K. Y PAQUETTE, T.L. (1983). *Science* 222: 1337.
- (48) CASTAÑO, L., RUSSO, E. ZHOU, L. LIPES, M.A. Y EISENBARTH, GS. (1991). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73: 1197.
- (49) PIETROPAOLO, M., CASTAÑO, L., BABU, S., BUELOW, R., KUO, Y.L., MARTION, S., MARTIN, A., POWERS, A.C., PROCHANKA, M., NAGGERT, J., LEITER, E.H. Y EISENBARTH, G.S. (1993). *J. Clin. Invest.* 92: 359.
- (50) BAEKKESKOV, S., AANSTOOT, H., CHRISTGAU, S., REETZ, A., SOLIMENA, M., CASCALHO, M., FOLLI, F., RICHTER-OLESEN, H. Y DE CAMILLI, P. (1990). *Nature* 347: 151.
- (51) DANIEL, D., GILL, R.G., SCHLOOT, N. Y WEGMANN, D. (1995). *Eur. J. Immunol.* 25: 1056.
- (52) GELBER, C., PABORSKY, L., SINGER, S., MCATEER, D., TISCH, R., JOLICOEUR, C., BUELOW, R., MCDEVITT, H.O. Y FATHMAN, C.G. (1994). *Diabetes* 43: 33.
- (53) KAUFMAN, D.L., CLARE-SALZER, M., TIAN, J., FORSTHUBER, T., TING, GSP., ROBINSON, P., ATKINSON, MA., SERCARZ, E.E., TOBIN, A.J. Y LEHMANN, P.V. (1993). *Nature* 366: 69.
- (54) REICH, EP., VON GRAFENSTEIN H., BARLOW, A., SWENSON, K.E., WILLIAMS, K. Y JANEWAY, C.A. (1994). *J. Immunol.* 152: 2279.
- (55) HATTORI, M., BUSE, JB, JACKSON, RA, GLIMCHER, L, DORF, ME, MINAMI, M, MAKINO, S., MORIWAKI, K, KUZUYA, H., IMURA, H., STRAUSS, W.M., SEIDMAN, JG. Y EISENBARTH, GS. (1986). *Science* 231: 733.
- (56) WICKER, L.S., MILLER, BJ., FISCHER, PA, PRESSEY, A. Y PETERSON, LB. (1989). *J. Immunol.* 142: 529.
- (57) ACHA-ORBEA H. Y MCDEVITT, H.O. (1987). *PNAS* 84: 2435.
- (58) LIU, G.Y., BAKER, D., FAIRCHILD, S., FIGUEROA, F., QUARTEY-PAPAFIO, R., TONE, M., HAELEY, D., COOKE, A., TURK, J.L. Y WRAITH, D.C. (1993). *Immunogenetics* 37: 296.
- (59) QUARTEY-PAPAFIO, R., LUND, T., CHANDLER, P., PICARD, J., OZEGBE, P., DAY, S., HUTCHINGS, P.R., O'REILLY, L., KIOUSSIS, D., SIMPSON, E. Y COOKE, A. (1995). *J. Immunol.* 154: 5567.
- (60) KHALIL, I., D'AURIOL, L., GOBET, M., MORIN, L., LEPAGE, V., DESCHAMPS, I., PARK, M.S., DEGOS, L., GALIBERT, F. Y HORS, J. (1990). *J. Clin. Invest.* 85: 1315.

- (61) YAMAMURA, K., MIYAZAKI, Y., UNO, M., TOYONAGA, T. Y MIYAZAKI, J. (1992). *Springer Semin. Immunopathol.* 14: 115.
- (62) SINGER, S.M., TISCH, R., YNAG, XD. Y MCDEVITT, H.O. (1993). *PNAS* 90: 9566.
- (63) LUNDT, T.L., O'REIGY, L., HUTCHINGS, P., KANGAWA, O., SIMPSON, E., GRAVELY, R., CHANDLER, P., DYSUM, J., PICARD, J.K. Y EDWARDS, A. (1990). *Nature* 345: 727.
- (64) YAMAMURA, K., MIYAZAKI, T., UNO, M., TOYONAGA, T. Y MIYAZAKI, J. (1992). *Springer Sem. Immunopathol.* 14: 115.
- (65) UEHIRAM, M., UNO, M., KURNER, T., KIKUTANI, H., MORI, K., INOMOTO, T., UEDA, T., MIYAZAKI, J., MISHIMOTO, H., KISHIMOTO, T. Y YAMAMURA, K. (1989). *Inter. Immunol.* 1: 209.
- (66) ULAETO, D., LACY, P.E., KIPNIS, D.M., KANAGAWA, O. Y UNANUE, E.R. (1992). *PNAS* 89: 3927.
- (67) TOCHINO, Y. (1987). *CRC Crit. Rev. Immunol.* 8: 49.
- (68) IKEGAMI, H., MAKINO, S. (1993). En *Lessons from Animal Diabetes*, ed. E. Shaffir, pg 39. London: Smith-Gordon.
- (69) NELSON, C.A., PETZOLD, S.J. Y UNANUE, E.R. (1993). *PNAS* 90: 1227.
- (70) NELSON, C.A., PETZOLD, S.J. Y UNANUE, E.R. (1994). *Nature* 371: 250.
- (71) GASKINS, H.R., MONACO, J.J. Y LEITER, E.H. 1992. *Science* 256: 1826.
- (72) BIKOFF, E.K., HUANG, L.Y., EPISKOPOU, V., VAN MEERWIJK, J., GERMAIN, R.N. Y ROBERTSON, E.J. 1993. *J. Exp. Med.* 177: 1699.
- (73) VIVILLE, S., NEEFJES, J., LOTTEAU, V., DIERICH, A., LEMEURE, M., PLOEGH, H., BENOIST, C. Y MATHIS, D. (1993). *Cell* 72: 635.