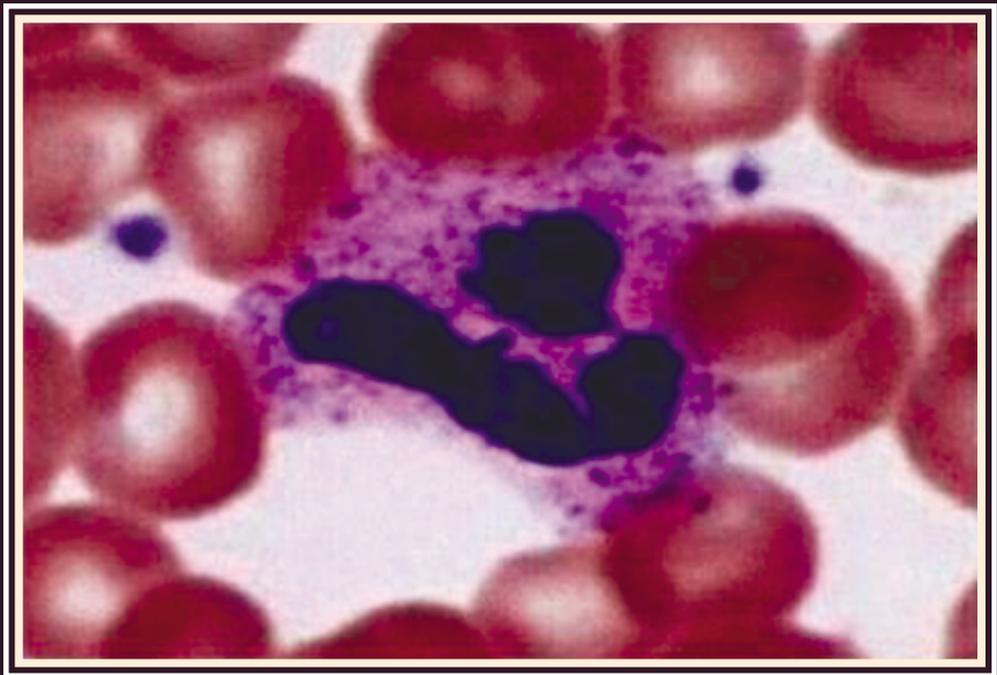


Instituto de España

BIOQUÍMICA Y FISIOPATOLOGÍA DEL SISTEMA INMUNE



Editores

María Cascales Angosto

Pedro García Barreno

Madrid 2007

INSTITUTO DE ESPAÑA

**BIOQUÍMICA Y FISIOPATOLOGÍA
DEL
SISTEMA INMUNE**

Coordinadores:

**MARÍA CASCALES ANGOSTO
PEDRO GARCÍA BARRENO**



Madrid 2007

Portada:

Neutrófilo polimorfonuclear (en el centro), rodeado de eritrocitos. 4.000 aumentos

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento muy especial a *Adoración Urrea Salazar* por su inestimable ayuda y colaboración en la preparación, ajuste electrónico de las fotografías y portada y en todo lo relativo a la impresión de esta Monografía.

Índice

	<u>Págs.</u>
Autores	7
Prólogo. Margarita Salas Falgueras	11
Ontogenia del Sistema Inmune. Agustín Zapata González	15
Inflamación e inmunidad innata. Pedro García Barreno	31
NADPH oxidasa fagocítica y enfermedad granulomatosa crónica. María Cascales Angosto	135
Inmunología del trasplante. Emilio Gómez de la Concha	169
El sistema inmunitario en el envejecimiento. Mónica De la Fuente Del Rey	193
Vacunas heterólogas. Mariano Esteban Rodríguez	245
Reconstitución inmune en niños infectados por HIV. M. ^a Ángeles Muñoz Fernández.....	303

Autores



María Cascales Angosto

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Doctora *ad honorem* del CSIC

Farmacia 11

28004 Madrid

Teléfono +34 91 4509229 y +34 91 5310307

Correo electrónico: mcascales@insde.es

Mariano Esteban Rodríguez

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Profesor de Investigación del CSIC

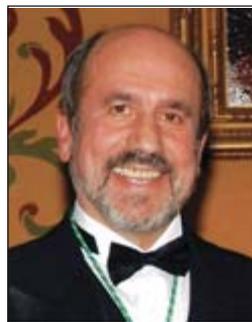
Centro Nacional de Biotecnología CSIC

Campus UAM

28049 Madrid

Teléfono: +34-91-5854553; FAX: +34-91-585-4506

Correo electrónico: mesteban@cnb.uam.es



Mónica De la Fuente Del Rey

Catedrática de la Universidad Complutense

Departamento de Fisiología

Facultad de Ciencias Biológicas UCM

C/ José Antonio Novais, 2, 28040 Madrid

Teléfono. +34 91-3944989; FAX: +34 91-3944935

Correo electrónico: mondelaf@bio.ucm.es

AUTORES



Pedro García Barreno

Académico de número de la Real Academia Española, y de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

Catedrático de Fisiopatología Quirúrgica de la Universidad Complutense, y Jefe de Departamento del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Correo electrónico: pghbarreno@insde.es

Emilio Gómez de la Concha

Académico de Número de la Real Academia de Medicina

Profesor asociado de la Universidad Complutense
Servicio de Inmunología

Hospital Clínico San Carlos, 28040 Madrid

Teléfono +34 91 3303342

Correo electrónico: egomezdela.hcsc@salud.madrid.org



M.ª Ángeles Muñoz Fernández

Doctora en Ciencias Biológicas y Doctora en Medicina.
Profesora Honoraria en el Departamento de Biología
Moléculas UAM

Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular.

Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Dr. Esquerdo, 46, 28007 – Madrid

Teléfono +34 91 5868565; FAX +34 91 5868018

Correo electrónico: mmunoz.hgugm@salud.madrid.org

AUTORES



Mercedes Pérez Blas

Doctora en Medicina
Profesora Contratada
Inmunología (Departamento de Microbiología I)
Facultad de Medicina de la UCM
Plaza de Ramón y Cajal, s/n
28040 Madrid
Teléfono +34 91 3941629; Fax +34 91 3941641
Correo electrónico: mperb@med.ucm.es

Agustín Zapata González

Catedrático de la Universidad Complutense
Departamento de Biología Celular
Facultad de Biología de la UCM,
Ciudad Universitaria - 28040 Madrid
Teléfono +34 91 3944979
Correo electrónico: zapata@bio.ucm.es



Prólogo

MARGARITA SALAS FALGUERAS

Una vez más el Instituto de España publica una Monografía sobre un tema de gran interés científico y de enorme repercusión clínica: **Bioquímica y Fisiopatología del Sistema Inmune**. Los coordinadores/editores de esta obra, María Cascales Angosto y Pedro García Barreno, me piden que introduzca esta Monografía, petición que realizo con gran satisfacción, no solo por venir de dos grandes amigos, sino porque el curso que ha dado origen a este volumen fue programado en 2003, siendo yo entonces Presidenta del Instituto de España.

Hace poco más de un cuarto de siglo que el sistema inmune empezó a ser considerado como uno de los temas de mayor interés clínico y sanitario y se comenzaron a descubrir enfermedades que estaban íntimamente relacionadas con las alteraciones de este sistema: alergias, obesidad, cáncer, SIDA, diabetes, hipertensión, problemas circulatorios y cardiovasculares, etc.

En los organismos multicelulares, el sistema inmune actúa como defensa frente a invasores externos. Está compuesto por un entramado de células y productos de éstas, que interaccionan entre sí. Su función es distinguir las entidades propias de las extrañas y eliminar las extrañas. Si el sistema inmune funciona adecuadamente el organismo puede estar en contacto con alérgenos y no ser alérgico, con gérmenes y no tener infecciones, con cancerígenos y no tener cáncer. Los componentes del sistema inmune tratan de evitar que estos agentes extraños infecten las células del cuerpo humano, o de controlar la infección cuando ésta ya se ha iniciado. Los microorganismos son las principales entidades extrañas, pero los neoplasmas, trasplantes y ciertas toxinas son también importantes. Para hacer frente a estas entidades el sistema inmune ha desarrollado dos mecanismos: inmunidad innata e inmunidad adquirida, las cuales se encuentran en total conexión e influencia una sobre otra.

El sistema inmune nos define y nos defiende; su fracaso puede producir la enfermedad y, en algunos casos, la muerte. La inmunología constituye una rama relativamente joven de la ciencia biomédica. El término inmunidad se deriva del latín *immunitas*, esto es exento de «cargos» (impuestos, pagos). Sin embargo, durante casi un siglo, el término inmunidad ha denotado la resistencia al posible ataque por algún agente infeccioso. Aunque la disciplina de la Salud Pública se desarrolló antes que la Inmunología, parece haber cierto paralelismo entre esta última y los avances conseguidos en el control de las enfermedades infecciosas y la mejora de la calidad de vida.

Se conoce desde tiempos remotos el hecho de que los supervivientes a las plagas estaban protegidos de los terribles estragos de éstas en posteriores encuentros con la enfermedad. Uno de los comentarios más antiguos aparece en las crónicas de Tucídides en la guerra del Peleponeso donde describe una plaga que azotó Atenas en el año 430 antes de Cristo y comenta como los que sentían mayor piedad por los enfermos y los moribundos eran los que habían padecido antes esa enfermedad y se habían recuperado. Ellos conocían la enfermedad y sabían que no padecerían ésta por segunda vez, y de sufrir un segundo ataque, nunca tendría una evolución fatal. Estos conocimientos no se entendieron bien en su época y no fueron sometidos a experimentación o análisis; más bien, la aparición de fiebres o la peste se envolvieron de una aureola mágica o religiosa. La primera vacunación efectiva, aunque todavía empírica, fue llevada a cabo por Edgard Jenner (1749-1823), que observó que las personas que se curaban después de alguna infección con la viruela de la vaca, quedaban protegidas contra la viruela humana. Convencido por sus observaciones, en mayo de 1796 inoculó a James Phipps, un niño de ocho años, con la viruela de vaca y unos meses después con viruela humana. James Phipps sobrevivió porque se había hecho inmune a la viruela. Jenner envió el artículo con estos datos a la Royal Society para su publicación, pero se lo rechazaron, por miedo a que dañara la reputación de la Sociedad. La publicación en 1798 del tratado de Jenner sobre la vacunación (de *vaccinus*, de las vacas), término que sustituyó al de variolización, hizo que se extendiera el concepto de contagio y se profundizara en el estudio de la respuesta inmune del organismo a sustancias extrañas, y de este modo tuvo lugar el nacimiento de la Inmunología como Ciencia. Un testimonio elocuente de la importancia y el progreso de la inmunología fue el anuncio en 1980 por la Organización Mundial de la Salud de que la viruela había sido erradicada del mundo gracias a un programa de vacunación. Los años finales del siglo XIX fueron una época afortunada en los avances científicos. Louis Pasteur estableció que las enfermedades específicas no se adquieren espontáneamente, sino que son producidas por organismos específicos y, además

inducen inmunidad. Fue en el siglo XX cuando gracias a los estudios de la teoría humoral (Ehrlich, Premio Nobel) y la teoría celular (Metchnikoff, Premio Nobel), se estableció la idea de la selección clonal. Pero en los últimos 30 años, gracias a los constantes avances científicos alcanzados, hemos podido conocer en términos estructurales y bioquímicos muchos de los fenómenos que acontecen en la respuesta inmune.

Volviendo a la publicación que hoy presentamos, conviene resaltar que *Bioquímica y Fisiopatología del Sistema Inmune* es el resultado de una eficaz colaboración, en la que surgieron las materias específicas que componen este volumen, llegándose a la elección de una serie de temas, cuidadosamente preparados, que responden a materias de la mayor actualidad: Ontogenia del sistema inmune, Inflamación e inmunidad innata, NADPH oxidasa fagocítica y enfermedad granulomatosa crónica, Inmunología del trasplante, El sistema inmune en el envejecimiento, Vacunas heterólogas y Reconstitución inmune en niños infectados por VIH.

Dentro del plantel de autores que intervienen en esta obra, sería arduo destacar a alguien salvo la ejemplar labor de los coordinadores/editores. No obstante parece razonable una sucinta referencia nominal en neutral y riguroso orden alfabético de los autores: María Cascales Angosto, Mariano Esteban Rodríguez, Pedro García Barreno, Mónica De la Fuente del Rey, Enrique Gómez de la Concha, María Ángeles Muñoz Fernández, Mercedes Pérez Blas y Agustín Zapata González. A todos ellos quiero expresarles nuestro profundo agradecimiento por su colaboración y por haber puesto en esta tarea su esforzado entusiasmo y sus conocimientos de expertos en esta materia de tanta repercusión en el campo de la Bioquímica y la Fisiopatología, que, a pesar de los avances hasta hoy conseguidos, por su complejidad biológica sigue constituyendo un desafío al que nadie puede ni debe sustraerse.

Mayo 2006

Ontogenia del Sistema Inmune: Papel de los Morfógenos en la Diferenciación de los Linfocitos T

AGUSTÍN ZAPATA GONZÁLEZ

RESUMEN

En la primera parte de este trabajo se pasa revista a los principales acontecimientos que marcan la organización del sistema inmune durante su desarrollo: los principales loci hematopoyéticos, la formación de los órganos linfoides primarios —timo y médula ósea— y de los órganos linfoides periféricos —bazo, ganglios linfáticos y tejido linfoide asociado a las mucosas—, resaltándose los principales mecanismos que gobiernan el proceso así como las incógnitas que quedan por resolver. En la segunda parte se repasa sucintamente la ontogenia del primordio tímico hasta su colonización por los primeros precursores linfoides y el papel que Notch y sus ligandos juegan en la determinación del compromiso T y B. Toda la última parte se dedica a revisar el papel que ciertos morfógenos, principalmente Sonic hedgehog y BMP-4, tienen en la diferenciación de los linfocitos T. Se trata de un campo de investigación nuevo llamado a un rápido crecimiento en los próximos años.

LA HEMATOPOYESIS EMBRIONARIA

Como las restantes células sanguíneas, los linfocitos, principales elementos celulares del sistema inmune, provienen de células progenitoras que durante el desarrollo embrionario se generan como hemangioblastos, capaces de producir las células tronco hematopoyéticas y los endotelios de los vasos sanguíneos, en

dos regiones embrionarias distintas. Antes de identificarse tales áreas en el embrión, el mesodermo ventral ha sido determinado por distintos morfógenos, entre ellos las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), moléculas como Noggin o Chordin u otras pertenecientes a la familia del factor de crecimiento fibroblástico (b FGF), a producir todas las células sanguíneas del organismo.

Las dos regiones hematopoyéticas embrionarias corresponden a los islotes sanguíneos del saco vitelino y a una región intraembrionaria con potencialidad para diferenciar la aorta, las gónadas y el mesonefros (región AGM) (1, 2). En todos los vertebrados estudiados se han identificado estas regiones o sus equivalentes. Por ejemplo, en *Xenopus*, los islotes sanguíneos ventrales son los equivalentes funcionales del saco vitelino de aves y mamíferos mientras la placa dorsolateral lo es de la región AGM (3). En el pez cebra, la llamada masa celular intermedia es el equivalente de los islotes sanguíneos del saco vitelino mientras que la región ventral de la aorta dorsal o la región anterior de la vena caudal han sido descritos como equivalentes de la región AGM de los vertebrados endotermos (3).

Tras saco vitelino y región AGM, el hígado fetal y, finalmente, la médula ósea son los otros órganos hematopoyéticos que albergan los precursores de las células sanguíneas. Aunque fuera del objetivo de esta revisión me gustaría señalar algunos de los interrogantes que aún existen acerca de la hematopoyesis embrionaria y remitir a los lectores a algunos trabajos donde pueden encontrar información actualizada al respecto (2, 4-7). No está todavía aclarado, por ejemplo, si saco vitelino y región AGM intercambian precursores, ni si las dos regiones contribuyen a la hematopoyesis definitiva proporcionando progenitores para las células sanguíneas adultas o si solamente la región AGM realiza esta función, limitándose el saco vitelino a proporcionar las células embrionarias. No sabemos, por tanto, si cada locus hematopoyético genera *in situ* sus propios precursores o son gradualmente colonizados por algunos existentes en las áreas hematopoyéticas que les precedieron funcionalmente. Así, no está claro si progenitores provenientes del saco vitelino y/o la región AGM colonizan el hígado fetal o no; como tampoco ha sido definitivamente demostrado si precursores del hígado fetal contribuyen a la población de células tronco hematopoyéticas de la médula ósea.

LOS PRECURSORES LINFOIDES Y SU DETERMINACIÓN A LINFOCITOS T Y B

Otro problema todavía por dilucidar es la naturaleza de los precursores linfoides derivados de las células tronco hematopoyéticas y los factores que com-

prometen a estas últimas con el linaje linfoide y cuales, a su vez, a éste con los linfocitos T ó B, u otras células importantes para el funcionamiento del sistema inmune, como células NK o células dendríticas. Hay numerosísimos trabajos que se han ocupado de estos extremos a los que, nuevamente remitimos al lector (1, 2, 8-10). La diferenciación de los linfocitos B se produce durante el período fetal en el hígado fetal y, después, en la médula ósea cuanto ésta se constituya como el principal órgano hematopoiético. Por el contrario, los precursores provenientes del hígado fetal o de la médula ósea deben colonizar el primordio tímico para poder diferenciarse a linfocitos T. De esta forma, médula ósea y timo constituyen los órganos linfoides primarios donde los precursores linfoides maduran a linfocitos B ó T, respectivamente, en ausencia de estímulo antigénico. Una vez formados tales linfocitos, junto con otras células importantes para el funcionamiento del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas y células NK, colonizarán los llamados órganos linfoides periféricos o secundarios, como bazo, ganglios linfáticos y tejido linfoide asociado a las mucosas, principalmente al tracto digestivo, donde los linfocitos culminan su maduración y responden a los antígenos. En todos los vertebrados, incluido el hombre, la organización y maduración de los órganos linfoides periféricos es un proceso tardío que no consiste exclusivamente en la llegada a ellos de los linfocitos sino que incluye un complejo proceso de regionalización para subdividir los órganos en zonas de captación de antígenos, zona de respuesta a ellos, formación de centros germinales, etc... En todos estos procesos determinadas quimiocinas y sus receptores y distintos miembros de la familia del TNF y sus receptores juegan un papel clave (11).

HEMATOPOIESIS FETAL Y ADULTA: UN HECHO SEMEJANTE, DOS POTENCIALES DIFERENTES

No quiero dejar de señalar que, aunque en términos generales, el hecho hematopoiético es semejante durante el periodo embrionario y el adulto, el primero corresponde a una hematopoyesis transitoria (recordemos, por ejemplo, las diferencias entre hemoglobina fetal y adulta, los eritrocitos nucleados fetales y la forma de generación de los macrófagos independiente de la existencia de monocitos) y el segundo a la hematopoyesis definitiva. También fenotípicamente las células tronco hematopoyéticas embrionarias y adultas son distintas, estando mejor definidas el fenotipo de estas últimas que el de las primeras (1, 2). Ya dentro de las estirpes linfoides, los precursores de los linfocitos B-1 se genera durante el período embrionario y desaparecen en la vida adulta manteniéndose por proliferación de los precursores remanentes y el potencial de las primeras oleadas de lin-

focitos T $\gamma\delta$ producidos en el timo fetal es mucho más restringido que el de aquellos generados después. Además, nosotros y otros autores hemos demostrado la distinta potencialidad para generar linfocitos T, células dendríticas y células NK de los precursores linfoides aislados del hígado fetal, del timo fetal y del timo neonatal (12). También, demostramos que el ratio CD4: CD8 cambiaba al final del período embrionario dentro del timo de rata, de manera que mientras que en el timo fetal dicha relación era menor de 1, como consecuencia de la mayor producción de células T CD8 positivas, tras el nacimiento el ratio alcanzaba valores de 2, 3 e incluso 6 ó 7 según la cepa de rata o ratón que se considerara (13).

¿Cual es el origen de estas diferentes potencialidades de los precursores linfoides fetales y adultos?. Aunque no podemos dar una contestación definitiva sí podemos afirmar que el microambiente fetal y adulto, donde se lleva a cabo la diferencia linfoide, son distintos y ello parece ser clave a la hora de explicar las diferencias encontradas entre la linfopoyesis fetal y la adulta. Por ejemplo, en el caso del cambio de ratio CD4: CD8 antes comentado, demostramos que la distinta expresión de ciertas moléculas, que ahora sabemos son clave para la diferenciación de los linfocitos T, como Notch y sus ligandos, especialmente Jagged-1, eran determinantes en el proceso (13).

EL PAPEL DE NOTCH Y SUS LIGANDOS EN LA DIFERENCIACIÓN LINFOIDE

Como antes mencionaba son legión los trabajos que se han ocupado de analizar los factores que determinan la diferenciación del llamado precursor linfoide común al linaje de linfocitos T ó de linfocitos B (8-10). Hace 10 años nadie consideraba que Notch y sus ligandos, unas moléculas descubiertas en *Drosophila* e implicadas en la determinación de numerosos linajes celulares, tuvieran algún papel en el sistema inmune. Desde que Ellen Robey demostrara en 1996 (14) que Notch podía estar implicada en la diferenciación de los timocitos DP (CD4+CD8+) a células SP CD4+CD8 – ó CD4-CD8+ se han sucedido los trabajos que relacionan estas moléculas con la determinación no solo de los linajes de células T CD4 y CD8, sino con las de células $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, linfocitos T colaboradores tipo 1 y tipo 2 y, sobre todo, con las decisiones del precursor linfoide común hacia la producción de linfocitos T o linfocitos B (ver revisiones en 15-17). Este último aspecto es al que nos referiremos ahora.

Notch descrito por primera vez, como antes señalaba, en un mutante de *D. melanogaster*, es un receptor de transmembrana perteneciente a una familia de moléculas filogenéticamente muy conservadas. En *Drosophila* hay una sola mo-

lécula de la familia y dos ligandos, Serrate y Delta. En mamíferos hay hasta 4 moléculas de la familia Notch (Notch 1-4) y 5 ligandos: Jagged 1 y 2 (homólogos de Serrate) y Delta 1, 3 y 4 (homólogos de Delta). Las proteínas Notch se sintetizan como precursores que se cortan durante su transporte a la superficie celular donde se expresan como heterodímeros. La interacción de Notch con sus ligandos libera el dominio citoplásmico de la molécula (Notch-IC) que se une al factor de transcripción CSL (denominado en el caso humano CBF-1 y en ratón RBP-J) que activan los genes blanco de Notch pertenecientes a la familia Hess (Hairy enhancer of split) (17).

Dos tipos de experimentos han demostrado el papel jugado por Notch y sus ligandos en el compromiso T ó B de los llamados precursores linfoides comunes (16, 17). Aquellos en los que Notch ha sido inactivado o sobre-expresado y aquellos en los que la inducción de ligandos de Notch en un determinado microambiente cambian las capacidades de inducir diferenciación T ó B del mismo. En los primeros, la inactivación de Notch conduce a un bloqueo de la diferenciación intratímica de células T en un estadio muy temprano (células CD3-CD4-CD8-CD44+ CD25-) y a la acumulación de linfocitos B en el timo. En esta misma línea de investigación, la sobre-expresión de Notch constitutivamente activo en los precursores linfoides determina su diferenciación a células T dentro de la médula ósea hasta el estadio de timocitos DP (CD3+CD4+CD8+) y al bloqueo de la diferenciación B. Por otro lado, cuando progenitores linfoides de hígado fetal son cultivados en una línea de estroma de médula ósea se generan exclusivamente linfocitos B pero si se induce en ella la expresión del ligando de Notch, Delta-like 1, se producen células T.

Otras evidencias indirectas confirman el papel de Notch en la determinación de los linajes linfoides. Por ejemplo, la activación de la vía de señalización de Notch en células T activa los genes Hes 1, Hes 5, Deltex-1 (un activador de Notch) y el propio Notch1. El gen de la cadena pT α del receptor preTCR expresado en timocitos DN (CD3-CD4-CD8-) es un posible blanco de la señalización via Notch y la activación de los factores de transcripción Hes 1 y Hes 5 bloquean el desarrollo de linfocitos B. Por el contrario, ratones deficientes en Hes 1 muestran una alteración parcial del desarrollo T.

Podemos concluir, aunque presumiblemente es una sobre simplificación de una realidad más compleja, que el microambiente tímico expresa ligandos Notch que envían señales a los precursores linfoides que, así, se comprometen con el linaje T y pierden la capacidad para generar linfocitos B. En la médula ósea la ausencia de tales señales, o su bloqueo, determina la diferenciación de los precursores linfoides al linaje B.

EL TIMO, UN MOSAICO DE INTERACCIONES ENTRE DISTINTAS CAPAS EMBRIONARIAS

Como ya hemos señalado en varias ocasiones de esta revisión, y volveremos a repetir, el microambiente de los órganos linfoides juega un papel capital en la funcionalidad linfoide. El caso del timo es particularmente relevante en este sentido pues desde hace muchos años el papel del epitelio tímico en la diferenciación de los linfocitos T es conocido pero solo muy recientemente se ha prestado atención a la ontogenia del primordio epitelial tímico y a los mecanismos reguladores de su diferenciación (ver revisiones 18-22).

El primordio tímico proviene, junto con el paratiroides, de una progresión lateral del endodermo de la tercera bolsa faríngea bajo la influencia del mesodermo de la cresta neural. Dos hipótesis tratan de explicar el origen del epitelio tímico. Según una de ellas el primordio epitelial tímico consta solo de tejido endodérmico rodeado de fibroblastos mesodérmicos que constituyen la cápsula del órgano a cuyo través llegarán, durante la ontogenia, los precursores linfoides a colonizar el primordio epitelial. La otra hipótesis sostiene que solo la parte central del órgano tiene origen endodérmico mientras que por debajo de la cápsula conectiva y rodeando esa zona central hay una capa de epitelio ectodérmico derivada de la hendidura branquial. De acuerdo con este último modelo, basado principalmente en evidencias morfológicas, el epitelio cortical deriva de células ectodérmicas mientras que el medular es de origen endodérmico. Otros estudios apoyan, por el contrario, un modelo unitario en el que todo el epitelio tímico tiene un origen común. Esta hipótesis ha sido confirmada recientemente (22), comprobándose que, aunque efectivamente el endodermo de la tercera bolsa faríngea y el ectodermo de la hendidura branquial correspondiente interactúan entre los días 10,5 y 11,5 del desarrollo embrionario murino, posteriormente se separan muriendo las células de la región de contacto, de tal forma que el primordio epitelial tímico finalmente proviene exclusivamente del endodermo faríngeo. Así, endodermo de la tercera y cuarta bolsa faríngea de un embrión de 8,5-9 días injertado bajo la cápsula renal de un ratón nudo es capaz de producir un timo funcional organizado histológicamente en corteza y médula.

Por otra parte, la existencia de un progenitor epitelial común al epitelio cortical y al epitelio medular se había demostrado indirectamente en timomas que eran capaces de generar células epiteliales tanto corticales como medulares. Estudios posteriores en los que se comprobó la importancia del gen *Foxn1* (Forkhead box n1) para la maduración del epitelio tímico (ver luego) demos-

traban que el precursor epitelial expresaba conjuntamente los marcadores MTS20 y MTS24. también la expresión de distintos subtipos de citoqueratinas ha servido para caracterizar esta población. Mientras que las células epiteliales corticales expresan la citoqueratina K8, pero no la K5, las medulares hacen lo contrario (K8-K5+) y los progenitores epiteliales que se expresan en el primordio tímico temprano o se acumulan en ratones con bloqueo de la diferenciación linfoide expresan los dos tipos de citoqueratinas.

También conocemos, al menos parcialmente, los genes implicados en la organización del primordio tímico murino (22). En la formación de las bolsas faríngeas intervienen Pax 1, Pax 9 y FGF 8. Más concretamente, Hoxa 3 es necesario para la generación de la tercera bolsa faríngea implicada en la organización del primordio tímico, activado a través de la cascada de los genes Hox1, Pax-Eya-Six. A los 11 días de desarrollo embrionario comienza la formación del esbozo tímico. La cascada Hox-Pax-Eya-Six es necesaria para la participación del endodermo mientras Hoxa 3 y Eya 1 aportan el mesodermo proveniente de las crestas neurales. Entre los días 11.5 y 12.5 de desarrollo se produce el crecimiento y regionalización del primordio marcándose los territorios correspondientes al timo y al paratiroides. Dos nuevos genes: Gcm2 (glial cells missing homolog 2) y Foxn1, ya mencionado, intervienen en el proceso. En este estudio, los primeros precursores linfoides comienzan a colonizar el primordio tímico a través de la cápsula. Un día después, el primordio tímico se separa definitivamente de la faringe y migra independizándose también de la paratiroides, posiblemente bajo la influencia de las células de la cresta neural. Pax 9 es necesario para la separación de la faringe; Hoxa 3 podría controlar la migración del primordio y Gcm 2 regula la separación de timo y paratiroides. A partir del día 12 Foxn 1 se convierte en un gen clave para la diferenciación y diversificación de las células epiteliales en un proceso independiente de la presencia o no de timocitos, donde también podría estar implicado Wnt-1.

MORFÓGENOS Y SISTEMA INMUNE

Si antes mencionábamos que hace 9 ó 10 años no había ningún dato acerca del posible papel de Notch y sus ligandos en el sistema inmune, hace sólo 4 años que comenzó a estudiarse la relación de ciertos morfógenos con el mismo y, en particular, con la diferenciación de los linfocitos T, objeto principal de esta revisión. Nuestro grupo en esa época había comenzado una nueva línea de investigación en la que emprendimos el análisis del papel de ciertas moléculas, conocidas por ser claves en la organogénesis de otros sistemas, en el desarrollo

de los órganos linfoides, y de los linfocitos. Las moléculas elegidas fueron Notch y sus ligandos, a las cuales ya nos hemos referido, Ephs y Ephrinas, y ciertos morfógenos, principalmente Sonic Hedgehog y BMP 2/4.

Los morfógenos son moléculas secretadas que transmiten señales a sus células blanco dependiendo de su concentración. Los morfógenos generan gradientes de concentración que resultan en patrones de respuesta. En *Drosophila* se definieron 3 moléculas: hh (Hedgehog) wg (wingless) y dpp (decapentaplegic) como morfógenos durante el desarrollo, cuyo ortólogos en vertebrados, la familia Hh, la familia Wnt y las proteínas morfogenéticas del hueso BMP 2 y 4 también actúan como morfógenos durante la embriogénesis y la organogénesis (23, 24). Hace unos 5 años en colaboración con el grupo que dirige Tessa Crompton en el Imperial College de Londres comenzamos a estudiar el papel de Hedgehog y, luego, de las BMP 2/4 en la diferenciación T murina y humana. Los resultados obtenidos se resumen a continuación.

Papel de Sonic Hedgehog y sus ligandos en la diferenciación de las células T murinas y humanas

La familia Hedgehog es una familia de morfógenos fuertemente conservada descubierta en *Drosophila* donde existe un único gen implicado en la polaridad de los segmentos de la pupa (15). En vertebrados hay 3 homólogos denominados: Indian, Desert y Sonic.

Sonic Hedgehog (Shh) se sintetiza como un precursor de 45 Kd que sufre autoproteólisis dando lugar a dos fragmentos: uno de 20 Kd, implicado en la señalización, que incluye la región del amino terminal, y otro de 25 Kd, responsable del autoprocesamiento de la molécula, que contiene la región del carboxilo terminal. El extremo amino terminal puede palmitolarse para permanecer asociado a la membrana de la célula productora e interactuar solamente con las células próximas.

Shh se une a un receptor heterodimérico formado por 2 proteínas de transmembrana llamadas patched (de la que existen dos isoformas Ptc1 y Ptc2) y smoothed (Smo). En ausencia de ligandos Hh, Ptc reprime Smo pero la unión de Hh a Ptc libera del complejo a Smo que inicia la cascada de señalización intracelular que culmina con la activación de 3 factores de transcripción de la familia Zn-finger, llamados Gli-1, Gli-2 y Gli-3 (15).

Antes de describir los datos existentes sobre la expresión y función de Shh y su receptor en el timo señalaremos otros elementos del sistema inmune en los

que estas moléculas podrían jugar un papel. Por ejemplo, tanto Shh como Ptc/Smo y los factores de transcripción Gli, 1,2 y 3 se expresan en células tronco hematopoiéticas aisladas de sangre periférica humana y de la médula ósea. Además Shh, Ptc y Smo se expresan tanto en precursores mieloides como linfoides (25). Desde el punto de vista funcional, estos mismos autores demostraron que Shh aumenta la proliferación pero no la diferenciación de las células tronco hematopoiéticas, en un proceso mediado a través de otro morfógeno BMP4. De hecho, en presencia de un anticuerpo anti Shh se inhibe la proliferación de las células tronco hematopoiéticas inducida por citocinas (25).

Por otro lado, Shh y Ptc se expresan en células T colaboradoras (CD4+) «resting» y activadas murinas y humanas, así como en macrófagos, células T citotóxicas (CD8+) humanas y en órganos linfoides periféricos (26-28).

Los primeros datos sobre el papel de Shh en la diferenciación T se obtuvieron en el 2000 (29) cuando se demostró la expresión diferencial de Shh en el epitelio tímico de ratón, mientras Ptc lo hacía en timocitos DN (CD4-CD8-), DP (CD4+CD8+) y SP (CD4-CD8+) y Smo solamente en células DN capaces de dar exclusivamente linfocitos T -células DN2 (CD4-CD8-CD44+CD25+), pero no en las más primitivas de este compartimento -células DN1 (CD4-CD8-CD44+CD25-).

Además, como ya hemos descrito para las células tronco hematopoiéticas, la adición de Shh a cultivos orgánicos de lóbulos tímicos fetales inhibía la diferenciación de las células DN, bloqueándola en el estadio de células DN CD 25+ antes de iniciar las reordenaciones del locus TcR β . Por el contrario, el tratamiento de tales cultivos con un anticuerpo anti Shh estimulaba la diferenciación de los timocitos DN a DP (CD4+CD8+). Aparentemente, por tanto, Shh mantiene las células en el estadio DN. De hecho, el tratamiento de timocitos DN provenientes de ratones knockout (KO) para Rag 1 con un anticuerpo anti la cadena ϵ de CD3, que permite diferenciar las células DN a DP aún en ausencia de reordenaciones en el locus TcR β , regula negativamente la expresión de Smo, sugiriendo que es necesario un bloqueo de la señalización inducida por Shh a través de la subunidad Smo de su receptor para que las células DN puedan diferenciarse al estadio DP (29).

Con posterioridad se demostraría que los efectos de Shh sobre la diferenciación de los timocitos DN eran dependientes de la dosis, confirmando su condición de morfógeno antes mencionada. Así, el tratamiento de cultivos orgánicos de lóbulos tímicos fetales con una dosis de 0,5 mg/ml durante 7 días bloqueaba la diferenciación de las células DN, pero, por el contrario, una concentración 10.000 veces menor (0,0005 mg/ml) promovía su diferenciación (30).

Este papel de Shh en la diferenciación *in vitro* de timocitos ha sido recientemente confirmada *in vivo* analizando el fenotipo de ratones knockout para Shh (30). Dichos ratones muestran una enorme reducción del número de células, con acumulación de timocitos DN1 (CD44+CD25-) mas que DN2 (CD44+CD25+) como cabría esperar a tenor de que la expresión de Smo es máxima en este último compartimento DN. Estos mismos autores confirmaron que el defecto en la diferenciación de los progenitores T era consecuencia de la falta de Shh en el epitelio tímico, y no un problema de migración de tales progenitores al primordio tímico, ya que ratones wild type (Shh+/+) irradiados y reconstituídos con progenitores de hígado fetal de ratones KO (Shh -/-) producían timocitos normalmente (30).

Estos resultados han sido confirmados y ampliados en timo humano (31, 32). Como en ratón, Sonic (Shh), Desert (Dhh) e Indian Hedgehog (Ihh) se expresan exclusivamente en el epitelio tímico, Shh en el epitelio subcapsular y medular mientras Ihh y Dhh aparecen por toda la red epitelial tímica concentrándose, a veces, en células aisladas que forman grupos. Mediante RT-PCR Ptc 1 y Smo se detectaron en todas las subpoblaciones de timocitos y en células epiteliales, mientras Ptc 2 se expresaba en estas últimas y en los primeros estadios de desarrollo T, CD34 positivos; por citometría de flujo se confirmó la expresión de Ptc1: más del 85% de los timocitos totales y todos los subsets de timocitos expresaban Ptc1 pero solo una tercera parte de los timocitos totales expresaban Smo, particularmente los estadios de células DN y DP. Un 88% de las células CD34 + expresaban Ptc y solo un 27% Smo. Además, como en ratones, los progenitores intratímicos mas tempranos con capacidad para diferenciar no solo a linfocitos T sino también a células dendríticas y células NK eran CD34+ Smo-, mientras que aquellos exclusivamente comprometidos con el linaje T eran CD34+ Smo+ (32). También como en el timo de ratón, los factores de transcripción Gli-1, Gli-2 y Gli-3, implicados en la señalización de Shh, se expresan en el timo humano en concreto en los primeros estadios del desarrollo T, CD34+ y CD8+, y en las células epiteliales. Finalmente algunas proteínas que regulan positivamente la señalización Shh como Hip (Hh-interacting protein) y Gas-1 (growth-arrest-specific gene 1) también se expresan tanto en los timocitos como en el epitelio tímico humano (31).

Respecto del papel de Shh en la diferenciación de los progenitores humanos CD34+, el morfógeno aumenta su viabilidad, en correlación con un aumento de la expresión de moléculas de supervivencia como bcl-2 y un descenso de la de Bax implicada en muerte celular, pero no su proliferación en cultivos en suspensión. Además, Shh bloquea la diferenciación de células CD34+ tanto en re-

agregados con células epiteliales tímicas como tras reconstitución de lóbulos fetales tímicos de ratones SCID (32). En este último tipo de ensayos, la adición de Shh a cultivos tratados con IL7, un factor conocido por estimular la proliferación de los precursores linfoides, bloqueaba este efecto estimulador disminuyendo la expresión de la cadena α del receptor de IL7 y del receptor de la quimocina SDF-1, CXCR4, así como la fosforilación del factor de transcripción STAT-5 mediada por IL7 (32). Todos estos resultados añadían, por tanto, un aspecto capital a los estudios realizados en ratón al demostrar que, al menos algunos, de los efectos de Shh sobre los precursores linfoides estaban mediados por el bloqueo de los efectos de IL7 y SDF-1.

Papel de BMP 2/4 y Noggin en los efectos de Shh sobre la diferenciación linfóide

Como antes indicábamos en el caso de las células tronco hematopoiéticas los efectos de la Shh podrían, al menos en parte, estar mediados por otros morfógenos, principalmente BMP 2/4. En este sentido, investigamos tanto la expresión de estas proteínas y de sus receptores en el timo murino y humano como sus efectos en la diferenciación de los progenitores intratímicos.

Las llamadas proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) son morfógenos pertenecientes a la familia del TGF β . Las BMP 2 y 4 están muy conservadas y son ortólogas de la proteína dpp de *Drosophila*. Aunque tienen distintos patrones de expresión y funciones no solapantes durante el desarrollo comparten rutas de señalización a través de dos tipos de receptores protein-tirosin-quinasas denominadas BMPR-I (IA ó IB) y BMPR-II (33). La activación de estos receptores induce la fosforilación de las llamadas R-Smads (Smad 1, 5, 8), que una vez fosforiladas reclutan el mediador Co-Smad (Smad 4) y ambos se trasladan al núcleo donde el heterodímero R-Smad y Co-Smad interaccionan con el ADN y, finalmente, activan o reprimen los genes blanco. Esta ruta de señalización se regula vía otros morfógenos como Noggin, Chordin o Twisted gastrulation (Tsg). Los dos primeros se unen a BMP 2/4 e impiden su unión a los receptores, mientras que Tsg se une también directamente a BMP 4 y, además, corta chordin aumentando su afinidad por BMP 4.

Las evidencias acerca de un papel de todas estas moléculas en la diferenciación T son cada vez mas concluyentes. BMP 2 y BMP 4 se expresan en las células epiteliales tímicas tanto de ratón (34, 35) como de humanos (T. Cejalvo, en preparación). Igualmente BMPR I-A, BMPR I-B, BMPR II, R-Smads y Co-Smads se expresan en timocitos y células epiteliales tímicas (35-38). En el

caso humano aproximadamente la mitad de los progenitores CD34+, particularmente aquellos comprometidos con el linaje T CD34+CD1+, expresan el BMPR I-B y una cuarta parte los BMPR I-A y BMPR II (T. Cejalvo, en preparación).

Además, Chordin se expresa en el epitelio tímico y Tsg tanto en el epitelio como en los timocitos de ratón (34, 35). Por otra parte, la transcripción de Tsg se regula positivamente tras la señalización a través del pre-TcR y del TcR (34). Finalmente, Schnurri-2, un factor de transcripción relacionado con Smad es necesario para la selección positiva (39). La conclusión de todos estos últimos resultados es que, presumiblemente, para que los timocitos diferencien de DN (CD4-CD8-) a DP (CD4+CD8+) y de DP a SP (CD4+CD8-; CD4-CD8+) necesitan una reducción en la señal mediada por BMP 2/4.

Algunos resultados recientes apoyan esta hipótesis. En ratón, el tratamiento de cultivos orgánicos de lóbulos tímicos fetales con BMP-4 disminuye la proliferación y la diferenciación de los timocitos DN (CD4-CD8-) (34, 35). El proceso es, como en el caso de Shh, independiente de la reordenación del locus TcR β , puesto que hay diferenciación en lóbulos provenientes de ratones Rag 1 -/- tratados con un anticuerpo anti-CD3 ϵ . Además, los efectos de BMP-4 son dosis dependientes y se bloquean con BMPR I-A soluble, chordin o noggin. De hecho, cultivos orgánicos tratados con Noggin estimulan la diferenciación de DN (CD4-CD8-) a DN 4 (CD44-CD25-) y a DP (CD4+CD8+), pero no cuando los cultivos se establecen a partir de lóbulos tímicos de ratones Rag 1 -/- o dobles KO para TcR β y TcR δ , lo que sugiere que la neutralización de la señalización a través de BMP 2/4 no es suficiente para obviar la señal del pre-TcR y que estas moléculas, como ya demostramos en el caso de Shh, deben afectar otras señales necesarias para la maduración de los timocitos DN.

Algunos resultados obtenidos con progenitores tímicos humanos aclaran esta situación (T. Cejalvo en preparación). El tratamiento con BMP 4 de cultivos orgánicos de lóbulos tímicos de ratones SCID reconstituidos con células CD34 + disminuye la proliferación de los progenitores humanos sin afectar su supervivencia y bloquea su diferenciación. Además, la proliferación de suspensiones de células CD34+ mediada por IL 7 disminuye significativamente en presencia de BMP-4 ó Shh, pero el efecto de este último es bloqueado por Noggin.

En conclusión, probablemente Shh y, especialmente, BMP 2/4 afectan los efectos de IL7/IL 7R sobre las células DN. Además, presumiblemente, el efecto de Shh sobre la supervivencia de CD 34+ humanas es directo mientras que aquel sobre la proliferación mediada por IL 7 se realiza a través de BMP 4.

En los próximos años habrá de establecerse el papel de los otros miembros de la familia Hh en este sistema, Indian y Desert y deberá profundizarse en las relaciones entre morfógenos y Notch, pre TcR, IL 7/IL 7R y SDF-1/CXCR4.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bellantuono, I. 2004. Haemopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36:607.
2. Kyba, M., and G. Q. Daley. 2003. Hematopoiesis from embryonic stem cells: lessons from and for ontogeny. *Exp Hematol* 31:994.
3. Hansen, J. D., and A. G. Zapata. 1998. Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunol Rev* 166:199.
4. Cumano, A., and I. Godin. 2001. Pluripotent hematopoietic stem cell development during embryogenesis. *Curr Opin Immunol* 13:166.
5. Matsuoka, S., K. Tsuji, H. Hisakawa, M. Xu, Y. Ebihara, T. Ishii, D. Sugiyama, A. Manabe, R. Tanaka, Y. Ikeda, S. Asano, and T. Nakahata. 2001. Generation of definitive hematopoietic stem cells from murine early yolk sac and paraaortic splanchnopleures by aorta-gonad-mesonephros region-derived stromal cells. *Blood* 98:6.
6. Kumaravelu, P., L. Hook, A. M. Morrison, J. Ure, S. Zhao, S. Zuyev, J. Ansell, and A. Medvinsky. 2002. Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development* 129:4891.
7. Douagi, I., P. Vieira, and A. Cumano. 2002. Lymphocyte commitment during embryonic development, in the mouse. *Semin Immunol* 14:361.
8. Bhandoola, A., A. Sambandam, D. Allman, A. Meraz, and B. Schwarz. 2003. Early T lineage progenitors: new insights, but old questions remain. *J Immunol* 171:5653.
9. Bartholdy, B., and P. Matthias. 2004. Transcriptional control of B cell development and function. *Gene* 327:1.
10. Busslinger, M. 2004. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* 22:55.
11. Cyster, J. G. 2003. Lymphoid organ development and cell migration. *Immunological reviews* 195:5.
12. Alonso, C. L., J. J. Muñoz, and A. G. Zapata. 2001. Delineation of intrathymic T, NK, and dendritic cell (DC) progenitors in fetal and adult rats: demonstration of a bipotent T/DC intermediate precursor. *J Immunol* 167:3635.
13. Jiménez, E., A. Vicente, R. Sacedón, J. J. Muñoz, G. Weinmaster, A. G. Zapata, and A. Varas. 2001. Distinct mechanisms contribute to generate and change the

- CD4:CD8 cell ratio during thymus development: a role for the Notch ligand, Jagged1. *J Immunol* 166:5898.
14. Robey, E., D. Chang, A. Itano, D. Cado, H. Alexander, D. Lans, G. Weinmaster, and P. Salmon. 1996. An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell* 87:483.
 15. Benson, R. A., J. A. Lowrey, J. R. Lamb, and S. E. Howie. 2004. The Notch and Sonic hedgehog signalling pathways in immunity. *Mol Immunol* 41:715.
 16. Radtke, F., A. Wilson, S. J. Mancini, and H. R. MacDonald. 2004. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5:247.
 17. Radtke, F., A. Wilson, and H. R. MacDonald. 2004. Notch signaling in T- and B-cell development. *Curr Opin Immunol* 16:174.
 18. Boehm, T., C. C. Bleul, and M. Schorpp. 2003. Genetic dissection of thymus development in mouse and zebrafish. *Immunol Rev* 195:15.
 19. Gill, J., M. Malin, J. Sutherland, D. Gray, G. Hollander, and R. Boyd. 2003. Thymic generation and regeneration. *Immunol Rev* 195:28.
 20. Manley, N. R., and C. C. Blackburn. 2003. A developmental look at thymus organogenesis: where do the non-hematopoietic cells in the thymus come from? *Curr Opin Immunol* 15:225.
 21. Petrie, H. T. 2003. Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nat Rev Immunol* 3:859.
 22. Blackburn, C. C., and N. R. Manley. 2004. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat Rev Immunol* 4:278.
 23. Christian, J. L. 2000. BMP, Wnt and Hedgehog signals: how far can they go? *Curr Opin Cell Biol* 12:244.
 24. Ingham, P. W., and A. P. McMahon. 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15:3059.
 25. Bhardwaj, G., B. Murdoch, D. Wu, D. P. Baker, K. P. Williams, K. Chadwick, L. E. Ling, F. N. Karanu, and M. Bhatia. 2001. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* 2:172.
 26. Lowrey, J. A., G. A. Stewart, S. Lindey, G. F. Hoyne, M. J. Dallman, S. E. Howie, and J. R. Lamb. 2002. Sonic hedgehog promotes cell cycle progression in activated peripheral CD4(+) T lymphocytes. *J Immunol* 169:1869.
 27. Stewart, G. A., J. A. Lowrey, S. J. Wakelin, P. M. Fitch, S. Lindey, M. J. Dallman, J. R. Lamb, and S. E. Howie. 2002. Sonic hedgehog signaling modulates activation of and cytokine production by human peripheral CD4+ T cells. *J Immunol* 169:5451.

28. Sacedón, R., V. Nuñez, B. Diez, C. Hernandez-López, C. Gutierrez-de-Frias, S. V. Outram, T. Crompton, A. G. Zapata, A. Vicente, and A. Varas. 2005. Sonic Hedgehog production by follicular dendritic cells: Involvement of Hedgehog signalling pathway in germinal center reactions. *J. Immunol* 174:1456.
29. Outram, S. V., A. Varas, C. V. Pepicelli, and T. Crompton. 2000. Hedgehog signaling regulates differentiation from double-negative to double-positive thymocyte. *Immunity* 13:187.
30. Shah, D. K., A. L. Hager-Theodorides, S. V. Outram, S. E. Ross, A. Varas, and T. Crompton. 2004. Reduced thymocyte development in Sonic hedgehog knockout embryos. *J Immunol* 172:2296.
31. Sacedón, R., A. Varas, C. Hernández-López, C. Gutierrez-de Frias, T. Crompton, A. G. Zapata, and A. Vicente. 2003. Expression of hedgehog proteins in the human thymus. *J Histochem Cytochem* 51:1557.
32. Gutiérrez-Frías, C., R. Sacedón, C. Hernández-López, T. Cejalvo, T. Crompton, A. G. Zapata, A. Varas, and A. Vicente. 2004. Sonic hedgehog regulates early human thymocyte differentiation by counteracting the IL-7-induced development of CD34+ precursor cells. *J Immunol* 173:5046.
33. Varas, A., A. L. Hager-Theodorides, R. Sacedón, A. Vicente, A. G. Zapata, and T. Crompton. 2003. The role of morphogens in T-cell development. *Trends Immunol* 24:197.
34. Graf, D., S. Nethisinghe, D. B. Palmer, A. G. Fisher, and M. Merkschlagler. 2002. The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. *J Exp Med* 196:163.
35. Hager-Theodorides, A. L., S. V. Outram, D. K. Shah, R. Sacedón, R. E. Shrimpton, A. Vicente, A. Varas, and T. Crompton. 2002. Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. *J Immunol* 169:5496.
36. Dewulf, N., K. Verschuere, O. Lonnoy, A. Moren, S. Grimsby, K. Vande Spiegle, K. Miyazono, D. Huylebroeck, and P. Ten Dijke. 1995. Distinct spatial and temporal expression patterns of two type I receptors for bone morphogenetic proteins during mouse embryogenesis. *Endocrinology* 136:2652.
37. Dick, A., W. Risau, and H. Drexler. 1998. Expression of Smad1 and Smad2 during embryogenesis suggests a role in organ development. *Dev Dyn* 211:293.
38. Flanders, K. C., E. S. Kim, and A. B. Roberts. 2001. Immunohistochemical expression of Smads 1-6 in the 15-day gestation mouse embryo: signaling by BMPs and TGF-betas. *Dev Dyn* 220:141.
39. Takagi, T., J. Harada, and S. Ishii. 2001. Murine Schnurri-2 is required for positive selection of thymocytes. *Nat Immunol* 2:1048.

Inflamación e inmunidad innata

PEDRO GARCÍA BARRENO

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. Aunque dolorosa, la inflamación es, normalmente, una respuesta reparadora. En ocasiones, transcurre hacia una situación crónica que suele dar lugar a una enfermedad degenerativa como artritis, arteriosclerosis o, incluso, cáncer. Aunque suele acompañarse de una respuesta generalizada —«respuesta de fase aguda»— caracterizada por sensación de malestar, fiebre y leucocitosis pasajeras, en ocasiones la inflamación aguda local provoca una reacción orgánica generalizada —«síndrome de respuesta inflamatoria sistémica»— que, en una secuencia de reacciones a modo de espiral sin control —«inflamación maligna»—, conduce al fracaso funcional de los diferentes órganos y sistemas —«fracaso multiorgánico»— y, tras ello, a la muerte del individuo¹.

I. BOSQUEJO HISTÓRICO

Para comprender la respuesta inflamatoria, tal como hoy se entiende, es oportuno repasar las raíces de nuestro conocimiento sobre tal fenómeno. La perspectiva histórica indica que el progreso científico no es continuo, y que la ciencia está influida por la personalidad de quienes la hacen avanzar. La historia de la investigación sobre la inflamación se extiende más allá de dos mil años; de ellos, doscientos de investigación en el contexto celular y, los veinte últimos, en el entorno molecular².

Los signos y síntomas inflamatorios se conocen desde antiguo. Los egipcios describieron abscesos y úlceras, y el Código de Hammurabi contiene instrucciones

para tratar abscesos oculares ³. Sin embargo, fue el médico griego Hipócrates de Cos ⁴ quién introdujo las palabras *edema* y *erisipela* para describir la inflamación. Hipócrates consideró la inflamación como el inicio de un proceso de resolución o de curación. La primera descripción comprensiva de la inflamación se encuentra en los escritos de Aulo Celso ⁵, que no fue médico ni científico. En su *De Medicina* introdujo los que se consideran *síntomas cardinales* de la inflamación: *rubor, tumor, calor* y *dolor*. Galeno de Pérgamo ⁶ añadió un quinto signo: *functio laesa*. Galeno, que introdujo el concepto de los cuatro humores vitales (*sanguis, pituita, chole* y *melaine chole*), consideró la inflamación como un desajuste en la relación de esos humores ⁷. No consideró que el pus fuera perjudicial (*pus laudable*), aunque debía facilitarse su evacuación mediante punción. Galeno advirtió del efecto perjudicial del frío sobre un edema inflamatorio, porque el frío tornaba la lividez del tejido en una *scirros* (cicatriz patológica). Pensó que la sangre percolaba a través de las paredes de las arterias hacia el tejido.

Con todo, la investigación del proceso inflamatorio no comenzó hasta la invención del microscopio compuesto por el científico holandés Zacharias Janssen, alrededor del año 1595. Antoni van Leeuwenhoek construyó, en el año 1719, el primer microscopio con la suficiente resolución óptica para observar hematíes individuales moviéndose a través de los pequeños vasos sanguíneos, aunque los leucocitos no fueron objeto de su interés (**Figura 1**). El médico Hermann Boerhaave (1668-1738) utilizó el microscopio para observar vasos sanguíneos en tejidos inflamados; concluyó que los vasos sanguíneos más pequeños eran demasiado angostos para facilitar el flujo de sangre en el área inflamada, con lo se generaba calor debido a la fricción. Un discípulo de Boerhaave, Hieronymus D. Gaubius (1705-1780), encontró que la inflamación promovía las condiciones para que coagulara la sangre, y en 1796 apareció la obra "*Treatise of the blood, inflammation, and gun-shot wounds*" del inglés John Hunter (1728-1793).

La primera descripción de las células inflamatorias se debe a Rene Dutrochet quién señaló, en el año 1824 ⁸, que corpúsculos sanguíneos individuales podían escapar a través de la pared de los vasos y moverse con lentitud en la porción clara (de la preparación), donde la velocidad de movimiento era muy lenta; ello en marcado contraste con el torrente sanguíneo del que procedía la célula. Especuló sobre la naturaleza de la trasmigración de los leucocitos, y sugirió que las paredes de los vasos presentaban orificios que permitían a los elementos formes de la sangre entrar en los tejidos. Rudolf Wagner (1805-64) tiene la primicia de la descripción, en el año 1839 ⁹, del rodamiento leucocitario: «En el espacio claro y brillante entre el torrente sanguíneo y la pared del vaso,

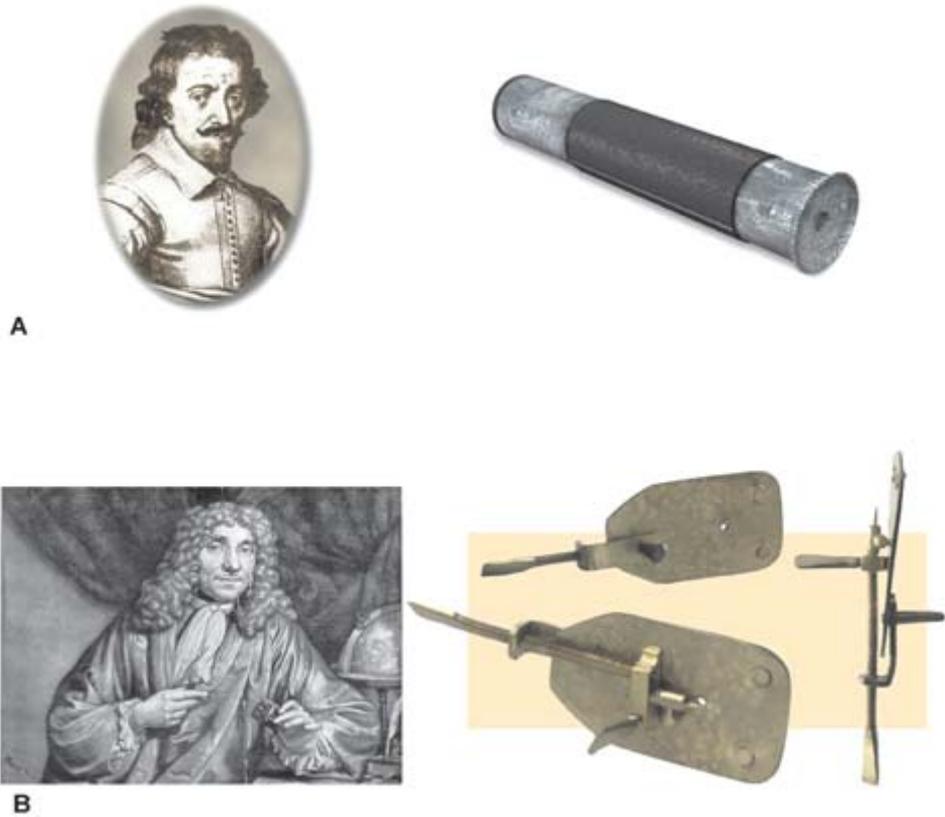


FIGURA 1 (A). El científico holandés Zacharias Janssen (1580-1638) fue, probablemente, el primero en inventar el microscopio compuesto (con dos lentes), hacia el año 1595. Puesto que Zacharias era muy joven en aquella época, es posible que su padre, Hans Lippershey, fabricase el primero, pero Zach joven asumió el control la producción. Los primeros microscopios compuestos producidos por los Janssen eran simplemente un tubo de 45 cm. de largo y 5 cm. de diámetro con una lente convexa en cada extremo. El aumento proporcionado por esos aparatos era de $\times 3-9$, dependiendo del tamaño de la abertura del diafragma. **(B)** Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) careció casi por completo de formación científica. Recibió formación en Amsterdam como tratante de paños; sin embargo, su enorme curiosidad le llevó a una sólida autoformación. Mientras trabajaba como comerciante y ayudante de cámara de los alguaciles de Delft construyó, para la observación de la calidad de las telas, lupas de mejor calidad que las que se podían conseguir en ese momento; ello, tras aprender por su cuenta soplado y pulido de vidrio. Desarrolló mecanismos de fijación para pequeñas lentes biconvexas montadas sobre platinas de latón, que se sostenían muy cerca del ojo, y también construcciones similares a microscopios en las que se podían fijar la lente y el objeto a observar. Con ellos podía examinar objetos, que montaba sobre la cabeza de un alfiler, ampliándolos hasta trescientas veces (potencia que excedía con mucho la de los primeros microscopios de lentes múltiples). Con su microscopio artesanal observó fibras musculares y la circulación de la sangre en los capilares.

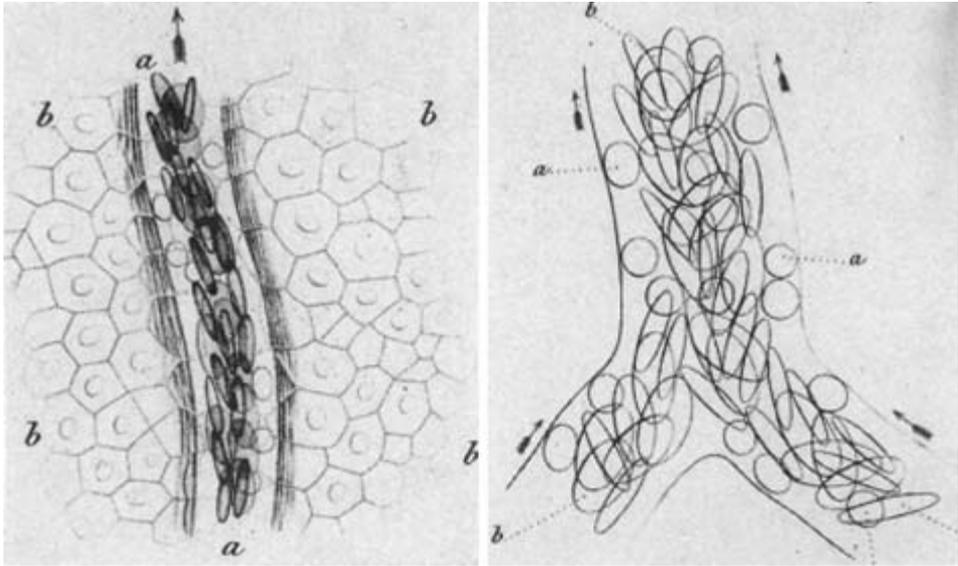


FIGURA 2. Rodamiento leucocitario en vénulas del batracio *Rana temporaria*, reproducido de *Icones Physiologicae*, por Rudolf Wagner (1839, tabla 14), y tomado de Klaus Ley (2001; pág. 3, fig. 1.1.). Izquierda (x 350): tronco venoso (a) cercano a la superficie de la epidermis, inmerso en un mosaico de células planas hexagonales (b). Los corpúsculos sanguíneos muestran formas diversas debido al plano de la observación. En el espacio brillante entre el flujo de sangre y la pared del vaso se visualizan linfocitos que aparecen como redondas, refringentes. Derecha: esquema de la situación en una bifurcación vascular en el mismo tejido; (a) leucocitos; (b) eritrocitos. La dirección del flujo se indica mediante flechas.

que está rodeada por varias fibras paralelas, puede observarse como los leucocitos se mueven lentamente» (**Figura 2**). Esta observación fue confirmada por Rudolf L. C. Virchow (1821-1902) quién, en el año 1871 ¹⁰, hizo notar que los leucocitos rodantes podían adherirse transitoriamente a la pared del vaso y, en ocasiones, reentrar en el torrente circulatorio. Observó la trasmigración leucocitaria, pero atribuyó un papel nutritivo más que una función inflamatoria a este fenómeno. Observaciones similares fueron hechas por William Addison (1802-1881) y por Augustus Volney Waller (1814-1870), quienes ofrecieron, en la década de los años 1840, una clara descripción de la trasmigración de los leucocitos y de la diapédesis de los eritrocitos en la inflamación secundaria a traumatismos, y descubrieron que el pus estaba formado por leucocitos ¹¹.

Avanzado el siglo XIX, las contribuciones más importantes a la investigación de la inflamación fueron realizadas por Ilya I. Metchnikoff y por Julius Cohnheim. El primero señaló que «la acumulación de células en la vecindad de la lesión constituye una clase de defensa natural para el organismo» ¹²; y Cohnheim dio,

en el año 1877, una detallada descripción de la cascada leucocitaria, incluida la trasmigración: «Primero, en una vena con marginación típica de las células blancas, uno ve un borde punteado en la pared externa del vaso. Estas se mueven más allá, hacia el exterior del vaso al que se conectan mediante un fino tallo. Finalmente, este tallo se desvanece y, ahora, la célula blanca aparece como un corpúsculo brillante apenas coloreado, contráctil, situado completamente fuera del vaso»¹³. Max J. S. Schultze (1825-74) fue el primero en percatarse de que los leucocitos no eran una clase homogénea de células¹⁴. Metchnikoff amplió tales observaciones y definió los linfocitos, los monocitos-macrófagos y los granulocitos; distinguió los neutrófilos de los eosinófilos, y reconoció que las células plasmáticas y los mastocitos eran células inflamatorias. Metchnikoff escribió que «el elemento esencial y primario en la inflamación típica consiste en una reacción de los fagocitos contra el agente lesivo». Por su innovador trabajo, Metchnikoff, el fundador de la teoría celular de la inflamación, compartió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 1908 («por sus trabajos sobre inmunidad») con Paul Ehrlich (**Figura 3**), quién había trabajado sobre el sistema del complemento sérico y los anticuerpos y a quién se atribuye la fundación de la escuela humoral de la inmunidad. Con tales desarrollos, los conceptos de activación endotelial, adhesión leucocítica, actividad fagocítica e inmunidad, habían sido introducidos.

Luego llegaron los modelos *in vivo* encabezados, en el año 1903¹⁵, por el de Nicolas Maurice Arthus (1862-1945) mediante la inyección intradérmica de antígenos (reacción de Arthus). Eliot R. Clark y Eleanor Linton Clark desarrollaron, en el año 1935¹⁶, una cámara que visualizaba la adhesión y trasmigración de los leucocitos *in vivo* (**Figura 4**). Henry H. Dale (**Figura 5**), quién había trabajado en transmisión sináptica, reconoció (1929) la implicación de mediadores químicos en el proceso inflamatorio, identificando el primero de ellos: la histamina; descubrimiento al que siguieron los de la serotonina y la bradiquinina. Dale compartió con Otto Loewi el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 1936 «por sus descubrimientos relativos a la transmisión química de los impulsos nerviosos».

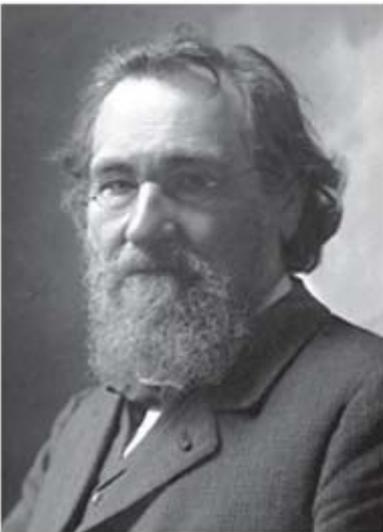
Con todo, Urtubey¹⁷ titulaba una conferencia desarrollada en Valencia, en 1937, *Concepto filosófico de la inflamación*: «He insistido en el término “filosofía” porque, precisamente en una ciencia tan de observación como la Patología, apenas hay otro problema inquietante de esta índole que el que se refiere a la inflamación». Por otra parte, Heilmeyer y Kähler¹⁸ escriben: «Para el médico, es de importancia fundamental el problema de la significación biológica de la inflamación. La respuesta que se dé a esta cuestión influirá decisivamente en su conducta junto a la cabecera del enfermo. Antaño, la consideración teleológica de la inflamación, en el sentido de que ésta constituiría un proceso conveniente para el organismo, do-



A



B



C



D

FIGURA 3. (A) René Dutrochet (1776-1847), tras estudiar medicina en París, trabajó como jefe clínico en el Hospital de Burgos. Luego regresó a Francia donde se volcó en el estudio de las ciencias naturales. Sus principales contribuciones fueron en el campo de la embriología. (B) Julius Cohnheim (1839-1884), nacido en la Pomerania, llevó a cabo su trabajo en el instituto de Virchow en la Universidad de Berlín y, luego, en las Universidades de Kiel y de Leipzig. (C) Ilya Ilyich Mechnikoff (1845-1916), nacido en Rusia, desarrolló su trabajo en el Instituto Pasteur de París. (D) Paul Ehrlich (1854-1915), alemán, desarrolló sus investigaciones en la Universidad de Goettinger y en el Real Instituto de Terapéutica Experimental de Frankfurt-on-the-Main.



FIGURA 4. Cámara transparente que permite el estudio del comportamiento celular y vascular in vivo.

minaba por completo el planteamiento del problema». Büchner¹⁹, en 1950, había señalado: «Así, pues, lo lógico y necesario es hablar no de finalidad sino de significación biológica de la inflamación. El fenómeno, peculiar de la materia viva, de lo que en ella sucede por necesidad, es decir, con carácter forzoso, con mucha frecuencia es al mismo tiempo lo más conveniente desde el punto de vista biológico, se pone de manifiesto precisamente en el proceso inflamatorio. El estímulo flogógeno perturba el equilibrio del organismo, pero la reacción de éste logra restablecer por lo regular el equilibrio perturbado». Y Lewis Thomas²⁰ ha sugerido que «quizá la reacción inflamatoria deba ser considerada como una defensa del individuo contra el resto de la naturaleza, simbolizando su individualidad y anunciando su existencia como entidad». Como resumen de la situación, hace apenas veinte años, valga lo escrito por Weissmann en 1974²¹: «Cualquier descripción o teoría general de la “inflamación” es probablemente tan prematuro como una teoría general del comportamiento».



FIGURA 5. Henry Hallett Dale (1875-1968), nacido en Inglaterra, desarrolló su trabajo en el National Institute for Medical Research, en Londres.

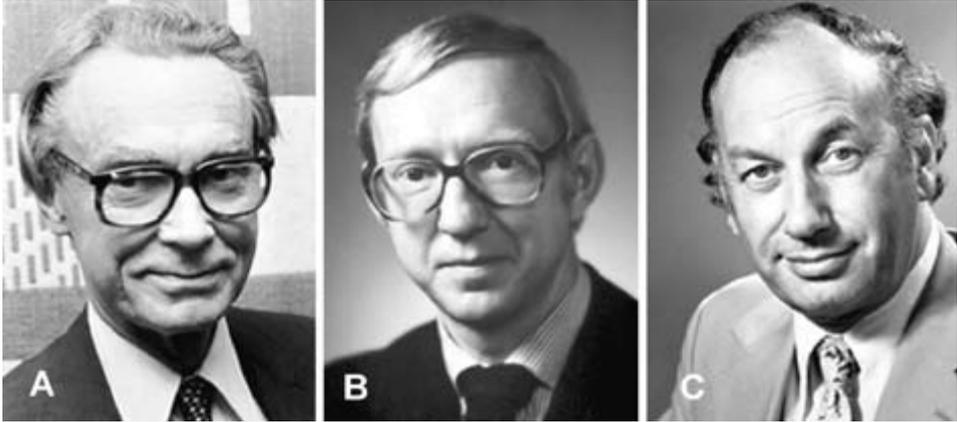


FIGURA 6. (A) Sune K. Bergström (1916-2004), nacido en Suecia, desarrolló su trabajo en el *Karolinska Institutet*, en Estocolmo. (B) Bengt I. Samuelson (n.1934) nacido en Suecia, desarrolló su trabajo en el *Karolinska Institutet*, en Estocolmo. (C) John R. Vane(1927-2004), nacido en Inglaterra, desarrolló su trabajo en *The Wellcome Research Laboratories*, en Beckenham.

La serie de mediadores inflamatorios culminó con el estudio de las prostaglandinas (el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 1982 fue compartido por Sune K. Bergström, Bengt I. Samuelson y John R. Vane por «sus descubrimientos referentes a las prostaglandinas y sustancias relacionadas biológicamente activas» (Figura 6), y, luego, del óxido nítrico (Robert Furchgott, Louis Ignarro y Ferid Murad (Figura 7)

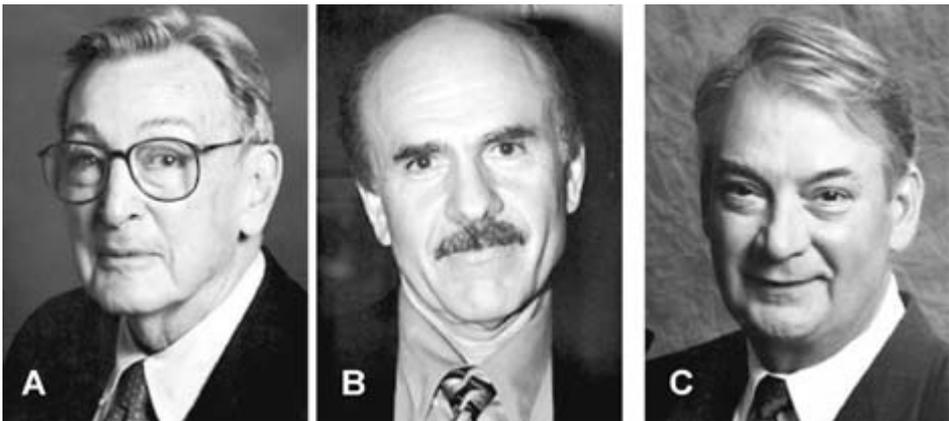


FIGURA 7. (A) Robert Furchgott (n. 1916), nacido en EE. UU., desarrollo su trabajo en el *Suny Health Science Center*, en Brooklyn. (B) Louis J. Ignarro (n. 1941), nacido en EE. UU., desarrolló su trabajo en la *University of California School of Medicine Los Angeles*, en California. (C) Ferid Murad (n. 1936), nacido en EE. UU., desarrolló su trabajo en la *University of Texas Medical School*, en Houston, Texas.

recibieron el Premio Nobel Fisiología o Medicina 1998 por sus trabajos sobre este último mediador). Por otro lado, el papel de las citoquinas inflamatorias (IL-1 β y TNF α), su papel activador del endotelio vascular potenciando la adhesión de los leucocitos y la identificación de las moléculas de adhesión (selectinas e integrinas), quedaron establecidos en la década de los años 1980²².

G. Vejlens estudió (1938) el rodamiento y la adhesión leucocitarias en los vasos mesentéricos²³, y V. T. Marchesi, H. W. Florey y J. L. Gowans establecieron (1960-4) las interrelaciones entre leucocitos y células endoteliales durante la tras migración²⁴. Por último, A. J. Goldman y A. Atherton y G. V. R. Born, estudiaron (1967-73) el comportamiento hidrodinámico de la inflamación²⁵. Tras los trabajos pioneros de H. A. Abrahamson en el año 1927, sobre los cambios inflamatorios en las propiedades biofísicas de las membranas de los leucocitos²⁶, un mojón distintivo son los trabajos de E. A. Jaffe y colaboradores (1973) que establecieron las bases para el descubrimiento de las moléculas de adhesión entre los leucocitos y las células endoteliales²⁷. Por su parte, H. B. Stamper y J. J. Woodruff desarrollaron, en el año 1976, el primer ensayo *in vitro* para el estudio de la adhesión leucocitaria en presencia de estrés por cizallamiento circulatorio²⁸.

II. FISIOPATOLOGÍA

El proceso inflamatorio²⁹ representa una reacción tisular ante una agresión, que incluye: decisiones de puesta en marcha o de cese, basadas en la integración de secuencias moleculares incitadas por el daño tisular causado por la penetración de microbios o por la presencia de material extraño exógeno o endógeno; reclutamiento, instrucción y envío de células; eliminación de microbios, cuerpos extraños y de células infectadas y/o dañadas; creación de barreras para evitar las metástasis microbianas, y la reparación del tejido lesionado por la agresión o por la respuesta del huésped. Si diferentes causas alteran o bloquean cualquiera de las etapas de este ordenado proceso, la inflamación puede derivar hacia soluciones no deseadas, como la infiltración tisular por agregados de linfocitos y leucocitos (granulomas) que, en ocasiones —en las articulaciones—, son embebidos en una masa de fibroblastos sinoviales hiperproliferativos (pannus), o la distorsión tisular mediante la biosíntesis incontrolado de colágeno (fibrosis o cirrosis). La inflamación persistente puede provocar depósitos de proteínas amieloides, en principio protectoras pero que, a la larga, pueden inducir enfermedades crónicas degenerativas, y, también, lesiones oxidativas en el ácido desoxirribonucleico (ADN) que, con el tiempo, favorezcan transformaciones neoplásicas (**Figura 8**).

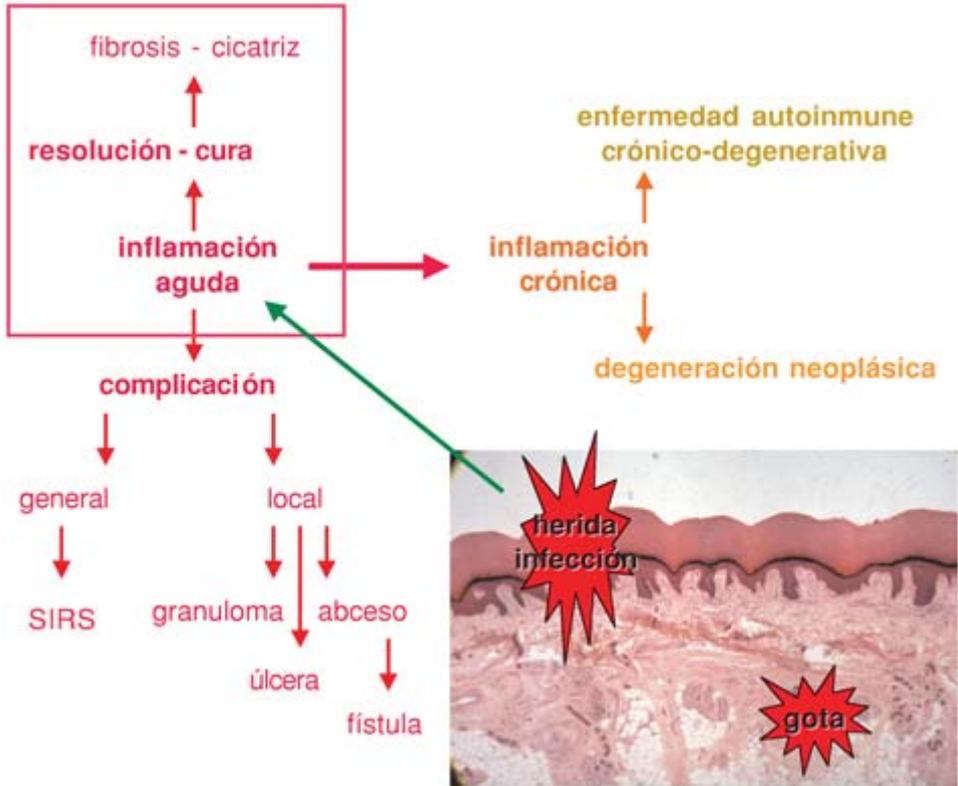


FIGURA 8. *Historia natural de la inflamación: las tres salidas del proceso inflamatorio agudo. Resolución o curación que, si se ha producido alguna lesión tisular (ej. herida), lo hará con una cicatriz. Complicación local —granuloma, úlcera, absceso o fístula—, o general —sepsis/SIRS—. Cronificación, hacia una enfermedad crónico-degenerativa o hacia degeneración neoplásica.*

Lo que Celso definió como «rubor, calor, dolor y tumor» sigue siendo un problema intelectual de primer orden en el terreno de la transducción de señales y de la comunicación intercelular, en los sistemas biológicos; un problema sociolaboral importante por su incidencia en el trabajo y en las relaciones personales, y un mercado millonario para la industria farmacéutica. Cuando los acontecimientos patogénicos primarios se desconocen, la fisiopatología y el control de la inflamación son las mejores opciones, aunque el número de enfermedades consideradas de origen inflamatorio disminuye a la par que se identifican las causas patogénicas iniciales. Sin embargo, en determinadas enfermedades infecciosas importantes, la respuesta inflamatoria puede causar más daño que el microbio (Tabla I) ³⁰.

TABLA 1. *Ejemplos de enfermedades inflamatorias*

Enfermedades en las que la inflamación juega un papel patogénico importante	
Anafilaxis	Gota
Artritis reumatoide	Lupus eritematoso
Asma	Osteoartritis
Aterosclerosis	Pénfigo
Colitis ulcerosa	Psoriasis
Dermatitis atópica	Rechazo xenoinjerto
Enfermedad de Alzheimer	Sarcoidosis
Enfermedad de Crohn (enteritis regional)	Síndr. Isquemia-reperusión
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)	Síndr. Fiebre periódica
Esclerosis múltiple	Tiroiditis de Hashimoto
Espondilitis anquilosante	Vasculitis
Enfermedades de origen infeccioso en las que la inflamación contribuye a la patología tanto como la toxicidad bacteriana	
Disentería bacteriana	Lepra (forma tuberculoide)
Enfermedad de Chagas	Meningitis neumocócica o neisseria
Filariasis	Neumonitis fibrosa quística
Gastritis por <i>H. pylori</i>	Neumonía viral
Glomerulonefritis post-estreptocócica	Sepsis
Hepatitis C	Tuberculosis
Enfermedades de origen diverso en las que la fibrosis post-inflamatoria es una causa principal de patología	
Cirrosis hepática (alcohólica o vírica)	Fibrosis pulmonar post-irradiación
Esquistosomiasis	Fibrosis pulmonar inducida por bleomicina
Fibrosis pulmonar idiopática	Rechazo crónico alógeno

La inflamación es, ante todo, una respuesta a favor de la supervivencia, tal como queda reflejado por el elevado riesgo de infecciones graves en individuos con deficiencias genéticas de los componentes principales del proceso inflamatorio; por ejemplo, la incapacidad para reclutar leucocitos en el foco lesionado, en los casos de déficit de adhesión leucocitaria, puede conducir a la muerte por infección³¹; la incapacidad de producir diferentes componentes del sistema del complemento sérico predispone a infecciones meningocócicas³², o la incompetencia de la maquinaria NADPHoxidasas leucocíticas, que incapacita al fagocito para producir especies reactivas de oxígeno bactericidas, conlleva la enfermedad granulomatosa crónica (ver: María Cascales, *Enfermedad granulomatosa crónica*, en este

libro: cap. 7, págs. 100-110). Por ello, el objetivo médico de inhibir la inflamación se acompaña por un esfuerzo de comparable importancia para lograr inducir inflamación de manera eficaz en, al menos, dos situaciones. En primer lugar, causar y mantener inflamación se encuentran entre las funciones esenciales de los adyuvantes en las vacunas; y en segundo, provocar inflamación es uno de los objetivos primarios de la inmunología tumoral, en inmunización terapéutica³³ y en inmunoestimulación inespecífica, como cuando se instila bacilo de Calmette-Guérin en una vejiga urinaria para prevenir la recurrencia tumoral³⁴.

«La evolución no previno que la cirugía sería una técnica aséptica. Así, el organismo reacciona al trauma como si la emergencia fuera una infección, y hasta que se demuestre lo contrario»³⁵. La secuencia inflamatoria suele ejemplificarse con un sencillo experimento: descubrir uno de nuestros antebrazos y colocarlo en supinación sobre una superficie de apoyo. Colocar las yemas de los tres dedos medios de la otra mano sobre el antebrazo desnudo, a la altura de la muñeca, y arrastrarlos hacia el codo mientras mantenemos una fuerte presión. Tras, más o menos, quince segundos aparecerá un bajorrelieve enrojecido en la piel «agredida» de nuestro antebrazo, que desaparecerá transcurrida una hora. En cambio, si la piel ha sido lesionada —un corte— y las bacterias han logrado acceder a los tejidos —contaminación—, el enrojecimiento y el edema persistirán, mostrando que se han puesto en marcha una serie de mecanismos, sincronizados con el tiempo de replicación bacteriana y su potencial expansivo. El episodio probablemente culminará con el confinamiento y muerte de las bacterias que ganaron el acceso a la piel, y con la eliminación y reparación del tejido dañado. Si la respuesta inflamatoria no fue adecuada por diferentes causas de origen congénito (ver párrafos anteriores) o adquirido, la infección y sus efectos se generalizarán —sepsis— pudiendo, incluso, provocar la muerte del enfermo.

IIa. La respuesta celular a la agresión

Cualquier agresión local a un organismo desencadena respuestas en tres niveles de la organización: celular, tisular y orgánica (**Figura 9**). La respuesta celular es individual y aislada, y tiene por objetivos defender su acervo génico y mantener la conformación nativa de sus proteínas. Para sobrevivir, los organismos deben enfrentarse con los efectos adversos del estrés genotóxico o agresiones que, constantemente, amenazan la integridad y función de sus genes y que pueden afectar a los exones o a las regiones no codificantes como los promotores. Tales ataques provienen de agentes ambientales como las radiaciones y los xenobióticos, y también endógenos: productos metabólicos de las células propias que causan

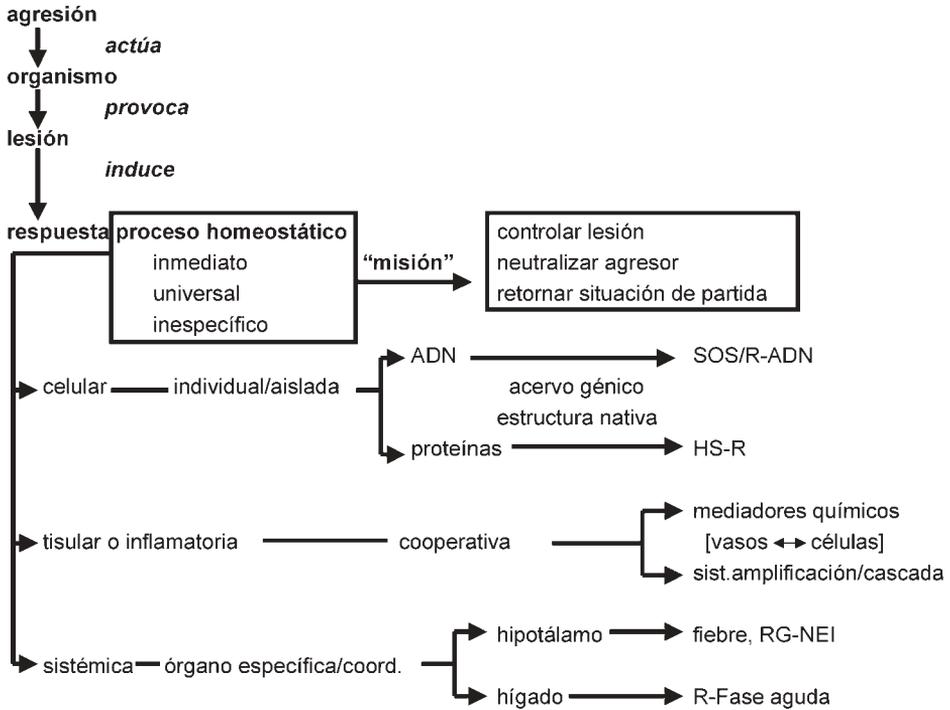


FIGURA 9. Respuesta orgánica a la agresión.

lesiones diversas en el ADN. En este contexto, la exposición repetida a la radiación ultravioleta provoca a corto plazo inflamación cutánea —eritemas y quemaduras solares— y, a la larga, cáncer de piel. También la inflamación crónica mantenida por la presencia bacteriana —*Helicobacter pylori*— en la úlcera gástrica se ha asociado al desarrollo de cáncer gástrico. En el ámbito de la inflamación aguda tienen mayor interés las lesiones inducidas, en las regiones promotoras de los genes, por diferentes especies reactivas de oxígeno liberadas por las células fagocíticas activadas. Su presencia puede interferir la interacción con factores de transcripción, específicamente con los involucrados directamente en la respuesta inflamatoria, como AP-1 o NF-κB (Figura 10). Para hacer frente a los daños infligidos por los elementos genotóxicos, internos y externos, los organismos han desarrollado mecanismos que enlentecen o bloquean la proliferación mediante su actuación en los puntos críticos del ciclo celular, que promueven la reparación del ADN o que eliminan las células agredidas poniendo en marcha programas de suicidio celular o apoptosis (Figura 11). Cómo la célula decide, entre vivir o morir,

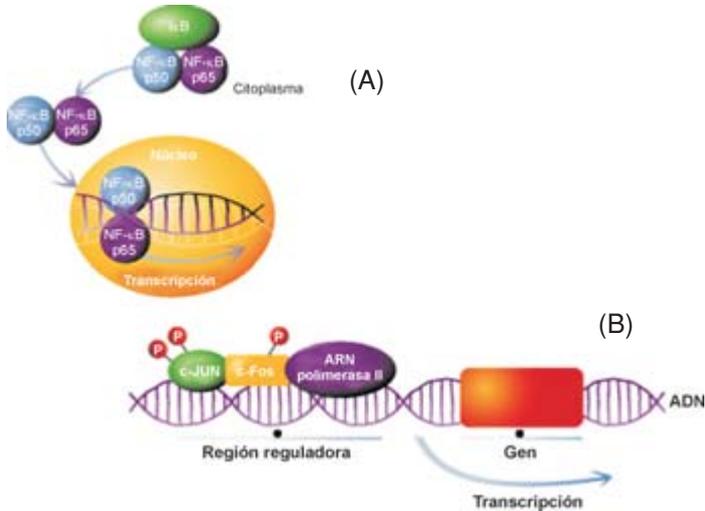


Figura 10. Los factores de transcripción son proteínas involucradas en el control y regulación de la expresión génica que, acoplándose a los elementos promotores aguas arriba de los genes, facilitan o inhiben su transcripción. Los factores de transcripción están compuestos de dos regiones principales: un dominio de acoplamiento al ADN y un dominio activador. El primero está formado por una secuencia de aminoácidos que reconocen secuencias específicas de bases en el ADN, cercanas al inicio de la transcripción. Los factores de transcripción se clasifican de acuerdo a la estructura del dominio de acoplamiento al ADN: dedos de zinc, hélice-vuelta-hélice, cremallera de leucina, hélice-asa-hélice y grupos de alta movilidad. Los dominios activadores de los factores de transcripción interactúan con los componentes de la maquinaria de transcripción (ARN polimerasa) y con otras proteínas reguladoras que afectan la eficiencia del acoplamiento al promotor. Los factores de transcripción pueden ser activados o inhibidos por estímulos fisiológicos, patológicos o farmacológicos. (A) El factor nuclear $\kappa\text{B}/\text{Rel}$ ($\text{Rel}/\text{NF-}\kappa\text{B}$) y la proteína activadora-1 (AP-1) son factores típicamente involucrados en el proceso inflamatorio. Las proteínas $\text{Rel}/\text{NF-}\kappa\text{B}$ son una familia de factores de transcripción, que acoge homo- y hetero-dímeros caracterizados porque el dominio de dimerización y acoplamiento al ADN —región de homología Rel — está muy conservado. Los miembros de la familia incluyen p50 , p52 , p65 , c-Rel y Rel . Los miembros mejor caracterizados de esta familia son los complejos heterodimérico $\text{p50}/\text{p65}$ y homodimérico $\text{p50}/\text{p50}$. En la mayoría de las células, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ se encuentra en el citoplasma en forma inactiva acoplado a una proteína inhibidora ($\text{I}\kappa\text{B}$). $\text{I}\kappa\text{B}$ enmascara el dominio de acoplamiento nuclear de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ mediante un enlace de asociación no-covalente. Un gran variedad de moléculas endógenas y exógenas como citoquinas, virus o xenobióticos, inducen la disociación del complejo $\text{I}\kappa\text{B}/\text{NF-}\kappa\text{B}$. El proceso de activación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ exige la activación previa de $\text{I}\kappa\text{B}$ -quinasa por los inductores del factor de transcripción, lo que provoca una rápida fosforilación de la subunidad inhibidora. La fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B}$ se sigue de su marcaje por ubiquitina, lo que permite su reconocimiento por el proteosoma que degrada $\text{I}\kappa\text{B}$ fosforilado. $\text{NF-}\kappa\text{B}$, una vez liberado, transloca al núcleo donde se une a secuencias ADN específicas que provocan la transcripción de los genes cuyos productos está involucrados en la respuesta mediada por $\text{NF-}\kappa\text{B}$ que, en el caso del proceso inflamatorio, incluyen $\text{pro-TNF-}\alpha$, moléculas de adhesión, COX2 o iNOS . (B) Los factores de transcripción de la familia de la proteína activante-1 (AP-1) consta de homo- y hetero-dímeros de proteínas que presentan regiones de cremallera de leucina. Esta familia incluye las subfamilias: Jun (c-Jun , v-Jun , JunB , JunD), Fos (c-Fos , v-Fos , FosB , Fra1 , Fra2) y factores de transcripción relacionados (ATF2 , $\text{ATF3}/\text{LRF1}$, B-ATF). El control de la activación de AP-1 descansa en procesos de fosforilación/desfosforilación que regulan la formación de homodímeros (Jun) o heterodímeros (Fos) que reconocen las secuencias correspondientes en el ADN.

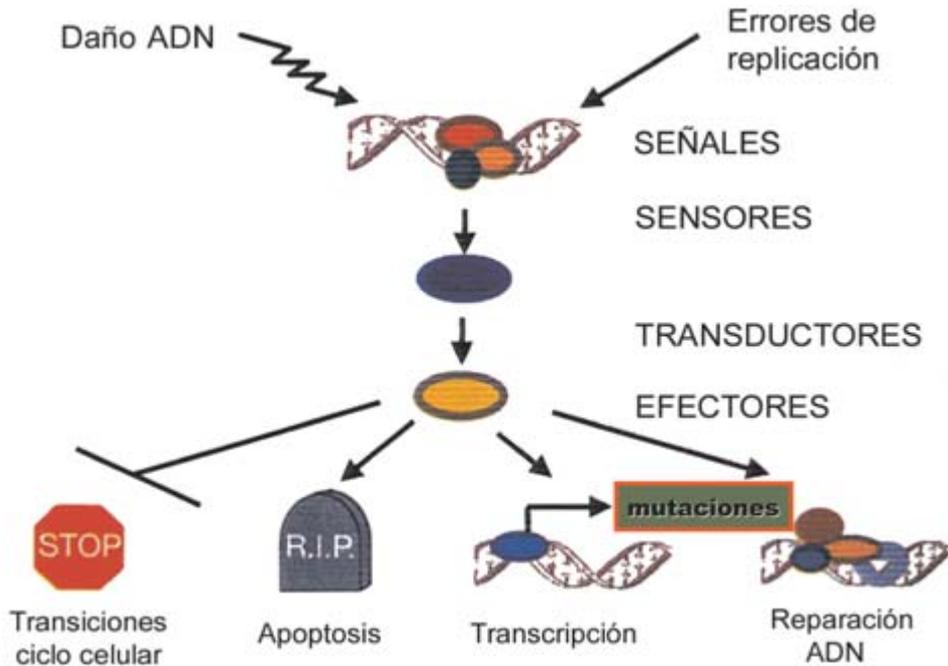


Figura 11. Panorámica de la vía de transducción de señales correspondiente a la respuesta al daño del ADN. Dicha vía, que consta de sensores, transductores y efectores, es activada por una serie de señales que corresponden a las diferentes lesiones causadas en el ADN: roturas de una o de las dos bandas nucleotídicas, y dimerizaciones de las bases. Los sensores no se conocen bien; un sensor candidato es la proteína BRCA1 (*Breast Cancer 1*). Los transductores de la señal son mejor conocidos. Dos proteínas quinásas relacionadas y evolutivamente bien conservadas —ATM (producto del gen *Ataxia Telangiectasia Mutated*) y ATR (*ATM-Rad3-related*)— son componentes centrales de la respuesta al daño del ADN. Las quinásas Chk1 y Chk2 son elementos efectores responsables de decidir entre reparar el daño, detener el ciclo celular o inducir apoptosis. Modificada de: Zhou *et al.*³⁶; fig. 1, pág. 433.

en respuesta a la lesión en su ADN es crítico no sólo para el destino celular, sino para evitar consecuencias desastrosas para el organismo como el cáncer³⁶.

Se conoce que, en respuesta a una ruptura de la doble hélice de la molécula de ADN, las células activan la proteína quinasa ATM, un regulador que fosforila numerosas otras proteínas, y, con ello, modula sus funciones en el control del ciclo celular, de la reparación del ADN o de la muerte celular. Uno de los sustratos de ATM, NEMO, es un regulador esencial del factor de transcripción de supervivencia NF- κ B. El juego entre ATM y NEMO es un factor importante en la maquinaria de toma de decisiones respecto al destino celular en respuesta al daño del ADN³⁷. NF- κ B y su activador IKK operan como un módulo de señalización, evolutivamente conservado, que orquesta la expresión de

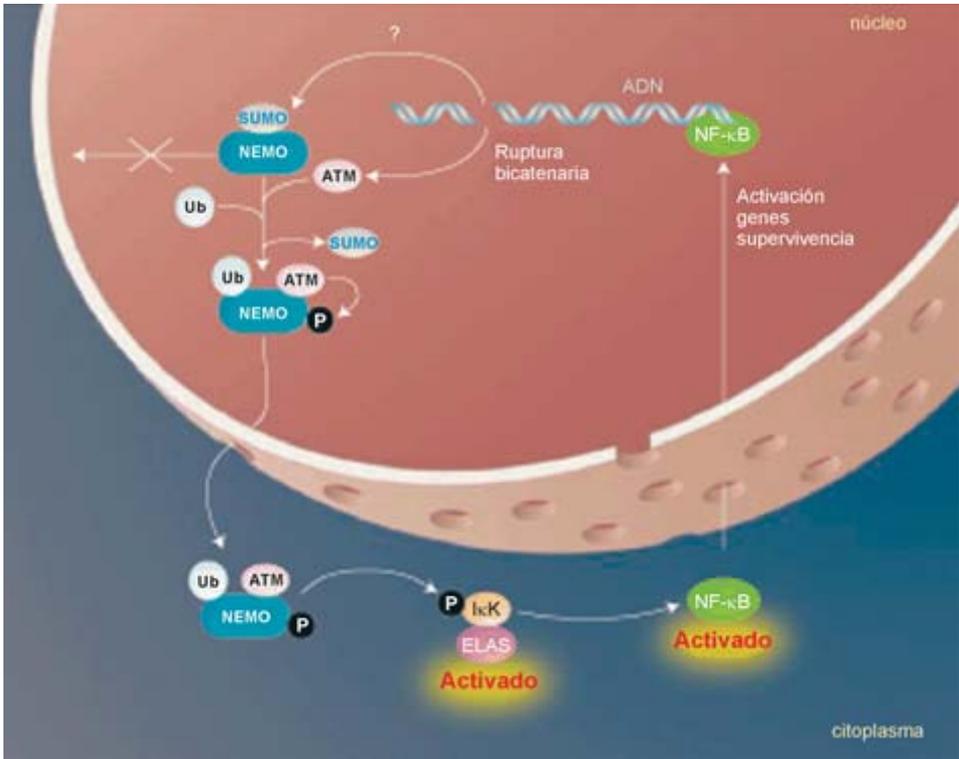


FIGURA 12. ATM busca a NEMO en respuesta a la lesión del ADN. Agresiones genotóxicas, que causan rupturas bicatenarias de la molécula de ADN, evocan una señal de estrés que provoca la modificación de NEMO (*NF-κB essential modulator*) nuclear por SUMO (*small ubiquitin-related modifier*), lo que evita la exportación de NEMO del núcleo. A la vez, señales provenientes de la ruptura activan la quinasa nuclear ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), que fosforila a NEMO previamente modificado por SUMO. La fosforilación de NEMO provoca el desacoplamiento de SUMO, lo que deja hueco para que se acople ubiquitina. Se forma así un complejo NEMO^U•Ubiquitina•ATM que abandona el núcleo para asociarse con y activar el complejo IKK (*IκB kinase*) en el citosol. IKK activado lo hace a su vez con NF-κB (*nuclear factor-κB*). NF-κB activado se transloca al núcleo para activar genes de supervivencia. Modificada de: Bartek *et al.*³⁷; fig. 1, pág. 111.

genes inducibles en diversos tipos celulares y procesos biológicos, permitiendo a las células y organismos adaptarse a cambios ambientales. El complejo activador IKK y su sustrato NF-κB están, en condiciones normales, durmientes en el citoplasma y prestos a responder a señales extracelulares que trasladan al núcleo. Pero el heterodoxo mecanismo dependiente de ATM/NEMO trabaja en dirección opuesta como una cascada de señales, puesta en marcha por órdenes intranucleares (ruptura bicatenaria del ADN), desde el núcleo al citoplasma (**Figura 12**). El delicado equilibrio en el sistema ATM/NEMO/IKK/NF-κB tie-

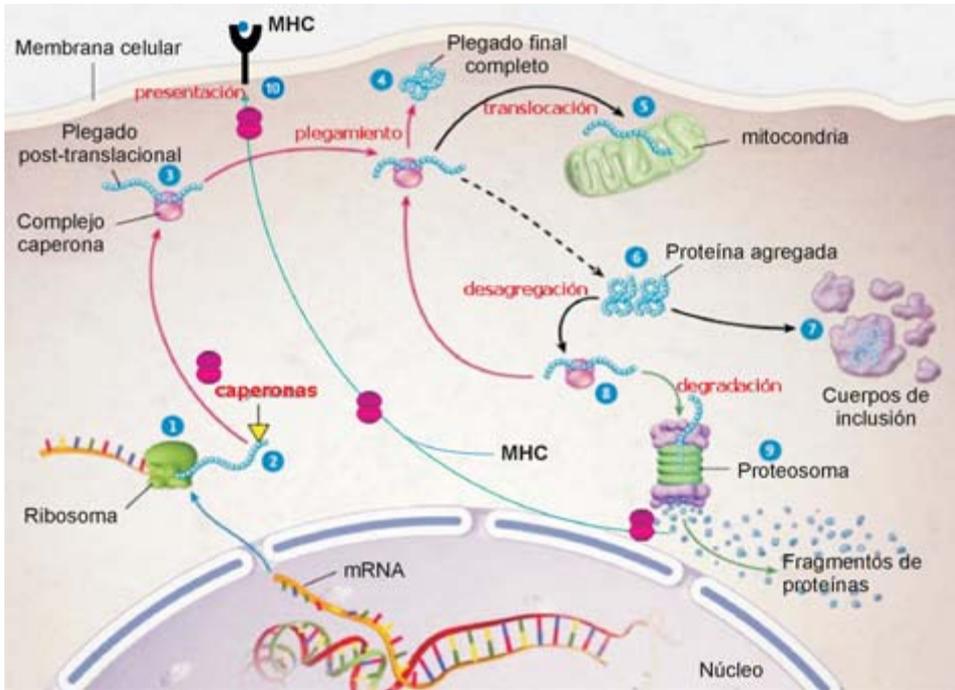


FIGURA 13. Esquema de la vida de una proteína. La traducción del ARN mensajero (mARN) ocurre sobre el ribosoma (1). A la vez, comienza, asistido por caperonas, el plegamiento de la cadena polipeptídica naciente (2); operación que continúa postraduccionalmente (3) hasta su complitud (4). Algunas proteínas, antes de lograr su conformación final son translocadas a diferentes orgánulos (ej. mitocondria, 5). En ocasiones, como consecuencia de la historia natural de la proteína o inducido por factores desestabilizadores (ej. estresores), las proteínas se desnaturalizan, agregan (6) y precipitan en un cuerpo de inclusión (7) que será procesado y digerido por la maquinaria lisosómica. Algunas proteínas desnaturalizadas o parcialmente desplegadas son recuperadas por caperonas (8), que bien las repliega en su conformación funcional (4) o, bien, las conduce al proteosoma (9) para ser degradadas. En las células presentadoras de antígenos (APC), las caperonas acompañan (10) a los péptidos —antígenos— digeridos o degradados hasta las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), que los presentarán, sobre la superficie celular, a los receptores de las células T (TCR). Modificada de: Macario et al.³⁸; fig. 1, pág. 1491.

ne un lado desfavorable. La activación, tanto por defecto como por exceso, de esta vía puede resultar en el desarrollo de células anormales y perjudiciales para el organismo. Aberraciones en diferentes componentes de la cascada pueden causar enfermedades debido a respuestas inmunológicas inapropiadas, reacciones inflamatorias o una pérdida de equilibrio en proliferación y muerte celular.

Las proteínas de choque término (HSPs), también denominadas proteínas de estrés, son un grupo de macromoléculas muy conservadas, con diferentes pesos

moleculares que guían una de sus clasificaciones —HSPs de gran masa molecular: ≥ 100 kDa; HSP90: 99-81; HSP70: 80-65; HSP60: 64-55; HSP40: 54-35, y HSP de masa molecular pequeña: ≤ 34 —, presentes en todas las células de todas las formas de vida. Expresadas en condiciones normales, diversos tipos de estrés ambiental o endógeno —ej., hipertermia, hipotermia, hipoxia, especies reactivas de oxígeno, desviaciones del pH, infección, metales, compresión o cizallamiento— inducen su producción. Actúan como caperonas o carabinas moleculares, asegurando que cada proteína alcance su conformación funcional en el lugar y en el momento adecuados. Para ello, intervienen en el proceso de plegamiento peptídico, en su distribución intracelular y en su degradación. En condiciones adversas se ocupan de que proteínas desnaturalizadas recuperen su conformación operativa y de que otras, que han formado agregados, recuperen su individualidad. También acompañan a los fragmentos peptídicos, producidos en la degradación de las proteínas, hasta el lugar de su presentación, en la superficie celular, por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (**Figura 13**). Las HSPs pueden alcanzar el medio extracelular, siendo detectadas en sangre en situaciones normales y patológicas; ello de manera pasiva —liberación en casos de necrosis celular, pero no en apoptosis— o por secreción activa, induciendo respuestas proinflamatorias ³⁸.

IIIb. La respuesta tisular

La **figura 14** esquematiza el flujo de información desencadenado por una herida contaminada, común, de pronóstico leve (**Tabla II**). La respuesta tisular a la agresión, o inflamación en stricto sensu, contempla, en esquema, cuatro acontecimientos interrelacionados: **a**) la estimulación de las terminaciones nerviosas libres provoca dolor y liberación de péptidos bioactivos: neuropéptidos; **b**) las células dañadas liberan proteínas constitutivas intracelulares: HSPs, factor nuclear HMGB1 y N-formil-péptidos (FP) mitocondriales; **c**) los microorganismos y sus diferentes productos incitan, en colaboración con los anteriores, una respuesta inmunológica innata, y **d**) señales emanadas del foco inflamatorio reclutan leucocitos en el lugar de la lesión.

Las terminaciones nerviosas libres, sensitivas, liberan tras la lesión o el estímulo neuropéptidos pertenecientes a la clase taquininas —sustancia P y neuroquininas— que representan el estímulo inicial de los mastocitos, que exponen sobre su membrana receptores específicos para tales mediadores proinflamatorios. Una vez iniciada la secuencia inflamatoria, triptasas liberadas por esas mismas células y por otras participantes en el proceso y actuando sobre receptores

INFLAMACIÓN E INMUNIDAD INNATA

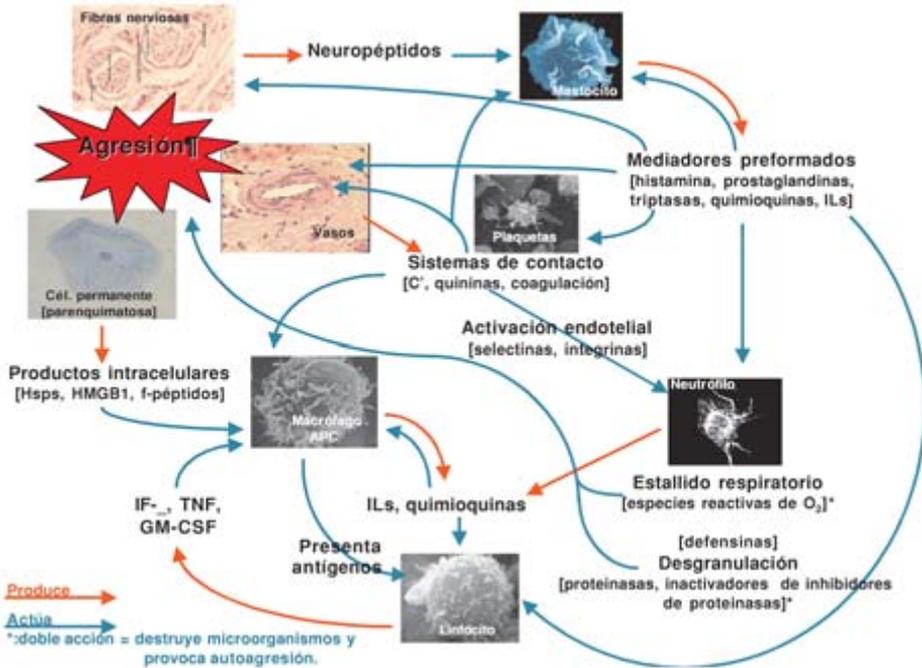


FIGURA 14. Flujo de información desencadenado por una herida contaminada, común, de pronóstico leve. Los microorganismos liberan productos que actúan, de manera directa, sobre mastocitos, macrófagos/APCs y neutrófilos. APCs: células presentadoras de antígenos; C': sistema del complemento sérico; f-péptidos: formil-péptidos; HMGB1: *high mobility group box 1*; Hsps: proteínas de choque térmico; ILs: interleuquinas. Producción de: →. Actuación sobre: →.

TABLA II. Clasificación y tasa de infección de las heridas operatorias

Clasificación	Tasa de infección (%)	Características de la herida
Limpia (clase I)	≈ 1.0 – 5.0	Incisa (“no traumática”);aséptica; no acceso a los tractos génito-urinario (GU) o gastro-intestinal (GI), ni a las vías respiratorias (VRs)
Limpia - contaminada (clase II)	≈ 8.0 – 12.0	Mínima transgresión en la esterilidad de la técnica; acceso al GU, GI o VRs, sin vertido importante
Contaminada (clase III)	≈ 15.0 – 17.0	Heridas traumáticas; vertido grosero desde tracto GI; acceso a tejidos, hueso o vías urinarias o biliares, infectadas. Sucia - infectada
(clase IV)	≈ 28.0 – 40.0	Drenaje de abscesos; desbridamiento de tejidos blandos infectados.

activados por proteasas (PAR) de los tipos PAR2 y EPR1 (ver más adelante y figura núm. 15), refuerzan la respuesta inicial de las terminaciones nerviosas, que incrementan la producción y liberación de CGRP y de sustancia P. El primero actúa sobre receptores arteriulares provocando vasodilatación, responsable de los signos inflamatorios rubor y calor, y el segundo sobre receptores del tipo NK1 venulares, provocando un incremento de la permeabilidad venular y extravasación responsable del edema o tumor inflamatorio.

Se ha demostrado que las HSPs liberadas al compartimiento extracelular tienen una serie de efectos inmunológicos, que incluyen la inducción de secreción de citoquinas proinflamatorias y de expresión de moléculas de adhesión por diversos tipos celulares. La HSP60 activa, en humanos, las células endoteliales vasculares para expresar selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1. La misma proteína de estrés induce la secreción de interleuquina-6 (IL-6) por células endoteliales, células musculares lisas y macrófagos. De manera similar al lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gram negativas, la HSP60 induce la rápida liberación de factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y de óxido nítrico (NO) por los macrófagos, así como la expresión de IL-12 e IL-15. Las HSPs, en su función extracelular como citoquinas —caperoquinas—, activan los monocitos y macrófagos a través de los mismos receptores —CD14 y TLR4— que utilizan los LPS bacterianos para incitar una respuesta inmunológica innata (**Figuras 15 y 16**).

La HMGB1 es una abundante proteína no histona, miembro de la superfamilia que agrupa proteínas nucleares que presentan una movilidad electroforética muy alta. Este grupo de proteínas incluye tres familias. Los miembros de la familia HMGB se encuentran entre las proteínas más ubicuas, abundantes y evolutivamente más conservadas entre las especies eucarióticas; todos ellos comparten un dominio —*box*— que media el acoplamiento de la proteína al ADN. La HMGB1, como factor nuclear, actúa como un elemento estabilizador de la arquitectura del ADN, e interacciona con varios factores de transcripción, proteínas virales de replicación y receptores esteroídicos; juega, por todo ello, un papel relevante en la transcripción. Cuando abandona su ubicación normal y alcanza el medio extracelular, bien pasivamente por ruptura celular o secretada por células inflamatorias activadas por citoquinas, actúa como un potente mediador inflamatorio con características citoquínicas y quimioquínicas. Su receptor —RAGE—, que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, se localiza en los endotelios y los miocitos vasculares y en los fagocitos, entre otras células. Su actuación sobre estas células potencia el proceso inflamatorio: provoca disrupción de la pared vascular favoreciendo la extravasación de líquido y de células intravasculares, y es una potente citoquina sobre los fagocitos³⁹.

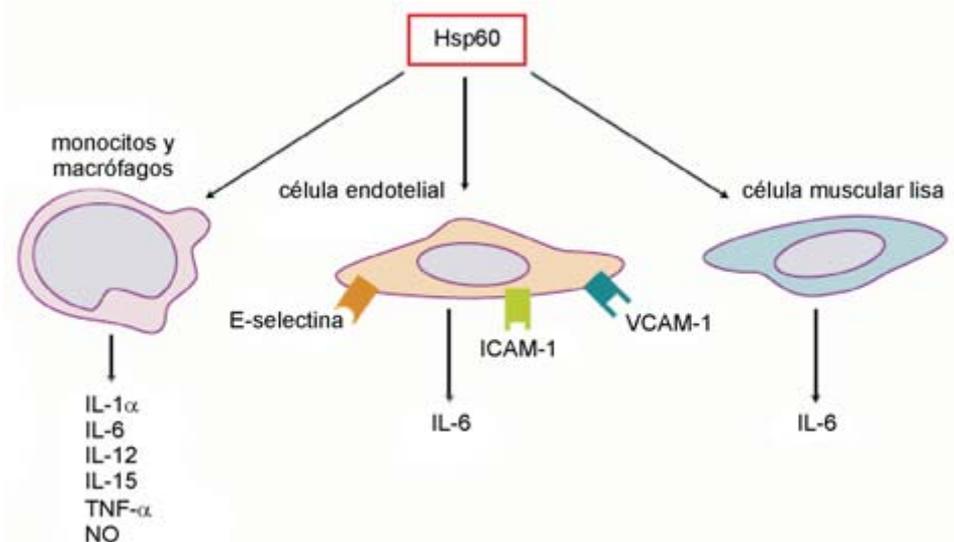


FIGURA 15. La HSP60 como molécula de señalización intercelular. ICAM: *intercellular adhesion molecule*. IL: *interleukin*. TNF: *tumor necrosis factor*. VCAM: *vascular cell adhesion molecule*. Modificada de: Pockley ³⁸; fig. 2, pág. 8.

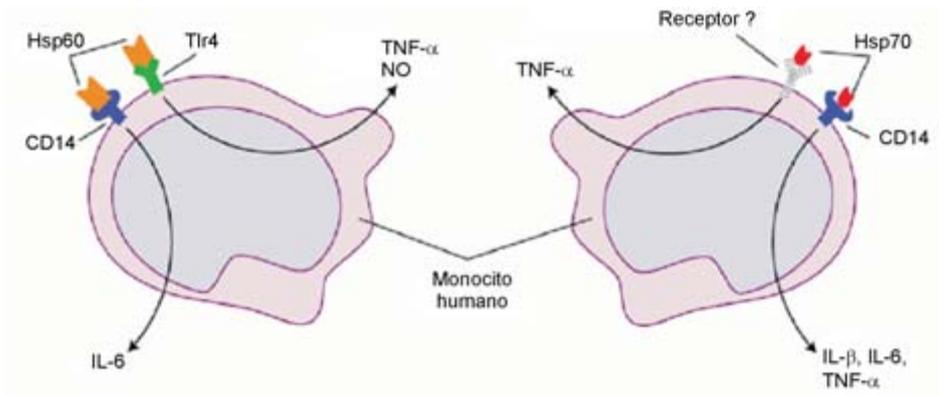


FIGURA 16. Las proteínas HSP60 y HSP70 inducen la secreción de citoquinas proinflamatorias por monocitos/macrófagos. La HSP60 induce la secreción de interleuquina 6 (IL-6) a través del receptor CD14 y se une al complejo del receptor tipo Toll 4 (TLR4), del que CD14 es un correceptor, para inducir la expresión de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y de óxido nítrico sintasa; esta última responsable de incrementar la producción de óxido nítrico (NO). La HSP60 también induce la expresión de las citoquinas IL-12 e IL-15, a través de vías no identificadas. La HSP70 actúa a través de una vía dependiente de CD14 para estimular la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , y por otra vía no conocida potencia la expresión de TNF- α . Modificada de: Pockely ³⁸; fig. 3, pág. 9.

Los fagocitos profesionales —polimorfonucleares neutrófilos y células mononucleadas (monocitos y macrófagos)— juegan un papel clave en la defensa del huésped contra las bacterias invasoras. Las señales atractoras —quimioatractores— clásicas de los fagocitos son los FP bacterianos y mitocondriales, el factor 5a del complemento (C5a), la interleuquina 8 (IL-8), el factor activador de plaquetas (PAF) y el leucotrieno B₄ (LTB₄). El término quimioattractor deriva del hecho de que los fagocitos migran a lo largo de un gradiente de concentración —gradiente haptotáctico— de tales sustancias. Cuando los quimioatractores están presentes a altas concentraciones, activan las funciones citotóxicas de los fagocitos; específicamente, los fagocitos activados completan la cascada adherente, generan diferentes especies de radicales de oxígeno (ROS) y liberan enzimas lisosómicas y otros mediadores inflamatorios.

Al contrario que los procariotes, la síntesis de proteínas codificadas por el ADN nuclear eucariótico se inicia con un aminoácido metionina no formilado. Sin embargo, el aparato de síntesis proteica mitocondrial utiliza *N*-formilmetionina para iniciar la síntesis peptídica, de manera análoga a los procariotes; además, el resto formil (-CHO) se retiene en el extremo aminoterminal de las proteínas mitocondriales. Por ello, FPs liberados por las mitocondrias —en cuyo interior y en condiciones normales permanecen confinadas e ignoradas por el sistema de vigilancia inmunológico— dañadas juegan un papel proinflamatorio similar al de los péptidos bacterianos. Los receptores quimiotácticos clásicos de los fagocitos incluyen los de FP (FPR), C5a (C5aR), PAF-R e IL-8R. Todos ellos, como los receptores de eicosanoides y de quimioquinas, son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR), y cuya interacción con el ligando agonista resulta en la activación de la célula ⁴⁰.

IIc. Mediadores inflamatorios

Numerosos estudios señalan la importancia del reclutamiento de leucocitos en el foco inflamatorio a partir del pul circulante. Sin embargo, una rápida respuesta requiere células centinelas estacionadas en los tejidos. Los macrófagos y especialmente los mastocitos, cumplen tal función ⁴¹. Los mastocitos perivasculares responden a los neuropéptidos liberados por las terminaciones nerviosas dañadas y estimuladas liberando histamina ⁴², triptasa y otras proteasas y TNF- α preformados, y eicosanoides —prostaglandinas inflamatorias, troboxanos y leucotrienos ⁴³—, citoquinas y quimioquinas neoformadas. Histamina, eicosanoides y triptasas causan vasodilatación —responsable del calor y rubor inflamatorios— y extravasación —responsable del tumor o edema inflamatorio—. Las triptasas mastocíticas siegan

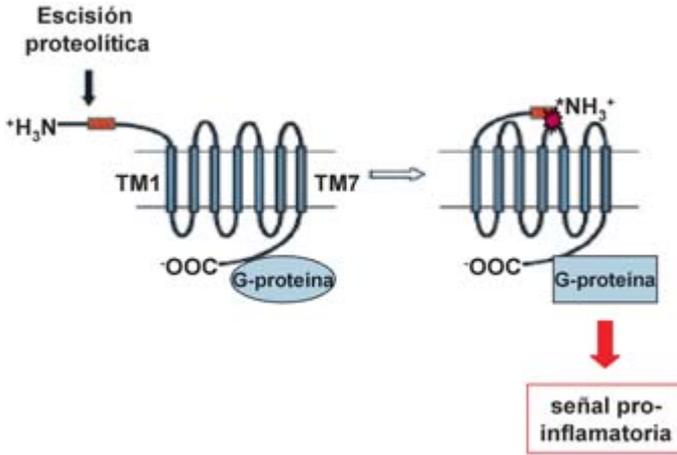


FIGURA 17. Mecanismo de autoactivación de los receptores activados por proteasas (PARs). Tras la escisión proteolítica del extremo N-terminal (NH_3^+) del PAR por trombina, tripsina o triptasa (dependiendo del subtipo del receptor), se expone un nuevo resto N-terminal ($^*\text{NH}_3^+$) y se desenmascara la secuencia [⚡] que autoactiva [⚡] el receptor acoplado a proteína G. TM1: primer dominio transmembranar. TM7: séptimo dominio transmembranar. COO: grupo carboxi-terminal.

el extremo N-terminal exocelular de receptores activados por proteasas, desenmascarando secuencias, previamente crípticas, que autoactivan el receptor⁴⁴. Un receptor que pertenece a la clase GPCR⁴⁵, y que están presentes en mastocitos, terminaciones nerviosas libres sensitivas, endotelio vascular, plaquetas y neutrófilos (**Figura 17**). Ello potencia la estimulación de los mastocitos y de las terminaciones nerviosas; hace al endotelio adherente para los leucocitos, permeable al fluido intravascular y procoagulante; induce la adhesividad y agregación de las plaquetas e insta a los leucocitos a producir factor activador plaquetario (**Figura 18**). PAF es el nombre trivial de un fosfolípido [1-O-alkil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina] que tiene diversas y potentes acciones fisiológicas. Muchos mediadores lipídicos (ej., eicosanoides) derivan de fosfolípidos, pero el PAF es un fosfolípido intacto que se acopla a un receptor específico⁴⁶. El PAF refuerza la adhesividad endotelial que conduce a la migración leucocitaria desde el vaso al foco inflamatorio (**Figura 19**), e induce en aquellos la expresión de receptores de quininas.

La interacción del quininógeno de peso molecular elevado (HK) con su receptor sobre la superficie celular endotelial es clave para la activación de la precalicreína (PK), que circula en el plasma formando un complejo con HK. Como se muestra en la **figura 20**, la calicreína activa sobre la membrana endotelial digiere al HK para liberar bradiquinina (BK). El ensamblaje del complejo HK•PK sobre la célula endotelial es, por tanto, un prerrequisito para la formación de BK, que puede interactuar con el receptor de BK de tipo 2 (B2). La activación de B2 in-

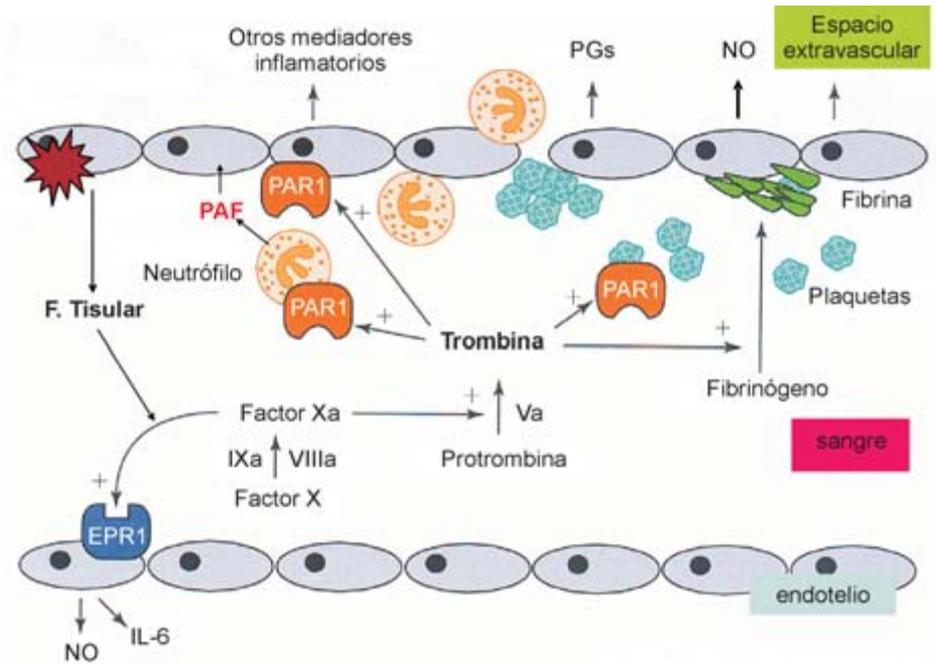


FIGURA 18. La activación del receptor activado por proteasa del subtipo 1 (PAR1) por trombina, representa un vínculo de unión entre las vías inflamatoria y de la coagulación. PAR1 se expresa en la superficie de las plaquetas (p), neutrófilos (n) y endotelios (e). La activación de PAR1e por trombina conduce a la liberación de mediadores proinflamatorios -prostaglandinas (PGs) y óxido nítrico (NO)- por las células endoteliales vasculares; mientras que la activación de PAR1n induce la migración de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, y la liberación de factor activador plaquetario (PAF) que actuando sobre el endotelio potencia su adhesividad para las plaquetas. La activación de PAR1p provoca la adhesión de las plaquetas al endotelio y la agregación plaquetaria, que activan la vía intrínseca de la coagulación. Previamente, el endotelio lesionado ha liberado factor tisular (factor VII de la coagulación) que pone en marcha la vía extrínseca de la coagulación e inicia la producción de trombina. La adhesión plaquetaria y el depósito de fibrina sobre el endotelio vascular potencian la producción de PGs y NO. Por su parte, el factor X de la coagulación, activado por ambas vías de la coagulación, actúa directamente sobre las células endoteliales mediante la activación de otro receptor de la clase PAR -receptor EPR1 (*effector cell protease receptor 1*), también presente en las terminaciones nerviosas libres en las que se expresa junto con el subtipo PAR2-, induciendo la producción de NO y de interleuquina 6 (IL-6).

Modificada de: Cirino *et al.* ⁴⁴; fig. 1, pág. 171.

duce la producción de óxido nítrico y prostaciclina (PGI₂), vasodilatadores, y de activador tisular del plasminógeno (tPA), antitrómbico. El activador de la PK es una serina proteasa (PRCP o angiotensinasa C). PRCP también digiere la inerte angiotensina I y la vasoconstrictora angiotensina II, dando lugar en ambos casos a

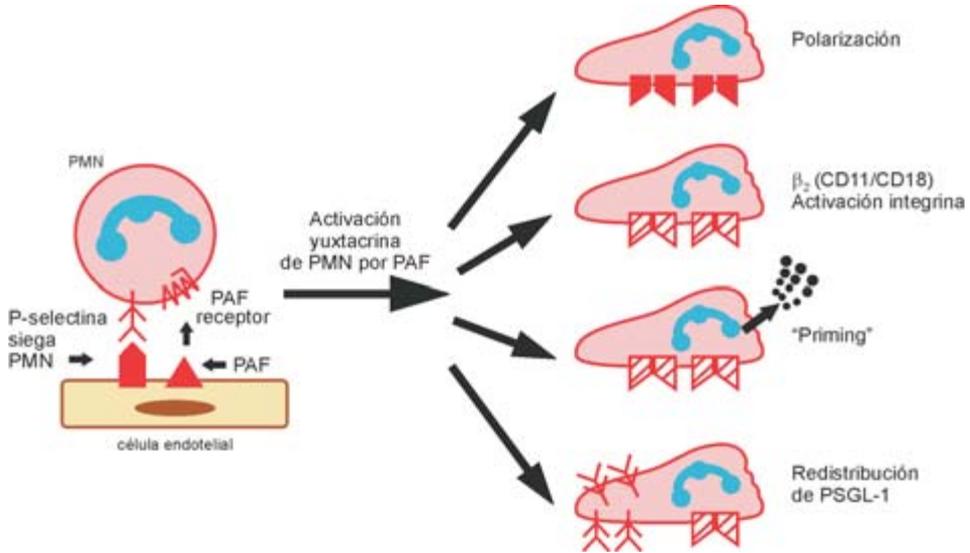


FIGURA 19. La señal incitada por el PAF prepara y activa a los leucocitos en las superficies de las células endoteliales vasculares inflamadas: un sistema yuxtacrino de control espacial del proceso inflamatorio. El PAF y una molécula de adhesión, P-selectina, se coordinan sobre la membrana celular endoteliofítica. La P-selectina ata el leucocito a la célula endotelial, lo que permite al PAF de la célula endotelial acceder a su receptor en el leucocito polimorfonuclear. Ello constituye una especie de señal yuxtacrina pleotrópica. Modificada de: Prescott et al. ⁴⁶; fig. 1, pág. 421.

angiotensina II $(_{1-7})$, un péptido bioactivo que induce vasodilatación por estimular la producción de NO. PRCP produce dos péptidos bioactivos vasodilatadores, BK y angiotensina II $(_{1-7})$, que se oponen a la potente acción vasoconstrictora de la angiotensina II. Se conoce la capacidad de la angiotensina II para inducir la secreción de inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI1), lo que involucra al sistema renina-angiotensina (RAS) en favorecer la trombosis. La doble acción de la PRCP —activa PK e inactiva angiotensina II— indica una importante interacción entre el sistema caliceína-quinina (KKS) y el RAS, y sugiere que ambas vías, conjuntamente, no solo regulan la presión arterial sino que influyen en la producción de trombosis. Existen otras dos interacciones entre KKS y RAS (**Figura 21**): la caliceína puede convertir prorenina (inactiva) en renina (activa); y la enzima convertidora de angiotensina (ACE o quininasa II) puede convertir angiotensina I (inactiva) en angiotensina II (activa), y BK en BK $(_{1-5})$, un péptido inhibidor de trombina. El sistema KKS plasmático es, por tanto, anticoagulante y profibrinolítico. Además, BK, como se ha señalado, induce la formación de NO, de PGI₂ y de tPA. En resumen, parece que el KKS plasmático sirve de contrapeso fisiológico al hipertensivo y protrombótico RAS ⁴⁷.

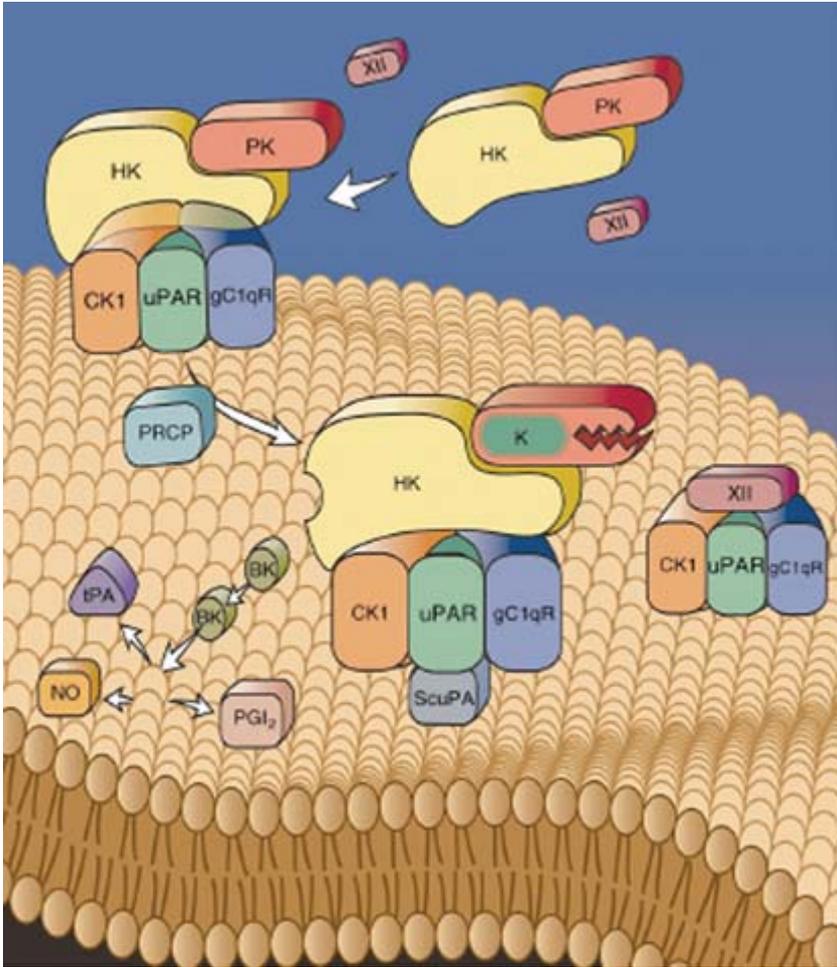


FIGURA 20. Ensamblaje y activación del sistema caliceína-quinina (KKS) plasmático. La precaliceína (PK: *prekallikrein*) circula formando un complejo con quinínogeno de elevado peso molecular (HK: *high molecular-weight kininogen*) [HK•PK]. HK•PK interacciona con un receptor multiproteico formado por citoqueratina 1 (CK1: *cytokeratin 1*), receptor de activador de plasminógeno-uroquinasa (uPAR: *urokinase plasminogen activator receptor*) y gC1qR. Las proteínas del receptor de HK•PK colocalizan sobre la membrana de las células endoteliales vasculares. Cuando HK•PK se une a su receptor, PK es rápidamente convertida a caliceína (K) por la enzima prolil-carboxipeptidasa (PRCP), que es un componente constitutivo, activo, de la membrana del endotelio. La caliceína resultante autodigiere a su receptor, HK, liberando bradiquinina (BK). La bradiquinina interacciona con receptores específicos cuya señal induce la producción y liberación de activador tisular de plasminógeno (tPA: *tissue plasminogen activator*) óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI₂). La caliceína también activa al factor XII de la coagulación, que se une al mismo receptor al que lo hace HK•PK, potenciando la vía intrínseca de la coagulación. ScuPA (*single chain urokinase plasminogen activator*) es un adaptador de uPAR. Modificada de: Schmaier⁴⁷; fig. 1, pág. 1007.

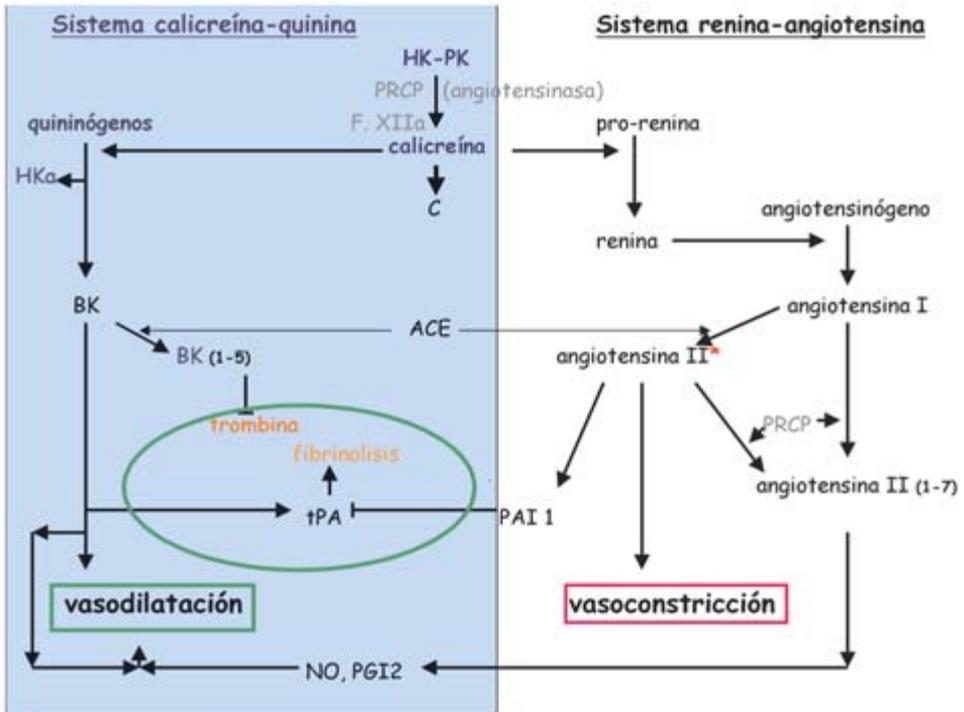


Figura 21. Interacción entre los sistemas caliceína-quinina (KKS) y renina-angiotensina (RAS) plasmáticos. La caliceína convierte pro-renina en renina, y la renina tiene la capacidad de convertir angiotensinógeno en angiotensina I. La enzima convertora de angiotensina (ACE: *angiotensin-converting enzyme*) convierte a la inerte angiotensina I en la vasoconstrictora angiotensina II. La angiotensina II estimula al inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI1: *plasminogen activator inhibitor 1*) liberado por las células endoteliales. A la vez, ACE degrada la bradiquinina (BK) a bradiquinina₍₁₋₅₎, un péptido con actividad anti-trombina. La proilcarboxipeptidasa (PRCP) es la enzima que degrada la angiotensina II o la angiotensina I, en el péptido vasodilatador angiotensina II₍₁₋₇₎. La angiotensina II₍₁₋₇₎ estimula la producción de óxido nítrico (NO) y de prostaciclina (PGI₂), que potencian los efectos de la BK. PRCP también tiene la capacidad de convertir PK en caliceína. La caliceína formada digiere los quininógenos para liberar BK y un fragmento (HKa: *kinin-free kininogen*) que tiene propiedades antiproliferativas y antiangiogénicas. Así, PRCP, la misma enzima que degrada la vasoconstrictora angiotensina II, conduce a un incremento en la formación de las vasodilatadoras BK y angiotensina II₍₁₋₇₎. Por último, la BK estimula la producción de activador tisular de plasminógeno (tPA), NO y PGI₂, lo que supone un contrapeso al efecto protrombótico de la angiotensina II. Modificada de: Schmaier⁴⁷; fig. 2, pág. 1008.

Las citoquinas⁴⁸ son pequeñas proteínas o glicoproteínas⁴⁹, que actúan como autacoides o como hormonas, producidas generalmente como formas precursoras por células activadas que median el proceso inflamatorio. El término citoquina o inmunocitoquina se utilizó inicialmente para separar un grupo de proteínas inmunomoduladoras, denominadas inmunotransmisores, de otros factores de crecimen-

to o factores peptídicos reguladores que modulan la proliferación y bioactividad de células que no pertenecen, en principio, al sistema inmunológico. El término citoquina se utiliza como un nombre genérico para un grupo diverso de proteínas solubles que actúan como reguladores humorales a concentraciones nano- o picomolares y que, en condiciones normales y patológicas, modulan las actividades de células y tejidos; y algunas de ellas se comportan como factores de supervivencia al prevenir la apoptosis. Las citoquinas también median, de manera directa, interacciones intercelulares. En muchos aspectos, las actividades biológicas de las citoquinas semejan las de las hormonas clásicas producidas en tejidos glandulares especializados. Algunas citoquinas también se comportan como hormonas, al actuar a distancia. En general, las citoquinas actúan sobre una mayor variedad de células diana que las hormonas; y, quizás, la principal diferencia entre hormonas y citoquinas es que estas no son producidas por células especializadas. Diferentes citoquinas son producidas por células diferentes, y virtualmente todas las células del organismo son capaces de producir una u otra de aquellas.

En el sentido más restrictivo, las citoquinas comprenden las interleukinas —se pensó, en un principio, que eran producidas exclusivamente por leucocitos—, linfoquinas, monoquinas, interferones (IFNs), quimioquinas, factores estimulantes de colonias (CSFs) y factores de crecimiento (GFs). El término citoquinas de tipo 1 se refiere a aquellas producidas por células Th1 (células *T helper* o asistentes): IL-2, IFN- γ , IL-12 o TNF- β). Las citoquinas de tipo 2 son las producidas por Th2: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 o IL-13. La mayoría de las citoquinas no se relacionan en términos de secuencias, aunque algunas pueden agruparse en familias (por ej. familias de receptores⁵⁰), o clasificadas en categorías de acuerdo con el tipo de la estructura secundaria o terciaria. Tras la expresión génica, la mayoría de las citoquinas son secretadas por las células utilizando las vías secretoras clásicas, existiendo formas que se asocian a las membranas y, otras, a la matriz extracelular. Se denomina entramado citoquínico a las interacciones, extraordinariamente complejas, de las citoquinas por las que inducen o suprimen su propia síntesis o la de otras citoquinas o sus receptores, y antagonizan o sinergizan entre ellas de maneras diferentes y, a menudo, redundantes. Tales interacciones involucran, en ocasiones, cascadas citoquínicas en las que una citoquina inicial desencadena la expresión de ella y de muchas otras, creando complejos circuitos de retroalimentación. Se denominan citoquinas pro-inflamatorias aquellas que favorecen la inflamación, siendo prototípicas IL-1, IL-6 y TNF- α . Actúan como pirógenos endógenos, inducen la síntesis de mediadores secundarios y de citoquinas proinflamatorias por macrófagos y por células mesenquimales, estimulan la producción de proteínas de fase aguda y atraen células inflamatorias. El efecto neto de una respuesta inflamatoria está determinada por el balance entre citoquinas pro- y antiinflamatorias (IL-4, IL-10 o IL-13).

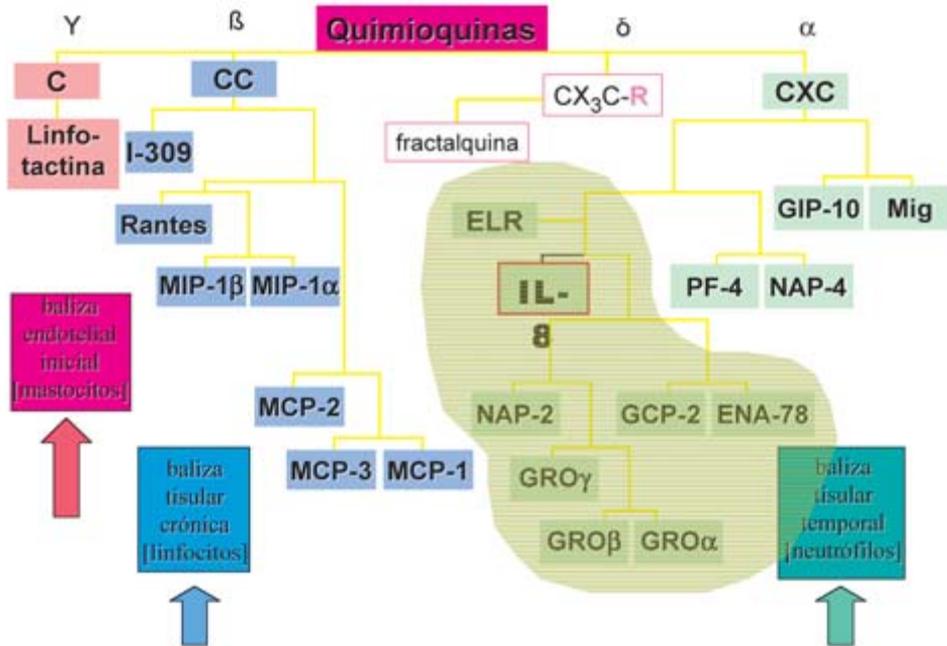


FIGURA 22. Se han identificado cerca de 50 quimioquinas, proteínas homólogas de 8-10 kDa, que se agrupan en familias sobre la base de la posición relativa de sus cisteínas (Cys o C) en la proteína madura. En las quimioquinas- α los primeros dos restos Cys están separados por un solo aminoácido (CXC), mientras que en la quimioquinas- β las primeras dos Cys están adyacentes (CC). Las quimioquinas- α que contienen la secuencia ácido glutámico-leucina-arginina inmediatamente antes de CXC son quimiotácticas para neutrófilos, mientras que las que no contienen esta secuencia actúan sobre linfocitos. La quimioquina C linfotactina tiene solo dos cisteínas en la proteína madura, y la quimioquina CXXXC fractalquina tiene tres aminoácidos separando las dos primeras cisteínas. Los receptores de quimioquinas son proteínas transmembranares acopladas a proteína G, que se expresan sobre los diferentes subgrupos de leucocitos. Se han identificado, en humanos, cuatro CXCR, ocho CCR y un CXXXCR.

Macrófagos activados producen, en respuesta a patógenos y otros estímulos dañinos, TNF, una citocina con una masa molecular relativa de 17 kDa que se comporta como mediador necesario y suficiente de la inflamación local y generalizada. El incremento de la concentración local de TNF provoca los signos clínicos cardinales de la inflamación: calor, rubor, tumor y dolor. El aumento sistémico de TNF media la lesión tisular deprimiendo el volumen sistólico cardíaco, induciendo trombosis microvascular y mediando en el síndrome vasculopléjico con vasoparálisis y extravasación masiva de líquido intravascular. El TNF amplifica y prolonga la respuesta inflamatoria al activar otras células que, como respuesta, liberan citocinas tales como IL-1 y HMGB1, y otros mediadores como eicosanoides, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno, que po-

tencian la inflamación y provocan lesiones tisulares. El TNF es esencial para la completa expresión inflamatoria; por el contrario, la autolimitación del proceso inflamatorio se caracteriza por una atenuación de la actividad del TNF.

Las quimioquinas, constituyen una familia de pequeñas proteínas proinflamatorias caracterizadas por contener en su molécula cuatro restos de cisteína (Cys) que forman cuatro enlaces disulfuro intracatenarios. Las quimioquinas juegan un papel fundamental en la inflamación por atraer y activar clases específicas de leucocitos, participando en tres de las cinco etapas de la cadena de adherencia leucocítica. En primer lugar, favorecen el rodamiento lento y la adherencia de los leucocitos al activar las integrinas leucocitarias. Segundo, son potentes quimioatractores que guían a los leucocitos hacia el foco inflamatorio; y por último, activan las funciones efectoras de los leucocitos, incluyendo la producción de productos intermedios reactivos durante el metabolismo del oxígeno y la exocitosis de enzimas hidrolíticas. Las quimioquinas se unen a glicosaminoglicanos y heparina, formando complejos que se creen de gran importancia en su capacidad para atraer localmente a los leucocitos. Hay dos subfamilias estructurales principales, designadas Cys-X-Cys, CXC o subfamilia α , y la subfamilia Cys-Cys, CC o subfamilia β . Linfotactina (C) y fractalquina (CX_3C) representan otras dos familias (**Figura 22**). Los receptores de quimioquinas son miembros de la superfamilia de receptores transmembranares acoplados a proteína G.

IId. La cascada de adhesión leucocitaria

La mayor parte de lo anterior tiene por objetivo reclutar y activar fagocitos en el foco inflamatorio ⁵¹. La cascada de adhesión leucocítica es una secuencia de acontecimientos de adhesión y activación que concluye con la extravasación de los leucocitos; ello con la finalidad de que tales células ejerzan sus efectos en el foco inflamatorio. En dicha cascada pueden distinguirse, al menos, cinco etapas bien definidas: captura, rodamiento, rodamiento lento, anclaje y migración (**Figura 23**). Cada una de ellas es necesaria para el reclutamiento efectivo de los leucocitos, y el bloqueo de cualquiera de ellas disminuye significativamente la acumulación de leucocitos en el tejido lesionado. Tales etapas no representan fases de la inflamación, sino la secuencia de acontecimientos desde la perspectiva de cada leucocito. En cualquier momento determinado las cinco etapas suceden en paralelo, involucrado a diferentes células en el mismo microvaso y al mismo tiempo. La comprensión del escenario microvascular tiene una proyección terapéutica inmediata: el desarrollo de fármacos antiinflamatorios orientados a interferir con todas y cada una de las etapas señaladas.

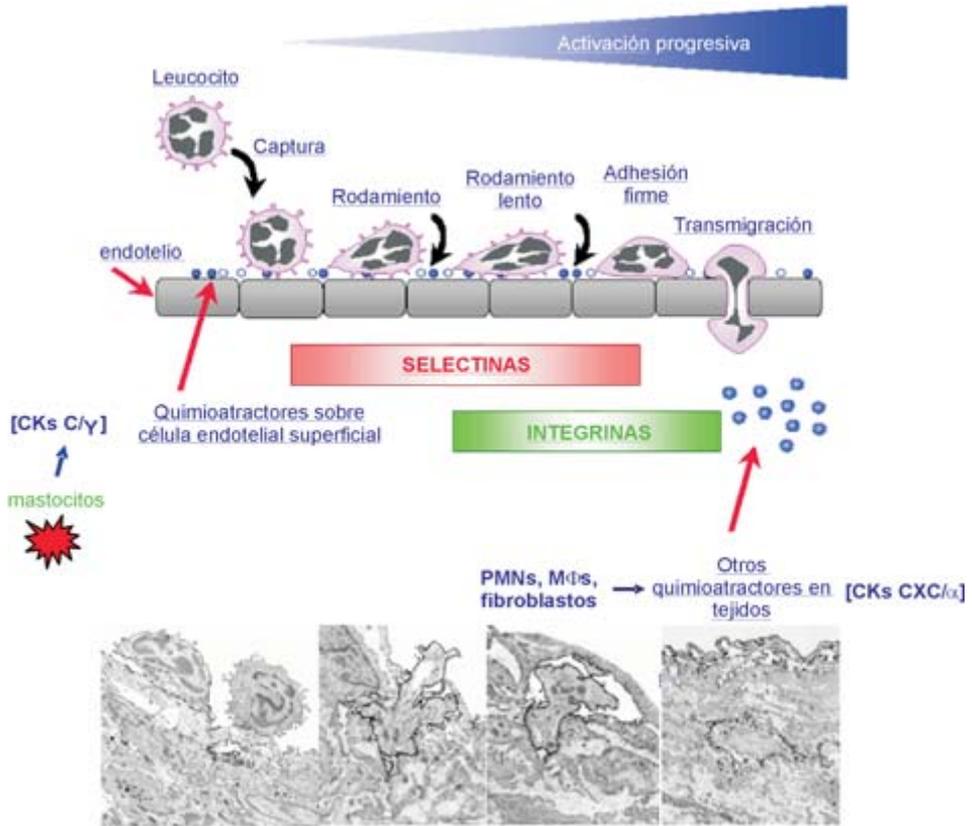


FIGURA 23. La «cascada de adhesión leucocitaria» es una secuencia de acontecimientos de adhesión y activación que termina con la extravasación del leucocito que, en el espacio intersticial donde tienen lugar la inflamación, ejercerá sus efectos. La cascada de acontecimientos se ha diseccionado en cinco pasos: captura, rodamiento, rodamiento lento, anclaje y transmigración. Cada uno de ellos es necesario para que el reclutamiento leucocitario en el foco inflamatorio sea efectivo. Los tres primeros pasos dependen, en principio, de selectinas, siendo integrinas las responsables de la conclusión de la secuencia. En resumen, la iniciación del proceso exige la activación del endotelio que, por acción de quimioquinas expone, sobre su superficie, selectinas. Ligandos constitutivamente expresados sobre los leucocitos establecen ligaduras, cada vez más fuertes según avanza la secuencia, con selectinas. La conclusión de la cascada de adhesión depende de las interacciones de integrinas leucocitarias con sus ligandos endoteliales. Completa la captura, el leucocito migra transendotelialmente siguiendo un gradiente haptotáctico de nuevas quimioquinas. Modificada de: Kalus et al.⁵¹

El endotelio vascular proporciona una barrera impecable que previene la interacción entre las células circulantes y la pared de vaso. El endotelio está formado por un epitelio escamoso simple que recubre la luz vascular. Juega un papel clave en la mecánica del flujo sanguíneo, en la regulación de la coagulación de la sangre, en la adhesión de los leucocitos y en el crecimiento de los miocitos,

y también sirve de barrera a la difusión transvascular de los líquidos y solutos circulantes. El endotelio, lejos de ser una pared pasiva, es un tejido dinámico que lleva a cabo variadas funciones activas, como la producción, secreción o expresión de sustancia vasoactivas involucradas en la cascada adhesiva, en la hemostasia o en el tono vascular.

La marginación es el proceso en el que los leucocitos circulantes abandonan el eje del flujo, lo que permite iniciar una serie de interacciones —contacto mecánico— entre las células circulantes y el endotelio. Los mecanismos subyacentes de la marginación involucran interacciones entre los leucocitos y los eritrocitos que fluyen por el mismo vaso, de tal manera que los eritrocitos deformados empujan y desplazan a los leucocitos a una posición marginal; ello debido a la menor sección transversal y a la mayor velocidad de flujo de los eritrocitos. La agregación eritrocítica también promueve la marginación leucocítica en los microvasos mayores, dado que los agregados ocupan el centro de la vénula. La marginación reológica no es crítica para el rodamiento de los leucocitos, dado que los leucocitos abandonan aquellos capilares cuyo diámetro es menor que el de ellos, con lo que el contacto con el endotelio está asegurado. El proceso de captura o atamiento representa el primer contacto de un leucocito con el endotelio activado. La captura ocurre tras la marginación, que permite moverse al leucocito hacia una posición próxima al endotelio, lejos del eje del flujo. La respuesta inflamatoria requiere una activación endotelial previa al inicio de la captura. La P-selectina sobre las células endoteliales es la molécula de adhesión primaria para la captura en inicio del rodamiento. El principal ligando del leucocito para la P-selectina es PSGL-1. Además, diferentes estudios sugieren que la L-selectina también juega un papel importante en la captura; su ligando en la célula endotelial no está bien definido. Anticuerpos que bloquean la función de la L-selectina inhiben el rodamiento en muchos modelos en los que el rodamiento es dependiente de la P-selectina.

Una vez que el leucocito ha sido capturado, se mantiene transitoriamente adherido al endotelio venular y comienza a rodar. El rodamiento ocurre a una velocidad similar o menor a la de las células, como los eritrocitos, que circulan libremente en el mismo vaso y en la misma posición radial. La velocidad que separa el rodamiento del flujo celular libre se denomina velocidad crítica o velocidad hidrodinámica. La familia selectina de receptores transmembranares de adhesión media este proceso de rodamiento. La P-selectina es el miembro más importante de la familia en esta etapa. La P-selectina puede soportar la captura y el rodamiento en ausencia de L-selectina. Aunque la P-selectina se identificó inicialmente en las plaquetas, también se encuentra en los cuerpos de Weibel-

Palade de los endotelios humanos. Tras la agresión tisular, la P-selectina es rápidamente expresada sobre la superficie del endotelio venular, al que le confiere cierta pegajosidad para los leucocitos. PSGL-1 se expresa constitutivamente sobre la superficie de los linfocitos, monocitos y neutrófilos, por lo que todas estas células ruedan sobre el endotelio. Durante el rodamiento, se forman ataduras entre el endotelio y el borde frontal del leucocito y se rompen las existentes entre la cola del leucocito y su soporte. Mientras tanto, las integrinas leucocitarias mantienen su estado de reposo y sus ligandos inmunoglobulínicos endoteliales mantienen sus niveles de control. Las selectinas de los tipos L y E toman también parte en el proceso de rodamiento. La L-selectina es menos eficaz que la P-selectina, pero en el proceso inflamatorio normal es necesaria para la captura e inicio del rodamiento. Por su parte, la E-selectina es responsable de las interacciones que dictan la transición hacia la etapa de rodamiento lento, que suceden a una velocidad inferior a $10 \mu\text{ms}^{-1}$ y, posiblemente, en la iniciación de la etapa de anclaje o de adhesión firme. La velocidad circulatoria de los leucocitos en el territorio venular es, aproximadamente, $120 \mu\text{m s}^{-1}$; y la velocidad de rodamiento en ese territorio es de, aproximadamente, $20\text{-}40 \mu\text{m s}^{-1}$ ⁵².

El rodamiento lento requiere la expresión de E-selectina sobre las células endoteliales y de integrinas CD18 sobre los leucocitos rodantes, y se ha denominado etapa de rodamiento lento o de frenado para distinguirla del rodamiento rápido que no exige la presencia de citoquinas. El tiempo de tránsito a través del lecho microvascular y, más específicamente, el tiempo de contacto durante el que el leucocito está en íntima relación con el endotelio, parece ser un parámetro clave en la consecución del éxito del proceso de reclutamiento que culmina con la adhesión firme o anclaje. El tiempo de tránsito del leucocito parece que se relaciona con las citoquinas presentes en la superficie endotelial y que son accesibles al leucocito mientras que está rodando. Los leucocitos rodantes son activados por los quimioattractores expuestos sobre la superficie endotelial y a través de señales incitadas por moléculas de adhesión. También es posible que la velocidad de rodamiento pueda tener un efecto independiente del tiempo de tránsito, porque acontecimientos secundarios de acoplamiento (por ej., mediados por $\beta 2$ integrinas) pueden ser incompetentes a menos que los leucocitos permanezcan cierto tiempo en una posición favorable para establecer contactos. Aunque el rodamiento lento hace mucho más eficiente el reclutamiento leucocitario no es estrictamente requerido, porque altas concentraciones de quimioattractores pueden detener leucocitos en rodamiento rápido.

Se piensa que la mayoría, si no todos, los leucocitos se adhieren únicamente tras haber rodado; la adhesión directa desde el pul de leucocitos en flujo libre es

excepcional. El factor principal, aunque no suficiente, lo representan las integrinas de la familia CD18, aunque otras integrinas pueden ser importantes para poner en marcha vías alternativas. La integrina más importante es la LFA-1, mientras que otro miembro de la familia, la integrina Mac-1, se requiere en los procesos de activación y de fagocitosis de los leucocitos. Los leucocitos en rodamiento lento no se detienen abruptamente, sino que frenan de manera gradual reduciendo progresivamente su velocidad hasta que se detienen y adhieren de manera estable. Esta desaceleración es estrictamente dependiente de integrinas CD18, aunque requieren ser activados, al menos parcialmente, antes de detenerse. Este proceso tiene lugar en, aproximadamente, un minuto, y, aunque se conoce que está involucrado el receptor IL-8, parece que señales iniciadas por receptores de adhesión también contribuyen a este proceso de reclutamiento leucocitario. Las integrinas CD18 leucocitarias, LFA-1 y Mac-1 pueden acoplarse a las inmunoglobulinas endoteliales ICAM-1 e ICAM-2. Una vez adherido, el leucocito migra a través de uniones interendoteliales si existe un gradiente exógeno de quimioattractores, siendo IL-8 y FP los más eficaces.

Las selectinas son una familia de moléculas transmembranares expresadas sobre la superficie de los leucocitos y de las células endoteliales activadas (**Figura 24**). Las selectinas contienen un dominio extracelular N-terminal con homología estructural con las lectinas dependientes de calcio; a continuación muestran un dominio homólogo al factor de crecimiento epidérmico y, luego, de dos a nueve repeticiones de consenso cuyas secuencias son similares a las encontradas en las proteínas reguladoras del sistema del complemento sérico. Cada uno de estos receptores de adhesión se insertan mediante un dominio hidrofóbico transmembranar que se prolonga mediante una corta cola que representa el extremo C-terminal, citoplasmático, de la molécula. El anclaje inicial de los leucocitos durante la inflamación es abordado por la familia selectina, que logra frenar el movimiento de los leucocitos, a lo largo del endotelio, mediante interacciones adhesivas transitorias y reversibles que, en conjunto, se denomina rodamiento leucocitario. Cada una de las tres selectinas —L, P y E— puede mediar en el rodamiento si se dan las condiciones apropiadas. La L-selectina es la más pequeña de las selectinas vasculares y se encuentra en la práctica totalidad de los leucocitos. La P-selectina es la mayor de la familia y se expresa en plaquetas y endoteliecitos activados. La E-selectina se expresa sobre células endoteliales activadas por citoquinas.

La más pequeña de las selectinas vasculares —L-selectina, LECAM-1, LAM-1, Mel-14, gp90^{mel} o Leu8/TQ-1)— es una molécula de 74-100 kDa que se expresa constitutivamente en los extremos de las microprotusiones (*microvillis*) de las

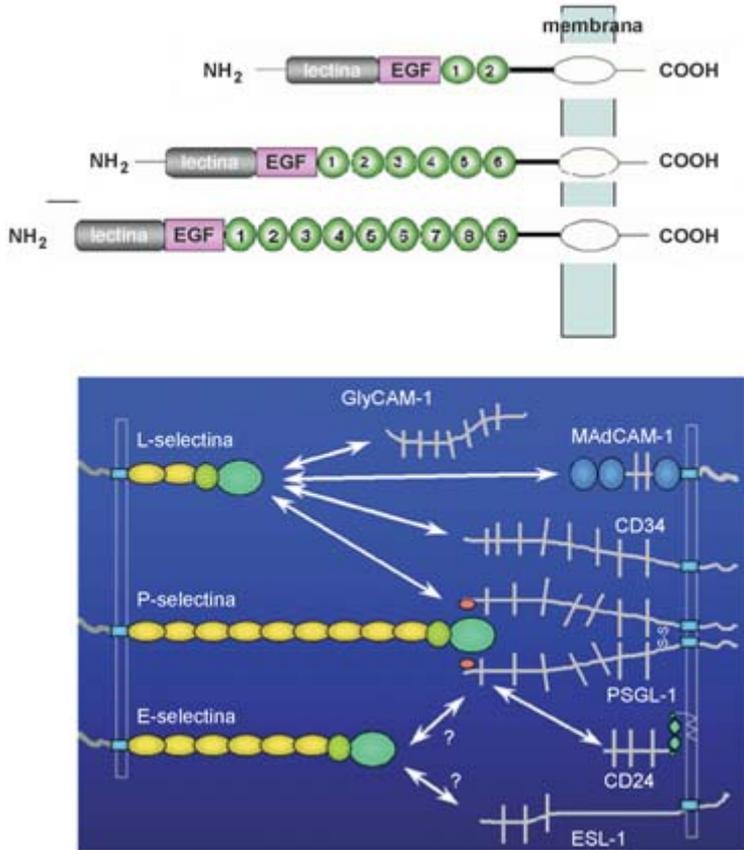


FIGURA 24. Las selectinas son una familia de moléculas transmembranares, expresadas sobre la superficie de los leucocitos y de las células endoteliales vasculares activadas. Las selectinas contienen un dominio N-terminal extracelular con homología estructural con las lectinas dependientes de calcio; luego, un dominio homólogo al factor de crecimiento epidérmico (EGF), seguido de dos a nueve dominios repetitivos, similares a secuencias encontradas en proteínas reguladoras del complemento. La selectina atraviesa la membrana mediante un dominio hidrofóbico, al que sigue el extremo C-terminal citosólico. El contacto inicial del leucocito con el endotelio activado se realiza a través de selectinas, lo que actúa a modo de freno; ello endentece la marcha del leucocito, lo que proporciona el tiempo suficiente para que se establezcan nuevos contactos, cada vez más eficaces aunque todavía reversibles y transitorios, que prácticamente detienen el leucocito sobre el endotelio. L-selectina, la más pequeña de la familia, se encuentra en la mayoría de los leucocitos. P-selectina, la mayor de las selectinas, se expresa sobre células endoteliales y plaquetas activadas. E-selectina se expresa sobre endotelio activado. Durante la respuesta inflamatoria, la adhesión de los leucocitos al endotelio está controlada por la interacción de selectinas vasculares a ligandos glicoproteicos complementarios, especialmente PSGL-1, que presentan estructuras oligosacáridas para los dominios lectina de las selectinas. Enlaces transitorios entre receptores (selectinas) y sus ligandos median los pasos iniciales de la cascada de adhesión. Modificada de: Kalus et al.⁵¹

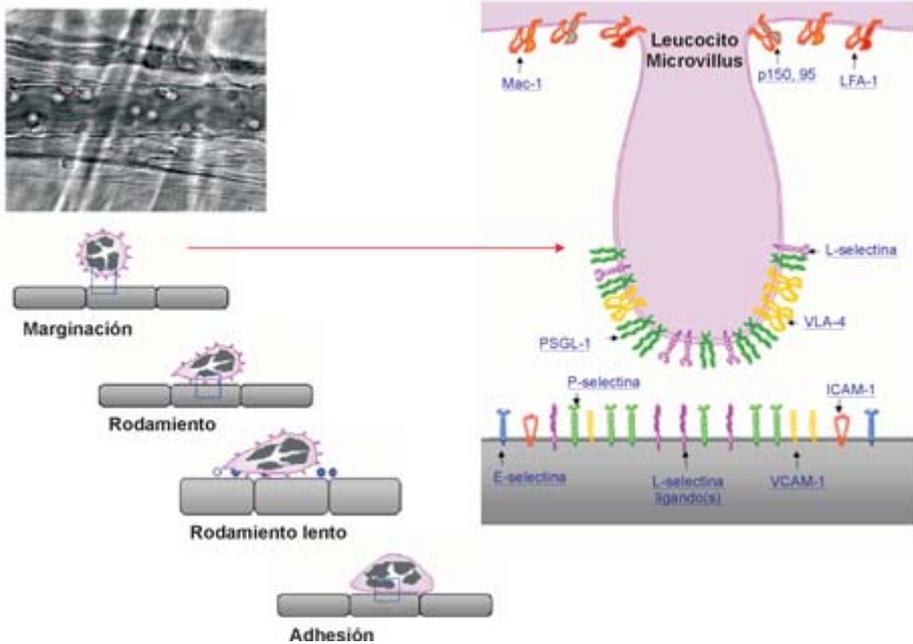


FIGURA 25. *Selectinas e integrinas se disponen estratégicamente sobre la superficie del leucocito. Aquellas moléculas que intervienen en las primeras fases de la cascada de adhesión —ligandos para P-selectina y E-selectina endoteliales; L-selectina leucocitaria que interaccionará con ligandos endoteliales, e integrina leucocitaria β_1 (VLA-4) que lo hará con ligandos endoteliales de la familia inmunoglobulínica— se sitúan en la cúspide de los microvilli de la membrana leucocitaria. Las moléculas que participan en las fases tardías —integrinas leucocitarias β_2 (Mac-1, p150-95 y LFA-1)— se ubican en los fondos de las interdigitaciones de los microvilli. Para que este segundo frente alcance sus dianas - ligandos inmunoglobulínicos (ICAM-1) sobre el endotelio, los actores iniciales deben ser desplazados; ello lo realizan citoquinas quimiotácticas, que destruyen las interacciones entre las selectinas y sus ligandos. Modificada de: Kalus et al.⁵¹*

membranas de los granulocitos, monocitos y linfocitos (**Figura 25**). La L-selectina juega un papel primordial en la captura de los leucocitos por el endotelio vascular en las fases iniciales de la cascada de adhesión. Tras la captura, la L-selectina es eliminada de la superficie de los leucocitos tras el estímulo quimioquínico. La L-selectina interactúa con tres contrarreceptores o ligandos: MAdCAM-1, GlyCAM-1 y CD34. La P-selectina es la mayor de las selectinas, con un peso molecular de 140 kDa. Contiene nueve repeticiones de consenso que extienden la molécula hasta 40 nm más allá de la superficie del endotelio. La P-selectina, también denominada CD62P, GMP-140, LECAM-3 y PADGEM, se expresa en los α -gránulos de las plaquetas activadas y en los gránulos de las células endoteliales. A los pocos minutos del estímulo de las células endoteliales por los mediadores inflamatorios como histamina o trombina, la P-selectina es expuesta en la superficie ce-

lular, teniendo una vida corta, aproximadamente diez minutos. IL-1 y TNF- α provocan una segunda respuesta biosintética *de novo* diferida, aproximadamente, dos horas. El ligando primario de la P-selectina es PSGL-1, que se encuentra constitutivamente en los leucocitos. Otros ligandos para la P-selectina son CD24 y otras moléculas no bien caracterizadas. Las interacciones transitorias entre la P-selectina y PSGL-1 permiten el rodamiento leucocitario a todo lo largo del endotelio venular. La P-selectina es responsable, en gran parte, de la fase de rodamiento de la cascada de adhesión leucocitaria. La P-selectina puede también mediar en la captura cuando no hay L-selectina. La E-selectina —ELAM-1, LECAM-2— se expresa sobre la superficie de las células endoteliales en respuesta a la acción de las citoquinas. Los ligandos para la E-selectina no se conocen bien, dudándose de que PSGL-1 y ESL-1 participen como tales, y ni siquiera está claro que el ligando sea una glicoproteína, pues algunos glicolípidos pueden asumir el rodamiento dependiente de E-selectina. Aunque las selectinas P y E tienen funciones redundantes, diversos estudios indican que la P-selectina es responsable del inicio del rodamiento, mientras que la E-selectina frena al leucocito y lo adhiere.

Durante la respuesta inflamatoria, la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales se controla merced al ligamiento de las selectinas vasculares a glicolípidos complementarios. La formación de ligaduras lábiles, transitorias, entre ambos participantes, median los pasos iniciales de la cascada de adhesión. Las tres selectinas pueden reconocer glicoproteínas y/o glicolípidos que contienen el tetrasacárido sialil-Lewis (sialil-CD14). Este tetrasacárido se encuentra en la superficie de todas las células mieloides circulantes y está compuesto por ácido siálico, galactosa, mucosa y N-acetil-galactosamina. No está claro como las selectinas logran interacciones específicas con sus ligandos, dado la estructura hidrocarbonada común. PSGL-1 y CD24 han sido caracterizados como posibles ligandos de la P-selectina. Para la L-selectina se han identificado cuatro posibles ligandos: GlyCAM-1, MAdCAM-1, CD34 y PSGL-1. Se desconocen ligandos específicos de la E-selectina. PSGL-1 es un homodímero formado por dos cadenas polipeptídicas de 120 kDa, constitutivamente expresado en todos los leucocitos y que se encuentra sobre las cimas de sus microvilli. PSGL-1 se liga a la P-selectina para garantizar la fase de rodamiento de la cascada de adhesión.

Las integrinas son una gran familia de glicoproteínas heterodiméricas transmembranares que ligan las células a las proteínas de la matriz extracelular de los basamentos membranares o a ligandos en otras células (**Figura 26**). Las integrinas contienen subunidades grande (α) y pequeña (β) de pesos moleculares de 120-170 kDa y 90-100 kDa, respectivamente. Algunas integrinas median el reconocimiento y las interacciones celulares directas. Las integrinas contienen sitios de acoplamiento

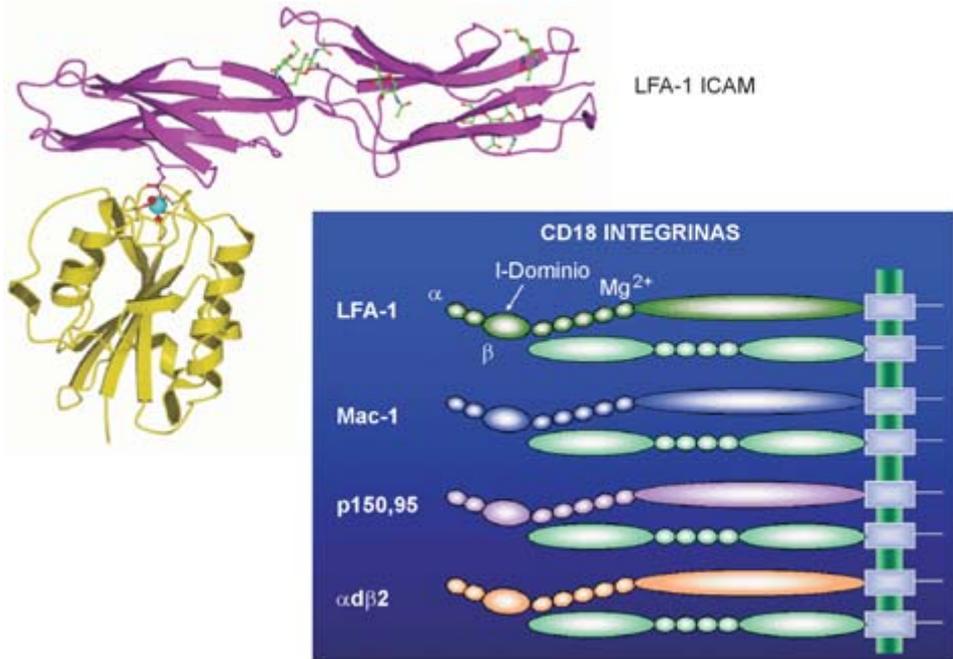


FIGURA 26. Las integrinas son una gran familia de glicoproteínas heterodiméricas transmembranares, que agarran las células a las proteínas de la matriz extracelular de los basamentos membranares o a ligandos sobre otras células. Las integrinas constan de una cadena mayor (α) y otra más pequeña (β). Las integrinas forman varias subfamilias que comparten una subunidad β común, que se asocia con diferentes cadenas α . Integrinas β_2 —Mac-1, p150-95 y LFA-1— se expresan, exclusivamente, sobre leucocitos. El miembro más importante de la subfamilia β_1 es VLA-4. Las integrinas interaccionan con ligandos de la superfamilia de las inmunoglobulinas. ICAM-1 es el principal ligando para las integrinas leucocitarias de la subfamilia β_2 , y VCAM-1 para la subfamilia β_1 . Modificada de: Kalus et al.⁵¹

para cationes divalentes (Mg^{2+} y Ca^{2+}) que son necesarios para su función adhesiva. Las integrinas de los mamíferos forman varias subfamilias que comparten subunidades β comunes que se asocian con diferentes subunidades α . Las integrinas del tipo β_2 se expresan exclusivamente sobre la superficie de los leucocitos, y sufren un cambio conformacional secundario a una fosforilación de la subunidad β tras la activación leucocítica por citoquinas. Las integrinas incluyen cuatro heterodímeros diferentes: la integrina β_2 predominante CD11a/CD18 (LFA-1) es crítica en la trans migración de los neutrófilos e importante en la trans migración de otros subtipos de leucocitos; CD11b/CD18 (Mac-1), exclusiva de granulocitos y de monocitos, comparte las funciones de LFA-1 y se almacena en gránulos específicos que son transportados a la superficie del granulocitos tras su activación por moléculas

quimioatrazadoras; CD11c/CD18 (p150,95) y CD11d/CD18. ICAM-1 (CD54), un miembro de la superfamilia inmunoglobulina de moléculas de adhesión, es el principal ligando de LFA-1 y de Mac-1. Una mutación en el gen que codifica la molécula β_2 -CD18 resulta en un trastorno genético: deficiencia en la adhesión leucocítica (LAD), en la que los pacientes padecen infecciones bacterianas recurrentes debido a la incapacidad para reclutar eficazmente granulocitos en el foco inflamatorio. El miembro más importante de la subfamilia de las integrinas β_1 en los leucocitos es VLA-4 (también denominado CD49d/CD29 y $\alpha_4\beta_1$). VLA-4 se acopla a su ligando VCAM-1, y es el principal responsable para la adhesión de los linfocitos al endotelio vascular y del reclutamiento de los leucocitos en el foco inflamatorio. VLA-4 se liga a fibronectina y a VCAM-1 (CD106), un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa en la superficie de las células endoteliales tras su activación citoquímica.

En resumen, los leucocitos neutrófilos, que han contactado con los edotelocitos a través del sistema de selectinas, son activados inicialmente por el TNF- α y los leucotrienos producidos por los mastocitos y por otros neutrófilos, lo que conduce a la liberación de pequeñas cantidades de elastasa. La elastasa desprende la cubierta antiadhesiva de leucosialina (CD43) que recubre los neutrófilos, lo que permite que sus integrinas se expongan y completen la adhesión y extravasación leucocitaria al formar puentes estables con las proteínas de la matriz extracelular (ECM). La señal binaria del engarce de las integrinas a la ECMs junto con el estímulo producido por el TNF- α y quimioquinas, induce la desgranulación y el estallido respiratorio masivo de los leucocitos, lo que resulta en la liberación de proteinasas —elastasa, catepsina G y proteasa—, proteínas antimicrobianas —BPIP, defensinas, serprocidinas y azuridina— y oxidantes —peróxido de hidrógeno, hipohaluros y cloraminas—. Los oxidantes activan metaloproteinasas de la matriz (MMPs) e inactivan los inhibidores de las proteasas, que provocan la destrucción tisular (**Figura 27**). Las MMPs activadas inducen la liberación de TNF por los macrófagos y por los monocitos atraídos desde la sangre al tejido por la azuridina liberada por los neutrófilos. El TNF y las quimioquinas liberadas por los macrófagos y monocitos atraen y activan más neutrófilos. Por otro lado, el TNF y las quimioquinas macrofágicas se combinan con prostaglandina E2 (PGE2) y defensinas liberadas por neutrófilos, para reclutar linfocitos; mientras que los leucotrienos ayudan a atrapar células dendríticas presentadoras de antígenos. Y los linfocitos, con la ayuda de productos bacterianos, mantienen y potencian la activación de los macrófagos que secretan proteasas, eicosanoides, citoquinas, especies reactivas de oxígeno y NO⁵³.

Existe un canon de la inmunología para la activación celular: las células B necesitan el emparejamiento receptor-antígeno más señales facilitadoras de las célu-

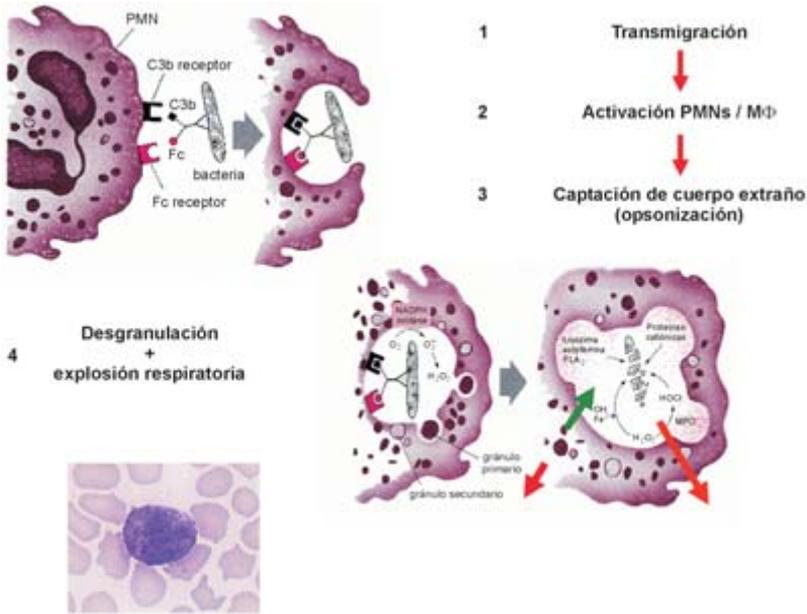


FIGURA 27. Los fagocitos activados engullen material extraño previamente opsonizado. Una vez formado el fago-lisosoma, el leucocito vierte en él productos fuertemente oxidantes —ROS—, péptidos microbicidas e hidrolasas, que destruyen al microorganismo en el confinamiento vacuolar. Sin embargo, tales productos, en principio defensivos, pueden escapar al medio extracelular prociendo autolesiones.

las T; las células T necesitan el emparejamiento receptor-antígeno más señales facilitadas de las células presentadoras de antígenos (APCs), y las APCs, incluidos los macrófagos, necesitan citoquinas más productos microbianos o citoquinas más ligamiento de CD14 o productos microbianos más productos de las células huésped necróticas. La cadena de señales comienza con la activación de mastocitos y neutrófilos, y su activación mantenida condiciona la activación de APCs, células T y células B en el proceso de transición durante el que la respuesta inflamatoria innata evoluciona a respuesta inmunológica adaptativa. La combinación de daño celular e infección mantiene la respuesta inflamatoria que provoca la aparición en escena de la inmunidad adaptativa ⁵⁴.

IIe. La respuesta del organismo

La respuesta de fase aguda (APR) ⁵⁵ se refiere a una amplia serie de acontecimientos fisiológicos, que se inician inmediatamente después de que haya tenido

lugar una infección o cualquier otro tipo de agresión al organismo. La APR se caracteriza por fiebre, cambios en la permeabilidad vascular y cambios en los perfiles metabólicos de varios órganos. La respuesta se inicia y coordina por diversos mediadores inflamatorios, especialmente citoquinas, y hormonas, fundamentalmente glucocorticoides. Las primeras son liberadas precozmente desde el foco inflamatorio por fagocitos mononucleares, linfocitos y otros tipos células diferenciados activadas, y tienen potentes efectos locales y sistémicos. La cascada de mediadores induce la activación, proliferación, cambios del comportamiento y cambios metabólicos de una serie de células y de tejidos. Todo ello con el objetivo de neutralizar el agente agresor, controlar el proceso inflamatorio y promover el proceso de reparación y, así, iniciar el retorno a la normalidad fisiológica. Es importante considerar la inflamación y la consiguiente respuesta de fase aguda como un proceso homeostático dinámico que involucra a todos los principales sistemas del organismo a parte de los sistemas inmunológico, cardiovascular y nervioso central (CNS). Normalmente, la APR perdura no más allá de unos pocos días; sin embargo, en casos de inflamación recurrente o crónica, la permanencia aberrante de algunos de los ingredientes de la APR contribuye a erosionar el tejido conduciendo, a la larga, al establecimiento de una patología definida en un determinado tejido, como arteriosclerosis o patologías secundarias a amiloidosis reactiva como en algunas enfermedades neurodegenerativas ⁵⁶.

Un aspecto importante de la APR es que altera radicalmente el perfil biosintético hepático. En condiciones normales el hígado produce, de manera estable, un espectro característico de proteínas plasmáticas. Muchas de ellas tienen importantes funciones, requiriéndose elevadas concentraciones de tales proteínas ante situaciones de un estímulo inflamatorio. Aunque la mayoría de las proteínas o reactantes de fase aguda son sintetizadas por los hepatocitos, algunas de ellas lo son por otros tipos celulares, que incluyen monocitos, células endoteliales, fibroblastos y adipositos. Se denominan proteínas negativas de fase aguda aquellas cuya concentración plasmática decrece durante la APR; ello para incrementar la capacidad hepática para sintetizar proteínas inducidas de fase aguda.

De los muchos factores solubles que inician y mantienen una respuesta inflamatoria, varios de ellos regulan específicamente la transcripción de proteínas APR. Entre aquellos: IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α , factor inhibidor leucémico (LIF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor neurotrópico ciliar (CNTF), interferón γ (IFN- γ), oncostatina M, ácido retinoico o glucocorticoides, como factores positivos, y ácido okadaico o insulina, como factores negativos. Un hecho importante de la APR es que IL-1 y TNF- α estimulan, vía CNS, la síntesis de glucocorticoides por las glándulas suprarrenales; lo que resulta en una potenciación

cooperativa con IL-1 y TNF- α , al estimular los glucocorticoides la síntesis de proteínas APR por el hígado. Este efecto es coincidente con la atenuación de la síntesis de IL-1 por los macrófagos, creándose un mecanismo de retroalimentación entre el sistema inmunológico y el CNS para reducir la síntesis *de novo* de citoquinas proinflamatorias. La expresión de los genes APR está regulada por factores nucleares (NFs) de transcripción: NF- κ B, C/EBP β , AP-1 y factor APR, así como por el receptor de glucocorticoides y factores de transcripción hepatoespecíficos como los factores nucleares hepatocíticos (HNFs). Existe, además, una regulación post transcripcional: acortamiento de la vida media de los mARNs de ApoAI y de albúmina mediada por TGF- β ⁵⁷, en el caso de las proteínas APR negativas, y una estabilización de los mARNs de las proteínas APR inducidas por citoquinas y glucocorticoides.

Las proteínas APR desempeñan un amplio abanico de actividades que contribuyen a la defensa del huésped: neutralizan a los agentes inflamatorios, ayudan a minimizar la extensión del daño tisular y participan en la reparación y regeneración tisular. El incremento en la concentración plasmática de muchos de los componentes del sistema del complemento sérico y su posterior activación son esenciales para la acumulación local de fagocitos y de proteínas plasmáticas, y participan en la destrucción de los agentes infecciosos, en la eliminación de cuerpos extraños y de restos celulares, y en la reparación del tejido lesionado⁵⁸. Los componentes del sistema de la coagulación, como el fibrinógeno, juegan un papel esencial en la promoción de la cicatrización. Los inhibidores de las proteinasas neutralizan a las hidrolasas lisosómicas liberadas tras la infiltración de monocitos y de neutrófilos activados, controlando así la cascada proinflamatoria dependiente de hidrolasas. Proteínas acopladoras de metales quelan el hierro perdido durante la inflamación impidiendo su captación por las bacterias, y actúan como exclusas de radicales libres de oxígeno. En general, las proteínas APR son inducidas entre el 50% y varias veces sus niveles normales, pero las denominadas proteínas APR principales multiplican x1000 su producción. Este grupo incluye el componente amiloide sérico A (SAA), y proteína C reactiva (CRP) en humanos o su homólogo componente amiloide sérico P (SAP) en el ratón.

Las proteínas APR principales en los mamíferos incluyen SAA y CRP o SAP, dependiendo de la especie animal. CRP y SAP son pentraxinas, proteínas con una organización homopentamérica característica. Generalmente solo una de esas proteínas es una proteína APR en una especie determinada: en humanos la concentración plasmática de SAP, en condiciones normales es, aproximadamente, 30 μ g ml⁻¹, sin que se modifique en situaciones inflamatorias; no es, por

tanto, una proteína APR en humanos. Por el contrario, la concentración sérica de CRP ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) puede incrementar más de mil veces en situaciones inflamatorias y dependiendo de la gravedad del cuadro; un comportamiento que la identifica como una verdadera proteína APR en humanos. La inducción específica de especie de CRP o de SAP durante la APR, sugiere que la exigencia de una pentraxina debe tener responder a alguna actividad fisiológica común, tal vez su capacidad de acoplarse a la cromatina. La proteína C-reactiva, que debe su nombre a su capacidad de ligar el polisacárido C del *Pneumococcus*, presenta una estructura anular (donuts) pentamérica y actúa como una opsonina para las bacterias, parásitos y complejos inmunológicos, y puede activar la vía clásica del complemento sérico; también puede modular el comportamiento de neutrófilos, monocitos y plaquetas; además, se une a histonas y a pequeñas partículas de ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs). SAP, que presenta una estructura similar a un par de donuts apilados, es la forma circulante del componente amiloide P, que es un componente de todos los depósitos amiloides. Es un componente normal de los basamentos membranares y comparte las funciones de la CRP. IL-6 sola o en combinación con IL- β provoca un incremento significativo e inmediato de mRNA-CRP en hepatocitos humanos en cultivo.

SAA es el nombre colectivo dado a una familia de proteínas polimórficas codificadas por multitud de genes en diversas especies de mamíferos. Las SAAs son pequeñas apolipoproteínas que se asocian rápidamente durante la APR con lipoproteínas de densidad elevada (HDL3). Aunque no está bien establecida la significación funcional de la asociación entre SAA y HDL3, el desplazamiento o reemplazamiento de la ApoAI por SAA puede interferir el metabolismo del colesterol. SAA puede representar una señal por la que HDL3 se reconduce hacia los macrófagos en vez de a los hepatocitos (la señal prohepatocítica sería ApoAI), lo que favorecería el engullamiento y retirada de restos lipídicos procedentes de células dañadas en el proceso inflamatorio. Aunque no está bien comprendido su papel en la APR, el SAA inhibe la fiebre y la síntesis de PGE2 en el hipotálamo, inducidas por IL- β y TNF- α ; también inhibe la activación de las plaquetas inducida por trombina y la explosión respiratoria de los fagocitos activados. Por otro lado, la presencia mantenida de las proteínas APR causada por un proceso inflamatorio crónico puede acarrear consecuencias desastrosas: los depósitos amiloides que se acumulan en bazo, riñón o hígado —amiloidosis reactiva o secundaria—, producidos en enfermedades crónicas o recurrentes como tuberculosis, lupus eritematoso o artritis reumatoide, están compuestos, principalmente, de amiloide A derivado, probablemente por proteólisis, del precursor SSA. El componente amiloide P, derivado de SAP, está asociado con placas de amiloide A y otras formas de depósitos amiloides, incluidas las presen-

tes en la enfermedad de Alzheimer. Y la asociación de SSA con HDL3 sugiere la participación de las proteínas APR en la arteriosclerosis.

Otra proteína APR es la fosfolipasa A₂ (PLA₂). PLA₂ hidroliza fosfolípidos generando ácido araquidónico, y cataliza el paso limitante en la formación de eicosanoides. En humanos se han identificado diferentes formas de PLA₂: varias formas citosólicas, y dos formas secretadas (PLA₂ soluble: sPLA₂), los tipos I secretado por el páncreas y II producido por diferentes tipos celulares, especialmente los hepatocitos. La forma soluble hepática es estimulada por IL-1β, IL-6 y TNF-α.

Los fosfolípidos (PLs) están asimétricamente distribuidos entre las láminas interna y externa de las membranas biológicas: la lámina externa contiene primariamente esfingomielina (SM) y fosfatidilcolina (PC), mientras que la lámina interna incluye fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE). El mantenimiento de esta asimetría es dependiente de energía y requiere adenosina trifosfato (ATP). En ausencia de ATP, se produce un intercambio entre los fosfolípidos de las láminas interna y externa («flip-flop»). La PLA₂ pancreática, estrechamente relacionada con la sPLA₂ II en términos de estructura y de función, es capaz de hidrolizar los PLs de la lámina interna pero no los de la externa; por su parte, la sPLA₂ II es capaz de interactuar con los PLs situados en la lámina externa cuando la membrana está sometida al fenómeno de flip-flop. Es posible que esta capacidad de la sPLA₂ II de discernir entre membranas normales y membranas con flip-flop sea aprovechado por proteínas APR para atacar células dañadas. Tras la interacción con sPLA₂ II, las células incrementan el contenido de liso-PLs (PLs que han perdido un ácido graso), especialmente liso-PC, en la lámina membrana externa. Esta modificación, junto con la presencia de PS y de PE, distorsiona el empaquetamiento de los PLs en la estructura membrana externa y expone sitios, hasta entonces crípticos, que permiten el atracamiento de la CRP sobre la superficie externa de la membrana celular. Una vez anclada la CRP induce, a través de la vía clásica, la activación del complemento que, a su vez, potencia el influjo de fagocitos al foco inflamatorio (por generar C5a) y favorece la fagocitosis de las células que incorporan sobre su superficie CRP y complemento⁵⁹ (**Figura 28**).

CRP y sPLA₂ han permanecido muy conservadas durante la evolución de los vertebrados y pueden actuar conjuntamente para favorecer la fagocitosis de células comprometidas metabólicamente. Presumiblemente, este mecanismo ha evolucionado para retirar células isquémicas y detritus tisulares de las heridas a efectos de permitir una rápida reparación del tejido lesionado. Sin embargo, la inhibición de la activación del complemento parece que reduce la necrosis tisular,

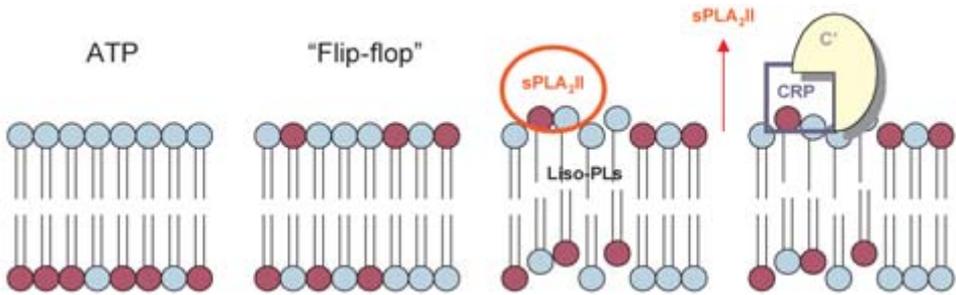


FIGURA 28. Papel hipotético de la fosfolipasa A₂ secretada tipo II (sPLA₂) y de la proteína C reactiva (CRP) en la promoción de la fagocitosis de las células lesionadas durante la fase inicial del proceso inflamatorio. (a) Fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE), ambas mostradas en color, solo se localizan en la lámina interna de la bicapa fosfolipídica que conforma la membrana celular; tal asimetría es un proceso dependiente de energía que consume ATP. (b) Los fosfolípidos (PLs) de las membranas dañadas pierden dicha simetría (flip-flop) como consecuencia de la baja concentración de ATP intracelular. (c) Las membranas flip-flopeadas, pero no las membranas normales, son susceptibles a la hidrólisis por sPLA₂, que genera lisofosfolípidos (LPLs) en la membrana externa. (d) La presencia de LPLs en tal localización crea lugares de acoplamiento para la CRP, que activa, sobre la superficie celular y a través de la vía clásica, al complemento (C'). Modificada de: Hack et al.⁵⁵; fig. 1, pág. 112).

por ejemplo tras un infarto del miocardio. Es posible que la acción combinada de sPLA₂, CPR, complemento y fagocitosis, en los tejidos dañados, no haya conseguido la suficiente fineza para discriminar entre células dañadas reversible o irreversiblemente. Por ello, las correlaciones clínicas entre la activación de sPLA₂, CPR y complemento e IL6, observadas en varias enfermedades incluidas la sepsis, artritis o infarto del miocardio, pueden reflejar un mecanismo patogénico de base que contribuye a la inflamación y, a la postre, al daño tisular. Con todo, un número de proteínas APR son capaces de inhibir la acción de los anteriores actores. Además, componentes destacados de la APR son proteínas microbicidas⁶⁰.

Durante la situación de sepsis se produce una marcada elevación de adreno-medulina (AM) en el plasma de los pacientes. AM se produce como prohormona cuyo procesamiento origina dos péptidos: AM y PAMP. AM comparte homología con con CGRP y amilina, y circula preferentemente vehiculado por una proteína (AMBP-1) identificada como el factor H del sistema del complemento, un inhibidor de las vías clásica y alternativa de la cascada del complemento. AM y PAMP inducen la producción de MIF y de IL-6, dos factores moduladores, y deprimen la expresión de TNF- α , pro-inflamatorio; por otro lado, son potentes moléculas antimicrobianas, cuyo precursor, producido en epitelios, mucosas y neutrófilos, está bajo control de IL-1 y activación de NF- κ B. AM comparte la capacidad microbicida los péptidos antibióticos de los eucariotes superiores.

La diversidad de péptidos antimicrobianos descubiertos es tan grande —cerca de 500—, que es difícil categorizarlos excepto sobre la base de sus estructuras secundarias. El principio estructural primario es la capacidad de la molécula para adoptar una forma en la que grupos de aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos se organicen espacialmente en sectores discretos de la molécula (diseño anfipático). Para actuar aprovechan el talón de Aquiles de las membranas procarióticas. Las membranas de las bacterias se organizan de tal manera que la zona más externa de la bicapa, la superficie expuesta al medio ambiente, está ampliamente poblada de lípidos con cabezas fosfolipídicas polares (cargadas negativamente). Por el contrario, la lámina externa de los eucariotes está compuesta, principalmente, de lípidos sin carga neta (en los mamíferos, colesterol); la práctica totalidad de las cabezas polares se congregan en la lámina interna, cara al citoplasma. El modelo que explica la acción de la mayoría de los péptidos antimicrobianos es el de Shai-Matsuzaki-Huang ⁶¹ (SMH, o modelo de envoltura —las moléculas peptídicas acaban por envolver y «asfixiar» al microorganismo— y/o poro tipo donut —las moléculas perforan la pared bacteriana—), que presupone la interacción del péptido con la membrana, seguido del desplazamiento de los lípidos membranares, alteración de la estructura membranar y, en ciertos casos, entrada del péptido en el interior celular. En general, los péptidos que operan según el modelo SMH destruyen microbios a concentraciones micromolares. Epitelios, mucosas y fagocitos humanos producen defensinas tanto constitutivamente como inducidas por citoquinas, y como otros péptidos microbicidas no inducen resistencia bacteriana, son poderosos adyuvantes y solapan acciones con las citoquinas.

IIf. Autorregulación del proceso

Poco después de iniciarse los ciclos proinflamatorios descritos, se accionan una serie de frenos en los que las lipoxigenasas son piezas importantes. El araquidonato liberado de los neutrófilos sirve de sustrato a la 5-lipoxigenasa de los propios neutrófilos para generar el proinflamatorio leucotrieno B₄. Sin embargo, cuando los neutrófilos infiltran los tejidos, también ceden araquidonato a estos, donde las células expresan 15-lipoxigenasa. La 15-lipoxigenasa produce lipoxinas a partir del araquidonato. Las lipoxinas son una clase de eicosanoides oxidados que se acoplan a receptores cuya señal bloquea el influjo de neutrófilos. Los neutrófilos también pasan a otras células un metabolito intermedio de la 5-lipoxigenasa: leucotrieno A₄, al que la 15-lipoxigenasa convierte también en lipoxina. De esta manera interacciones intercelulares favorecen una transición en el perfil de los productos del araquidonato: desde los proinflamatorios leucotrienos a los derivados antiinflamatorios de la clase ciclopentanonas (CyPGs: PGF_{2g}, PGA₁ y PGD₂), que inhiben la actividad, no la producción, de los factores de transcripción AP-1, STAT y NF-κB, y a las lipoxinas (**Figura 29**). Por su parte,

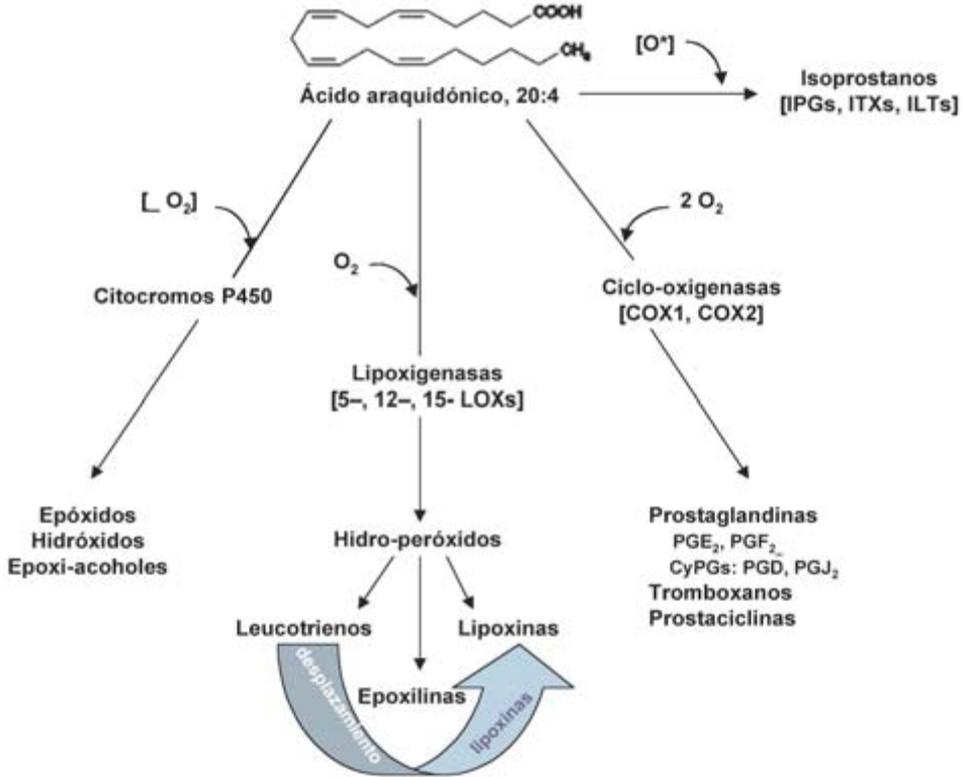


FIGURA 29. Las prostaglandinas (PGs) son pequeñas moléculas lipídicas que regulan numerosos procesos orgánicos. La producción de PGs comienza con la liberación de ácido araquidónico o eicosanoico de los fosfolípidos (PLs) de las membranas celulares, por acción de la fosfolipasa A₂ en respuesta a estímulos inflamatorios. El ácido araquidónico es convertido a PGH₂ por las enzimas ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 (sintasa de prostaglandina-endoperóxido H). Se considera que COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos y actúa para mantener procesos homeostáticos (ej. secreción de moco o función renal). COX-2, por el contrario, es una enzima inducible y está involucrada, primariamente, en la regulación de la inflamación. Está en discusión una tercera forma (COX-3). La vía COX₂ da lugar a prostaglandinas, tromboxanos y prostacilinas. Prostacilinas y derivados ciclopentanona-PGs (cyPGs) —PGD₂ y su metabolito PGJ₂— son eficaces antiinflamatorios, mientras que las PGs clásicas —PGE₂ y PGF_{2α}— y tromboxanos son pro-inflamatorias. El ácido araquidónico puede ser metabolizado a través de otras dos vías enzimáticas: lipoxigenasas dan lugar a los hidroperóxidos leucotrienos y lipoxinas; y citocromo P450 forma derivados epóxidos. Mientras que los leucotrienos son potentes pro-inflamatorios, las lipoxinas frenan el proceso inflamatorio. Durante el desarrollo del proceso inflamatorio se produce un desplazamiento hacia lipoxinas; ello mediante la reorientación del metabolismo hidroperóxido hacia intereses antiinflamatorios bajo la dirección de los productos de la vía COX. Existe una cuarta vía metabólica del ácido araquidónico, no enzimática, dependiente de la producción de radicales libres de oxígeno [O*] por los fagocitos activados, que da lugar a isoprostanos.

fosfolípidos de las membranas de las células endoteliales vasculares, oxidados por los ROS producidos tras la activación de los fagocitos, atemperan la expresión de moléculas de adhesión ⁶².

A la vez, productos microbianos y citoquinas inducen la producción de ciclooxigenasa 2 (COX2) por los macrófagos ⁶³. COX2 convierte araquidonato a prostaglandina E2 (PGE2), que incrementa la permeabilidad vascular y, con ello, el escape del líquido intravascular hacia el intersticio tisular (edema). Sin embargo, cuando la concentración local de PGE2 incrementa consigue un efecto inhibitorio de la COX2 y de la 5-lipoxigenasa, a la vez que induce la expresión de 15-lipoxigenasa en los neutrófilos. Tal efecto, diferido, desplaza el metabolismo del araquidonato hacia la formación de lipoxinas en los propios neutrófilos. De esta manera, tras varias horas de acciones la señal proinflamatoria inicial de la PGE2 se torna en una señal antiinflamatoria ⁶⁴.

Después del potasio, ATP es la molécula intracelular más abundante. Se conocen bien sus funciones como fuente de energía, como cofactor y como sustrato de un vasto número de reacciones, incluso de su papel como neurotransmisor. Por su parte, ADP, AMP y adenosina, subproductos del metabolismo de ATP, también muestran una serie de efectos bioquímicos y fisiológicos, primariamente como mensajeros intercelulares. La adenosina puede generarse a partir de nucleótidos de adenina, bien intracelularmente como producto de la desfosforilización de AMP, o en el medio extracelular como resultado de la desfosforilización de AMP por ectonucleotidasa. Ratones privados de ectonucleotidasa CD39 hiperreaccionan a diferentes agresiones cutáneas, y los que carecen de receptores purinérgicos A2a sucumben a dosis subletales de microbios. Tales observaciones sugieren que CD39 degrada ATP extracelular y ADP secretado por células activadas o liberado desde células dañadas, generando adenosina, que actúa suprimiendo la respuesta inflamatoria de las células vecinas ⁶⁵.

Mecanismos contrarreguladores, evolutivamente muy conservados, limitan normalmente la respuesta inflamatoria aguda y previenen la difusión de los mediadores inflamatorios al torrente circulatorio. Células inmunocompetentes activadas liberan receptores truncados —receptores solubles de TNF, sTNFR— que captan TNF libre circulante y neutralizan sus acciones proinflamatorias y potencialmente tóxicas. Otros factores contrarreceptores son el antagonista del receptor de IL-1 y el receptor señuelo IL-1R tipo 2. Por su parte, se producen inactivados del complemento sérico y citoquinas antiinflamatorias, como la prototípica IL-10 y el factor transformante del crecimiento- β (TGF- β), que inhiben específicamente la liberación de TNF y de otros mediadores proinflamatorios. Glucocorticoides adrenales, adrenalina, hormona estimulante melanocítica- α (α -MSH)

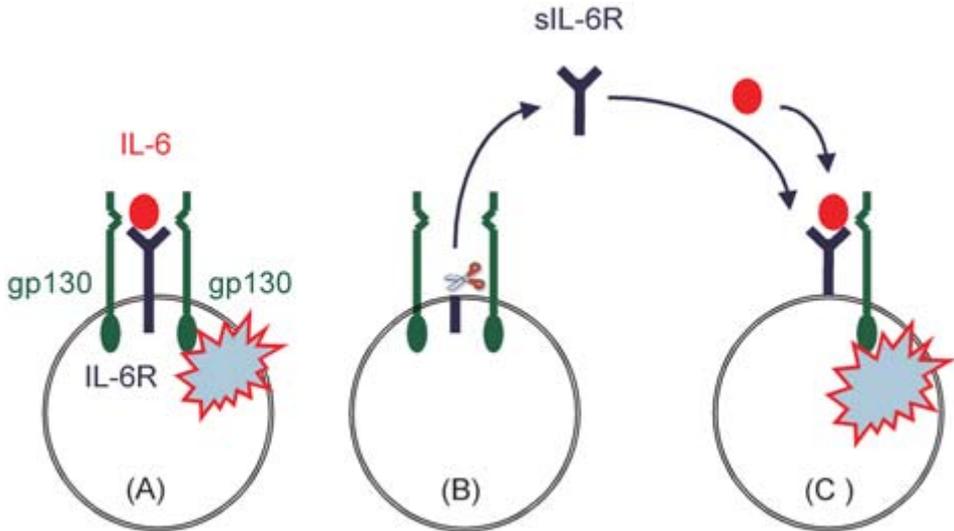


FIGURA 30. *Trans-señalización. Vía clásica de interacción IL-6/IL-6R/gp130, y generación de sIL-6R que, tras acoplarse con su ligando, activa células que solo expresan una cadena gp130. Modificada de: Rose-John et al.⁶⁷; fig. 1, pág. 228.*

y otras clásicas hormonas de estrés (ej. espermina) inhiben la síntesis de citoquinas; ello, dentro de las interacciones o interfaz inmunoneuroendocrina ⁶⁶.

Las citoquinas de la familia IL-6 actúan vía de complejos receptores que contienen, al menos, una subunidad de la proteína de transducción de señales gp130. La familia comprende IL-6, IL-11, CNTF, cardiotrofina-1 (CT-1), factor inhibidor de leucemia (LIF), neuropoyetina (NPN), oncostatina M (OSM), IL-27 e IL-31. Sobre las células diana, IL-6 se asocia con un dímero de gp130 e, inmediatamente, se inicia la cascada de señales intracelulares (**Figura 30**). Gp130 se expresa en prácticamente todas las células del organismo; sin embargo, IL-6R se expresa principalmente en hepatocitos —induce la señal APR—, neutrófilos, monocitos/macrófagos y algunos linfocitos. Además existe una forma soluble de IL-6R (sIL-6R) que se produce por dos mecanismos: procesamiento alternativo del mRNA correspondiente, o por proteólisis parcial del IL-6R transmembranar. Lo interesante de sIL-6R es que es capaz, unido con su ligando IL-6, de estimular células que sólo expresan gp130; un proceso denominado trans-señalización. IL-6 desempeña una serie de actividades que son críticas para resolver la inmunidad innata y/o promover la adquirida. La transición entre inmunidad innata y adquirida es un acontecimiento central en la resolución de cualquier situación inflamatoria, y la alteración de la capacidad reguladora de la IL-6 puede distorsionar la respuesta

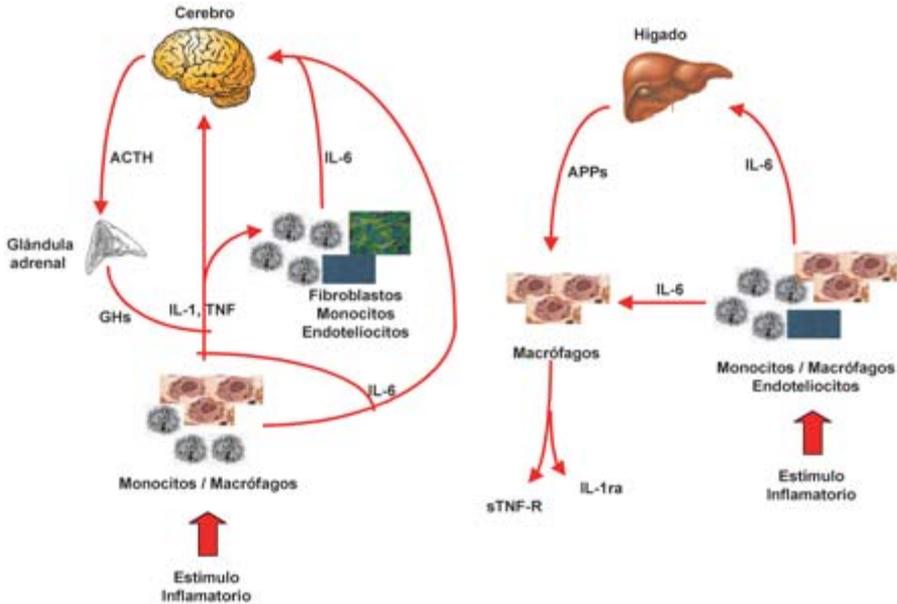


FIGURA 31. Descripción de los lazos de retroalimentación negativa que pueden operar durante la inflamación. (a) Citoquinas (IL-1 y TNF) producidas por monocitos/macrófagos activados estimulan el cerebro, que responde produciendo ACTH que, subsiguientemente, induce la liberación de glucocorticoides (GCHs) desde la glándula adrenal. GCHs e IL-6 suprimen la producción de IL-1 y de TNF. (b) Citoquinas producidas por macrófagos y otras células activadas, inducen la síntesis hepática de proteínas APR (APPs). Las APPs, en cooperación con IL-6, inducen la producción de antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) y la liberación, por siega de la secuencia epimembranar, de receptores de TNF solubles (sTNF-R). IL-1ra y sTNF-R bloquean el efecto de los respectivos ligandos.

inmune y condicionar el comienzo de trastornos crónicos o autoinmunes. La IL-6, a través de su capacidad de transeñalización, orquesta el reclutamiento leucocitario, su activación y su eliminación apoptótica, y a la vez, mediante la regulación de la secreción de citoquinas, abre el camino a la fase inmunoadquirida⁶⁷.

Por otro lado, la inflamación en los tejidos periféricos altera la señalización neuronal en el hipotálamo, habiéndose identificado bases moleculares comunes para la comunicación en neuronas y en células inmunocompetentes. Por ej., las neuronas cerebrales pueden sintetizar y expresar TNF e IL-1, y esas citoquinas pueden participar en la comunicación neuronal. Esta comunicación es bidireccional, porque las citoquinas pueden inducir la liberación de glucocorticoides y, a su vez, los glucocorticoides suprimen la síntesis continuada de citoquinas. A su vez, las células inmunocompetentes pueden producir neuropéptidos, acetilcolina y otros neurotransmisores (**Figura 31**).

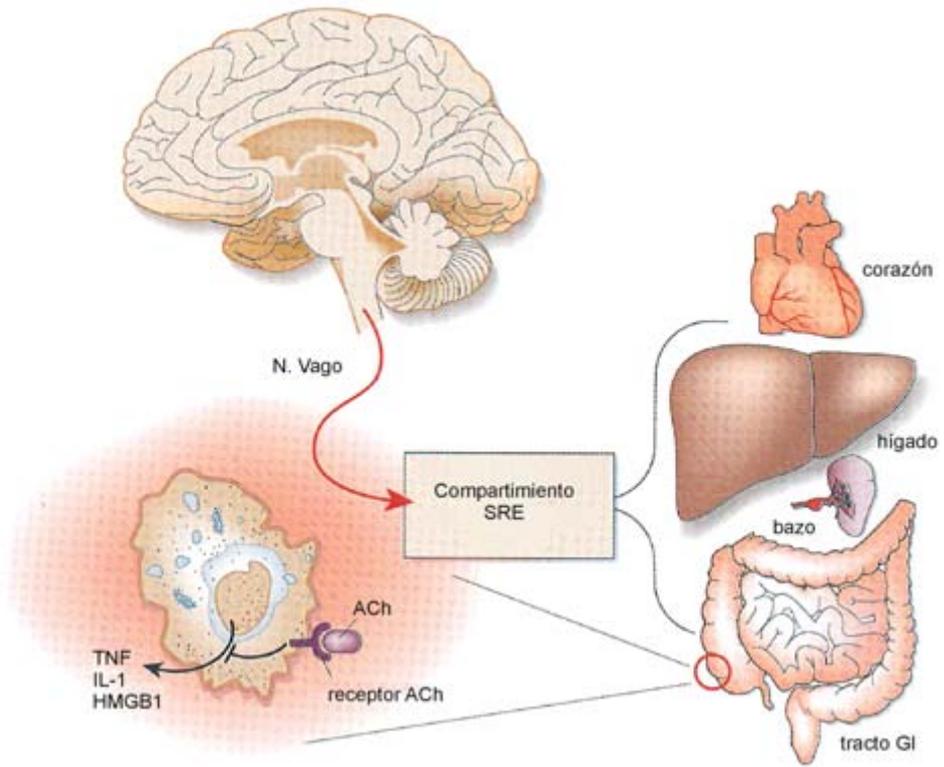


FIGURA 32. La vía antiinflamatoria colinérgica. La activación eferente en el nervio vago conduce a la liberación de acetilcolina (ACh) en el tejido reticuloendotelial, que incluye hígado, corazón, bazo y tracto gastrointestinal. ACh interactúa con receptores nicotínicos sensibles a α -bungarotoxina sobre los macrófagos; interacción que inhibe la liberación de TNF- α , IL-1 HMGB1 y otras citoquinas. Modificada de: Tracey ⁶⁸; fig. 1, pág. 855.

La mejor comprensión de los mecanismos básicos que regulan la inflamación ha permitido identificar un mecanismo neural que inhibe la activación de los macrófagos a través de la señal parasimpática. Se denomina vía o «reflejo antiinflamatorio colinérgico» ⁶⁸; ello porque la acetilcolina, principal neurotransmisor parasimpático, desactiva a los macrófagos a ella expuestos (**Figura 32**). El nervio vago inerva los principales órganos, incluyendo aquellos que albergan al sistema reticuloendotelial (hígado, pulmones, bazo, riñones e intestino). La activación experimental de la vía anti-inflamatoria colinérgica, mediante la estimulación eléctrica directa de las fibras vagales eferentes, inhibe la producción de TNF en hígado, bazo y corazón, y atenúa la concentración séri-

ca de TNF durante la endotoxemia. Por su parte, la vagotomía exagera la respuesta del TNF al estímulo inflamatorio y sensibiliza a los efectos letales de la endotoxina. El encaje entre el sistema nervioso colinérgico y el sistema inmunológico innato es un receptor presente en la superficie de los macrófagos: receptor nicotínico de acetilcolina sensible a la α -bungarotoxina. La exposición de macrófagos humanos, pero no de monocitos circulantes, a nicotina o a acetilcolina inhibe la liberación de TNF, IL-1 e IL-18 en respuesta a endotoxina. Los macrófagos tisulares, pero no los monocitos circulantes, producen la mayoría del TNF que aparece en la circulación sistémica durante una respuesta inflamatoria excesiva. La interacción entre el receptor colinérgico en los macrófagos y su ligando, inhibe la síntesis de citoquinas proinflamatorias (TNF, IL-1 e IL-18), pero no las citoquinas antiinflamatorias (IL-10) (**Figura 33**). La acetilcolina inhibe la expresión de la proteína TNF en macrófagos, pero no la producción del mRNA correspondiente, lo que indica que la activación del receptor colinérgico transduce señales intracelulares que inhiben la síntesis de citoquinas en un estadio postranscripcional. Desde una perspectiva simple existen razones por las que una vía antiinflamatoria con base neural es ventajosa. La trama antiinflamatoria difusible, que incluye glucocorticoides, citoquinas antiinflamatorias y otros mediadores humorales es lenta, difusa, no integrada y dependiente de gradientes de concentración. Por el contrario, el reflejo antiinflamatorio colinérgico es discreto y localizado en los tejidos donde la invasión y la lesión se produjeron (**Figura 34**).

El sistema nervioso central recibe señales sensoriales desde el sistema inmunológico a través de rutas humorales y neurales. El sistema inmunológico funciona como un sexto sentido que detecta la invasión microbiana y produce moléculas que trasladan esta información al cerebro. TNF y otros mediadores inmunológicos pueden acceder a los centros cerebrales carentes de la barrera hematoencefálica, lo que ocurre en la región circunventricular cerebral. Esta ruta humoral de comunicación entre los sistema inmunológico y nervioso ha sido involucrada en el desarrollo de la fiebre, de la anorexia y de la activación de la respuesta hipotálamo-hipofisaria a la infección y al estrés. La liberación de citoquinas en el foco inflamatorio activa fibras sensitivas que ascienden en el vago hasta sinapsar en el núcleo del tracto solitario, y un incremento de las señales vagales eferentes suprime, como se ha indicado, la liberación de citoquinas en la periferia a través de la vía antiinflamatoria colinérgica que activa receptores nicotínicos en los macrófagos.

El reflejo antiinflamatorio se describe como localizado, rápido y discreto; pero puede igualmente inducir respuestas antiinflamatorias humorales sistémicas. Ello ocurre porque la activación del nervio vago puede ser transferida a la formación reticular medular, al locus caeruleus y al hipotálamo, lo que conduce a una libera-

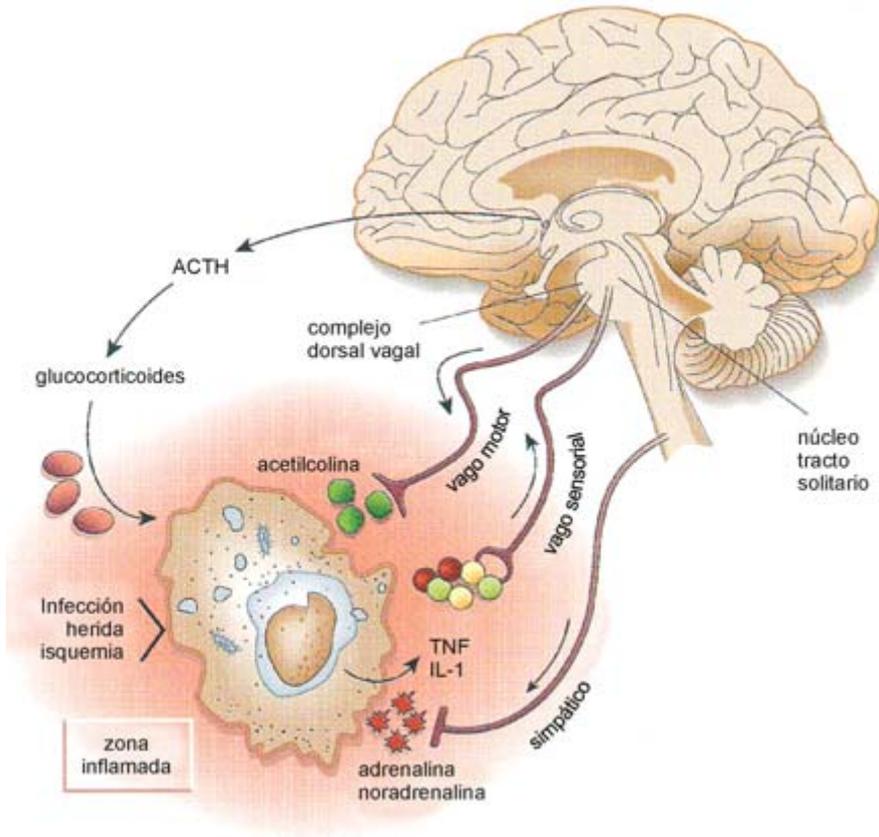


FIGURA 33. Vías antiinflamatorias difusibles versus neurales. (a) Vías difusibles. La circulación vehicula células inflamatorias (monocitos y neutrófilos) y citoquinas a y desde el foco inflamatorio. Las respuestas dependen del gradiente de concentración, son lentas y no están integradas. Las sustancias inflamatorias producidas en el foco inflamatorio (TNF- α , IL-1, HMGB1) difunden hacia el torrente circulatorio, y las hormonas y las citoquinas antiinflamatorias (glucocorticoides, α -MSH, IL-10, espermina) difunden a la zona lesionada. (b) Vías neurales. La regulación antiinflamatoria de los macrófagos tisulares es local, rápida e integrada a través del CNS. ACh inhibe la liberación de TNF- α por los macrófagos. Adrenalina y noradrenalina predominantemente inhiben la liberación de TNF- α , pero pueden, en determinadas circunstancias, liberar TNF- α por los macrófagos. La sustancia P, un neuropéptido, puede estimular la síntesis de citoquinas y amplificar la respuesta inflamatoria local a la vez de mediar en la sensación dolorosa. Modificada de: Tracey⁶⁸; fig. 2, pág. 856.

ción incrementada de ACTH por la hipófisis anterior. Pero la producción de citoquinas en los tejidos causa dolor, lo que proporciona otro mecanismo para transferir información desde el sistema inmunológico al cerebro. Dolor y estrés resultan en un incremento de adrenalina y noradrenalina que puede inhibir también la activación macrofágica y suprimir la síntesis de TNF y otras citoquinas. La eleva-

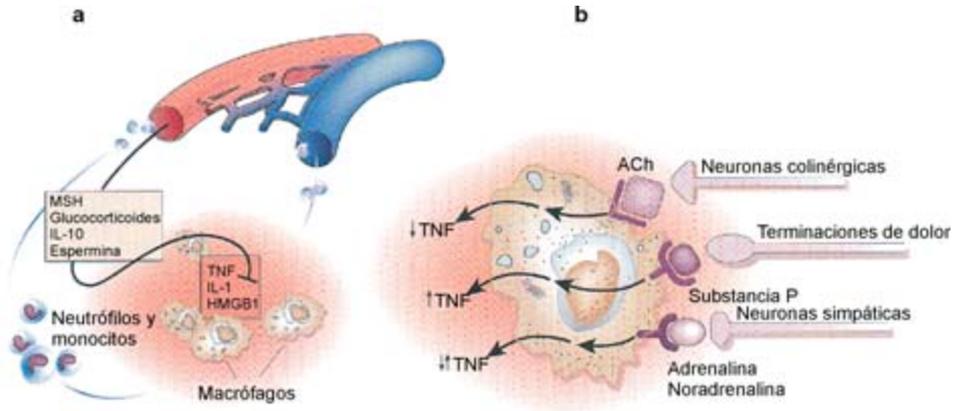


FIGURA 34. Circuitería del reflejo inflamatorio. Sustancias inflamatorias producidas en el foco inflamatorio activan señales aferentes que son conducidas al núcleo del tracto solitario; subsiguientemente, la activación vagal eferente inhibe la síntesis de citoquinas a través de la vía colinérgica anti-inflamatoria: el reflejo inflamatorio. La información puede llegar también al hipotálamo y al complejo dorsal del vago, lo que estimula la liberación de ACTH, que activa la vía humoral antiinflamatoria. La activación del sistema nervioso simpático por respuestas de ansiedad o al dolor, o a través de señales directas desde los núcleos cerebrales indicados, pueden incrementar las concentraciones locales de catecolaminas que ayudan a suprimir la inflamación. Modificada de: Tracey ⁶⁸; fig. 3, pág. 857.

da actividad simpática y el incremento resultante de las catecolaminas estimulan la liberación, dependiente de receptores β -adrenérgicos, de IL-10, una potente citoquina antiinflamatoria. Así, los efectos antiinflamatorios de los sistemas nerviosos simpático y parasimpático se comprometen sinérgicamente para asegurar este objetivo.

IIg. Microorganismos e inmunidad innata

Dos hechos han guiado, durante los últimos diez años, el campo de la inmunología innata. En 1996, cuando sólo se conocía que la proteína Toll estaba comprometida en el proceso de desarrollo y morfogénesis en *Drosophila* ⁶⁹, se demostró que también era requerida por la mosca para montar una respuesta inmunológica efectiva frente al hongo *Aspergillus fumigatus* ⁷⁰; y, en 1998, el receptor tipo Toll-4 (TLR-4) fue identificado como el receptor de lipopolisacárido (LPS) bacteriano, codificado por el locus *Lps* y requerido, en el ratón, para construir una respuesta efectiva frente a bacterias gram-negativas, en las que el LPS es parte integral de la membrana celular externa ⁷¹. Tales hallazgos revelaron que la estructura proximal del

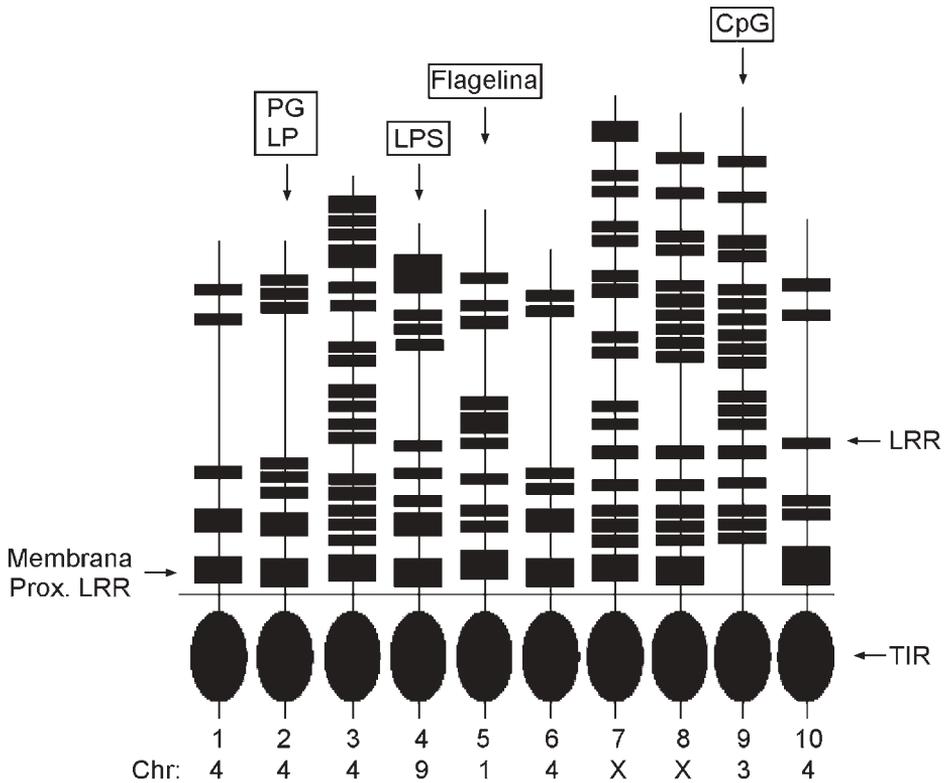


FIGURA 35. Parálogos humanos de receptores tipo Toll. El ectodominio de cada proteína se caracteriza por contener múltiples motivos de repeticiones ricas en leucina (LRR); el dominio citoplasmático es un dominio TIR (receptor de IL-1/Toll). En la mayoría de los TLRs, existe, en la proximidad de la membrana, una caja LRR que contiene varias cisteínas. Existe especificidad para determinados ligandos: LP, lipopéptido; PG, peptidoglicano; LPS, lipopolisacárido; CpG, oligonucleotidos que comparte islas CpG.

aparato sensor del sistema inmunológico innato de insectos y de mamíferos tiene un origen evolutivo común, y sugerían un papel central para los TLRs en el reconocimiento primario de patógenos infecciosos por los mamíferos. Hasta la fecha se han identificado 11 parálogos de TLRs en humanos (Figura 35). Cada uno de los subtipos TLR reconoce un repertorio distintivo de moléculas microbianas conservadas, de tal manera que el conjunto de TLRs es capaz de detectar la mayoría de los microorganismos sino la totalidad de ellos. No existen dudas de que los TLRs son capaces de rastrear el espectro total de microorganismos: virus, bacterias, hongos y protozoos. Por ellos los TLRs son tan importantes y han llenado un vacío en la inmunología. El impacto de su identificación como la puerta al reconocimiento inmunológico innato, puede compararse con los descubrimientos anteriores de los

receptores que aseguran un reconocimiento eficaz en la inmunología adaptativa o adquirida: las inmunoglobulinas (Igs) y los receptores de las células T (TCRs) ⁷².

Los TLRs están formados por un ectodominio constituido por n motivos repetidos ricos en leucina (LRR). Este ectodominio garantiza la especificidad de unión con su respectivo ligando. Un dominio LRR yuxtamembranar, presente en la mayoría de los TLRs, contienen varios restos cisteína. El endodominio citoplasmático lo conforma el dominio TIR, que es homólogo con el receptor de IL-1 y que interacciona con las proteínas adaptadoras de la vía de señales. Cuatro proteínas adaptadoras (existe una quinta no bien caracterizada) —MyD88, MAL/TIRAP, TRIF y TRAM— transducen la señal, desde los dominios TIR, hasta proteína quinasas (IRAK o RPK) a las que activan y otros factores intermediarios (TRAF6 o IRF3) que, a su vez, activan factores de transcripción (NF κ B, AP-1 o STAT1). Los factores de transcripción activados provocan la expresión de los genes inflamatorios (**Figura 36**).

Aunque la activación de la respuesta inmunológica innata es crítica para controlar la infección causada por microorganismos patógenos, una producción excesiva, fuera de control, de citoquinas es peligrosa para el huésped y puede conducir a distorsión microcirculatoria, shock, daño tisular e, incluso, la muerte. La exposición previa a LPS causa una indiferencia transitoria a un nuevo reencuentro con el LPS. Este fenómeno se denomina tolerancia endotóxica, tolerancia a LPS, insensibilidad a LPS o refractariedad a la endotoxina. La tolerancia a la endotoxina se considera un mecanismo protector contra el shock endotóxico durante una infección por bacterias gram-negativas, y tiene por objetivo limitar el daño tisular debido a una excesiva respuesta inmunológica. La tolerancia a la endotoxina se caracteriza por un estado de indiferencia de un organismo y sus macrófagos, en términos de producción de citoquinas ⁷³.

TLR4 es el receptor para LPS, uno de los inmunoestimuladores más potentes conocidos. Los humanos albergan una impresionante cantidad de flora bacteriana comensal en el tracto intestinal, cuyos epitelios no expresan TLR4. Ello es, probablemente, la consecuencia evolutiva de una cohabitación milenaria con bacterias gram-negativas en el intestino, que proporcionan una vasta cantidad de LPS. El mecanismo de regulación negativa ha coevolucionado con la cascada de señalización inmunitaria innata. Además de en el intestino, tampoco hay expresión de TLR4 sobre los epitelios del cervix y vagina, que contienen flora bacteriana del tipo de *Lactobacillus*. Por el contrario, en la tráquea y en la vejiga urinaria, donde no residen bacterias comensales, el epitelio está provisto de TLR4 y puede responder al estímulo LPS. Uno de los mecanismos que causan tolerancia bacteriana es, probablemente, la represión de la expresión en la superficie celular de TLR4, pero existen otros mecanismos de tolerancia.

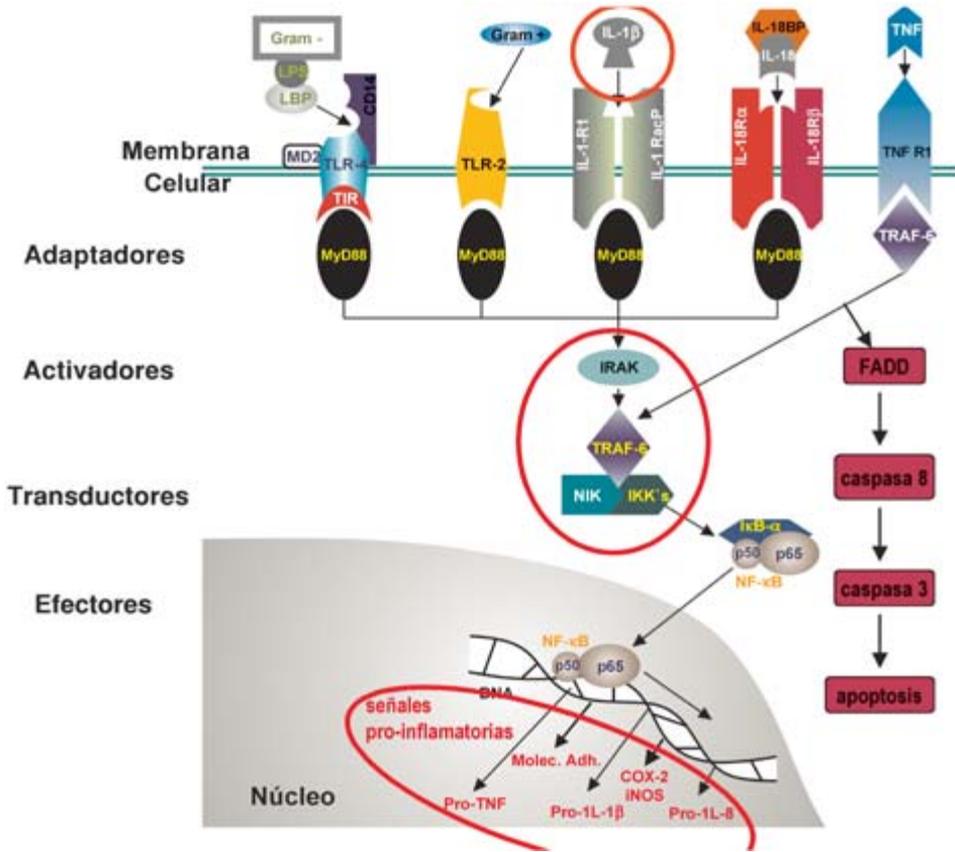


FIGURA 36. Esquema general del reconocimiento de PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) por PRMs (moléculas de reconocimiento de patrones). TLRs (receptores tipo Toll), el prototipo de PRMs, reconocen diferentes ligandos (PAMPs). Existen diferentes TLRs para otros tantos ligandos exógenos (LPS) y endógenos (ILs, TNF). La cascada de señales iniciada por la interacción ligando-receptor, exige una serie de moléculas que garantice su progresión: adaptadores (MyD88), proteína quinasas activadoras (IRAK), proteínas transcriptoras (TRAF) y factores de transcripción (NF-κB/p50.p65) que ejecutan la señal. Los factores de transcripción involucrados induce la expresión de genes pro-inflamatorios (*pro-IL-1*, *pro-TNF*, *moléculas de adhesión*, *COX2*, *iNOS*). En el caso del receptor de TNF, existe una interacción con la vía de señales pro-apoptótica. Ver las figuras siguientes para completar el modelo general de inducción de la inmunidad natural o innata.

Se han propuesto varias moléculas que inhiben la señalización TLR4. Una de ellas es IRAK-M, cuyo déficit provoca una mayor producción de citoquinas pro-inflamatorias tras la estimulación de TLR4 e IL-1R. IRAK-M bloquea la disociación de IRAK-1 e IRAK-4 de MyD88, interrumpiendo la vía de señales. La activación de TLR en macrófagos induce la expresión de IRAK-M; es decir, la

señal pro-inflamatoria activa la vía inflamatoria y, a la vez, una vía de retroalimentación inhibitoria que contribuye a estabilizar la homeostasis del sistema inmunitario innato. Otro mecanismo de control de la señal inflamatoria son la proteína supresora de las señales citoquímicas (SOCS) y la proteína interactiva con Toll (Tollip), que regulan negativamente la cascada de señales JAK-STAT, inhibiendo la activación de los receptores de interferón γ , IL-4, IL-6 y LIF. SOCS y Tollip se unen a IRAK-1 interrumpiendo, como IRAK-M, la cascada de señales. Otros dos mecanismos de seguridad operan en los extremos proximal y distal de la cascada. Proximalmente, MyD88s, generado por procesamiento alternativo de *MyD88*, compite con el producto estándar interrumpiendo la vía de señales; y aguas abajo, la proteína A20 estorba directamente a NF- κ B (**Figura 37**).

La determinación de los componentes estructurales (motivos) bacterianos responsables de iniciar la vía de señales pro-inflamatorias fue algo importante para la comprensión y control del proceso inflamatorio. Los motivos bacterianos que son reconocidos por el sistema inmunológico innato se denominan «patrones moleculares asociados a patógenos» (PAMPs), y aunque se deberían denominar «asociados a microorganismos», porque no está claro si el huésped distingue entre las señales de los patógenos y de los comensales. En las bacterias gram-negativas, el lipopolisacárido (LPS) o endotoxina tiene un papel dominante. La membrana externa de estas bacterias está construida por una bicapa lipídica, separada de la membrana celular interna por peptidoglicano. La molécula de LPS forma parte de la membrana externa, anclándose a la pared bacteriana a través de su porción denominada lípido A (**Figura 38**). Las bacterias gram-positivas no poseen LPS, pero sus paredes contienen peptidoglicano y ácido lipoteicoico, que también pueden interactuar con TLRs específicos, aunque son menos activos que los LPS ⁷⁴.

La incapacidad para identificar un receptor de LPS fue una barrera para comprender como las bacterias gram-negativas iniciaban la reacción pro-inflamatoria. La activación de las células del organismo infectado depende de la presencia de una proteína libre, circulante, denominada proteína acopladora de LPS (LBP) y del receptor opsónico CD14. La LBP compite con lipoproteínas respecto al LPS; LPS ligado a lipoproteínas forma micelas inertes desde el punto de vista inflamatorio, pues no liberan citoquinas ⁷⁵. La forma estable de CD14, acoplado en la membrana (mCD14), asegura su anclaje a la superficie celular mediante glicosilfosfatidilinositol. También se encuentra en la circulación en forma libre, como CD soluble (sCD14). Muchas células que son constitutivamente CD14 negativas, como las células dendríticas, fibroblastos, células musculares lisas o el endotelio vascular, pueden responder al complejo [LBP-LPS-

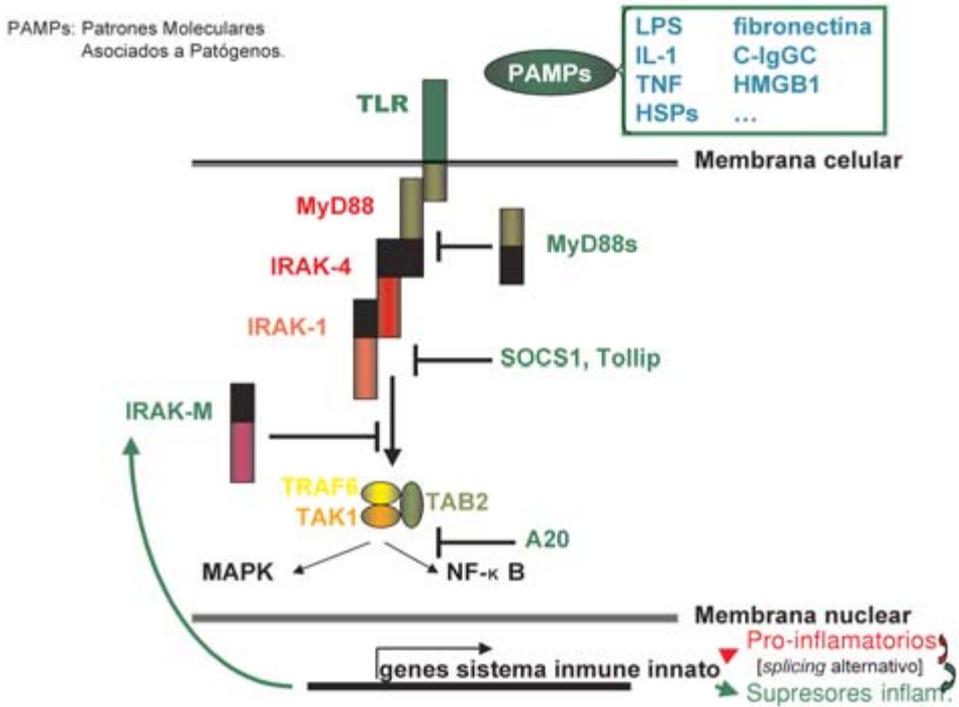


FIGURA 37. Modelo de señalización y control de TLR. La activación del receptor por PAMPs induce multimerización de los TLRs, que reclutan proteínas MyD88 e IRAK. El agrupamiento de las proteína quinasas (IRAKs) induce su autofosforilación y formación de un complejo (IRAK-4/IRAK-1). La formación de este complejo provoca su liberación de la proteína adaptadora MyD88. Liberado el complejo IRAK-4/IRAK-1, inicia una serie de activaciones de moléculas situadas aguas abajo de la cascada. De este modo se activan las proteínas transductoras TRAF6 (factor-6 asociado al receptor de TNF), TAK1 (quinasa-1 activada por el factor de transformación del crecimiento) y TAB2 (proteína-2 ligada a TAK1), que, finalmente activan los correspondientes factores de transcripción (NF-κB). Los frenos son: sMyD88 (una forma alternativa, soluble, de MyD88), que estabiliza el complejo TIR/MyD88/IRAK-4 impidiendo que prosiga la cascada de señales; SOCS 1 (supresor-1 de la señalización de inducida por citoquinas) y Tollip (proteína de interacción con Toll), que inhiben directamente la señal de TLR-4; IRAK-M, que bloquea la activación de las moléculas transductoras por IRAK-4/IRAK-1, y A20, que bloquea el paso más distal de la cascada impidiendo la activación de los factores de transcripción por las moléculas transductoras. La señal inicial pone en marcha, por tanto, respuestas inflamatoria y antiinflamatoria la primera dependiente de la activación de NF-κB, y la segunda de vías dependientes de MAPK (quinasa activada por mitógenos) que incidirían sobre factores de transcripción moderadores. Modificada de: Kobayashi et al. ⁷³; fig. 1, pág. 429.

sCD14]. sCD14 se encuentra en el suero de individuos sanos, pero su concentración incrementa drásticamente en pacientes con procesos inflamatorios. Ni sCD14 ni mCD14 incorporan un endodominio intracitoplasmático; es necesario un eslabón que conecte [LBP-LPS-CD14] con el interior celular. Los TLRs, que

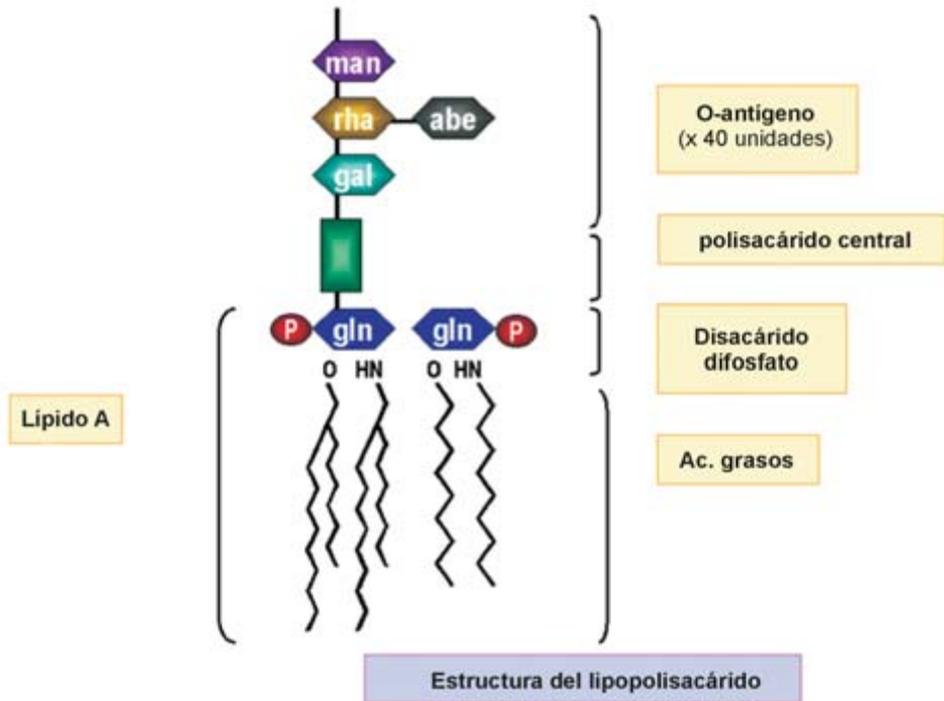


FIGURA 38. Los lipopolisacáridos de las bacterias gram-negativas constan, típicamente, de un dominio hidrofóbico denominado lípido A (o endotoxina) formado por colas de ácidos grasos acilados por disacáridos bifosfato. A esta estructura sigue un oligosacárido central (*core*) no repetitivo, a la que sigue distalmente un polisacárido (antígeno O).

aseguran tal exigencia, reconocen los diferentes «patrones moleculares»; pero para que este reconocimiento e interacción resulte en la activación del receptor que inicia la vía de señales proinflamatoria, se requiere una nueva molécula accesoria: MD-2, que asegura la correcta posición del receptor. Con ello queda completado el complejo inicial: [(LBP)-LPS-(CD14)]•[TLR-MD-2]. La misión de LBP es llevar, con sCD14 o sin él, LPS hasta el complejo receptor, y la de CD14 es presentar LPS a TLR.

La noción de una asociación monógama entre un TLR en particular y su ligando, como en el caso de TLR4 y LPS, es una simplificación. Por ejemplo, TLR2 puede ser activado por componentes de las paredes celulares de levaduras y de micobacterias; y, aunque los TLRs suelen formar homodímeros, mayor complejidad introduce el hecho de que los TLRs pueden ser capaces de combinarse en heterodí-

meros para formar un repertorio capaz de distinguir con precisión ligandos estrechamente relacionados. Por otra parte, los polimorfismos en la familia de las proteínas Toll pueden proporcionar parte de la explicación del porqué de la enorme variabilidad en la respuesta individual, a lo que parecen ser similares agresiones infecciosas.

Otra complicación es la existencia de vías adicionales del reconocimiento extracelular de los componentes microbianos: proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos (PGRPs) que pueden distinguir entre bacterias gram-positivas y gram-negativas, TREM-1, MDL-1, MSR, la integrina leucocitaria CD11b/CD18 (Mac-1) y determinados canales de potasio. Además, se ha propuesto que las células puedan también responder a LPS mediante receptores intracelulares (**Figura 39**).

Las moléculas de reconocimiento, involucradas en la defensa del huésped, poseen un dominio sensible a los ligandos microbianos construido por una serie de repeticiones de unidades ricas en leucina, y un dominio de interacción proteína-proteína que engarza el reconocimiento del microbio con la vía de transducción de señales que induce la respuesta defensiva. Sensibilización al ligando más que interacción con él. Por ello, se utiliza el término «moléculas de reconocimiento de patrones» (PRMs) para distinguirlos de los receptores clásicos. Por parte del microbio, los factores reconocidos por las PRMs son, normalmente, componentes estructurales del microorganismo denominados PAMPs. Los ligandos PAMPs son reconocidos por PRMs extracelulares o intracelulares. En los mamíferos, la familia de los receptores tipo Toll representa PRMs integrados en la membrana celular que detectan PAMPs en el medio extracelular.

Por otro lado, una familia de proteínas intracelulares forma un sistema de vigilancia y reconocimiento citosólico que detecta PAMPs que puedan presentarse en el interior celular; son las proteínas NBS-LRR. Estas proteínas se diferencian de los TLRs porque carecen del dominio TIR; en vez de él, contienen tres dominios distintivos: un dominio C-terminal que incluye varias repeticiones de secuencias ricas en leucina (LRRs), encargadas del reconocimiento del ligando; un dominio central (NBS o NACHT), esencial para la oligomerización de la molécula, y un dominio N-terminal de interacción proteína-proteína con el sustrato de tipo PYD, CARD o BIR. Esta familia también ha sido denominada CATERPILLER. Como en los TLRs, LRRs representan 20-29 motivos repetidos de secuencias de moléculas de leucina, que proporcionan una trama estructural versátil para la formación de interacciones proteína-proteína o proteína-carbohidrato/lípido, de orígenes bacteriano (por ej. LPS) o celular (por ej. cristales de pirofosfato). La presencia de los diferentes dominios N-terminales divide esa familia NBS-LRR en subfamilias: (a) Nalp contiene un dominio PYD; (b) Nod posee un dominio CARD, y (c) IPAF/NAIP (IPAF tiene un dominio CARD, como NODS,

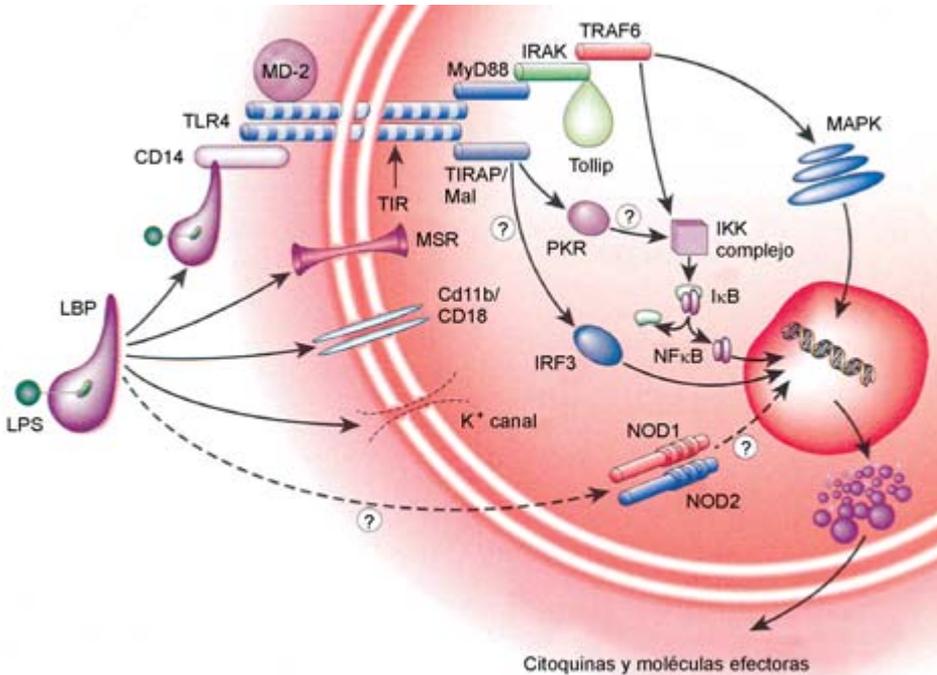


FIGURA 39. Reconocimiento del lipopolisacárido (LPS) bacteriano en la superficie celular. El principal mecanismo por el que se detecta el LPS es a través de la vía que inicia su camino mediante el reconocimiento y la captación de la endotoxina por una proteína específica: proteína acopladora de LPS (LBP). El complejo LBP-LPS alcanza su punto de ataque sobre la superficie celular en el complejo: proteína de acoplamiento CD14 - complejo receptor tipo Toll-4 (TLR4) - proteína de estabilización MD-2. Sin embargo existen otras posibilidades de reconocimiento por parte de la membrana celular: receptor de aclaramiento de macrófagos (MSR), CD18/CD11b y canales iónicos activados por LPS. La cadena de señales intracelulares depende del acoplamiento del dominio intracelular de TLR –TIR, quinasa asociada al receptor de IL-1 – a IRAK, una quinasa asociada al receptor de IL-1. El proceso de acoplamiento entre TIR e IRAK está facilitador por dos proteínas adaptadoras: MyD88 (proteína de diferenciación mieloide 88) y TIRAP (proteína adaptadora que contiene un dominio TIR; también denominada proteína adaptadora similar a MyD88 o Mal). Como en todo proceso biológico, existe un freno o inhibidor: Tollip. Existe una vía independiente de MyD88, por la que TIRAP/Mal envía señales mediante una proteína quinasa dependiente de ARN (PKR) y factor regulador de interferón-3 (IRF3). Las células también pueden ser capaces de responder a LPS por receptores intracelulares denominados proteínas Nod (dominios de oligomerización y de acoplamiento a nucleótido). NOD1, denominado dominio-4 de reclutamiento de caspasa, se identificó sobre la base de su homología con el regular apoptótico Apaf-1. NODs tienen regiones ricas en leucina. La expresión de NOD1 y 2 confiere capacidad de respuesta a LPS de bacterias gram-negativas, pero no a ácido lipoteicoico de las gram-positivas. Se ha sugerido que el mecanismo por el que NODs responde a LPS reeefectúa vía de la apertura de canales de potasio sensibles a LPS. Modificada de: Cohen ⁹²; fig. 1, pág. 886.

y NAIP tiene un dominio BIR). A pesar de la disparidad en N-terminal entre IPAF (CARD) y NAIP (BIR), presentan una similitud en sus dominios NBS/NACHT y LRR, lo que sugiere que son proteínas evolutiva y funcionalmente muy próximas y relacionadas. Por su parte, las subfamilias NALP y NOD, pero no la subfamilia IPAF, contienen un dominio NAD próximo a NBS/NACHT.

Las caspasas son cisteína-aspartato proteasas, que se sintetizan como zimógenos inactivos y sufren un proceso proteolítico durante su activación. En términos generales, las caspasas se agrupan en apoptóticas e inflamatorias. El conjunto de caspasas que degradan los sustratos específicos que producen los cambios asociados a la apoptosis se denominan caspasas ejecutoras que, en los mamíferos, están representadas por las caspasas -3, -6 y -7. En la mayor parte de las ocasiones, las caspasas apoptóticas ejecutoras son activadas por caspasas iniciadoras (caspasas -10, -8, -2 o -9). El mecanismo de activación de estas caspasas iniciadoras depende críticamente de la estructuración de plataformas a partir de elementos reclutados, tales como el complejo inducido por señales de muerte para la caspasa-8 y la caspasa-10; el PIDDosoma para la caspasa-2, y, la mejor conocida, el inflamasoma, para la caspasa 9. Tales plataformas integran señales celulares que conducen a la formación de una enzima activa eficaz que inicia cascadas de señales específicas. Estas plataformas son complejos multiproteicos ensamblados sobre una proteína, que actúa a modo de un esqueleto central y que, característicamente, posee tres dominios principales: una región involucrada en el reconocimiento del ligando, un dominio que dirige la oligomerización y un tercer dominio implicado en reclutar las caspasas. El ejemplo prototípico es la proteína de andamiaje apoptosómico APAF-1. APAF-1 contiene un dominio CARD para el reclutamiento de la caspasa 9; un dominio NB-ARC que permite la oligomerización del complejo, y un dominio de repetición WD (triptófano-ácido aspártico) que reconoce el citocromo *c* mitocondrial, la señal que conduce a la apoptosis por activación del apoptosoma (**Figura 40**)⁷⁶.

En los vertebrados se han descrito una familia de receptores intracelulares estructuralmente relacionados con APAF-1 (Ver figura núm. 200). Tales proteínas, denominadas receptores tipo NOD (NLRs), son sensores intracelulares de patógenos y otras señales. NLRs incluyen proteínas tales como NOD1 y NOD2, y tres proteínas involucradas en la formación del complejo activador de caspasa-1: IPAF, NAIP y NALP. Todas ellas miembros de la familia de proteínas NBS-LRR.

Utilizando bases de datos genómicas se descubrió NOD1/CARD. Similar a APAF-1, NOD1 tiene un dominio N-terminal CARD y otro central NBS/NACHT, pero en vez de las repeticiones WD encontradas en APAF-1, NOD1 presenta un dominio LRR. La oligomerización de NOD1 induce el re-

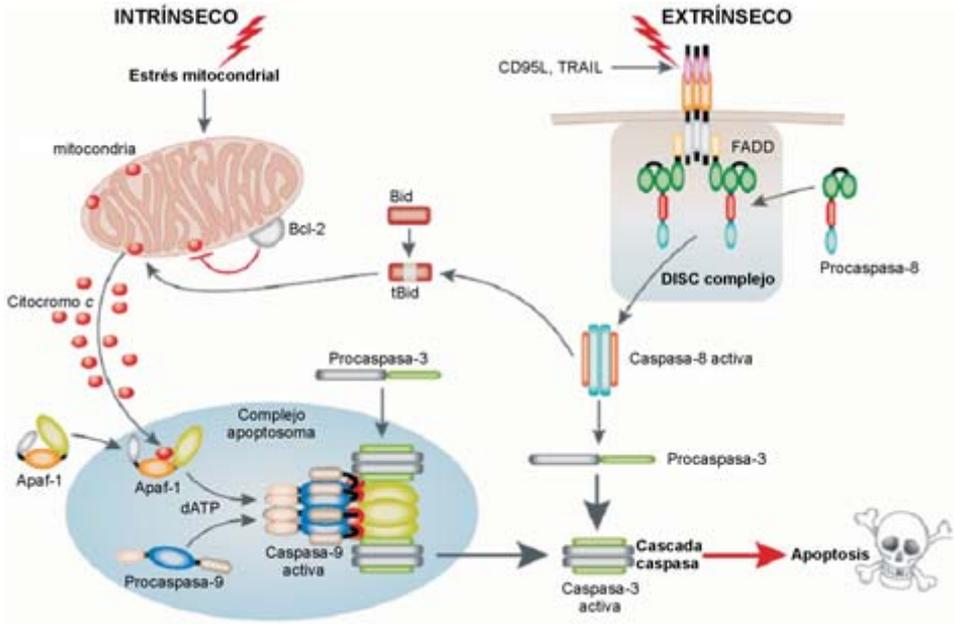


FIGURA 40. Apoptosoma y vías extrínseca e intrínseca de la activación de caspasas apoptóticas. La vía extrínseca es activada vía de la activación del receptor “muerte”; la vía intrínseca lo es por estímulos estresores que provocan daño mitocondrial y pérdida de productos mitocondriales hacia el citosol. El estímulo de receptores de muerte —pertenecientes a la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNF)— sobre la superficie celular provoca la activación de la vía apoptótica que involucra la procaspasa 8. En la vía intrínseca, la perturbación mitocondrial permite la salida, entre otros, de citocromo *c* y cuya estabilidad intramitocondrial depende del equilibrio entre miembros de la familia Bcl2, unos (Bcl2/Bcl-X_L/Mcl1) antiapoptóticos y proapoptóticos otros (Bax, Bak y tBid). Una vez liberado, el citocromo *c* se une al factor activador de la proteasa apoptótica 1 (Apaf-1), que resulta en la formación del complejo Apaf1-procaspasa 9 o apoptosoma, que resulta en la activación del zimógeno formándose caspasa 9 activa. Subsecuentemente, las caspasas iniciadoras 8 y 9, operativas, activan a las caspasas efectoras 3, 6 y 7. Modificada de: MacFarlane *et al.* ⁷⁶; fig. núm. 1, pág. 675.

clutamiento de Rip2 a través de la interacción hemofílica CARD (NOD1)/CARD (Rip2). Rip2 es un adaptador que comparte homologías estructurales con una quinasa asociada al receptor de IL-1 β (IRAK), y de las proteínas RIP (serina-treonina quinasa involucradas en la vía de señales aguas abajo del TNFR1). La interacción entre NOD1 y Rip2 conduce a la activación de la vía del NF- κ B a través del reclutamiento del complejo IKK al dominio central de Rip2. Principalmente en las células epiteliales, NOD1 es un sensor intracelular de peptidoglicanos bacterianos. NOD2 se expresa predominantemente en las células del linaje mielóide y en las células epiteliales digestivas. Homólogo a NOD1, a

TABLA III. *Enfermedades asociadas con mutaciones en proteínas NBS-LRR*

<i>Proteína NBS-LRR</i>	<i>Otros nombres</i>	<i>Enfermedad asociada</i>	<i>Patología</i>
Subfamilia Nod			
Nod2	Card15	Enfermedad de Crohn Síndrome de Blau	Reconocimiento incorrecto de PAMP. Activación constitutiva de NF-κB.
Subfamilia Nalp			
Nalp3	Criopirina	Síndrome de Muckle-Wells CINCA (Síndrome neurológico, cutáneo y articular, crónico infantil) FCAS (Síndrome familiar auto-inflamatorio inducido por frío)	Activación de caspasa1, independiente del ligando: ↑ secreción IL-1β. Idem. Activación inducida por frío.
Subfamilia Ipaf			
Naip	Birc1	Atrofia muscular espinal	Fracaso en la inhibición de caspasa1.
Naip5 (ratón)	Birc1e	Susceptibilidad a infecciones por <i>Legionella pneumophila</i>	Idem.
Subfamilia CIITA			
CIITA		Síndrome de linfocitos pelados	Ausencia de expresión MHCII por bloqueo de la translocación nuclear.
Proteínas asociadas a NBS-LRR			
Pirina	Marenostrina	Fiebre familiar mediterránea	Reconocimiento defectuoso del ligando bacteriano y apoptosis.

diferencia de este, NOD2 posee dos dominios CARD en su extremo N-terminal. Al igual que su homólogo, la vía NOD2 se induce tras su oligomerización tras el reclutamiento de la cascada Rip2/IKK, que conduce a la activación del NF-κB. El ligando para NOD2 es el motivo peptidoglicano MDP. El hecho de que el gen *Nod2* haya sido identificado, independientemente, como el primer gen de susceptibilidad para la enfermedad de Crohn, sugiere interesantes interconexiones entre un sistema de vigilancia y control bacteriológico y una enfermedad inflamatoria (**Tabla III**).

El dominio CARD de IPAF-1 se asocia, directa y específicamente, con el dominio CARD de la procaspasa-1 a través de interacciones CARD-CARD; el dominio NBS/NACHT, relacionado con el dominio NB-ARC de APAF-1, induce la oligomerización y promueve la proximidad de las caspasas, y la región LRR

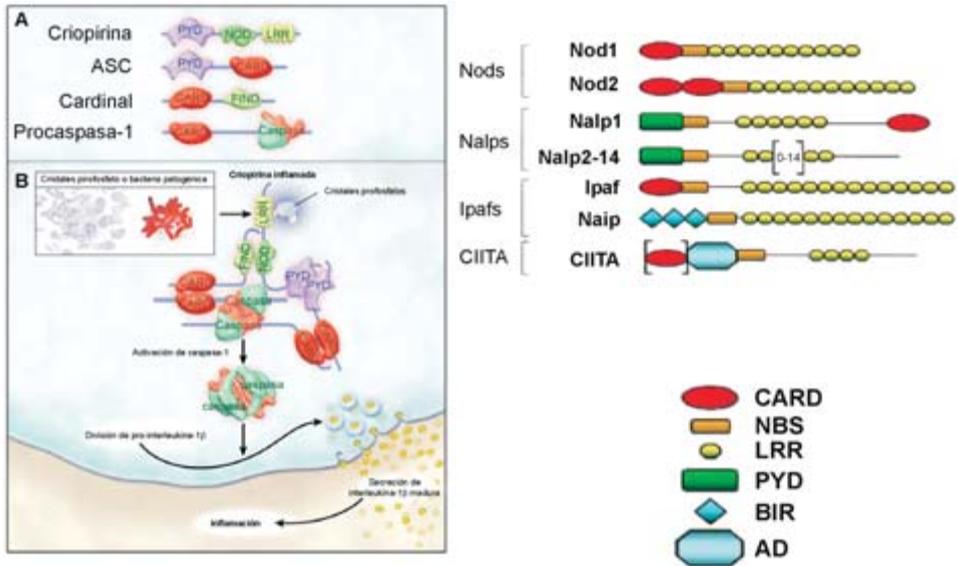


FIGURA 41. Inflamasoma criopirina. Criopirina o NALP3 es el componente central del inflamasoma. Criopirina tiene tres dominios: un dominio pirina (PYD, producto del gen responsable de la fiebre mediterránea familiar, también denominado marenostrina), un dominio de oligomerización nucleosídico (NOD) y un dominio de repeticiones ricas en leucina (LRR). Los otros componentes del inflamasoma son: ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (CARD)*), cardinal y procaspasa-1. Los respectivos dominios pueden ensamblarse, exclusivamente, una vez que la criopirina ha sido activada mediante la interacción de su dominio LRR con un cristal (urato o pirofosfato cálcico deshidratado) o con ciertas especies microbianas. El ensamblaje de los diferentes dominios conduce a la liberación de caspasa-1 que, a su vez, activa la interleuquina-1 β , tras escindir la molécula de prointerleuquina-1 β y cuya secreción al medio extracelular incita la inflamación. Modificada de: Drenth *et al.* ⁷⁷; fig. 1, pág. 731.

es, probalmente, el sensor del ligando. Naip interacciona con Ipaf-1, siendo parte del mismo complejo activador de la procaspasa-1. IPAF-1/NAIP conforman un inflamasoma, aún no bien caracterizado, que convierte procaspasa-1 en caspasa-1 activa (también denominada enzima convertora de IL-1 β : ICE) que, a su vez, convierte proIL-1 β en su forma activa, IL-1 β (Figura 41).

La investigación de pacientes con síndromes febriles periódicos hereditarios — síndrome de Muckle-Wells, síndrome autoinflamatorio familiar inducido por frío y enfermedad inflamatoria multisistémica de comienzo neonatal o síndrome neuro-cutáneo-articular infantil crónico— ha dado como resultado la identificación de mutaciones en el gen *CIAS1*, que codifica criopirina. Macrófagos y neutrófilos contienen una estructura denominada inflamasoma, un complejo de proteínas que cumple diferentes papeles en el sistema de defensa innato ⁷⁷. Miembros de la familia de pro-

teínas NALP —que incluye criopirina— son los principales bloques de construcción del inflamasoma, del que se han descrito dos tipos —NALP1 y NALP3 o inflamasoma criopirina—, aunque seguramente existen más variantes. NALPs representan la mayor subfamilia NLRs. Albergan dominios NACHT y LRR similares a IPAF, pero a diferencia de esta último, NALPs se caracterizan por un dominio terminal PYD, que interactúa y recluta el adaptador ACS vía interacción PYD-PYD. ASC, un componente esencial del inflamasoma, contiene un dominio PYD N-terminal, y un dominio C-terminal CARD, por el que ASC recluta procaspasa-1 al inflamasoma. La estimulación de criopirina —por componentes bacterianos o por cuerpos extraños como cristales de pirofosfato— dispara una serie de reacciones que conducen a la producción de IL-1 β que, secretada por el macrófago, induce una cascada de acontecimientos pro-inflamatorios. IL-1 β (17 kDa) es sintetizada, inicialmente, en forma de precursor inactivo (pro-IL-1 β , 31 kDa) que debe ser procesado a su forma activa por caspasas (las caspasas inflamatorias —caspasas grupo I— están codificadas, en el humano, en tres genes (*caspasa -1*, *-4* y *-5*), y se caracterizan por la presencia del dominio CARD como extremo N-terminal de la molécula; son parientes, por tanto de la subfamilia NOD). Al igual que la interleuquina inflamatoria IL-1 β se sintetiza en forma de un precursor inactivo (proIL-1 β), las caspasas inflamatorias sufren el mismo proceso de activación: son sintetizadas como zimógenos inactivos (procaspasas) que deben ser procesados a caspasas activas que, a su vez, activan las pro-ILs inflamatorias -1, -18 y -33.

III. Generalización del proceso inflamatorio

La teoría prevalente ha sido que la sepsis —en principio, la situación generalizada grave que puede complicar una infección— representa una respuesta inflamatoria descontrolada. Lewis Thomas popularizó este punto de vista cuando escribió que «los microorganismos que nos invaden son meros espectadores... Es nuestra respuesta a su presencia lo que desencadena la enfermedad. Nuestro arsenal para combatir a las bacterias es tan poderoso y dispone de tantos mecanismos de defensa, que estamos más expuestos a sus efectos devastadores que los propios microbios»⁷⁸.

La escena descrita por Thomas parece corroborarse, en parte, cuando tal resultado puede desencadenarse por causas ajenas a la infección. Agresiones infectivas (internas: peritonitis fecal; o externas: herida contaminada) y no infectivas (internas: pancreatitis; o externas: quemaduras externas o traumatismos graves) provocan una reacción inflamatoria similar, cuya fisiopatología y clínica son idénticas: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*). Esta respuesta inflamatoria está determinada, cualitativa y cuantitativamente, por factores genéticos y ambientales.

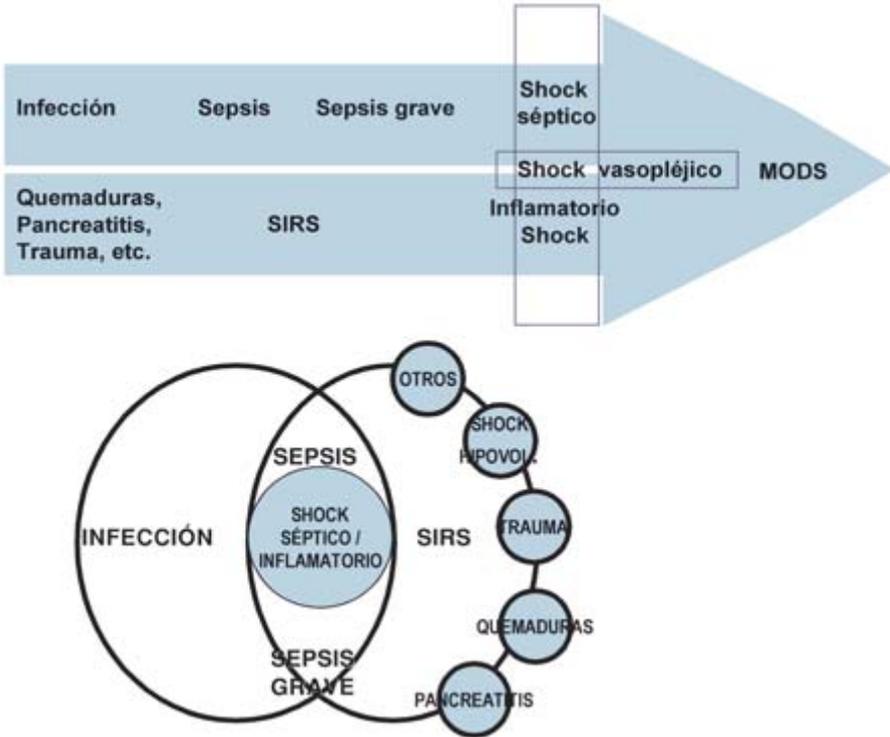


FIGURA 42. Sepsis (inducción por señales proinflamatorias exógenas) y SIRS (inducción por señales proinflamatorias endógenas), comparten un camino común, de gravedad progresiva, que conduce a una situación de shock vasopléjico. El desenlace final, si la enfermedad no logra controlarse, es un síndrome de fracaso multiorgánico, la causa más recuente de muerte en la unidades de cuidados intensivos no coronarias.

En 1991, el *American College of Chest Physicians* (ACCP) y la *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) convinieron una Conferencia de consenso en un intento de acordar una base conceptual y un criterio clínico para definir la respuesta inflamatoria sistémica a la infección; una situación de deterioro progresivo conocida con el término generalizado de sepsis y que, en su estadio avanzado incluye la disfunción o el fracaso de diversos órganos y sistemas. La Declaración de la Conferencia ACCP/SCCM introdujo, en términos de igualdad, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), un acrónimo que hace referencia a los complejos hallazgos que resultan de la activación de una respuesta inmunológica innata, independientemente de la causa que la provoque, y aunque se discute si los ligandos endógenos utilizan los mismos TLRs que los ligandos bacterianos (**Figura 42, Tabla IV**)⁷⁹. La Declaración asumía

TABLA IV. Conferencia de consenso ACCP / SCCM: Definiciones

Infección: fenómeno microbiano caracterizado por una respuesta inflamatoria a la presencia de microorganismos, o la invasión de tejidos del huésped normalmente estériles por aquellos organismos.

Bacteriemia: presencia de bacterias viables en sangre.

Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*)

respuesta inflamatoria sistémica a diversos insultos clínicos graves. La respuesta se manifiesta por dos o más de las siguientes condiciones: 1) temperatura corporal $\geq 38^{\circ}\text{C}$ o $\leq 36^{\circ}\text{C}$; 2) frecuencia cardíaca > 90 latidos min^{-1} ; 3) frecuencia respiratoria > 20 respiraciones min^{-1} , o $\text{PaCO}_2 < 32$ mm Hg, y 4) recuento leucocitario en sangre periférica $> 12,000 \mu\text{L}^{-1}$, $< 4,000 \mu\text{L}^{-1}$ o 10 % de formas inmaduras.

Sepsis: respuesta sistémica a la infección, manifestada por dos o más de las siguientes condiciones: 1) temperatura corporal $\geq 38^{\circ}\text{C}$ o $\leq 36^{\circ}\text{C}$; 2) frecuencia cardíaca > 90 latidos min^{-1} ; 3) frecuencia respiratoria > 20 respiraciones min^{-1} , o $\text{PaCO}_2 < 32$ mm Hg, y 4) recuento leucocitario en sangre periférica $> 12,000 \mu\text{L}^{-1}$, $< 4,000 \mu\text{L}^{-1}$ o 10 % de formas inmaduras.

Sepsis severa: sepsis asociada con disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión. Las alteraciones por hipoperfusión e hipotensión pueden incluir —aunque no limitarse— acidosis láctica, oliguria o una alteración aguda del estado mental.

Shock séptico: hipotensión inducida por sepsis, a pesar de una adecuada fluidoterapia, y que cursa con —aunque puede no limitarse— acidosis láctica, oliguria o una alteración aguda del estado mental.

Síndrome de disfunción orgánica múltiple (MODS: *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*): presencia de función orgánica alterada en un paciente séptico, cuya homeostasis no puede mantenerse sin intervención.

que SIRS puede ser desencadenado por una infección local o generalizada, trauma, quemadura o por un proceso inflamatorio estéril como una pancreatitis. Se considera el diagnóstico de SIRS cuando el paciente tiene dos o más de los hallazgos clínicos siguientes: temperatura corporal $>38^{\circ}\text{C}$ o $<36^{\circ}\text{C}$; frecuencia cardíaca $>90 \text{ min}^{-1}$; hiperventilación evidenciada por una frecuencia respiratoria $>20 \text{ min}^{-1}$ o una $\text{PaCO}_2 <32$ mm Hg, y un recuento leucocitario periférico de $>12,000$ células μL^{-1} o $<4,000 \mu\text{L}^{-1}$. El concepto SIRS ha sido adoptado globalmente por clínicos e investigadores, siendo su patogenia, en principio, una inundación generalizada y descontrolada de mediadores químicos proinflamatorios, inducida por factores bacterianos vía TLRs, o por cualquier otro tipo de agresión que induce inflamación (Figura núm. 1000). Sepsis/SIRS es un pro-

TABLA V. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS: Conferencia Internacional sobre definiciones de sepsis

• **Puntos de consenso**

Los conceptos actuales de sepsis, sepsis grave y shock séptico parecen ser definiciones robustas, que deben permanecer tal como fueron redactadas en 1991.

Las definiciones actuales no permiten realizar un estadiaje de la respuesta del huésped a la infección.

Los signos y síntomas de sepsis son más variados que los incluidos en los criterios iniciales, establecidos en 1991.

Se presenta una lista accesoria de nuevos signos y síntomas para el diagnóstico de sepsis.

El futuro exige el desarrollo de un sistema de estadiaje que caracterice la progresión de la sepsis. Se propone un nuevo sistema —PIRO— para caracterizar y estadiar la respuesta del huésped a la infección.

SCCM: Society of Critical Care Medicine. ESICM: European Society of Intensive Care Medicine. ACCP: American College of Chest Physicians. ATS: American Thoracic Society. SIS: Surgical Infection Society.

blema de primer orden, que significa la mayor causa de mortalidad en las unidades de cuidados intensivos no coronarias ⁸⁰.

La «revisión» realizada en 2001 ⁸¹ de la Conferencia ACCP/SCCM de 1991 insistió en la robustez de las definiciones consensuadas hace diez años, aunque señaló que no existe un estándar de oro con el que calibrar los criterios diagnósticos; y apuntó que, en el futuro, parámetros bioquímicos y genéticos serán más consistentes que los clínicos actualmente manejados (**Tabla V**). Utilizando una variante del sistema TNM (Tumor, Nódulos o ganglios linfáticos y Metástasis) aplicado en oncología, propuso una clasificación para sepsis/SIRS denominada PIRO: predisposición (genética y epigenética), infección (características), respuesta (grado) y (disfunción) orgánica (**Tabla VI**).

Una intensa vasoconstricción en la vascularización periférica es la respuesta normal en aquellas condiciones en las que la presión arterial —presión de perfusión— es demasiado baja para perfundir adecuadamente los tejidos; tal ocurre en los estados de shock hemorrágico o cardiogénico. En otras condiciones, principalmente en las situaciones de shock séptico o inflamatorio, la hipotensión está causada por una vasodilatación periférica resistente, incluso, a fármacos vasoconstrictores.

TABLA VI. *Marcadores genéticos en Sepsis/SIRS*

<i>Loci</i>	<i>Marcador</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Clínica</i>
TNF- α [promotor: -308 (6 p21.3)]	TNF-1 α (G/G)	68-80 %	Susceptibilidad a sepsis/SIRS; mal pronóstico.
	TNF2 (A/A)	2-5 %	
IL-1 β [5 ^o exón: 3,953 (2 q14)]	IL-1 β (C/C)	70-75 %	
	IL-1 β a (T/T)	25-30 %	
IL-1ra [2 ^o intrón: 86 bp (2 q14.2)]	IL-1raA1 (VNTR)	70-73 %	Susceptibilidad a sepsis/SIRS; mal pronóstico.
	IL-1raA2	20-25 %	
PAI-1 [promotor: -674 (7 q22)]	4G/5G + 5G/5G	70-76 %	Susceptibilidad a sepsis meningocócica; mal pronóstico
	4G/4G (inserción/delección)	24-27 %	
LBP	varios		
CD14 [promotor: -159]	VNTR		Susceptibilidad a sepsis/SIRS; mal pronóstico.
TLR4	Asp299Gly		Susceptibilidad a sepsis/SIRS; mal pronóstico.

Sepsis/SIRS es la casusa más frecuente de shock vasodilatador, y es la vía final común de las situaciones de shock hipovolémico o cardiogénico cuando las causas originales no son solucionadas con prontitud. Cuando ocurre esto último, se denomina fase de «shock irreversible». En todas las formas de shock vasodilatador se detectan concentraciones plasmáticas marcadamente elevadas de catecolaminas, y activado el sistema renina-angiotensina; ello indica que la causa de la vasodilatación e hipotensión arterial se deben a la incapacidad del músculo liso arteriolar para contraerse. Para explicar este fallo se han apuntado varias hipótesis; entre ellas, la muerte de las células vasculares debido a la hipotensión prolongada, inadecuada extracción de oxígeno por los tejidos o un aproducción incrementada de prostaglandinas vasodilatadoras. Respecto al papel de las prostaglandinas debe indicarse que la vasoparálisis no es activa sino pasiva; incluso la situación de shock séptico/infalatorio se denomina «vasopléjico». Tres mecanismos han sido involucrados en este síndrome: activación de los canales de potasio dependientes de ATP (canales K_{ATP}) en la membrana plasmática de los miocitos de la pared vascular; activación de la

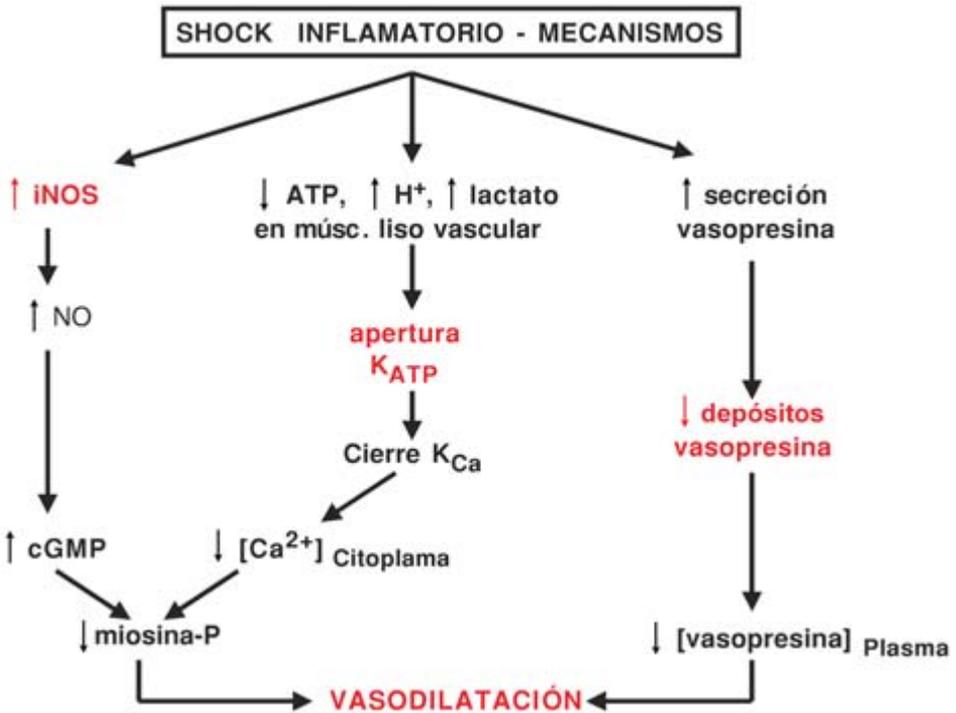


FIGURA 43. El shock séptico/SIRS causa hipoxia y acidosis metabólica hiperlactacidémica que abre canales K_{ATP} . A su vez, provoca un incremento de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que es responsable del incremento de la producción de óxido nítrico que abre canales K_{Ca} . Ello provoca una depleción de calcio citosólico y, este, una disminución de fosforilización de miosina. Por otro lado, se produce un aumento primero y una depleción después de vasopresina. La disminución de la fosforilización de miosina y la depleción de vasopresina producen vasoplejia. Modificada de: Landry et al.; fig. 4, pág. 593.

forma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS), y déficit de vasopresina (Figura 43) ⁸².

La vasoconstricción adecuada requiere que ligandos hormonales (por ej. angiotensina II) o neurales (por ej. norepinefrina) interaccionen y activen receptores en la superficie de los miocitos y, vía de segundos mensajeros, incrementen la concentración de calcio citosólico. Este incremento resulta de la liberación de calcio por los almacenes intracelulares del catión y de la entrada de calcio extracelular al citosol a través de los canales de calcio dependientes de voltaje. A concentraciones citosólicas adecuadas, el calcio forma un complejo con calmodulina, y este complejo activa una quinasa que fosforila la cadena ligera, re-

guladora, de miosina. La fosforilación de miosina permite la activación de miosina-ATPasa por actina y, con ello, el establecimiento de puentes entre miosina y filamentos de actina, un proceso que contrae el músculo. De manera opuesta, vasodilatadores como el péptido natriurético atrial y el óxido nítrico activan una quinasa que, interactuando con miosina fosfatasa, desfosforilan miosina y previenen la contracción muscular.

Además, la vasodilatación patológica y la resistencia a vasoconstrictores que caracteriza al shock séptico/SIRS, vasodilatador y vasopléjico, no puede comprenderse sin entender el papel del potencial de membrana en la regulación del tono vascular. El potencial de reposo de la membrana de las células musculares lisas vasculares oscila entre -30 y -60 mV. La positivación del potencial (despolarización) abre los canales de calcio dependientes de voltaje, incrementando la concentración de calcio citosólico e induciendo vasoconstricción. Al contrario, la hiperpolarización cierra esos canales e induce relajación. También, dado que la vasoconstricción mantenida requiere la entrada de calcio extracelular, la hiperpolarización impide la vasoconstricción aun en presencia de ligandos vasoconstrictores. Una variedad de canales y de transportadores iónicos, en especial canales de potasio, contribuyen al potencial de membrana de los miocitos vasculares. De los cuatro tipos conocidos de canales de potasio en la membrana plasmática de estas células, el canal K_{ATP} es el mejor conocido por tener un papel crítico en la patogénesis del shock vasopléjico.

La apertura de los canales K_{ATP} permite un eflujo de potasio, lo que hiperpolariza la membrana e impide la entrada de calcio a la célula: la activación farmacológica (por ej. diazóxido) de los canales K_{ATP} inhibe la vasoconstricción inducida por catecolaminas o por angiotensina II. Los canales son activados fisiológicamente por la disminución de la concentración intracelular de ATP, y por el incremento de las concentraciones citosólicas de hidrogeniones o de lactato, un mecanismo que liga el metabolismo celular con el tono vascular y con el flujo de sangre arteriolo-capilar. En condiciones fisiológicas de reposo, los canales K_{ATP} permanecen cerrados, y sus inhibidores (por ej. sulfonilurea, un antidiabético) no causan vasodilatación. Sin embargo, en condiciones hipermetabólicas o de hipoxia la activación de estos canales causa vasodilatación que puede ser revertida con los fármacos indicados. Activadores neurohormonales de canales K_{ATP} también pueden estar implicados en algunas formas de shock vasopléjico. Péptido natriurético atrial, péptido relacionado con el gen calcitonina y adenosina pueden activar canales K_{ATP} . Las concentraciones plasmáticas de esos tres compuestos están incrementadas en el shock vasopléjico y en las fases avanzadas —shock irreversible— de shock hipovolémico. El canal K_{ATP} también es activado por iNOS.

Un incremento de la síntesis de óxido nítrico contribuye a la hipotensión y a la resistencia a los fármacos vasopresores, que ocurren en el shock vasopléjico⁸³. La producción incrementada de NO, resultado de la expresión de la iNOS, es un hecho constante en el shock vasopléjido y en la fase irreversible del shock hipovolémico. Ello ocurre en varios tipos celulares; entre otros, en los miocitos y en los endotelioscitios vasculares. La inducción de la expresión de iNOS se debe a la activación de NF- κ B provocada por IL-1 β , IL-6, TNF- α , INF- γ y adenosina. La acción vasodilatadora de NO está mediada por la activación de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina y, también, por activar canales de potasio dependientes de calcio (canales K_{Ca}); activación, en ambos casos, en los miocitos vasculares. En condiciones normales, una de las funciones de este canal es mitigar el efecto de vasoconstrictores —por hiperpolarización de la membrana—, y tal efecto es característico de los tipos de shock que, ahora, nos ocupa. NO activa canales K_{Ca} por dos mecanismos: por nitrosilación directa del canal, o a través de la activación de una proteína quinasa dependiente de cGMP. Los inhibidores de la síntesis de NO y los bloqueantes de canales K_{Ca} revierten, al menos parcialmente, la hiporrespuesta vascular a los vasoconstrictores en el shock vasopléjico.

La conservación de agua es la principal acción de la vasopresina, una hormona secretada bajo control osmótico que regula la permeabilidad de los tubos colectores renales al agua. Sin embargo, la vasopresina está también involucrada en la homeostasis cardiovascular, secretándose bajo control barorreflejo y provocando vasoconstricción. Mientras que su efecto renal lo consigue con concentraciones plasmáticas del orden de 1-7 pg ml⁻¹, el efecto vasoconstrictor ocurre a concentraciones plasmáticas bastante superiores, del orden de 10-200 pg ml⁻¹. En condiciones normales la contribución de la vasopresina al tono vascular es mínima; pero en situaciones de hipotensión, de cualquier causa, se produce una liberación masiva de la neurohormona; por ello, su participación es importante para mantener la homeostasis circulatoria en las primeras fases de shock; de hecho, individuos con diabetes insípida toleran muy mal la situación de shock. Sin embargo, cuando el shock progresa, la concentración plasmática de vasopresina disminuye paulatinamente, remedando un cuadro de secreción inapropiada de vasopresina. Tal agotamiento se debe a la depleción de los depósitos de la neurohormona en el hipotálamo tras el doble estímulo, osmótico y barorreflejo, mantenido y a una producción poco eficaz. La acción de la vasopresina en pacientes con shock vasopléjico es interesante no sólo porque no tiene efecto en individuos normales, sino porque el shock es resistente a los efectos vasopresores de otras sustancias como norepinefrina, angiotensina II y endotelina. Entre otros efectos, la vasopresina inactiva canales K_{ATP} en los mio-

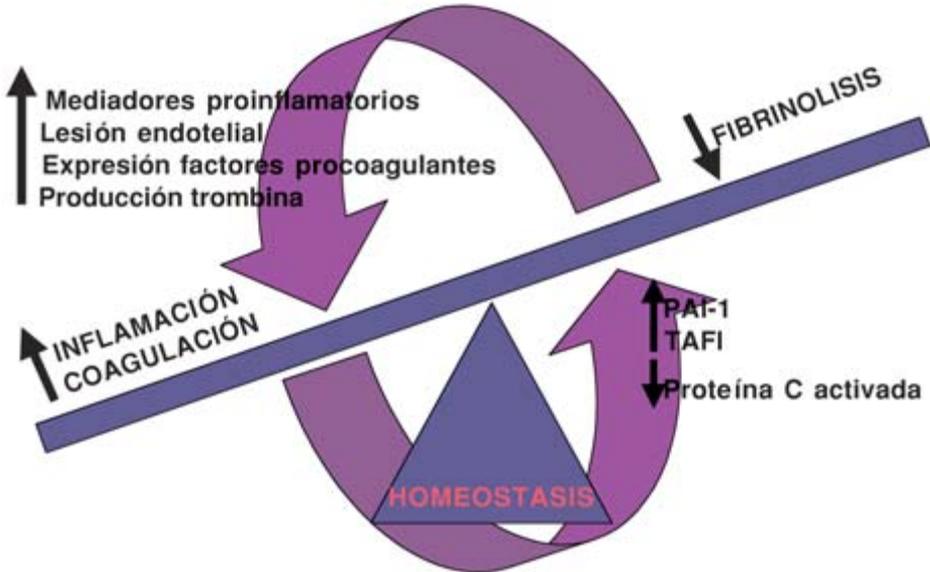


FIGURA 44. La pérdida de la homeostasis en sepsis/SIRS se debe a un predominio de los factores proinflamatorios y procoagulantes, sobre los antiinflamatorios y fibrinolíticos. PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno-1; TAFI: inhibidor de fibrinólisis activada por trombina.

citocinas vasculares; amortigua el incremento, en esas mismas células, del cGMP inducido por NO, y disminuye la síntesis de iNOS estimulada por citoquinas.

Aunque las citoquinas se consideran las principales culpables —«tormenta citoquímica»— del shock séptico/SIRS, la compleja problemática de la situación deja abiertas innumerables preguntas (**Figura 44**). En primer lugar, no es aplicable el paradigma «bench-to-bed»; en este caso, lo que es válido en el ratón no lo es en el humano. Los protocolos de tratamiento basados en el bloqueo farmacológico de los mediadores químicos fracasan en la clínica humana⁸⁴. Ello ha obligado a buscar nuevas dianas, aunque la estrategia no ha variado⁸⁵. El conocimiento actual de las vías de señales celulares que median la respuesta a los microbios ha demostrado que el concepto del bloqueo de la endotoxina, a efectos de prevenir las complicaciones sépticas, es simplista. El ejemplo paradigmático son los ratones C3H/HeJ, que son resistentes a endotoxina, sobre la base de una mutación en el gen *TLR4*, y sin embargo presentan mayor mortalidad a la inyección de bacterias completas. Otro es la ineficacia, en clínica humana, del tratamiento con anticuerpos anti-endotoxina en pacientes con shock séptico.

Los pacientes con sepsis/SIRS presentan manifestaciones consistentes con inmunosupresión., incluyendo una pérdida de hipersensibilidad diferida, inca-

pacidad de acabar con la infección desencadenante y una predisposición a infecciones nosocomiales. Una razón para el fracaso de la estrategia antiinflamatoria en pacientes con sepsis/SIRS puede ser el cambio del síndrome con el tiempo. Inicialmente, el cuadro puede caracterizarse por una tormenta citoquinica proinflamatoria; pero si la situación persiste, se produce un desplazamiento hacia una situación inmunosupresora antiinflamatoria ⁸⁶.

Las células CD4 T están programadas para secretar citoquinas con dos perfiles distintos y antagónicos. Pueden secretar citoquinas con propiedades inflamatorias (Th1) como TNF- α , IL-2 o INF- γ , o citoquinas con propiedades antiinflamatorias (Th2) como IL-4 o IL-10. Los factores que determinan si las células CD4 T tendrán un comportamiento Th1 o Th2 se desconocen con precisión, pero entre ellos destacan el tipo del patógeno, el tamaño del inóculo o el sitio de infección ⁸⁷. Por su parte, las células mononucleares de pacientes con quemaduras extensas o con trauma grave tienen reducidos los niveles de citoquinas Th1, pero incrementados los niveles de citoquinas Th2, y la reversión de la respuesta Th2 mejora la supervivencia entre los pacientes con sepsis/SIRS. Se ha señalado que el incremento progresivo de IL-10 —indicador de respuesta Th2— predice un desenlace fatal (**Figura 45**).

Anergia es un estado de indiferencia al antígeno. Las células T son anérgicas cuando no son capaces de proliferar o de secretar citoquinas, en respuesta a sus antígenos específicos. Pacientes en shock séptico/SIRS tienen niveles reducidos de células T circulantes, y sus células T remanentes son hipo o anérgicas. Por su parte, células apoptóticas —gran número de células epiteliales intestinales y linfocitos mueren por apoptosis en tal situación— pueden provocar, al menos en parte, anergia o respuesta Th2 inducidas por sepsis/SIRS.

En el extremo opuesto a la anergia se sitúa el denominado síndrome de shock tóxico (TSS) ⁸⁸. El TSS es una enfermedad de comienzo hiperagudo —el shock séptico se instaura progresivamente—, caracterizada por fiebre, rash cutáneo e hipotensión, que puede desembocar, también rápidamente, en una situación letal de fracaso orgánico múltiple. La enfermedad está causada por superantígenos bacterianos (SAGs) secretados por *Staphylococcus aureus* y estreptococos del grupo A. Los SAGs puentean la presentación antigénica normal; ello, al acoplarse a las moléculas del MHC de la clase II sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos, y a regiones variables específicas de la cadena beta del receptor antigénico de las células T. A través de esta interacción, los SAGs activan las células T que transmiten órdenes, de una magnitud muy superior a las incitadas por la presentación antigénica normal, que resultan en una liberación masiva de citoquinas que, se cree, es responsable de la espectacularidad del TSS.

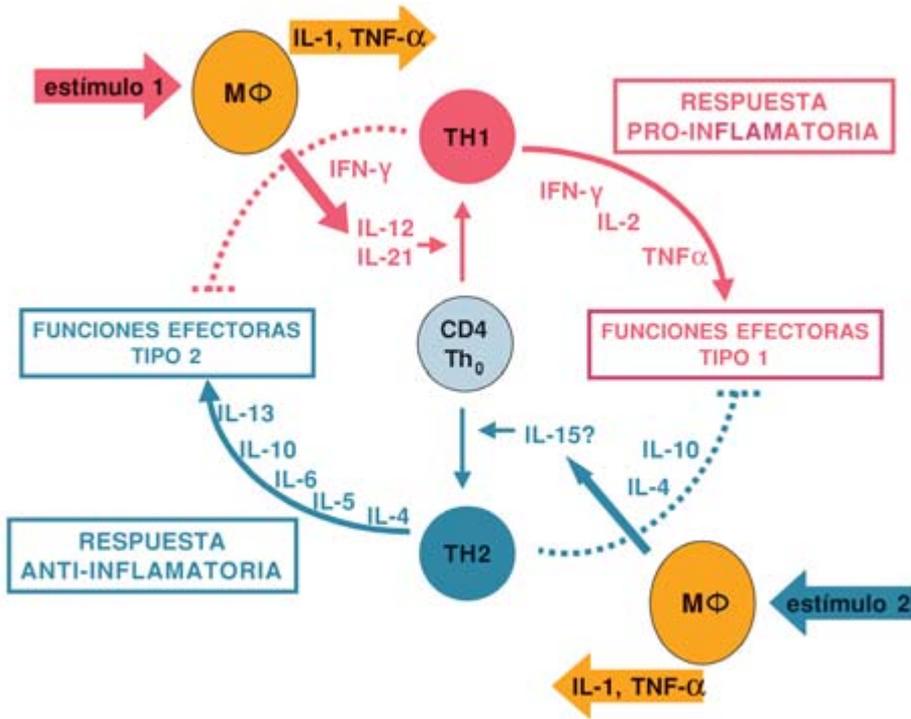


FIGURA 45. El equilibrio entre la respuesta proinflamatoria y antiinflamatoria depende de un complejo entramado de señales citoquímicas. Los macrófagos responden a señales activadoras según patrones bien establecidos pero mal comprendidos. Un determinado estímulo activa los macrófagos que responden produciendo y liberando citoquinas inflamatorias —IL-1 y TNF- α — y, además, señales que condicionan el futuro de células CD4 Th₀. Si el macrófago libera IL-12, CD4 Th₀ compromete su destino hacia un fenotipo tipo 1 (CD4 Th₁), que define una respuesta proinflamatoria que se traduce en la producción de IL-2, TNF- α e interferón γ (INF- γ). Si los macrófagos responden al estímulo inicial liberando IL-15, CD4 Th₀ compromete su destino hacia un fenotipo tipo 2 (CD4 Th₂), que define una respuesta antiinflamatoria que se traduce en la producción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Además, cada tipo de respuesta bloquea la contraria, lo que potencia el efecto final. El resultado final de una respuesta tipo 1 será un cuadro, en principio, de defensa del organismo, y la de una respuesta de tipo 2 condicionará, a la postre, una situación de anergia.

Un mecanismo potencial de apoptosis linfocítica puede deberse a la liberación de glucocorticoides inducida por la situación de estrés inflamatorio, aunque tales hormonas son un fármaco bien asumido⁸⁹. La autopsia de pacientes fallecidos por sepsis/SIRS descubre una pérdida masiva, por apoptosis⁹⁰, de células inmunocompetentes, en especial de células B, células T CD4 y células dendríticas foliculares, que disminuyeron la producción de anticuerpos, la activación de macrófagos y la presentación antigénica, respectivamente. Otros dos hallazgos constantes en las autopsias son necrosis centrolobulillar hepática junto con ne-

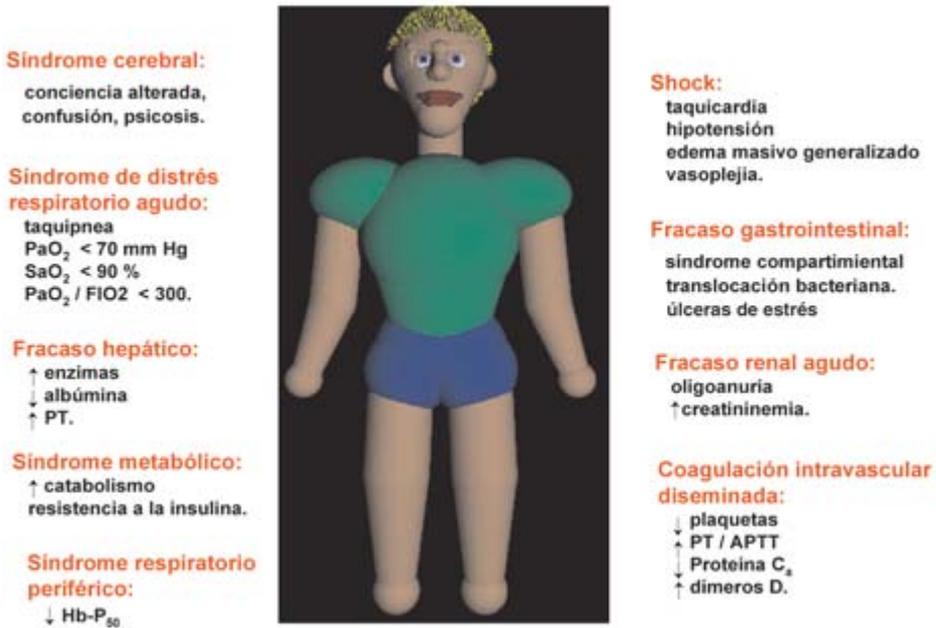


FIGURA 46. El síndrome de disfunción o fracaso orgánico múltiple (MODS) afecta a diferentes órganos y sistemas. El síndrome respiratorio periférico se refiere a un incremento de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno; ello dificulta su extracción por los tejidos, contribuyendo a la distorsión metabólica celular. La causa del incremento de la afinidad por el O₂, que se traduce en una disminución de la p50 —presión parcial de oxígeno arterial (27 mm Hg), a la que la hemoglobina presenta una saturación de O₂ del 50 %—, es una perturbación del metabolismo del eritrocito que compromete la producción de 2,3-bifosfoglicerato, un modulador alostérico de la hemoglobina que facilita la cesión de oxígeno.

crosis focales cerebrales y miocárdicas, y la discordancia entre los hallazgos histopatológicos y el síndrome MODS responsable de la muerte de estos pacientes. El hallazgo patognomónico es una situación generalizada de «hibernación celular» o de «aturdimiento celular» como ocurre durante la fase de preinfarto del miocardio. Presumiblemente la sepsis/SIRS activa mecanismos de defensa que induce a las células a mantener, exclusivamente, las funciones básicas. En resumen, la autopsia no revela porqué mueren los pacientes con sepsis/SIRS.

La causa última de la muerte en pacientes con sepsis/SIRS es el fracaso orgánico múltiple⁹¹. Típicamente, los pacientes desarrollan, en la fase inicial, problemas funcionales en un solo órgano —por ej. fracaso respiratorio que exige respiración mecánica—; si la enfermedad persiste, irán apareciendo problemas en otros órganos y sistemas, hasta abocar en un fracaso multiorgánico que acarreará, sin son más de tres los afectados, la muerte del paciente (**Figura 46**).

La patogénesis del síndrome de fracaso multiorgánico (MODS) es multifactorial y no bien comprendida. La hipoperfusión e hipoxia tisular son los factores dominantes. Por otro lado, los factores involucrados provocan un depósito generalizado de fibrina que causa oclusión microvascular y extravasación, que comprometen aún más la oxigenación tisular, y trastornos en la homeostasis microvascular que resultan de la producción de sustancias vasoactivas como PAF, histamina y prostanoïdes. Los infiltrados celulares, especialmente neutrófilos, dañan directamente los tejidos al liberar enzimas lisosómicas y especies reactivas —radicales libres— derivadas del metabolismo del oxígeno. TNF- α y otras citoquinas incrementan la expresión de iNOS y la de su producto NO, que causa mayor inestabilidad vascular y que puede contribuir a deprimir, de manera directa, el miocardio. A parte de la hipoxia, las células pueden ser disóxicas —incapacidad de utilizar el oxígeno disponible—, otra consecuencia del exceso de la producción de NO, que interfiere la respiración mitocondrial.

En la situación de sepsis/SIRS se produce una liberación de factor tisular por monocitos y células endoteliales que dispara la producción de trombina a través de la vía extrínseca de la coagulación. La activación de PAR1 por trombina puede representar el engarce entre coagulación e inflamación (ver **Figura 18**). PAR1 es expresado sobre la superficie de plaquetas, células endoteliales y neutrófilos. La activación de PAR1 sobre las células endoteliales por trombina conduce a la liberación de mediadores inflamatorios como PGs y NO, mientras que la activación de PAR1 en neutrófilos conduce a la trans migración de estas células hacia el espacio extracelular. Por último, la activación de PAR1 en plaquetas conduce a su adhesión al endotelio y agregación subsiguiente, que potencia el sistema de coagulación y favorece los depósitos de fibrina. Independientemente de la activación de PAR1, la trombina está directamente involucrada en la coagulación al convertir fibrinógeno en fibrina. Por otro lado, el Factor X activado puede actuar directamente sobre las células endoteliales activando una vía no hemostática que utiliza EPR-1, que sinergia su efecto con la activación de PAR1 endotelial por trombina, para forzar al endotelio a producir masivamente IL-6 y NO. El Factor Xa utiliza la vía clásica de la coagulación para incrementar la concentración de trombina al estimular la conversión de protrombina a trombina.

Una causa adicional del estado procoagulante en sepsis/SIRS es el incremento en la producción del procoagulante PAI-1, y la depresión expresiva de tres factores anticoagulantes: antitrombina, inhibidor del factor tisular y proteína C ⁹². Tales anticoagulantes naturales tienen particular importancia porque, además de su efecto amortiguante sobre la generación de trombina, ejercen pro-

iedades anti-inflamatorias al impedir la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. La proteína C (PC) es una serina-proteasa, dependiente de vitamina K que, tras ser activada (aPC) por trombina complejada con trombomodulina, detiene el proceso de coagulación inactivando los factores V y VIII activados. Por otro lado, aPC utiliza el receptor EPCR como un co-receptor de APR1 que, tras esta interacción, induce señales anti-inflamatorias que incitan la expresión de la inmunomoduladora MCP-1. La interacción entre EPCR y APR1 impide a este último responder a trombina. Además, aPC inhibe PAI-1. El factor V Leyden —una variante del factor V de la coagulación— causa un cuadro de hipercoagulabilidad por ser resistente a la aPC; por su parte, la administración de proteína C en sepsis/SIRS ha demostrado resultados optimistas.

El cuadro referido de hipercoagulabilidad e hipofibrinólisis se traduce en el denominado síndrome de «coagulación intravascular diseminada» (DIC), que expresa el fracaso orgánico más precoz del MODS, y cuya traducción clínica es un síndrome paradójicamente hemorrágico que justifica la denominación de «coagulopatía por consumo» con la que también se conoce al síndrome ⁹³. El hecho distintivo de DIC es la formación intravascular diseminada de fibrina que provoca la oclusión trombótica de los pequeños vasos (**Figura 47**). La coagulación intravascular compromete el aporte de sangre a tejidos y a órganos y, junto con las alteraciones hemodinámicas y metabólicas, contribuye al MODS. A la vez, la utilización masiva y la subsiguiente depleción de factores de coagulación y de plaquetas resultantes de la coagulación progresiva y mantenida inducen hemorragia masiva que, en ocasiones, puede ser el primer síntoma del síndrome.

El síndrome DIC tiene un efecto dominó, al que siguen, secuencialmente o en paralelo, el fracaso de otros órganos —MODS: síndrome de distrés respiratorio agudo ⁹⁴; fracaso renal agudo ⁹⁵; disfunción gastrointestinal acompañada de hemorragia digestiva y translocación bacteriana ⁹⁶, o insuficiencia cardiaca ⁹⁷— que agravan, progresivamente, el pronóstico de la situación. Por su repercusión sobre todo el panorama descrito, junto con DIC, los disturbios endocrinos y metabólicos en la sepsis tienen especial relevancia ⁹⁸.

La respuesta metabólica inicial a la sepsis está estrechamente regulada por cambios endocrinos específicos, que inactivan vías anabólicas e incrementan la actividad hipofisaria anterior. Durante la sepsis, no solo varía la cantidad de hormonas sino también el patrón de secreción. La resistencia a la insulina es una de las características del paciente séptico, y parece que, en la respuesta metabólica a la sepsis, se perturba el equilibrio entre insulina y sus hormonas contrarreguladoras —cortisol, glucagón, hormona del crecimiento y catecolami-

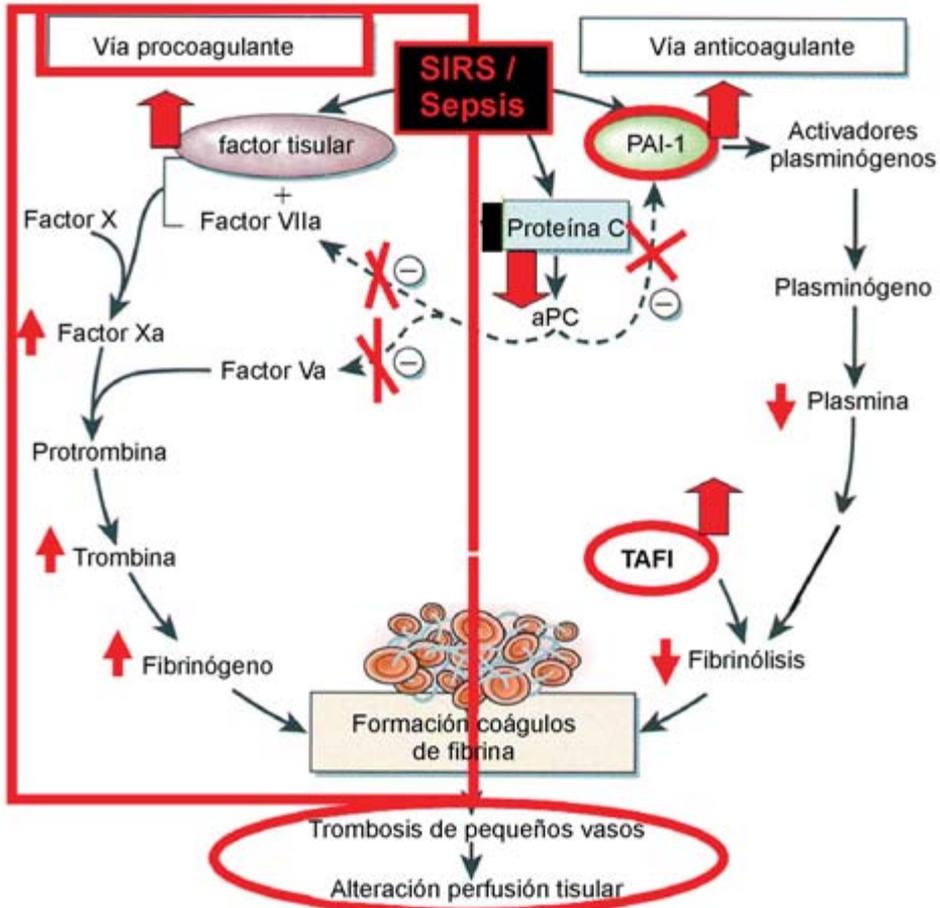


FIGURA 47. Sepsis/SIRS alteran el equilibrio homeostático normal entre mecanismos procoagulantes y anticoagulantes. Se produce una producción y secreción incrementadas de factor tisular que, a través de la vía extrínseca de la coagulación que utiliza inicialmente factor VIIa, provoca un aumento significativo de producción de trombina, que genera fibrina a partir de fibrinógeno. Simultáneamente, incrementa la producción de inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), que resulta en una disminución de la producción de plasmina y, con ello, un fracaso de los mecanismos fibrinolíticos; la fibrina es convertida en productos de degradación (FDP), de especial significado en diagnóstico clínico del síndrome de coagulación intravascular diseminada. Sepsis/SIRS también causa una disminución de la producción del anticoagulante natural proteína C, cuya activación (aPC) inhibe las vías extrínseca (inhibe al factor VII activado) e intrínseca (inhibe al factor V activado), de la coagulación. aPC también es un potente antitrombótico, a la vez que inhibe PAI-1 y TAFI. Todo ello hace que la disminución de aPC tenga un importante efecto procoagulante, cuyo resultado neto es la formación de depósitos de fibrina en el territorio microvascular, que provoca una alteración de la oxigenación tisular y, finalmente, daño celular. Modificada de: Cohen ⁹²; fig. 2, pág. 887.

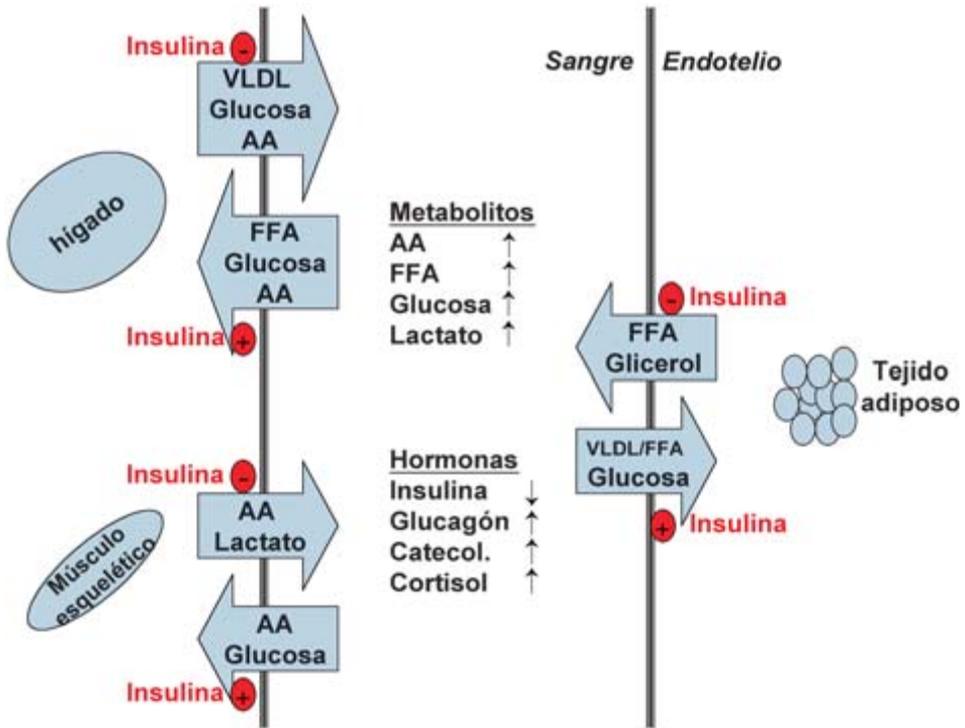


FIGURA 48. Sepsis/SIRS induce cambios en el perfil hormonal y metabólico. Modificada de: Kaeseler et al.⁹⁷; fig. 1, pág. 415.

nas—, que estimulan la gluconeogénesis y la glicogenólisis hepáticas e inhiben la captación de glucosa mediada por insulina. En la situación séptica, el conjunto de respuestas endocrinas se torna hacia el catabolismo (**Figura 48**). En condiciones basales, el nivel de glucosa está regulado por la oferta hepática, siendo el sustrato metabólico principal los ácidos grasos libres (FFAs). Parece que durante la sepsis, uno de los problemas metabólicos principales es la incapacidad de utilizar FFAs como sustrato metabólico. Normalmente, la oferta hepática de glucosa depende de la glicogenólisis y resíntesis a partir de carbonos reciclados (por ej. lactato y glicerol), y en mucho menor grado por gluconeogénesis a partir de aminoácidos (AAs) como alanina y glutamina; todo ello está marcadamente alterado en la sepsis. La resistencia periférica a la insulina resulta en una disponibilidad incrementada de FFAs y de AAs como resultado de un desplazamiento hacia lipólisis y proteólisis. La función hepática como reguladora de la glucemia también se ve afectada como resultado de la resistencia

hepática a la insulina, lo que se traduce en un incremento de la oferta hepática de glucosa, primero resultante de glicogenolisis y, luego, de gluconeogénesis.

La pérdida de masa muscular resultante de la postración y de la respuesta catabólica es significativa en sepsis, que se caracteriza por una inhibición de la síntesis y un incremento de la degradación proteicas. Los AAs liberados al torrente circulatorio son captados por el hígado, que los utiliza para sintetizar proteínas APR y como sustrato gluconeogénico, en competencia con enterocitos y polimorfonucleares neutrófilos que también utilizan glutamina como sustrato energético. Los responsables del cuadro metabólico son IL-1, que induce un incremento indirecto de la producción de cortisol, tras provocar la liberación hipofisaria de ACTH, y TNF- α , que induce directamente la liberación de cortisol por las glándulas suprarrenales. El músculo séptico, aunque capta glucosa mediante un transportador independiente de insulina, es resistencia al efecto anabólico de esta y, también, a IGF-1 que media la acción de la hormona de crecimiento.

La concentración plasmática de FFAs se eleva significativamente, en parte como resultado de la resistencia hepática a la insulina y, en parte, por la resistencia del tejido adiposo a esta misma hormona. La glucosa es metabolizada en el hepatocito a malonil-CoA, que inhibe la carnitina-palmitoil transferasa, la enzima de la membrana mitocondrial responsable del transporte de los FFAs de cadena larga al interior mitocondrial para su oxidación. El acúmulo de malonil-CoA también incrementa la síntesis hepática de FFAs, triglicéridos y VLDL. Se conoce que existen receptores de FFA entre otros, en las células del sistema inmunológico.

La hiperglicemia incrementa la cascada de adhesión leucocitaria; efecto que no es dependiente de cambios en la osmolaridad sino de un incremento en la expresión de moléculas de adhesión (**Figura 49**). Glucosa y FFAs, en concentraciones elevadas, incrementan la concentración celular de especies reactivas de oxígeno que, tras interaccionar con NO, dan lugar a nuevos radicales que activa NF- κ B, responsable de la expresión de aquellas moléculas. Por otro lado, la hiperglicemia y la resistencia a la insulina afectan las funciones básicas de los fagocitos, lo que podría acarrear consecuencias negativas sobre la función fagocítica en la sepsis. MIF es una citoquina reguladora que estimula la función de los macrófagos y contrarresta los efectos de los glucocorticoides sobre estas células. MIF es secretado constitutivamente por la hipófisis anterior, por las células inmunocompetentes en respuesta a los estímulos proinflamatorios y por las células β pancreáticas en respuesta a la estimulación por glucosa actuando de manera autocrina para estimular la secreción de insulina. MBL juega un papel importante en la inmunidad innata; un déficit de MBL, que depende de insulina, se asocia con una susceptibilidad incrementada a las infecciones. Por últi-

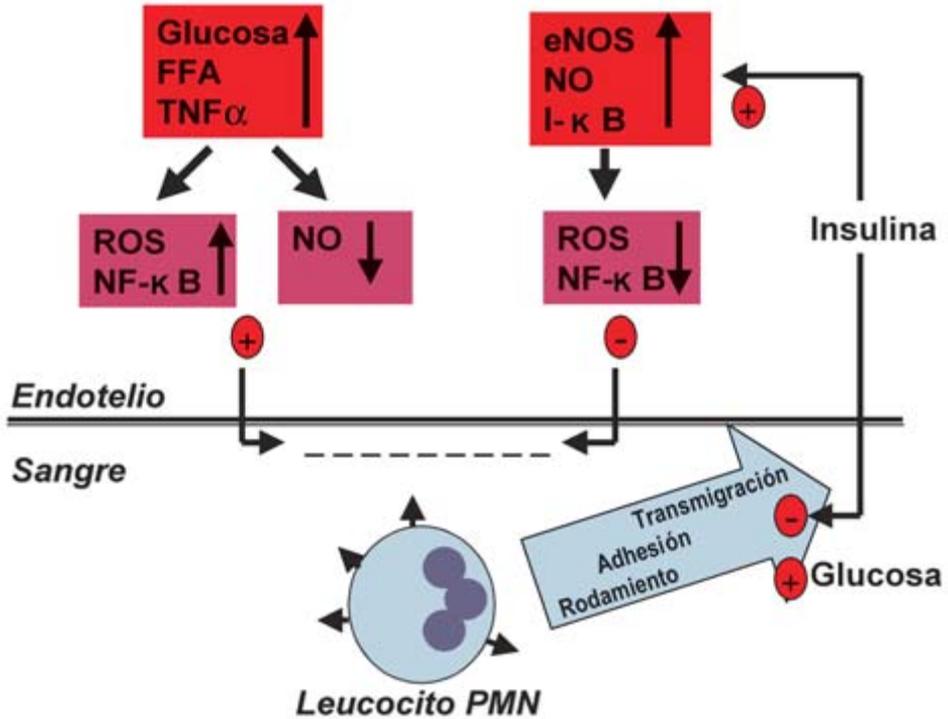


FIGURA 49. Efectos de insulina, glucagón y FFA sobre la expresión de moléculas de adhesión celular (CAM) y de las interacciones entre leucocitos y endotelio. Modificada de: Kaeseler et al.⁹⁷; fig. 2, pág. 417.

mo, la insulina tiene un efecto anticitoquínico, en especial respecto a TNF- α e IL-6, y TNF- α e IL-1 β están involucrados en el desarrollo de la resistencia a la insulina característica de la sepsis.

Un nuevo ingrediente que se considera en el MODS son las consecuencias crónicas del shock séptico⁹⁹. Pacientes que se han recuperado del MODS muestran, a los treinta días de dar por resuelta la situación, una mortalidad del 30-50 %; y algunos estudios señalan la persistencia de un riesgo significativo de morir, durante, al menos, los ocho años siguientes del alta hospitalaria. Ello parece significar que la inflamación generalizada y grave, que significa el cuadro de shock inflamatorio, pone en marcha una respuesta inflamatoria, disregulada, que tiene consecuencias a largo plazo respecto a la respuesta del huésped a otros retos.

Retomando el sentir de Lewis Thomas —«un observador de la biología»—, es la inflamación desmedida cuando se produce —“fuego amigo”—, más que la agresión, la causa principal de la enfermedad y su desenlace. Existe un amplio consenso sobre que la sepsis/SIRS es el resultado de la incapacidad de controlar la respuesta inflamatoria. Y desde el lado de las repercusiones a largo plazo de la inflamación, son abundantes y vienen de lejos, los datos que ligan hipercolesterolemia y aterogénesis, pero solo recientemente se ha apreciado que son mecanismos inflamatorios los que acoplan ambos términos. El reclutamiento leucocitario y la expresión de citoquinas proinflamatorias caracterizan las fases iniciales del ateroma, y vías inflamatorias promueven trombosis, una complicación letal de la aterosclerosis. Por su parte, el espectro de enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central se ha ido expandiendo desde las enfermedades autoinmunes clásicas, como la esclerosis múltiple, a aquellas en las que, como el Alzheimer, existe una respuesta inmune innata provocada por la producción local de proteína- β amiloide, una proteína de la fase aguda de la respuesta inflamatoria. Y datos recientes apoyan el concepto de que la inflamación es un componente crítico de la progresión tumoral. Muchos cánceres se desarrollan a partir de infección, irritación e inflamación, y se ha hecho evidente que el microambiente tumoral, que está orquestado en gran parte por células inflamatorias, es un participante indispensable en el proceso neoplásico, apoyando la proliferación, la supervivencia y la migración celular.

«La vida es breve; la ciencia, extensa; la ocasión, fugaz; la experiencia, insegura; el juicio, difícil. Es preciso no sólo disponerse a hacer lo debido uno mismo, sino además [que colaboren] el enfermo, los que le asisten, y las circunstancias externas», así comienzan los *Aforismos* hipocráticos. Aplíquese a la inflamación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ursula Weiss (2002) Nature insight: Inflammation. *Nature* 420: 845.
2. Klaus Ley (2001) History of inflammation research. En: K Ley, ed. *Physiology of Inflammation*. Oxford: Oxford University Press; pág. 1-10. El libro de K. Ley ofrece, en 24 cap. que ocupan 525 pág. escritas, en colaboración, por 42 autores; aunque ya tiene media docena de años, es uno de los mejores y actualizados textos sobre inflamación.
3. Cyril P. Bryan (1974) *Ancient Egyptian medicine: The Papyrus Ebers*. Chicago, IL: Ares Publishers Inc.
4. *Tratados hipocráticos. VI: Enfermedades*. Traducciones, introducciones y notas de Assela Alamillo Sanz y M.^a Dolores Lara Nava. Madrid: Editorial Gredos-Biblioteca Clásica 143, 1990.

5. Aurelio Cornelio Celso. *Los ocho libros de la Medicina*. Traducción directa del latín, prólogo y notas de Agustín Blázquez. Barcelona: Gráficas Diamante - Obras Maestras, 1966; vol. I: libros I-IV, vol. II: libros V-VIII.
6. Galeno de Pérgamo. *Sobre la localización de las enfermedades*. Traducción y notas de Salud Andrés Aparicio. Madrid: Editorial Gredos S A - Biblioteca Clásica 248, 1997.
7. *Tratados hipocráticos. VIII: Sobre la naturaleza del hombre*. Introducción, traducción y notas de Jorge Cano Cuenca. Madrid: Editorial Gredos S A - Biblioteca Clásica 307, 2003. Raymond Klibansky, Edwin Panofsky & Fritz Saxo (1991) La melancolía en la literatura fisiológica de la Antigüedad. 1. La doctrina de los cuatro humores. En: R Klibansky et al., eds. *Saturno y la Melancolía. Estudios de historia de la filosofía de la naturaleza, la religión y el arte*. Versión española de María Luisa Balsero. Madrid: Alianza Editorial S A - Alianza Forma 100. San Isidoro de Sevilla. Acerca de la medicina: Sobre los cuatro humores del cuerpo. En: *Etimologías*. Texto latino, versión española y notas por José Oroz Reta y Maule-A. Marcos Casquero. Madrid: BAC, 2004.
8. Rene Dutrochet (1824) *Recherches anatomiques et physiologiques sur la structure intime des animaux et des végétaux, et sur leur motilité*. Paris: Ballière et Fils.
9. Rudolf Wagner (1839) *Erläuterungstafeln zur Physiologie und Entwicklungsgeschichte*. Leipzig: Leopold Voss.
10. Rudolf L. C. Virchow (1871) *Die Cellularpathologie in Ihrer Begründung auf Physiologische und Pathologische Gewebelehre*, 4ª ed. Berlin: August Hirschwald Verlag.
11. William Addison (1843) *Experimental and practical researches on inflammation and on the origin and nature of tubercles of the lung*. London: Churchill. Augustus V. Waller (1846) Microscopic observation on the perforation of the capillaries by the corpuscles of the blood, and on the origin of mucus and pus-globules. *London, Edinburgh and Dublin Philosophical Magazine* 29:397-405.
12. Henry Brown (1995) Ilya Mechnikov and his studies on comparative inflammation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 209: 99-101.
13. Julius Cohnheim (1877) *Lectures on General Pathology: A Handbook for Practitioners and Students*. Londres: The New Sydenham Society, 1889 (ed. inglesa).
14. Max J. S. Schultze (1865) Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes. *Archiv. F. Mikroskop Anatomie* 1:1-42.
15. Nicolas M. Arthus (1903) Injections répétées de serum du cheval zhez le lapin. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie*, Paris, 55: 817-820.
16. Eliot R. Clark y Eleanor L. Clark (1935) Observations on changes in blood vascular endothelium in the living animal. *American Journal of Anatomy* 57: 385-438.
17. Luis Urtubey (1937) Concepto filosófico de la inflamación. Causas, límites, terreno. Conferencia desarrollada en la Facultad de Medicina de Valencia el 23 de abril de 1937. Separata de *Anales de la Universidad de Valencia*, Segunda época. Valencia: Gráficas Vives Mora.

18. H. C. L. Heilmeyer & H. J. Kähler (1962) *Die entzündung und ihre steuerung*. Basel/Stuttgart: Benno Schwabe Co. - Verlag. Versión española de F. Cervantes — *La inflamación. Su regulación y tratamiento*— para Ediciones Toray S. A. (Barcelona), 1964; págs. xi-xii.
19. F. Büchner (1950) *Allgemeine Pathologie*. Munich/Berlin: Urban & Schwarzenberg.
20. Lewis Thomas (1971) En: B. K. Forscher & J. C. Houck, eds. *Immunopathology of inflammation*. Amsterdam: Excerpta Medica; pág. 1.
21. Gerald Weissmann (1974) Introduction. En: G. Weissmann, ed. *Mediators of inflammation*. New York / London: Plenum Press; pág. 6-7.
22. Philip E. Auron, Andrew C. Webb, Lanny J. Rosenwasser, Steven F. Mucci, Alexander Rich, Sheldon M. Wolff & Charles A. Dinarello (1984) Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 81 (24): 7907-11. Chau-Ching Liu, Martin Steffen, Frank King & John Ding-E Young (1987) Identification, isolation, and characterization of a novel cytotoxin in murine cytolytic lymphocytes. *Cell* 51 (3):393-403. Michael P. Bevilacqua, Jordan S. Pober, M. E. Wheeler, Ramzi S. Cotran & Michael A. Gimbrone (1985) Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *Journal of Clinical Investigation* 76 (5): 2003-11. Michael P. Bevilacqua, Jordan S. Pober, Donna L. Mendrick, Ramzi S. Cotran, and Michael A. Gimbrone (1987) Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA.* 84 (24): 9238-42.
23. G. Vejlens (1938) The distribution of leukocytes in the vascular system. *Acta Pathologica and Microbiologica Scandinavica* Suppl. 33:1-239.
24. V. T. Marchesi & H. W. Florey (1960) Electron micrographic observations on the emigration of leukocytes. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognitive Medical Science* 45 (4): 343-8. V. T. Marchesi & J. L. Gowans (1964) The Migration of Lymphocytes through the Endothelium of Venules in Lymph Nodes: An Electron Microscope Study. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 159 (975): 283-290.
25. A. J. Goldman, R. G. Cox & H. Brenner (1967) Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall - II Couette flow. *Chemical Engineering Science* 22:653-60. A. Atherton & G. V. Born (1972) Quantitative investigations of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leucocytes to blood vessel walls. *Journal of Physiology* (Lond.) 222 (2): 447-74. A. Atherton & G. V. R. Born (1973) Relationship between the velocity of rolling granulocytes and that of the blood flow in venules. *Journal of Physiology* (Lond.) 233 (1): 157-65.

26. Harold A. Abrahamson (1927) The mechanisms of the inflammatory process. I. The electrophoresis of the blood cells of the horse and its relation to leukocyte emigration. *Journal of Experimental Medicine* 46 (6): 987-1002.
27. Eric A. Jaffe, Ralph L. Nachman, Carl G. Becker & C. Richard Minick (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. *Journal of Clinical Investigation* 52 (11):2745-56.
28. H. B. Stamper & J. J. Woodruff (1976) Lymphocyte homing into lymph nodes: In vitro demonstration of the selective affinity of recirculating lymphocytes for high-endothelial venules. *Journal of Experimental Medicine* 144 (3):828-33.
29. Benjamin W. Zweifach, Lester Grant & Robert T. McCluskey, eds. (1965) *The Inflammatory process*. New York: Academic Press. John I. Gallin, Ira M. Goldstein & Ralph Snyderman, eds. (1992) *Inflammation. Basic principles and clinical correlates*, 2^a. ed. New York: Raven Press Ltd.
30. Carl Nathan (2002) Points of control inflammation. *Nature* 420: 846-52.
31. Michaeline Bunting, Estelle S. Harris, Thomas M. McIntyre, Stephen M. Prescott & Guy A. Zimmerman (2002) Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving [beta] 2 integrins and selectin ligands. *Current Opinion in Hematology* 9 (1): 30-35.
32. Douwe H. Biesma, André J. Hannema, Heleen van Velzen-Blad, Leontine Mulder, Rob van Zwieten, Irma Kluijt & Dirk Roos (2001) A family with complement factor D deficiency. *Journal of Clinical Investigation* 108 (2): 233-240.
33. Robert Soiffer, Thomas Lynch, Martin Mihm, Ken Jung, Catherine Rhuda, Jan C. Schmollinger, F. Stephen Hodi, Laura Liebster, Prudence Lam, Steven Mentzer, Samuel Singer, Kenneth K. Tanabe, A. Benedict Cosimi, Rosemary Duda, Arthur Sober, Atul Bhan, John Daley, Donna Neuberg, Gordon Parry, Joseph Rokovich, Laurie Richards, Jan Drayer, Anton Berns, Shirley Clift, Lawrence K. Cohen, Richard C. Mulligan & Glenn Dranoff (1998) Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95 (22): 13141-13146.
34. Alvaro Morales (1996) Intravesical therapy of bladder cancer: an immunotherapy success story. *International Journal of Urology* 3 (5): 329-333.
35. Carl Nathan (2002) *Ibid* ³⁰.
36. Bin-Bing S. Zhou & Stephen J. Elledge (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408: 433-9. Pedro García Barreno (2001) Maquinaria de reparación del ADN. En: María Cascales, ed. *Proliferación celular y cáncer 2000*. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia, Monografía VIII, págs. 145-75.

- Alan R. Lehmann (2001) The xeroderma pigmentosum group D (*XPD*) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes & Development* 15: 15-23. David M. J. Lillley & Malcolm F. White (2001) The junction-resolving enzymes. *Nature Review of Molecular Cell Biology* 2 (6): 433-43. Chris J. Norbury & Ian D. Hickson (2001) Lisa M. Coussens & Zena Werb (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-7. Cellular responses to DNA damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41: 367-402. Marcus S. Cooke, Mark D. Evans, Miral Dizdaroglu & Joseph Lunec (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal* 17: 1195-1214. Zhao-Hui Wu, Yuling Shi, Randal S. Tibbetts & Shigeki Miyamoto (2006) Molecular linkage between the kinase ATM and NF- κ B signalling in response to genotoxic stimuli. *Science* 311: 1141-6.
37. Jiri Bartek & Jiri Lukas (2006) The stress of finding NEMO. *Science* 311: 1110-1.
38. A. Graham Pockley (2001) Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? *Expert Reviews in Molecular Medicine* 21 sept. En: www-ermm.cbcu.cam.ac.uk. María Cascales (2002) *Proteínas del estrés y carabinas moleculares. Proyecciones clínicas y terapéuticas*. Discurso inaugural del Curso académico. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia, en www.ranf.com/publi/ina.html. Alberto J. L. Macario & Evely Conway de Macario (2005) Sick chaperones, cellular stress, and disease. *The New England Journal of Medicine* 353 (14): 1489-501.
39. Susanne Müller, Paola Scaffidi, Bernard Degryse, Tiziana Bonaldi, Lorenza Ronfani, Alessandra Agresti, Monica Beltrame & Marco E. Bianchi (2001) The double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *The EMBO Journal* 20 (16): 4337-40. Paola Scaffidi, Tom Misteli & Marco E. Bianchi (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418: 191-5. Christopher J. Czura, Huan Yang & Kevin J. Tracey (2003) High mobility group box-1 as a therapeutic target downstream of tumor necrosis factor. *The Journal of Infectious Diseases* 187 (Suppl. 2): S391-6. Huan Yang, Haichao Wang, Christopher J. Czura & Kevin J. Tracey (2005) The cytokine activity of HMGB1. *Journal of Leukocyte Biology* 78 (2): 1-8.
40. Elliott Schiffmann, Barbara A. Corcoran & Sharon M. Wahl (1975) N-Formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 72 (3): 1059-62. Harvey Carp (1982) Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *Journal of Experimental Medicine* 155: 264-75. John S. Mills, Heini M. Miettinen, Michael J. Vlasses & Algirdas J. Jesaitis (1999) The N-formyl peptide receptor. Structure, signalling, and disease. En: Charles N. Sheran & Peter A. Ward, eds. *Molecular and Cellular Basis of Inflammation*. Totowa, New Jersey: Humana Press; cap. 10, pág. 215-45. Katharina Wenzel-Seifert & Roland Seifert (2001) Chemoattractant receptor-G-protein coupling. En Klaus Ley ², *Ibid*, pág. 146-88. Huamei Fu, Jennie Karlsson, Johan Bylund, Charlotta Movitz, Anna Karlsson & Claes Dchlgren

- (2006) Ligand recognition and activation of formal peptide receptors in neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 79 (2): 247-56.
41. Los mastocitos o células cebadas de Ehrlich, cuyas vías de diferenciación y heterogeneidad todavía no son bien conocidas, se originan de precursores del linaje hematopoyético y circulan por los sistemas sanguíneo y linfático antes de acomodarse en los tejidos y adquirir sus características efectoras finales. Los mastocitos producen una impresionante batería de mediadores que confiere a la célula cierta distinción en el sistema inmunológico. Muchos de tales mediadores —histamina, proteasas (triptasa) y TNF- α — son liberados muy rápidamente mediante exocitosis a partir de abundantes reservas intracelulares. Tras la activación, los mastocitos sintetizan, también rápidamente, metabolitos activos de ácido araquidónico, prostaglandinas y leucotrienos; y también se activa con rapidez un programa de expresión génica que conduce a la síntesis de novo de varias citoquinas, quimioquinas y, de nuevo, TNF- α . De esta guisa, el mastocito activado influye sobre el sistema vascular a través de los potentes metabolitos vasoactivos histamina e eicosanoides; sobre monocitos y linfocitos a través de las propiedades quimiotácticas y diferenciales de quimioquinas y citoquinas, y sobre la matriz extracelular a través de potentes hidrolasas. Christophe Benoist & Diane Mathis (2002) Mast cells in autoimmune disease. *Nature* 420: 875-8.
 42. Elke Schneider, Malvyne Rolli-Derkinderen, Michel Arock & Michel Dy (2002) Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends in Immunology* 23 (5): 255-63.
 43. Stephen L. Tilley, Thomas M. Coffman & Beverly H. Koller (2001) Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The Journal of Clinical Investigation* 108 (1): 15-23. Roy J. Soterman & Peter Christmas (2003) The organization and consequences of eicosanoid signalling. *The Journal of Clinical Investigation* 111 (8): 1107-13.
 44. Tom M. Cocks & James D. Moffatt (2000) Protease-activated receptors: sentries for inflammation? *Trends in Pharmacological Sciences* 21 (3): 103-8. Giuseppe Cirino, Claudio Napoli, Mariarosaria Bucci & Carla Cicala (2000) Inflammation-coagulation network: are serine protease receptors the knot? *Trends in Pharmacological Sciences* 21 (5): 170-2. Stefano Fiorucci & Eleonora Distrutti (2002) Role of PAR2 in pain and inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences* 23 (4): 153-5. Valeria S. Ossovskaya & Nigel W. Bunnett (2004) *Protease-Activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease*. *Physiol. Rev.* 84: 579-621.
 45. Maria J. Marinissen & J. Silvio Gutkin (2001) G-protein-coupled receptors and signalling networks: emerging paradigms. *Trends in Pharmacological Sciences* 22 (7): 368-76. Kristen L. Pierce, Richard T. Premont & Robert J. Lefkowitz (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3: 639-50.

46. Thomas M. McIntyre, Guy A. Zimmerman & Stephen M. Prescott (1999) Biologically active oxidized phospholipids. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (36): 25189-92. Stephen M. Prescott, Guy A. Zimmerman, Diana M. Stafforini & Thomas M. McIntyre (2000) Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annual Review of Biochemistry* 69: 419-45. Nobuyuki Fukushima, Isao Ishii, James J. A. Contos, Joshua A. Weiner & Jerold Chun (2001) Lysophospholipid receptors. *Annual Reviews of Pharmacology & Toxicology* 41: 507-34. Timothy Hla, Menq-Jer Lee, Nicolas Ancellin, Ji H. Paik & Michael J. Kluk (2001) Lysophospholipids - Receptors revelations. *Science* 294: 1875-8.
47. Sabine Böckmann & Inge Paegelow (2000) Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 68 (11): 587-92. Urs Eriksson, Ursula Danilczyk & Josef M. Penninger (2002) Just the beginning: novel functions for angiotensin-converting enzymes. *Current Biology* 12: R745-52. Alvin H. Schmaier (2002) The plasma kallikrein-kinin system counterbalances the rennin-angiotensin system. *The Journal of Clinical Investigation* 109 (8): 1007-9.
48. Horst Ibelgauf (2006) *COPE: Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopaedia* (version 18.0) En <http://www.copewithcytokines.de>. Elías J. Fernández & Elías Lolis (2002) Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 42: 469-99. Katsutoshi Ozaki & Warren J. Leonard (2002) Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (33): 29355-8. Andrew D. Luster (1998) Chemokines - Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *The New England Journal of Medicine* 338 (7): 436-45.
49. ILs-1 = 17 kDa (153-159 aminoácidos); IL-6 = 185 aa.; TNF- α = 157 aa., no glicosilado).
50. Los datos de clonación han permitido agrupar los receptores de citoquinas en una familia génica y dos subfamilias. La familia de receptores de citoquinas tipo 1 (CRF1: *cytokine receptor family type 1*) incluye, entre otros, los receptores de IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e IL, y también los de trombopoyetina, hormona del crecimiento y prolactina. La familia de receptores de citoquinas tipo 2 (CRF2), comprende, entre otros, los receptores de IFNs e IL-10. Por su parte, aproximadamente, 500-10000 receptores de alta afinidad para TNF- α se expresan sobre la superficie de todos los tipos celulares somáticos a excepción de los eritrocitos. El receptor contiene en su extremo C-terminal citosólico un "domino muerte" involucrado en la apoptosis. Al menos tres isoformas conforman la familia de TNF-Rs; además existe una forma truncada soluble que bloquea, por competencia, las acciones de la interacción del TNF con su receptor *in situ*.
51. Véronique Witko-Sarsat, Philippe Rieu, Béatrice Descamps-Latscha, Philippe Le-savre & Lise Halbwachs-Mecarelli (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation* 80 (5): 617-53. R. L. Juliano (2002) Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton:

- Functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* 42: 283-323. Paul Kubes (2002) Introduction: The complexities of leukocyte recruitment. *Seminars in Immunology* 14: 65-72. Diane Marshall & Dorian O. Haskard (2002) Clinical overview of leukocyte adhesion and migration: where are we now? *Seminars in Immunology* 14: 133-40. William A. Muller (2002) Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Laboratory Investigation* 85 (5): 521-33. T. S. Olson & Klaus Ley (2002) Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative & Comparative Physiology* 283 (1): R7-R28. William A. Muller (2002) Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Laboratory Investigation* 82 (5): 521-33. Motomu Shimaoka, Junichi Takagi & Timothy A. Springer (2002) Conformational regulation of integrin structure and function. *Annual Review of Biophysic & Biomolecular Structure* 31: 485-516. Christian Weber (2003) Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. *Journal of Molecular Medicine* 81: 4-19. Julie A. Lekstrom-Himes & John I. Gallin (2000) Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *The New England Journal of Medicine* 343 (23): 1703-14. Joan M. Cook-Mills & Tracy L. Deem (2005) Active participation of endothelial cells in inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 77 (4): 487-95. Klaus Ley & Adam Brooke (visitado: diciembre 2006) *Inflammation: The leukocyte adhesion cascade*. En: <http://bme.virginia.edu/ley/menu.html>.
52. Michael B. Lawrence (2001) *In vitro* models of leukocyte adhesion. En: *Ibid* ²; pág. 204-21.
 53. John Savill & Chris Haslett (1991) Resolution of inflammation. En: *Ibid* ²; pág. 496-25. M Tarek Elghetany, & Francis Lacombe (2003) Physiologic variations in granulocytic surface antigen expression: impact of age, gender, pregnancy, race, and stress. *Journal of Leukocyte Biology* 75 (10): 157-62.
 54. Perter J. Delves & Ivan M. Roit (2000) The immune system. *New England Journal of Medicine* 343 (1): 37-49, 1^a parte, y (2): 108-17, 2^a parte. Kenneth T. Miyasaki (acceso: dic. 2006). Course name & number: Oral Biology 471b: *Basic immunology* (Course materials). En: http://www.dent.ucla.edu/Curriculum/course_outline.asp?id=99.
 55. Heinz Baumann & Jack Gauldie (1994) The acute phase response. *Immunology Today* 15 (2): 74-80. Diana M. Steel & Alexander S. Whitehead (1994) The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunology Today* 15 (2): 81-8. C. Erik Hack, Gert-Jan Wolbink, Caspar Schalkwijk, Han Speijer, Willem Th. Hemens & Henk van den Bosch (1997) A role for secretory phospholipase A₂ and C-reactive protein in the removal of injured cells. *Immunology Today* 18 (3): 111-5. Herbert Tilg, Charles A. Dinarello & James W. Mier (1997) IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunology Today* 18 (9): 428-32. Jeffrey D. Hasday

- & Ishwar S. Singh (2000) Fever and the heat shock response: distinct, partially overlapping processes. *Cell Stress & Chaperones* 5 (5): 471-80.
56. Peter Libby (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-74. Giampaolo Merlini & Vittorio Bellotti (2003) Molecular mechanisms of amyloidosis. *The New England Journal of Medicine* 349 (6): 583-96.
 57. Gerard C. Blobe, William P. Schiemann & Harvey F. Lodish (2000) Role of transforming growth factor β in human disease. *The New England Journal of Medicine* 342 (18): 1350-8.
 58. Mark J. Walport (2001) Complement. *New England Journal of Medicine* 344 (14): 1058-66, 1^a parte, y 344 (15): 1140-4, 2^a parte. Dimitrios Mastellos & John D. Lambris (2002) Complement: more than a 'guard' against invading pathogens? *Trends in Immunology* 23 (10): 485-91. Craig Gerard (2003) Complement C5a in the sepsis syndrome - Too much of a good thing? *The New England Journal of Medicine* 348 (2): 167-9.
 59. C. Erik Hack, Gert-Jan Wolbink, Caspar Schalkwijk, Han Speijer, Willem Th. Hermans & Henk van den Bosch (1997) A role for secretory phospholipase A2 and C-reactive protein in the removal of injured cells. *Immunology Today* 18 (3): 111-5.
 60. Tomas Ganz & Robert I. Lehrer (1999) Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Molecular Medicine Today* 5: 292-7. Ofer Levy (2000) Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. *Blood* 96 (8): 2664-72. Robert E. W. Hancock & Daniel S. Chapple (2002) Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43 (6): 1317-23. Da Yang, Arya Biragyn, Larry W. Kwak & Joost J. Oppenheim (2002) Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends in Immunology* 23 (6): 291-6. Michael Zasloff (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-95. Enrique Zudaire, Sergio Portal-Núñez & Frank Cuttita (2006) The central role of adrenomedullin in host defense. *Journal of Leukocyte Biology* 80: 237-44.
 61. K. Matsuzaki (1999) Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1462: 1-10. Y. Shai (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipids bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1462: 55-70. L. Yang, T. M. Weiss, R. Lehrer & H. W. Huang (2000) Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophysical Journal* 79: 2002-9.
 62. Alan R. Brash (1999) Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (34): 23679-82. Thomas M. McIntyre, Guy A. Zimmerman & Stephen. Prescott (1999) Biologically active oxidized phospholipids. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (36): 25189-92. Michael C. Seeds & David A. Bass (1999) Regulation and metabolism

- of arachidonic acid. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 17: 5-26. William B. Campbell (2000) New role for epoxyeicosatrienoic acids as anti-inflammatory mediators. *Trends in Pharmacological Sciences* 21 (4): 125-7. Derek A. Willoughby, Adrian R. Moore & Paul R. Colville-Nash (2000) Cyclopentanone prostaglandins - new allies in the war on inflammation. *Nature Medicine* 6 (29): 137-8. Alan R. Brash (2001) Arachidonic acid as bioactive molecule. *The Journal of Clinical Investigation* 107 (11): 1339-45. F. A. Fitzpatrick & Roy Soberman (2001) Regulated formation of eicosanoid. *The Journal of Clinical Investigation* 107 (11): 1347-51. Colin D. Funk (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-5. Charles N. Serhan & Ernst Oliw (2001) Unorthodox routes to prostanoid formation: new twists in cyclooxygenase-initiated pathways. *The Journal of Clinical Investigation* 107 (12): 1481-89. Niels C. Riedemann & Peter A. Ward (2002) Oxidized lipid protects against sepsis. *Nature Medicine* 8 (10): 1084-5.
63. Lawrence J. Marnett, Scott W. Rowlinson, Douglas C. Goodwin, Amit S. Kalgutkar & Cheryl A. Lanzo (1999) Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (33): 22903-6. Garret A. FitzGerald & Patrick Loll (2001) Series introduction: COX in a crystal ball: current status and future promise of prostaglandins research [Perspective series: Prostaglandins and their precursors (G. A. FitzGerald, Series ed.)] *The Journal of Clinical Investigation* 107 (11): 1335-7. William L. Smith & Robert Langenbach (2001) Why there are two cyclooxygenase isozymes. *The Journal of Clinical Investigation* 107 (12): 1491-5. Roy J. Soberman & Peter Christmas (2003) The organization and consequences of eicosanoid signalling. *The Journal of Clinical Investigation* 111 (8): 1107-12.
 64. Sarah G. Harris, Josue Padilla, Laura Koumas, Denise Ray & Richard P. Phipps (2002) Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology* 23 (3): 144-50. Robert P. A. Wallin, Andreas Lundqvist, Solveig H. Moré, Arne von Bonin, Rolf Kiessling & Hans-Gustaf Ljunggren (2002) *Trends in Immunology* 23 (3): 130-5. A. Graham Pockley (2003) Heat shock proteins as regulators of the immune response. *The Lancet* 362: 469-76.
 65. Bruce N. Cronstein (1999) Adenosine and its receptors during inflammation. En: Charles N. Serhan & Peter A. Ward, eds. *Molecular and Cellular Basis of Inflammation*. Totowa, New Jersey: Humana Press; cap. 12, pág. 259-74. Joel Linden (2001) Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41: 775-87.
 66. Esther M. Sternberg, ed (1977) Neural-immune interactions in health and disease (Perspectives series: Cytokines and the brain). *The Journal of Clinical Investigation* 100 (11): 2641-7. Herbert Tilg, Charles A. Dinarello & James W. Mier (1997) IL-6 and APPS: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunology Today* 18 (9): 428-32. Shlomo Melmed (2001) The immuno-neuroendocrine

- interface. *The Journal of Clinical Investigation* 108 (11): 1563-6. Jeanette I. Webster, Leonardo Tonelli & Esther M. Sternberg (2002) Neuroendocrine regulation of immunity. *Annual Review of Immunology* 20: 125-63.
67. Eduardo Arzt (2001) gp130 cytokine signalling in the pituitary gland: a paradigm for cytokine-neuro-endocrine pathways. *The Journal of Clinical Investigation* 108 (12): 1729-33. Christoph J. Auernhammer & Shlomo Melmed (2001) The central role of SOCS-3 in integrating the neuro-immunoendocrine interface. *The Journal of Clinical Investigation* 108 (12): 1735-403. Tadimitsu Kishimoto (2005) Interleukin-6: From basic science to medicine - 40 years in immunology. *Annual Review of Immunology* 23: 1-23. Stefan Rose-John, Jürgen Scheller, Greg Elson & Simon A. Jones (2006) Interleukin-6 is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *Journal of Leukocyte Biology* 80 (8): 227-36.
 68. Kevin J. Tracey (2002) The inflammatory reflex. *Nature* 420: 853-9. Patricia E. Molina (2005) Neurobiology of the stress response: contribution of the sympathetic nervous system to the neuroimmune axis in traumatic injury. *Shock* 24 (1): 3-10. Claude Libert (2003) A nervous connection. *Nature* 421: 328-9.
 69. Kathryn V. Anderson, Liselotte Bokla & Christiane Nüsslein-Volhard (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the *Toll* gene product. *Cell* 42 (3): 791-8.
 70. Bruno Lemaitre, Emmanuelle Nicolas, Lydia Michaut, Jean-Marc Reichhart & Jules A Hoffmann (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86 (6): 973-83.
 71. Alexander Poltorak, Xiaolong He, Irina Smirnova, Mu-Ya Liu, Christophe Van Huffel, Xin Du, Dale Birdwell, Erica Alejos, Maria Silva, Chris Galanos, Marina Freudenberg, Paola Ricciardi-Castagnoli, Betsy Layton & Bruce Beutler (1998) Defective LPS signalling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282: 2085-8.
 72. Bruce Beutler (2004) Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430: 257-63.
 73. Ruslan Medzhitov & Charles Janeway (2000) Innate immunity. *The New England Journal of Medicine* 343 (5): 338-44. Bruce Beutler (2002) Toll-like receptors: how they work and what they do. *Current Opinion in Hematology* 9 (1): 2-10. Charles A. Janeway & Ruslan Medzhitov (2002) Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 20: 197-216. Kiyoshi Takeda, Tsuneyasu Kaisho & Shizuo Akira (2003) Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology* 21: 335-76. Thomas J. Murphy, Hugh M. Paterson, John A. Mannick & James A. Lederer (2004) Injury, sepsis, and the regulation of Toll-like receptor responses. *Journal of Leukocyte Biology* 75: 400-7. Akihiko Yoshimura, Hiroyuki Mori Masanobu Oishi,

- Daisuke Aki & Toshikatsu Hanada (2004) Regulation of TLR signalling and inflammation by SOCS family proteins. *Journal of Leukocyte Biology* 75: 422-7.
- Koichi S. Kobayashi & Richard A. Flavell (2004) Shielding the double-edged sword: negative regulation of the innate immune system. *Journal of Leukocyte Biology* 75: 428-33.
- Sinead M. Migglin & Luke A. J. O'Neill (2006) New insights into the regulation of TLR signalling. *Journal of Leukocyte Biology* 80: 220-6.
74. Christian R. H. Raetz & Chris Whitfield (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry* 71: 635-700.
75. Mathias Rauchhaus, Andrew J. S. Coats & Stefan D. Anker (2000) The endotoxin-lipoprotein hypothesis. *The Lancet* 356: 930-3.
76. Margaret C. Cummings, Clay M. Winterford & Neal I. Walker (1997) Apoptosis (Historical section). *The American Journal of Surgical Pathology* 21 (1): 88-101.
- Marcel Leist & Marja Jäättelä (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 589-97.
- Marion Macfarlane & Ann C. Williams (2004) Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Reports* 5 (7): 674-8.
- Takahiro Shintani & Daniel J. Klionsky (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306: 990-5.
77. Mathias Chamaillard, Stephen E. Girardin, Jérôme Viala & Dana J. Philpott (2003) Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cellular Microbiology* 5 (9): 581-92.
- Jürg Tschopp, Fabio Martinon & Kimberly Burns (2003) NALPS: A novel protein family involved in inflammation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 95-104.
- Joost P. H. Drenth & Jos W. M. van der Meer (2006) The inflammasome - A linebacker of innate defense. *The New England Journal of Medicine* 355 (7): 730-2.
- Fabio Martinon, Virginie Pétrilli, Anninck Mayor, Aubry Tardivrel & Jürg Tschopp (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440: 237-41.
- Fabio Martinon & Jürg Tschopp (2007) Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death and Differentiation* 14: 10-22.
78. Lewis Thomas (1972) Germs. *The New England Journal of Medicine* 287 (11): 553-5.
79. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee: Roger C. Bone, Robert A. Balk, Frank B. Cerra, R. Phillip Dellinger, Allan M. Fein, William A. Knaus, Roland M. H. Schein & William J. Sibbald (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 101: 1644-55 & *Critical Care Medicine* 20: 864-74.
- Min-Fu Tsan & Baochong Gao (2004) Endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of Leukocyte Biology* 76 (6): 524-9.
80. Es un hecho admitido que el cuadro de sepsis/shock séptico es un problema clínico de primer orden; ello, por ser uno de los principales contribuyentes a la morbilidad y mortalidad hospitalaria, por la confusión terminológica utilizada para describir el cuadro, y porque su base fisiopatológica en general e inmunológica en

particular, no están bien comprendidas, de lo que se deriva terapéuticas poco eficaces. De la prolífica bibliografía sobre el tema se han escogido tres: (1) Greg S. Martin, David M. Mannino, Stephanie Eaton & Marc Moss (2003) The epidemiology of sepsis in United States from 1979 through 2000. *The New England Journal of Medicine* 348 (16): 1546-54. Revisa, aproximadamente, 750 millones de hospitalizaciones en EE. UU, durante un periodo de 22 años, identificando 10.319,418 casos de sepsis, que fue más frecuente en hombres que en mujeres, y en personas de color. La incidencia, entre 1979 y 2000, tuvo un incremento anual de un 8.7 %; la tasa de sepsis debida a hongos incrementó un 207 %, siendo las bacterias gram-positivas el patógeno predominante a partir de 1987. La tasa de mortalidad hospitalaria disminuyó desde el 27.8 %, durante el periodo 1979-1984, al 17.9 %, durante el periodo 1995-2000, aunque el número total de muertes sigue incrementando. El MODS es la causa principal de mortalidad en sepsis, siendo esta menor entre aquellos pacientes en los que fracasan menos de tres órganos. (2) La segunda referencia bibliográfica es un número especial del *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* (vol 35, nº 9, págs. 529-696, 2003) que recoge las actas de un simposio sobre sepsis que tuvo lugar en mayo de 2003, bajo el patrocinio de la Fundación Nobel (*Nobel Symposium No. 124: Septicemia and shock - Pathogenesis and novel therapeutic strategies*). (3) Robert S. Munford (2006) Severe sepsis and septic shock. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 1: 467-96.

81. International Sepsis Definitions Conference: Mitchell M. Levy, Meitchell P. Fink, John C. Marshall, Edward Abraham, Derek Angus, Deborah Cook, Jonathan Cohen, Steven M. Opal, Jean-Louis Vincent & Graham Ramsay (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions Conference. *Critical Care Medicine* 31 (4): 1250-6.
82. Donald W. Landry & Juan. A. Oliver (2001) The pathogenesis of vasodilatory shock. *The New England Journal of Medicine* 345 (8): 588-95.
83. Thomas Michel & Olivier Feron (1997) Nitric oxide synthases: nitric oxide and nitric oxide synthases. *Journal Clinical Investigation* 100 (9): 2146-52. Carl Nathan (1997) Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *Journal Clinical Investigation* 100 (10): 2417-23. Marco Colasanti & Hisanori Suzuki (2000) The dual personality of NO. *Trends in Pharmacological Science* 21: 249-51. Philip W. Saul (2002) Regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Annual Review of Physiology* 64: 749-74.
84. Daniel Rittirsch, L. Marco Hoesel & Peter A. Ward (2006) The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *Journal of Leukocyte Biology* 81 (19): 137-43.
85. Niels C. Riedemann, Ren-Feng Guo & Peter A. Ward (2003) Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nature Medicine* 9 (5): 517-24. Michael A. Matthay & Lorraine B. Ware (2004) Can nicotine treat sepsis? *Nature Medicine* 10 (11): 1161-2.

86. Richard S. Hotchkiss & Irene E. Karl (2003) The pathophysiology and treatment of sepsis. *The New England Journal of Medicine* 348 (2): 138-50.
87. Pierre Moine & Edward Abraham (2004) Immunomodulation and sepsis: impact of the pathogen. *Shock* 22 (4): 297-308.
88. John K. McCormick, Jeremy M. Yarwood & Patrick M. Schlievert (2001) Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annual Review of Microbiology* 55: 77-104.
89. Turk Rhen & John A. Cidlowski (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids - New mechanisms for old drugs. *The New England Journal of Medicine* 353 (16): 1711-23.
90. Richards S. Hotchkiss & Donald W. Nicholson (2006) Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nature Review of Immunology* 6: 813-22.
91. Philip S. Barie, ed (2000) Solving the puzzle of multiple organ dysfunction syndrome. *Surgical Infections* 1 (3): 153-54. Todo el número está dedicado a MODS; nueve artículos de revisión cubren todos los aspectos del síndrome: pág. 155-248
92. Kenji Okajima (2001) Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants. *Immunological Reviews* 184: 258-74.
93. Marcel Levi & Hugo Ten Cate (1999) Disseminated intravascular coagulation. *The New England Journal of Medicine* 341 (8): 586-92. Jonathan Cohen (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885-91.
94. Lorraine B. Ware & Michael A. Matthay (2000) The acute respiratory distress syndrome. *The New England Journal of Medicine* 342 (18): 1334-49.
95. Robert W. Schrier & Wei Wang (2004) Acute renal failure and sepsis. *The New England Journal of Medicine* 351 (2): 159-69.
96. Edwin A. Deitch, Da-Zhong Xu & Qi Lu (2006) Gut lymph hypothesis of early shock and trauma-induced multiple organ dysfunction syndrome: a new look at gut origin sepsis. *Journal of Organ Dysfunction* 2 (2): 70-9.
97. Ralph A. Kelly & Thomas W. Smith (1997) Cytokines and cardiac contractile function. *Circulation* 95: 778-81.
98. Soren Kaeseler Andersen, JakobGjedsted, Cristian Cristiansen & Else Tønnsen (2004) The roles of insulin and hyperglycemia in sepsis pathogenesis. *Journal of Leukocyte Biology* 75 (3): 413-21. Gökhan S. Hotamisligil (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-7.
99. Claudia F. Benjamin, Cory M. Hogaboam & Steven L. Kunkel (2004) The chronic consequences of severe sepsis. *Journal of Leukocyte Biology* 75 (3): 408-12.

Acrónimos y siglas

AA: Aminoácido

ACCP: *American College of Chest Physicians*

ACE: *Angiotensin-converting enzyme*

ACTH: *Adrenocorticotropic hormone*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: *Adenosine diphosphate*

aIL-R: *antagonist of IL-R*

AM: Adrenomedulina

AMBP: *AM-binding protein*

AMP: *Adenosine monophosphate*

AP: *Activator protein*

APAF: *Apoptosis protease-activating factor*

APC: *Antigen presenting cell*

aPC: *activated-Protein C*

Apo: Apolipoproteína

APR: *Acute phase response*

ASC: *Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD*

ATM: *Ataxia telangiectasia mutated*

ATP: *Adenosine triphosphate*

BIR: *Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat*

BK: *Bradikinin*

BPIP: *Bacterial permeability-increasing protein*

C: Complemento sérico

CAM: *Cell adhesion molecule*

CARD: *Caspase-activating and recruitment domain*

CATERPILLER: CARD, *transcription-enhancer, R (purina)-binding, Pyrin, lots of LRRs*

CD: *Cluster designation o cluster of differentiation* (Nomenclatura propuesta en 1982, en el *First International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens* (HLDA); *workshops* denominados en la actualidad *Human Cell Differentiation Molecules*)

C/EBP β : *CCAAT/enhancer binding protein beta*

CED: *Cell death*

CGRP: *Calcitonin gene related product*

CIAS: *Cold-induced auto-inflammatory syndrome*

CIITA: *MHC Class II transcription activator*

CNS: *Central nervous system*

CNTF: *Ciliary neurotrophic factor*

COX: *Cyclooxygenasa*

CpG: *islas de citosina-guanina*

CRP: *C-reactive protein*

CSF: *Colony stimulating factor*

CT: *Cardiotrofina*

CyPG: *Cyclopentanone prostaglandin*

Cys: *Cystein*

DIC: *Disseminated intravascular coagulation*

ECM: *Extra-cellular matrix*

EGF: *Epidermal growth factor*

ELAM: *Endotelial-leukocyte adhesión molecule*

EPCR: *Endothelial protein C receptor*

EPR: *Effector cell protease receptor*

ESL: *E-selectin ligand*

FDP: *Fibrin degradation products*

FFA: *Free-fatty acid*

FP: *N-formil-péptido*

FPR: *FP Receptor*

GF: *Growth factor*

GlyCAM: *Glycosilation-dependent cell adhesion molecule*

GMP: *Granule membrana protein*

gp: *Glycoprotein*

GPCR: *G protein-coupled receptor*

HDL: *High-density lipoproteins*

HET-E: *Incompatibility locus protein from Podospora anserine*

HK: *High-molecular weight kininogen*

HMGB: *High mobility group box*

HNF: *Hepatic nuclear factor*

HSP: *Heat shock protein*

ICAM: *Inter-cellular adhesion molecule*

ICE: *IL-1 β -converting enzyme*

IFN: *Interferon*

Ig: *Inmunogloulina*

IGF: *Insulin-like growth factor*

IKK: *Inhibitor-kappa B kinase*

IL: *Interleuquina*

IL-R: *IL-receptor*

iNOS: *inducible NOS*

IPAF: *ICE-protease activating factor*

IRAK: *IL-R-associated kinase*

IRF: *Interferon regulatory factor*

KKS: *Kalikrein-kinin system*

LAD: *Leukocyte adhesion deficiency*

LAM: *Leukocyte adhesion molecule*

LBP: *LPS-binding protein*

LECAM: *Leukocyte-endothelial cell adhesion molecule*

LFA: *Lymphocyte function-associated antigen*

LIF: *Leukemia inhibitory factor*

LP: *Lipopérido*

LPS: Lipopolisacárido

LRR: *Leucine rich repeat*

LT: Leucotrieno

Mac: *Macrophage antigen*

MAdCAM: *Mucosal addressin cell adhesion molecule*

MAL/TIRAP: *MyD88-adaptor-like protein/TIR-containing adapter protein*

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

mARN: ARN mensajero

MBL: *Mannose-binding lectin*

MCP: *Monocyte chemoattractant protein*

MDL: *Myeloid DAP12-associating lectin*

MDP: *Muramyl dipeptide*

MEL: *Melanome antigen*

MHC: *Major histocompatibility complex*

MIF: *Macrophage migration Inhibitory factor*

MMP: *Matrix metalloproteinase*

MODS: *Múltiple organ disfunction syndrome*

MSH: *Melanocyte stimulating hormone*

MSR: *Macrophage scavenger receptor*

MyD: *Myeloid differentiation factor*

NACHT: *NAIP, CIITA, HET-E y TPI*

NAD: *NBS/NACHT-associated domain*

NAIP: *Neuronal apoptosis inhibitor protein*

NALP: *NACHT - NAIP, LRR, PYD*

NB-ARC: *Nucleotide-binding adaptor shared by Apaf-1, R proteins, and CED-4*

NBS: *Nucleotide binding site*

NBS-LRR: *Nucleotide-binding site and LRR*

NEMO: *NF- κ B essential modulator*

NF: *Nuclear factor*

NF κ B: *Nuclear factor κ B*

NLR: *NOD-like receptor*

NO: *Nitric oxide*

NOD: *Nucleotide-binding oligomerization domain*

NOS: *NO synthase*

NPN: *Neuropoyetina*

OSM: *Oncostatina M*

PADGEM: *Platelet-activation-dependent granule to external membrane protein*

PAF: *Platelet-activating factor*

PAI: *Plasminogen-activator inhibitor*

PAMP: *Pathogen-associated molecular pattern*

PAR: *Protease-activated receptor*

PC: *Phosphatidyl choline*

PE: *Phosphatidyl ethanolamine*

PG: *Peptidoglicano*

PG: *Prostaglandina*

PGRP: *Peptidoglycan-recognition protein*

PK: *Pre-kallikrein*

PKR: *RNA-dependent protein kinase*

PL: *Phospholipid*

PLA: *Phospholipase A*

PRCP: *Prolylcarboxypeptidase*

PRM: *Pattern-recognition molecule*

PS: *Phosphatidyl serine*

PSGL: *P-selectin glycoprotein ligand*

PYD: *Pyrin domain*

RAGE: *Receptor for advanced glycation end products*

RAS: *Renin-angiotensin system*

RPK: *RNA-dependent pmProtein kinase*

SAA: *Serum amyloid A protein*

SAG: *Superantigen*

SAP: *Serum amyloid P component*

SCCM: *Society of Critical Care Medicine*

sCD: *soluble CD*
sIL-R: *soluble IL-R*
SIRS: *Systemic inflammatory response syndrome*
SM: *Sphingomyeline*
SMH: modelo «Shai-Matsuzaki-Huang»
snRNP: *Small nuclear ribonucleoprotein particle*
SOCS: *Suppressors of cytokine signaling*
sPLA: *soluble PLA*
STAT: *Signal transducer and activator of transcription*
TAB: *TAK1-binding protein*
TAFI: *Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor*
TAK: *Transforming growth factor- β -activated kinase-1*
sTNFR: *soluble TNFR*
TGF: *Transforming growth factor*
Th: *helper T-cell*
TIR: *Toll/Interleukine-1 receptor homologous region*
TIRAP/MAL: *TIR domain-containing adapter protein / MyD88-adaptor-like protein*
TLR: *Toll-like receptor*
TNF: *Tumor necrosis factor*
TNFR: *TNF receptor*
Tollip: *Toll-interacting protein*
TP: *Telomerase-associated protein*
tPA: *tissue plasminogen activator*
TRAF: *TNFR-associated factor*
TRAM: *TLR-associated molecule*
TREM: *Triggering receptor expressed on myeloid cells*
TRIF: *Toll-receptor-associated activator of interferon*
TSS: *Toxic shock syndrome*
VCAM: *Vascular cell adhesion molecule*
VLA: *Very late antigen*
VLDL: *Very low-density lipoproteins*

NADPH oxidasa fagocítica y enfermedad granulomatosa crónica

MARÍA CASCALES ANGOSTO

RESUMEN

La NADPH-oxidasa fagocítica es un sistema que productor de radical superóxido que constituye una fuente endógena importante de especies reactivas del oxígeno en el organismo y se encuentra implicado en la respuesta del sistema inmune innato, frente a una gran variedad de patógenos. Este complejo enzimático está formado por un heterodímero unido a membrana, el flavocitocromo b_{558} , y una serie de factores citosólicos $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ y la pequeña GTPasa Rac2, que se traslocan a la membrana plasmática donde experimentan un proceso de ensamblaje que conforma el sistema enzimático activo. Este proceso se encuentra estrictamente regulado e implica una serie de fosforilaciones, traslocación y múltiples cambios conformacionales. El conocimiento de las interacciones proteína-proteína que permiten el ensamblaje y el mecanismo de acción enzimático, ha permitido detectar los cambios que transcurren en el estado activo. La importancia fisiopatológica de la NADPH oxidasa fagocítica se muestra en la enfermedad granulomatosa crónica (EGC), patología transmitida por herencia en la cual está ausente o defectuoso alguno de los componentes de la NADPH oxidasa. Esta enfermedad aparece en la infancia y los individuos que la padecen sufren infecciones recurrentes crónicas y severas debido a la incapacidad de sus neutrófilos para generar radical superóxido y destruir microbios patógenos.

INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune innata representa una estrategia defensiva del organismo utilizada para hacer frente a una gran variedad de microorganismos patógenos

(bacterias, virus y hongos). La activación del sistema inmune innato da lugar a una respuesta inflamatoria esencial para el control rápido de las infecciones. Los leucocitos fagocíticos, componentes esenciales del sistema inmune innato, que han surgido para responder rápidamente a la presencia de agentes invasores, son críticos en estos procesos por su capacidad de atrapar y destruir los microorganismos. Estos leucocitos comprenden neutrófilos (polimorfonucleares, PMN), monocitos, macrófagos y eosinófilos. La actividad de la NADPH-oxidasa fagocítica constituye un mecanismo muy conservado a través de las especies, que genera especies reactivas de oxígeno. Este sistema, responsable del denominado estallido respiratorio (*respiratory burst*) de los fagocitos es una fuente endógena importante de radical superóxido y está constituido por varias proteínas distribuidas entre el citoplasma y la membrana plasmática. Durante la activación leucocitaria los componentes ubicados en el citosol, tienen que emigrar a la membrana plasmática, que es donde se verifica el ensamblaje del complejo funcional que conforma el sistema enzimático activo [1-3].

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) o neutrófilos (Figura 1) se encuentran normalmente en la sangre (vida media 7 h), migran hacia los tejidos y dedican su corta vida a la supervivencia. Sin embargo, en caso de infección, el periodo vital de estas células se incrementa y grandes cantidades de ellas son reclutadas rápidamente y dirigidas hacia el lugar de la infección donde actúan atrapando y destruyendo los patógenos invasores, mediante la activación de la NADPH oxidasa y la consiguiente generación de radical superóxido, especies reactivas del oxígeno derivadas y enzimas proteolíticas. La importancia fisiopatológica de la NADPH fagocítica está demostrada por la enfermedad “granulomatosa” crónica (EGC), que se caracteriza por defectos genéticos en los componentes esenciales de este sistema, que constituyen una amenaza para la vida. Los pacientes con EGC padecen frecuentes infecciones severas y recurrentes y sus tejidos se infiltran de granulomas, estructuras formadas por la inclusión de neutrófilos, monocitos y macrófagos, que han fagocitado bacterias que son incapaces de destruir.

La NADPH-oxidasa fagocítica es un complejo enzimático asociado a membrana, que cuando se activa, cataliza la transferencia de electrones desde el NADPH intracelular hacia el O_2 , situado en el espacio fagolisosómico, con la formación de radical superóxido. El radical superóxido se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y ácido hipocloroso. Éstos, junto a los derivados reactivos del nitrógeno y a los enzimas proteolíticos de los gránulos, constituyen el mecanismo fundamental de respuesta del sistema inmune innato, para la destrucción de los agentes patógenos [1-4]. Otras células no fagocíticas, como los linfocitos B, expresan también este sistema enzimático y generan radical superóxido.

SISTEMA NADPH OXIDASA FAGOCÍTICO

La presencia de oxígeno es un requisito vital para que los fagocitos puedan destruir y digerir los agentes patógenos, pero no es necesaria para la fagocitosis misma. Desde hace casi cincuenta años, el estallido respiratorio catalizado por la NADPH oxidasa, proceso en el que se consumen cantidades considerables de oxígeno, ha fascinado a muchos investigadores. Fue en 1959 cuando Sbarra y Karnosky [5], que se encontraban investigando la fagocitosis del bacilo de la tuberculosis por neutrófilos, detectaron un súbito incremento en el consumo de oxígeno por estas células, el cual era resistente a inhibidores específicos de la cadena mitocondrial, tales como la azida sódica y el cianuro. También observaron que este consumo de oxígeno no coincidía con la respiración mitocondrial, por lo que supusieron que este fenómeno debería encontrarse involucrado en algún otro proceso diferente al de producción de energía. Posteriormente se aclaró que su misión era destruir microorganismos mediante la oxidación de un sustrato suministrado por la glucólisis. El sustrato natural de esta oxidasa fue un tema de considerable especulación y por fin se llegó a descubrir que se trataba del equivalente reductor NADPH, producto de la oxidación de la glucosa por el ciclo de los fosfatos de pentosas. Estos autores denominaron a este sistema “NADPH oxidasa” [5].

Los PMN o neutrófilos adquieren la capacidad de producir especies activas de oxígeno cuando experimentan la activación por una serie de estímulos proinflamatorios. Este proceso se caracteriza por un aumento súbito del consumo de oxígeno no asociado al transporte electrónico mitocondrial, catalizado por el sistema NADPH-oxidasa y denominado «*estallido respiratorio*». La producción “explosiva” de radical superóxido en respuesta a estímulos externos es una propiedad característica de estos fagocitos profesionales, que es utilizada por las células para destruir bacterias y se encuentra implicada en la respuesta inflamatoria [6, 7].

Por tanto, los neutrófilos juegan un papel esencial en la defensa innata del organismo frente a agentes patógenos, actuando, a su vez, como mediadores primarios de la respuesta inflamatoria. Para defender al organismo, estas células utilizan una amplia variedad de productos microbicidas, tales como oxidantes, péptidos, enzimas líticos, etc. La generación de agentes oxidantes por el complejo multiproteico NADPH oxidasa, antes mencionado, cataliza la transferencia de electrones desde el NADPH al O_2 , con la simultánea producción de radical superóxido. Durante la activación de la oxidasa, diversas proteínas citosólicas se traslocan a la membrana plasmática que rodea al fagolisosoma, donde se asocian a otro complejo unido a membrana el flavocitocromo b_{558} . Este proceso se encuentra estrictamente regulado e implica fosforilaciones, traslocación y múltiples cambios conformacionales.

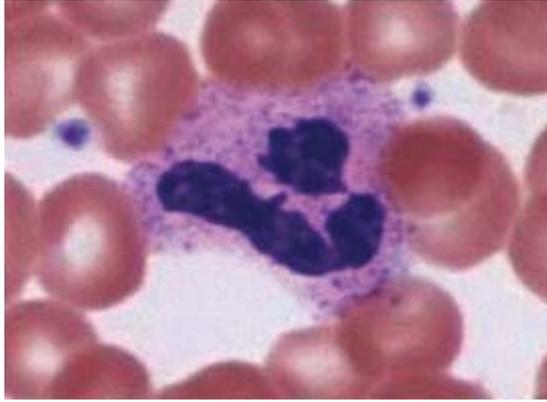


FIGURA 1. *Muestra de sangre donde aparece un neutrófilo polimorfonuclear (PMN) rodeado de eritrocitos.*

El producto de la reacción enzimática catalizada por la NADPH oxidasa, se identificó al principio como H_2O_2 por su capacidad para oxidar el formato. Posteriormente Babior, Kipnes y Curnutte en 1973 demostraron que el H_2O_2 procedía de la dismutación del radical superóxido [8]. Cuando los neutrófilos fagocitan partículas, el anión superóxido se produce en aquella región de la membrana plasmática en contacto directo con la partícula. Después ha de transcurrir un período (fase “lag”), que proporciona al fagocito el tiempo requerido para la formación y cierre de una vacuola que impide la salida al exterior de las especies de oxígeno formadas. Al descubrirse que los radicales libres de oxígeno se producían en grandes cantidades en la vacuola fagocítica (Figura 2), se responsabilizó a estos radicales de la destrucción del microorganismo. Sin embargo, tanto el radical superóxido como el peróxido de hidrógeno son relativamente poco reactivos, de manera que hubo que buscar otras explicaciones y profundizar en estas reacciones. Así, se llegó a la conclusión que el contenido de los gránulos citoplasmáticos, presentes en los fagocitos, debía jugar también un papel importante. Se observó que los citoplastos, unos cuerpos enucleados sin gránulos, fagocitaban las bacterias y producían un estallido respiratorio normal, pero destruían tales bacterias con muy poca eficiencia. Esto indicaba que los componentes de los gránulos aunque eran requeridos en este proceso, su actividad no era lo que se esperaba. Posteriormente se detectó que uno de los principales constituyentes de los gránulos era la mieloperoxidasa, enzima que utiliza el H_2O_2 para oxidar los haluros y convertirlos en compuestos reactivos tóxicos, como el $OHCl$ y las cloraminas. Sin embargo, se observó que en casos de deficiencia en mieloperoxidasa, la destrucción de los microbios no resultaba

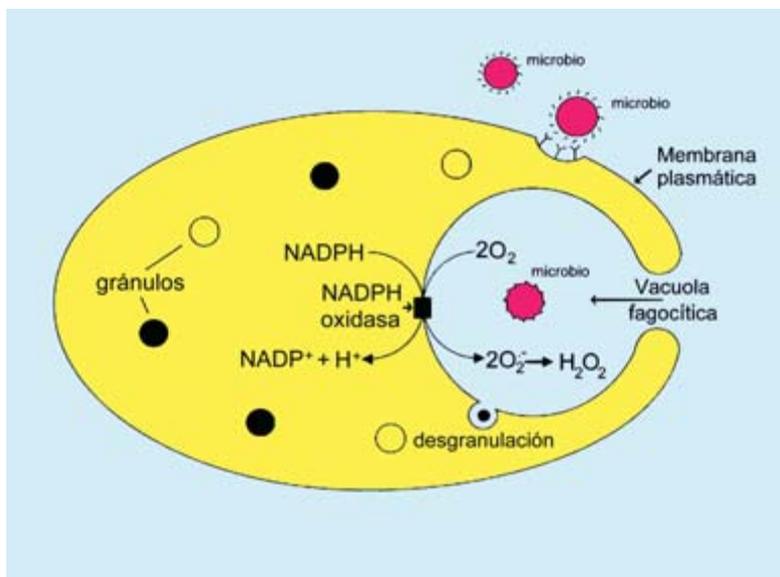


FIGURA 2. Esquema que muestra un fagocito atrapando un microorganismo en la vacuola fagocítica. La NADPH oxidasa se activa selectivamente en la membrana de la vacuola y genera O_2^- y H_2O_2 en el lumen de la vacuola. Otros enzimas se liberan en la vacuola por desgranulación de los gránulos citoplasmáticos [11].

abiertamente defectuosa, por tanto, tenían que estar necesariamente implicados otros factores en el estallido respiratorio y en la destrucción de las proteínas de los agentes patógenos. La explicación apareció por fin y resultó ser notablemente simple: el bombeo hacia el interior de la vacuola de concentraciones milimolares de electrones, no acompañada de protones, originaba el consumo de iones de hidrógeno en el lumen de dicha vacuola, con la consiguiente elevación del pH. Se observó también que el contenido de los gránulos se mantenía en estado inactivo a pH 5.0, pero se activaba cuando se exponía al medio relativamente alcalino de la vacuola [9-12].

Posteriores trabajos de Rada y colaboradores [13] han cuestionado el modelo clásico de destrucción de bacterias por los fagocitos y el efecto tóxico de las ROS, atribuyendo un papel importante al movimiento iónico y a la liberación de las proteínas en el interior del fagosoma.

Está claro que los fagocitos circulantes y los macrófagos de los tejidos, son capaces de generar cantidades sustanciales de radical superóxido, pero en este aspecto los neutrófilos son los más activos puesto que llegan a producir hasta 100 nmoles de radical superóxido por millón de células, cuando se estimulan

con 10 ng del éster de forbol 12 miristato 13 acetato. En fagocitos quiescentes, la NADPH oxidasa no es activa, pero adquiere actividad catalítica cuando las células se estimulan con agentes apropiados. El estímulo fisiológico de la NADPH oxidasa en fagocitos incluye la fagocitosis de bacterias u otras partículas opsonizadas, complejos inmunes, citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), la linfotoxina, el interferón γ , péptidos quimiotácticos como el producto C5a de la rotura del complemento y los péptidos N-formilados derivados de bacterias. Estímulos no fisiológicos muy potentes son el éster de forbol (PMA) activador de la proteína quinasa C y el agente activador de las proteínas G (AIF_3).

La NADPH oxidasa, responsable del estallido respiratorio de los fagocitos, genera el radical superóxido como producto primario, el cual en sí mismo es un oxidante débil. Sin embargo, en una serie de reacciones posteriores, este radical es el origen de oxidantes más potentes, tales como: *peróxido de hidrógeno* (H_2O_2), vía dismutación espontánea o catalizada enzimáticamente por las superóxido dismutasas; *radical hidroxilo* ($\cdot\text{OH}$) por reacción del $\text{O}_2^{\cdot-}$ con el H_2O_2 en presencia de hierro bivalente (reacción de Fenton), e; *hipohaluros*, como el ácido hipocloroso (OHCl), generado al reaccionar el anión Cl^- con el H_2O_2 , mediante la acción catalítica de la mieloperoxidasa. Estos hipohaluros al reaccionar con el H_2O_2 , generan oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), una forma excitada del oxígeno molecular que presenta gran reactividad.

De esta manera la NADPH oxidasa fagocítica juega un papel crítico en la producción de un grupo complejo de especies reactivas de oxígeno (ROS), que van a jugar un papel directo o indirecto en la destrucción de microbios, particularmente frente a las bacterias y hongos catalasa positivos. Los fagocitos cuentan también con otros recursos, como el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y otros no oxidativos, como proteasas y péptidos bactericidas procedentes de los gránulos. Por último, la interacción del $\text{NO}\cdot$ con el $\text{O}_2^{\cdot-}$ origina peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), agente que se descompone en radical nitroso y radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), siendo este último mucho más potente que los anteriores [10, 13, 14].

COMPONENTES DEL SISTEMA NADPH OXIDASA

La mayor parte del conocimiento actual de la NADPH oxidasa se ha conseguido estudiando los diferentes subgrupos de la enfermedad granulomatosa crónica, donde este complejo enzimático es genéticamente defectuoso. Analizando los fagocitos de tales pacientes, se han descubierto los componentes clásicos de

este sistema. Estos son: la glicoproteína gp91^{phox} y los polipéptidos p22^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox}. El flavocitocromo b₅₅₈ es el complejo asociado a membrana, que está formado por una molécula de gp91^{phox} y otra de p22^{phox}. Estas proteínas phox (*phagocyte oxidase*), están muy conservadas a través de las especies, lo que confirma su requerimiento en la defensa. Los polipéptidos p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox} se encuentran en el citoplasma. Otros dos componentes, relacionados estructuralmente con el producto del oncogen ras, Ras2 y Rap1A, se encuentran también en el citoplasma y participan en la activación de este sistema.

Flavocitocromo b₅₅₈

Es el componente redox de la NADPH oxidasa, sistema de transferencia electrónica que genera el radical superóxido. Es un heterodímero α , - β , tipo β o un heterooligómero α , - β , tipo β , que se localiza en la membrana de los gránulos específicos (90 %) y en la membrana plasmática (10 %), cuando el PMN está en reposo. Después de la activación, el flavocitocromo b₅₅₈ emigra desde la membrana de los gránulos específicos hacia la membrana plasmática o la de los fagolisomas. Está compuesto por 2 subunidades diferentes: una glicoproteína de 91 kDa (gp91^{phox}) y otra proteína no glicosilada de 22 kDa (p22^{phox}). La subunidad mayor se sintetiza originalmente como una proteína de 65 kDa, pero la N-glicosilación en los residuos de tres aminoácidos 131, 148 y 239, la hace mostrarse como una banda difusa de 91 kDa en geles SDS. Contiene una región de homología con la región de unión al NADPH de varias flavoenzimas, incluyendo la citocromo P-450 reductasa y la ferredoxina-NADP⁺ reductasa, y también muestra homología con el sitio de unión al FAD de varias deshidrogenasas flavoproteicas. El complejo flavocitocromo b₅₅₈ es, por tanto, una flavoproteína que contiene 2 grupos hemo por cada FAD [1, 3], siendo la subunidad gp91^{phox} la que posee los sitios de unión para el FAD y el NADPH [5]. De acuerdo con este modelo, el terminal-N muy hidrofóbico de gp91^{phox} atraviesa la membrana plasmática al menos cinco veces. Esta región es la que contiene los dos grupos hemo, que parecen descansar en una disposición transmembrana. La localización exacta de los grupos hemos asociados al flavocitocromo b₅₅₈ ha sido difícil de determinar y hoy en día aún se discute. La Figura 3 muestra dos modelos propuestos. El modelo de *hemo compartido* en el que uno de estos grupos es coordinado en gp91^{phox} y el otro es coordinado y compartido entre gp91^{phox} y el residuo histidina de p22^{phox}. El *modelo alternativo* es aquel en el que los dos grupos hemos se encuentran entre los dominios transmembrana III y V de gp91^{phox} y coordinados por los residuos de histidinas 101, 115, 209 y 222 [15].

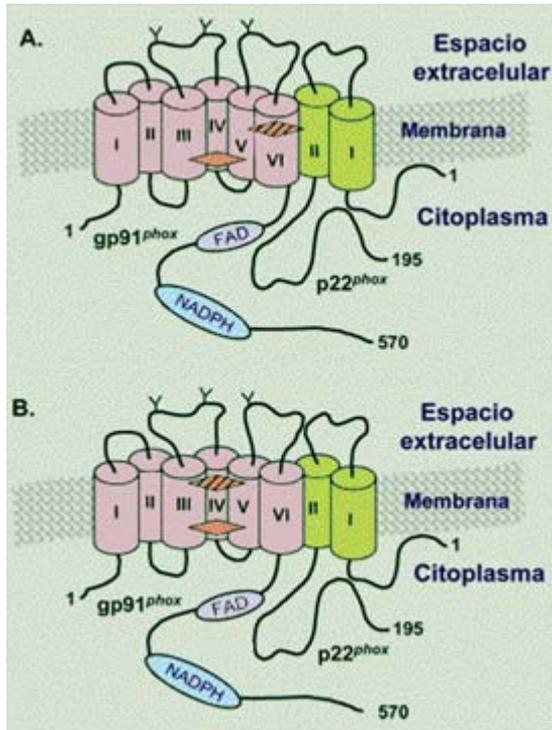


FIGURA 3. Modelos propuestos que muestran la estructura del flavocitocromo b_{558} , con sus dominios transmembrana y la ubicación de los grupos hemo. (A) Modelo de hemos compartidos en el que uno de ellos se encuentra ubicado entre los dominios transmembrana III y V de $gp91^{phox}$ (rombo liso) y el otro compartido por dominios de $gp91^{phox}$ y $p22^{phox}$. (B) Modelo de hemos no compartidos en el que ambos grupos hemos se ubican entre los dominios transmembrana III y V de $gp91^{phox}$. (Y) sitios de glicosilación (Quinn y Gauss 2004 modificado) [15].

La subunidad pequeña, $p22^{phox}$, del flavocitocromo b_{558} , contiene dos secuencias ricas en prolina en la región C-terminal, una de las cuales es similar a la secuencia consenso para la unión de las regiones SH3. Este dominio se une a un dominio SH3 de $p47^{phox}$. En el modelo estructural, la secuencia contiene también un terminal-N hidrofóbico que cruza la membrana. Esta subunidad posee una sola histidina conservada durante la evolución y este residuo se ha propuesto que coopera con la subunidad $gp91^{phox}$ para formar uno de los sitios de unión a los grupos hemo [16]. Esta disposición coloca el C-terminal rico en prolina, en el lado citosólico de la membrana donde puede interaccionar con $p47^{phox}$. El flavocitocromo b_{558} se considera el componente central de la NADPH-oxidadasa, pues contiene todos los elementos que le permiten transportar los electrones desde el NADPH hasta el O_2 (Figura 3) [1, 3].

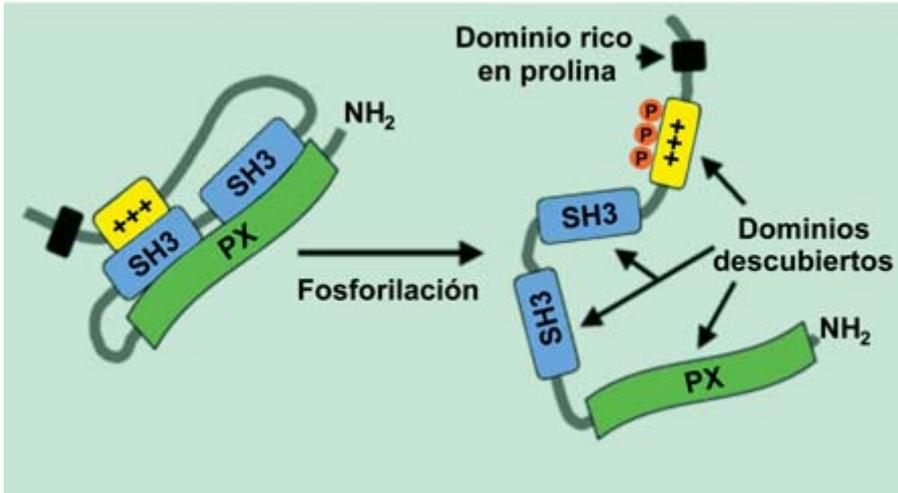


FIGURA 4. Cambio conformacional en la $p47^{phox}$ inducido por fosforilación, que pone al descubierto dominios de enlace. La fosforilación ayuda a neutralizar las cargas catiónicas en el dominio autoinhibidor +++++. La exposición de los dominios SH3 (homología Src) y PX (homología N-terminal phox), permite la interacción con otras proteínas. La región rica en prolina en la región C-terminal se une a $p67^{phox}$. (Quinn y Gauss 2004, modificado)[15].

$p47^{phox}$: Segal y Abo [12] observaron que los neutrófilos de pacientes con EGC autosómica recesiva, eran incapaces de fosforilar una proteína de 44 kDa relacionada con la oxidasa. Así se identificó la proteína $p47^{phox}$ que se denominó factor citosólico neutrofílico (NCF1). Esta proteína, se localiza en el citosol en forma libre o formando un complejo de 240 kDa con los otros 2 componentes citosólicos: $p67^{phox}$ y $p40^{phox}$, y es la responsable del transporte del complejo a la membrana durante la activación. Parece ser que $p47^{phox}$ es el primer componente citosólico que interacciona con el flavocitocromo b_{558} durante el ensamblaje. Es una proteína con un fuerte componente básico, poseedora de una región catiónica con múltiples sitios de fosforilación (residuos 314 - 347). Esta proteína contiene dos dominios SH3 (homología Src, residuos 163-211 y 227-281), una región C-terminal rica en prolina (residuos 360 - 371) y una homología N-terminal phox (PX) (residuos 4-125). Esta última juega un papel importante en la unión a fosfoinosítidos (Figura 4).

En respuesta a la estimulación celular, la proteína $p47^{phox}$ se fosforila *in vivo* en múltiples serinas situadas en la región C-terminal. La fosforilación parece ser parte de la señal de activación de la oxidasa, aunque puede estar implicada también la fosforilación de los otros dos componentes ($p67^{phox}$ y $p40^{phox}$). La desfosforilación inactiva al complejo. La fosforilación de $p47^{phox}$ produce un cambio conformacional en la proteína, que neutraliza el dominio catiónico autoinhibidor y deja

al descubierto los dominios SH3 y PX, necesarios para facilitar la unión con los otros componentes del complejo (Figura 4). La fosforilación está catalizada por quinasas. Se han propuesto un número de quinasas que participan en la fosforilación de p47^{phox}: PKC, p38, MAPK, ERK, Atk, etc. [17].

Los dominios SH3 se unen a la secuencia rica en prolina situada en el C-terminal de p22^{phox}. El segundo SH3 se une a una región rica en prolina, cerca del centro de la molécula de p67^{phox}. Las interacciones SH3 con las regiones ricas en prolina son importantes, pero no parecen ser el único determinante de las interacciones proteína-proteína entre los componentes de la NADPH oxidasa [18, 19]. Trabajos muy recientes [20] han observado que la activación de la NADPH fagocítica requiere la interacción del dominio SH3 de p47^{phox} con la subunidad pequeña del heterodímero catalítico el flavocitocromo b₅₅₈. El tandem SH3 se une a una corta región rica en prolina de p22^{phox} (151-160). También han observado que una región C-terminal helicoidal de p22^{phox} (161-164) adopta una configuración helicoidal α que participa en la actividad fortaleciendo la asociación de los dominios SH3 de p47^{phox}.

Así que, la proteína p47^{phox} se considera que es una proteína adaptadora-reguladora que proporciona una plataforma para el ensamblaje del sistema enzimático funcional en la cara citoplasmática del flavocitocromo b₅₅₈. Actúa a modo de interruptor que desencadena la fosforilación de la proteína, lo cual va a originar un cambio conformacional que expone los motivos escondidos SH3, la región rica en prolina y el dominio PX, que median interacciones con el flavocitocromo b₅₅₈ y la p67^{phox}.

A pesar de todas estas misiones de la proteína p47^{phox} aún se discute su papel esencial para la función de la NADPH oxidasa. Funcionalmente, el efecto de p47^{phox} es el de incrementar unas 100 veces la unión de p67^{phox} y 50 veces la unión de Rac, y no parece participar directamente en la actividad de la NADPH oxidasa. Por tanto, el efecto regulador directo de esta actividad oxidasa tiene que estar en Rac o en p67^{phox}.

p67^{phox}: De la misma manera que la p47^{phox}, la p67^{phox} se identificó como factor citosólico 2 (NCF2) en neutrófilos de pacientes con CGD autosómica recesiva. Esta proteína se encuentra en el citosol como parte del complejo de 240 kDa cuando el leucocito está en reposo. Comparte la unión al NADPH con gp91^{phox}. p67^{phox} contiene una región central rica en prolina (219-231), seguida de un dominio SH3 (245-295), con un segundo SH3 en la región C-terminal (458-517) y 4 motivos TPR en la región N-terminal (6-154) (Figura 4). p67^{phox} se une a p47^{phox} vía una interacción cola-cola, utilizando el dominio SH3 cercano al C-terminal de p67^{phox} para unirse a la secuencia rica en prolina en el C-terminal de p47^{phox} (Figura 5). Además, el segundo dominio SH3 de p47^{phox} se une a la región rica en prolina de p67^{phox}. La mitad N-terminal de p67^{phox} contiene una región de enlace para Rac, ya que p67^{phox} (1-

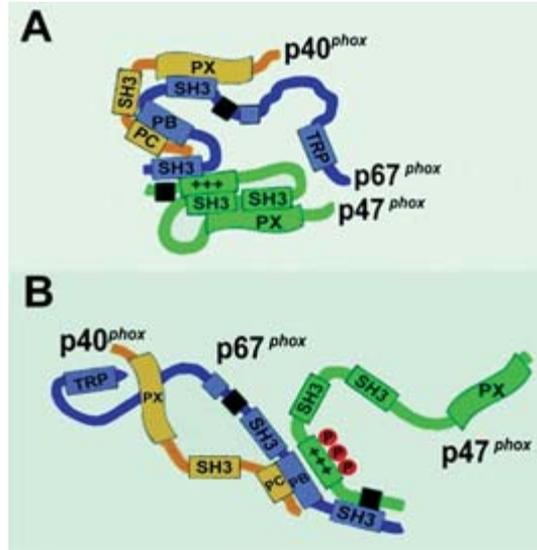


FIGURA 5. Cambio conformacional $A \Rightarrow B$, en el complejo citosólico $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ y $p67^{phox}$, inducido por fosforilación, donde quedan al descubierto dominios de enlace que permiten la interacción con las proteínas del citocromo b_{558} . (SH3, homología src con capacidad para unirse a regiones ricas en prolina; PX, homología N-terminal phox implicada en la unión con lípidos de membrana; PB, motivo modular C-terminal capaz de unirse a proteínas que contengan motivos PC; PC dominio C-terminal implicado en la unión entre $p40^{phox}$ y $p67^{phox}$). (Quinn y Gauss 2004 modificado)[15].

198) se une a Rac con la misma afinidad que lo hiciera la $p67^{phox}$ completa. La localización exacta del sitio de unión de Rac se desconoce y la secuencia en esta región no corresponde a otros sitios de unión a Rac conocidos de otras proteínas [21]. No se conoce otra función para $p67^{phox}$ que la de unirse a $p47^{phox}$ y a Rac. En ausencia de $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ no puede ensamblarse con la NADPH oxidasa, lo que demuestra que $p47^{phox}$ ejerce la función adaptadora, antes citada, para la unión de $p67^{phox}$. Se ha observado que existe una correspondencia de efectos entre $p67^{phox}$ y $p47^{phox}$, que indica la existencia de mutuas facilidades para la unión de estos dos componentes citosólicos. $p67^{phox}$ es el factor limitante citosólico ya que se encuentra en proporción dos o tres veces menor que $p47^{phox}$, lo que indica que la mayor parte de $p67^{phox}$ se encuentra formando complejo.

También se ha mencionado que $p67^{phox}$ participa en la unión al NADPH. La NADPH oxidasa contiene dos sitios de unión al NADPH, uno de baja afinidad en la $gp91^{phox}$ y otro de elevada afinidad en $p67^{phox}$. Se ha demostrado que $p67^{phox}$ se une directamente al NADPH vía los dominios TRP y puede catalizar la deshidrogenación de los piridín nucleótidos. La interacción de $p67^{phox}$ y rac parece estar me-

diada por unión de rac al N-terminal de p67^{phox} (1-200). Cuatro motivos en serie de TPR son los que median la unión a rac a p67^{phox}. La fosforilación de p67^{phox} se verifica por vías dependientes e independientes de la PKC en tre 233.

40^{phox}: Es el tercer componente del complejo citosólico. Se ha descrito de forma reiterada que puede regular negativamente la actividad del complejo [22] y se ha demostrado que en la activación sufre fosforilación que pudiera explicar dicha acción [23]. p40^{phox} se caracterizó inicialmente como componente del complejo con p67^{phox} y p47^{phox} en el citosol de neutrofilos no activos. Puede interactuar con el dominio rico en prolina de la región C-terminal de p47^{phox}, aunque no está claro que esto ocurra *in vivo*. Este componente emigra a la membrana celular después de la activación, unida a p47^{phox} y p67^{phox}. En un sistema libre de células p40^{phox} no es esencial para la actividad oxidasa y se ha descrito que inhibe dicha actividad. Puede ser que juegue un papel regulador o que ayude a mantener los factores citosólicos en un estado inactivo [24, 25].

Rac2: Es una proteína de unión al GTP que se encuentra en el citosol durante el reposo, unida a un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (Rho-GDI). Con la activación intercambia GDP por GTP, se disocia del factor Rho-GDI y se trasloca a la membrana plasmática simultánea e independientemente del complejo de 240 kDa. Es esencial para la activación del sistema y se cree que está conectada a las vías de señalización tempranas. Desempeña además un importante papel en la quimiotaxis [26].

Rap1A: Es una proteína de la superfamilia Ras de proteínas de unión al GTP. Se asocia estrechamente con el flavocitocromo b₅₅₈ en la activación. Puede activar la proteína quinasa C y participar así en la regulación del complejo.

Rho-GDI: de la subfamilia Rho a la que pertenece Ras, está implicada en la regulación de una gran cantidad de procesos celulares importantes. La capacidad de Rac para estimular la producción de radical superóxido, se basa en su conversión desde la forma inactiva, unida a GDP, a la forma activa, unida a GTP. La traslocación a la membrana requiere un intercambio entre nucleótidos de guanina, por una proteína asociada a membrana, la GEF (*Guanin nucleotide Exchange Factor*), acompañado por su liberación desde un complejo citosólico con la GDI (*GDP Dissociation Inhibitor*). Una propiedad común de todos los miembros de la subfamilia Rho, es su interacción con el regulador negativo, la proteína GDI. El papel de Rho-GDI es mantener Rho/Rac en el citosol, distante de sus objetivos en la membrana, enmascarando el grupo geranilo-geranilo y también en un estado inactivo formando complejo con GDP. La asociación de Rac con GDI puede también inhibir la GAP (*GTPase Activating Protein*), que estimula la hidrólisis del GTP por Ras. Media-

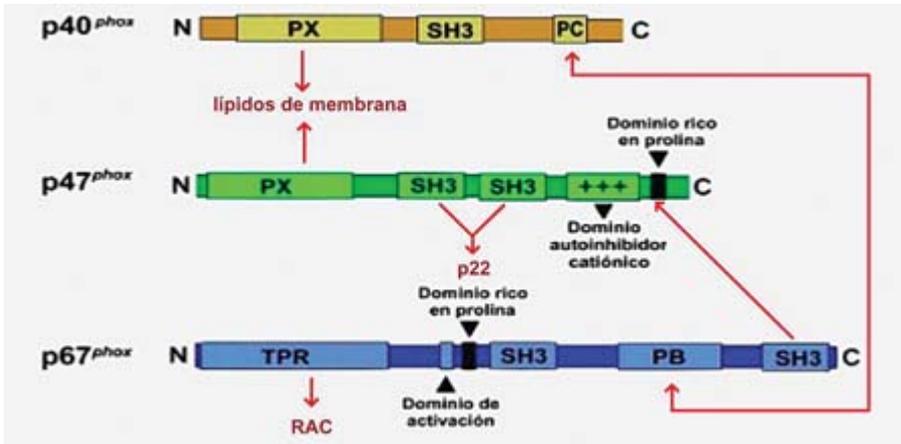


FIGURA 6. Interacción de las proteínas citosólicas p40^{phox}, p47^{phox} y p67^{phox} entre ellas y con p22^{phox} y rac

dores lipídicos como los inositol fosfolípidos regulan la actina del citoesqueleto y conducen a la formación de un complejo Rho/Rho-GDI en una conformación parcialmente abierta y ya preactivada [27].

Ensamblaje del sistema NADPH-oxidasa

El complejo multiproteico activo NADPH oxidasa necesita el ensamblaje de sus componentes esenciales. Muchos factores regulan este ensamblaje y la actividad del complejo, para mantener este sistema altamente reactivo bajo control espacial y temporal para eventos antimicrobianos y proinflamatorios. Tanto en reposo como durante el ensamblaje se establecen interacciones entre los diferentes componentes del sistema NADPH oxidasa (Figura 7). En esto desempeñan un importante papel los dominios SH3, regiones homólogas a las regiones no catalíticas de la familia Src de tirosina quinasas, que tienen afinidad por los residuos de prolina. Como en varios componentes del sistema existen tantos dominios SH3 como regiones ricas en prolina, esto facilita las interacciones entre las proteínas del complejo citosólico en el reposo y entre éstas y el flavocitocromo b₅₅₈ en la activación. En estado quiescente la proteína p47^{phox} puede establecer este tipo de interacciones de forma intracatenaria, lo que provoca el secuestro de la región catiónica de la molécula. Durante la activación esta interacción se rompe y permite su unión a las regiones ricas en prolina de p22^{phox} en la membrana. Como las interacciones SH3 son poco específicas, se cree que su función es la de alinear a las proteínas para el estable-

Mecanismo de acción

La NADPH-oxidasa cataliza la reacción:



Durante la transferencia de electrones, estos pasan desde el NADPH hacia el FAD, de éste a los grupos hemo y de éstos al O_2 . La liberación de protones H^+ en el compartimento citosólico produce una rápida despolarización de la membrana y una acidificación del medio intracelular. Estos cambios son compensados por la existencia de un canal de protones en la propia estructura del sistema enzimático que permite el escape de estos hacia el espacio extracelular fagolisosómico. La proteína que funciona como canal es gp91^{phox}. Se sugiere que el mecanismo de flujo de protones a través de gp91^{phox} puede involucrar un ciclo de protonación/desprotonación de la His-115 en la medida en que ésta se expone alternativamente hacia el lado interior y exterior de la membrana [1, 3, 30].

Cuando las células se rompen (por sonicación) y se separan por ultracentrifugación las fracciones citosólica y membranal, la NADPH oxidasa puede ser reconstituída *in vitro*, mezclando ambas fracciones y adicionando una sustancia anfifílica, como el dodecil sulfato sódico o el ácido araquidónico. Este tipo de activación de la NADPH oxidasa, en un medio libre de células, ha sido importante para profundizar en los mecanismos bioquímicos de este complejo y de su mecanismo de activación [30].

Rada y colaboradores [13] han cuestionado el modelo clásico de destrucción de bacterias por los fagocitos y el efecto tóxico de las ROS, atribuyendo un papel importante a los iones K^+ en la liberación de las proteínas antimicrobianas en el interior del fagosoma. Estos autores han investigado la producción de O_2^- , los cambios en el potencial de membrana, el eflujo de K^+ y la destrucción de las bacterias en presencia de difenileno iodonio, un inhibidor de la NADPH oxidasa.

La NADPH oxidasa cuando se activa, transfiere electrones desde el NADPH intracelular al oxígeno en el espacio extracelular intrafagosómico, formando el radical superóxido O_2^- . Este sistema enzimático lleva a cabo una función electrogénica, ya que en cada vuelta elimina una carga negativa del interior de la célula. Este movimiento de cargas se refleja en la despolarización de la membrana plasmática que acompaña a la formación del O_2^- . De hecho una generación intensa de O_2^- es capaz de revertir la polaridad de la membrana plasmática. La disminución o cambio del potencial de la membrana plasmática altera la fuerza conductora de todas las partículas cargadas, favoreciendo el movimiento de salida de los cationes y el movi-

miento de entrada de los aniones. En vista de todos estos movimientos iónicos iniciados por la separación de cargas vía NADPH oxidasa, estos autores han propuesto que la alteración de la composición iónica del espacio fagolisómico puede contribuir a la alteración de la destrucción bacteriana. Reeves y colaboradores han cuestionado los efectos tóxicos de las especies reactivas de oxígeno en las condiciones del fagosoma [31]. Ellos sugieren un papel específico para los iones K^+ enriquecidos en el espacio intrafagosómico, en la activación de los enzimas de los gránulos al ser liberados de su soporte polianiónico. De hecho, esta hipótesis reduce el papel del radical superóxido a proporcionar la fuerza conductora para el movimiento de K^+ en los fagosomas. Rada y cols [13, 32] han intentado profundizar en esta hipótesis estudiando la importancia relativa en la destrucción de las bacterias del radical superóxido, primero como molécula reactiva y después los cambios en el potencial de membrana iniciado por la transferencia electrónica via el sistema oxidasa generador de radical superóxido. Disminuyendo paulatinamente el ritmo de producción de radical superóxido por la NADPH oxidasa aplicando concentraciones crecientes del inhibidor difenileno iodonio (DPI), estos autores han tratado de establecer relaciones entre la concentración de radical superóxido, cambios en el potencial de membrana, liberación de K^+ y destrucción bacteriana. Estos análisis han mostrado que tanto el radical superóxido como el movimiento iónico contribuyen a la destrucción de algunos microorganismos como el *Staphylococcus aureus*, mientras que en otros casos, como en *Escherichia coli* no fue decisivo.

DEFICIENCIA DE NADPH OXIDASA: ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA

El ejemplo que pone de manifiesto la importancia de la NADPH oxidasa fagocítica es la enfermedad granulomatosa crónica (EGC), caracterizada por la ausencia o deficiencia de este complejo sistema enzimático, y por tanto del estallido respiratorio de los fagocitos en estos pacientes. Esta enfermedad se manifiesta en la infancia por una predisposición severa y prolongada a frecuentes infecciones severas, crónicas y recurrentes con desenlace, a veces fatal. Los organismos responsables incluyen una variedad de bacterias y hongos, entre los cuales algunos, como la *Serratia marsecens*, no es patógeno en individuos normales. Como esta enfermedad es rara, las células de estos enfermos han supuesto un valioso sistema donde estudiar las propiedades de la NADPH oxidasa. En la actualidad se utilizan ratones knockout deficientes en los genes *phox*. Desde la primera descripción de la EGC en 1957, como síndrome de infecciones recurrentes, hipergammaglobulinemia, hepatoesplenomegalia y linfadenopatía en niños que invariablemente morían en la primera década de sus vidas, se han re-

alizado avances significativos en el conocimiento de las deficiencias moleculares de esta enfermedad [33].

La EGC es una inmunodeficiencia primaria rara, determinada genéticamente donde el 2/3 de los casos muestra un perfil de herencia recesiva ligado al cromosoma X y los casos restantes son autosómicos recesivos. Se refiere a un grupo heterogéneo de enfermedades de carácter hereditario cuya etiología cursa con alteraciones del mecanismo de destrucción de los microorganismos, debido a que las células fagocíticas son deficientes en NADPH oxidasa e incapaces de generar radical superóxido y otras especies reactivas de oxígeno en los espacios fagolisosómicos, propiciando la formación de granulomas. Los órganos afectados con más frecuencia son los ganglios linfáticos, piel, pulmones, hígado y aparato digestivo. Las lesiones pueden ser grandes y numerosas y causar efecto de masa, obstrucción y disfunción de los órganos afectados [34].

La importancia crítica de la NADPH oxidasa se manifiesta en esta enfermedad como una rara patología del sistema inmune innato, cuya incidencia oscila entre 1/200.000 y 1/250.000 con aparición en la infancia y afectando sobre todo al sexo masculino. Los síntomas suelen manifestarse alrededor del primer o segundo año de la vida, aunque en casos más leves pueden retrasarse a la adolescencia e incluso mostrarse en la etapa adulta. Los pacientes que sufren esta enfermedad viven amenazados durante toda su vida por infecciones recurrentes, debido a su incapacidad para destruir bacterias y hongos catalasa positivos. A pesar del tratamiento con antibióticos, la mayoría de ellos muere de infecciones antes de alcanzar los 40 años. El tratamiento con interferón recombinante parece que está dando buenos resultados para prolongar la vida a estos pacientes. Sin embargo, la mayor esperanza para ellos se cifraría en restaurarles la actividad NADPH oxidasa por terapia génica somática.

En los enfermos CGG las vacuolas fagocíticas son anormalmente pequeñas y los tejidos están infiltrados de granulomas (granulomata), estructuras formadas por macrófagos y linfocitos, que dan nombre a la enfermedad. Estas anomalías parece que son consecuencia de la digestión defectuosa de microorganismos endocitados y residuos.

Clasificación de la EGC

La EGC se clasifica según el modo de herencia en: herencia recesiva ligada al cromosoma X y herencia autosómica recesiva (AR).

El patrón de herencia ligada al sexo es el tipo más frecuente y se encuentra aproximadamente en el 60 % de los casos. En este tipo de herencia existe la

probabilidad de que la condición afecte más a los hombres que a las mujeres, ya que el cromosoma X porta el gen defectuoso. Dado que la mujer posee 2 cromosomas X, si uno de ellos posee el gen defectuoso, el segundo cromosoma heredado compensará la presencia del gen afectado, convirtiéndola en portadora de la enfermedad, pero si una mujer hereda el gen defectuoso de ambos progenitores, puede resultar afectada. En el 40 % de los pacientes restantes la enfermedad se hereda de forma autosómica recesiva (AR). Actualmente esta patología se clasifica también de acuerdo con el subcomponente del complejo NADPH-oxidasa afectado. En la forma ligada al cromosoma X, el defecto consiste en la ausencia o disminución de la subunidad gp91-phox codificada en el brazo corto del cromosoma X. En la forma AR, el defecto observado en el 30 % de los enfermos se localiza en p47^{phox} y las alteraciones en las subunidades p67^{phox}, o p22^{phox} se presentan en el 5 % de los pacientes, respectivamente, codificándose cada uno de ellos en diferentes genes. Esta es una de las causas que justifican la heterogeneidad de la enfermedad [34].

Bases moleculares de la EGC

La EGC presenta una gran heterogeneidad genética y se han identificado diferentes mutaciones responsables de la enfermedad.

EGC ligada al cromosoma X

La CGD ligada al cromosoma X es la variante más frecuente de la enfermedad y se debe a mutaciones en el gen *CYBB* que codifica para subunidad β del citocromo b₅₅₈, la glicoproteína gp91^{phox}. Este gen se localiza en el locus p21 del cromosoma X (Xp21-1), el cual puede estar ausente, truncado o mutado, de tal forma que el DNA no se transcribe o el RNA es inestable. El síndrome resultante se suele denominar X-EGC. Esta deficiencia aparece en el 60-70% de los casos y hasta la fecha casi todos se han mostrado en familias individuales. Mutaciones *de novo* solo se muestran en un 10% de los casos analizados. La mutación en este gen, origina inactivación total del estallido respiratorio. La proteína gp91^{phox} posee los lugares de reconocimiento al FAD y al NADPH, por lo que estando alterada esta subunidad, no se produce radical superóxido en absoluto. Recientemente, por análisis de citometría de flujo, utilizando la dihidrorrodamina 123, se ha detectado una nueva forma autosómica de la EGC ligada al cromosoma X, donde la mutación espontánea en la subunidad gp91^{phox} coincide con la inactivación de un extremo [35].

Recientemente se ha estudiado una nueva mutación de esta variante de la enfermedad en la cual el citocromo b_{558} se encuentra en un nivel normal, pero no es funcional. La mutación consiste en 2 sustituciones provocadas por una doble mutación de sentido erróneo ubicada en la región C-terminal de la subunidad $gp91^{phox}$. Esta mutación eliminó el sitio de unión de las subunidades $p47^{phox}$ y $p67^{phox}$ al citocromo b_{558} , y por lo tanto, el ensamblaje estable de la NADPH oxidasa y su actividad microbicida [36]

En 1998, un grupo de investigadores describieron una mutación que consiste en una simple sustitución de pares de bases que lleva a un cambio en la posición 338 de His a Tir en la subunidad $gp91^{phox}$, lo cual provoca la pérdida del dominio de unión de FAD, que impide así la incorporación de éste dentro del sistema NADPH oxidasa, y como consecuencia, la activación de la enzima [37]. En ese mismo año se describió un caso atípico de esta variante, en el cual los neutrófilos mostraron ausencia completa de actividad de la NADPH oxidasa. Mediante de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de análisis secuenciales, se reveló una transición que provocó el reemplazo de His en la posición amino acídica 101 por Tir, constituyendo la His 101 uno de los ligandos de unión al hemo del citocromo b_{558} , el cual es esencial para la activación de esta enzima, y por lo tanto, para la eliminación de microorganismos infecciosos [38].

La enfermedad de herencia materna X-EGC, afecta principalmente a hombres y es recesiva. Las mujeres heterocigotas portadoras de mutaciones $gp91^{phox}$ no tienen riesgo de padecer esta enfermedad, aunque presentan mayor riesgo a padecer lupus discoide o sistémico y afecciones de la cavidad oral tales como estomatitis aftosa y queilitis granulomatosa.

Existen pacientes con una forma variante de X-EGC que presenta manifestaciones clínicas más benignas. La mayoría de ellos muestran concentraciones bajas pero detectables de $gp91^{phox}$ y sus fagocitos son capaces de generar cantidades suficientes de radical superóxido. Los pacientes con estas mutaciones que resultan con actividad residual $phox$, como también aquellos con mutaciones en $p47^{phox}$, no suelen ser diagnosticados hasta llegar a adultos.

EGC deficiente en p47-phox

El siguiente defecto genético más común que conduce al 30% de los casos de EGC, es una forma autosómica recesiva (AR) que aparece en el gen que codifica para la proteína $p47^{phox}$ (*NCF1*). Este gen se localiza en el brazo largo del cromoso-

ma 7 (7q11.23) y su defecto parece estar asociado con alteraciones clínicas menos profundas. Este gen está constituido por 15.236 pares de bases, incluye 11 exones y posee el 98,6 % de homología en su secuencia caracterizada por elementos repetitivos. La mayoría de los pacientes que padecen esta deficiencia, presentan una delección del dinucleótido GT (Delta GT) en la porción inicial del exón 2. El 97 % de los pacientes afectados por este tipo de enfermedad contienen esta mutación. El gen *NCF-1* tiene 2 pseudogenes casi idénticos, muy homólogos (posi NCF-I), en la proximidad del locus 7q11.23 cromosómico. La delección del dinucleótido en el comienzo del exón 2, que conduce a un cambio y a la formación de un codon de parada prematuro, se considera la secuencia característica de los pseudogenes. Esta es la mutación prevalente en la EGC deficiente en p47-phox como resultado de la inserción de un fragmento del pseudogen que contiene al dinucleótido Delta GT dentro del gen. Aunque la detección de la secuencia GT se considera por encima del 85 % en los pacientes afectados, la base de la enfermedad se debe principalmente a eventos parciales de *cross-over* entre el tipo silvestre del gen funcional y sus pseudogenes en diversos sitios de recombinación. Estos datos indican que la delección del gen que codifica a la subunidad p47^{phox} (*NCF-1*) ocurre raramente [39, 40]

Las mutaciones autosómicas recesivas de la EGC causadas por mutaciones en los genes que codifican las proteínas citoplasmáticas p47^{phox} y p67^{phox}, ocasionan defectos en la traslocación de estos dos componentes a la membrana.

EGC deficiente en p22-phox

Una forma rara recesiva autosómica de EGC se debe a defectos en el gen que codifica la subunidad pequeña, p22^{phox} (*CYBA*) del flavocitocromo b₅₅₈. Este gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 16 (16q24). Cualquier defecto en esta proteína influye en la formación del flavocitocromo b₅₅₈. La formación del heterodímero gp91-p22, parece que es esencial para la estabilidad intracelular de cada subunidad, ya que la deficiencia de una se asocia con la reducción marcada de la concentración de la otra. Se ha descrito la existencia de 10 alelos mutantes que caracterizan a esta variante y se han comunicado 7 polimorfismos en el gen *CYBA*. Las principales mutaciones que caracterizan a este grupo son: inserciones de pares de bases, delecciones, mutaciones de codones sin sentido y mutaciones en sentido erróneo [41]

El 5 % de los pacientes puede presentar una de estas formas raras de la enfermedad. Por la técnica de PCR se ha detectado una mutación a nivel del RNAm que consiste en una inserción asociada con una delección en el inicio del exón 5, en la posición 315 del codon de traducción del DNAc de la subunidad p22^{phox}.

A nivel del DNA genómico, el defecto molecular radica en deleciones homocigóticas en la secuencia de unión localizada entre el intrón 4 y el exón 5. Todas estas mutaciones producen la pérdida de la subunidad p22^{phox}, y por lo tanto, la inactivación de la enzima NADPH oxidasa [36]

EGC deficiente en p67-phox

La EGC autosómica recesiva causada por pérdida de la subunidad p67^{phox} es la forma más rara de esta enfermedad y se presenta aproximadamente en el 5 % de los pacientes. Esta subunidad está compuesta por 526 aminoácidos y está codificada por el gen *NCF-2* localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q25). Se han detectado 7 alelos mutantes que conducen a este trastorno y existe una heterogeneidad entre las mutaciones que caracterizan a esta deficiencia. Este grupo heterogéneo de mutaciones provoca una marcada inestabilidad del RNAm, de la proteína, o de ambos, que provoca la pérdida de la actividad de la NADPH oxidasa.

La estabilidad de la subunidad p67^{phox} es muy sensible a deleciones y mutaciones de sentido erróneo, que causan sustituciones de aminoácidos dentro del dominio N-terminal de la proteína. Sin embargo, las mutaciones que predicen simples cambios de aminoácidos en otros sitios de la proteína, representan generalmente polimorfismos benignos [42, 43].

Dentro de las mutaciones que caracterizan a esta variante de EGC, se encuentra una mutación que involucra a los exones 9 y 10 como resultado de una duplicación de aproximadamente 1.1 kb. Algunos resultados sugirieron que esta mutación surgió como un evento recombinante ilegítimo [44]

Se han investigado 2 tipos de mutaciones donde el mutante es capaz de activar a la NADPH oxidasa *in vitro* a 25 °C. Sin embargo, estas mutaciones representan un defecto sensible a la temperatura que explica su fenotipo a temperatura fisiológica [45]

Se ha descrito una deleción que elimina la interacción de la proteína p67^{phox} con rac 1, la cual afecta la translocación de la misma al flavocitocromo b₅₅₈, y por lo tanto, la actividad de la enzima. En los pacientes que padecen esta variante de la CGD no solo está deficiente la subunidad p67^{phox} de la enzima, sino también la subunidad p40^{phox}. [46]

Las mutaciones en los genes que codifican para p22^{phox} (*CYBA*) y p67^{phox} (*NCF2*) son raras, y no exceden el 10% de los casos.

La forma autosómica recesiva (AR), debida a mutaciones de genes autosómicos recesivos afecta a mujeres y hombres por igual. Estos casos se deben a mutaciones de los genes que codifican las subunidades p47^{phox}, p67^{phox} y p22^{phox}, localizadas en cromosomas somáticos, que se heredan con un patrón de herencia autosómico recesivo. Los genes que afectan a las proteínas p47^{phox}, p22^{phox} y p67^{phox}, se encuentran en un 33 %, 5% y 5% de los casos, respectivamente. Las mutaciones de estas proteínas suelen implicar una deficiencia en el estallido respiratorio. Los síntomas suelen aparecer durante la primera infancia, pero a veces no se manifiestan hasta la adolescencia. Infecciones crónicas se detectan en piel, pulmones, nódulos linfáticos, boca, nariz e intestinos. Pueden aparecer accesos de pus en diferentes partes del cuerpo. Los nódulos linfáticos tienden a llenarse de bacterias y se agrandan. El hígado y el bazo se hipertrofian. Los niños presentan crecimiento retardado.

Los niños con CGD son aparentemente sanos al nacer. Sin embargo, en los primeros meses o años, comienzan a padecer infecciones recurrentes difíciles de tratar, o infecciones causadas por microorganismos que no son generalmente patógenos, tales como hongos. Las infecciones pueden aparecer en cualquier órgano o tejido del organismo, piel, pulmones, nódulos linfáticos, hígado o huesos. La neumonía es un problema común y recurrente en pacientes con CGD.

NADPH oxidasa y proteasas

La generación de los oxidantes del estallido respiratorio es esencial para la normal destrucción bacteriana en el fagosoma, actuando concertadamente con proteasas, defensinas y otros compuestos liberados en el fagosoma por fusión de diferentes poblaciones de gránulos. La activación de la NADPH oxidasa también origina cambios en el pH intrafagolisosómico [47]. La importancia de los compuestos de los gránulos para la inmunidad innata está demostrada por un defecto raro en la función de los neutrófilos, la deficiencia específica de gránulos. En esta enfermedad, debida en algunos casos a mutaciones en el factor de transcripción mieloide C/EBP ϵ , los pacientes carecen de defensinas, gelatinasa y otras proteínas de los gránulos y sufren de una serie de infecciones bacterianas [34]. Estudios en ratones knockout deficientes en la elastasa de los neutrófilos mostraron una mayor susceptibilidad a microorganismos gram negativos tales como *Klebsiella* y *Escherichia coli*, y los ratones deficientes en catepsina y/o elastasa parecen ser más susceptibles al *Aspergillus* [4]. La liberación óptima de proteínas asociadas a la matriz de los gránulos y otras proteínas en el lumen del fagolisosoma puede depender de los flujos iónicos puestos en movi-

miento por cambios en el potencial de la membrana como resultado del transporte electrónico a través de la membrana mediado por la NADPH oxidasa [13, 31]. Sin embargo, no parece probable que la función principal de la NADPH oxidasa sea promover la activación de las proteínas de los gránulos. Evidencias experimentales apoyan que los oxidantes derivados del estallido respiratorio poseen por sí mismos propiedades microbicidas [4, 13]. Los iones específicos transportados en respuesta a los efectos electrogénicos de la NADPH oxidasa es todavía tema de investigación activa.

Diagnóstico y Manifestaciones clínicas

En la mayoría de los enfermos el diagnóstico puede establecerse antes de los 2 años de edad. Los hallazgos clínicos más frecuentes son linfadenopatía marcada, hepatoesplenomegalia y al menos un episodio de neumonía, además de otras manifestaciones tales como rinitis, conjuntivitis, dermatitis, estomatitis ulcerativas, diarrea crónica y obstrucción intestinal. Esta enfermedad se caracteriza por infecciones recurrentes causadas por gérmenes piógenos catalasa positivos, poco patógenos o de baja virulencia. Entre los más frecuentes se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Notocordia*, *Serratia*, etc y hongos, dentro de los cuales es el *Aspergillus* el mayor responsable de la mortalidad. El primer hallazgo clínico suele estar constituido por una adenitis supurativa crónica en las regiones laterocervicales, que pueden extenderse por todo el organismo. Generalmente las infecciones no son controladas por la invasión neutrofílica y pueden dar lugar a la formación de granulomas compuestos por macrófagos activados que producen obstrucciones a diversos niveles (uretral, pilórico, esofágico, etc). Los enfermos con EGC no sufren infecciones con bacterias catalasa negativas, debido a que estos organismos liberan suficiente peróxido de nitrógeno en las vacuolas fagocíticas para posibilitar la destrucción de los microorganismos infecciosos. Se observan infecciones en piel, ganglios linfáticos, hígado, bazo, pulmones y huesos, que dan lugar a abscesos que requieren ser drenados quirúrgicamente. Dentro de las infecciones cutáneas, el impétigo, los forúnculos cutáneos y los abscesos perianales y rectales son muy comunes. La neumonía recurrente es un problema significativo que puede ser causado por bacterias que no suelen encontrarse en la mayoría de las neumonías. Es común la presencia de inflamación crónica de los ganglios linfáticos cervicales que aparecen con frecuencia y que persisten en los pacientes.

Las anomalías en el tracto urinario son relativamente frecuentes. Las manifestaciones genitourinarias constituyen causas significativas de morbilidad en pa-

cientes con EGC. El desarrollo de osteomielitis multifocal es una de las primeras manifestaciones de la EGC.

En pacientes que padecen de esta enfermedad, suelen presentarse complicaciones inflamatorias no infecciosas que sugieren que la deficiencia de NADPH oxidasa conduce a esta respuesta en ausencia de infecciones microbianas persistentes. Los mecanismos relacionados con este proceso inflamatorio aberrante son desconocidos. Un grupo de investigadores de Londres demostraron *in vitro* que los neutrófilos de pacientes con EGC son más resistentes a la apoptosis espontánea y muestran una disminución significativa de la producción del mediador antiinflamatorio prostaglandina ciclopentona D (2) (PGD(2)). También se observó que los macrófagos, durante el proceso de fagocitosis de partículas apoptóticas opsonizadas y no opsonizadas, estaban severamente comprometidos en su habilidad para producir PGD(2) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF β). Lo anterior sugirió que la apoptosis retardada de las células inflamatorias, así como la producción deficiente de mediadores antiinflamatorios (PGD(2) y TGF β) durante la eliminación de desechos apoptóticos y de patógenos fagocitados por los macrófagos, contribuyen a la persistencia de la inflamación en la EGC [48].

En la variedad ligada al sexo hay pocos pacientes con fenotipos complejos asociados con el síndrome McLeod, lo cual puede presentarse con o sin rinitis pigmentosa, o asociación o no, con la distrofia muscular de Duchenne.

Estudios de laboratorio

El estudio más fácilmente disponible para el diagnóstico de esta enfermedad es la prueba del nitroazul de tetrazolio (NBT). Los enfermos con EGC no reducen el NBT, mientras que los portadores pueden reducir el colorante. Con esta técnica se puede confirmar la enfermedad y detectar el estado de portador de la madre. Los pacientes que padecen esta deficiencia son incapaces de destruir ciertas bacterias a una velocidad normal. Las curvas de destrucción de los microorganismos a los cuales estos individuos son susceptibles indican, por lo general, poca o escasa destrucción en un período de 2 horas. Otros estudios que pueden realizarse para detectar la enfermedad incluyen la disminución de la captación del oxígeno durante la fagocitosis y la yodación anormal de las bacterias, así como la prueba de velocidad de sedimentación globular. Mediante el hemograma con diferencial se observa que el número de leucocitos está habitualmente elevado, incluso si el enfermo no posee una infección activa. En estos pacientes se observa una hipergammaglobulinemia y la función de los anticuerpos es normal. Se observa además que los factores del complemento pueden estar elevados en los pacientes que padecen de esta enfermedad

En la EGC se observa una disminución del número de células T en pacientes mayores de 3 años de edad, y al realizarse una comparación con individuos sanos se observó que esta diferencia aumenta con el incremento de la edad. Se desconoce cómo el número disminuido de células T influye en la susceptibilidad de estos pacientes a padecer infecciones recurrentes, pero los efectos de la disminución de las células T pueden representar un cofactor significativo para las infecciones detectadas en los pacientes que padecen dicha enfermedad [49].

Recientemente se ha descubierto que los enfermos EGC presentan una profunda disminución de las células B que expresan el marcador de memoria CD27, mientras que existe una expansión de las células B que expresan CD5. Ambos fenómenos son independientes de la edad, genotipo y estado clínico del paciente y no estuvieron acompañados por expresión alterada de CD5 y CD27 en las células T [50].

Durante los episodios de neumonía, las radiografías de tórax con frecuencia son anormales. Las pruebas de función hepática pueden reflejar alteraciones funcionales como resultado de la infección crónica. Las pruebas de función pulmonar son anormales, por lo general, después de los episodios de neumonía y pueden no regresar a la normalidad durante varios meses. La gammagrafía ósea y la gammagrafía del hígado pueden revelar trastornos presentes en ambas regiones. Mediante la biopsia de tejidos se pueden mostrar los granulomas presentes en dichos tejidos. La prueba de quimioluminiscencia cuantitativa es el mejor método para detectar la condición de portador, aunque se ha informado diagnóstico uterino mediante el uso de sangre fetal. En la literatura se han descrito varios enfermos que presentan un grupo *Kell* sanguíneo raro que se le denomina fenotipo McLeod. [51].

Para distinguir individuos con la EGC p47^{phox} deficiente se utiliza un método de análisis basado en el conocimiento genético de esta variante de la inmunodeficiencia, el cual es altamente reproducible y sensible [52].

Actualmente se puede realizar el diagnóstico prenatal en pacientes que han perdido la expresión de la proteína p47^{phox} debido a la detección de un punto de mutación en el gen NCF-1. La primera descripción de este diagnóstico fue realizado en el 2002 [53]. En el 2003, se introdujo un método diagnóstico molecular prenatal para detectar la EGC ligada al cromosoma X a través de un sistema de cromatografía líquida de alta resolución. Este método se utiliza para diagnosticar la enfermedad durante el segundo trimestre de embarazo en madres embarazadas por segunda vez, cuyo primer hijo padeciera de esta variante de la enfermedad [54]

El ensayo de dihidrorrodamina 123 (DHR) es una prueba efectiva para evaluar la EGC en pacientes masculinos y en muchos de ellos permite diferenciar entre la forma común ligada al cromosoma X y el defecto autosómico recesivo [55].

Tratamiento

Es necesario el tratamiento intenso de las infecciones con antibióticos de amplio espectro para prolongar la supervivencia global de los enfermos. Los abscesos deben ser drenados rápidamente. Actualmente se usa el interferón gamma en la EGC ligada al cromosoma X para el tratamiento de las infecciones severas, ya que estimula la producción de superóxido [56] La profilaxis con intraconazol parece ser un tratamiento efectivo y bien tolerado que reduce la frecuencia de aparición de infecciones fúngicas en los pacientes que padecen de esta enfermedad, pero no debe ser administrado durante largos períodos de tiempo [57]

El trasplante alogénico de médula ósea puede ser la cura para la EGC pero el grado de toxicidad relacionado con el trasplante y la limitada disponibilidad de donantes compatibles han restringido la aplicación de esta técnica. Debido a que se conocen los defectos genéticos responsables de la EGC y que dicha enfermedad es una alteración de células madre que puede ser tratada mediante el trasplante de médula, hoy se considera que la EGC es una enfermedad con grandes expectativas para la terapia génica somática en el sistema hematopoyético. Son muchas las publicaciones que han demostrado la reconstitución de la actividad de la NADPH oxidasa por la transferencia génica a la médula de pacientes con EGC y en cultivos de líneas celulares *in vitro* [58, 59].

Se han desarrollado modelos en ratones con EGC mediante la separación de genes. Los estudios preclínicos en estos animales, usando vectores retrovirales recombinantes, han demostrado la reconstrucción de la funcionalidad normal de los neutrófilos y una mayor resistencia a patógenos tales como *Aspergillus fumigatus*, *Staphylococcus aureus* y *Burkholderia cepacia*. La transfusión de granulocitos se ha considerado una modalidad terapéutica para las infecciones bacterianas y micóticas recurrentes en pacientes con una neutropenia prolongada y con alteraciones funcionales en los neutrófilos. Evidencias teóricas y experimentales han demostrado la eficacia de la transfusión de granulocitos en la prevención y tratamiento de infecciones severas. Sin embargo, las evidencias clínicas han sido más difíciles de interpretar, pero se ha observado eficacia cuando se administra la dosis correcta de granulocitos por peso del paciente. No obstante, son necesarios experimentos clínicos bien diseñados para establecer las transfusiones granulocíticas, como una modalidad terapéutica disponible para el

tratamiento de infecciones bacteriales y micóticas recurrentes en pacientes con alteraciones funcionales en los neutrófilos o con neutropenia [60].

En el año 2003 se realizó con éxito el primer caso de trasplante con células madre obtenidas de sangre de cordón umbilical, en un paciente cuya enfermedad fue confirmada a los 2 años de edad. La sangre de cordón umbilical fue donada por su hermana gemela no afectada por la enfermedad. Después de un año de trasplante desaparecieron las manifestaciones clínicas y se normalizó la función de los neutrófilos con una integración completa de los linfocitos donados [61]

Análisis de los mecanismos fisiopatológicos

Los enfermos con EGC no pueden producir radical superóxido, peróxido de hidrógeno, ni otras especies reactivas de oxígeno, por presentar deficiencia funcional de la actividad NADPH-oxidasa y trastornos a nivel del estallido respiratorio de los neutrófilos y macrófagos. Los pacientes con EGC cuando sufren una infección, muestran reacciones inflamatorias extensas, que pueden manifestarse en fallos de la degradación antígenos, propiciando una acumulación persistente de neutrófilos. Los microorganismos fagocitados sobreviven dentro del fagocito, estimulando una respuesta celular contra los antígenos dentro de la célula, lo cual da lugar a la formación de granulomas. Las infecciones son producto de microorganismos catalasa positivos, que producen catalasa, enzima capaz de eliminar el peróxido de hidrógeno derivado de la dismutación del radical superóxido, ambos productos del estallido respiratorio.

Desde el punto de vista histológico se detectan en la enfermedad granulomatosa crónica numerosos granulomas, que son los que dan el nombre a esta enfermedad. Los granulomas son aglomeraciones de diferentes tamaños que engloban fagocitos, especialmente neutrófilos, junto a los microbios causantes de esa infección. En estos granulomas pueden aparecer zonas necróticas (Figura 8).

Los microorganismos catalasa positivos no pueden ser destruidos por los fagocitos deficientes en NADPH oxidasa, debido a que la catalasa microbiana elimina el poco peróxido de hidrógeno que logran producir los fagocitos. Los microorganismos catalasa negativos pueden ser controlados más fácilmente por los fagocitos deficientes debido a que usan el peróxido de hidrógeno que secretan los propios microorganismos y lo hacen actuar junto a la mieloperoxidasa de los fagocitos, controlando la infección. Los microorganismos catalasa positivos se mantienen vivos dentro de los fagocitos integrantes de los granulomas, pudiendo incluso reproducirse.

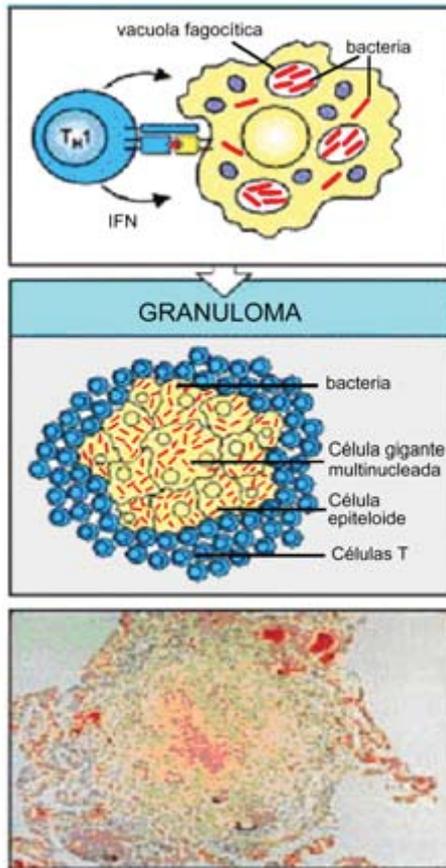


FIGURA 8. *Granuloma.*

Las especies bacterianas que producen peróxido de hidrógeno y son catalasa negativas, cuando son fagocitadas por fagocitos de enfermos con EGC, las propias bacterias contribuyen a paliar el defecto de los fagocitos defectuosos. Como resultado se supera la deficiencia y los microorganismos pueden ser eliminados utilizando el peróxido de hidrógeno producido por ellos mismos que reacciona con la mieloperoxidasa del fagocito. Así los pacientes EGC no presentan susceptibilidad a estos microorganismos, solo son susceptibles a los que no producen peróxido de hidrógeno, tales como estafilococos y hongos. En estudios histopatológicos aparecen en los granulomas células epiteloideas, células multinucleadas gigantes, linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$, además de los microorganismos causantes de la infección y fibroblastos. La formación de granulomas parece ser un mecanismo de defensa, que impide la expansión y distribución de la infección que no se ha podido controlar.

El mecanismo mediante el cual se forman los granulomas puede explicarse como sigue. Por acción de citoquinas circulantes, los fagocitos se activan para producir el estallido respiratorio, pero en casos de EGC, al no producirse dicho estallido, los fagocitos se sobreestiman y se transforman en células epiteloideas y células multinucleadas gigantes. Los fagocitos a su vez, secretan IL-8, avisando a los polimorfonucleares y otros mastocitos para que acudan al sitio de la infección. Esto comienza a producir un conglomerado celular, que se convertirá más tarde en el granuloma. Además, los macrófagos secretan IL-12 que induce la diferenciación de las células Th1, IL-5 que aumenta la proliferación de las células T y MCP-1 y MIP-1 que provocan quimiotaxis y adherencia, llamando al acúmulo celular en una zona específica.

Con toda esta secreción crónica de citoquinas, se ven estimulados otros tipos celulares no inmunes, como el endotelio que ayuda al paso de células hacia el granuloma y a los fibroblastos, que comienzan a producir colágeno, en respuesta a factores de crecimiento y diferenciación fibroblásticos y endotelio vasculares secretados por los macrófagos, para reparar la matriz dañada en la inmunidad natural. La secreción de este colágeno ayuda a impedir la migración e invasión de otras zonas por la infección y provoca necrosis central, que se produce por lisis trófica de los macrófagos y microbios que allí se encuentran, dependiendo de la concentración de colágeno y del tamaño del granuloma. Esto, como última etapa, ayuda también a controlar la infección, aunque sea a costa de células del individuo enfermo.

Expectativas

La calidad de vida de muchos pacientes que sufren la EGC ha mejorado notablemente desde que se conocen los mecanismos moleculares afectados por esta enfermedad y la apreciación de la necesidad de una temprana terapia agresiva con antibióticos cuando se manifiestan las infecciones. Son necesarias frecuentes hospitalizaciones, ya que se requieren pruebas múltiples para localizar el lugar exacto y la causa de las infecciones y a menudo puede ser necesaria la aplicación intravenosa de antibióticos en casos de infección severa. Los intervalos libres de enfermedad se elevan por acción profiláctica de los antibióticos y tratamiento con interferón gamma. Las infecciones severas tienden a ser menos frecuentes a partir de la adolescencia. De hecho muchos pacientes con EGC pueden llevar una vida relativamente normal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Babior BM. (2000) Phagocytes and oxidative stress *Am J Med* **109**, 33-44.
2. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys.* **397**, 342-344.
3. Babior BM. (2004) NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* **16**, 42-47
4. Fang FC (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* **2**, 820-832
5. Sbarra AJ, Karnovsky ML. (1959) The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* **234**, 1355-1362.
6. Segal AW (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* **23**, 197-223
7. Nauseef WM (2004) assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem cell Biol* **122**, 277-291
8. Babior BM, Kipnes RS y Curnutte JT (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* **52**, 741-744.
9. Maly FE y Schürer-Maly C (1995) How and Why cells make superoxide: The "phagocytic NADPH oxidase. *NIPS* **10**, 233-238
10. Cascales M (1999) Inmunosenescencia. En: Estrés Oxidativo, Envejecimiento y Enfermedad. Instituto de España. Madrid, pp 169-192.
11. Cascales M (2005) Estallido respiratorio de los fagocitos *Anal Real Acad Farm* **71**, 365-386.
12. Segal AW y Abo A (1993) The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes *TIBS* **18**, 43-47
13. Rada BK, Geiszt M, Káldi K, Timár C y Ligeti E (2004) Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial cell killing. *Blood*, 104, 2947-2953.
14. Park JB (2003) Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages. *Exp Mol Med* **35**, 325-335
15. Quinn MT y Gauss KA (2004) Structure and regulation of neutrophil respiratory burst oxidase: Comparison with nonphagocyte oxidase. *J Leukocyte* **76**, 760-781.
16. Henderson LM. (1998) Role of histidines identified by mutagenesis in the NADPH oxidase-associated H⁺ channel. *J Biol Chem* **273**, 33216-33223.
17. Mendez I de, Homayounpour N, Leto TL. (1997) Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol Cell Biol* **17**, 2177-2185.

18. Freeman JL y Lambeth JD. (1996) NADPH oxidase activity is independent of p47-phox in vitro *J Biol. Chem* **271**, 22578-22585.
19. Faust LP, El Benna J, Babior BM, Chanock SJ. (1995) The phosphorylation targets of p47-phox subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J Clin Invest* **96**, 1499-1505.
20. Nobuhisa I, Takeya R, Ogura K, ueno N, Kohda D, Inagaki F y Sumimoto H (2006) Activation of the superoxide-producing phagocyte NADPH oxidase requires co-operation between the tandem SH3 domains of p47phox in recognition of a polyproline type II helix and an adjacent alpha-helix of p22phox. *Biochem J* **396**, 183-192.
21. Dang PM, Cross AR, Babior BM. (2001) Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67 phox and cytochrome b558. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 3001-3005.
22. Sathyamoorthy M, Mendez I de, Adams AG, Leto TL (1998). p40 (phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem* **272**, 9141-9146.
23. Cross AR (2000) p40phox participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of P47phox for flavocytochrome b558. *Biochem J* **349**, 113-117
24. Bouin AP, Grandvaux N, Vignais V, Fuchs A (1998). p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process. *J Biol Chem* **273**, 30097-30103.
25. Grizot S, Grandvaux N, Fieschi F, Fauré J, Massenet C, Andrieu J P, Fuchs A, Vignais P V, Timmins P, Dagher MC, y Pebay-Peyroula E. (2001). Small angle neutron scattering and gel filtration analyses of neutrophil NADPH-oxidase cytosolic factors highlight the role of the C-terminal end of p47phox in the association with p40phox. *Biochemistry* **40**, 3127-3133
26. Geist M, Dagher MC, Molnar G, Havasi A, Fauré J, Paclet M, Morel F, y Ligeti E. (2001) Characterisation of Rac GTPase activating protein (Rac-GAP) in human neutrophil granulocytes, *Biocheml J* **355**, 851-858.
27. Fauré J, Vignais PV, Dagher MC. (1999) Phosphoinositide-dependent activation of Rho A involves partial opening of the RhoA/Rho-GDI complex. *Eur J Biochem.* **262**, 1-12.
28. DeLeo FR, Quinn MT. (1996) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukocyte Biol* **60**, 677-691
29. Dang PM, Cross AR, Quinn MT y Babior BM (2002) Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: A direct interaction between p67phox and cytochrome b558II. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **99**, 4262-4265

30. Koshkin V, Lotan O, Pick E. (1997) Electron transfer in the superoxide-generating NADPH oxidase complex reconstituted *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* **1319**, 139-146.
31. Reeves EP, Nagl M, Godovac-Zimmermann J, Segal AW (2003) Reassessment of the microbicidal activity of reactive oxygen species and hypochlorous acid with reference to the phagocytic vacuole of the neutrophil granulocyte *J Med Microbiol* **52**, 643-651
32. Rada BK, Geiszt M, Hably C y Ligeti E (2005) Consequence of the electrogenic function of phagocytic NADPH oxidase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**, 2293-2300.
33. Berendes H, Bridges RA, Good RA (1957) A fatal granulomatous disease of childhood: The clinical study of a new syndrome. *Minn Med* **40**, 309-312.
34. Dinauer MC (2005) Chronic granulomatous disease and other disorders of phagocyte function. *Hematology Am Soc. Hematol Educ Program* 89-94
35. Jirapongsananuruk O, Niemela JE, Malech HL, Fleisher TA (2002) CYBB mutation análisis in X-linked chronic granulomatous disease. *Clin Immunol* **104**, 73-76.
36. Estasia MJ, Lardy B, Maturana A, Rosseau P, MartelC, Bordigoni P, *et al.* (2002) Molecular and functional characterization of a new X-linked chronic granulomatous disease variant (X91+) case with a double missense mutation in the cytosolic gp91-phox C-terminal tail. *Biochim Biophys Acta* **1586**, 316-330.
37. Yoshida L, Saruta F, Yoshikawn K, Tatsuzawa O, Tsunawaki S (1998). Mutation at histidine 338 of gp91(phox) depletes FAD and affects expression of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase. *J Biol Chem* **273**, 27879-27886.
38. Tsuda M, Kaneda M, Sakiyama T, Inana I, Owada M, Kiryu C, *et al.* (1998) A novel mutation at a probable heme-bilding ligand in neutrophil cytochrome b558 in atypical X-linked chronic granulomatous disease. *Hum Genet* **103**, 377-381.
39. Noack D, Rae J, Cross AR, Ellis BA, Newburger PE, Curnutte JT, *et al.* (2001) Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by defects in NCF-1, the gene encoding the phagocyte p47-phox: mutations not arising in the NCF-1 pseudogenes. *Blood* **97**, 305-311.
40. Heyworth PG, Noack D, Cross AR. (2002) Identification of a novel NCF-1 (47-phox) pseudogene not containing the signature GT deletion: significance for A47 degrees chronic granulomatous disease carrier detection. *Blood* **100**, 1845-1851.
41. Roe J, Noack D, Heyworth PG, Ellis BA, Curnutte JT, Cross AR (2000). Molecular analysis of 9 new families with chronic granulomatous disease caused by mutations in CYBA, the gene encoding p22-phox. *Blood* **96**, 1106-12.
42. Noack D, Rae J, Cross AR, Muñoz J, Salmen S, Mendoza JA, *et al.* (1999) Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by novel mutations in NCF-2, the gene encoding the p67-phox component of phagocyte NADPH oxidase. *Hum Genet* **105**, 460-467.

43. Patino PJ, Rae J, Noack D, Erickson R, Ding J, de Olarte DG, *et al.* (1999) Molecular characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by a defect of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) oxidase component p67-phox. *Blood* **94**, 2505-2514.
44. Borgato L, Bonizzato A, Lunardi C, Dusi S, Andrioli G, Scarperi A, *et al.* (2001) A 1.1-kb duplication in the p67-phox gene causes chronic granulomatous disease. *Hum Genet* **108**, 504-510.
45. Grizot S, Fieschi F, Dagher MC, Pebay E. (2001) The active N-terminal region of p67 phox. Structure at 1.8Å resolution and biochemical characterizations of the A128V mutant implicated in chronic granulomatous disease. *J Biol Chem* **276**, 21627-21631.
46. Vergnaud S, Paclet MH, Benna J, Pocolado MA, Morel F (2000) Complementation of NADPH oxidase in p67-phox-deficient CGD patients p67-phox/p40-phox interaction. *Eur J Biochem* **267**, 1059-1067.
47. Harrison RE, Touret N y Grinstein S (2004) Microbial killing: oxidants, proteases and ions. *Curr Biol* **12**, R357-R359
48. Brown JR, Goldblatt D, Buddle J, Morton L, Thrasher AJ (2003) Diminished production of anti-inflammatory mediators during neutrophil apoptosis and macrophage phagocytosis in chronic granulomatous disease. *J Leukoc Biol* **73**, 591-599.
49. Heltzer M, Jawad AF, Rae J, Curnutte JT, Sullivan KE (2002) Diminished T cell number in patients with chronic granulomatous disease. *Clin Immunol* **105**, 273-278.
50. Bleesing JJ, Souto-Carneiro MM, Savage WJ, Brown MR, Martinez C, Yavuz S, Brenner S, Siegel RM, Horwitz ME, Lipsky PE, Malech HL, y Fleisher TA. (2006) Patients with Chronic Granulomatous Disease Have a Reduced Peripheral Blood Memory B Cell Compartment. *J Immunol* **176**, 7096-7103.
51. Rosen F, Eibl M, Rolfman C, Fisher A, Volanakis J, Aiuti F, *et al.* (1999) Primary immunodeficiency disease. *Clin Exp Immunol* **118**, 1-28.
52. Dekker J, de Boer M, Roos D (2001). Gene-scan method for the recognition of carriers and patients with p47(phox)-deficient autosomal recessive chronic granulomatous disease. *Exp Hematol* **29**, 1319-1325.
53. De Boer M, Singh V, Dekker J, Di Rocco M, Goldblatt D, Roos D (2002). Prenatal diagnosis in two families with autosomal, p47(phox)-deficient chronic granulomatous disease due to a novel point mutation in NCF-1. *Prenat Diagn* **22**, 235-240.
54. Chien SC, Lee CN, Hung CC, Tsao PN, Su YN, Hsieh FJ (2003) Rapid prenatal diagnosis of X-linked chronic granulomatous disease using a denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) system. *Prenat Diagn* **23**, 1092-1092.

55. Jirapongsananuruk O, Malech HL, Kuhns DB, Niemela JE, Brown MR, Cohen M, *et al.* (2003) Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay. *J Allergy Clin Immunol* **111**, 374-379.
56. Ma HR, Mu SC, Yang YH, Chen CM, Chiang BL (2003) Therapeutic effect of interferon-gamma for prevention of severe infection in X-linked chronic granulomatous disease. *J Formos Med Assoc* **102**, 189-192.
57. Gallin JI, Alling DW, Malech HL, Wesley R, Koziol D, Marciano B, *et al.* (2003) Intraconazole to prevent fungal infections in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* **348**, 2416-2422.
58. Horwitz ME, Barrett AJ, Brown MR, Carter CS, Childs R, Gallin JI, Holland SM, Linton GF, Miller JA, Leitman SF, Read EJ, Malech HL (2001) Treatment of chronic granulomatous disease with nonmyeloablative conditioning and a T-cell-depleted hematopoietic allograft. *New Engl J Med* **344**, 926-927
59. Barese CN, Goebel WS, Dinauer MC. (2004) Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Expert Opin Biol Ther.* **4**, 1423-34
60. Briones MA, Josephson CD, Hillyer CD (2003). Granulocyte transfusion: Revisited. *Curr Hematol Rep* **2**, 522-527.
61. Bhattacharya A, Slatter M, Curtis A, Chapman CE, Barge D, Jackson A, *et al.* (2003) Successful umbilical cord blood stem cell transplantation for chronic granulomatous disease. *Bone Marrow Transplant* **31**, 403-405.

Inmunología del trasplante

EMILIO GÓMEZ DE LA CONCHA
MERCEDES PÉREZ BLAS

RESUMEN

El trasplante es hoy la solución más idónea para el fracaso funcional de muchos órganos del cuerpo humano. Sin embargo la presencia de antígenos de histocompatibilidad en todas las células nucleadas hace que el sistema inmunitario provoque el rechazo de todo trasplante que no sea realizado entre gemelos univitelinos. El progreso en las técnicas quirúrgicas, el tipaje de donante y receptor, la selección del primero y sobre todo la administración indefinida de drogas inmunosupresoras al receptor ha permitido que el trasplante sea un tratamiento habitual. Sin embargo, los trasplantes, en la mayoría de los casos, no duran indefinidamente por culpa de un rechazo crónico para el que hoy en día no existe tratamiento. Por otro lado, el número de donantes es limitado y no todos los que lo necesitan pueden recibir un trasplante. La solución de estos dos problemas ha de venir por el logro de la tolerancia al trasplante en el receptor y por el xenotrasplante. Estos son los dos grandes retos que tiene la investigación en este campo en los próximos años.

1. INTRODUCCIÓN

Más de cincuenta años después del primer trasplante renal coronado por el éxito, el trasplante de órganos se ha convertido en un tratamiento habitual del fracaso funcional de los más importantes órganos de nuestro cuerpo. Esto ha sido posible gracias al progreso realizado en tres grandes frentes: las técnicas quirúrgicas, el conocimiento de las moléculas de histocompatibilidad (HLA) y las técnicas para su estudio, y el desarrollo de fármacos inmunosupresores.

El número de trasplantes aumenta de año en año, habiéndose realizado más de 21.000 trasplantes de órganos en USA en 1999 (Tabla 1). En España también el número de trasplantes es considerable y durante el año 2005 se realizaron los siguientes (datos de la Organización Nacional de Trasplantes): 2.200 renales de donante cadáver y 87 de donante vivo, 1.070 hepáticos, 287 cardíacos, 167 de pulmón, 3 de pulmón corazón, 74 pancreáticos, 7 intestinales, 1.910 de precursores hematopoyéticos, de los cuales 1.353 fueron autólogos y 557 alogénicos.

Sin embargo, aún quedan graves problemas sin resolver. Si bien la viabilidad del órgano a los 5 años es muy buena (Tabla 1), los trasplantes no duran indefinidamente, apareciendo en la mayoría de los casos un rechazo crónico que les hace fracasar en épocas posteriores (Tabla 2). También los fármacos que se administran para evitar el rechazo, aunque muy útiles en los primeros años post-trasplante, han de administrarse indefinidamente y tienen efectos secundarios importantes, favoreciendo principalmente la aparición de infecciones y tumores. Y finalmente, y éste puede que sea el mayor problema, existe una gran escasez

TABLA 1. *Trasplantes realizados en USA en 1992 y 1999 y lista de espera y supervivencia del órgano trasplantado en este último caso*

Órgano trasplantado	N.º de trasplantes		Lista de espera (1999)	Supervivencia del órgano (1999) %	
	1992	1999		1 año	5 años
Riñón	9.736	12.251	46.803	94	77
Hígado	3.064	4.463	16.423	87	72
Corazón	2.172	2.345	4.114	85	69
Pulmón	535	862	3.638	77	43
Páncreas	ND	245	971	79	60
Intestino	ND	68	133	70	ND

TABLA 2. *Supervivencia del trasplante renal, cifras actuales*

Un año	95 %
Cinco años	86 %
Diez años	40 %
Veinte años	30 %

de órganos que impide que reciban uno la mayoría de los enfermos que lo necesitan. Por eso, pese a los enormes avances realizados en las tres áreas mencionadas anteriormente, quedan dos grandes problemas que resolver. Por un lado, conseguir que el organismo receptor acepte el injerto como si fuera tejido propio, es decir que se haga tolerante para él; esto evitaría tener que administrar inmunosupresores indefinidamente con los graves problemas de efectos secundarios que acarrear. Por otro lado, la solución a la escasez de órganos sólo puede venir con el xenotrasplante, es decir el trasplante de órganos de especies distintas a la nuestra, que puedan ser criadas específicamente con este fin y en cantidades ilimitadas.

2. EL SISTEMA HLA

El éxito de un trasplante depende de minimizar el fenómeno de rechazo, del cual es responsable el sistema inmunitario al reconocer el tejido injertado como extraño al organismo. El trasplante alogénico utiliza injertos de donantes de la misma especie que el receptor.

Los principales antígenos reconocidos como extraños en las células de un tejido alogénico trasplantado son las moléculas HLA (de *Human Leucocyte Antigens*) que se encuentran en la superficie de todas las células nucleadas del organismo. Estas moléculas exhiben un extraordinario polimorfismo, y su función es presentar péptidos, presentes en las células, a los linfocitos T para que estos los examinen y determinen si son del propio organismo y deben ser conservados, o si son extraños y deben ser eliminados. Se piensa que este polimorfismo es necesario para preservar la especie de infecciones. En efecto, la diversidad de las moléculas HLA las hace capaces de unir y presentar cualquier péptido, de cualquier proteína, de cualquier microorganismo y, por tanto, hacer que el sistema inmunitario los reconozca como extraños y los elimine. Un número limitado y pequeño de polimorfismos en el sistema HLA podría permitir que un virus mutara de forma que ninguno de sus péptidos pudiera unirse a y ser presentado por estas moléculas y por tanto el sistema inmunitario no podría defender a ningún organismo de la especie contra su infección (Janeway CA, 2005).

Pero lo que representa una ventaja frente a las infecciones, es un serio obstáculo para el trasplante, pues hace que cada individuo exprese en la superficie de sus células moléculas HLA que van a ser reconocidas como extrañas por el sistema inmunitario de otro individuo de la misma especie, siendo extraordinariamente difícil encontrar dos individuos no emparentados que tengan los mismos antígenos HLA. Aunque esto depende de la frecuencia de las moléculas

HLA de cada individuo, se ha calculado que, como media, existe una probabilidad de uno entre un millón de encontrar dos individuos no emparentados con las mismas moléculas HLA.

Existen dos tipos de moléculas HLA. Las llamadas de clase I, que aparecen en todas las células nucleadas del organismo, y las de clase II, que aparecen fundamentalmente en células presentadoras de antígeno (APC) del sistema inmunitario como monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. También en determinadas circunstancias, tras estímulos activadores, las moléculas de clase II pueden aparecer en la superficie de linfocitos T y de células endoteliales.

La misión de las moléculas HLA de clase I es presentar péptidos a los linfocitos T CD8 citotóxicos, mientras que las de clase II presentan péptidos a los linfocitos T CD4 cooperadores.

Las moléculas de clase I poseen dos cadenas: alfa y beta. En todas ellas la cadena beta es la β_2 microglobulina, que no es polimórfica. La cadena alfa tiene tres dominios extracitoplasmáticos denominados α_1 , α_2 y α_3 . Los dominios α_1 y α_2 son los más externos a la célula y forman entre ellos un surco o hendidura donde se aloja el péptido. Estas zonas de la molécula son las más variables, de tal forma que cada variante o alotipo va a unir, alojar y presentar péptidos diferentes.

Las moléculas de clase II tienen una estructura tridimensional muy parecida a las de clase I. Sin embargo, sus cadenas alfa y beta son semejante entre sí, teniendo cada una dos dominios. Los dominios α_1 y β_1 , los más externos a la célula, son los más polimórficos y los que forman entre sí el surco o hendidura donde va a alojarse el péptido.

Con excepción de la β_2 microglobulina, todas las cadenas de las moléculas de histocompatibilidad son codificadas por genes que se encuentran en el ser humano en un pequeño segmento del brazo corto del cromosoma 6, denominado Complejo Principal de Histocompatibilidad o complejo HLA. Esta región contiene tres zonas, denominadas de clase I, II y III. Es en la zona de clase I donde se encuentran los genes que codifican para las cadenas alfa de las moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C, denominadas moléculas HLA de clase I y en la zona de clase II se encuentran los genes para las cadenas alfa y beta de las moléculas HLA-DR, HLA-DQ Y HLA-DP, llamadas moléculas de clase II. Con excepción del gen HLA-DRA1 (gen para la cadena alfa de la molécula HLA-DR) el resto de los genes mencionados son muy polimórficos, destacando los genes HLA-B (más de 400 alelos) y HLA-DRB1 (más de 200 alelos), que codifican, respectivamente, para la cadena alfa de HLA-B y para la cadena beta de HLA-DR.

En su conjunto, el Complejo Principal de Histocompatibilidad o región HLA contiene unos 200 genes entre los que figuran, además de los mencionados, otros muchos genes importantes para la respuesta inmunitaria, pero no ya para el rechazo de injertos.

Si bien es muy difícil encontrar dos individuos no emparentados que posean idénticas moléculas HLA, esto sí ocurre en un 25% de los hijos de unos mismos padres. Esto es debido a que, al estar todos los genes polimórficos de las moléculas HLA reunidos en un pequeño segmento del cromosoma 6, todo el grupo se hereda de forma conjunta, constituyendo un solo haplotipo.

Según se ha podido demostrar en ratones, si donante y receptor no comparten todos las moléculas HLA (realmente HLA es una denominación reservada a humanos, por lo que en animales habría que hablar de antígenos MHC de *Major Histocompatibility Complex*) al trasplantar cualquier órgano, se produce un rechazo al cabo de pocos días. Si, por el contrario, todo el complejo HLA es compartido por donante y receptor y, por tanto, todas las moléculas HLA son las mismas en ambos, este tipo de rechazo no se produce, pero sí uno más lento que aparece al cabo de un par de meses. Esto se debe a que, además de los antígenos o moléculas principales de histocompatibilidad, existen otros antígenos menores de histocompatibilidad que acaban por producir de todas formas rechazo. Estos son mal conocidos, pero se piensa que son proteínas intracelulares polimórficas que, presentadas por moléculas HLA, permiten reconocer al órgano como extraño por el sistema inmunitario y producir su rechazo. Así pues, aún en hermanos que compartan todos los antígenos HLA, en el caso de un trasplante, es necesario el tratamiento de por vida con inmunosupresores.

3. ALORREACTIVIDAD Y RECHAZO

Considerando el elevado polimorfismo del sistema HLA, y la escasa probabilidad de encontrar para un receptor cualquiera un donante HLA idéntico, los fenómenos de rechazo aparecerán invariablemente en cualquier tipo de trasplante, a excepción del autólogo o del procedente de gemelo singénico. Los principales tipos de rechazo, atendiendo al momento de su aparición y a las características anatomopatológicas del tejido rechazado, son el Hiperagudo, Agudo y Crónico.

3.a. Componentes celulares y moleculares del rechazo

La base inmunológica de los rechazos es el fenómeno de alorreactividad, es decir, el reconocimiento por parte de los linfocitos T del receptor de las molé-

culas HLA alogénicas del donante, lo cual lleva a la producción de anticuerpos y a la activación de células efectoras T-CD8, responsables en último término del rechazo. Durante el fenómeno de alorreactividad, los linfocitos T reconocen, a través de su receptor (TCR), tanto residuos aminoácidos polimórficos de la molécula HLA alógena como el péptido alojado en su interior (Housset D, 2003). En cualquiera de los casos, y por razones no aclaradas, la frecuencia de linfocitos T alorreactivos en un individuo cualquiera es del 2-10%, frecuencia elevadísima si se compara con la de linfocitos T específicos para un antígeno concreto, que es de 1/10.000 – 1/100.000. Las moléculas HLA alogénicas son prácticamente las únicas proteínas capaces de estimular una respuesta inmune sin ser primero procesadas en péptidos para unirlos al HLA propio: durante el reconocimiento alógeno son reconocidas sobre las células presentadoras de antígeno del donante (vía directa de presentación de aloantígenos).

3.b. Células presentadoras de antígeno y linfocitos. Vías directa e indirecta

La abundancia de células presentadoras (APC) en el injerto facilita la producción de rechazo. De hecho, en modelos animales la eliminación de APC del injerto prolonga la supervivencia del trasplante (Sykes M, 2003a). Hay que tener en cuenta que la realización de un trasplante hace que participen dos tipos de células presentadoras: las del receptor y las del donante. Según el tipo de APC que participe se distinguen dos vías en el proceso de sensibilización alógena, las vías directa e indirecta.

- *Vía directa de presentación de aloantígenos.* Tras la realización de un injerto y durante un tiempo variable (días-semanas) se produce una migración de las APC del donante desde el injerto hacia los ganglios linfáticos regionales y el bazo (Game DS, 2002). Ahí se produce la sensibilización de los linfocitos T CD4 vírgenes del receptor (Figura 1). Estas células T, una vez activadas por el HLA alógeno, se desplazarán hacia el injerto, donde su extravasación se ve favorecida por el proceso inflamatorio asociado a la realización del trasplante (daño isquémico y traumático del trasplante) que conlleva la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF α , γ IF). Estas citoquinas aumentan localmente las moléculas de adhesión del endotelio vascular del injerto facilitando la extravasación de leucocitos, e incrementan la expresión de HLA-II sobre las APC, y por tanto su capacidad presentadora de antígeno (Thorsby E, 2004). Aparte de este proceso de sensibilización inicial de las células T vírgenes, en el rechazo también pueden participar células T CD4 de memoria que fi-

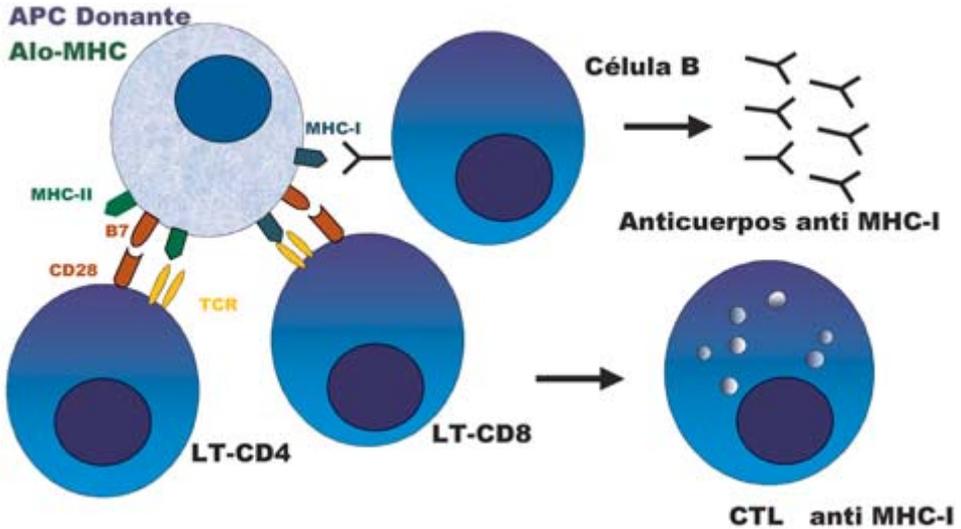


FIGURA 1. Vía Directa de presentación de alo-MHC.

siológicamente reconocen *HLA+péptido propio* y son capaces de reaccionar de manera cruzada con *alo-HLA+péptido extraño*. Aunque también puede darse vía directa de presentación de aloantígenos desde las APC del donante hacia las células T-CD8 del receptor, éste representa un mecanismo menor en la producción de rechazo. Se ha descrito que la vía directa de alorreactividad mediada por células T-CD4 es necesaria y suficiente para producir rechazo agudo, aun cuando no haya células T-CD8 (Pietra BA, 2000).

Hay dos modelos para explicar la elevada frecuencia de células T alorreactivas capaces de participar en la vía directa: uno propone que la especificidad del TCR de las células T alorreactivas va dirigida frente a los aminoácidos polimórficos y expuestos del MHC alogénico, pero el péptido alojado por ese MHC no sería relevante. El otro modelo postula que la especificidad del TCR va dirigida frente a un determinado péptido derivado de una proteína celular o sérica normal, y son las diferencias en la región del unión al antígeno del alo-MHC lo que le llevarían a unir una serie de péptidos esencialmente distintos de los que une el MHC propio.

Considerando que las APC del donante procedentes del injerto disminuyen con el tiempo, la vía directa de alo-reconocimiento se da mayoritariamente, y es más relevante, durante las primeras semanas tras el trasplante: es decir, disminuye con el tiempo y en consecuencia su participación en el rechazo crónico es menor.

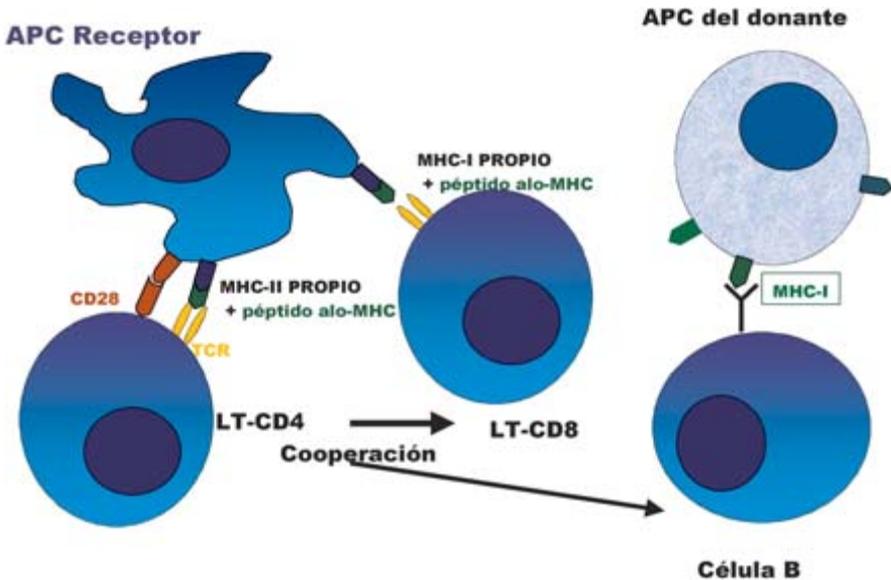


FIGURA 2. Vía Indirecta de presentación de alo-MHC.

• *Vía indirecta de presentación de aloantígenos.* Esta vía es similar al reconocimiento fisiológico de antígenos por las células T del sistema inmunitario. Las *APC del receptor*, situadas en los órganos linfoides secundarios, captan moléculas HLA-I, HLA-II y antígenos menores de histocompatibilidad solubles, liberados desde el injerto. En este caso, los fragmentos del HLA alogénico se exportan a la membrana de las APC unidas al HLA-II propio, del receptor, con lo que se activan preferentemente los linfocitos T-CD4. Por tanto, en la vía indirecta (Figura 2), las células T-CD4 del receptor reconocen antígenos HLA del donante presentados por moléculas HLA propias, del receptor (Pettigrew GJ, 2001; Caballero A, 2006). Diversos datos indican que la vía indirecta por sí sola es capaz de producir rechazo, aún en ausencia de reconocimiento alogénico por la vía directa (Fluck N, 1999).

Aparte de las APC implicadas durante el reconocimiento alogénico, hay otras poblaciones celulares implicadas en el rechazo. En la vía directa los linfocitos T-CD4 que reconocen el HLA-II alogénico proporcionan cooperación a linfocitos T-CD8 cercanos que reconocen sobre la APC el HLA-I alogénico, y también las T-CD4 cooperan con células B que están reconociendo HLA-I o II alogénicos. De manera análoga, la activación de las T-CD4 en la vía indirecta proporciona la cooperación necesaria a células T-CD8 y células B que están participando en el reconocimiento alogénico.

Hay importantes diferencias entre estas dos vías: la vía directa induce *in vitro* una respuesta proliferativa de células T alorreactivas 100 veces mayor que la producida frente a un antígeno concreto. También, la frecuencia de células T activadas por la vía directa es 100 veces mayor que en la vía indirecta. La producción de anticuerpos en la indirecta no se inhibe con Ciclosporina A, y sí en la vía directa.

Se piensa que la vía directa es la principal responsable del rechazo agudo, mientras que la indirecta participa mayoritariamente en el crónico.

3.c. Anticuerpos

Los anticuerpos (Acs) presentes en el receptor ya en el momento del trasplante pueden provocar rechazo hiperagudo si están presentes en suficiente cantidad y reconocen determinantes antigénicos expresados en el endotelio vascular del injerto. Estos anticuerpos son de dos tipos: Anticuerpos naturales y Anticuerpos inducidos (Duquesnoy RJ, 1990).

Los *Anticuerpos naturales* son los dirigidos frente a los grupos sanguíneos del sistema ABO, son IgM y tienen menor afinidad por sus ligandos que los inducidos. Los *Anticuerpos inducidos* aparecen por sensibilización previa a un sistema HLA alógeno. Esto puede ocurrir por la realización de transfusiones, trasplantes previos o en mujeres multíparas. En este último caso, la mujer entra en contacto con las moléculas HLA alógenas expresadas en el feto que proceden del haplotipo paterno. Los anticuerpos inducidos por sensibilización alógena van dirigidos en más del 90 % de los casos frente a moléculas HLA-I, y en un porcentaje mucho menor frente a HLA-II. Son IgG y tienen mayor afinidad por su ligando que los naturales, con lo que son más peligrosos en la producción de rechazo hiperagudo.

En otros casos, los anticuerpos se producen tras la realización del trasplante y van dirigidos contra el HLA expresado en el injerto. Generalmente no llegan a producir rechazo agudo, porque aparecen tardíamente, cuando ya la respuesta T ha causado rechazo, o bien porque su producción es lenta debido a la inmunosupresión post-trasplante y también debido al fenómeno de Acomodación endotelial, que permite la coexistencia “pacífica” de anticuerpos frente al injerto sin que éste resulte dañado. Estos anticuerpos parecen jugar un papel importante en el rechazo crónico.

3.d. Rechazo Hiperagudo

Se produce durante las primeras 24 horas tras la realización del trasplante. En el trasplante renal el riñón se vuelve azulado y necrótico. La mortalidad es

elevada y no tiene tratamiento, salvo el retrasplante. Desde el punto de vista anatomopatológico se caracteriza por la oclusión trombótica de los vasos del injerto y hemorragias, con infiltrado abundante de granulocitos (Sykes M, 2003b).

Se debe a la presencia en el receptor de anticuerpos preformados, anteriores a la realización del trasplante, que son capaces de reconocer estructuras expresadas en el endotelio del injerto. Es decir, anticuerpos IgM anti-ABO e IgG anti-HLA de clase I. Es, por tanto, una respuesta inmunológica secundaria, o de recuerdo.

El mecanismo de daño se basa en la activación del Sistema del Complemento y en la activación endotelial tipo I. Considerando que sobre las células endoteliales hay proteínas reguladoras de la activación del Complemento (CR1, MCP, DAF...), para que el anticuerpo unido a la célula endotelial sea capaz de sobrepasar esos mecanismos hace falta que sea de elevada afinidad y se encuentre a título elevado. Esos dos requisitos los cumplen los anticuerpos anti-HLA de clase I, de ahí que sean más peligrosos en la producción de este tipo de rechazo.

Una vez activado el Complemento, se da la lisis de las células endoteliales por el complejo de ataque a la membrana (C5-C9), pero además, el Complemento induce también el fenómeno de *activación endotelial tipo I*, en el que se produce la retracción de las células endoteliales y la pérdida de moléculas anti-trombóticas en el endotelio. El resultado es el edema, la hemorragia extravascular y la formación de trombos.

Hay que reseñar que no todos los órganos son igualmente susceptibles a este tipo de rechazo. En principio, es propio de órganos vascularizados, por lo que no se da en el trasplante de islotes pancreáticos (que pierden el componente vascular en cultivo), o de componentes celulares aislados (hepatocitos, médula ósea) o de órganos en los que no hay exposición inmediata del endotelio vascular del injerto a la circulación sanguínea del receptor, como la piel.

Por otra parte, algunos órganos como el hígado son poco susceptibles al rechazo hiperagudo. Las razones no son claras, pero se postulan diversos mecanismos: el doble aporte vascular a través de la vena porta y arteria hepática le permitiría suplir el daño isquémico sufrido en algún punto; la existencia de moléculas HLA-I solubles en hígado permite que no haya un blanco único (endotelio) sobre el que se dirija el ataque de los anticuerpos, y en consecuencia el daño es menor; finalmente, los macrófagos hepáticos son capaces de adsorber e inactivar inmunocomplejos, así como el fibrinógeno y los agregados plaquetarios.

Como este tipo de rechazo carece de tratamiento efectivo, la mejor estrategia es evitar su aparición. Para ello es fundamental la compatibilidad de grupo sanguíneo ABO y la determinación de anticuerpos preformados (Anticuerpos citotóxicos) en el receptor, así como la realización de Pruebas cruzadas previas al trasplante. Actualmente, han surgido diferentes estrategias encaminadas a realizar el trasplante a pesar de la incompatibilidad ABO o de la existencia de Anticuerpos citotóxicos en el receptor (Jordan SC, 2005). Son especialmente útiles en individuos hiperinmunizados en los que, a pesar de estar incluidos en programas especiales (Eurotrasplante), hasta en un 40% no se consigue donante. Así, en trasplante renal y cardiaco se han utilizado las siguientes técnicas:

- Administración de dosis altas de gamma globulina inmune intravenosa, que trabaja bloqueando los Acs anti-HLA e inhibiendo el Complemento
- Administración de Anticuerpos Monoclonales (AcMo) anti-CD20, que inducen depleción de células B e interfieren con la actividad presentadora de antígeno de las células B.
- Plasmaféresis, sola o combinada con IgG-anti citomegalovirus o con Gammaglobulina inmune.

3.e. Rechazo Agudo

Clínicamente, aparece desde los 7 días post-trasplante y su incidencia disminuye pasados los 3 primeros meses. Es el más frecuente, aunque en la actualidad debido a su mejor control con inmunosupresores (anticuerpos anti-CD3, Ciclosporina A...), se ha incrementado la frecuencia del rechazo crónico. El examen anatomopatológico del órgano con rechazo agudo muestra un infiltrado abundante de células mononucleares, principalmente células T, macrófagos y células B. El endotelio vascular (15%) y el intersticio del injerto (85%) son los principales blancos del rechazo agudo (Paul LC, 2001a). Los mecanismos efectores son linfocitos T citolíticos (CTL) en el daño intersticial y anticuerpos y células T en el endotelial.

A diferencia del rechazo hiperagudo, el agudo es una respuesta inmunitaria primaria, es decir, las células T del receptor entran en contacto por primera vez con el HLA alogénico procedente del injerto, de ahí que tarde en iniciarse 7-10 días. Se produce la sensibilización por la vía directa de presentación de aloantígenos y, en menor medida, participaría la vía indirecta (Figuras 1, 2).

Dado que los mecanismos efectores del daño sobre el injerto son la presencia de anticuerpos y linfocitos T CD8 citolíticos frente al HLA alogénico, es decir, está

mediado por células T, la terapia inmunosupresora de células T es efectiva (Sykes M, 2003b).

3.f. Rechazo Crónico

Ocurre pasado el primer año tras la realización del trasplante. El análisis anatómopatológico muestra un proceso de fibrosis intersticial con oclusión arterial. Hay proliferación de células endoteliales y fibra muscular lisa, con destrucción de la capa media vascular, fibrosis concéntrica que ocluye la luz, y abundancia de citoquinas fibrogénicas localmente (FGF, IGF...). Dependiendo del órgano injertado, se puede observar también obliteración bronquiolar o destrucción de conductos biliares. Finalmente se produce la fibrosis del parénquima del injerto (Sykes M, 2003b).

Además de los mecanismos inmunológicos, son factores de riesgo el tiempo de isquemia inicial del injerto, la escasa masa del injerto (especialmente en el trasplante hepático), la denervación del injerto, los fármacos inmunosupresores, la infección viral crónica, la hipertensión arterial y la hiperlipidemia.

Se asocia frecuentemente con la presencia de anticuerpos anti-HLA alogénico en el receptor, y con episodios previos de rechazo agudo. Es normalmente refractario al tratamiento inmunosupresor, a diferencia del rechazo agudo. De hecho, sólo el 50% de los trasplantes son funcionantes pasados 10 años. Dado que con el paso del tiempo, las APC del donante son sustituidas por las del receptor, sería la vía indirecta de presentación de aloantígenos la principal implicada en su producción.

4. TIPAJE HLA Y LISTA DE ESPERA

La determinación de las variantes proteicas HLA expresadas por las células de donante y receptor se ha realizado clásicamente mediante técnicas de microlinfocitotoxicidad estándar (técnicas serológicas). Actualmente, dichas técnicas están siendo desplazadas por técnicas de biología molecular (genotipaje) en las que se determina el alelo heredado por ese individuo en cada uno de los *loci* HLA-A, B, C, DR, DQ y DP. Así, las actualmente 100 variantes proteicas HLA (clase I y II) suponen más de 1.300 alelos definidos a nivel de secuencia de DNA (Tiercy JM, 2002). De esta manera, la identidad HLA por criterios de genotipaje (DNA) lleva a una mayor supervivencia del injerto.

En cualquiera de los casos, hay que tratar de minimizar las diferencias HLA entre donante y receptor, primero en clase II y después en clase I para evitar, en la medida de lo posible, la aparición de fenómenos de rechazo. Aún con todo, el

rechazo se puede acabar produciendo debido a diferencias en antígenos menores de histocompatibilidad. De ahí que sea preferible un donante emparentado a uno no relacionado, ya que en el caso de un familiar la probabilidad de compartir antígenos menores es mucho mayor que con un donante no relacionado.

Técnicas serológicas (Stites DP, 1998) Son un método rápido y sencillo; se suelen utilizar sueros policlonales que contienen anticuerpos dirigidos frente a moléculas HLA, o bien anticuerpos monoclonales frente a HLA. Se usan placas de 60 pocillos en las que se incluyen, en cada uno de los pocillos, diferentes anticuerpos frente a las distintas variantes proteicas HLA. Posteriormente se añaden las células problema (células T o células B, según que se realice tipaje de clase I o clase II respectivamente) y, a continuación, Complemento exógeno. Si se produce la lisis celular indica que la célula problema expresa la molécula HLA frente a la que va dirigido el anticuerpo contenido en ese pocillo.

Genotipaje. Se usan técnicas de amplificación del DNA mediante cebadores específicos de los exones a amplificar PCR-SSP (*sequence-specific primers*) o bien mediante amplificación e hibridación (PCR-SSOP, *sequence-specific oligonucleotide probes*). La principal ventaja de estas técnicas sobre los métodos serológicos es su capacidad de distinguir alelos que pueden confundirse con las técnicas serológicas clásicas, como son los grupos de alelos HLA con reacción cruzada (CREG): A2- A3- A28- A30- A31- A32 p. ejplo, o DR5, DR6, DR8 y DR12. Es decir, son más discriminativas. Estas técnicas pueden ser de baja resolución, en las que sólo se identifica el componente genérico del alelo, p. ej. DRB1* 04 (DR4 por técnicas serológicas), o de alta resolución (más discriminativas), que identifican además del componente genérico al alélico, p. ejplo DRB1* 0405 (DR4 por técnicas serológicas).

En el trasplante de médula ósea es fundamental la identidad HLA entre donante y receptor mediante técnicas de alta resolución en clase II y clase I, aunque se pueden aceptar diferencias menores en clase I: el mismo componente genérico, por ejemplo B7, pero distinto alélico (B*0701 *versus* B*0705).

Anticuerpos Citotóxicos y Pruebas Cruzadas

En cualquier individuo que entra en lista de espera para un trasplante de órganos sólidos hay que realizar extracciones de suero periódicamente y en cada una de esas extracciones séricas determinar la posible presencia de anticuerpos citotóxicos, es decir anticuerpos capaces de provocar rechazo hiperagudo. Para ello se enfrenta el suero del receptor a un panel de células linfoides proceden-

tes de individuos (mínimo 30) no relacionados y de tipaje HLA conocido. Tras la adición de Complemento, se observa al microscopio si hay o no muerte celular. Según el porcentaje de pocillos en los que se observe lisis celular se dirá que el porcentaje de Anticuerpos citotóxicos de ese receptor es, por ejemplo, del 0%, 22%, 97%...Y, además, se podrá determinar si en aquellos pocillos en los que hubo lisis había algún factor común, por ejemplo en todos ellos las células linfoides expresaban B7 o B27, en cuyo caso sabemos que esos anticuerpos van dirigidos contra B7/B27. De esta manera, se obtiene un seguimiento en el tiempo del nivel de Anticuerpos citotóxicos de ese receptor y de su posible especificidad HLA. También se pueden determinar mediante citometría de flujo y ELISA. Aquellos individuos cuyo porcentaje de Anticuerpos citotóxicos es igual o mayor del 50% frente a las células del panel de denominan hiperinmunizados. Estos pacientes son difícilmente trasplantables y pueden llegar a esperar varios años para conseguir un donante apropiado; para evitarlo hay programas nacionales e internacionales (Eurotrasplante) en los que se les da preferencia. En el programa europeo y mediante programas informáticos (determinación de los triplete de aminoácidos inmunogénicos en la región polimórfica del HLA) se definen las variantes proteicas HLA-A y HLA-B frente a las cuales la prueba cruzada sería negativa. Se consigue así trasplantar a un 45% de los pacientes hiperinmunizados.

En las *pruebas cruzadas* se enfrenta el suero pre-trasplante del receptor, obtenido horas antes de la realización del trasplante como tal, y sus sueros previos si los hay (almacenados en la seroteca a -20°C) con las células linfoides del donante. Se cocultivan ambos y se añade Complemento. Si hay muerte celular la prueba cruzada es positiva y está contraindicada la realización del trasplante. También se pueden realizar pruebas cruzadas por citometría de flujo, con suero del receptor, células del donante (o antígeno HLA adherido a unas esferas) y un AcMo anti-IgG humana.

Las pruebas cruzadas positivas indican la aparición de rechazo hiperagudo en caso de que se realizara el trasplante, aunque con los tratamientos previos mencionados previamente (gammaglobulina inmune, plasmaféresis...) en ocasiones es posible la realización del trasplante.

5. INMUNOSUPRESORES

En los últimos años, la búsqueda de fármacos inmunosupresores ha llevado al descubrimiento de una gran variedad de sustancias con distintos mecanismos de acción: capaces de inhibir la actividad de la calcineurina, bloquear la trans-

misión de señales desde receptores de citoquinas, inhibir el metabolismo de las purinas, el funcionalismo del TCR/CD3, la transcripción de genes de citoquinas o la funcionalidad del receptor de IL-2, entre otras. Estas sustancias incluyen a los glucocorticoides, clásicamente utilizados, la Ciclosporina A, el FK506, la Rapamicina, el Mofetilmicofenolato y anticuerpos monoclonales anti-CD3, entre otros (Masri MA, 2004). El tratamiento del rechazo suele combinar dos o más de estas sustancias, dependiendo de distintos factores del donante y del receptor del trasplante (First MR, 2001; Bestard, O, 2005; Borrow R, 2005).

5.a. Glucocorticoides

Los glucocorticoides actúan a nivel celular y molecular, produciendo distintos efectos. Todas las células nucleadas poseen receptores citoplásmicos para ellos que en condiciones normales se hallan unidos a proteínas de shock térmico (hsp90). Una vez que el glucocorticoide se une al receptor, se desplaza al núcleo donde se une a secuencias específicas del ADN denominadas GRE (*glucocorticoid response elements*) y ahí puede actuar aumentando o suprimiendo la transcripción de diversos genes. Se calcula que hay hasta 100 genes que poseen sitios GRE, y son por tanto susceptibles a la acción de estos fármacos.

Las principales acciones ejercidas por los glucocorticoides son las siguientes (Almawi WY, 1998):

- a) Redistribución leucocitaria. Producen neutrofilia debido a una disminución de moléculas de adhesión endoteliales (Selectinas, ICAM-1, VCAM-1) lo que impide la extravasación leucocitaria hacia tejidos, y linfopenia debido al secuestro de linfocitos en órganos linfoides secundarios. Esta acción es directa (a nivel transcripcional) e indirecta, debido a la menor síntesis de citoquinas proinflamatorias, encargadas de aumentar esas moléculas de adhesión.
- b) Efecto antiinflamatorio. Inhiben la producción de citoquinas y sustancias proinflamatorias. Activan la transcripción de lipocortina, la cual inhibe a la fosfolipasa A2, necesaria para la liberación del ácido araquidónico desde los depósitos membranales. En consecuencia, se bloquea la producción de metabolitos derivados del ácido araquidónico con clara actividad proinflamatoria: leucotrienos, prostaglandinas, PAF y otros eicosanoides.
- c) Inmunosupresión. Disminuyen la función presentadora de antígeno de los macrófagos, así como su capacidad microbicida. Inhiben la activación y proliferación de células T frente a antígenos.

Mecanismo de acción

Bloquean factores transcripcionales, NF-AT, AP1, NF- κ B, inhibiendo así la transcripción de los genes de diversas citoquinas: IL-1, IL-6, IL-8, TNF α , IL-3, IL-5, GM-CSF, IL-2, IL-4, γ IF, IL-12... Los glucocorticoides pueden unirse directamente a esos factores transcripcionales y bloquearlos; además inducen la síntesis del factor inhibidor I κ B, con lo que al unirse éste a NF- κ B impide su desplazamiento al núcleo. Por otra parte, la unión del glucocorticoide a los GRE sobre el DNA impide físicamente la unión del correspondiente factor transcripcional a su secuencia sobre el DNA. Además, disminuyen la vida media del mRNA de diversas citoquinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-2, TNF α y GM-CSF.

Disminuyen la expresión de moléculas de adhesión por mecanismos transcripcionales y post transcripcionales: Selectinas, ICAM-1 y VCAM-1.

Aumentan la transcripción de TGF β , citoquina inmunosupresora, y la vida media de su mRNA por estabilización de los transcritos.

5.b. Ciclosporina A y Tacrolimus (FK506): Inhibidores de la Calcineurina

La Ciclosporina A (CsA), fue aislada (1970) y comercializada (*Sandimmun*®), por los laboratorios Sandoz a partir de cultivos de un hongo (*Tolypocladium inflatum*) que sintetizaba y secretaba metabolitos a los que se denominó ciclosporinas. Sus propiedades inmunosupresoras fueron inicialmente descritas por Borel *et al.* Desde su introducción en la práctica clínica en el tratamiento de los pacientes trasplantados de riñón en los años 80 (1984) ha disminuido notablemente la incidencia de rechazo agudo, consiguiéndose que la supervivencia al primer año del injerto sea prácticamente del 100% (Charpentier B, 2001). La CsA ha reemplazado extensamente los anteriores protocolos, de baja eficacia y elevada toxicidad, basados en la administración de azatioprina y corticoides. Actualmente, y dada la absorción oral errática de la CsA, se han desarrollado nuevos preparados (*Neoral*®) con una mejor absorción.

El FK506 o tacrolimus (Prograf®) es un antibiótico macrólido derivado de *Streptomyces tsukubaensis*, cuya potencia es hasta 100 veces mayor que la de la CsA en análisis *in vitro*. En consecuencia, las dosis utilizadas de FK506 son menores y, por otra parte, su absorción oral es buena. La supervivencia del injerto pasados 3 años parece ser superior a la conseguida con la CsA. También se ha mostrado su eficacia en el tratamiento de los pacientes con episodios de rechazo agudo refractarios al tratamiento con CsA (van Hooff JP, 1999).

Ambas sustancias, CsA y FK506, se unen en el interior celular a proteínas denominadas genéricamente inmunofilinas que se encuentran en la mayoría de las células del organismo, y cuyos ligando fisiológicos son muy variados (proteínas de shock térmico, proteínas antioxidantes...) y no bien caracterizados. Concretamente la CsA se une a la Ciclofilina A, y el tacrolimus a FKBP12. Tras su unión a las inmunofilinas, ambas sustancias bloquean a una enzima fosfatasa, la calcineurina (Schreiber SL, 1992; Liu J, 1991). En condiciones normales la calcineurina es clave para el correcto funcionamiento del factor transcripcional NF-AT, pero también colabora en la inducción de otros factores como NF- κ B y AP-1 (Luo C, 1996; Trushin SA, 1999). Además, la calcineurina inhibe la transcripción de TGF β y del factor de crecimiento de hepatocitos. En consecuencia el bloqueo de la calcineurina impide la adecuada transcripción de diversos genes de citoquinas, IL-2, IL-4, γ IF, TNF α , IL-12 y GM-CSF, entre otros, pero incrementa la producción de TGF β .

Ambos fármacos se metabolizan a través del citocromo P450 hepático. Los principales efectos indeseables de la CsA y FK506 son la nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, neurotoxicidad e hipertensión, así como un mayor riesgo de infecciones, lo que resulta en una estrecha ventana terapéutica. Además la CsA produce hirsutismo e hiperplasia gingival, mientras que el tremor, la hiperglicemia y la diarrea son más frecuentes con el tacrolimus (van Hooff JP, 1999; Paul LC, 2001b)

5.c. Rapamicina

Descrita inicialmente por sus efectos antiproliferativos en 1975 en las islas de Rapa Nui, se aprobó su uso por la FDA en 1999. También, al igual que el tacrolimus, es un antibiótico macrólido, derivado de *Streptomyces hygroscopicus*, que se une a FKBP en el citoplasma celular (Raught B, 2001). Sin embargo, dada la abundancia de la inmunofilina citoplásmica, no se produce inhibición competitiva entre ambos fármacos, por lo que se pueden utilizar conjuntamente. De hecho, debido a sus mecanismos de acción respectivos, la rapamicina, también denominada sirolimus (*Rapamune*®) es sinérgica con la CsA y con el tacrolimus (Saunders RS, 2001) y se usa combinada con cualquiera de ellos en el tratamiento del rechazo agudo, además de ser utilizada en combinación con Mofetilmicofenolato (Bestard O, 2005).

Tras su unión a la inmunofilina, la rapamicina bloquea a proteínas citoplásmicas denominadas mTOR (*mammalian target of rapamycin*) que tienen actividad serina-treonina quinasa y son homólogos estructuralmente a la fosfatidil inositol 3 quinasa (PIK3). mTOR coordinan el balance entre la síntesis proteica y

la degradación proteica en respuesta a la cantidad y calidad de nutrientes. Regulan el ciclo celular, el importe de aminoácidos, la autofagia, la síntesis de proteínas ribosómicas y el inicio y elongación del proceso de traslación (Rohde J, 2001). La mayoría de las citoquinas tras la unión a sus receptores señalizan a través de mTOR y también lo hace la vía de CD28. La rapamicina, por tanto, bloquea la transmisión de señales desde los receptores de citoquinas y afecta tanto a células T como a células B. Se inhibe así la síntesis de DNA, quedando la célula parada en fase G1 tardía.

Los principales efectos indeseables son la mielosupresión, por bloqueo de citoquinas hematopoyéticas, y la hiperlipidemia (Paul LC, 2001b). Su utilización en el rechazo crónico se debe a que parece retardar su aparición, inhibiendo la actuación de citoquinas fibrogénicas (FGF, PDGF...) con lo que retrasa la proliferación endotelial y de fibra muscular lisa de la pared vascular, aunque la hiperlipidemia y la limitación en la dosis pueden reducir su potencial terapéutico (Saunders NS, 2001).

5.d. Anticuerpos Monoclonales (AcMo) anti-CD3 y otros

Los anticuerpos monoclonales **anti-CD3** (OKT3®), se llevan usando desde hace más de 20 años en el tratamiento del rechazo agudo y en su profilaxis.

Su vida media es de aproximadamente 18-36 horas, y su mecanismo de acción radica en la depleción de células T mediada por el Complemento y por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), y en la modulación de superficie de la molécula CD3, lo que impide la adecuada activación de las células T. Los dos principales problemas derivados de su administración son el “efecto primera dosis” debido a una liberación importante de citoquinas desde las células T (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 y TNF α) y la creación en el paciente de anticuerpos frente al monoclonal de origen murino, lo que disminuye su vida media y efectividad.

El efecto primera dosis se produce a las pocas horas de su administración y consiste en un cuadro de malestar general, a veces junto a disnea y síntomas gastrointestinales y dura de 2 a 48 h. Puede ser prevenido mediante la administración previa de corticoides, antipiréticos y antihistamínicos. Raramente produce síntomas más graves como necrosis tubular aguda, hipercoagulabilidad, edema pulmonar y meningitis aséptica. Como la liberación de citoquinas requiere el entrecruzamiento del AcMo a través de su región Fc con los receptores correspondientes en la superficie de otras células, se puede resolver este problema mediante la fusión de las regiones V del AcMo con regiones Fc de baja afinidad por sus recep-

tores (Fc- α p. ej.) o eliminando la región Fc. Para solucionar el problema del origen murino y el desarrollo de anticuerpos frente a él, hay distintas estrategias para humanizar el AcMo (fusión de la región murina Fab con región Fc humana...) (Smith JA, 1997).

Otros AcMo utilizados en el tratamiento del rechazo son **anti-CD52** o alem-tuzumab (Campath1®), capaz de provocar una intensa depleción de células T y B, ya que CD52 se expresa abundantemente en la superficie de los linfocitos, y es capaz de activar eficazmente al sistema del Complemento. El **anti-CD25**, Dacliczumab o Basiliximab (*Zenapax*®, *Simulect*®) va dirigido frente a la cadena alfa del receptor de IL-2 y reduce la incidencia de rechazo agudo (Vincenti F, 2006) especialmente si se combina con CsA.

5.e. Mofetilmicofenolato (MMF) (CellCept®)

Es un derivado del ácido micofenólico, que inhibe selectivamente a la Inosin monofosfatodeshidrogenasa (IMPDH) necesaria para la síntesis de DNA por la vía *de novo*, la cual es utilizada exclusivamente por los linfocitos T y B. Hay dos isoformas de la enzima: la IMPDH-I, que se expresa en células T y B en reposo, y la IMPDH-II, que se expresa solamente en linfocitos activados. De ambas, la más sensible al MMF es la isoforma II. El bloqueo de la enzima provoca depleción de guanosíntrifosfato, GTP, y deoxi GTP, y en consecuencia se inhibe la síntesis de guanina y por tanto de DNA, actuando así en la fase S del ciclo celular. Los efectos inhibidores sobre la síntesis de DNA afectan principalmente a células linfoides y no a otros tipos celulares, dado que en la mayoría de las células del organismo se usan tanto la vía *salvaje* como la *de novo* para la síntesis de DNA (Allison AC, 2000). También la disminución de GTP previene la glicosilación de moléculas de adhesión.

Inhibe la producción de óxido nítrico mediada por iNOS (sintasa inducible de óxido nítrico), disminuye la expresión de moléculas de adhesión endoteliales (VCAM-1), suprime la respuesta primaria de anticuerpos y bloquea la replicación de las células T activadas en fase S (Allison AC, 2000).

Se utiliza como fármaco de segunda línea en pacientes que no toleran la CsA o el tacrolimus, y también combinado con rapamicina. Puede ser útil en rechazo crónico dado que inhibe la proliferación de fibroblastos y fibra muscular lisa arterial. Sus principales efectos indeseables son gastrointestinales (dolor abdominal, náuseas, diarrea y gastroenteritis) y hematológicos (leucopenia, trombopenia) (Paul LC, 2001)

6. TOLERANCIA

Pese a todos los avances conseguidos en el campo de la inmunosupresión, los problemas que plantea el rechazo son todavía muy importantes. Por un lado, el rechazo crónico y por otro los efectos secundarios de las drogas que han de ser administradas indefinidamente, entre los que destaca la inmunosupresión inespecífica que facilita en el individuo trasplantado la aparición de infecciones y tumores.

Sería pues ideal el conseguir en el trasplantado una tolerancia específica para el órgano trasplantado. Esto es posible, ya que existen individuos trasplantados que por propia iniciativa han abandonado el tratamiento inmunosupresor y en los que no se ha producido rechazo, conviviendo indefinidamente órgano y receptor. Aunque estos son casos aislados y excepcionales, en animales sí se han realizado numerosos estudios sobre tolerancia, demostrándose que ésta puede ser adquirida frente a antígenos o injertos extraños. Tolerancia es definida en la práctica clínica como la supervivencia a largo plazo de un injerto alogénico en ausencia de tratamiento inmunosupresor.

6.a. Tolerancia Central

Es bien conocido que los pacientes trasplantados de médula ósea no requieren tratamiento inmunosupresor de por vida; de hecho el tratamiento inmunosupresor post trasplante va encaminado a prevenir la aparición de enfermedad de injerto contra huésped, GVHD (*graft versus host disease*), y se puede suspender pasados 6-9 meses. Este hecho se debe a que el trasplante de médula ósea induce tolerancia central, por depleción tímica (selección negativa) de los linfocitos reactivos frente al MHC del donante, ya que las células dendríticas y macrófagos que se encuentran en la unión córticomedular del timo del receptor proceden de la médula ósea injertada y son las responsables de la inducción de tolerancia frente al alo-MHC sobre los linfocitos T en maduración (Delis S, 2004). Por supuesto, dadas las complicaciones infecciosas, de rechazo y tóxicas por los tratamientos mieloablativos asociados a este trasplante, es impensable su utilización como estrategia terapéutica. Sin embargo, puede ser útil en aquellos pacientes que requieren un trasplante de médula ósea por su patología de base y que años después desarrollan insuficiencia funcional de un órgano sólido (riñón, hígado...). En este caso el trasplante posterior de riñón si es del mismo donante que el de médula ósea no requiere tratamiento inmunosupresor. También puede ser útil en aquellos pacientes que requieren un trasplante de órgano sólido pero en los que está contraindicada la terapéutica inmunosupresora de por vida (Fehr T, 2004)

Quimerismo parcial

Considerando la capacidad de las células precursoras hematopoyéticas para inducir tolerancia, se pueden administrar al receptor precursores hematopoyéticos del donante, pero sin que el sistema hematopoyético del receptor sea sustituido por el del donante (Monaco AP, 2001). Por otro lado, cada vez hay más evidencias que indican que el timo es funcional a lo largo de toda la vida del individuo. Es decir, que se puede inducir tolerancia o bien inyectando alo-HLA del donante en el timo, pero aquí no hay un aporte continuo del alo-HLA, por lo que la tolerancia inducida sería transitoria, o bien administrando precursores hematopoyéticos del donante; en este caso sí hay un aporte continuo de alo-HLA hasta el timo del receptor. Esta se considera la forma más potente de conseguir tolerancia T, ya que es sistémica y consigue que la mayoría de los clones T reactivos frente al alo-HLA del donante sean eliminados del repertorio. Pero, para conseguir un quimerismo hematopoyético permanente hay que eliminar o bloquear las células T maduras (timocitos) positivas simples, que son alorreactivas porque ya habían madurado previamente a la introducción del alo-HLA, y las células T de sangre periférica presentes en el momento del trasplante. Las células T intratímicas alorreactivas pueden ser tratadas mediante irradiación tímica o con depleción T repetitiva, y las de sangre periférica con AcMo (Fehr T, 2004).

6.b. Tolerancia Periférica

Incluye aquellos métodos basados en la depleción T (Irradiación linfóide total, AcMo), en el bloqueo de señalización T (Rapamicina, Anti-CD3 conjugado a inmunotoxinas o a deoxiespergualina) y en el bloqueo de la señal coestimuladora (anti-CD40, anti-B7). La mayoría de estos métodos no son aplicables aún en la práctica clínica, a excepción de los AcMo y fármacos comentados anteriormente.

REFERENCIAS

- Allison AC, Eugui EM. (2000) Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* . **47**:85-118.
- Almawi WY, Hess DA, Rieder MJ. (1998). Multiplicity of glucocorticoid action in inhibiting allograft rejection. *Cell Transplantation*, **7** : 511-523.
- Bestard O, Cruzado JM, Grinyó JM. Calcineurin-inhibitor-sparing immunosuppressive protocols. (2005). *Transplant Proc*, **37**:3729-3732.

- Borel JF, Zis ZL. (1991) The discovery and development of cyclosporin (Sandimmune). *Transplant Proc*, **23**: 1867-1874.
- Borrows R, Loucaidou M, Van Tromp J *et al.* (2005). Steroid sparing in renal transplantation with tacrolimus and mycophenolate mofetil: three-year results. *Transplant Proc*, **37**, 1792-94.
- Caballero A, Fernandez N, Lavado R, *et al.* A. (2006). Tolerogenic response:Allorecognition pathways. *Transplant Immunology*, **17**: 3-6.
- Charpentier B, Hiesse Ch, Durrbach M *et al.* (2001) Overview of clinical trials with new agents. *Transplant Proc*, **33**: 2201-03.
- Dellis S, Ciancio G, Burke III GW *et al.* (2004) Donor bone marrow transplantation. Chimerism and tolerance. *Transplant Immunology*, **13**: 105-115.
- Duquesnoy RJ. (1990) Clinical significance of humoral allosensitization of HLA antigens. Chapter 2, pp 27. In “*HLA system. New approach*”. J. Lee Ed. Springer Verlag.
- Fehr T, Sykes M. (2004) Tolerance induction in clinical transplantation. *Transplant Immunology*, **13**:117-130.
- First MR. (2001) Tailoring immunosuppressive therapy based on donor and recipient risk factors. *Transplant Proc* **33**:2207-11.
- Fluck N. (1999). Indirect allorecognition is involved in both acute and chronic allograft rejection. *Transplant Proc* **31**:842-843.
- Game DS, Lechler RI. (2002). Pathways of allorecognition:implications for transplantation tolerance. *Transplant Immunology*. **10**: 101-108.
- Housset D, Malissen B. (2003) ¿What do TCR-pMHC crystal structures teach us about MHC restriction alloreactivity? *Trends Immunol*, **24**: 429-437.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomik MJ. (2005) Chapter 5. Antigen presentation to T lymphocytes. En “*Immunobiology*” 6th edition. Ed Masson.
- Jordan SC, Vo AA, Tyan D, *et al.* (2005) Current approaches to treatment of antibody-mediated rejection. *Pediatr Transplantation*, **9**: 408-415.
- Liu J, Farmer JDJ, Lane WS *et al.* (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**:807.
- Luo C, Shaw KT, Raghavan A *et al.* (1996) Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import . *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:8907-8912.
- Masri MA. (2003) The mosaic of immunosuppressive drugs. *Mol Immunol* **39**:1073-1077.
- Monaco AP, Maki T, Hale D *et al.* (2001) The enigma of tolerance and chimerism:variable role of T cells and chimerism in induction of tolerance with bone marrow. *Transplant Proc* **33**, 3837-89.

- Paul LC. (2001b) Overview of side effects of immunosuppressive therapy. *Transplant Proc* **33**: 2089-91.
- Paul LC. (2001a) Graft vascular endothelium: its role in transplantation biology. *Transplant Proc* **33**:3809-10.
- Pettigrew GJ, Bolton EM, Bradley JA. (2001) Alloantigen recognition pathways and transplant tolerance. *Transplant Proc* **33**:3811-3813.
- Pietra BA, Wiseman A, Bolwerk A. (2000) CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *J Clin Invest.* **106** (8):1003-1010.
- Raught B, Gingras AC, Sonenberg N. (2001) The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:7037-44.
- Rohde J, Heitmans J, Cardenas ME. (2001) The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J Biol Chemistry* **276**: 9583-86.
- Saunders NS, Metcalfe MS, Nicholson ML. (2001) Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney International* **59**: 3-16.
- Schreiber SL, Crabtree GR. (1992) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* **13**:136.
- Smith JA, Bluestone J. (1997) T cell inactivation and cytokine deviation promoted by anti-CD3 mAbs. *Current Opinion Immunol* **9**:684-54.
- Spahn JD, Leung DYM, Szeffler SJ. (2001) Glucocorticoids. Chapter 106.- In “*Clinical Immunology*”. RR Rich. 2^a ed.. Ed Mosby.
- Stites DP, Terr AI, Parslow TG. (1998) Capítulo 17. Pruebas de histocompatibilidad. En “*Inmunología Básica y Clínica*”. 9^a edición. Ed Manual Moderno.
- Sykes M, Auchincloss H, Sachs DH. (2003a) Transplantation Immunology. Chapter 47, “Components of immune system involved in graft rejection” pp. 1496-1500. In “*Fundamental Immunology*”, Paul WE, 5^a edition.. Ed Lippincott-Raven.
- Sykes M, Auchincloss H, Sachs DH. (2003b) Transplantation Immunology. Chapter 47, “Mechanisms of graft rejection” pp. 1500-1518. In “*Fundamental Immunology*”, Paul WE, 5^a edition.. Ed Lippincott-Raven.
- Thorsby E, Pfeffer P, Leivestad T. (2004) Role of HLA molecules in the induction of alloimmune responses: clinical significance in the cyclosporine era. *Transplant Proc* **36**:16S-21S.
- Tiercy JM. (2002) Molecular basis of HLA polymorphism: implications in clinical transplantation. *Transplant Immunology* **9**: 173-180.
- Trushin SA, Pennington KN, Algeciras-Schimmich A, Paya CV. (1999) Protein kinase C and calcineurin synergize to activate I κ B kinase and NF κ B in T lymphocytes. *J Biol Chem* **274**:22923-22931.

- Van Hooff JP, Christians MHL. (1999) Use of tacrolimus in renal transplantation. *Transplant Proc* **31**: 3298-99.
- Vincenti F, de Andrés A, Becker T. *et al.* (2006) Interleukin-2 receptor antagonist induction in modern immunosuppression regimens for renal transplant recipients. *Transplant International* **19** :446-457.

El sistema inmunitario en el envejecimiento

MÓNICA DE LA FUENTE DEL REY

RESUMEN

El envejecimiento afecta a prácticamente todos los seres vivos y en el caso del ser humano ocupa la mayor parte de su existencia dada la elevada esperanza de vida media que se tiene actualmente en los países desarrollados. De todas las teorías emitidas para explicar la causa del envejecimiento, la más aceptada es la de la oxidación que tiene lugar por la necesaria utilización del oxígeno por nuestras células y la consecuente formación de radicales libres de oxígeno que dañan a las macromoléculas, lo que produce la falta de función celular. El sistema inmunitario sufre cambios con el envejecimiento que afectan al número y tipo de poblaciones leucocitarias y a la funcionalidad de las mismas. Unas funciones se deterioran, pero otras, las que suponen un mayor riesgo oxidativo e inflamatorio se activan. Los cambios en algunas de esas funciones han sido propuestos por nuestro grupo como marcadores de edad biológica y esperanza de vida, en base a lo encontrado en un modelo de envejecimiento prematuro y en individuos que alcanzan elevada longevidad. La causa de esos cambios funcionales se encuentra en el aumento de estrés oxidativo (mayores niveles de oxidantes y menores de defensas antioxidantes) que experimentan las células inmunitarias con la edad, lo que las hace tener una contribución importante en el proceso de envejecimiento. Esto se ha comprobado con la utilización de antioxidantes, que, en cantidades apropiadas, tanto *in vivo* como *in vitro* recuperan, en los individuos viejos, la funcionalidad leucocitaria típica de adultos, aumentando la longevidad. También la práctica de ejercicio físico

moderado realiza el mismo efecto, al igual que otros factores de estilo de vida. El sistema inmunitario, dada su necesidad de producir compuestos oxidantes e inflamatorios para llevar a cabo su función defensiva, puede ser en gran parte responsable, si no está bien regulado, del estrés oxidativo crónico que experimenta el organismo con el envejecimiento. De hecho, el «rejuvenecimiento» de la funcionalidad del sistema inmunitario parece conllevar una mejor salud y mayor esperanza de vida.

EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

Para poder comprender el papel del sistema inmunitario en el proceso de envejecimiento tendremos primero que conocer en qué consiste ese proceso. Actualmente, el envejecimiento, en el caso del ser humano, está resultando ser un problema en los países «desarrollados». Esto se debe a que en ellos los avances alcanzados en el ámbito sanitario y social están permitiendo aumentar nuestra esperanza de vida media, la cual es actualmente en España de unos 82,5 años en las mujeres y de unos 75,3 en los hombres, cifras que, lógicamente varían según el país considerado (1). Esta longevidad media representa la media de años que viven los individuos de una población, y depende, prioritariamente, de factores de estilo de vida. Dado que empezamos a envejecer una vez que hemos alcanzado nuestra edad reproductora, los 18-20 años, el periodo de nuestra vida en el que estamos envejeciendo es el más largo de nuestra existencia. Como indicó muy acertadamente Dröescher «*sólo se puede estar en dos momentos: creciendo o envejeciendo*». El proceso de envejecimiento culmina al cumplirse el tiempo que representa la esperanza de vida máxima o longevidad máxima, esto es, la edad máxima alcanzable por los individuos pertenecientes a una especie concreta, hecho que viene determinado genéticamente. Como miembros de la especie *Homo sapiens sapiens* podemos llegar a los más o menos 120 años que ya indicaba el Génesis podría vivir el hombre. Por ejemplo, el récord de longevidad registrado en el ser humano lo tiene Jeanne Louise Calmet que nació en Arlés (Francia) en 1875 y murió en 1997, esto es, vivió 122 años. Así, los avances sanitarios y un adecuado estilo de vida, pueden permitirnos una mayor longevidad media, pero no nos harán superar mucho esos 120 años, algo sólo posible en un todavía lejano futuro si se pudieran manipular los genes de una forma apropiada.

No es fácil definir el envejecimiento, de hecho, hay numerosas definiciones, pero en todas se recoge la misma idea: “cambios que se van sucediendo en nuestras células y tejidos con el paso del tiempo, los cuales suponen una pérdida pro-

gresiva de rendimiento y una incapacidad para mantener la homeostasis (ese equilibrio funcional que nos permite responder adecuadamente a las modificaciones de nuestro organismo frente a estímulos internos y externos)”. Todo ello, hace aumentar el riesgo de enfermedades y de muerte. Shock (2) lo definió como «*una pérdida progresiva de rendimiento, de homeostasis y de resistencia a los estreses medioambientales*». El envejecimiento es pues un proceso biológico que presentan todos los organismos multicelulares, incluso en un medio ambiente óptimo. Este proceso está caracterizado, según indicó el eminente gerontólogo Strehler (3), por ser universal (ya que tiene lugar en todos los individuos), por ser endógeno o intrínseco (pues las causas del proceso tienen un origen interno), por ser progresivo (dichas causas están presentes a lo largo de toda la vida), y por resultar deletéreo (tiene un acusado carácter perjudicial para el individuo). Es posible que de esas cuatro características las que más puedan ayudar a entender el proceso de envejecimiento sean las de que es «progresivo» y «endógeno». Este carácter endógeno explica el hecho de que las especies animales tengan una esperanza de vida máxima muy diferente, aunque vivan en ambientes y condiciones muy parecidas, pues, como antes se ha comentado, en la longevidad máxima los genes son determinantes. Sin embargo, en la longevidad media de un individuo de una especie, como sucede en el ser humano, los factores ambientales y de estilo de vida influyen decisivamente. De hecho, si los genes pueden participar en un 25% de esa longevidad media, el estilo de vida puede llegar a hacerlo en un 75%

En el envejecimiento hay cambios bioquímicos, morfológicos, fisiológicos y conductuales, pero es posiblemente la perspectiva fisiológica la que mejor defina las alteraciones que se manifiestan al envejecer. Con el paso del tiempo se van dando pérdidas y deterioros en prácticamente todos los órganos y sistemas, bien de tipo primario o secundarias a otras alteraciones, aunque el ritmo al que tienen lugar los cambios depende de cada tipo celular, siendo una característica del envejecimiento la menor capacidad, de cualquier sistema, para responder a los esfuerzos. De hecho, los tres sistemas reguladores que tenemos y que mantienen nuestra homeostasis, el sistema nervioso, el endocrino y el inmunitario, se deterioran con la edad por lo que se responde peor a las variaciones del medio interno y externo. Este aspecto se comentará en mayor detalle más adelante.

TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO

Para poder entender el proceso de envejecimiento hay que encontrar respuestas apropiadas a tres preguntas sobre el mismo: ¿cómo se envejece?; ¿dónde se inicia y desarrolla el proceso de envejecimiento?; ¿por qué tiene lugar este

proceso?. Preguntas no siempre bien planteadas ni contestadas. El análisis de los mecanismos que determinan la duración de la vida de los animales, incluido el ser humano, se inicia cuando el desarrollo de las ciencias experimentales permite abordar adecuadamente esta cuestión, hecho que sucede en el siglo XIX. A lo largo de todo este tiempo, el acercamiento de los científicos al problema que supone conocer las causas del envejecimiento ha sido en muchas ocasiones parcial y subjetivo. Así, cada investigador se ha centrado y aislado en su campo de conocimiento, obviando una visión integradora y que supusiera la cooperación con otras áreas científicas. Por ello, no es de extrañar que cuando en 1990 Medvedev (4) se puso a recopilar las teorías existentes hasta ese momento sobre el envejecimiento, le salieran cerca de 300. Es evidente que el envejecimiento es multifactorial, que tiene lugar a todos los niveles de organización biológica (desde los genes hasta las células, los tejidos, los sistemas y el organismo completo), pero esto no justifica que se hayan emitido un número tan elevado de teorías. No obstante, actualmente, muchas de ellas ya sólo tienen valor histórico. Un hecho importante y que ha ayudado a entender el envejecimiento humano es la comprobación de que los mecanismos celulares fundamentales del mismo son similares en todas las especies animales, por lo que lo observado en los animales de experimentación se puede extrapolar, con todas las reservas necesarias, a la especie humana.

Hacer una relación de todas las casi 300 teorías que hay sobre el envejecimiento resultaría pesado e inútil. No obstante, se pueden establecer clasificaciones, que también son algo diferentes según el autor que las realice, de todas esas teorías. Una bastante clara es la que agrupa las teorías más relevantes en dos grandes apartados. En uno de ellos, el que se ha denominado de «Teorías deterministas», se pueden incluir todas las que consideran a los genes como únicos responsables del envejecimiento. Este proceso estaría, para dichas teorías, genéticamente programado. En el otro gran grupo, el de las «Teorías estocásticas» o «epigenéticas», quedan incluidas todas las que teniendo en cuenta la participación de los genes otorgan también un papel relevante a los factores ambientales. En este grupo se habla de acumulación progresiva y estocástica de daños irreversibles para entender el envejecimiento.

Teorías deterministas del envejecimiento

Entre las teorías que se pueden incluir en este grupo es muy conocida, por ejemplo, la del límite mitótico de Hayflick (5,6). Según esta teoría las células tendrían un reloj endógeno que marcaría el número de divisiones que son ca-

paces de tener *in vitro*. Así, los fibroblastos de embriones humanos pierden su capacidad mitótica tras 50 divisiones, número que depende de la edad del sujeto de procedencia de esas células, siendo menores a medida que el mismo tiene mayor edad. Por otra parte, la capacidad replicativa de estos fibroblastos *in vitro* se relaciona directamente con la longevidad de la especie de procedencia, siendo mayor en los fibroblastos de tortuga que en los de humanos y en estos mayores que en los de pollo o ratón. La hipótesis inicial mantenía que la pérdida de capacidad mitótica equivalía a *envejecimiento celular*, y este error dificultó el llegar a definir mecanismos de envejecimiento celular que tuviesen una aplicación *in vivo*. Es difícil explicar en base a ese límite mitótico el envejecimiento de nuestras neuronas o el de nuestras espermatogonias, dada la escasa o nula división que experimentan las primeras y la que siguen teniendo las segundas en individuos muy viejos. Como concluye el prestigioso gerontólogo Bernard L. Strehler (7): «*No existe ninguna razón para creer que el envejecimiento clonal o pérdida de capacidad mitótica es causa importante del envejecimiento del organismo ni de sus importantes poblaciones de células germinales, tales como las que proporcionan su capacidad regeneradora a la piel, el intestino y la médula ósea*». Se podría aceptar que las células en cultivo experimenten una diferenciación terminal *in vitro* semejante a la que se observa en muchos tipos de células *in vivo*, como las hematopoyéticas o los mioblastos. Esa diferenciación irreversible supondría el fin de la capacidad de división, por lo que esos experimentos *in vitro* de senescencia de las células estarían realmente investigando mecanismos de diferenciación celular, como ya indicó Miquel (8).

Los mismos inconvenientes apuntados para la teoría del límite mitótico de Hayflick tiene la tan renombrada teoría de los telómeros y la telomerasa. Según Olovnikov (9), el acortamiento en cada división celular de los extremos de los cromosomas —los telómeros— estaría relacionado con la tasa de envejecimiento, de manera que el fin de la división celular se produciría cuando se llegara al total acortamiento de los mismos. Basándose en ese hecho, la administración de la telomerasa, la enzima encargada de reponer los telómeros, permitiría preservar la capacidad mitótica celular. De hecho, el mantenimiento de una actividad telomerasa alta durante el periodo embrionario-fetal garantizaría el crecimiento celular durante el desarrollo. La pérdida de actividad telomerasa desencadenaría un acortamiento telomérico, el cual lleva a la senescencia replicativa, es decir, a la parada celular. Así, manteniendo telómeros de tamaño constante se preserva la capacidad mitótica *in vitro*, de acuerdo con el hecho de que, si se introduce telomerasa en fibroblastos humanos mantenidos en cultivo, aumenta la longevidad de dichos cultivos (10). En una revisión Goyns (11) resume de la siguiente manera el papel de la telomerasa y los telómeros en los diversos tipos celulares que forman los te-

jididos de los metazoos: A) En las células postmitóticas (de escasa o nula proliferación), los telómeros no se acortan significativamente durante la vida del animal. B) Las células germinales (que proliferan muy frecuentemente) muestran una gran actividad de la telomerasa, lo que asegura la preservación de su capacidad mitótica. C) Los fibroblastos, las células epiteliales y otras células intermitóticas (que experimentan un número relativamente escaso de divisiones a lo largo de la vida en el organismo adulto) carecen de telomerasa, probablemente porque no la necesitan, ya que no llegan a agotar su capacidad mitótica *in vivo*. A pesar de lo indicado, se ha podido comprobar que el acortamiento del telómero puede estar asociado también a una pérdida de la función telomérica, independiente de la pérdida de la actividad telomerasa. De hecho, se ha observado que el acortamiento telomérico podría deberse a lesiones en una sola cadena de ADN, las cuales pueden ser producidas por radicales libres de oxígeno, independientemente del acortamiento por replicación celular (12). En resumen, se puede decir que resulta evidente el interés de los telómeros y la telomerasa en relación con los mecanismos, normales y patológicos, de la mitosis y diferenciación celular, pero, como indicara Carlson y Riley (13), *«no hay pruebas de que las relaciones entre los telómeros y la mortalidad in vitro de las células en cultivo sean relevantes para comprender el envejecimiento del organismo, pues los mamíferos no mueren como resultado del agotamiento de su potencial mitótico»*.

Todas estas teorías, que son muy útiles para entender la senescencia celular replicativa, no han permitido dar respuesta a la pregunta de cómo envejecemos, y en ocasiones han impedido llegar a dicha respuesta. Es evidente que la duración máxima de la vida, que varía considerablemente entre las diferentes especies, tiene una base genética, y que incluso dentro de una misma especie puede haber grandes diferencias, genéticamente controladas, en esa longevidad (14), pero se ha comprobado que sólo un 1,8 % de los genes investigados muestran cambios en su expresión durante el envejecimiento (15). Además, como se ha puesto de manifiesto recientemente, los genes no controlan el proceso de envejecimiento de forma directa, lo hacen indirectamente a través de múltiples mecanismos protectores o destructores de la organización biológica inicial del organismo adulto (16). Aunque seleccionando mutantes, fundamentalmente en el nemátodo *C. elegans*, se han conseguido algunos con una longevidad mayor que la normal, estos muestran otros cambios fenotípicos marcadamente nocivos, o sea que el aumento de la duración de la vida se compensa con una disminución del rendimiento funcional y la menor capacidad de supervivencia de los animales en su hábitat natural (17). Por ahora, los datos de que se dispone demuestran que sólo con los «gerontogenes», no resulta fácil explicar el envejecimiento del ser humano (15).

Teorías estocásticas del envejecimiento

En el otro gran grupo de teorías sobre el envejecimiento, **las estocásticas**, los factores del medio ambiente tienen un papel fundamental en la desorganización que ocurre al envejecer. De las teorías incluidas en este apartado se pueden destacar, entre otras, las basadas en el **envejecimiento de los sistemas fisiológicos**, dado la demostrada disminución del rendimiento funcional que tiene lugar al envejecer. Pero teniendo presente que, como ya se ha indicado, una característica del envejecimiento es la menor capacidad para mantener la homeostasis corporal, han sido los sistemas fisiológicos que intervienen en su mantenimiento, el sistema nervioso, el endocrino o el inmunitario, en los que se ha focalizado más el interés. Es evidente que, por importantes que sean estos sistemas, su alteración no puede explicar el proceso de envejecimiento y, como ya indicó Hayflick (6), estas teorías carecen de universalidad, pues no todos los organismos que envejecen tienen complejos sistemas neuroendocrinos o inmunitarios. Además, los déficits en estos sistemas al envejecer pueden ser simplemente el resultado de las alteraciones básicas que se producen en todas las células viejas. Es un hecho que todos los sistemas envejecen, aunque lo hagan a diferente velocidad, y por tanto tenemos que distinguir claramente entre causa y efecto del envejecimiento.

Las **teorías metabólicas**, que se centran en las alteraciones que el metabolismo experimenta con el paso del tiempo, constituyen también otro grupo relevante de teorías de envejecimiento. Por ejemplo, la teoría de la «Acumulación de productos de desecho» se basa en el hecho de que todas las células postmitóticas van acumulando con el tiempo productos del metabolismo que no pueden ser renovados. De entre esos productos el más característico corresponde a los gránulos de lipofuscina, perfectamente visibles al microscopio óptico en el interior de las células de animales viejos. Tales gránulos están compuestos de lípidos y proteínas en alto grado de degradación, son insolubles y probablemente oxidados. Han sido denominados «pigmentos de envejecimiento» y parecen provenir de lisosomas o de mitocondrias destruidas, no resultando dañinos para la célula, en contra de lo que se creía en un principio. Esto indica que más que una causa de envejecimiento, los gránulos de lipofuscina podría ser un buen marcador del mismo. Otra teoría relevante dentro de las metabólicas es la del «*rate-of-living*» de Pearl (18). Según ésta la longevidad máxima de las distintas especies animales es inversamente proporcional a la disipación de energía o metabolismo basal característicos de cada especie. Esta teoría se relaciona con un factor ambiental importante, como es la temperatura, y también con la nutrición, además de con el oxígeno (que se comentará con mayor detalle más adelante).

En este contexto puede incluirse también la teoría de la «restricción calórica», según la cual esa reducción permite un aumento de la esperanza de vida, tanto de la media como de la máxima. Este hecho demostrado desde los trabajos de McCay y colaboradores (19), ha seguido siendo comprobado por toda una serie de investigadores (20). Actualmente se tiene ya un abundante cúmulo de datos, aportados por todos ellos, favorables a esta teoría. No obstante, a la luz de una revisión crítica se comprende cómo el efecto que ejerce sobre la esperanza de vida media es entendible al incidir en un menor metabolismo y ser su efecto una consecuencia lógica de la teoría oxidativa que luego se comentará. Respecto a la incidencia en la esperanza de vida máxima, los experimentos pueden ser cuestionados por cuanto se utilizan especies experimentales en cautividad que normalmente ingieren un exceso de alimento energético. Por ello, posiblemente lo que permita la restricción es crear una situación más parecida a la que tienen esos animales en su estado natural.

En este grupo de teorías epigenéticas o estocásticas habría que incluir la que se ha demostrado más útil para explicar a todos los niveles de organización el proceso de envejecimiento: «**la teoría de los radicales libres o de la oxidación**». En la actualidad ya es popularmente conocido que envejecemos porque nos oxidamos, pero como otras teorías, la de los radicales libres ha tenido sus seguidores y sus detractores. Rebeca Gerschman (21) y, de forma más claramente aceptada, Denham Harman (22), trabajando independientemente, publicaron en las décadas de los cincuenta y los sesenta una serie de trabajos en los que se indicaba la implicación de los radicales libres de oxígeno en el envejecimiento celular. Los radicales libres, especies químicas derivadas del oxígeno que pueden existir independientemente y que contienen uno o más electrones desapareados, son producidos continuamente en el metabolismo celular como consecuencia de la inevitable utilización del oxígeno. Dada la gran reactividad de estas especies químicas, al intentar aparear el electrón que tienen desapareado tomándolo de otra molécula cercana, reaccionan con todo tipo de biomoléculas: lípidos, proteínas, glúcidos y ácidos nucleicos (Figura 1). Este hecho supone la alteración de dichas moléculas y, consecuentemente, la pérdida de su funcionalidad y, con ella, de la función celular. De este modo, la teoría de los radicales libres nos da la base para saber **cómo** se produce el proceso de envejecimiento. El conocer **dónde** se inicia ese proceso requiere un perfilamiento de la teoría anterior, hecho que se llevó a cabo en primer lugar por Harman (23) y posteriormente por Miquel (24) y Barja (25), dando paso a lo que se conoce como la «teoría mitocondrial del envejecimiento». Si Harman apuntó la implicación de la mitocondria (organela en la que tiene lugar la mayor producción de radicales libres de oxígeno, al ser la localización de la respiración celular)

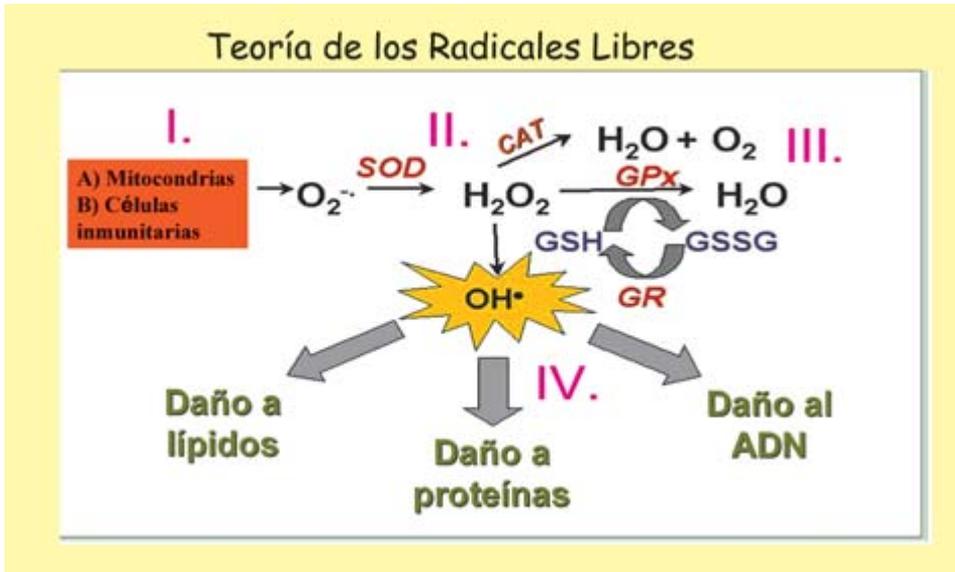


FIGURA 1. La respiración celular en las mitocondrias o el funcionamiento inmunitario producen radicales libres de oxígeno. El primero de los cuales es el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual se transforma en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que puede pasar a agua o a un radical muy dañino, el hidroxilo (OH^{\cdot}), SOD: Superóxido dismutasa. CAT: catalasa; GSH: glutatión reducido. GSSG: glutatión oxidado, GPx: glutatión peroxidasa, GR: glutatión reductasa

como primera diana de los radicales libres, Miquel focaliza el proceso en el genoma mitocondrial y en las células diferenciadas (con escasa o nula capacidad para dividirse y, consecuentemente, para regenerar las mitocondrias dañadas). El envejecimiento quedaba ligado, de forma prioritaria, al daño oxidativo que los radicales producen en el genoma mitocondrial, lo que supone una desorganización progresiva de estas organelas, hecho que es más apreciable cuando las mismas no pueden regenerarse por división celular al carecer la célula de mitosis por ser una célula diferenciada. Esto supone una pérdida de la capacidad de síntesis de ATP que se genera en las mitocondrias y que proporciona la capacidad bioenergética celular. De este modo, como indicará Miquel (24), con el paso del tiempo, esas células irían perdiendo rendimiento y resistencia al estrés, lo que sustenta la base del deterioro funcional que se produce al envejecer. Más recientemente, Barja (25) ha completado este panorama al comprobar que la tasa de generación de radicales de oxígeno en las mitocondrias (la fuga de radicales libres que no es otra cosa que el porcentaje de electrones que se «escapan» de la cadena de transporte reduciendo incompletamente el oxígeno) es más baja en los animales con elevadas esperanzas máximas de vida, siendo esta la causa pri-

mera de esas diferentes longevidades en las diversas especies. Ese hecho se complementa en los animales más longevos con un consecuente menor daño oxidativo en sus biomoléculas, fundamentalmente en el ADN mitocondrial (26). También, como otra derivación de la teoría de los radicales libres, una serie de investigaciones han indicado que el grado de instauración de los ácidos grasos de las membranas (celulares y mitocondriales) correlaciona negativamente con la longevidad máxima tanto en las aves como en los mamíferos (27), lo que dada la gran sensibilidad de los dobles enlaces al estrés oxidativo, explicaría la correlación negativa que también se ha encontrado entre la peroxidación lipídica y la longevidad máxima. Así, como han indicado Vijg y Müller (28): «*La teoría gerontológica de los radicales libres propuesta por Harman en 1956 aún ofrece la explicación más atractiva de un mecanismo general responsable del envejecimiento*».

De este modo esa fuga de radicales que media la oxidación parece estar en la base tanto de la distinta esperanza de vida máxima de los animales de diferentes especies como en la longevidad media o esperanza de vida media de los individuos de una especie. Ya en este contexto, que es el que más nos interesa a nivel personal, el poder conocer lo que determina que podamos acercarnos en buenas condiciones de salud a la edad de vida máxima que corresponde a la especie a la que se pertenece, es necesario resaltar que los radicales libres, en determinadas concentraciones, son necesarios para muchos procesos fisiológicos al ser importantes señalizadores intracelulares (29). Por tanto, el funcionamiento de nuestro organismo se basa en un perfecto equilibrio entre los niveles de tales radicales que producimos (o mejor, utilizando el término más amplio de «especies reactivas de oxígeno», ROS, siguiendo las siglas inglesas, esto es, todas las moléculas derivadas del oxígeno que contienen grupos reactivos aunque no se acojan a la definición indicada para un radical libre) y los de defensas antioxidantes de que dispongamos para neutralizarlos (Figura 1). Es la pérdida de este equilibrio, por un exceso en la producción de los primeros o por una menor disponibilidad o control de los segundos, lo que lleva a lo que se denomina: estrés oxidativo, y que es lo que subyace a la enfermedad y a la velocidad de envejecimiento (Figura 2). En el organismo, al envejecer, tiene lugar unos mayores niveles de ROS y menor presencia y acción de las defensas antioxidantes, siendo esta situación de estrés oxidativo lo que lleva al daño en las biomoléculas y a la consecuente falta de función celular.

Sin embargo, esta teoría, tal cual fue enunciada, aunque nos aproxima a entender **cómo** se envejece (por oxidación) y **dónde** se inicia el proceso (en el ADN mitocondrial de las células diferenciadas), no indica el porqué tiene lugar el pro-

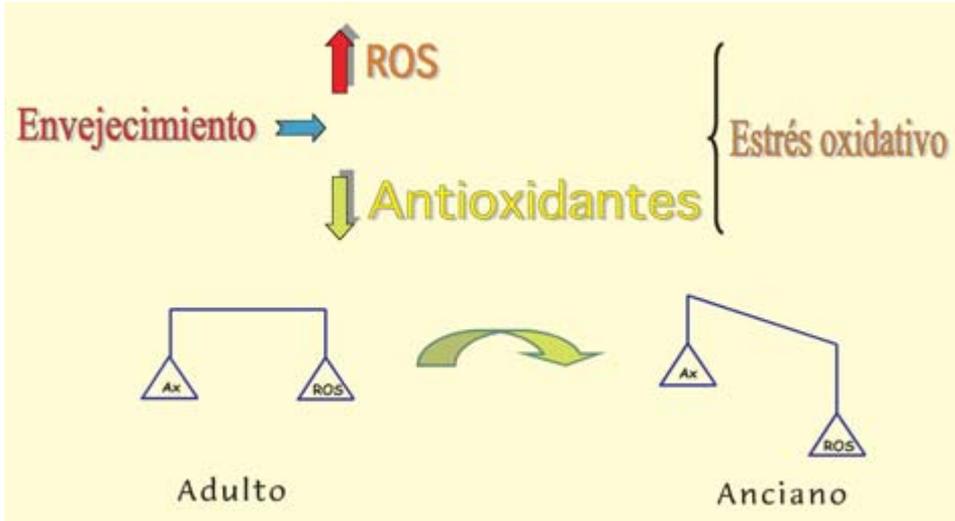


FIGURA 2. Con el envejecimiento aparece un desequilibrio entre los niveles de oxidantes y antioxidantes, con aumento de los primeros y/o disminución de los segundos, dándose lo que se denomina un «estrés oxidativo».

ceso de envejecimiento. Así, no es capaz de dar respuesta a la pregunta: ¿por qué las células de los metazoos, a diferencia de ciertos organismos unicelulares que no muestran envejecimiento en un medio óptimo, son incapaces de contrarrestar la involución senil causada por los radicales libres?. Tampoco esa teoría puede aclarar el por qué surgieron en el curso de la evolución biológica células destinadas a envejecer. Dada la complejidad del envejecimiento, ninguna teoría aislada puede ofrecer una explicación satisfactoria de todos sus aspectos. Tenemos que recurrir a integrar la teoría oxidativa con otras emitidas anteriormente y otras posteriores para terminar de responder a las preguntas enunciadas y entender adecuadamente el **porqué** del proceso de envejecimiento. Para ello, es conveniente tener en cuenta una serie de teorías evolutivas sobre el mismo.

Teorías evolutivas del envejecimiento

Entre las teorías que se acogen a la denominación de evolutivas y que son las que teorizan sobre por qué cada especie animal tiene una determinada esperanza de vida máxima o velocidad de envejecimiento, en lugar de abordar el cómo tiene lugar el mismo, se pueden comentar algunas de las más curiosas. Es posible nombrar aquí la que relacionaba el peso del cuerpo del animal con su longevidad. Aunque en muchas ocasiones a más peso se asociaba mayor longevidad, este hecho no se cumplía en to-

dos los casos. Así, un elefante puede alcanzar los 70-80 años y un hipopótamo, con un peso parecido, no llega a los 20. Por ello, se perfiló la teoría, concretándose en vertebrados a la relación entre el peso del cerebro y el peso promedio del animal. Friedenthal estableció en 1910 que una especie vive tanto más cuanto mayor sea su exceso de peso cerebral respecto del corporal. Esto ha resultado ser correcto en las setenta y tres especies de mamíferos que fueron estudiadas como base de la proposición de la idea. No deja de ser interesante que la tendencia de los mamíferos durante la evolución hacia cerebros cada vez más grandes, haya ido acompañada de la tendencia de dichos animales a ser cada vez más longevos. Esto tiene mayor fuerza en el caso de los primates, como señaló Dani (30). Sin embargo, el hombre, en el que realmente su longevidad ha aumentado al desarrollar más su cerebro en su historia evolutiva, al menos en la última parte de la misma, tiene una longevidad máxima superior a la que se deduce de la simple aplicación de esa fórmula. Una de las teorías evolutivas con más interés puede ser la que nos habla de la distribución de energía entre esfuerzo reproductor y mantenimiento de los órganos corporales, ya que se ha comprobado existe una relación inversa entre potencial reproductor y longevidad. Esto, que será comentado más adelante, nos pone de manifiesto el hecho de que los animales que más se reproducen viven menos y los que tienen menor capacidad reproductiva manifiestan mayor longevidad máxima. Otra teoría, la de la «Presión de predación» desarrollada por Austad (31), hace referencia a la relación inversa que se ha detectado existe entre la posibilidad de que una especie pueda ser atacada por depredadores y su longevidad. Si una especie sufre pocos ataques mortales por parte de depredadores, la selección natural actuaría haciendo que pudiese tener mayor longevidad. Pero estas teorías se han cuestionado desde la perspectiva de las denominadas «pleiotrópicas», las cuales hacen ver que la longevidad no puede ser seleccionada pues cómo pueden transmitirse los genes para aumentar la longevidad entre las generaciones, si los individuos viejos se reproducen en menor grado que los jóvenes. Ya indicó Willians en 1957 (32) «*Los más longevos no pasan más genes que los menos longevos*». El envejecimiento, como luego se comentará en mayor extensión, es consecuencia de caracteres seleccionados en la evolución por ser ventajosos para los jóvenes, lo que les permite llegar al momento de la reproducción y perpetuar la especie, aunque fuesen luego esos mismos caracteres desventajosos para los viejos. Parece evidente que la selección actúa antes de la edad adulta.

TEORIA INTEGRADORA DEL ENVEJECIMIENTO

El proceso de envejecimiento es complejo. Por ello, es evidente que ninguna teoría aislada, basada en un mecanismo único, ofrece una explicación satisfactoria sobre las causas moleculares y celulares de ese proceso. Por este moti-

vo hay que plantear una integración de diversas teorías siguiendo las recomendaciones de Medvedev (4): «*Una teoría moderna del envejecimiento debe explicar no sólo por qué los organismos envejecen y mueren con el paso del tiempo, sino también las diferencias causadas por la evolución y la razón de que los procesos de envejecimiento muestren un ritmo tan distinto en diferentes especies, tejidos, órganos y células*». Además, es necesario que la teoría que se plantee explique las bases bioquímicas de las diferencias entre los organismos jóvenes y viejos, la distinta longevidad de las especies y el mecanismo de cómo determinados agentes acortan o aumentan la vida media. Vijg y Müller (28) han comentado: «*algunas hipótesis antiguas emitidas en los comienzos de la gerontología biológica hicieron posible la gran revolución científica en nuestra comprensión del envejecimiento que ahora presenciamos*».

Ya en 1891 Weissman reflexionó sobre las diferencias entre células que muestran una longevidad ilimitada, como es el caso de las germinales, y otras que envejecen, como las somáticas. Este gerontólogo apuntó que la causa del envejecimiento fue la división del trabajo que acometieron las células de los organismos pluricelulares. Las células somáticas, que superaron en número a las reproductoras, se distribuyeron los diferentes trabajos del organismo creándose así sistemas de tejidos claramente diferenciados. De este modo se perdió el poder regenerativo de partes considerables del organismo, centrándose en las células sexuales la capacidad de reproducir el organismo entero. Igualmente Minot (33) propuso que el envejecimiento es el «*precio pagado por la diferenciación celular*», y Pearl añadió que envejecer es efecto secundario del metabolismo (18). Así, si se retoman conceptos clásicos como los de Weissman, Minot y Pearl (recogidos en la Tabla I), y se añan con los de Willians y con las hipótesis comentadas del estrés oxidativo y la vulnerabilidad del genoma mitocondrial, se podría llegar a la conclusión de que el envejecimiento derivaría de la diferenciación celular, ligada a la aparición de mitocondrias con muy altos niveles de consumo de oxígeno, y la alteración progresiva de estas organelas a través del daño en su ADN que antes se ha comentado. Al planteamiento hecho por Williams (32) «*después del hecho milagroso de la morfogénesis, un metazoo complejo es incapaz de realizar la tarea aparentemente más fácil de preservar lo que ya está formado*», se puede indicar como posible causa de esa paradoja el que el objetivo prioritario de la evolución no es la longevidad individual, sino la supervivencia de la especie, que en los animales se asegura a través de la reproducción sexual. Esta idea ha sido tratada con gran amplitud por Klarsfeld y Revah en su libro «*The Biology of Death*»(34), en el que indican como la muerte del individuo es necesaria para rejuvenecer la especie, y como esa muerte y la reproducción sexual están necesariamente unidas. Esta

supervivencia de la especie se consigue, en la evolución, a través de dos estrategias. Una sería la producción de individuos de desarrollo rápido y alta fertilidad, como sucede con los insectos, que al mantener un nivel alto de actividad metabólica y funcional tendrían una vida corta. Otra estrategia seguiría la vía opuesta, un desarrollo lento y menor potencial reproductor, y es la que culmina en mamíferos y más claramente en el hombre y otros primates. Además, estos últimos animales al tener un metabolismo menos intenso y consecuentemente producir menos oxidación, el ejemplo más típico estaría en el hombre con su baja tasa de producción de radicales libres mitocondriales, tendrían un envejecimiento más enlentecido y una mayor longevidad máxima. De hecho, otra teoría del envejecimiento, la del «*disposable soma*» o del «*soma desechable*», emitida de forma más clara por Kirkwood y Holliday (35), indica que la longevidad de las distintas especies animales depende de un equilibrio entre su capacidad reproductora y la eficacia de sus mecanismos de mantenimiento y reparación de las células diferenciadas del soma, destinadas a «desecharse», una vez que se ha asegurado la supervivencia de la especie a través de la reproducción. Se hace evidente que lo que nos permite tener más capacidad funcional en la edad reproductiva, como es la utilización del oxígeno para la obtención de energía en nuestras células, es lo que más directamente causa el deterioro y la muerte tras ese período de la vida del individuo. Así, según Williams (32), el envejecimiento sería consecuencia de los efectos secundarios del producto de genes que serían beneficiosos para conseguir el máximo rendimiento funcional en la edad de la reproducción, pero que resultarían nocivos después. Por tanto, un organismo podría tener unos genes que permitieran aumentar su capacidad de supervivencia mientras fuera apto para la reproducción, esto es, cuando fuera joven, y que permitieran la exterminación del mismo cuando dejara de serlo. Son las necesidades de mantenimiento de la especie y no las del individuo las que imperan biológicamente. Esa idea, que recoge Medina en su libro «El reloj de la edad» (36), también fue desarrollada por Medawar, quien destacó la poca importancia que tiene el que un desastre «golpee» a un individuo que ya ha dejado atrás su edad adecuada para reproducirse. De hecho ya apuntó cómo en la naturaleza no tiene interés alargar la longevidad, diciendo textualmente: «*La muerte por envejecimiento ocurre tan tarde, comparado con lo que sucede por accidente, predación, falta de alimento, etc, en el medio natural, que el retrasar el envejecimiento tendría un impacto mínimo para la supervivencia de la especie*». Siguiendo el razonamiento apuntado y simplificando mucho, se podría indicar que el **por qué** tiene lugar el envejecimiento, sería la consecuencia de mantener una adecuada actividad vital que permita la reproducción y el mantenimiento de la especie.

TABLA I. *Teorías «clásicas» y modernas que intentan explicar el proceso de envejecimiento a diversos niveles de organización biológica y que son la base de la teoría integradora del envejecimiento*

<i>Autor</i>	<i>Año de publicación</i>	<i>Concepto clave/causa del envejecimiento</i>
WEISSMAN	1891	División del trabajo fisiológico entre células germinales (inmortales) y somáticas (que envejecen).
MINOT	1907	Envejecer es el precio por la diferenciación.
PEARL	1928	Envejecer es efecto secundario del metabolismo.
HARMAN	1956	Lesiones causadas por los radicales libres de oxígeno.
WILLIAMS	1957	Efectos secundarios de genes beneficiosos para el máximo rendimiento funcional en la edad de reproducción y nocivos después.
GERSCHMAN	1962	Efecto de la toxicidad del oxígeno, por insuficiencia de las defensas antioxidantes.
HAYFLICK	1965	Agotamiento de la capacidad mitótica.
MIQUEL	1980	Pérdida progresiva de mitocondrias por el estrés oxidativo en las células diferenciadas postmitóticas.

Por lo indicado, no parece probable que el envejecimiento esté directamente controlado por los genes. Si bien las células forman los tejidos somáticos y funcionan como consecuencia de un programa genéticamente controlado que lleva a los diferentes estadios de diferenciación celular, la posterior desorganización que constituye el envejecimiento parece ser más un efecto secundario, no programado, del alto grado de estrés oxidativo en las células diferenciadas.

LA EDAD BIOLÓGICA

Un hecho que es evidente en ese progresivo proceso que es el envejecimiento, es su enorme heterogeneidad. El envejecimiento se asocia con una gran variedad de alteraciones a todos los niveles de organización biológica, que van afectando de forma diferente a los diversos sistemas de cada individuo y a los distintos individuos de una especie. Por tanto, no sólo hay una distinta tasa o velocidad de envejecimiento en los órganos y sistemas de nuestro organismo, también se aprecia una di-

ferente celeridad en los cambios fisiológicos que acompañan al paso del tiempo en cada uno de los miembros de una población con la misma edad cronológica. Así, se hace evidente que el «tiempo biológico» que se manifiesta en los organismos no siempre coincide con el «tiempo cronológico» que miden los relojes, no tiene lugar al mismo ritmo. Este hecho se empezó a estudiar en los años cincuenta del pasado siglo, y fue en principio introducido por las compañías de seguros de EEUU. MacFarland en 1953 (37) estableció el término de «Edad funcional», utilizando este concepto en los pilotos de las líneas aéreas para decidir la edad de jubilación. La OMS aceptó esa idea en 1963 como criterio de jubilación, al encontrar que la edad funcional era más equitativa para ello que la edad cronológica. El concepto de «edad biológica» fue desarrollado por Confort en 1969 (38), siendo más amplio que el de «edad funcional» al incluir no sólo parámetros funcionales, también no funcionales. A lo largo de los años setenta, una serie de estudios, algunos llevados a cabo con un gran número de individuos y de forma longitudinal, van a ir acreditando el valor predictivo de la «edad biológica» como indicador de longevidad (39). Este tema se sigue en los años ochenta y noventa con otra serie de estudios como el de Hawái dirigido por Befonte y colaboradores o el llevado a cabo por Miquel y colaboradores en España. Estos últimos establecieron un útil «Biograma» o «Gerograma» para detectar esa edad biológica en nuestro país (40). Para determinar esa «edad biológica» es necesario la utilización de «biomarcadores», los cuales son una serie de parámetros bioquímicos, fisiológicos y psicológicos que cambian con la edad y que pueden ser sometidos a análisis estadísticos para poner de manifiesto las relaciones entre edad biológica, edad cronológica, pérdida de salud y expectativas de longevidad. La investigación más exhaustiva al respecto ha sido la de Borkan y Norris (39), realizada en más de mil varones participantes en el estudio de envejecimiento humano del *Centro Gerontológico* de Baltimore. Este estudio demostró que no se puede hablar de una edad biológica integrada para un individuo, ya que cada sistema fisiológico puede tener su determinada «edad biológica», diferente de la de los otros sistemas. No obstante, la presencia de ciertos parámetros «más envejecidos», entre los que se incluían los de capacidad respiratoria, tensión arterial y tiempo de reacción en pruebas psicológicas, que los de la mayoría de las personas de su misma edad cronológica suponen una tendencia a morir prematuramente. Donde el análisis de «edad biológica» se manifiesta de gran utilidad es para poder conocer la eficacia de estrategias basadas en el estilo de vida, las cuales van a permitir al ser humano aumentar su longevidad media y acercarla a la máxima en excelentes condiciones de salud. La utilización de esos parámetros que indiquen la auténtica «edad biológica» de cada individuo nos permite saber si los tratamientos o cambios en los estilos de vida han sido eficaces a la hora de conseguir mantener un estado funcional más «juvenil».

LA COMUNICACIÓN NEUROINMUNOENDOCRINA

Como ya se ha comentado anteriormente, los sistemas reguladores que controlan la homeostasis del organismo, el nervioso, el endocrino y el inmunitario, no trabajan aisladamente, sino que lo hace en connexion. La comunicación bidireccional entre estos sistemas reguladores se confirmó científicamente en los años setenta con los trabajos de Besedovsky y sus colaboradores, al observar como los niveles de glucocorticoides se elevaban durante la respuesta inmunitaria produciendo un efecto supresor sobre la misma (41). Posteriormente, éstos y otros investigadores confirmaron esa conexión (42-44). De este modo se estableció que el sistema inmunitario es el receptor de los estímulos que podemos llamar «no cognoscitivos», esto es, de las infecciones, células malignizadas o extrañas, que aparecen en el organismo. Este sistema responde a los mismos y comunica dicha información, a través de las citoquinas que produce, al sistema neuroendocrino con el que así se conecta. Por su parte, el sistema neuroendocrino es receptor de estímulos «cognitivos», como luz, sonido, situación de estrés, etc., a los que responde, y sus mediadores (neurotransmisores y hormonas) llegan al sistema inmunitario informándole de la situación. De este modo, poseemos un gran sistema neuroinmunoendocrino que permite el mantenimiento de la homeostasis corporal, y por tanto de la salud de los individuos. En este sistema de integración las células inmunitarias, por su capacidad de moverse y llegar a cualquier parte del organismo, constituyen nuestra «mente corporal». La demostración científica de esa comunicación, ha permitido comprender, en base a los datos experimentales, toda una serie de hechos observados en la vida cotidiana. Es evidente que las situaciones de depresión, estrés emocional o ansiedad, provocadas por ejemplo por la pérdida de trabajo o de un ser querido, entre otras, se acompañan de una mayor propensión a padecer desde procesos infecciosos hasta cánceres o enfermedades autoinmunes. Esto supone que el sistema inmunitario se encuentra deteriorado y, consecuentemente, como posteriormente se comentará en mayor detalle, hay una peor salud y menor longevidad. Por el contrario, situaciones agradables o una «visión optimista» de la vida nos ayuda a superar enfermedades que tienen una base inmunitaria y, en general, a tener mejor salud. Por otra parte, se ha confirmado que alteraciones en el sistema inmunitario, como puede suceder en un proceso infeccioso grave, modifican la funcionalidad del sistema nervioso pudiendo llegarse, en algunas situaciones extremas, a estados psicóticos. Hoy se sabe que las células de los tres sistemas comparten receptores para los mediadores típicos de los otros y pueden sintetizar dichos mediadores. Se ha comprobado que los leucocitos producen neurotransmisores y hormonas y que las células nerviosas pueden producir

citoquinas típicas de los leucocitos. Así, cualquier incidencia que podamos ejercer en el sistema inmunitario repercutirá en los sistemas nervioso y endocrino, y a la inversa. Es precisamente en el control de las respuestas a las múltiples situaciones de estrés emocional con las que nos enfrentamos en nuestra vida cotidiana donde parece tener mayor futuro las investigaciones y las terapias que se están llevando a cabo en este contexto. Una inadecuada respuesta al estrés va a repercutir en una mala salud inmunitaria y, en general, en la de los otros sistemas fisiológicos.

EL ENVEJECIMIENTO DEL SISTEMA INMUNITARIO: LA INMUNOSENESCENCIA

El sistema inmunitario, encargado de reconocer «lo propio» a cada individuo y en consecuencia eliminar lo que le es extraño, como los microorganismos que le invaden y las células que se transforman continuamente en tumorales, ha sido establecido como un claro marcador del estado de salud (45). Es un hecho demostrado que este sistema se deteriora con la edad, tengamos presente que el mayor porcentaje de muertes en la vejez se debe a procesos infecciosos. Pero esto no significa que todas las capacidades funcionales de las células inmunitarias disminuyan, las hay que se encuentran incluso estimuladas, por lo que se ha sugerido, como recoge Pawelec y colaboradores (46), que lo que se produce al envejecer es una «reestructuración» del sistema inmunitario.

CAMBIOS EN LAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS CON LA EDAD

Uno de los aspectos mejor estudiados de los cambios que experimenta el sistema inmunitario con la edad hace referencia a las variaciones que acontecen en la composición de las poblaciones leucocitarias así como en la expresión de sus marcadores de superficie.

Los linfocitos T (CD3+) disminuyen en número con la edad, debido al proceso de involución tímica (46,47). No obstante, no todas las subpoblaciones de células T experimentan los mismos tipos de cambios al envejecer. La relación CD4+/CD8+ disminuye con la edad, y en ambas subpoblaciones las células vírgenes (CD45RA+) son las que principalmente van disminuyendo, mientras que aumentan las memoria (CD45RO+) (48). También en estas subpoblaciones se ha visto una pérdida de expresión del marcador CD28, esencial para la activación de las células T, siendo, además, los linfocitos CD4+CD28- y los

CD8+CD28- potentes secretores de citoquinas proinflamatorias (49), lo que haría que al aumentar con la edad se tuviesen mayores niveles de compuestos inflamatorios. Al envejecer aparece un desequilibrio entre las subpoblaciones Th1/Th2 dándose una mayor producción de las citoquinas que producen los Th2 como la IL-4, IL-5, IL-6 e IL-8 (y que están más relacionadas con la respuesta humoral) y una menor de las Th1 como la IL-2, el interferon gamma (IFN γ), la IL-12 o la IL-15 (46).

Los linfocitos B y sus precursores medulares disminuyen con la edad, a pesar de que la médula ósea no involuciona al envejecer como lo hace el timo. Además, las células pre-B muestran una menor capacidad para madurar hacia células B y una elevada susceptibilidad a la apoptosis (50). No obstante, el número de células secretoras de anticuerpos parece aumentar con la edad, especialmente las CD5+ que generan autoanticuerpos (51). De forma similar a lo que sucede con los linfocitos T, se ha descrito un aumento de los linfocitos B memoria y un descenso de los virgenes en sangre periférica de ancianos (52).

En lo que respecta a los fagocitos, y considerando los más importantes como los macrófagos tisulares y los monocitos y neutrófilos de sangre periférica, estos o bien no experimentan modificaciones en su número con la edad, como se ha comprobado para los monocitos, o disminuyen, como se ha indicado para neutrófilos. Este menor número de neutrófilos se ha atribuido tanto a una menor habilidad de la médula ósea para liberar dichas células al sistema circulatorio o por deficiencias en los progenitores, tanto en su número como en su capacidad de respuesta proliferativa a los factores de crecimiento (53). Respecto a los macrófagos, los trabajos al respecto son menos numerosos que en otros fagocitos y que en linfocitos, pero se ha comprobado que, en ratones, estas células no varían, en número, cuando se comparan animales adultos y viejos. No obstante, la expresión de moléculas de histocompatibilidad tipo II es menor en los macrófagos de ratones viejos tras estimulación con interferon gamma (IFN γ) (54). Los cambios en la expresión de moléculas de HLA con la edad se han observado en los monocitos de sangre periférica humana, en los que se ha apreciado una disminución de la expresión de HLA-DR y un aumento de HLA-DQ al envejecer (55).

Las células NK también experimentan cambios con el envejecimiento. Numerosos autores han detectado un aumento de las mismas, con la edad, en sangre periférica humana (56), especialmente debido a las NK con baja expresión de CD56 que son fenotípica y fisiológicamente maduras. No obstante, en ratones las NK del peritoneo disminuyen con la edad (57).

CAMBIOS FUNCIONALES EN EL SISTEMA INMUNITARIO CON LA EDAD

La «remodelación» que experimenta el sistema inmunitario con el envejecimiento se aprecia de forma relevante en la capacidad funcional de sus células. Así, hay parámetros que aumentan, otros disminuyen y otros no se modifican (57-61).

Los linfocitos T son las células más estudiadas en este sentido y las que experimentan en mayor medida un deterioro funcional como consecuencia del envejecimiento (46,47). Una serie de factores pueden contribuir a dicho deterioro. Así, se pueden indicar desde el microambiente tímico, los cambios en las subpoblaciones y en la expresión de moléculas de superficie antes indicados, la mayor susceptibilidad a la apoptosis o las variaciones en la señalización intracelular que se generan tras la unión de los ligandos a los correspondientes receptores de las células T. En este sentido se ha comprobado que al envejecer hay una disminución en la formación de inositol trifosfato (IP3) y de diacil glicerol (DAG), así como diferencias en las isoformas de la fosfolipasa C (PLC) y de la protein quinasa C (PKC). Una de las funciones más destacadas de estas células es su proliferación en respuesta a un antígeno o expansión clonal. Hay bastantes investigaciones que demuestran que la capacidad proliferativa de los linfocitos en respuesta a mitógenos (usados en el laboratorio para mimetizar la respuesta *in vivo* a los antígenos) va disminuyendo de forma significativa durante el envejecimiento, tanto en humanos como en animales de experimentación (57, 59-60). Como paso previo a la proliferación los linfocitos deben adherirse al endotelio vascular y a los tejidos y migrar al sitio de reconocimiento antigénico. Para ello debe darse la expresión de moléculas de adhesión, hecho que aumenta al envejecer (59,60,62). No obstante, la capacidad de migrar hacia el sitio de reconocimiento antigénico parece disminuir con la edad (59, 60).

Los linfocitos B han sido menos estudiados que los T en cuanto a las alteraciones que experimentan con el envejecimiento. Los cambios en las células B parecen deberse en gran parte a una deficiente colaboración por parte de las T (63). Una clara manifestación del deterioro de la respuesta inmunitaria humoral al envejecer es la deficiente generación de anticuerpos específicos en respuesta a la vacunación en ancianos (64). La capacidad proliferativa de los linfocitos B, al igual que pasa con los T, está disminuida en la vejez (65), pero se ha observado o una falta de cambios o un aumento de las inmunoglobulinas circulantes, especialmente de autoanticuerpos (51).

En las células que llevan a cabo una respuesta inmunitaria innata, concretamente en lo que respecta a los fagocitos, hay trabajos que indican que la función

de los mismos está preservada con la edad, mientras que otros muestran cambios en casi todas las funciones de estas células, disminuyendo algunas al envejecer pero estimulándose otras (59,60, 66-68). En general, los neutrófilos de sangre periférica manifiestan una mayor adherencia, una menor quimiotaxis y capacidad fagocítica y alteraciones en la actividad microbicida. Así, se ha descrito una menor desgranulación de enzimas líticas en respuesta a fMLP en sujetos viejos, pero la producción de radicales libres como el anión superóxido puede aparecer aumentada, disminuida o sin cambios al avanzar la edad. Los macrófagos disponen de una gran heterogeneidad, tanto funcional como fenotípica, la cual parece deberse en gran medida a su capacidad para adaptarse a los cambios en el microambiente que les rodea. De hecho, recientemente se ha postulado la hipótesis de que las alteraciones que experimentan los macrófagos con la edad son el resultado de esas adaptaciones al ambiente tisular que les rodea (69). Dentro de esta idea se encuentra la indicación de que el envejecimiento no influye en la misma medida a macrófagos procedentes de diferentes localizaciones (70). Muchas de las funciones de estos fagocitos experimentan cambios importantes con el envejecimiento (71). Así, la capacidad de adherencia de los macrófagos aumenta con la edad, hecho que se ha relacionado con la mayor expresión de moléculas de adhesión y con el efecto de ciertas citoquinas proinflamatorias sobre dichas moléculas y/o con una mayor presencia de ROS (66,71-73). Esta y otras funciones de los macrófagos, especialmente de los peritoneales, han proporcionado resultados contradictorios. Así, la adherencia no se ve modificada en algunos estudios mientras la quimiotaxis y la fagocitosis se ha comprobado pueden aumentar, aunque en la mayoría de los estudios se aprecia que disminuyen (66,71-73). Esas diferencias pueden deberse a muchas causas, entre ellas se pueden citar las edades que se comparan, la técnica elegida para valorar la función o la cepa de animales en la que se lleve a cabo el estudio (74).

Las alteraciones funcionales de las NK con la edad (75) pueden contribuir a la mayor incidencia de enfermedades infecciosas y, especialmente, neoplásicas (76). La actividad citotóxica por célula disminuye claramente en la vejez (57), lo cual no impide que existan trabajos en los que se indica un aumento de esta función o la ausencia de cambios en la misma. Esa disminución de la actividad NK con el envejecimiento, mayoritariamente detectada, podría explicar el aumento del número de las células NK que se observa al aumentar la edad. La expansión de células NK podría constituir un mecanismo compensatorio de la menor funcionalidad de las mismas. Sin embargo, las causas de esa menor actividad NK son aún poco conocidas, no debiéndose ni a una menor unión célula efectora-diana, ni al contenido, distribución y utilización de las perforinas (77). La funcionalidad de las células NK está modulada por citoquinas, entre las que des-

taca la IL-2, en respuesta a la cual esas células no sólo aumentan su actividad citotóxica, también proliferan y liberan otras citoquinas como IFN γ y quimioquinas como IL-8 (78). Las variaciones con la edad en las citoquinas, que se comentará seguidamente, pueden condicionar dicha funcionalidad celular.

Las modificaciones con la edad en las citoquinas que producen y liberan las diferentes células inmunitarias es también un aspecto interesante que ha sido ampliamente examinado con el fin de dilucidar posibles mecanismos de inmunosenescencia. La IL-2 parece, y es unánimemente aceptado, disminuir con el envejecimiento (46,79). Otras citoquinas como la IL-4, la IL-5, la IL-8 aumentan con la edad, aunque como en casos anteriores hay trabajos que obtienen resultados en los que esas citoquinas o no se modifican o disminuyen al envejecer. Esos datos apuntaron a un cambio en el perfil Th1/Th2 con la edad, dándose una disminución de las Th1 (IL-2, IFN γ , IL-12) con una acción mayor a nivel de la inmunidad celular y un aumento de las Th2 (IL-4, IL-5, IL-6) que median en mayor medida la inmunidad humoral. Aunque los resultados son muy contradictorios, se puede decir que al envejecer aumentan las citoquinas proinflamatorias (como el TNF α o la IL-6) y disminuyen las antiinflamatorias como la IL-10 (46,67). Por otra parte, determinados perfiles de citoquinas como es unos bajos niveles de IL-6 y elevados de IL-10 o IL-15 se ha asociado con una mayor longevidad (80,81).

EL SISTEMA INMUNITARIO COMO MARCADOR DE EDAD BIOLÓGICA. MODELO DE ENVEJECIMIENTO PREMATURO E INDIVIDUOS LONGEVOS

Nuestro grupo de investigación ha conseguido estandarizar, tanto en ratones como en humanos, una serie de parámetros funcionales de las células inmunitarias que se modifican con la edad, y ha comprobado cómo en las dos especies tiene lugar una evolución semejante de dichos parámetros a lo largo de la vida, los dos años en los ratones y los cien en el ser humano. De todas las funciones posibles que llevan a cabo las células inmunitarias nuestro grupo se ha centrado en las que se recogen en la tabla II y Figura 3. Los linfocitos se adhieren a los endotelios vasculares para posteriormente moverse hacia el sitio de reconocimiento antigénico y una vez que el mismo es llevado a cabo proliferan y liberan citoquinas. Estas propiedades de adherencia, quimiotaxis o movilidad inducida, proliferación en respuesta a mitógenos y liberación de IL-2 han sido las estandarizadas en este tipo de células. Los fagocitos siguen una serie de etapas en su proceso de ingestión y destrucción de los agentes patógenos. En primer lugar se



FIGURA 3. Funciones estandarizadas en leucocitos del peritoneo de ratones y de sangre periférica humana, obtenidas, a lo largo de la vida, desde la edad adulta hasta la vejez.

adhieren a las paredes de los vasos o a los tejidos en los que se encuentran, para posteriormente moverse, lo que fundamentalmente realizan de forma dirigida por el gradiente químico que se crea desde el foco infeccioso y que les permite acercarse al mismo. Una vez que estas células llegan al foco infeccioso y contactan con los agentes extraños se unen a los mismos y los fagocitan, incluyéndolos en vacuolas, fagosomas, e inician la etapa de destrucción de tales agentes. En este paso del proceso se dan una serie de mecanismos, los más relevantes conllevan el aumento del consumo de oxígeno y la consecuente producción de radicales libres, el primero de los cuales es el anión superóxido, que posteriormente dará otros radicales y ROS (Figura 1). Estos radicales permitirán procesar los microorganismos fagocitados para la posterior presentación de los «determinantes antígenicos» a los linfocitos. Estas funciones de adherencia, quimiotaxis, fagocitosis, producción de ROS intracelular han sido las estandarizadas en este tipo de células. Por su parte, las NK se han analizado en su capacidad de lisar células tumorales propias de la especie animal estudiada. Estos parámetros han sido valorados en las diferentes décadas de la vida del ser humano (desde la edad adulta de los veinte años hasta los noventa) en leucocitos de sangre periférica, y a lo largo de los meses (desde la edad adulta a los 24 meses) de vida de ratones ICR-

CD1, en sus leucocitos peritoneales (obtenibles de los animales sin necesidad de sacrificarlos ni tan siquiera anestésarlos, lo que hace una obtención de muestra semejante a la de leucocitos de sangre periférica humana).

Al envejecer, disminuyen las capacidades funcionales que son más beneficiosas, como pueden ser la respuesta linfoproliferativa a los antígenos o la actividad NK. También lo hace la IL-2 que está regulando las dos funciones indicadas, así como la capacidad de quimiotaxis y la de ingerir lo extraño por parte de los fagocitos. Sin embargo, se activan aquellas funciones que podrían resultar perjudiciales si lo hacen en exceso, como es el caso, por ejemplo, de la expresión de moléculas de adhesión que favorecen la adherencia de los leucocitos a los tejidos, impidiéndoles cumplir llegar al sitio donde tienen que llevar a cabo su misión (59,60,67) (Tabla II). No obstante, como se muestra en la Figura 4, las funciones inmunitarias estandarizadas tienen diferentes cinéticas en su evolución con la edad. Así, unas van aumentando progresivamente desde la edad adulta (es el caso de la adherencia), otras van disminuyendo (lo que sucede en la quimiotaxis) y otras tienen un pico en la edad adulta y disminuyen al envejecer (como pasa con la fagocitosis, la linfoproliferación frente a mitógenos, la liberación de IL-2 y la actividad antitumoral de las NK). También, aumenta con la edad la liberación extracelular de radicales libres de oxígeno o la de citoquinas proinflamatorias, como el TNF α , que en cantidades elevadas causan la destrucción de las estructuras celulares.

No obstante, es evidente que para acreditar a esos parámetros como marcadores de «edad biológica» y, consecuentemente, de longevidad es necesario que el valor que muestren dichos parámetros en un individuo se relacione con lo que vive el mismo. Esta acreditación la conseguimos gracias a un modelo de envejecimiento prematuro que hemos caracterizado en ratones. Este modelo, que es una prueba más de la relación entre el sistema nervioso y el inmunitario, se basa en la diferente realización de una prueba conductual en un laberinto en T simple por ratones del mismo sexo y edad cronológica. Los animales que realizan peor la prueba tienen una mayor edad biológica, esto es un envejecimiento prematuro. Esto se detectó en primer lugar por tener dichos animales un sistema inmunitario más envejecido, mostrando los diferentes parámetros funcionales estudiados, tanto a nivel de las células fagocíticas, como de las NK y los infocitos, las características propias de los de animales con mayor edad cronológica (Tabla II) (59,82-84). También mostraron estos ratones prematuramente envejecidos, a los que hemos denominado PAM («prematurely ageing mice») unos niveles de ansiedad e hiperemocionalidad mayores (85) y una neuroquímica cerebral correspondiente a animales más viejos

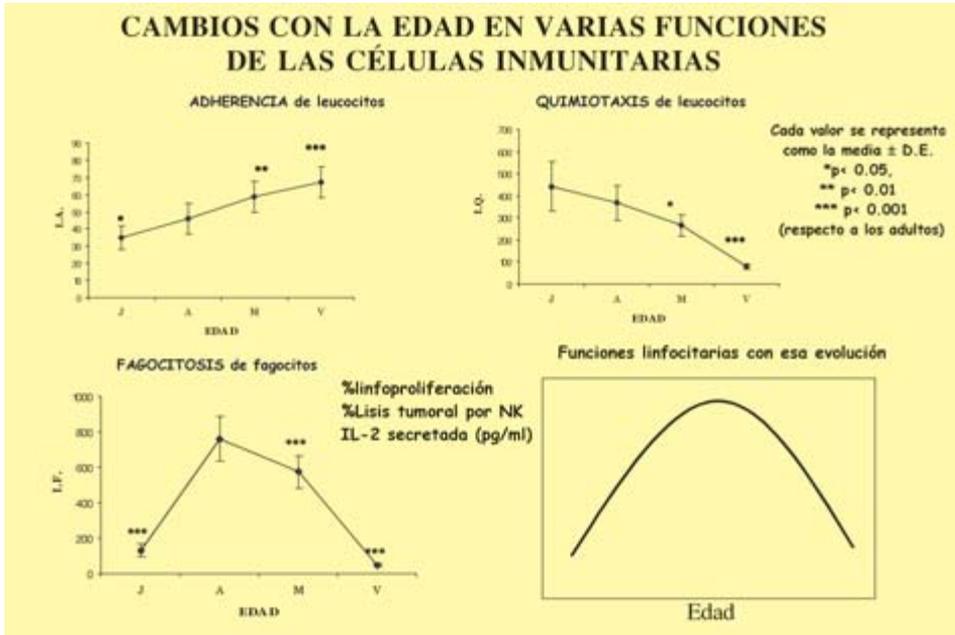


FIGURA 4

(86). Sin embargo, lo que definitivamente aseguró tales parámetros como biomarcadores de edad biológica es que dichos animales prematuramente envejecidos tenían una significativamente menor longevidad que sus compañeros de igual edad cronológica y que se clasificaron como no prematuramente envejecidos (NPAM, retomando las siglas del inglés de «nonprematurely ageing mice») (82,84) (Figura 5). Dada la idéntica evolución de los parámetros estandarizados en ratones y en el hombre, los resultados en animales nos permiten hacer una cierta extrapolación al ser humano de la idea de que cuando un individuo presenta valores típicos de una edad mayor en esos parámetros inmunitarios, tiene una esperanza de vida más limitada.

LOS CENTENARIOS Y LOS ANIMALES LONGEVOS

Un hecho que demuestra el importante papel del sistema inmunitario en la salud y la longevidad de los individuos es la comprobación de que aquellos que llegan a edades avanzadas en buenas condiciones son los que mantienen una funcionalidad de sus células inmunitarias semejante a la de los adultos (57, 87).

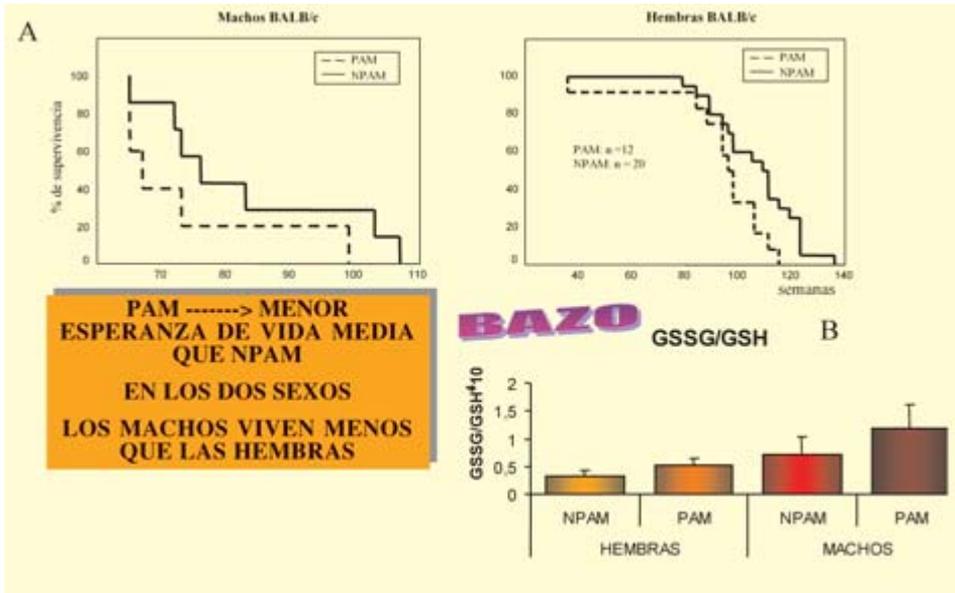


FIGURA 5A. Menor longevidad de los ratones clasificados como PAM ("Prematurely Ageing Mice") que de los NPAM (Nonprematurely Ageing Mice) de igual edad cronológica

FIGURA 5B. Los leucocitos de las hembras tienen menos estrés oxidativo que los de los machos.

Los centenarios, que son el paradigma del envejecimiento satisfactorio, parecen presentar una mejor adaptación a las agresiones internas y externas, en particular con respecto a las que inciden en el sistema inmunitario (87,88). Los precursores hematopoyéticos de los leucocitos sanguíneos, en centenarios, preservan su capacidad proliferativa y la respuesta a distintos factores de crecimiento, de forma más eficaz que en individuos viejos de menor edad (89). Se ha comprobado que aunque el número de linfocitos $T\gamma\delta$ está reducido en centenarios, su capacidad de activación por LPS es similar a la de los adultos (90). Otros cambios cuantitativos detectados en los centenarios se encuentran a nivel de las células $CD8+CD28^-$, presentes en mayor número que en adultos, así mismo hay un aumento de NK, con una mayor proporción de NKT, las cuales producen grandes cantidades de $IFN\gamma$ e $IL-4$ y ejercen una potente acción antitumoral, lo que podría explicar la menor incidencia de tumores que se observa en las personas longevas (91). Los granulocitos, especialmente los neutrófilos, están en elevado número en los centenarios y presentan una mayor capacidad de fagocitosis y de producción de $IL-1\beta$ y $TNF\alpha$ y una menor generación de anión superóxido que las células



FIGURA 6. *La actividad NK en sangre periférica es similar en adultos y centenarios*

de individuos viejos de menor edad cronológica (92). La capacidad linfoproliferativa en respuesta a CD3 aparece en los centenarios muy bien preservada, y la que se hace en respuesta a mitógenos, aunque retardada en el tiempo, es similar a la de adultos (93). En un trabajo reciente de nuestro grupo se ha comprobado que las funciones inmunitarias, estandarizadas en lo que respecta a sus cambios a lo largo de la edad, se encuentran en los centenarios muy similares a como aparecen en los adultos jóvenes (de 30 años de edad) y en cualquier caso mucho mejores que como aparecen en los de setenta años (94). Como ejemplo se muestran los resultados a nivel de la actividad NK (Figura 6). Un hecho similar al indicado para centenarios lo hemos observado en células inmunitarias peritoneales de ratones longevos (57). Como ejemplo se muestran, en la Figura 7, algunas funciones analizadas en ratonas adultas, viejas y longevas (en estudios de longevidad con ratones se hace necesario utilizar hembras, ya que los machos en esta especie animal muestran un comportamiento muy agresivo que dificulta su mantenimiento en buenas condiciones durante los meses de vida de los mismos). Todos estos resultados confirman que el sistema inmunitario es un buen indicador de salud y longevidad.

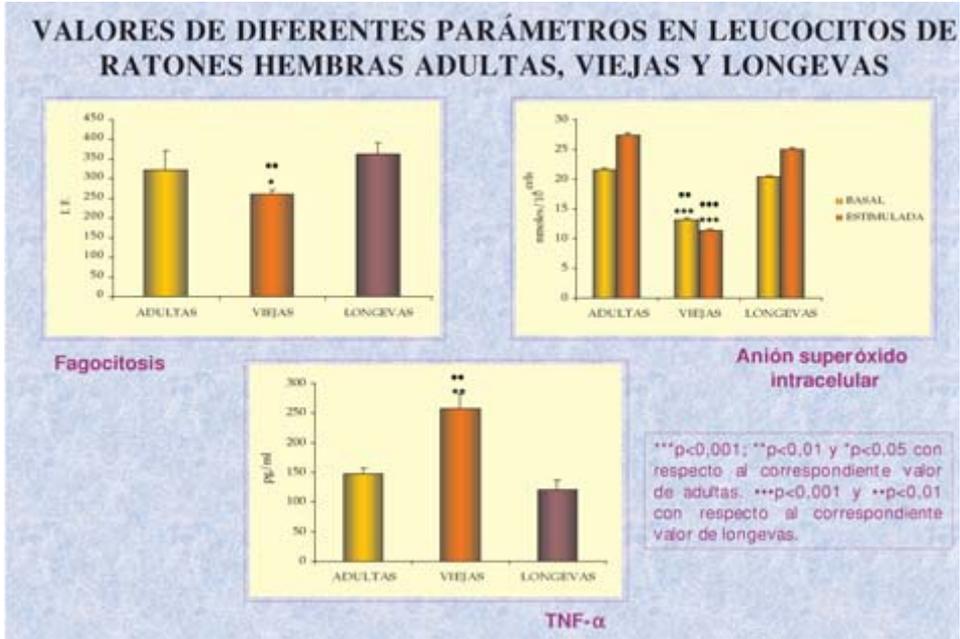


FIGURA 7. *Los leucocitos de animales longevos tienen una capacidad funcional semejante a la de los de adultos.*

¿CUÁL ES LA CAUSA DE LA INMUNOSENESCENCIA?

Una vez comprobados los cambios de las funciones inmunitarias con la edad, los cuales generan un sistema defensivo menos eficaz para llevar a cabo su función, y habiendo podido relacionar los valores de las mismas con la longevidad de cada individuo, lo oportuno era preguntarse ¿por qué se produce la inmunosenescencia?, ¿por qué se dan esos cambios en la funcionalidad inmunitaria con el envejecimiento?. Si como antes se ha indicado los mecanismos que subyacen al envejecimiento deben ser de aplicación universal, parece lógico pensar que la causa de la inmunosenescencia es la misma que la que hace envejecer a las demás células del organismo: el estrés oxidativo que se genera por el imprescindible uso del oxígeno. El estudio de cómo se encuentra el estado redox de las células inmunitarias a lo largo de la edad se manifiesta necesario para constatar a la pregunta de este apartado. Además, un hecho que hay que tener presente es que las células inmunitarias necesitan producir radicales libres y compuestos oxidantes e inflamatorios para llevar a cabo muchas de sus funciones, como ya han indicado diversos autores (95,96). También, hay que tener en con-

sideración que las células inmunitarias son particularmente sensibles a la oxidación dado el alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados que tienen en sus membranas, el papel crítico de la señalización intracelular relacionada con esas membranas y la expresión génica que requieren en su labor defensiva (97). Por todo ello, si en cualquier célula del organismo es importante preservar el mencionado equilibrio entre producción de oxidantes y niveles de defensas antioxidantes, más lo es en las células de nuestro sistema defensivo, en las que dicho equilibrio puede determinar su capacidad funcional y con ello, la del organismo en general.

Para poder conocer cómo se encuentra el estado redox de los leucocitos a lo largo de la edad, hemos estudiado en las células inmunitarias peritoneales de ratones los niveles de toda una serie de oxidantes y de defensas antioxidantes. Siguiendo el esquema que se muestra en la Figura 1, del anión superóxido que pueden generar y liberar los leucocitos se pasa al peróxido de hidrógeno, una ROS que puede proporcionar el radical hidroxilo, el más dañino de los radicales de oxígeno, el cual puede producir importantes daños oxidativos en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Para defender a las células de esos oxidantes hay toda una serie de antioxidantes. El más importante es el glutatión que en su forma reducida (GSH) se utiliza para eliminar peróxidos, lo que hace mediante la activación de otra defensa antioxidante enzimática, la glutatión peroxidasa (GPx). El glutatión oxidado que se genera (GSSG) es un importante oxidante, teniendo que recuperarse a la forma reducida de GSH mediante la glutatión reductasa (GR), otra enzima antioxidante. De hecho, el índice GSSG/GSH se considera un importante marcador de estrés oxidativo celular (98). Como otras defensas enzimáticas antioxidantes se encuentran la superóxido dismutasa, enzima que convierte al anión superóxido en peróxido de hidrógeno, y la catalasa (CAT) que, entre otras actividades, elimina el peróxido de hidrógeno pasándolo a agua (99) (Figura 1). Además de los oxidantes, los leucocitos generan al activarse compuestos proinflamatorios que le permiten destruir lo extraño, y hay que tener presente que la oxidación y la inflamación son procesos íntimamente relacionados (100). Entre estos compuestos podemos citar a citoquinas como el $\text{TNF}\alpha$ y la PGE_2 .

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados en los últimos años al respecto nos permiten responder que las células inmunitarias envejecen por lo mismo que lo hacen las demás células del organismo, es decir, por el estrés oxidativo que experimentan. Como se recoge en la Tabla II, toda la serie de parámetros de oxidación e inflamación analizados aumentan con la edad, mientras disminuyen las defensas antioxidantes (algunos resultados se muestran en la Figura 8). Como consecuencia de

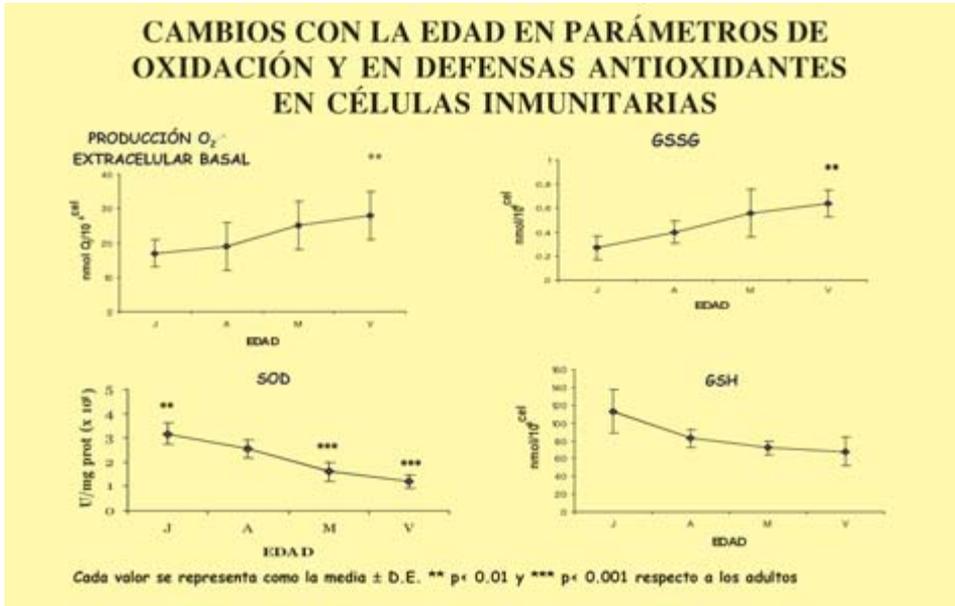


FIGURA 8. Aumento con la edad de los niveles de anión superóxido extracelular y de glutatión oxidado (GSSG) y disminución de los de glutatión reducido (GSH) y de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) en leucocitos peritoneales de ratones.

esta situación de estrés oxidativo se produce un aumento del daño a biomoléculas en las células inmunitarias, tanto a nivel de lípidos como del ADN nuclear (66,67).

A la vista de nuestras últimas investigaciones, se puede afirmar que los cambios que se producen en la funcionalidad de las células inmunitarias con el envejecimiento se deben al «estrés oxidativo crónico» que experimentan las mismas con el paso del tiempo. Además, recientemente hemos podido comprobar que los ratones prematuramente envejecidos (PAM) tienen un mayor estrés oxidativo en sus leucocitos peritoneales que los NPAM, y recordemos que eso se acompaña de peor función y menor esperanza de vida (82-84, 101-102). También otro hecho que ratifica la implicación del mayor estrés oxidativo de los leucocitos peritoneales como marcador del estado de oxidación general del organismo y, consecuentemente, de la esperanza de vida del individuo ha sido el comprobar que la evolución tanto de las funciones como de los parámetros de estado redox anteriormente comentadas (Tabla II) era similar a lo largo de los meses de vida de los ratones y durante las horas que sobreviven estos animales con un «estrés oxidativo agudo», el producido por una septicemia. Así, en animales a los que se les produce un «shock endotóxico» por inyección de lipopolisacárido (LPS) bacteriano

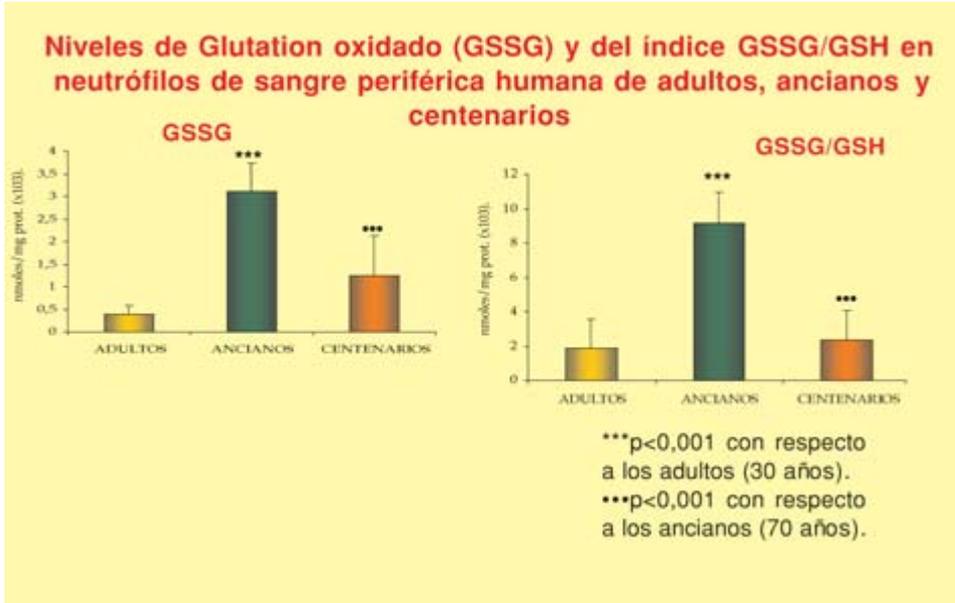


FIGURA 9. Los neutrófilos de sangre periférica de centenarios tienen menos estrés oxidativo, analizado por la relación GSSG/GSH, que los de personas de setenta años.
GSSG: glutacion oxidado; GSH: glutacion reducido.

(E. coli), y que mueren en su totalidad a las 30 horas de haberles provocado la infección, la cinética de las funciones inmunitarias estudiadas es, básicamente, la misma que la apreciada en el estudio de envejecimiento (103,104). Es conocido que en el shock endotóxico, una de las principales causas de muerte en las unidades de cuidados intensivos, es el estrés oxidativo que producen las células inmunitarias, en su intento de defendernos de la infección, lo que conduce a la muerte del individuo. Este paralelismo no sólo se limita a las funciones inmunitarias, también a los niveles de compuestos oxidantes y proinflamatorios, así como de antioxidantes en las células del sistema defensivo, y del daño a macromoléculas en las células del mismo (105). Con todo ello, se hace evidente que el paso del tiempo cronológico produce una situación de «estrés oxidativo crónico» que se detecta en las células de nuestro sistema defensivo.

Otro hecho que ratifica lo indicado es el análisis de algunos parámetros de estrés oxidativo en linfocitos y neutrófilos de centenarios. Los resultados demuestran que, en las personas que superan los cien años, estas células tienen valores de oxidantes y de antioxidantes más similares a las de adultos que las de individuos de setenta años (Figura 9). Lo mismo se puede decir del daño oxi-

dativo a lípidos, aunque en muchos casos hay un comportamiento diferente de un tipo de células leucocitarias a otros (94). Hay parámetros de inflamación, como los niveles de TNF α y otras citoquinas proinflamatorias, que están más elevados en centenarios. Este hecho se ha interpretado como causa de una progresiva estimulación de la inmunidad innata que se produce al envejecer, siendo el estado inflamatorio que genera compatible con la longevidad siempre que no sea excesivo (106).

SISTEMAS PARA MANTENER EN MEJORES CONDICIONES LA FUNCIÓN INMUNITARIA EN EL ENVEJECIMIENTO

Una vez establecido que el estrés oxidativo es el mecanismo que subyace a la inmunosenescencia, se pueden proponer estrategias que, incidiendo en el mismo, permitan el mantenimiento de una mejor función inmunitaria al envejecer. Además, dado el carácter de marcador de edad biológica que hemos comprobado tiene el estado funcional de las células inmunitarias, dichas intervenciones podrían, al mantener más joven dicha edad biológica, proporcionar una mayor longevidad a los individuos.

LA NUTRICIÓN

En este contexto, y siendo conocida la inadecuada nutrición que se tiene en el ser humano durante la vejez (107), una de las estrategias que parecen más evidentes hace referencia a la utilización de compuestos antioxidantes. Actualmente está claramente sustentado, con abundantes datos experimentales, el hecho de que la administración de antioxidantes, muchos de los cuales tienen también un carácter antiinflamatorio, puede equilibrar el balance celular entre niveles de oxidación e inflamación con los de las defensas antioxidantes, disminuyendo el estrés oxidativo (67,108). Los compuestos antioxidantes pueden ser endógenos o exógenos, encontrándose los primeros en nuestro organismo para salvaguardar la existencia de unos niveles de ROS necesarios para el funcionamiento corporal, pero evitando la superproducción o acumulo de las mismas y, consecuentemente, los procesos patológicos que desencadenan. La disminución de los niveles de antioxidantes endógenos, hecho que manifiesta un gasto de estos compuestos en la neutralización del exceso de oxidantes, se pueden solventar mediante su incorporación a nuestro organismo, a través de la dieta o mediante la suplementación de cantidades apropiadas, de antioxidantes exógenos. Dentro de estos antioxidantes exógenos, son posiblemente los más conocidos la vitamina C, la E,

los carotenos o los polifenoles, aunque otros muchos, entre los que se puede mencionar a aquellos de tipo tiólico (que aumentan los niveles intracelulares de glutathione) como la tioprolina o la N-acetilcisteína, se están incorporando a la ya larga lista que hoy se tiene de estos compuestos. La base del efecto beneficioso en la vejez de los antioxidantes es precisamente su capacidad de aumentar el poder reductor, protegiendo frente al daño oxidativo asociado al envejecimiento (67,108). Toda una serie de grupos, incluido el nuestro, han comprobado que esos antioxidantes son necesarios y se utilizan para llevar a cabo una adecuada función de nuestro sistema inmunitario. Así, durante la actuación de los leucocitos éstas células van consumiendo sus reservas de antioxidantes. Esto puede explicar, tanto en animales de experimentación como en el ser humano, la mejoría de la capacidad funcional del sistema inmunitario en la edad adulta, tras la incorporación *in vitro* o la suplementación *in vivo* con diferentes antioxidantes exógenos como los antes mencionados (109-112). Si consideramos que al envejecer se producen mayores niveles de oxidantes junto a frecuentes estados de malnutrición y una clara disminución de los niveles de defensas antioxidantes, parece evidente que la suplementación con este tipo de compuestos podría tener un efecto beneficioso en general y en la función inmunitaria en particular, hecho que se ha comprobado tanto en sujetos humanos como en animales de experimentación (Tabla II) (59,67,113-115). Además, en esos experimentos se ha observado que la ingestión de antioxidantes consigue dejar los parámetros funcionales de las células inmunitarias en niveles similares a los de los adultos. Lo más relevante es que este «rejuvenecimiento» inmunitario se manifiesta, en los animales de experimentación, y concretamente en los que muestran un envejecimiento prematuro (116-120), con una mayor longevidad de los mismos (121,122) (Figura 10). Este descubrimiento, realizado por nuestro grupo de investigación, es un apoyo importante a la teoría oxidativa/inflamatoria del envejecimiento y al papel de marcador de salud y esperanza de vida que tienen las funciones leucocitarias estudiadas. Otros datos que apoyan el hecho de que el estrés oxidativo subyace a la inmunosenescencia es que los niveles de compuestos oxidantes y de defensas antioxidantes, valorados en individuos viejos que ingieren antioxidantes, se modifican, alcanzando los mismos valores similares a los detectados en los adultos (Tabla II) (67), lo que se aprecia también en los leucocitos peritoneales de los PAM (Figura 10). También, está el hecho de que en los animales con el modelo de shock endotóxico letal, antes comentado, la administración de un antioxidante tiólico como la N-acetilcisteína, a una dosis adecuada, mejoró la función inmunitaria y equilibró los niveles de oxidantes y antioxidantes en estas células, obteniéndose consecuentemente un aumento de la supervivencia de los animales (123,124).

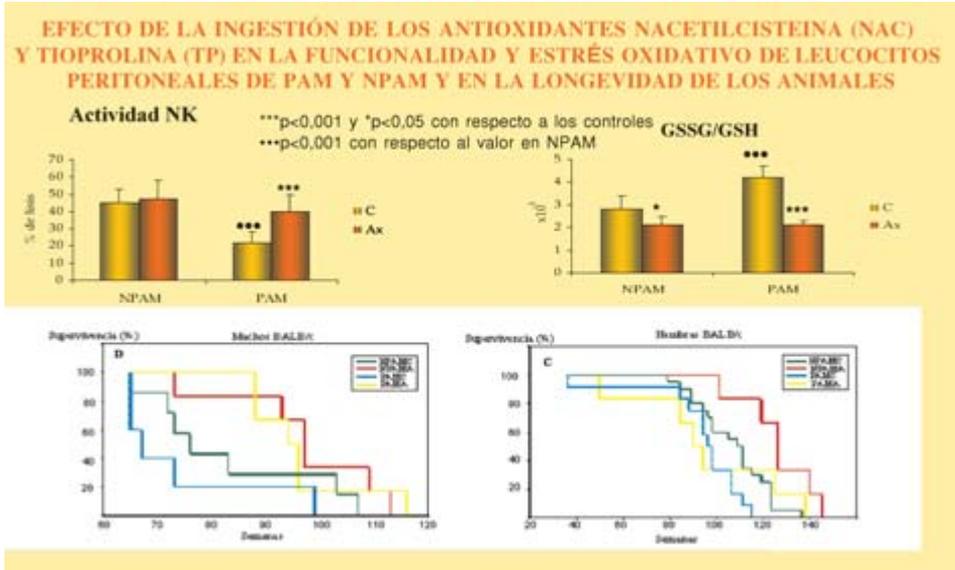


FIGURA 10. *Los leucocitos peritoneales de ratones mejoran su capacidad funcional y disminuyen su estrés oxidativo tras la ingestión de antioxidantes (NAC+TP), dándose un aumento de la longevidad. Estos hechos se aprecian en mayor medida en los animales prematuramente envejecidos (PAM).*

Puesto que la mejoría que ejercen los antioxidantes en la función inmunitaria supone aumentar las funciones que están disminuidas y reducir las que están muy estimuladas, estos compuestos no se manifiestan como estimuladores inmunitarios indiscriminados, más bien como inmunomoduladores, restaurando los niveles más apropiados para cada función. Esta capacidad moduladora parece ser ejercida a nivel de factores intracelulares ubicuos e implicados en la oxidación e inflamación como el NF- κ B (67,123,125).

El papel regulador de los antioxidantes afectaría no sólo al sistema inmunitario sino también a los otros sistemas reguladores, como el sistema nervioso, lo cual ha sido comprobado por diversos investigadores. De hecho, en los ratones prematuramente envejecidos la ingestión de antioxidantes mejora la respuesta conductual, lo que prueba que el estrés oxidativo que subyace al deterioro del sistema inmunitario, pero también al del sistema nervioso, se neutraliza con la administración de antioxidantes (126). Por lo indicado podemos plantear a los antioxidantes como una herramienta útil para enlentecer el deterioro homeostático que tiene lugar en el envejecimiento, explicando así su papel en la disminución de la morbilidad y mortalidad que acontecen al avanzar la edad, y al sistema inmunitario como un marcador útil para estudiar y detectar estos hechos.

TABLA II. *Cambios de la edad adulta a la vejez en diferentes funciones y parámetros de estrés oxidativo y daño a lípidos y ADN nuclear, en células inmunitarias. Papel de la ingestión de antioxidantes*

Célula	Función	Vejez	Antioxidantes en vejez
1. Fagocitos	Adherencia	↑	↓ (= adulto)
	Migration	↓	↑ (= adulto)
	Fagocitosis	↓	↑ (= adulto)
	Niveles de RL In.	↓ (m) / ↑ (n)	↑ / ↓ (= adulto)
2. Linfocitos	Adherencia	↑	↓ (= adulto)
	Migración	↓	↑ (= adulto)
	Proliferación	↓	↑ (= adulto)
	Liberación de IL-2	↓	↑ (=adulto)
3. NK	Citotoxicidad	↓	↑ (= adulto)
En Leucocitos	Parámetro	Vejez	Antioxidantes en vejez
1. Oxidantes	Anión superóxido Ex	↑	↓ (= adulto)
	PGE2	↑	↓ (= adulto)
	Liberación TNFα	↑	↓ (= adulto)
	GSSG	↑	↓ (= adulto)
2. Antioxidantes	GSH	↓	↑ (= adulto)
	SOD	↓	↑ (= adulto)
	CAT	↓	↑ (= adulto)
	GPx	↓	↑ (=adulto)
	Gr	↓	↑ (=adulto)
3. Daño Lípidos	MDA	↑	↓ (= adulto)
	Daño ADN	8-oxodG/dG	↑

In : Intracelular. Ex: Extracelular. RL: Radicales Libres. PGE2: prostaglandina E2. TNFα factor de necrosis tumoral alfa. GSSG: glutatión oxidado. GSH: glutatión reducido. SOD: superóxido dismutasa. CAT: catalasa. GPx: Glutatión peroxidasa. Gr: glutatión reductasa. MDA: malondialdehído. 8-oxodG: deoxiguanosina oxidada. m: macrófagos; n: neutrófilos.

La otra herramienta nutricional que se ha visto puede ser efectiva en el proceso de envejecimiento, al limitar la oxidación celular, es la restricción calórica (127). Esta restricción protege a los animales de experimentación, atenuando la inducción asociada a la edad de genes que codifican productos proinflamatorios y de estrés, aumentando las defensas antioxidantes y reduciendo la oxidación de macromoléculas. La restricción calórica mejora la funcionalidad de las células inmunitarias en el envejecimiento, como comprobó

Pahlavani (128). Este papel atenuador de la inmunosenescencia parece llevarse a cabo a través de lo que se ha comentado hace en el organismo en general, la modulación que la restricción calórica ejerce sobre la expresión de una serie de genes, muchos de ellos son precisamente los implicados en la expresión de factores oxidantes/antioxidantes. En este sentido, se ha comprobado que la restricción calórica incide sobre factores de transcripción, como el NF-kB, reduciendo la activación que tiene lugar en los mismos con la edad (107).

EL EJERCICIO FÍSICO

Otra estrategia para llegar a resultados similares de mejora de la función inmunitaria en la vejez es la realización de ejercicio físico moderado. Hay numerosos estudios que han comprobado el importante papel que tiene el ejercicio físico sobre el sistema inmunológico (67, 129-131). No obstante, la actividad física que resulta beneficiosa para nuestro sistema defensivo es la que se lleva a cabo de forma moderada y de manera más o menos habitual, siendo, por el contrario, bastante perjudicial la que se hace de forma exhaustiva, puntual o con dilatadas sesiones. Este ejercicio intenso, como el que llevan a cabo muchos deportistas de alta competición, puede suponer un estrés añadido que hace envejecer nuestras defensas y nuestro organismo. Aunque los estudios sobre los efectos del ejercicio físico en la vejez son bastante escasos, nosotros hemos podido comprobar que la realización de ejercicios moderados conlleva un mejor estado inmunitario a cualquier edad, pero de forma más evidente al envejecer (67,131). En individuos viejos, tanto en animales de experimentación como en humanos, ese ejercicio moderado restaura la función inmunitaria deteriorada, asemejándola a la de adultos (60,132). Concretamente, en un estudio reciente en humanos, hemos comprobado como en hombres y mujeres de setenta años, que llevan a cabo un programa de ejercicio, basado en el desarrollo de la fuerza muscular, se mejora la función inmunitaria ya a los dos meses de iniciar el programa y el «rejuvenecimiento» de este sistema es más evidente a los seis meses, momento en el que finaliza el mismo, y en el que los parámetros inmunitarios son similares a los que presentan hombres y mujeres de treinta años. Tras 6 meses sin realizar actividad física algunos funciones recuperan sus valores iniciales (Figura 11). Además, el efecto positivo del ejercicio resulta aun más evidente en individuos que se encuentran con un mayor deterioro fisiológico como el que presentan los hipertensos (67).

La relación entre las dos «terapias inmuno-revitalizadoras» estudiadas da una posible explicación al efecto beneficioso del ejercicio en la vejez, ya que el ejercicio moderado favorece, entre otras cosas, el aumento de los niveles de antio-

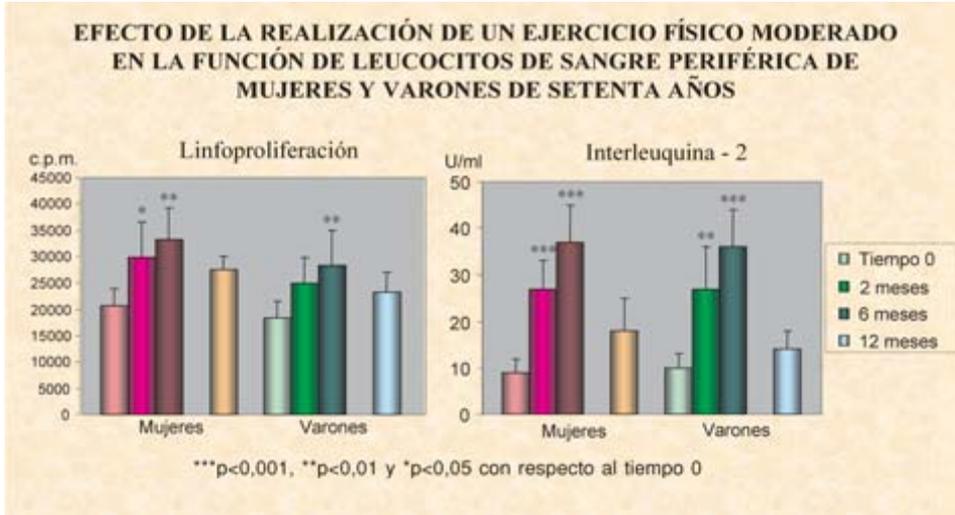


FIGURA 11. Efecto de la realización de ejercicio físico en la linfoproliferación en respuesta al mitógeno fitohemaglutinina y liberación de IL-2 en hombres y mujeres antes de iniciar el programa de ejercicio (tiempo 0) a los 2 meses, a los 6 meses (cuando finaliza el programa) y tras otros 6 meses sin hacer actividad física (12 meses).

xidantes intracelulares en las células inmunitarias, y por consiguiente de su función. Por su parte, un ejercicio con sobreentrenamiento produce una disminución de esos niveles intracelulares, con una consecuente menor actividad inmunitaria. De este modo, la realización de ejercicio físico, de forma adecuada, tanto *per se* como por su capacidad de aumentar los niveles de antioxidantes celulares, permitirá recuperar el balance oxidantes/antioxidantes que se ha perdido al envejecer, y de este modo puede incidir positivamente en la función del sistema inmunitario (67). Pero además, también lo hará en la del sistema nervioso y en la del endocrino, así como en la comunicación entre los tres sistemas reguladores. Todo ello evitará el deterioro homeostático que por el estrés oxidativo va teniendo lugar con la edad, y consecuentemente, se disminuirá la morbilidad y se mejorará la supervivencia de los individuos (Figura 12).

OTROS SISTEMAS DE INTERVENCIÓN

La actividad mental y la superación del estrés emocional también mejoran la función inmunitaria. Es este un campo en el que se está empezando a incidir con estudios científicos bien diseñados. Por tanto, basándonos en el valor de

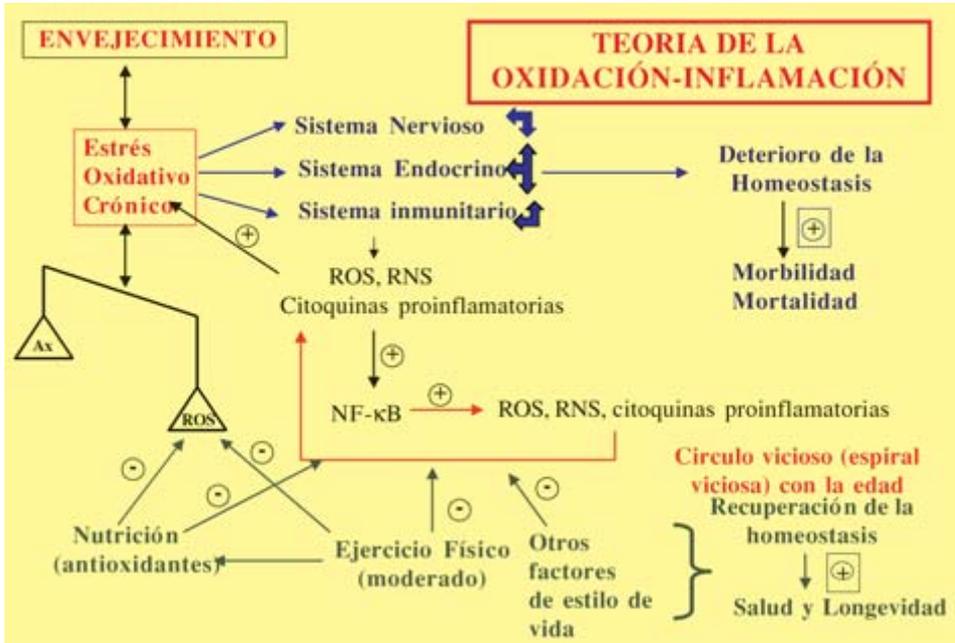


FIGURA 12.

marcador de edad biológica del sistema inmunitario, podemos asegurar que todas esas estrategias resultan útiles para incrementar nuestra esperanza media de vida. De hecho, resultados recientes de nuestro grupo están comprobando que en animales de experimentación el «enriquecimiento ambiental» mejora la función y el estado redox de las células inmunitarias y alargan la longevidad.

Se puede concluir diciendo que en la vejez la ingestión de cantidades apropiadas de antioxidantes en la dieta, la realización de un ejercicio moderado y una buena «actitud» ante la vida producen una revitalización del sistema inmunitario y por consiguiente de la homeostasis corporal, lo que supone una mejora en la salud del individuo y en su calidad de vida (Figura 12).

PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA INMUNITARIO EN EL ENVEJECIMIENTO DEL ORGANISMO: TEORÍA OXIDATIVA-INFLAMATORIA DEL ENVEJECIMIENTO

Una pregunta que podemos hacernos, conocido el papel del sistema inmunitario, sus modificaciones con el envejecimiento y lo que subyace a esas altera-

ciones, un «estrés oxidativo crónico», es si los cambios en el sistema inmunitario con la edad son únicamente una consecuencia más de los procesos oxidativos que tienen lugar con el paso del tiempo, o dichos cambios pueden ser una causa importante de esa oxidación, contribuyendo a la celeridad de la misma.

Como ya se ha indicado, las células inmunitarias en el ejercicio de su función defensiva llevan a cabo una respuesta inflamatoria, produciendo citoquinas proinflamatorias (como el $\text{TNF}\alpha$) y radicales libres de oxígeno y de nitrógeno, los cuales sustentan la inflamación y oxidación que permite la eliminación de lo extraño. No debemos olvidar que, como ya se ha indicado, la oxidación e inflamación son procesos coincidentes en lo que respecta a los factores y mecanismos implicados en los mismos. Dado que tales factores proinflamatorios se encuentran aumentados al envejecer, se está sugiriendo una nueva teoría del envejecimiento que sería una puntualización de la teoría de la oxidación, «la teoría inflamatoria». De este modo, se puede hablar de una «teoría oxidativa-inflamatoria» del envejecimiento, en la que el sistema inmunitario tendría un importante papel (67). La idea se recoge en la Figura 12. Partiendo de la base de que el envejecimiento es un estrés oxidativo crónico, éste afectaría a todas las células del organismo, pero tendría especial relevancia en las de los sistemas homeostáticos, el nervioso, el endocrino y el inmunitario, los cuales, al no poder mantener su equilibrio redox sufrirían el daño oxidativo que conlleva su falta de función, lo que impediría un mantenimiento adecuado de la homeostasis. Este deterioro de la homeostasis daría lugar al aumento de morbilidad y mortalidad típico de la vejez. En este contexto, el sistema inmunitario por su característico funcionamiento en el que se requiere generar continuamente una elevada cantidad de compuestos oxidantes e inflamatorios, podría activar una serie de factores, como el ubicuo factor de transcripción NF-kB. Así, al activarse este factor, en un cierto grado, se estimularía la expresión de genes de compuestos oxidantes e inflamatorios. De hecho, este factor manifiesta una gran activación en las células inmunitarias en situaciones de estrés oxidativo, como la septicemia (105) o el que nos ocupa, el envejecimiento (datos en vías de publicación). Se podría así, si esa producción de compuestos oxidantes/inflamatorios no se regula adecuadamente, entrar en un «circulo vicioso» o mejor en una «espiral viciosa», pues las nuevas situaciones que se van generando son similares, pero no coincidentes, en la que mayor cantidad de compuestos oxidantes e inflamatorios por parte del sistema inmunitario activarían más aún la producción de los mismos, vía factores como el NF-kB. Si esa espiral no es controlada, los compuestos oxidantes e inflamatorios afectarían con el tiempo a todas las células del organismo, siendo las más sensibles las diferenciadas postmitóticas, como antes se ha comentado, contribuyendo de este modo a mantener el estrés oxidativo crónico del organismo (67).

Por otra parte, una consecuencia de los cambios que con la edad establece el estrés oxidativo en las células inmunitarias sería una señalización intracelular alterada en las mismas, lo que las puede hacer responder de forma inadecuada a los estímulos que les llegan. Nuestro grupo ha comprobado cómo el deterioro funcional que experimentan las células inmunitarias con el envejecimiento las hace «sordas» a los mensajes que recibe del sistema nervioso (73,74,133). En este contexto, se explicaría el deterioro de la comunicación entre los sistemas reguladores. Así, al envejecer, y teniendo como base el estrés oxidativo, no sólo se altera la respuesta del sistema nervioso, la del endocrino y la del inmunitario, sino también la capacidad de comunicación entre ellos, lo que conduce inexorablemente al fallo homeostático que conlleva el aumento en morbilidad y mortalidad que tiene lugar con la edad.

Como demostración de esta hipótesis tenemos toda una serie de hechos anteriormente comentados. Por una parte, los individuos que llegan a centenarios o los animales que alcanzan una elevada esperanza de vida media, son aquellos que mantienen mejor el estado redox de sus células inmunitarias y consecuentemente la función de las mismas (94). Por otra parte, las hembras de cada especie, que tienen mejor sistema inmunitario que los machos (79) y muestran una longevidad media mayor (134), presentan un mejor estado redox en sus leucocitos (Figura 5B). A este respecto, también se puede indicar, como se muestra en la Figura 5B, que, en ambos sexos, los animales prematuramente envejecidos, los PAM, tienen un mayor estrés oxidativo en sus leucocitos que los de igual edad cronológica que no están prematuramente envejecidos, los NPAM. Además, las hembras PAM muestran en sus leucocitos un estado redox más parecido a los de los machos NPAM. También hay que tener en cuenta, como se ha indicado en el apartado anterior, que todas las estrategias que permiten mantener un mejor estado redox y función inmunitaria, como la ingestión en la dieta de antioxidantes en cantidades adecuadas, permiten una mayor longevidad de los individuos.

Se podría decir, como ya ha sido sugerido por algún investigador, que nuestro sistema inmunitario tiene carácter homeostático y también antihomeostático (42). Cuando un individuo está sujeto a una infección, nuestro sistema inmunitario intenta defenderlo de la misma, pero si no puede hacerlo adecuadamente por la no muy apropiada fisiología de dicho individuo, el sistema inmunitario utiliza sus herramientas de oxidación e inflamación para sacrificarlo en beneficio del resto de los individuos de la especie a los que podría infectar. De hecho, ya se ha comentado que en un sock séptico el individuo no muere por la infección, lo hace por la oxidación de un sistema inmunitario mal controlado. Se podría ampliar esta idea a lo que sucede en el envejecimiento. Desde que nacemos nuestro sistema inmunitario se tiene que enfrentar a numerosos agentes extraños, y para defendernos

de los mismos ha ido liberando compuestos oxidantes e inflamatorios. Cuanto mejor lo hace, más fácil es que sobreviva el individuo y llegue a la edad reproductora (hecho que interesa a la especie para su mantenimiento). El sistema inmunitario no está diseñado evolutivamente para mantener mucho tiempo su función defensiva, especialmente en individuos de algunas especies como la humana que ha aumentado tanto su esperanza de vida media. Esta teoría evolutiva de la inmunosenescencia (135) nos explica por qué la inmunidad adquirida, más especializada y sofisticada y más reciente en términos evolutivos, sea la que sufre el mayor deterioro con el envejecimiento, mientras la inmunidad innata, más antigua y menos específica sea la que mejor se preserva e incluso se estimula excesivamente, en algunos de sus aspectos, al envejecer. Al igual que pasa con la utilización del oxígeno, que nos permite vivir con gran actividad pero que tiene la contrapartida de generar oxidación, un activo sistema inmunitario está diseñado para defendernos mejor de las infecciones y tumores a los que estamos sometidos continuamente, pero después hay que pagar las consecuencias de esa activación y la misma, si no se encuentra bien controlada o no hay una buena adaptación del individuo, participa acelerando el proceso de envejecimiento.

De este modo, no puede aceptarse «la teoría inmunitaria» tal cual fue emitida en los años ochenta (136), ya que la misma proponía como base del envejecimiento el deterioro del sistema defensivo y esta idea no se acoge al principio de universalidad, al no disponer todos los animales de sistemas inmunitarios similares al que muestran los mamíferos. Sin embargo, sí parece que este sistema pueda jugar un papel trascendente en la oxidación que subyace al envejecimiento. Además, en ese proceso parecen estar más implicadas las células inmunitarias con mayor capacidad de producción de oxidantes y compuestos inflamatorios como son las de la inmunidad innata, las fagocíticas, las cuales sí se encuentra presentes en todos los animales.

Agradecimientos

La autora quiere agradecer la financiación recibida para llevar a cabo gran parte de los experimentos cuyos resultados se recogen en este capítulo, y de forma especial al reciente proyecto concedido por el Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2005-06777). También quiere expresar su agradecimiento a los doctores: C. Vallejo, S. Medina, VM. Victor, N. Guayerbas, M. Puerto, P. Alonso, C. Alvarado y P. Alvarez, así como a L. Arranz e I. Baeza, por sus aportaciones experimentales (algunas recogidas en las figuras de este capítulo), sin las cuales no se hubiese podido sustentar los comentarios expuestos.

BIBLIOGRAFÍA

1. De la Fuente M (2005) La gerontología en España. En «El Estado de España». Ed: Real Academia de Doctores de España. Borelia Asesores Editoriales SL. Barcelona. Pgs: 714-731.
2. Shock NW(1970) Physiological aspects of aging. *J Am Diet Assoc* **56**,191-496.
3. Strehler BL (1977) Time, cells and aging. Academic press. New York.
4. Medvedev ZA (1990) An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev.* **65**, 375-398.
5. Hayflick L. (1980) Recent advances in the cell biology of aging. *Mech Ageing Dev* **14**, 59-79.
6. Hayflick L (1985) Theories of biological of aging. *Exp Gerontol* **20**, 145-159.
7. Strehler BL (2000) Understanding aging. En Barnett YA, Barnett CR (eds): Aging methods and protocols. Totowa, New Jersey; Human Press; Pgs: 1-19.
8. Miquel J (1990) Envejecimiento celular: Teorías y datos experimentales. En Hayflick L, Barcia D, Miquel J (eds). Aspectos actuales del envejecimiento normal y patológico. ELA . Madrid. Pgs: 49-59.
9. Olovnikov AM (1971) Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR* **201**, 1496-1499.
10. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichsteiner S y Wright WE. (1998) Extension of life span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **79**, 349-52.
11. Goyns MH (2002) Genes, telomeres and mammalian ageing. *Mech Ageing Dev* **123**,791-799.
12. Benito M (2003) Senescencia replicativa y Telomerasa. En: Cascales, M, Cabezas JA, García-Barreno P (eds): Bioquímica y Fisiopatología del envejecimiento. Instituto de España. Madrid. Pgs: 91-101.
13. Carlson JC y Riley JCM (1998) A consideration of some notable aging theories. *Exp Gerontol.* **33**, 127-134.
14. Hekimi S, Burgess J, Bussiere F, Meng Y y Benard C (2001) Molecular genetics of life span in *Caenorhabditis elegans*: molecular diversity, physiological complexity, mechanistic simplicity. *Trends Genet.***17**, 712-718.
15. Vijg J (1999) Profiling aging by gene arrays. *Mech Ageing Dev* **112**, 1-4.
16. Martín GM. (2002) Keynote: mechanisms of senescence-complicationists versus simplificationists. *Mech Ageing Dev* **123**, 65-73.
17. Bernard C y Hekimi S (2002) Long-lived mutants, the rate of aging, telomeres and the germline in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* **123**, 869-880.

18. Pearl R (1928) The rate of living. London: University of London Oress; P.50.
19. McCay CM, Crolwell M y Maynard L (1935) The effect of retarded growth upon the length of the life span and ultimate body size. *J Nutr* **10**, 63-79.
20. Weindruch R (2003) Caloric restriction: life span extensión and retardation of brain aging. *Clin Neurosci Res* **2**, 279-284.
21. Gerschman R (1962) Man ´s dependence on the earthly atmosphere. En Schaeffer KS (ed) Proc 1st Symp Submarine and Space Medicine. MacMillan: New York; Pgs: 475.
22. Harman D (1956) A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298-300.
23. Harman D (1972) The biological clock. The mitochondria? *J Am Geriatr Soc* **20**, 99-117.
24. Miquel J (1991) An integrate theory of aging as the result of mitochondrial DNA mutation in differentiated cells. *Arch Gerontol Geriatr* **12**, 99-117.
25. Barja G (2002) Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity. *Free Rad Biol Med* **33**, 1167-1172.
26. Barja G y Herrero A (2000) Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span inthe heart and brain of mammals. *FASEB J* **14**, 312-318.
27. Pamplona R, Barja G y Portero-ortín M (2002) Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation. *Ann N Y Acad Sci* **959**, 475-490.
28. Vijg J y Muller WEG (2000) The science of aging and the need for a mechanistic approach. *Mech Ageing Dev* **114**, 1-3.
29. Finkel T (2003) Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Biol* **15**, 247-254.
30. Dani SU (1997) The metabolic basis of encephalization prolonged life span, and the evolution of longevity. En S.U. Dani, A Hori y G.F. Walter (eds). Principles of neural aging. Elsevier, Amsterdam.
31. Austad SN (1997) Comparative aging and life histories in mammals. *Exp Gerontol* **32**, 23-38.
32. Williams GC (1957) Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution* **2**, 397-411.
33. Minot CS (1907) The problem of age, growth and age. *Pop Sci Monthly* **71**, 509-527.
34. Klarsfeld A y Revah F (2004) The biology of death. Origins of mortality. Cornell University Press, New York.

35. Kirkwood TBL y Holliday R (1979) The evolution of aging and longevity. *Proc R Soc London Ser B*: 531-446.
36. Medina JJ (2003) *El reloj de la edad*. Crítica. Barcelona.
37. McFarland RA (1953) *Human factors in air transportation: occupational health and safety*. McGraw-Hill, New York.
38. Confort A (1969) *Lancet* Dec **27**, 1411.
39. Borkan A y Norris AH (1980) Assessment of biological age using a profile of physiological parameters. *J Gerontol* **35**, 177-184.
40. Miquel J (2003) Determinación de edad biológica. *Medicina Antienvjecimiento* **1**, 24-28.
41. Besedovsky H, Sorkin E, Séller M y Muller J (1975) Changes in blood hormone levels during the immune response. *Proc Soc Exp Biol. Med* **150**, 466-470.
42. Besedovsky H y Del Rey A (1996) Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrin Rev* **17**, 64-102.
43. Ader R, Felten DL y Cohen N. (2001) *Psychoneuroimmunology*. Academic Press. San Diego.
44. Blalock JE (2005) The immune system as the sixth sense. *J Intern Med* **257**, 126-138.
45. Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ y Goodwin JS (1990) Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol* **45**, M45-48.
46. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, Caruso C, Franceschi C, Fulop T, Gupta S, Mariani E, Mocchegiani E y Solana R (2002) T cells and aging. *Front Biosci* **1**;7: D1056-183.
47. Taub DD y Longo DL (2005) Insights into thymic aging and regeneration *Immunol Rev* **205**, 72-93.
48. Romanyukha AA y Yashin AI (2003) Age related changes in population of peripheral T cells: towards a model of immunosenescence. *Mech Ageing Dev* **124**, 433-443.
49. Zanni F, Vescovini R, Biasini C, Fagnoni F, Zanlari L, Telera A, Di Pede P, Passeri G, Pedrazzoni M, Passeri M, Franceschi C y Sansón P (2003) Marked increase with age of type 1 cytokines within memory and effector/cytotoxic CD8+ T cells in humans: a contribution to understand the relationship between inflammation and immunosenescence. *Exp gerontol* **38**, 981-987.
50. Allman D y Miller JP (2005) B cell development and receptor diversity during aging. *Curr Opin Immunol* **17**, 463-467.
51. Weksler ME (2000) Changes in B cell repertoire with age. *Vaccine* **18**, 1624-1628.

52. Colonna-Romano G, Bulati M, Aquino A, Scialabba G, Candore G, Lio D, Motta M, Malaguarnera M y Caruso C (2003) B cells in the aged: CD27, CD5 and CD40 expression. *Mech Ageing Dev* **124**, 389-393.
53. Morrison SJ, Wandycz AM, Akashi K, Globerson A y Weissman IL (1996) The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med* **2**, 1011-1016.
54. Herrero C, Sebastián C, Marques L et al (2002) Immunosenescence of macrophages: reduced MHC class II gene expresión. *Exp Gerontol* **37**, 389-394.
55. Solana R, Villanueva, JL, Peña, J y De la Fuente M (1991) Cell mediated immunity ageing. *Comp Biochem Physiol* **99 A**, 1-4.
56. Solana R y Mariani E (2000) NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine* **18**, 1613-1620.
57. Puerto M, Guayerbas N, Alvarez P y De la Fuente M (2005) Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol* **165** (1-2), 33-40.
58. De la Fuente M (1998) Las defensas contra la infección, inmunidad y envejecimiento. En *El Problema del Envejecimiento*. En G. Barja. (ed.) Editorial AKAL. Madrid. Pgs: 61-89.
59. De la Fuente M (2002) Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr* **56**, S5-S8.
60. De la Fuente M (2003) Inmunosenescencia. En: Cascales, M, Cabezas JA, García-Barreno P (eds): *Bioquímica y Fisiopatología del envejecimiento*. Instituto de España. Madrid. Pgs: 133-168.
61. Vasto S y Caruso C (2004) Immunity and ageing: a new journal looking at ageing from an immunological point of view. *Immun Ageing* **1**, 1-4.
62. De Martínis M, Modesti M, Loreto MF, Quaglino D y Ginaldi I (2000) Adhesión molecules on peripheral blood lymphocytes subpopulations in the elderly. *Life Sci* **68**, 139-151.
63. Malaguarnera I, Ferlito L, Imbesi RM, Gulizia GS, Di Mauro S, Maugeri D, Malaguarnera M y Messina A (2001) Immunosenescence: a review. *Arch Gerontol Geriatr* **32**, 1-14.
64. Song H, Price PW y Cerny J (1997) Age-related changes in antibody repertory contribution from T cells. *Immunol Rev* **160**, 55-62.
65. Frasca D, Nguyen D, Riley RL y Blomberg BB (2003) Effects of aging on proliferation and E47transcription factor activity induced by different stimuli in murine splenic B cells. *Mech Ageing Dev* **124**, 361-369.
66. De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Alvarez P y Alvarado C (2004) Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. *Cell Mol Biol* **50**, OL-683-690.

67. De la Fuente M, Hernanz A y Vallejo MC (2005) The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension. Favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxidants & Redox Signals* **7** (9&10), 1356-1366.
68. Lord JM, Butcher S, Killampali V, Lascelles D y Salmon M (2001) Neutrophil ageing and immunosenescence. *Mech Ageing Dev* **122**, 1521-35.
69. Stout RD y Suttles J (2005) Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation by age-associated microenvironmental changes. *Immunol Rev* **205**, 60-71.
70. Kohut ML, Senchina DS, Madden KS, Felten DL y Moynihan JA (2004) Age effects on macrophage function vary by tissue site, nature of stimulant, and exercise behavior. *Exp Gerontol* **39**, 1347-1360.
71. De la Fuente M (1985) Changes in the macrophage function with aging. *Comp Biochem Physiol* **81 A**, 935-938.
72. Ginaldi L, De Marinis M, D'Osilio A, Marini L, Loreto MF y Quaglino D (1999) The immune system in the elderly. III Innate immunity. *Immunol Res* **20**, 117-126.
73. De la Fuente M, Del Rio M y Medina S (2001) Changes with aging in the modulation by neuropeptide Y of murine peritoneal macrophage functions. *J Neuroimmunol* **116**, 156-167.
74. De la Fuente M y Medina S (2005) NPY and phagocytic cell functions. En: The NPY Family of Peptides in Immune Disorders, Inflammation, Angiogenesis and Cancer. Zukowska, Z and Feuerstein, G. Z. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland. 107-122.
75. Albright JW, Bream JH, Bere EW, Young HA, Winkler-Pickett R y Ortaldo JR (2004) Aging of innate immunity: functional comparisons of NK/LAK cells obtained from bulk cultures of young and aged mouse spleen cells in high concentrations of interleukin-2 *Exp Gerontol* **39**, 73-82.
76. Tarazona R, Solana R, Ouyang Q y Pawelec G (2002) Basic biology and clinical. Impact of immunosenescence *Exp Gerontol* **37**, 183-189.
77. Mariani E, Sgobbi S, Meneghetti A, Tadolini M, Tarozzi A, Sinoppi M, Cattini L y Facchini A (1996) Perforins in human cytolytic cells: the effect of age. *Mech Ageing Dev* **92**, 195-209.
78. Mariani E, Meneghetti A, Neri S, Ravaglia G, Forti P, Cattini L y Facchini A (2002) Chemokine production by natural killer cells from nonagenarians *Eur J Immunol* **32**, 1524-1529.
79. De la Fuente M, Baeza I, Guayerbas N, Puerto M, Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C y F-Tresguerres JA (2004) Changes with aging in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontol* **5** (6), 389-400.

80. Caruso C, Lio D, Cavallone L y Franceschi C (2004) Aging, longevity, inflammation and cancer. *Ann N Y Acad Sci* **1028**, 1-13.
81. Gangemi S, Basile G, Monti D, Merendino RA, Di Pasquale G, Bisignano U, Nicita-Mauro V y Francheschi C (2005) Age-related modifications in circulating IL-15 levels in humans. *Mediators Inflamm* **2005**, 245-247.
82. Guayerbas N, Catalan M, Victor VM, Miquel J y De la Fuente M (2002) Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav Brain Res* **134**, 41-48.
83. Guayerbas N, Puerto M, Victor VM, Miquel J y De la Fuente M (2002) Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol* **37**, 249-256.
84. Guayerbas N y De la Fuente M (2003) An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely-aging mice. *Develop Comp Immunol* **27**, 339-350.
85. Viveros MP, Fernandez B, Guayerbas N y De la Fuente M (2001) Behavioral characterization of a mouse model of premature immunosenescence. *J Neuroimmunol* **114**, 80-88.
86. De la Fuente M, Hernanz A, Medina S, Guayerbas N, Fernandez B y Viveros MP (2003) Characterization of monoaminergic systems in brain regions of prematurely ageing mice. *Neurochem Int* **43**, 165-172.
87. Franceschi C, Monti D, Sansoni P y Cossarizza A (1995) The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today* **16**, 12-16.
88. Franceschi C y Bonafe M (2003) Centenarians as a model of healthy aging. *Biochem Soc Transact* **31**, 457-461.
89. Bagnara GP, Bonsi L, Strippoli P, Bonifazi F, Tonelli R y D'Addato S (2000) Hemopoiesis in healthy old people and centenarians: well-maintained responsiveness of CD34+ cells to hemopoietic growth factors and remodeling of cytokine network. *J Gerontol* **55**, B61-66.
90. Colonna-Romano G, Potestio M, Aquino A, Candore G, Lio D y Caruso C (2002) Gamma/delta T lymphocytes are affected in the elderly. *Exp Gerontol* **37**, 205-11.
91. Bonafe M, Barbi C, Storci G *et al.* (2002) What studies on human longevity tell us about the risk for cancer in the oldest old: data and hypotheses on the genetics and immunology of centenarians. *Exp Gerontol* **37**, 1263-1271.
92. Miyaji C, Watanabe H, Toma H *et al.* (2000) Functional alteration of granulocytes, NK cells, and natural killer T cells in centenarians. *Hum Immunol* **61**, 908-916.
93. Sansoni P, Fagnoni F, Vescovini R, *et al.* (1997) T lymphocyte proliferative capability to defined stimuli and costimulatory CD28 pathway is not impaired in healthy centenarians. *Mech Ageing Dev* **96**, 127-136.

94. Alonso P (2006) Estudio del perfil inmunológico en individuos centenarios. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
95. Cascales M (1999) Extrés oxidativo. Envejecimiento y enfermedad. Instituto de España. Madrid.
96. Knight JA (2000) Review: Free Radicals, Antioxidants, and Immune System. *Ann Clin Lab Sci* **30**, 145-158.
97. Meydani S N, Wu D, Santos MS y Hayek MG (1995) Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am J Clin Nutr* **62**, 1462S-76S.
98. Sies H (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem* **25**, 1058-1071.
99. Halliwell B (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end. *Free Rad Res* **31**, 261-272.
100. Grimble RF (2003) Inflammatory response in the elderly. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **6**, 21-29.
101. Alvarado C, Alvarez P, Jimenez L y De la Fuente M (2006) Oxidative stress in leukocytes from young prematurely aging mice is reversed by antioxidant-mixture dietary supplementation. *Develop Comp Immunol* En prensa.
102. Alvarado C, Alvarez P, Puerto M, Gausserés N, Jimenez L y De la Fuente M (2006) Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely-ageing mice. *Nutrition* En prensa.
103. Victor VM y De la Fuente M (2000) Comparative study of peritoneal macrophage functions in mice receiving lethal and non-lethal doses of LPS. *J Endotox Research* **6**, 235-241.
104. Victor VM y De la Fuente M (2003) Changes in the superoxide production and other macrophage functions could be related with the mortality of mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Physiol Res* **52**, 101-110.
105. Victor VM y De la Fuente M (2003) Immune cells redox state from mice with endotoxin-induced oxidative stress. Involvement of NF-kB. *Free Rad Res* **37**, 19-27.
106. Franceschi C, Bonafe M y Valensin S (2000) Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine* **18**, 1717-1720.
107. De la Fuente M (2002) La nutrición y el sistema inmunitario en el envejecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol* **37**, 17-25.
108. De la Fuente M (2000) Papel de los antioxidantes en la nutrición del anciano. *Rev Esp Geriatr Gerontol* **35**, 63-71.

109. Del Rio M, Ruedas G, Medina S, Victor VM y De la Fuente M (1998) Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro. *Life Sci* **63**, 871-81.
110. Blanco B, Ferrandez MD, Correa R, Del aRio M, Guaza C, Herranz A y De la Fuente M (1999) Changes in several functions of murine peritoneal macrophages by N-acetylcysteine and thioproline ingestion. Comparative effect between two strains of mice. *BioFactors* **10**, 179-185.
111. De la Fuente M, Carazo M, Correa R y Del Rio M (2000) Changes in macrophage and lymphocyte functions in guinea-pigs after different amounts of vitamin E ingestion. *Brit J Nutr* **84**, 25-29.
112. Pomaki M, Mota MJ, De la Fuente M y Berger J (2005) Effect of thiolic antioxidants on in vitro mouse peritoneal macrophage functions. *Comp Clin Path* **13**, 176-181.
113. De la Fuente M, Ferrández MD, Burgos MS, Soler A, Prieto A y Miquel J (1998) Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E. *Can J Physiol Pharmacol* **76**, 373-380.
114. De la Fuente M, Ferrández MD, Del Rio M, Burgos MS y Miquel J (1998) Enhancement of leukocyte functions in aged mice supplemented with the antioxidant thioproline. *Mech Ageing Develop* **104**, 213-225, 1998. A.
115. De la Fuente M, Guayerbas N, Catalán MP, Victor VM y Miquel J (2002) The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve the immune functions is higher in aged than in adult mice. *Free Rad Res* **36**, 119-126.
116. Puerto M, Guayerbas N, Victor VM y De la Fuente M (2002) Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. *Pharmacol Biochem Behavior* **73**, 797-804.
117. Guayerbas N, Puerto M, Ferrandez MD y De la Fuente M (2002) A diet supplemented with thiolic antioxidants improves leukocyte function in two strains of prematurely ageing mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**, 1009-1014.
118. Guayerbas N, Puerto M, Alvarez P y De la Fuente M (2004) Improvement of the macrophage functions in premature ageing mice by a diet supplemented with thiolic antioxidants. *Cell Mol Biol* **50**, OL677-OL681.
119. Guayerbas N, Puerto M, Alvarado C y De la Fuente M (2005) Effect of diet supplementation with N-acetylcysteine on leukocyte functions in prematurely ageing mice. *J Appl Biomed* **3**, 199-205.
120. Alvarado C, Alvarez P, Jimenez L y De la Fuente M (2005) Improvement of leukocyte functions in young prematurely aging mice after a 5-week ingestion of a diet supplemented with biscuits enriched in antioxidants. *Antioxidants & Redox Signals* **7** (9&10), 1203-1210.

121. Guayerbas N (2003) Cambios con la edad en la función inmune en un modelo murino de envejecimiento prematuro. Efecto de los antioxidantes. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
122. Alvarado C (2006) Efecto de la ingestión de una dieta enriquecida en antioxidantes sobre el estado funcional y de esters oxidativo de leucocitos peritoneales de ratón. Cambios con la edad y en respuesta a un proceso infeccioso. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
123. Victor VM, Rocha M y De la Fuente M (2003) N-acetylcysteine protects mice from lethal endotoxemia by regulating the redox state of immune cells. *Free Rad Res* **37**, 919-929.
124. Victor VM, Rocha M, Esplugues JV y De la Fuente M (2005) Role of free radicals in sepsis: Antioxidant therapy. *Curr Pharm Des* **11**, 3141-3158.
125. De la Fuente M y Victor VM (2000) Antioxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol* **78**, 49-54.
126. Guayerbas N, Puerto M, Herranz A, Miquel J y De la Fuente M (2005) Thiolic antioxidant supplementation of the diet reverses age-related behavioral dysfunction in prematurely ageing mice. *Pharmacol Biochem Behav* **80**, 45-51.
127. Weindruch R, Walford RL, Fligiel S, Guthrie D (1986) The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J Nutr* **116**, 641-654.
128. Pahlavani MA (2000) Caloric restriction and immunosenescence: a current perspective. *Front Biosci* **5**, D580-587.
129. Ferrández MD y De la Fuente M (1999) Effects of age, sex and physical exercise on phagocytic process of murine peritoneal macrophages». *Acta Physiol Scand* **166**, 47-53.
130. Vallejo C, Sanchez C, Medina S y De la Fuente M (2000) Influencia de la actividad física de fuerza en la respuesta inmune de ancianas y ancianos sedentarios y en los que practican natación. *Rev Esp Geriatr Gerontol* **35**, 32-33.
131. Vallejo C (2001) Evaluación de la influencia de programas de actividad física sobre el sistema inmunitario en los ancianos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
132. De la Fuente M (2002) Sistema inmunológico y deporte. *Selección* **11**, 125-134.
133. Medina S, Del Rio M, Herranz A y De la Fuente M (2000) Age-related changes in the neuropeptide Y effects on murine lymphoproliferation and interleukin-2 production. *Peptides* **21**, 1403-1409.
134. Borrás C, Sastre J, García-Sal D, Lloret A, Pallardo FV y Viña J (2003) Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Rad Biol Med* **34**, 546-552.

135. Franceschi C, Valensin S, Fagnoni F, Barbi C y Bonafe M (1999) Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. *Exp Gerontol* **34**, 911-921.
136. Makinodan T y Kay MMB (1980) Age influence on the immune system. *Adv Immunol* **29**, 287-331.

Interferones y vacunas como control de enfermedades prevalentes

MARIANO ESTEBAN RODRÍGUEZ

INTRODUCCIÓN

El nuevo milenio se inicia con una población superior a los 6.000 millones de personas en nuestro planeta y con unas necesidades claras en educación, salud, alimentación, medio ambiente e infraestructuras. Aunque ha habido una mejora sustancial en la calidad de vida de los ciudadanos, debido fundamentalmente al papel que ha jugado la ciencia, sin embargo, esta distribución ha sido desigual entre países. Los avances espectaculares en los últimos cincuenta años en genética, con la secuenciación del genoma humano en el año 2001 y su anotación final en 2003, en informática con el aumento de las comunicaciones por Internet, los superordenadores como el *Mare Nostrum*, y enormes bases de datos, nos están asegurando avances espectaculares por la aplicación de la ciencia al bienestar social. Estos avances, en las áreas de salud, agricultura y medioambiente, tienen un gran impacto mundial. Es indudable que estamos abordando en profundidad y a nivel molecular las causas de las enfermedades infecciosas, trastornos cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, alteraciones genéticas y cáncer, que permitirán una mejor calidad de vida. Hoy se habla que se podrá realizar una medicina más dirigida, al conocer los genes que influyen en un determinado proceso patológico y su respuesta al tratamiento con fármacos. La tecnología de «biochips» se está ya utilizando para determinar la correlación entre expresión de genes y patología de distintas enfermedades, identificándose los genes responsables, así como los que determinan resistencias a fármacos en humanos. El concepto de medicación «a la carta» o personalizada, se implementará en los hospitales y habrá un resurgir de la industria farmacéutica dedicada a

cubrir esta demanda social. La producción de medicamentos por métodos biotecnológicos está sustituyendo a los procedimientos tradicionales, por ser más seguros y económicos. En pocos años se podrá disponer de un arsenal terapéutico amplio y con mayor especificidad. La capacidad de transferir genes de unas especies a otras posibilita la modificación de microorganismos, plantas y animales con fines beneficios. El conocimiento de los mecanismos de diferenciación celular hace posible que partiendo de células totipotentes de un individuo se puedan regenerar tejidos y órganos dañados y así repararlos, evitando el rechazo que se produce en transplantes. La utilización de células madre con fines terapéuticos tendrá sus beneficios a largo plazo.

Pero, a medida que se avanza en conocimientos científicos nos enfrentamos a grandes retos: el control de enfermedades con una amplia distribución global como el SIDA, malaria, tuberculosis, hepatitis C, o de pandemias como las producidas anualmente por la gripe o las que se pronostican en un futuro próximo, como la gripe aviar o el síndrome respiratorio agudo grave (SARS). Es de todos conocidos que la inmunización es el método más eficiente y económico de intervención. Así, se ha conseguido erradicar la viruela y reducir la incidencia de polio en un 99%, consiguiendo además reducciones espectaculares en enfermedades como difteria, tétanos, tosferina, paperas y sarampión. La Organización Mundial de la Salud (OMS) lleva a cabo un programa de vacunación masivo contra un buen número de enfermedades para las cuales existen vacunas, y su objetivo es que en 2010 la vacunación alcance al 90% de la población y evitando así los más de 2.5 millones de muertes anuales de niños con edad inferior a los cinco años por enfermedades que se pueden prevenir con las vacunas actuales. Aún así, hoy en día se estima que hay más de 27 millones de niños y 40 millones de mujeres embarazadas que no han sido vacunados. El reto de la OMS es, además, poder controlar enfermedades para las que no tenemos vacunas eficaces, como las mencionadas anteriormente.

Se considera que las enfermedades infecciosas son la tercera causa de mortalidad en la población, mientras que el cáncer es la segunda y las enfermedades cardiovasculares la primera. La necesidad de luchar contra estas enfermedades que afectan a una gran parte de la población mundial ha sido reconocida por la Unión Europea que en su VI Programa Marco priorizó ayudas a la investigación dirigidas a desarrollar estrategias de control contra las mismas; esta prioridad continúa en el VII Programa Marco que se inicia en 2007. También, el Plan Nacional español en el Programa de Biotecnología consideró como objetivo científico-técnico prioritario el diseño de nuevas vacunas, tanto preventi-

vas como terapéuticas, para luchar contra las enfermedades de mayor impacto sanitario. Que la línea temática de vacunas sea prioritaria lo refleja el hecho de que los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos de América y la Fundación de Bill y Melinda Gates financien fuertemente la investigación en vacunas contra enfermedades prevalentes como el SIDA, malaria y tuberculosis. Esta necesidad ha sido reconocida por el grupo G-8, con representación de los países mas poderosos de nuestro planeta

Como Miembro del Grupo de Expertos (SAGE) que asesora a la OMS en su programa de vacunas y agentes biológicos, he considerado oportuno referirme al control de enfermedades prevalentes con gran incidencia en la población, basado en la utilización de agentes biológicos y vacunas como mecanismos de defensa. Como modelo de agente biológico describiré a los interferones por su capacidad para actuar como primera línea de defensa del organismo (respuesta innata), para describir posteriormente las vacunas (respuesta adquirida) y cómo podemos hacerlas mas eficaces, dirigiendo de forma selectiva la respuesta inmune del organismo contra procesos infecciosos y tumorales. Es posible que seamos capaces de manipular nuestro sistema inmune mediante el uso de interferones y vacunas, y así obtener mayores efectos en el tratamiento de infecciones y tumores.

ENFERMEDADES PREVALENTES EN EL SIGLO XXI

Desde que en 1798 Edward Jenner desarrollara la primera vacuna contra la viruela, el éxito de la vacunación se ha visto reflejado en que se han podido controlar muchas de las enfermedades infecciosas que producían gran mortandad en la población, especialmente en niños. La única enfermedad que se considera erradicada ha sido la viruela. A pesar de los avances espectaculares aportados por las nuevas tecnologías de la genómica, proteómica y bioinformática y la elucidación del genoma humano (1, 2) y el de otros muchos microorganismos, en el inicio del siglo XXI nos encontramos con grandes enfermedades para las cuales no hay procedimientos eficaces de control. El impacto de estas enfermedades a nivel mundial es muy grande, causando altas tasas de mortandad. Consideremos algunos ejemplos de enfermedades prevalentes. Así, una de cada cinco personas de los 6.000 millones de la población global están expuestas a malaria, con una tasa de infección anual de unos 300 millones de personas infectadas, de las cuales entre 1,5-3 millones mueren, siendo los menores de cinco años los mas afectados (3). La leishmaniosis es un grupo de enfermedades parasitarias causadas por varias especies del género *Leishmania*. La OMS ha estimado que unos 12 millones de personas estan infectadas, y que cerca de 300

millones de personas tienen el riesgo de contraer la infección (4), con una incidencia anual de 1,5 a 2 millones de nuevos casos de leishmaniosis cutánea y 500.000 nuevos casos de leishmaniosis visceral (5). Esta parasitosis es zoonótica en los países mediterráneos, donde el perro doméstico es el reservorio principal. La especie endémica en el mediterráneo es *L. infantum*, que infecta tanto humanos como perros, causando lesiones cutáneas y viscerales. Los estudios epidemiológicos indican que en áreas endémicas estables, como en el caso de España, hasta el 48% de los perros están infectados (6-8), el 50% de los cuales evoluciona hacia leishmaniosis visceral (9, 10). La OMS ha estimado que entre el 2 al 9% de todos los pacientes con SIDA en el sur de Europa desarrollarán leishmaniosis visceral por *L. infantum*, siendo esta enfermedad parasitaria la más prevalente entre la población VIH-positiva (11). En la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM), existe una gran incidencia de leishmaniosis siendo el perro doméstico el reservorio natural de la infección por *L. infantum*. En el caso del SIDA, en el año 2006 la pandemia causó más de 3 millones de defunciones, estimándose en 5 millones las personas que contrajeron el virus a lo largo del año, lo que eleva a más de 42 millones el número de personas infectadas en todo el mundo, habiendo producido la muerte a más de 22 millones de personas desde que se identificó el origen de la pandemia. Las diferencias geográficas y económicas de esta enfermedad son evidentes, donde más del 95% de los casos y 95% de las muertes por SIDA ocurren en el tercer mundo (70% en África), sobre todo entre jóvenes adultos, con un incremento progresivo entre las mujeres (OMS, 2006). Es dramático contemplar cómo en África, región sub-sahariana, la epidemia sigue extendiéndose y que en muchos países los porcentajes de personas infectadas y con SIDA son muy elevados, lo que tiene efectos devastadores para las familias y para la economía productiva (12, 13). España continúa siendo el país con mayor número de personas infectadas por el VIH de la UE, alrededor de 1.500.000 personas. La hepatitis C es otro ejemplo de enfermedad infecciosa que afecta a unos 300 millones de personas de forma crónica y cuya tasa de infección es bastante elevada, con un 1-3% de las personas seropositivas en Europa (14, 15). En el caso de la tuberculosis, se considera que es una de las infecciones que más muertes produce, 2-3 millones por año, debido a que ha aumentado su virulencia por resistencia a los antibióticos y co-infección con el VIH (13). En el caso del cáncer y considerando la población de EE.UU, unas 500.000 personas mueren anualmente, más de 1.500 por día, con unos 5 millones de defunciones desde el año 1990 (16). La predicción es que para el año 2005 se produzcan cerca de 13 millones de muertes por cáncer. Por todo ello, la OMS considera prioritario el desarrollar vacunas profilácticas y/o terapéuticas contra todas estas grandes enfermedades.

Para llevar a cabo el desarrollo de una vacuna es necesario conocer los mecanismos de defensa del organismo frente al patógeno o célula tumoral, conocer la biología del patógeno, identificar los antígenos involucrados en la inducción de una respuesta inmune específica, disponer de modelos experimentales en los que se pueda ensayar la eficacia de la vacunación, así como implementar ensayos clínicos para determinar la seguridad y eficacia de la vacunación.

DEFENSA FRENTE INFECCIONES VIRALES: RESPUESTA INMUNE INNATA Y ADQUIRIDA

Vivimos en un mundo rodeado de un ingente ejército de agentes infecciosos. El número de partículas infectivas a las que estamos expuestos es enorme. El organismo dispone de una serie de barreras que nos protegen contra las infecciones. Una de ellas es física, como la piel que es el órgano mas grande del cuerpo que pesa más de 5 Kg en un adulto, otras son las mucosas, secreciones, enzimas en las lágrimas, pH ácido estomacal, reflejo de la tos. Sin embargo, cuando se sobrepasan las barreras físicas entra en acción el poderoso sistema immune. Uno de sus más apreciados atributos es su capacidad para reconocer y destruir a las células infectadas en el conjunto de células sin infectar. Esto no es sorprendente ya que las personas inmunocomprometidas son muy vulnerables a procesos infecciosos. Los procesos críticos de defensa immune son: reconocimiento del patógeno, amplificación de la respuesta y control del patógeno. Una infección viral debe de ser reconocida inmediatamente, activar las defensas y controlar la infección.

La respuesta immune contra infecciones virales consiste en la defensa innata (no específica) y la adquirida (específica). La respuesta innata es la primera línea de defensa immune, funcionando continuamente en el organismo, sin previo ataque por un virus invasor. Este sistema no es específico ya que responde esencialmente frente a cualquier intruso. La defensa innata está codificada por genes de la línea germinal que han surgido en la evolución de organismos multicelulares y son esenciales en la supervivencia de la especie humana. Sabemos que la defensa innata es la que dicta la conducta de la respuesta immune adquirida. ¿Como se activa la repuesta innata? Conocemos una serie de características bioquímicas comunes o inducidas por el mundo microbiano, como los receptores semejantes a Toll (TLRs: *Toll-like receptors*) que reconocen al lipopolisacárido bacteriano (LPS), motivos CpG, RNA bicatenario (dsRNA) y a otros patrones moleculares asociados a patógenos (PAPMs: *Pathogen Associated Molecular Patterns*). Se conocen mas de 10 miembros de la familia de los TLR. Los eventos moleculares intracelulares iniciados por la interacción en-

tre TLRs y sus PAPMs específicos desencadenan la respuesta inflamatoria (17, 18). Como resultado de la señalización por los TLRs se secretan citoquinas como los interferones del tipo I (alfa y beta). La respuesta innata a infecciones virales se compone: de potentes activadores proteicos llamados interferones, que inducen un estado antiviral en las células infectadas; una colección compleja de proteínas del suero llamadas complemento, que una vez activadas destruyen células infectadas, partículas virales y otros microorganismos; y los linfocitos citotóxicos, llamados células asesinas (NK) que reconocen y destruyen células infectadas. Los macrófagos y neutrófilos juegan también un papel importante en la respuesta innata.

La respuesta inmune adquirida o respuesta humoral o respuesta celular consiste en la producción de anticuerpos y está mediada por los linfocitos. Este sistema se denomina respuesta adquirida o de adaptación, porque no solamente diferencia lo propio de lo infectado, sino que también va dirigido hacia el invasor, de forma que una combinación de moléculas solubles (anticuerpos y citoquinas), junto con linfocitos participan en la acción antiviral. Los linfocitos B se producen en la médula ósea mientras que los linfocitos T se producen en el timo, migrando ambos a los órganos linfoides secundarios (bazo y nódulos linfáticos) donde tiene lugar la respuesta inmune.

Las células T reconocen al antígeno a través de sus receptores de membrana TCR (*T cell receptor*). El antígeno es degradado y procesado por las células presentadoras del antígeno a través de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Existen dos subpoblaciones principales de linfocitos, CD4+ y CD8+. Las células CD8+ reconocen a los antígenos de células infectadas con virus o a las tumorales, destruyéndolas mediante la liberación de proteínas que forman poros en la célula diana y la inducción de factores que inducen apoptosis (muerte celular programada). Los linfocitos CD4+ se activan al reconocer al antígeno expuesto en las células presentadoras, secretando citoquinas capaces de favorecer una reacción inflamatoria. Algo muy importante es que la respuesta inmune adquirida tiene memoria, de forma que cuando el sistema queda expuesto a nuevas invasiones del mismo patógeno, se desencadena una respuesta específica que normalmente elimina la infección poco después de producirse. Los receptores de la respuesta adquirida que reconocen patógenos han sido creados mediante reordenación genética durante la diferenciación de las células blancas de la sangre, llamados linfocitos.

Las repuestas innata y adquirida están interconectadas y coordinadas por mecanismos de señalización que les permite interactuar mutuamente. Existen una serie de células (linfocitos derivados de la médula, células T de ayuda Th, células B, NK, mononucleares, dendríticas, granulocitos, neutrófilos, entre otras) y de ci-

toquinas (interferones tipo I y II, TNF, TGF, IL-2,-3-4-5-6-7-10-12-15-18, entre otras), que definen tanto la respuesta innata como la adquirida. Estos marcadores de activación de la respuesta inmune se utilizan para diferenciar y definir el grado de respuesta inmune frente a una infección o en un proceso de vacunación.

Unas de las moléculas biológicas más activas en la defensa antiviral de la respuesta inmune innata son los interferones (IFN), que pertenecen a la familia de citoquinas, proteínas que regulan procesos esenciales de comunicación intracelular. Debido a la relevancia de estas citoquinas, a su interés clínico y a mi deseo por desentrañar los misterios de su modo de acción, algo que vengo investigando desde hace muchos años en proyectos científicos financiados por instituciones americanas y europeas, quisiera exponer algunas características de estas moléculas que han sido pioneras en el descubrimiento de moléculas biológicas con múltiples actividades (actividad antiviral, antitumoral y reguladores del sistema inmune), como motor en el desarrollo de la biotecnología moderna y llave que nos ha abierto la puerta a conocer las cascadas de señalización intracelular, desde su interacción con el receptor en la membrana celular al proceso de activación en el núcleo de genes específicos y su capacidad para controlar patógenos, regular el ciclo celular o la respuesta inmune.

LOS INTERFERONES COMO PRIMERA LÍNEA DE DEFENSA

Los interferones (IFNs) constituyen el ejemplo más representativo de productos biológicos sintetizados por el organismo en cantidades muy pequeñas, pero con propiedades importantes. Actúan en primera línea de defensa del organismo contra infecciones virales, parasitarias y tumores. Junto con los llamados *Toll-like receptors* (TLRs) descubiertos en estos últimos años, que son receptores de transmembrana de tipo I que reconocen moléculas conservadas de patógenos, constituyen la familia de receptores más importante para detectar la presencia e iniciar la defensa contra patógenos. Los TLR son capaces de inducir la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, primar la inmunidad adquirida e inducir IFN. El trabajo desarrollado con los IFNs, dado su interés sanitario, ha servido como ejemplo de la rentabilidad de la investigación básica que demuestra que los fundamentos de la investigación aplicada se basan en avances del conocimiento científico. Hoy en día, los IFNs son uno de los productos biotecnológicos más vendidos en el mundo. Ya en el año 1999, se fabricaron 3 kilogramos, valorados en 4.000 millones de dólares, para el tratamiento de cánceres, infecciones virales y enfermedades neurodegenerativas. La verdad es que los IFNs han sido el motor para que la industria farmacéutica se interesara por la biotecnología, con lo que ello ha su-

puesto de cambio en el concepto tradicional de escalado y purificación de productos biológicos. Han revolucionado además, la medicina hospitalaria, ya que al ser una de las primeras sustancias naturales obtenidas por ingeniería genética, su administración en pacientes ha permitido establecer procedimientos de control y seguimiento, así como de obtención de datos farmacológicos, posteriormente aplicados a otros productos biológicos obtenidos del organismo.

Pero, ¿que son los IFNs? La historia próxima de su noción comienza en 1957, con el descubrimiento de cierta sustancia protectora contra los virus por Alick Isaacs and Jean Lindeman, del Instituto Nacional de Investigaciones Médicas de Londres (NIMR) (19, 20). Como la mayoría de los descubrimientos, éste nació de observaciones rigurosas y de la intuición de los investigadores para percatarse de la importancia de sus observaciones. El experimento inicial fue sencillo. Incubaron células de embrión de pollo durante 24 horas en un medio de cultivo con virus de la gripe, previamente inactivado por radiaciones ultravioleta. Observaron que se liberaba de las células al medio de cultivo, cierto producto, que cuando se añadía a células frescas procedentes de embriones de pollo, impedía («interfería») la replicación de la estirpe salvaje y lítica del virus de la gripe. Es decir, las células así tratadas quedaban totalmente protegidas contra la infección por el virus gripal. Debido a que dicho principio activo «interfería» (impedía) la replicación vírica se le bautizó con el nombre de *interferón*. La comunidad científica internacional comenzó a interesarse por la nueva molécula. Se vio que su actividad biológica trascendía la función antivírica para ejercer también efectos antitumorales y reguladores del sistema inmune.

Con el tiempo se halló que no se trataba de una sola proteína. Había un conjunto de genes que codificaban distintos interferones (21, 22). Podemos reducirlos a dos clases principales: el interferón de tipo I (alfa y beta) y el de tipo II (gamma). El IFN de tipo I lo producen todo tipo de células, mayoritariamente los fibroblastos y células leucocitarias, en respuesta a infecciones víricas, inducidos por la síntesis de RNA bicatenario como intermediario en la replicación vírica. El IFN de tipo II lo fabrican los linfocitos Th1 y células NK en respuesta a mitógenos. Dentro del IFN de tipo I hay, a su vez, dos clases: el IFN- α , que procede de una familia multigénica de 12 subtipos, y el IFN- β , que está codificado por un solo gen. Los genes del tipo I se encuentran agrupados en el brazo corto del cromosoma 9. En el tipo II, el IFN- γ también está codificado por un solo gen, localizado en el cromosoma 12. Esta diversidad de IFN añade complejidad a sus acciones finales y a los mecanismos involucrados en esos procesos. Una vez producido, el IFN se libera de la célula actuando de forma autocrina y paracrina para estimular su receptor en la célula infectada y en las células adyacentes.

En los últimos años se ha elucidado el mecanismo de inducción de IFN por virus y RNA bicatenario (23-25). El RNA bicatenario, producto de la replicación viral, probablemente liberado al medio por lisis de células infectadas se une al TLR3 para estimular la transcripción de IFN del tipo I a través de la activación de los factores IRF3 e IRF7, así como por miembros de la familia de NF- κ B y AP1. Además, existen otras moléculas, identificadas recientemente como RIG (*retinoic acid-inducible gene*) y MDA5 (*melanoma differentiation associated gene 5*), que son helicasas con el dominio DexD/H, que al activarse por RNA bicatenario activan también la producción de IFN por la misma ruta de IRF3 (21). Sin lugar a dudas, la célula ha desarrollado una serie de mecanismos que responden a estrés causado por distintos agentes, como los virus, con la finalidad de estabilizarse hasta que el estrés haya desaparecido o si no para cometer suicidio en un intento de evitar la propagación del virus en el organismo. El entendimiento de los mecanismos moleculares por los que la célula decide su viabilidad o muerte por apoptosis es un tema de gran interés en biología.

Clonación de los interferones y el resurgir de la biotecnología

Durante la década de los años setenta emerge la nueva genética molecular, al obtenerse el primer DNA recombinante en 1972 por Paul Berg (Premio Nobel de Química en 1980), y al demostrar Herbert Boyer y Stanley Cohen en 1973 que las bacterias podían servir para fabricar proteínas de interés, como la insulina y la somatostatina. La aprobación del primer fármaco producido por ingeniería genética ocurre en 1980 y es la insulina humana, mientras que se aprueba la primera vacuna recombinante contra la hepatitis B en 1986. En 1980, el grupo de C. Weissmann, de Zurich, clonaba el primer gen del IFN de tipo I en la enterobacteria *Escherichia coli* (26, 27). De inmediato hay un salto espectacular en el sector farmacéutico que, al disponer del IFN en cantidad, puede pensar en aplicarlo como agente terapéutico contra virus y tumores. Como ocurrió con la penicilina, fue EE UU el que tomó la antorcha de que el IFN era un producto de gran interés farmacéutico.

Desde el nacimiento de la nueva biotecnología, las compañías farmacéuticas dependen de las biotecnológicas como fuente principal de fármacos. Así en los últimos diez años el número de fármacos biotecnológicos ha crecido considerablemente, existiendo en la actualidad unos 1.800 biofármacos en desarrollo, con 340 en las últimas etapas del desarrollo o pendientes de aprobación, siendo el 36% de estos fármacos compuestos biológicos (vacunas, anticuerpos, proteínas terapéuticas). Hay unos 370 fármacos y vacunas biotecnológicas en ensayos clínicos, dirigidos contra más de 200 patologías y unos 100 tests diagnósticos ba-

sados en biotecnología. Actualmente el 20% de todos los fármacos en el mercado se obtienen por procedimientos biotecnológicos. En el 2004 la FDA (*Food and Drug Administration*) de EEUU aprobó 31 nuevas moléculas, la cifra mas alta desde 1999. Si se analiza el año 2002, de los 29 nuevos fármacos que se pusieron en el mercado, 13 correspondían a EEUU, 8 a la UE y 7 a Japón. Se estima que actualmente la facturación mundial del sector biotecnológico asciende a casi 30.000 millones de euros, y esta facturación se incrementará significativamente en los próximos años. Un nuevo medicamento cuesta desarrollarlo unos 600 millones de euros, de los que el 65% son gastos en investigación clínica. Por ello el sector farmacéutico está concentrado en 13 grandes empresas. España a pesar de ser la novena potencia económica mundial ocupa un lugar muy por debajo en el sector farmacéutico y biotecnológico (informe Cotec, 2005).

La disponibilidad de la proteína IFN en estado puro y el interés por conocer su mecanismo de acción, alentaron los pasos siguientes: desentrañar la estructura de la proteína, conocer su interacción con la membrana celular e identificar las señales intracelulares emitidas.

Para desvelar la estructura se recurre al análisis de difracción de rayos X. Se supo así que los IFN son proteínas que se asocian consigo mismas para formar dímeros, con unión a dominios específicos. Posteriormente, gracias a la clonación de los receptores de IFN de tipo I y II, se demostró que tales receptores eran proteínas integrales de la membrana de tipo I (atravesan una vez la membrana plasmática). Los receptores constan de una parte extracelular, implicada en la unión a los IFNs, una parte transmembrana y una parte intracelular, necesaria esta última para transmitir a la célula distintas señales (23).

Descubrimiento de la cascada de señalización por interferones

Había que identificar el mecanismo de acción de los IFNs. ¿Cómo pueden unos factores solubles ejercer acciones tan dispares y, a la vez, tan específicas? Aunque se ha avanzado bastante en la respuesta, persisten muchos cabos sueltos. Fruto del empeño investigador, conocemos las cascadas de señalización que llegan desde la membrana de la célula y terminan en la inducción de múltiples genes del núcleo. De forma elegante, el grupo de George Stark, Sandra Pellegrini e Ian Kerr, de la Fundación Imperial de Investigaciones Oncológicas de Londres, y el de James Darnell del neoyorquino Instituto Rockefeller, consiguieron a finales de los años ochenta y comienzo de los noventa, descifrar los procesos moleculares mediante los cuales los IFN, tras unirse al receptor, activan la transcripción de genes específicos, genes que determinan su propia funcionalidad (28). Conocemos ya los mecanismos ligeramente distintos empleados por los IFNs de tipo I y de tipo II.

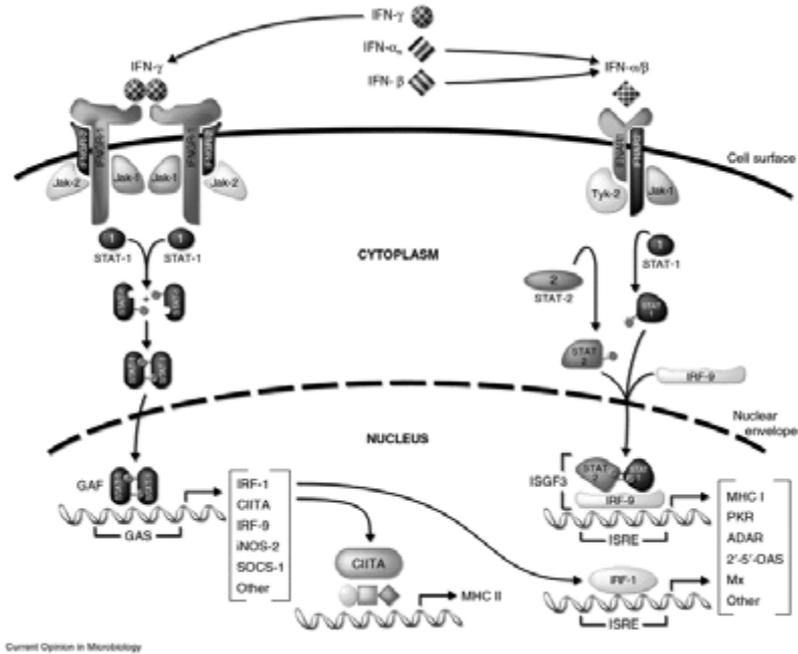


FIGURA 1. Cascada de señalización inducida por los interferones.

La señalización inducida por el tipo I consta de varios pasos. En una primera etapa la llegada de IFN- α o IFN- β provoca la heterodimerización del receptor. Este proceso desencadena una cascada de fosforilaciones en tirosinas, en la que intervienen diversas proteínas mediadoras (TYK2, JAK1, STAT1 y STAT2), pertenecientes a la familia de proteína quinasas *Janus* y de señales activadoras de la transcripción (STAT: *signal transducers and activators of transcription*). En virtud de la fosforilación JAK1/TYK2, las proteínas STAT1 y STAT2, pueden formar dímeros y, con esa forma, alcanzar el núcleo después de su interacción con el factor IRF-9. Instalado en el núcleo, el dímero constituido por ambas proteínas STAT junto a IRF-9 (complejo proteico llamado factor ISGF3) se comporta como un factor de transcripción específico de secuencia, estimulando la expresión de un conjunto de genes mediante su unión a la secuencia ISRE (*interferon-sequence responsive elements*).

El proceso difiere un poco en respuesta a IFN- γ . Las dos subunidades de los receptores de IFN- γ se encuentran separadas; una subunidad interacciona con JAK1 y la otra con JAK2, dos quinasas de tirosinas. La llegada del IFN- γ a las células induce la dimerización de cada una de las subunidades del receptor. Esto posibilita que JAK1 y JAK2 se encuentren lo suficientemente cerca como para activarse por fos-

forilación. JAK1, activada por autofosforilación, puede en ese estado fosforilar y activar a JAK2. La fosforilación de las tirosina quinasas promueve el reclutamiento de STAT1 (que reconoce a las tirosinas fosforiladas de las JAKs y se une a ellas).

La proteína STAT1 constituye la siguiente víctima de la cascada de fosforilación inducida por IFN- γ . Una vez fosforilada, STAT1 forma homodímeros; éstos, igual que ocurría con los heterodímeros STAT 1 y 2, pasan al núcleo, donde actúan como factores de transcripción que regulan la expresión de múltiples genes (22, 29, 30). Se están descubriendo otras cascadas de señalización independiente de JAK-STAT que también intervienen en respuesta a los IFNs (21).

El descubrimiento del mecanismo de señalización en respuesta a IFN, pionero en ese ámbito de la biología molecular, puso las bases para el conocimiento de la señalización mediada por otras citoquinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, etc, hasta cerca de 30 distintas), que ejercen funciones clave en la defensa del organismo frente patógenos y tumores.

Los genes inducidos en la fase de transcripción por los IFN serán los responsables últimos de los efectos ejercidos por las citoquinas. Así, los distintos IFN inducirán la síntesis de diferentes conjuntos de proteínas (unas comunes, otras particulares para cada caso). Mediante ensayos con «chips» de DNA se han identificado entre 100 y 200 genes inducidos en respuesta a cada una de las tres clases de IFNs, α , β , o γ (31). Esto nos da una idea de la complejidad y especificidad de las respuestas ejercidas por tales factores. Probablemente, esta complejidad aumente cuando dispongamos en detalle del análisis transcripcional completo de los aproximadamente 25.000 genes que se expresan en el genoma humano. Hasta estos ensayos, sólo se tenía constancia de la inducción por los IFN de una treintena de proteínas, cuya misión particular se ignoraba en la mayoría de los casos.

Entre las proteínas inducidas por IFN cuya acción está comprobada, las hay con propiedades antivirales como la proteína quinasa activada por RNA bicatenario, PKR, las proteínas Mx, la óxido nítrico sintetasa (iNOS) o la familia de 2'-5'-oligoadenilato sintetetasas, más conocidas como 2-5A, antitumorales (como PKR, IRF-1, p21), o proteínas con capacidad de regular distintos aspectos de la respuesta inmunitaria (complejo principal de histocompatibilidad, LMPs, TAPs) entre otras muchas (21, 32).

Descubrimiento del modo de acción de los interferones

En la década de los 70, el grupo de investigación del Instituto Nacional de Investigaciones Médicas (NIMR) en Londres, entre los que me encontraba, aco-

metimos una serie de experimentos que llevaron a la demostración de que el interferón inhibía la replicación vírica en el proceso de traducción del RNA mensajero. Se cuestionaba por entonces el carácter proteínico del IFN y que sirviera para algo. Junto con David Metz, trabajando en el mismo laboratorio donde se había descubierto la existencia de la molécula publicamos un artículo en *Nature* y posteriormente otros varios, que demostraron su modo de acción a nivel de iniciación en la síntesis de proteínas, lo que dió un impulso importante a dichas moléculas (33). Además, en colaboración con el grupo de Ian Kerr en el mismo Instituto, sacamos a la luz entre 1971 y 1974 una serie de trabajos que consolidaron al IFN como un regulador de la síntesis de proteínas (34-37). Dos de las rutas implicadas en esa acción son las que afectan a la enzima PKR y al sistema de las 2-5A sintetasa/RNasa L.

La proteína quinasa PKR como mediador antiviral y antitumoral de los interferones

La PKR es un importante mediador de las acciones de los IFNs. Se ha demostrado que participa en su acción antivírica y antitumoral. PKR es una proteína de 551 amino ácidos codificada por un gen único, localizado en el cromosoma 2p21, con un dominio quinasa serina/treonina en el extremo C-terminal. En particular, la PKR ejerce una acción antivírica frente a virus RNA y DNA, como el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus *vaccinia*, el virus de la estomatitis vesicular, el virus de la encefalomiocarditis, entre otros (38). En nuestro laboratorio del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del CSIC, hemos demostrado que esta enzima inhibe al virus *vaccinia* bloqueando la síntesis de proteínas, reduciendo la formación de partículas virales, provocando la muerte celular por apoptosis y activando la inducción de genes específicos involucrados en respuesta inmune, proliferación y apoptosis (40-49). Valoraremos mejor la importancia de la proteína quinasa PKR en la respuesta antivírica si advertimos que muchos virus (VIH, virus de la gripe, reovirus, virus de la hepatitis C, herpesvirus, adenovirus, entre otros) usan diversas estrategias para bloquear la síntesis o acción de la enzima, contrarrestando así sus efectos deletéreos para la replicación vírica (25).

La exquisita sensibilidad de PKR como antiviral viene ayudada por el hecho de necesitar de RNA bicatenario para activarse. El RNA bicatenario no se encuentra normalmente en las células, y se produce como intermediario durante la replicación vírica, de esta forma PKR se activa selectivamente durante la infección del virus. Para que se produzca la activación de PKR es suficiente que

el RNA tenga una estructura bicatenaria entre 30-85 pares de bases. La interacción con RNA bicatenario provoca que la PKR forme homodímeros y que se autofosfore en residuos de serina/treonina, incluyendo los residuos de treonina en las posiciones 446 y 451 (39, 40).

Como se mencionó anteriormente, una de las formas de actuación de PKR es mediante la inhibición de la síntesis de proteínas. Una vez activada, PKR fosforila a la subunidad pequeña del factor de iniciación eucariótico 2, (eIF-2 α) en la serina 51. Esta fosforilación da lugar a la formación de un complejo inactivo compuesto por eIF-2-GDP y el factor eIF2B, que origina la rápida inhibición de la síntesis de proteínas. El factor eIF2B se encuentra en cantidades limitantes en la célula por lo que su secuestro e inactivación por la fosforilación de eIF-2 α conlleva a la inhibición generalizada de la síntesis de proteínas. El factor eIF-2 es un heterotrímero compuesto de tres subunidades (α, β, γ) que funcionan por su asociación con GTP y el iniciador met-tRNA_i para formar el complejo ternario. Este complejo lleva el met-tRNA_i a la subunidad ribosómica 40S junto con otros factores traduccionales incluyendo eIF-3 para formar el complejo de preiniciación 43S. Este complejo 43S/eIF se asocia con el mRNA cerca del extremo 5' m⁷ G-cap y avanza en dirección 3' hasta encontrar el triplete de iniciación AUG en el contexto de la secuencia apropiada de Kozak. Una vez que este codon ha sido reconocido, GTP unido a eIF-2 se hidroliza en una reacción catalizada en parte por el factor eIF-5. A continuación, met-tRNA_i se libera del complejo ternario para iniciar la síntesis de la cadena peptídica naciente, y el factor eIF-2 se disocia del complejo de iniciación 43S. El GDP, asociado con el factor libre eIF-2, se intercambia por GTP mediante la actividad del complejo eIF2B, que es un heteropentámero compuesto por las subunidades ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$). Después de este intercambio, eIF-2 se incorpora en un nuevo complejo ternario para comenzar nuevos ciclos de iniciación (41).

Además de regular la síntesis de proteínas, PKR también modula la acción de uno de los factores claves en transcripción, el factor NF- κ B, regulando así la expresión de diversos genes anti y proapoptóticos. En nuestro laboratorio hemos contribuido a definir el mecanismo de activación de NF- κ B por PKR (42-45). NF- κ B, descubierto por el premio Nobel David Baltimore, es un dímero compuesto de diversos factores de la familia de proteínas Rel/NF- κ B, que se activa en respuesta a muy diversos estímulos; por ejemplo citoquinas proinflamatorias, infección por virus o bacterias, o diferentes tensiones, químicas o físicas (46, 47).

Demostramos que en presencia de PKR entra en acción el factor NF- κ B a través de la regulación del complejo I κ B quinasa (IKK), en el que también intervienen los factores TRAF-2 y TRAF-6 (miembros de la familia del factor de necrosis tumoral) (44, 48). Una vez unidos PKR y TRAF se activa el complejo IKK,

tente supresor de tumores; esta interacción conlleva la inducción de apoptosis. Además de estas interacciones, PKR juega un papel relevante en cascadas de señalización involucradas en muerte celular, como STAT-1, p53, ciclina B1, PDGF, IRF-1, ASK-1(38). Entender cómo la PKR provoca la muerte celular por apoptosis se discutirá a continuación, pues esto ha supuesto una contribución importante de mi grupo de investigación en una serie de trabajos que publicamos entre 1994 y 2005 (40-49, 54, 57-59). El impacto de PKR en biología celular, desde su acción antiviral hasta sus efectos antiproliferativos y posibles aplicaciones terapéuticas, ha sido objeto de una revisión reciente por mi grupo (García, M.A y col, 2006, *Microbial Mol. Biol. Reviews*, 70, 1032-1060).

Inducción de apoptosis por la proteína quinasa PKR

En 1994, descubrimos en nuestro laboratorio, que el gen de la PKR era capaz de inducir la muerte celular programada o apoptosis lo que explicaba la acción antiviral y antitumoral de los IFN (49). La apoptosis es un programa genético de muerte celular, que presenta características propias: condensación y fragmentación del DNA, de distintos orgánulos y de la membrana plasmática, descomposición de la célula en vesículas, cuerpos apoptóticos y disgregación nuclear. La apoptosis desempeña una misión importante en diversos aspectos de la vida, que van desde el desarrollo embrionario, hasta el día a día del organismo; elimina células no funcionales, dañinas, peligrosas, o simplemente producidas en exceso. La inducción de apoptosis podría ser, sugeríamos entonces, un mecanismo que ligase la quinasa PKR con su capacidad antivírica (sirviendo para liberar al individuo de células infectadas por virus) y antitumoral (contribuyendo a la eliminación de células tumorales).

La apoptosis se pone en marcha mediante la activación proteolítica en cascada de las caspasas, familia de proteasas, que se encuentran en las células en un estado inactivo (50). Existen dos cascadas principales, una desencadenada en respuesta a señales paracrinas o autocrinas provocadas por ligandos y receptores de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), y otra causada por diversos estímulos lesivos de la mitocondria, que convergen en la activación de las caspasas efectoras, 3, 6 y 7 (50-58).

La ruta inducida por ligandos de la familia del TNF empieza mediante la oligomerización de los receptores de la familia del TNF (o receptores de la muerte), que reclutan a diversas moléculas adaptadoras. El objetivo final es la captación y autoprosesamiento de la caspasa 8, que se activa así y permite el procesamiento de las demás caspasas. En la otra gran vía de inducción de apoptosis, intervienen

diversas señales que convergen en la mitocondria. El daño producido en el orgánulo provoca la liberación al citoplasma de moléculas diversas. Por ejemplo, del citocromo c, que puede unirse y activar a APAF-1, una molécula citosólica adaptadora. El complejo resultante APAF-1/citocromo c puede incorporar y activar a la caspasa 9, que pone en marcha la activación de las caspasas efectoras.

Durante los últimos años nos hemos centrado en el mecanismo de inducción de apoptosis por la enzima PKR. Mediante el uso de mutantes dominantes negativos específicos para la vía de fosforilación de eIF-2 α o de inducción de NF- κ B, hemos comprobado que ambas rutas están implicadas en la apoptosis promovida por PKR. De ello se desprende que, a través de la regulación de la traducción y de la transcripción, la proteína PKR modula la expresión de un conjunto de genes que desembocan en la inducción de apoptosis.

El análisis de los mecanismos implicados en la muerte celular programada debida a la enzima PKR, nos ha llevado a descubrir que la caspasa 8 constituye la proteasa clave de este proceso (45, 58, 59). La caspasa 8 se activa durante la apoptosis, inducida por PKR, en presencia de la molécula adaptadora FADD, un mediador común utilizado por diversos receptores de la familia del receptor TNF. Sin embargo, en el caso de la apoptosis inducida por la quinasa PKR, parece que la activación de la molécula FADD no depende de los receptores TNF, sino de un mecanismo atípico (aún por descubrir el receptor), similar al observado recientemente para la apoptosis derivada del tratamiento con cicloheximida, del estrés de radiación ultravioleta o del tratamiento con agua oxigenada. Los resultados obtenidos hasta la fecha sitúan a la enzima PKR como un mediador destacado de diversos procesos biológicos. Activada por múltiples estímulos, regula la síntesis de proteínas y la transcripción de genes específicos que determinan la pervivencia o muerte celular.

El entendimiento de cómo PKR regula el crecimiento y muerte celular puede proporcionar nuevas oportunidades terapéuticas dirigidas a combatir procesos infecciosos, tumorales y enfermedades neurodegenerativas, mediante el diseño de fármacos que activen o repriman la acción de PKR (60, 61). Estas investigaciones están en marcha en nuestro laboratorio.

El sistema de 2-5A sintetasa/RNasa L como antiviral y antitumoral de los interferones

Como hemos dicho, las acciones del IFN se deben a múltiples genes. En el caso de su misión antivírica intervienen además, múltiples vías. Una de estas vías es el

sistema de la 2-5 A (62). Se trata de una ruta multienzimática, compuesta por tres sintetasas (AOS1-OAS3), cuya transcripción se induce por IFN, y una endoribonucleasa, la RNasa L (63-65). Igual que acontecía con la enzima PKR, la eficacia de este sistema frente a las infecciones víricas depende de la capacidad de las 2-5A sintetasas de activarse en respuesta a la presencia de RNA bicatenario.

Una vez activadas, las 2-5A sintetasas intervienen en la síntesis de 2'-5' oligoadenilatos utilizando ATP, unos ácidos nucleicos peculiares y únicos en la naturaleza, pues los oligómeros de ácido adenílico, $(px5'A(2'p5'a)_n$, donde $x=1-3$ y $n > 2$) tienen la unión 2'-5' en lugar de la 3'-5' característica de las moléculas de RNA. Compete a los oligoadenilatos unirse, provocar la dimerización y poner en funcionamiento la RNasa L que se encuentra latente en las células y es un enzima único de 83 kDa. El gen humano de RNasa L (*RNASEL*) se localiza en el cromosoma 1q25, el locus HPC1 (*hereditary prostate cancer 1 gene*) (66, 67) La RNasa L activa causa la degradación masiva de RNA mensajero (víricos y celulares) y de RNA ribosómicos, con la inhibición consiguiente de la síntesis de proteínas en las células infectadas y la apoptosis de éstas, que explicaremos enseguida. Semejante sistema ha demostrado tener una notable capacidad antiproliferativa y antivírica contra el VIH, el virus *vaccinia*, el virus EMCV y el virus de Coxsackie.

En el año 1997, demostramos que la RNasa L también poseía capacidad inductora de apoptosis, lo que ponía sobre el tapete la redundancia en las acciones ejercida por los IFN (68, 69). Otros grupos revelarían luego que ambas enzimas (PKR y RNasa L) intervenían en la apoptosis inducida por causas muy diversas, además de controlar la infección vírica (70). Para obtener mas información sobre los mecanismos moleculares por los que RNasa L induce apoptosis, hemos generado vectores que expresan tanto la RNasa L como la 2-5 oligoadenilato sintetasa y demostrado en células en cultivo que la RNasa L induce apoptosis por activación de caspasas 2, 8, 9 y que la activación de la RNasa L es un evento que ocurre antes de la aparición de apoptosis y que requiere la acción de la mitocondria. En esencia, hemos demostrado recientemente que la activación de la 2-5A sintetasa por RNA bicatenario vírico produce los oligonucleótidos 2-5 A que activan a la RNasa L lo que produce una degradación del RNA celular, antes de que se induzca la apoptosis. Al comienzo de la apoptosis, tanto la RNasa L como la 2-5A sintetasa se localizan en el citoplasma y en la mitocondria, pero al iniciarse la apoptosis, ambas enzimas se trasladan a la mitocondria. Como consecuencia de la activación de RNasa L se produce la degradación de RNA, con la consiguiente inhibición en la síntesis de proteínas que, directa o indirectamente, activa a las caspasas. La activación de las caspasas 2, 8, 9 provoca la rotura de sustratos apoptóticos y da lugar a la acción orquestada del programa de muerte celular. Una vez

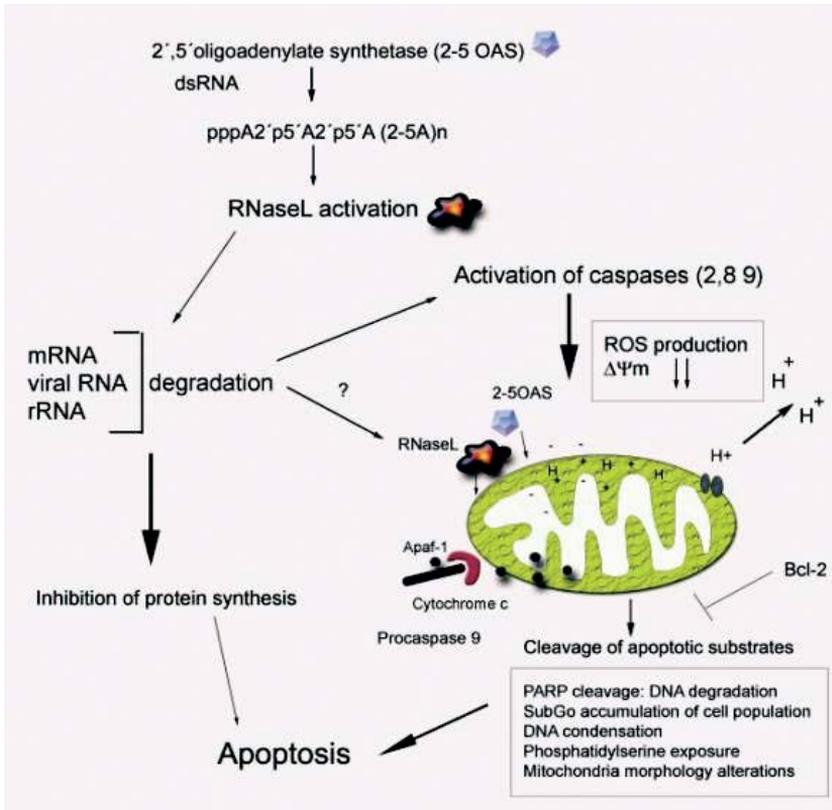


FIGURA 3. Activación de la proteína RNasa L, un regulador de la replicación viral y de la muerte celular.

que las caspasas se han activado, la mitocondria sufre cambios morfológicos y fisiológicos caracterizados por la liberación de citocromo c al citoplasma, pérdida del potencial de membrana, así como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), con el resultado final de muerte por apoptosis (71).

La importancia del sistema RNasa L en defensa viene reflejado por los estudios recientes que han observado que la RNasa L está involucrada en ciertos tumores de cáncer de próstata, al producirse mutaciones en el gen celular *RNA-SEL* que alteran la actividad de la enzima (67). Está claro que la mitocondria juega un papel central en apoptosis, a través de mecanismos interrelacionados que provocan alteraciones en el transporte de electrones, fosforilación oxidativa y producción de ATP, junto con liberación de proteínas que inducen activación de la familia de proteasas, las caspasas, y alteración del potencial redox.

Evasión de los virus a la acción de los genes de defensa inducidos por los interferones

Teniendo en cuenta que el IFN constituye la primera línea de defensa del organismo para luchar contra infecciones víricas (15, 72), no sorprende que los virus hayan desarrollado estrategias para evadir la acción del IFN. En trabajos pioneros propusimos en 1984 (73) que la resistencia del virus vaccinia al IFN era debida a la inducción de genes víricos específicos, que contrarrestaban el efecto de las enzimas 2-5A sintetasa y de la proteína PKR. En estos últimos años se ha demostrado la existencia de genes de poxvirus capaces de bloquear la acción del IFN a varios niveles (74, 75). Así, se han identificado productos de genes del virus vaccinia que son análogos al receptor del IFN de tipo I (gen B18R), y al receptor del IFN de tipo II (gen B8R). Dichos productos víricos se liberan al medio extracelular por las células infectadas y compiten con los receptores celulares en su unión a los IFNs. Asimismo, los productos de los genes E3L y K3L del virus *vaccinia* interfieren con la acción de los IFN. El gen E3L codifica para una proteína de 25 kDa que se une específicamente al RNA bicatenario. Esta proteína de 25KDa compite con la PKR y la 2'-5'-A oligoadenilato sintetasa por el ligando restringiendo su activación y por lo tanto la inhibición de la traducción (76-79). El segundo producto vírico que interfiere con la acción del IFN es el codificado por el gen K3L (80). Este gen expresa un polipéptido de 10.5 kDa que en su región carboxi-terminal presenta una gran homología con el factor de iniciación eIF-2 α . De una forma similar al caso anterior, la proteína vírica 10.5 KDa compite con el factor de iniciación eIF-2 α como sustrato para la proteína PKR. El resultado es una disminución en la fosforilación del factor eIF-2 α y por lo tanto una disminución en el bloqueo de la traducción.

A raíz del descubrimiento con los Poxvirus de la presencia en su genoma de genes que interferían con la acción de los IFNs, posteriormente se demostró en otros virus animales la existencia de genes víricos capaces de interferir con la acción del IFN, dirigidos mayoritariamente contra la enzima PKR (25, 72). Así, en adenovirus, el gen VA1-RNA (160 nucleótidos) bloquea la activación de la PKR. En el virus Epstein-Barr los genes EBER1 y EBR2 actúan como VA2 de adenovirus. La proteína NS1 del virus de la gripe previene la activación de PKR. Asimismo, el virus de la polio provoca la degradación de PKR durante la infección. El virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) tiene dos elementos reguladores de la proteína PKR, la secuencia TAR que activa y la proteína TAT que inhibe la acción de PKR. En reovirus la proteína $\sigma 3$, actúa como un inhibidor de PKR, por unión de RNA bicatenario. El virus de la

hepatitis C codifica dos proteínas, una es E2, que es un pseudosustrato y actúa como un inhibidor competitivo de la actividad PKR sobre el factor eIF-2 α , y la otra es NS5A involucrada en unión a PKR e inhibición de su dimerización. En el caso del virus herpes, el principal antagonista de PKR es la proteína ICP34.5 que actúa por reclutamiento de una fosfatasa que defosforila eIF-2 α , mientras que otra proteína US11 de herpes, actúa por unión a RNA bicatenario, inhibiendo la acción de PKR, al igual que las proteínas TRS1 y IRS1 del citomegalovirus humano.

Trabajos en mi laboratorio nos han permitido demostrar que la proteína E3L del virus *vaccinia* inhibe tanto a la acción de la proteína quinasa PKR como a la acción del sistema 2-5A sintetasa/RNasa L (42, 78). También hemos demostrado que otras proteínas virales inhiben la acción de la PKR, como son el producto del gen MC159L del virus *molluscum contagiosum* (81), la proteína A179L del virus de la fiebre porcina africana (82), el ORF5 del virus que produce el síndrome respiratorio reproductivo del cerdo (SRRRC) (83). Recientemente hemos demostrado que la proteína LANA2 del virus humano herpes 8 causante del sarcoma de kaposi (HHV8), inhibe la acción de PKR (84). En un trabajo más reciente en *Genes and Development* (2006), hemos demostrado un nuevo mecanismo de evasión viral para los alfavirus (Sindbis y Semliki), por el que la forma subgenómica 26S mRNA vírica, con una estructura en forma de horquilla (hairpin loop) en su extremo 5' localizada después de la señal iniciadora AUG, sitúa al ribosoma en su lugar correcto permitiendo la iniciación en la síntesis de proteínas y así evitando a la acción de la PKR, un fenómeno que ocurre aún en presencia de niveles muy altos de fosforilación del factor de iniciación eIF-2 α .

La importancia biológica de PKR queda reseñada por el hecho de que se han identificado varias proteínas celulares que actúan como activadores o inhibidores de PKR. Entre los activadores está la proteína PACT/RAX (85), que se une a los dominios de unión de RNA bicatenario. Entre las proteínas celulares inhibidoras de la acción de PKR están p58-IPK (86) que se induce durante la infección con el virus de la gripe y por choque térmico; la proteína p67 que hemos demostrado se asocia a PKR e inhibe la fosforilación de eIF-2 α (87) y la proteína TAR que se une a los dominios de unión de RNA bicatenario en PKR (25).

Mediante la utilización de ratones deficientes en PKR e infección con virus herpes o de la gripe carente en genes de interferencia con PKR, como ICP34.5 y NS1, se ha demostrado que esta enzima juega un papel fundamental en defensa del organismo contra infecciones. PKR parece que juega un papel importante en cáncer ya que células que sobreexpresan un mutante dominante negativo inducen tumores en ratones desnudos (25, 38, 42).

En estudios recientes y en colaboración con los grupos de Manuel Serrano (CNIO) y de Carmen Rivas (Facultad de Farmacia, Universidad Complutense en Madrid) hemos identificado un nuevo mecanismo de acción de los genes supresores de tumores, como p53 y ARF, al actuar también como inhibidores de la replicación viral (88, 89). La regulación de la replicación viral se produce por interacción de ARF con la proteína nuclear nucleofosmina; esta proteína normalmente se une a PKR y la bloquea. Durante la infección con un virus, se induce ARF que desplaza a la unión PKR-nucleofosmina, por lo que PKR una vez liberada se activa por RNA bicatenario viral con la consiguiente inhibición de la replicación viral. El impacto de genes supresores de tumores en defensa antiviral está siendo objeto de una revisión.

Hacia el descubrimiento de nuevos genes inducidos por las enzimas de defensa, PKR y 2-5A sintetasa/RNasa L

Es indudable que los múltiples efectos asignados a las enzimas PKR y sistema 2-5A sintetasa/RNasaL no se deben a la contribución de un solo gen, sino a un complejo de genes. Aunque se ha implicado a varios factores transcripcionales como IRF-1, IRF-3 e incluso p53 en la apoptosis inducida por PKR, sin embargo no se conoce el conjunto de genes que se activan por PKR en un proceso de replicación vírica. Para identificar a los genes celulares que se inducen en respuesta a estas enzimas en la infección, hemos recurrido a la tecnología de «chips» de DNA que contienen más de 15.000 genes humanos. En un estudio reciente (90), hemos observado que un total de 111 genes se regulan específicamente por la actividad catalítica de PKR, de los cuales la expresión de 97 genes está aumentada, mientras que la expresión de 14 genes está disminuida. Nueve de los genes activados codifican proteínas involucradas en adhesión celular, tres genes con papel de inmunomoduladores y 19 genes en metabolismo y señalización. Además, 21 genes están implicados en transcripción y 11 en traducción. La transcripción de los genes que codifican dos subunidades del proteasoma está también aumentada. La transcripción de genes con funciones de inhibición de la inducción de apoptosis por PKR, como las proteínas de choque térmico, la familia Hsp70, está reprimida. Entre los genes involucrados en apoptosis por la acción de PKR hemos identificado la caspasa 9 y el factor transcripcional ATF-3. ATF-3 actúa como un sensor que interacciona con p53 en condiciones de estrés celular, bloqueando su ubiquitinización; también aumenta la actividad de la caspasa 3, y su sobreexpresión confiere actividad antitumorigénica, especialmente en cáncer colorectal. Las implicaciones biológicas de estos estudios es que alguna de las actividades antitumorales de los interfe-

rones deben de estar relacionadas con la expresión de ATF-3, por lo que éste factor puede ser una buena diana para conocer la eficacia terapéutica en pacientes tratados con IFN. La utilización de «chips» en combinación con ensayos genéticos y bioquímicos permitirá definir el papel de cada uno de los genes inducidos por PKR en el proceso de muerte celular por apoptosis y desarrollar estrategias que permitan su control.

En relación al sistema 2-5A sintetasa/RNasa L, hemos iniciado en el laboratorio la identificación por «chips» de los genes humanos inducidos durante el proceso de apoptosis que ocurre durante la infección con virus recombinantes de *vaccinia* que expresan RNasa L y 2-5A oligoadenilato sintetasa.

Aplicaciones clínicas de los interferones

Conocer los mecanismos precisos de inducción de apoptosis por la quinasa PKR y otras proteínas inducidas por los IFNs servirá para mejorar los tratamientos terapéuticos efectuados con los. La disponibilidad de diferentes tipos de IFN ha posibilitado la realización de una amplia serie de tratamientos clínicos en humanos. En ellos ha quedado patente su eficacia contra enfermedades víricas, tumores y enfermedades neurodegenerativas (91).

Los IFNs se han hecho imprescindibles en oncología clínica. Se aplican en leucemias (mielocítica crónica, de célula pilosa), mieloma múltiple, linfoma non-Hodgkin, melanoma, carcinoma renal, sarcoma de Kaposi y papilomas. A ellos se recurre también en enfermedades de origen vírico (hepatitis B y C), síndrome agudo respiratorio, y se usan experimentalmente frente al VIH. Sin olvidar su aplicación creciente en enfermedades neurodegenerativas como esclerosis múltiple o esclerosis lateral amiotrófica (92). La combinación de los IFNs con otras terapias está contribuyendo a potenciar su actividad antivírica y antitumoral (93). Sin embargo, debido a los múltiples efectos que induce en una célula, no es sorprendente que estemos aún lejos de administrar estas moléculas de forma óptima, teniendo en cuenta las diferencias que se producen a nivel de expresión génica entre individuos. Por ello se está tratando de regular la acción de enzimas inducidas por los IFNs, como PKR, ya que en estudios recientes se ha observado su activación en varias patologías, como Alzheimer, Parkinson, Huntington y en la anemia de Fanconi. También se ha correlacionado el cáncer de próstata con la activación de RNasa L. Así pues, se inicia una nueva era en medicina clínica dirigida a activar o inhibir la acción de genes inducidos por IFN, con la finalidad de optimizar la aplicación terapéutica de estas moléculas biológicas tan potentes.

Resulta gratificante para quienes trabajamos en este campo, observar cómo, después de casi 50 años, lo que se alegó era un artefacto, ha resultado ser una realidad que alivia y controla distintas patologías. El conocimiento del amplio espectro de genes inducidos por los IFNs por técnicas de «biochips», y el ahondar en las implicaciones funcionales de cada uno de ellos, servirá en un futuro para racionalizar las terapias. Todas estas aplicaciones clínicas se fundarán, como ha ido ocurriendo hasta ahora, en el avance de la ciencia básica y clínica.

Aunque el papel inicial asignado a los IFNs fue su acción antivírica de amplio espectro, inhibiendo tanto a virus RNA como DNA, hemos comprobado, sin embargo, que estas moléculas juegan un papel esencial en la activación de la respuesta inmune. Hoy en día se están combinando los IFNs y otras citoquinas con adyuvantes y vacunas para potenciar la repuesta inmune frente a determinados antígenos y expandir la población de células B y T protectoras. A continuación trataré sobre la utilización de vacunas como complemento a los IFNs y como estrategia para aumentar las defensas del organismo en contra de patógenos y tumores. Una de las vacunas más eficaces ha sido la usada contra la viruela. Actualmente, recombinantes basados en el virus de la vacuna se están utilizando como vacunas contra otras enfermedades. Describiré a continuación los logros alcanzados con el virus vacunal, así como futuras aplicaciones.

LAS VACUNAS COMO SEGUNDA LÍNEA DE DEFENSA DEL ORGANISMO

He descrito a los IFNs como primera línea de defensa del organismo contra agresiones externas como son los patógenos y he mencionado al principio, que además de esta barrera el organismo dispone de otra que requiere más tiempo para su activación. Se trata de la respuesta inmune humoral y celular, que actúa como segunda línea de defensa contra los patógenos y que su activación por procedimientos de vacunación ha permitido controlar globalmente grandes enfermedades.

Descubrimiento del proceso de vacunación: la erradicación de la viruela

La erradicación de la viruela en 1980, la más devastadora de todas las enfermedades de la especie humana, que afectó a un décimo de la población mundial, fue posible gracias al programa de vacunación masivo coordinado por la OMS, y ha constituido uno de los mayores logros sanitarios a nivel mundial (94-99). Ha

sido la primera enfermedad erradicada de nuestro planeta. Hay que considerar que sólo en el siglo XX sucumbieron a esta enfermedad más de 300 millones de personas. Las razones del éxito del programa fueron las siguientes: el huésped de la viruela es el hombre, sólo hay un serotipo, no produce infección persistente, se puede diagnosticar tempranamente, la enfermedad es localizada, las manifestaciones subclínicas no son fuente de contagio, la vacuna confiere protección duradera, es barata y estable, y no hay barreras culturales o sociales frente a la infección.

El éxito de la vacunación obviamente no hubiera sido posible sin la contribución de quién descubrió la vacunación contra la viruela mediante la inoculación de material aislado de la ubre de las vacas que producía lesiones en las manos de las personas que las ordeñaban. Fue esta observación la que utilizó el médico inglés Edward Jenner para demostrar en 1796 que de la lesión producida en las manos de Sarah Nelmes (una ordeñadora que se había contagiado con la enfermedad de la ubre de las vacas, llamada Cow-pox), se podía extraer un material que al ser introducido por escarificación en el brazo del niño de ocho años James Phipps, se producía una protección contra viruela como lo demostró por posterior inoculación al niño de material obtenido de pústulas de personas infectadas con viruela. Este proceso lo repitió con otros 23 casos, consiguiendo protección total contra viruela (98, 99). Los resultados de estos trabajos de vacunación los publicó Jenner en un libro en 1798, ya que no le permitieron su publicación en la revista científica *Transactions of the Royal Society*. Este es un ejemplo típico de lo difícil que es introducir nuevos conceptos en la sociedad científica y transgredir moldes previamente establecidos (100). Se le acusó jocosamente de convertir a las personas inoculadas con material de las vacas en monstruos con cabeza de vaca. El proceso de vacunación masiva lo aplicó el médico español Francisco Javier Balmis que, utilizando el método de Jenner, inició una expedición en 1803 a las colonias españolas de Ultramar y consiguió vacunar hasta 1810 a unas 500.000 personas. La expedición de Balmis a América Central y del Sur, así como a Filipinas, auspiciada por la Corona Española, ha sido uno de los acontecimientos más relevantes en la historia de la conquista de la viruela (aunque poco divulgado), y una gran aportación de la medicina española a la lucha contra enfermedades (101). Como investigador que lleva trabajando más de 30 años en la biología del virus que fue utilizado como vacuna contra la viruela, me produce un gran orgullo recuperar la memoria histórica de Balmis. La expedición y vacunación en masa en zonas con alta mortandad por viruela es el claro ejemplo de solidaridad entre los pueblos, a lo que Balmis contribuyó de forma decisiva.

El hito histórico de la erradicación de la viruela, se ve agravado por el peligro de que la viruela vuelva a emerger por medio de actos terroristas (102). Afortu-

nadamente, en el mundo sólo se puede trabajar con el virus de la viruela en dos centros, el Centro de Enfermedades Infecciosas de Atlanta, en EE UU, y el Centro Vector en Novosibirsk en Rusia. La investigación que se realiza en ambos centros con el virus de la viruela está bajo control de la OMS, con asesoramiento de un Comité de expertos internacionales, entre los que me encuentro. Existe una moratoria de la OMS para destruir la colección de virus de la viruela existentes en EE UU y Rusia tan pronto como se considere que se han desarrollado métodos de diagnóstico, drogas antivirales y vacunas de nueva generación con menos efectos secundarios, que garanticen totalmente el control de la infección en el caso de que la viruela pudiera re-emerger, bien por bioterrorismo o a través de la infección por virus muy relacionados, como la viruela de monos.

El interés por seguir estudiando el virus de la viruela y los miembros de la familia Poxvirus a la que pertenece, estriba en la carencia de conocimiento que se tiene acerca de cómo este virus produjo una enfermedad tan letal y, por otro lado, en la posibilidad de utilizar los Poxvirus como herramientas para producir vacunas contra otras muchas enfermedades humanas y animales. Analizaremos aspectos relevantes sobre el virus y su uso como vacuna.

Características de los Poxvirus

Los Poxvirus forman la familia más compleja de virus animales con DNA, encontrándose ampliamente distribuidos en la naturaleza (103). La familia *Poxviridae* está dividida en dos subfamilias, *Chordopoxvirinae* y *Entomopoxvirinae*, dependiendo de si el rango de hospedador son vertebrados o insectos. La familia *Chordopoxvirinae* está compuesta por ocho géneros: *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Suipoxvirus* y *Yatapoxvirus*. Los miembros de un mismo género están antigénica y genéticamente relacionados teniendo una morfología semejante. La subfamilia de *Chordopoxvirinae* infecta a numerosas especies, como ratón, conejo, cerdo, cabra, vaca, camello, búfalo, elefante, mono y hombre, y la subfamilia *Entomopoxvirinae* a una gran variedad de insectos. La enfermedad *mixomatosis* producida por miembros del género *Leporipoxvirus* es prevalente en Europa, con un alto índice de mortandad. De hecho esta propiedad la utilizó el investigador Frank Fenner para llevar a cabo el primer experimento de control biológico con la introducción de la mixomatosis europea en animales de campo en Australia para evitar una excesiva multiplicación de conejos.

Sólamente los miembros del género *Orthopoxvirus* y *Molluscipoxvirus* infectan a la especie humana, aunque los Poxvirus de oveja, cabra y vaca pue-

den infectar a humanos por contacto directo con lesiones. Aunque la viruela causada por *variola major* ha sido erradicada, sin embargo los demás miembros de Poxvirus se mantienen en la naturaleza infectando a sus hospedadores. De hecho, en el año 1970 se identificaron los primeros casos humanos de infección por el virus de los monos (*monkeypox*) y el número de casos ha ido en aumento con más de 500 descritos desde 1996, aunque no hay evidencia de que la infección por *monkeypox* produzca una enfermedad como la viruela. Más de 30 casos de infección en humanos por *monkeypox* se han dado en EE UU en 2002 como resultado de la importación de roedores de África, afectando a diez Estados (104). La infección por *monkeypox* es zoonótica, probablemente se transmite por vía respiratoria, se asemeja a la viruela pero difiere genéticamente y por las propiedades biológicas y epidemiológicas, con menores tasas de mortandaz, entre el 10-15% de los infectados. La secuenciación del genoma de *monkeypox* ha demostrado que no es un virus ancestral de viruela, sino una especie única.

Se han secuenciado los genomas de más de 50 aislados en distintos continentes obtenidos en personas infectadas con el virus de la viruela. Actualmente el diagnóstico epidemiológico de los Poxvirus se realiza por técnicas de ampliación génica por PCR/RFLP y su secuenciación nucleotídica, así como por diferencias en reactividad contra distintos anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra proteínas específicas. Hay que tener en cuenta que la población está desprotegida, puesto que la práctica de la vacunación contra viruela ha sido suspendida en todos los países. La mejor forma de prevención es disponer de todas las herramientas que permitan su control. Hoy en día existen muy pocos antivirales específicos contra Poxvirus, como los interferones, metisazona (N-metilisatin B-tiosemicarbazona), rifampicina, ribavirina, cidofovir y derivados cíclicos, pero su eficacia en humanos no ha sido demostrada (105). Mediante el conocimiento de la biología molecular de Poxvirus y análisis estructural se podrán diseñar compuestos con especificidad frente a proteínas esenciales en la cascada de replicación vírica. Por motivos de seguridad, es necesario producir al menos tres compuestos que inhiban selectivamente más de un proceso replicativo vírico (ejem., inhibidores de proteasa, de topisomerasa, de DNA polimerasa, de morfogénesis, etc.).

El estudio de los Poxvirus ha permitido hacer avances importantes en inmunología y en biología celular. De hecho el nacimiento de la inmunología tiene sus bases en la vacunación contra viruela. Fueron los primeros virus en utilizarse como vacuna (frente a viruela), y el nombre de vacunación fue universalizado por Louis Pasteur por derivarse la primera vacuna de pústulas ob-

tenidas en la ubre de las vacas (del latín *vacca*, se derivó el nombre de vacuna) y extender, junto con Robert Koch, el término a la vacunación preventiva contra otros agentes. Fueron los primeros virus animales en ser visualizados microscópicamente, cultivados, cuantificados en células, y definida su composición química. Además, los estudios bioquímicos sobre estos virus sirvieron para demostrar que los retrovirus contienen una enzima llamada transcriptasa inversa, que otros virus con RNA en su genoma contenían la enzima RNA polimerasa, que les servía para copiar sus genomas, y que la mayoría de los RNA mensajeros (mRNA) virales y celulares contenían en su extremo 3' una secuencia de poli A (entre 50-200 residuos de adenosina) y en su extremo 5' una estructura llamada *cap* (m7GpppN). Toda la maquinaria enzimática necesaria para copiar el DNA a mRNA (proceso de transcripción) se encuentra formando parte de la partícula vírica (103). Estudios posteriores demostraron que esta familia de virus codifica una serie de genes cuya función es evadir la respuesta del sistema inmune frente a la infección (106). Estos mecanismos de evasión han sido posteriormente identificados en otros virus. Los Poxvirus también fueron los primeros virus animales en los que se demostró que en su genoma se podían incorporar genes de otras especies y producir virus recombinantes (107, 108). Estos virus recombinantes están siendo utilizados en fase experimental como posibles vacunas contra un amplio espectro de enfermedades humanas infecciosas y tumorales. Analizaremos a continuación la estructura del virion y su replicación en la célula infectada.

El ciclo replicativo de Poxvirus

Las partículas virales tienen el mayor tamaño de los virus animales, entre 270-350 nm, pudiendo verse con el microscopio óptico. Básicamente, la infección se inicia con la unión del virus a la membrana celular por acción de varias proteínas virales, entrada del nucleoide viral («core») en el citoplasma, desnudamiento del «core» por mecanismos aún desconocidos, expresión génica, replicación del DNA y morfogénesis. El virus que contiene un DNA de doble cadena con los extremos sellados penetra por fusión de membranas, como lo demostramos hace bastantes años. Se libera el nucleoide («core») que sintetiza mRNA tempranos, seguido por la replicación concatémica del DNA viral con síntesis de mRNA intermedios y posterior producción de mRNAs tardíos que requieren la cooperación de factores celulares para dar lugar a las proteínas estructurales. Se inicia el proceso de ensamblaje y formación de partículas infectivas (103).

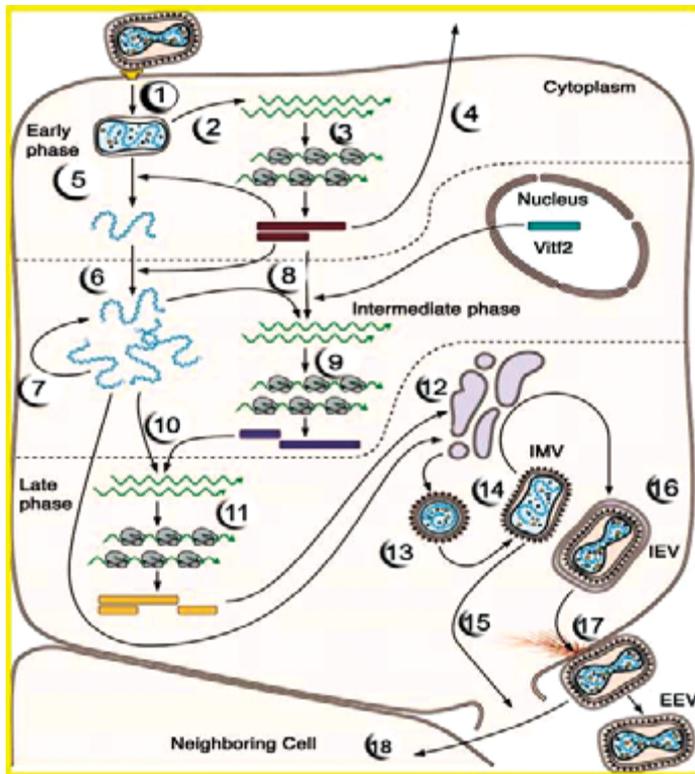
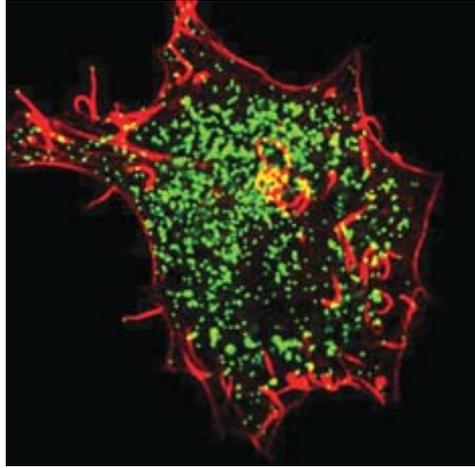


FIGURA 4. Ciclo replicativo de los poxvirus, cuyo representante más característico es el virus de la viruela. En la microscopía confocal se puede observar una célula infectada con gran cantidad de partículas virales (en verde).

A diferencia de otros virus, existen dos formas infectivas, llamadas virus intracelular maduro (IMV) y virus extracelular con envuelta (EEV) que se identifican claramente con el microscopio electrónico. Estas dos formas infectivas se diferencian en el número de membranas que adquieren del huésped. Así, en el proceso de formación del IMV, hay una serie de estadios intermedios que incluyen la adquisición de membranas del compartimento intermedio celular (ERGIC), formación de crestas con espículas, agrupamiento en partículas inmaduras (IV) que van adquiriendo mayor densidad con la incorporación del DNA viral y su empaquetamiento. El DNA se incorpora a la partícula IV por un proceso todavía desconocido, probablemente a través de un poro. La incorporación secuencial de proteínas víricas seguido del procesamiento proteolítico de proteínas del nucleóide, determinará la formación de la primera y más abundante forma infectiva viral, el virus intracelular maduro (IMV). Algunos de los IMV utilizan microtúbulos para llegar al área de Golgi y poder adquirir una segunda doble membrana, dando lugar a la partícula llamada virus intracelular con envuelta (IEV), que es transportado a la periferia de la célula por microtúbulos. En contacto con la membrana celular, la membrana externa del IEV se fusiona con la membrana plasmática y se libera de la célula como virus extracelular con envuelta (EEV), que es la segunda forma infectiva vírica (109). Muchas de estas partículas permanecen asociadas a la membrana celular dando lugar a la formación de colas de actina que propelen al virus unido a la membrana hacia otras células donde inicia una nueva infección (110). La formación de colas de actina la inicia la proteína del virus *A36R* y está controlada por varias proteínas celulares como N-WASP, Nck, WIP y kinasas de las familias Src/Abl, entre otras (111).

En la membrana externa del EEV se encuentran seis proteínas virales que son únicas y que no se encuentran en el IMV. Estas proteínas son producto de los genes: hemaglutinina (*A56R*, gp86), *F13L* (p37), *B5R* (gp42), *A34R* (gp22-24), *A36R* (p45-50) y *A33R* (gp23-28). La delección de los genes *F13L* o *B5R*, así como la represión del gen *A27L* reduce de forma drástica la formación de IEV. El EEV representa menos del 1% del total de la progenie vírica producida en la infección, pero participa de forma muy activa en la diseminación a larga distancia del virus en el huésped, mientras que el IMV juega el papel más importante en la transmisión del virus célula a célula.

Mediante crio-microscopía electrónica y reconstrucción tomográfica hemos definido la estructura del virus *vaccinia* en su forma infectiva de virus intracelular maduro o IMV (360x270x250 nm) con una resolución de 4-6 nm (112). Esta forma infectiva que es la mayoritaria durante la infección, se caracteriza por tener una membrana externa lipídica (5-6 nm de grosor), debajo de la cual hay dos cuer-

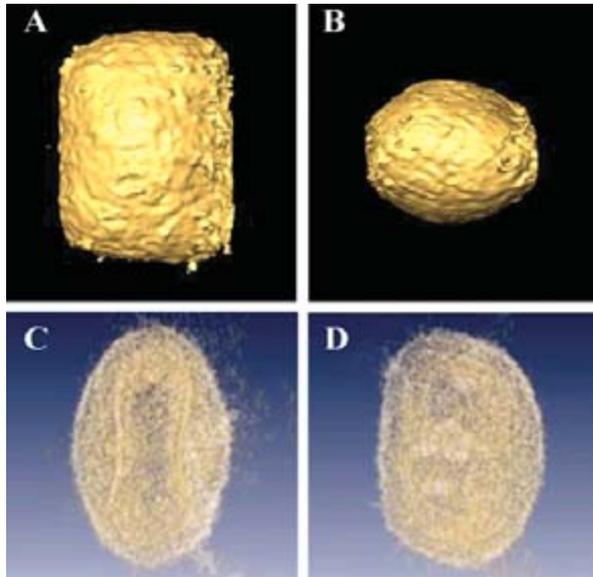


FIGURA 5. *Morfología del virus vacunal a una resolución de 4-6 nm obtenida por crio-microscopía electrónica y tomografía. Se puede observar la membrana externa con protuberancias y en su interior el nucleoide que contiene el DNA de unas 200 kb.*

pos laterales constituidos por material heterogéneo sin aparente estructura, y mas internamente existe un nucleoide o core rodeado por dos capas que tienen un grosor de unos 18-19 nm; la mas externa de estas capas contiene proyecciones de espículas agrupadas en forma hexagonal, y la mas interna es consistente con una membrana lipídica de 5-6 nm. En el core se observan poros que pueden servir para exportar el RNA mensajero durante el proceso de transcripción del genoma viral. Actualmente estamos tratando de definir la estructura del virus inmaduro (IV) para entender el proceso de organización de membranas en el virus.

Aproximadamente unas 100 proteínas forman parte de la estructura de IMV. En el proceso de maduración del IMV se piensa que sólo las proteínas virales forman parte del virión, aunque nuestros estudios de proteómica sobre la composición del IMV indican la presencia de algunas proteínas celulares. En el caso del EEV se ha demostrado la presencia de proteínas celulares, mayoritariamente receptores, que se incorporan a la membrana del EEV, debido al reclutamiento de la membrana del Golgi. El proceso replicativo dura entre las 12-24 horas, con producción de un gran número de partículas infectivas (unas 10.000 por célula), lo que nos da una idea sobre la capacidad infectiva del virus de la viruela.

El genoma de Poxvirus

Los Poxvirus contienen un genoma de DNA que varía en tamaño, desde 130.000 nucleótidos (caso de *Parapoxvirus*) a 300.000 nucleótidos (caso de *Avipoxvirus*). El primer genoma de Poxvirus se secuenció en 1990, teniendo el genoma del virus *vaccinia* estirpe Copenhague 191.636 pares de bases.

Desde entonces se ha determinado la secuencia completa de unos 50 representantes de los distintos géneros de la familia Poxviridae (113). Una característica del genoma de Poxvirus es que la molécula de doble hélice del DNA tiene los extremos sellados covalentemente, por lo que en condiciones desnaturalizantes formaría un círculo. Las dos cadenas del DNA tienen en sus extremos una secuencia idéntica que está repetida pero opuestamente orientada, formando telómeros. Estos telómeros, que se mantienen conservados en todos los miembros de la familia, son ricos en secuencias A+T y no pueden formar una perfecta estructura apareada entre las bases. Hay una región adyacente al extremo de unos 100 pares de bases que es necesaria para la resolución de las formas concateméricas del DNA en el proceso

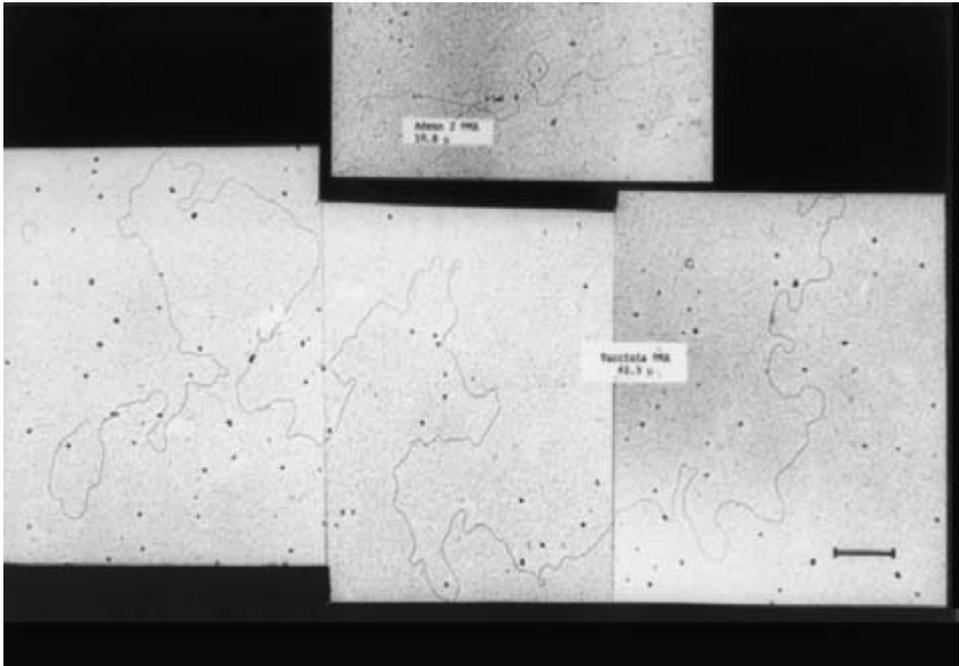


FIGURA 6. El DNA del virus vacunal fotografiado mediante microscopía electrónica, en comparación con el DNA del adenovirus, que es unas seis veces menor en tamaño.

de duplicación. En los *Orthopoxvirus*, a continuación de esta región hay una serie corta de secuencias repetidas en tándem, separadas entre sí por segmentos homólogos de unos 250-350 pares de bases. El número de repeticiones varía entre miembros de la familia y en función del número de bases. En los extremos se encuentran localizados la mayor parte de los genes no esenciales para la replicación del virus y los que están involucrados en la defensa, mientras que en las regiones internas del genoma abundan los genes que codifican proteínas estructurales (103).

Especialmente importante ha sido la obtención de la secuenciación completa de los genomas de *variola*, en sus formas virulenta (*variola major*) y atenuada (*variola minor o alastrin*), lo que ha permitido iniciar estudios de patogenicidad para entender por qué estos virus causaron tan alta tasa de mortandad en la población. La comparación entre las secuencias del virus *vaccinia* (con 185 posibles genes) y *variola* (con 186 posibles genes) ha permitido demostrar que ambos virus comparten 150 genes con una identidad del 90% (114). En comparación con *vaccinia*, *variola* tiene algunos genes truncados, otros fusionados y sus extremos codifican algunas proteínas únicas, aunque presentes en otros miembros de poxvirus. Los métodos actuales de secuenciación de genomas virales han reducido notablemente el tiempo en descifrar la secuencia de nucleótidos de un virus aislado, de un año en 1990 a unas cinco horas en 2005. El estudio de la funcionalidad de los genes de *variola major* aportará información relevante sobre la viruela.

Respuesta inmune frente a Poxvirus

La capacidad de los poxvirus por inducir una respuesta inmune protectora se conoce desde la antigüedad, con la práctica de la variolización (proceso utilizado en China basado en el uso de pústulas secas de pacientes infectados con viruela que se aplicaba a personas sanas). Esta práctica se utilizó de forma más segura por Jenner con la introducción de la vacunación a finales del siglo XVIII. La vacuna tradicional en humanos contra la viruela, basada en el virus *vaccinia*, se administraba por inoculación en la dermis con una aguja bifurcada conteniendo una suspensión del virus *vaccinia*, lo que daba lugar a una pápula a los 3 a 5 días y rápidamente se formaba una vesícula y luego una pústula que alcanzaba su máximo tamaño a los 8-12 días. A continuación se formaba una costra que se separaba de la piel a los 14-21 días dejando la típica señal epidérmica. Normalmente se produce una pequeña fiebre cuando aparece la pústula acompañada de hinchazón de los ganglios adyacentes. Ocasionalmente se produce viremia entre los 3-10 días y el virus se puede aislar de las amígdalas. En

1967 se inició una campaña de vacunación masiva de la población contra la viruela, utilizando como vacuna una estirpe del virus *vaccinia*. Esta campaña culminó en 1980 con la declaración por la OMS de la erradicación de la viruela de nuestro planeta (97). El éxito fundamental de esta campaña fue la existencia de una vacuna con capacidad para inducir una fuerte respuesta inmune que controlaba el proceso infeccioso.

Entre los mecanismos de inmuno-protección juegan un papel importante tanto la respuesta humoral, por activación de linfocitos B, como la celular por activación de linfocitos T. La producción de anticuerpos neutralizantes del isotipo IgG e IgM es una característica de la infección y es fundamental en protección, como se ha demostrado mediante transferencia pasiva de inmunoglobulinas procedentes de animales vacunados a animales sanos y posterior inoculación de una dosis letal del virus *vaccinia*. En los individuos vacunados contra viruela se ha observado la persistencia de anticuerpos neutralizantes durante más de 20 años. Entre los antígenos de *vaccinia* que inducen anticuerpos neutralizantes están los productos de los genes *A27L*, *A33R*, *B5R*, *D8L*, *H5R* y *L1R*. Nuestro grupo fue el primero en demostrar protección frente al virus *vaccinia* con el antígeno purificado *A27L* (115). Por otro lado, la vacuna induce memoria inmunológica caracterizada por la activación de linfocitos T. Se ha observado con ratones a los que se les han inactivado genes del sistema inmunológico, o a los que se les han transferido células específicas, que la activación de linfocitos CD4+, CD8+ y de células asesinas NK es necesaria para la protección contra Poxvirus. A pesar de la multitud de antígenos virales, se conoce muy poco acerca de las proteínas que inducen una respuesta celular y menos aún sus dominios antigénicos. Estudios recientes indican que las células dendríticas juegan un papel importante en la presentación antigénica y en el establecimiento de la memoria inmunológica frente a Poxvirus (116, 117).

Además de la inducción de una respuesta inmune adquirida, que se produce entre unos tres días y dos semanas después de la inoculación viral, la infección con Poxvirus induce una respuesta celular inmediata del huésped (respuesta innata), caracterizada por la producción de moléculas inmuno-moduladoras, como los interferones de tipo I y II, IL-12, TNF-alfa, Fas y otras. De hecho, con el virus *vaccinia* se demostró por primera vez que la producción de RNA bicatenario durante la infección era responsable de la producción de los IFN. Además, posteriormente se demostró que estas moléculas son potentes activadores de la apoptosis. El primer éxito terapéutico del interferón fue obtenido frente a lesiones oculares producidas por el virus *vaccinia* en conejo.

Con la implementación de la metodología de *microarrays* de DNA conteniendo 15.000 genes humanos, nuestro grupo ha identificado los genes celula-

res que se inducen o reprimen durante la infección con un Poxvirus (118, 119). Hemos demostrado que en el proceso de infección viral, la mayoría de los genes celulares activados por la infección se reprimen (en un 90%), mientras que un número reducido de genes aumentan su expresión. Hemos identificado uno de estos genes celulares de la familia WASP (síndrome de Wiskott-Aldrich), como necesario para la propagación del virus en tejidos animales, al estar implicado en la formación de colas de actina y propulsión del virus de una célula a otra (120). También hemos identificado los genes celulares que se inducen cuando la infección se produce por virus atenuados derivados del virus *vaccinia*, como MVA y NYVAC, que infectan a las células humanas pero son incapaces de propagarse (121). En este caso se pueden observar diferencias entre los genes que se inducen por la estirpe virulenta en relación con la atenuada, lo que tiene interés para el uso de estos virus como vacunas.

Utilización de Poxvirus recombinantes como vacunas contra distintas enfermedades

La demostración en 1982 por los grupos de Bernie Moss y de Enzo Paoletti en EE UU de que en el genoma del virus *vaccinia* se podía incorporar de forma estable una gran variedad de genes procedentes de otras especies y que por inoculación de estos virus recombinantes a animales se les podía conferir protección frente a un patógeno, supuso una revolución en el campo de las vacunas (107, 108). Por primera vez se consideró que un Poxvirus se podría utilizar como posible vacuna contra otros patógenos, siempre y cuando no provocara efectos secundarios y dicha vacuna demostrara su eficacia. Además, la experiencia de campo acumulada con la práctica de la vacunación contra viruela hacía posible que vacunas basadas en Poxvirus pudieran tener una amplia distribución mundial.

Los fundamentos para producir un Poxvirus recombinante se basan sencillamente en generar un plásmido de inserción que contiene el gen de interés flanqueado por regiones codificadoras de un gen no esencial del Poxvirus, como el gen timidina quinasa o hemaglutinina y un gen marcador, como la β -galactosidasa o la proteína verde fluorescente (GFP). El gen de interés tiene su expresión controlada bajo un promotor fuerte que se activa a tiempos tempranos y tardíos en la infección. Mediante un proceso de infección de células animales en cultivo con un Poxvirus seguido de la introducción del plásmido de inserción por transfección, se produce durante unas 24h un proceso de recombinación específica de secuencia entre las regiones flanqueantes del plásmido de in-

serción y el locus homólogo del gen viral. El aislamiento de virus recombinantes se realiza por seguimiento del gen marcador que, si es β -galactosidasa, se detecta por la producción de placas de color azul en presencia de su sustrato, o si es GFP, por la fluorescencia verde. Existe una gran variedad de marcadores, tanto enzimáticos como antibióticos para la selección de virus recombinantes (122). Para el uso de estos vectores como vacunas en humanos se requiere que el gen marcador no esté presente en el virus recombinante, por lo que en estos casos se utilizan plásmidos en los que el gen marcador se elimina por recombinación homóloga entre los sitios flanqueantes.

El éxito de la utilización de vacunas basadas en Poxvirus recombinantes se demostró en los estudios de campo llevados a cabo en Europa y EEUU con un virus recombinante de *vaccinia* que expresaba la proteína de la envuelta del virus de la rabia. Se observó que la administración de esta vacuna en cápsulas comestibles inducía una respuesta inmuno-protectora contra la rabia en animales que transmiten la enfermedad, como el zorro (123). De esta forma se ha generado una gran variedad de virus de Poxvirus recombinantes contra enfermedades virales (gripe, encefalitis, enteritis, fiebres hemorrágicas, hepatitis, sida), bacterianas (neumonías), parasitarias (malaria, leishmania), tumorales (melanoma, adenocarcinoma, tumor prostático), que se encuentran en fase de experimentación clínica.

Para evitar algunos efectos no deseados que se observaron en las campañas de vacunación contra la viruela, se han generado virus recombinantes altamente atenuados y seguros para la vacunación contra patógenos y tumores (124-126). Uno de los candidatos que está en experimentación clínica en fase I/II es el virus *vaccinia* modificado de Ankara, (MVA), que fue obtenido después de más de 500 pases seriados en células primarias de embrión de pollo y que fue administrado a más de 120.000 personas en Alemania durante la campaña de vacunación contra la viruela. Estudios recientes han demostrado que la inoculación de MVA recombinante que expresa antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) confiere protección contra la enfermedad producida en simios por un híbrido (SIVH) del virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV) conteniendo antígenos del VIH. Actualmente hay una serie de ensayos clínicos en humanos contra malaria, sida y tumores utilizando virus recombinantes de MVA en combinación con otros vectores.

Estudios pioneros de vacunación frente a malaria, en los que participó nuestro laboratorio junto con los grupos de Ruth Nussenzweig y Fidel Zavala en New York University Medical Center y de Peter Palese en Mount Sinai de NY, demostramos en una serie de publicaciones que se podía expandir la población de

células T CD8+ específicas para el antígeno CS (circunsporozoito) por administración sucesiva de dos vectores y que el orden de administración era fundamental para obtener protección frente a *Plasmodium yoelii* (127). Establecimos que si se lleva a cabo un protocolo de inmunización con una primera inoculación de un vector del virus de la gripe (influenza) que expresa el epítipo de CS específico para células T CD8+, seguido al cabo de dos semanas por una segunda inoculación con un vector de Poxvirus (*vaccinia* o MVA) que expresa la proteína completa CS, se produce al cabo de 10 días una ampliación de la respuesta celular CD8+ específica frente a CS que induce protección (90%) frente a la forma infectiva del parásito, esporozoitos de *Plasmodium yoelii* que producen la malaria murina. La protección se correlacionó con un alto grado de respuesta celular específica contra la proteína del circunsporozoito (CS) de plasmodio. Demostramos que este procedimiento de inmunización combinada de distintos vectores (*prime/booster*) inducía una respuesta inmunológica de tipo Th1 (caracterizada por la producción de las citoquinas IFN- γ y IL-12), mateniendo la presencia de linfocitos citotóxicos CD8+ durante largos períodos de tiempo que aún protegían (en un 60%) contra malaria (128, 129). Este procedimiento de *prime/booster* para expansión de células CD8+ ha sido confirmado por otros grupos utilizando como primera inoculación vectores que pueden ser DNA, proteínas, seudopartículas, ó virus atenuado expresando el gen de interés, seguido de una segunda inoculación con un MVA recombinante que expresa el mismo gen. Estos protocolos de *priming/booster* están siendo aplicados a otros sistemas de vacunación contra patógenos y ampliamente aceptados como regímenes de inmunización eficaz. Estos resultados, han servido para aumentar el interés de los Poxvirus como vacunas, ya que el proceso de *priming/booster* con vectores heterólogos ha demostrado su eficacia en distintos modelos animales. Además, recientemente hemos demostrado que es posible inducir una fuerte respuesta inmune en mucosas frente a antígenos del VIH mediante la inoculación por vía respiratoria de recombinantes del virus de la gripe y de MVA (130). También hemos demostrado que es posible proteger contra leishmaniasis visceral y cutánea en procedimientos de *prime/boost* con vectores de DNA y recombinantes del virus *vaccinia*, estirpes WR y MVA, que expresan el antígeno LACK de *L. infantum* (131, 132),

¿Qué ocurre en el proceso de *prime/booster*? Hemos propuesto que durante la primera inoculación (*priming*) se produce una activación moderada de linfocitos T CD8+ específicos frente a unos pocos epítopos del antígeno, y que después de la segunda inoculación con el Poxvirus recombinante (*booster*) expresando el mismo antígeno, se produce una expansión de la población de células T CD8+, además del efecto *priming* en células inmunológicamente vírgenes. Las células que fueron activadas en la fase inicial reaccionan más rápidamente y se

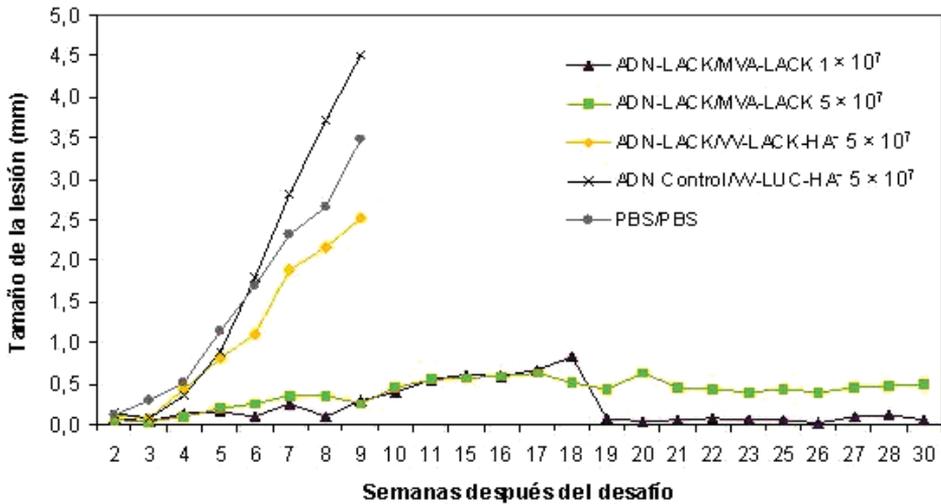


FIGURA 7. Protección frente a leishmaniasis en modelo murino mediante la inmunización sucesiva con DNA y un virus atenuado de vaccinia (estirpe MVA), en la que ambos vectores expresan el antígeno LACK de *L. infantum*. Ratonas Balb/c fueron inoculados primero con un vector de DNA-LACK seguido al cabo de 3 semanas por una segunda inoculación con el vector MVA-LACK en distintas dosis. Dos semanas más tarde se produjo el desafío con promastigotes de *L. major*, y el grado de infección por medida de la lesión en la pata fue seguido en el tiempo. En la figura se observa que se ha producido protección en los ratones inmunizados con la combinación DNA-LACK/MVA-LACK.

expanden. Actualmente el grupo que lidera el español Pedro Alonso está llevando a cabo ensayos clínicos en Mozambique con una vacuna basada en la proteína CS fusionada al antígeno de la hepatitis B junto con un adyuvante, obteniendo un 50% de protección frente a casos de malaria en la población de niños menores de cinco años (133). Es predecible que estos porcentajes puedan aumentar por inmunización de distintos vectores expresando el mismo antígeno o con una combinación de otros antígenos de Plasmodium.

Lógicamente cuando se utilizan vectores víricos se produce una respuesta inmune frente al vector que reduce su capacidad inmunogénica cuando se utiliza el mismo vector como *booster*. La respuesta inmunológica que se produce frente al vector se puede evitar mediante el uso de vectores basados en géneros de Poxvirus distintos, ya que hay una pobre reactividad cruzada entre ellos. Esta respuesta inmune frente al propio vector está disminuida en mutantes cuya replicación en células humanas se limita a la fase temprana, como avipoxvirus, o que sólo completan un ciclo de replicación sin progenie como MVA. Es prede-

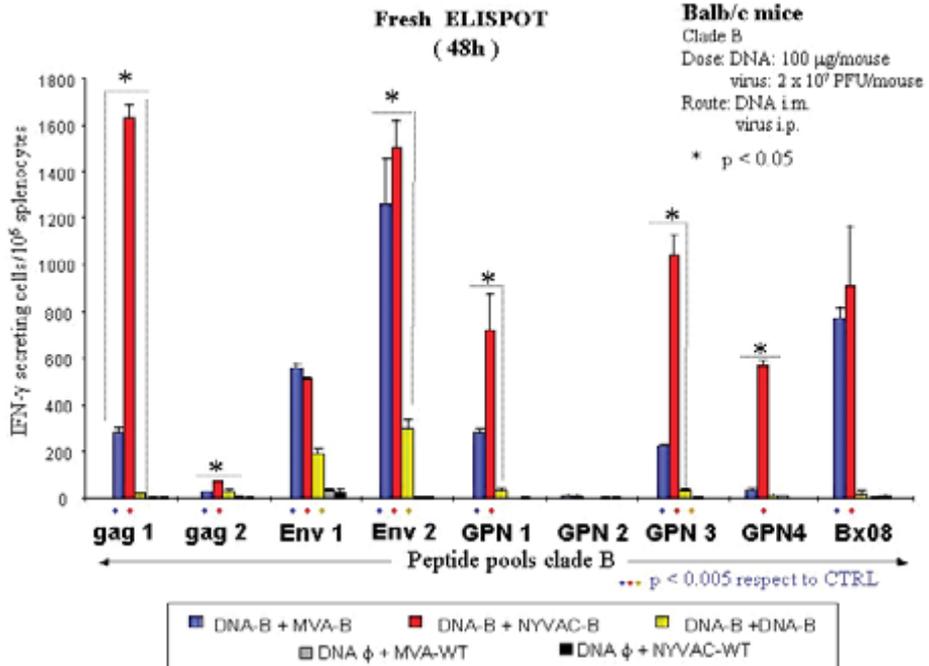


FIGURA 8. Activación de la respuesta inmune celular en ratones inmunizados en procedimientos de prime/boost con varias combinaciones de los vectores de DNA y del virus vacunal (estirpes vacunales MVA y NYVAC) que expresan cuatro antígenos (gp120/Gag-Pol-Nef) del VIH-1 subtipo B. Mediante el ensayo de ELISPOT se mide el número de células T secretoras de IFN-gamma en esplenocitos de ratones inmunizados y que han sido estimulados con mezclas de péptidos de 15 amino ácidos, con 11 amino ácidos solapantes, y que representan la secuencia completa de los cuatro antígenos (Env/Gag-Pol-Nef) del VIH-1. Se observa una buena y amplia respuesta inmune celular inducida por la combinación de vectores DNA/virus vacunal (MVA y NYVAC).

cible que en pocos años se utilicen vacunas basadas en vectores de Poxvirus contra una gran variedad de enfermedades.

Actualmente hay una serie de ensayos clínicos basados en Poxvirus recombinantes contra distintas enfermedades. En el caso del SIDA, hay varios ensayos clínicos que utilizan vectores recombinantes basados en virus atenuados de *vaccinia* que contienen múltiples deleciones en el genoma viral como MVA y NYVAC, o virus de canarios y pollos que no producen progenie en células humanas (para información adicional ver <http://chi.ucsf.edu/vaccines>). Nuestro laboratorio participa en el proyecto europeo de desarrollo de una vacuna contra el SIDA (www.euro-vacc.org), para lo cual hemos generado y patentado virus recombinantes de MVA que expresan en un mismo locus viral los genes *env/gag-pol-nef* del VIH procedente de aislados europeo (serotipo B) y asiático (serotipo C) y que inducen en

modelos animales una respuesta inmune específica de células T CD8+ frente a las distintas proteínas del VIH (Gómez y col. 2006, en prensa).

Con la colaboración de EuroVacc, se han completado ensayos clínicos en fase I con los vectores de DNA y NYVAC que expresan los cuatro antígenos del VIH, subtipo C, habiéndose observado en voluntarios sanos que la inmunización es segura y que produce una alta respuesta inmune celular frente a los antígenos del VIH. En 2007 se iniciarán ensayos en fase I con el subtipo B como vacuna profiláctica y terapéutica, y es predecible que se lleven a cabo ensayos clínicos en fase IIb en 2007/2008 con la combinación DNA/virus vacunal. En los próximos años conoceremos la eficacia de la vacunación utilizando Poxvirus recombinantes, administrados solos o en asociación con otros vectores. Aún considerando que los ensayos clínicos con los candidatos vacunales actuales frente al VIH se desarrollaran satisfactoriamente, todavía tendremos que esperar hasta al menos el año 2012 para lanzar una vacuna contra el SIDA.

Hacia una nueva generación de vacunas basadas en Poxvirus

Debido a que la familia de Poxvirus codifica proteínas que interfieren con el sistema inmune para evadir las defensas del organismo (106), es importante mejorar la capacidad inmunogénica de estos vectores y producir vectores de nueva generación con mayor capacidad para estimular respuestas inmunes frente al antígeno recombinante. Los vectores como MVA carecen de varias proteínas inmunomoduladoras, pero aún contienen otras capaces de contrarrestar el sistema inmune. Si queremos hacer uso óptimo de estos vectores es necesario eliminar estos genes o añadir otros que co-faciliten dicha respuesta. Nuestro grupo ha demostrado que se puede mejorar el comportamiento del vector MVA frente al VIH mediante la incorporación en el genoma viral de genes inmunomoduladores, como las citoquinas IL-12, IFN γ y el factor GM-CSF. En el proyecto europeo del que soy Coordinador, tenemos como objetivo el identificar los genes de MVA que una vez deletados produzcan un incremento de la respuesta inmune frente a recombinantes de dicho vector.

Los mecanismos inmunológicos que determinan la expansión de las células T CD8+ en el proceso de priming/booster con recombinantes del virus *vaccinia* no se conocen. Se acepta, como se discutió anteriormente, que durante la primera inoculación (*priming*) con un vector (DNA, VLPs, proteína, virus recombinante no relacionado con poxvirus), se produce una moderada activación de células CD8+ producida por pocos epítomos, pero que después de la segunda inoculación (*booster*) con un recombinante de *vaccinia* expresando el mismo antígeno, se produce una

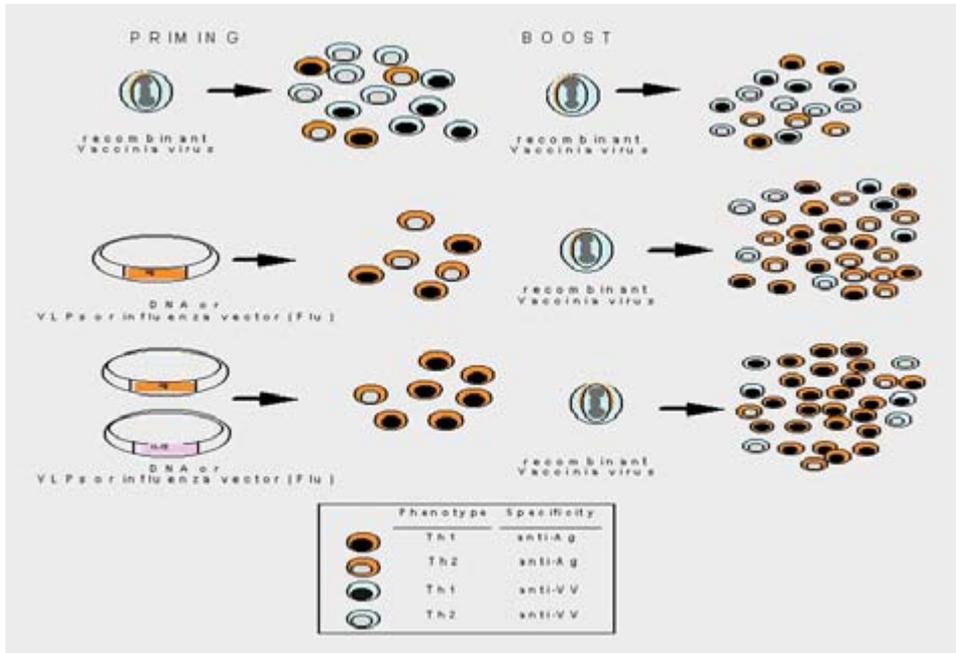


FIGURA 9. Esquema de ampliación de la respuesta inmune específica en procedimientos de prime/boost. Las células T que se amplían frente a antígenos recombinantes se indican con un núcleo negro y color marrón.

fuerte expansión de la población de células CD8+ específicas, además del efecto *priming* en activación de células vírgenes (*naive*). Las células de memoria activadas inicialmente, reaccionan y se expanden más rápidamente. Este potente efecto de expansión mediado por recombinantes de *vaccinia* puede estar relacionado con moléculas virales que inducen inmunomoduladores. Así, en experimentos de análisis por «microarrays» del patrón de expresión de genes celulares humanos después de la infección con vectores de MVA y NYVAC, hemos identificado genes celulares que se inducen por estos virus y que están involucrados en respuesta inmune, proliferación, apoptosis y migración (118).

Aunque los Poxvirus codifican por un buen número de proteínas que controlan el sistema del complemento, interferones y otras citoquinas y quimoquinas, es probable que muchas de estas moléculas modulen, en alguna medida, la acción del sistema inmune (134). En el caso de MVA, el genoma de éste virus no contiene receptores solubles de citoquinas, como IFN- α/β , IFN- γ , TNF o la proteína que se une a quimoquina. Hemos propuesto que para una mayor eficacia de *vaccinia* como vacuna es necesario inactivar selectivamente inhibidores virales de la

función del sistema inmune o incorporar citoquinas en el genoma del virus (135). De esta forma se podrá modular la respuesta inmune frente a antígenos que son específicos. Nuestro laboratorio ha demostrado que esta segunda aproximación es eficaz, al observar que la expresión de IL-12 puede modular de forma positiva o negativa (por producción de óxido nítrico) la expansión de células T CD8+ específicas frente a la proteína env del VIH (136). Utilizando IL-12, hemos establecido un protocolo de inmunización combinada de *prime/booster* con DNA y un recombinante de *vaccinia* expresando ambos la proteína env de VIH que aumenta fuertemente la producción de células T CD8+ específicas para VIH. Debido al papel tan importante que tiene IL-12 en la regulación del sistema inmune, polarizando el sistema hacia el subtipo Th1 y a su interés en terapias antivirales, anti-tumorales e inmunomoduladoras, y al efecto sinérgico que IL-18 ejerce sobre IL-12 en protección (137), estamos llevando a cabo un estudio sobre optimización del uso de estas citoquinas en protección frente patógenos en modelos animales. También estamos inactivando de forma selectiva genes de MVA y de NYVAC que codifican por citoquinas, quimoquinas, TLRs, apoptosis y que definen el rango de hospedador, para usarlos como vectores vacunales contra distintas patologías, como SIDA y leishmaniosis.

En función de todo lo mencionado anteriormente y de la experiencia acumulada del laboratorio en el desarrollo de estrategias de inmunización frente a patógenos, especialmente frente a malaria, VIH y Leishmania (www.cnb.uam.es), y la posibilidad de llevar a cabo los primeros ensayos clínicos con alguno de los inmunógenos generados por nosotros (caso de recombinantes de MVA que expresan en un mismo locus los genes env/gag-pol-nef del VIH-1, subtipos B y C), nos hemos propuesto como continuación a nuestras investigaciones llevar a cabo un estudio detallado de optimización y caracterización de la respuesta inmune por vectores de las cepas atenuadas de *vaccinia* MVA y NYVAC (este último carece de 18 genes deletados selectivamente) que expresan antígenos del VIH, así como abrir nuevos campos de investigación en la generación y caracterización de nuevas vacunas contra hepatitis C y cáncer de próstata. Aunque se trata de distintas enfermedades, existe un común denominador entre los tres sistemas, y es que utilizan los mismos vectores pero con distintos antígenos. Así pues, en los próximos años generaremos nuevos vectores atenuados de MVA y NYVAC con deleciones e inserciones específicas y se estudiará la respuesta inmune y capacidad de inducir protección en modelos animales (ratón y monos). La finalidad es obtener en tres-cuatro años un vector modelo de MVA/NYVAC que reúna todas las condiciones óptimas de inducción de una respuesta celular específica frente a las proteínas del VIH, para su ensayo clínico como vacunas de segunda/tercera generación frente al SIDA. Asimismo estos vectores optimizados de

MVA/NYVAC se utilizarán para expresar proteínas de hepatitis C y de tumores (melanoma y cáncer de próstata), como posibles vacunas contra estas enfermedades. Se establecerán parámetros inmunológicos que se correlacionen con protección y se seleccionarán los mejores vectores para ensayos clínicos como nuevas vacunas contra distintas enfermedades .

TRANSFERENCIA DE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA A LA CLÍNICA: PROMOCIÓN DE ENSAYOS CLÍNICOS EN FASE I/II

Aunque está establecido que la investigación es fuente de progreso para la sociedad, una gran dificultad que encontramos los investigadores es la casi imposibilidad de trasladar la investigación básica a la clínica. Esta dificultad se basa fundamentalmente en la falta de financiación, ya que generalmente los proyectos básicos no contemplan ayudas para realizar ensayos clínicos en fase I (con un reducido número de voluntarios sanos, entre 12-20 por brazo). Además, la financiación que se consigue es por un período limitado, generalmente tres años, por lo que cuando se acaba el proyecto se paraliza la actividad investigadora. Otro factor es que los ensayos clínicos se tienen que realizar con material preparado en condiciones GMP (*good manufacture practice*), lo que redundará en un mayor coste económico. El argumento de que las empresas tienen que acarrear con los costes de los ensayos clínicos en fase I tiene la desventaja de que cada empresa mira por sus intereses e invierte solo en aquellos ensayos que son beneficiosos para la empresa, por lo que sólo un número muy limitado de productos entran en fase clínica, como mencionamos al principio de este trabajo. Así pues, la dificultad de obtener financiación en convocatorias nacionales o del Programa Marco de la UE para la realización de ensayos clínicos en fase I, condiciona la posibilidad de que investigadores de centros públicos en colaboración con hospitales puedan involucrarse en ensayos clínicos dirigidos a determinar la eficacia de nuevos productos biológicos con interés sanitario. Actualmente hay más de un millar de ensayos clínicos iniciados (www.wiley.co.uk/genmed/clinical/), mayoritariamente dedicados al tratamiento de enfermedades oncológicas, seguido de enfermedades monogénicas, cardiovasculares e infecciosas, sobre todo en SIDA.

¿Cuáles son las opciones en España? Una posibilidad es asociarse con una empresa para que lleve a cabo todos los ensayos clínicos, con la dificultad que conlleva el que la empresa se interese por el producto. Otra posibilidad es la creación de empresas *start-up*, que tan buen resultado han dado en EEUU, en Francia, Reino Unido y Alemania. En mis años de dirección en el CNB se crearon cuatro empresas en biotecnología, alguna de las cuales está iniciando ensayos clínicos en fase I. Es necesari-

rio estimular y fomentar desde los organismos públicos, Gobierno y CC. AA, la creación de estas empresas en España para incorporar el excelente potencial humano de investigadores jóvenes que trabajan dentro y fuera de nuestro país. Además, el sector privado debe involucrarse más activamente en la financiación de los ensayos clínicos en fase I, y ser la empresa la que tome el control en las fases II/III. Como ejemplo, tenemos el caso de la Fundación EuroVacc, de la que soy miembro fundador. Dicha fundación surge después de obtener financiación del V Programa Marco de la UE, ante la imposibilidad de llevar a término los ensayos clínicos en fase I con los inmunógenos previamente generados contra el VIH/SIDA al finalizar los proyectos concedidos por la UE. Ante esta situación, Eurovacc ha establecido convenios con instituciones americanas, fundaciones, y acuerdos con empresas del sector farmacéutico, para continuar con los ensayos clínicos y avanzar en el objetivo de desarrollo de una vacuna contra el SIDA. Así pues, debemos establecer mecanismos ágiles que posibiliten la transferencia de tecnología desde la ciencia básica a la clínica.

PROTECCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN: PATENTES

Lógicamente para que un nuevo producto tenga interés industrial, debe de estar protegido a través de una patente y tener la precaución de patentar antes de publicar. España no ha tenido tradición en proteger la actividad investigadora, y aunque muchas patentes internacionales se basan en trabajos realizados por investigadores españoles, sin embargo las invenciones no fueron patentadas. El CSIC, que es el mayor organismo de investigación de España, con una plantilla de más de 3000 investigadores, generó unos ingresos de alrededor de dos millones de euros por patentes en 2003, cantidad muy exigua si se compara con lo que generan algunas universidades americanas con mucho menor personal científico. Los costes derivados del mantenimiento de una patente limitan a que los centros públicos mantengan en vigor la patente por períodos largos. El objetivo fundamental de los centros públicos con patentes es conceder una licencia a una empresa para su explotación y obtener beneficios en caso de explotación comercial. La patentabilidad de las invenciones es una asignatura pendiente en España. Es necesario dotar y fortalecer las unidades de transferencia de tecnología de los centros públicos de investigación en España.

EPÍLOGO

Es indudable que el descubrimiento de los interferones y la aplicación de la vacunación constituyen grandes logros de la humanidad para combatir enfermedades. Los avances científicos en estos temas nos están abriendo las puertas para luchar

contra aquellas otras enfermedades para las que aún no tenemos herramientas eficaces de control. Esto supone grandes retos y dificultades. Ya Pasteur, cien años después de que Jenner demostrara la vacunación contra la viruela, tuvo grandes dificultades para convencer a la sociedad de que la generación espontánea no existía y que son los microorganismos los que llevan a cabo los cambios químicos, los procesos de fermentación (vino, cerveza) y las enfermedades. Las experiencias del pasado nos han enseñado a entender que las repercusiones de la ciencia a la sociedad no son inmediatas en el tiempo. Hay que constatar que la mayor parte del trabajo científico no tiene aplicación directa aunque si la tiene en el avance del conocimiento. Muy pocas moléculas alcanzan la fase clínica, pues como he comentado anteriormente, desde el descubrimiento a la aplicación terapéutica de un producto pueden transcurrir 10 años con unos costes del orden de 600 millones de euros.

Es obvio que las aplicaciones que surgen de estos conocimientos y que inciden directamente sobre los seres humanos estén sujetas a normativas. La comunidad científica siempre ha sido la primera en alertar del impacto de la investigación a la sociedad. Sin embargo no conviene confundir entre avance del conocimiento, que es lo que la ciencia siempre produce, y las malas aplicaciones de su uso. La realidad de la ciencia está reflejada en el fundamento del método de Rene Descartes (1596-1650) en «no admitir como verdadera cosa alguna que no se sepa con evidencia que lo es». La ciencia no puede estar sometida a restricciones legales de cómo hacer ciencia, pues ésta ha de ser siempre creativa. La ciencia no tiene fronteras y los países con más desarrollo económico e industrial son aquellos que mas invierten en ciencia. La ciencia da credibilidad al país donde se realiza y es una tarjeta de presentación para los Gobiernos que la apoyan. Como comentó en un discurso el que fue primer Presidente del Gobierno de la India, Jawaharlal Nehru (1889-1964) «el futuro pertenece a la ciencia y a los que se hacen amigos de la ciencia». Las contribuciones de la ciencia a la mejora de la calidad de vida de las personas son enormes y aún serán mayores en el futuro, a medida que vayamos entendiendo la función de cada uno de nuestros genes y lo que nos rodea. Aunque las enfermedades siempre estarán con nosotros, sin embargo su control será cada día mejor. Todos queremos vivir mejor, por eso la ciencia siempre acaba triunfando.

Podemos concluir con satisfacción que el trabajo llevado a cabo por Balmis en vacunación hace 200 años tiene su continuidad en nuestro país, con la aportación de otros grupos españoles, entre los que me incluyo, que mantenemos el mismo entusiasmo y abnegación en el estudio de enfermedades de gran impacto social. Indudablemente Balmis no hubiera conseguido sus objetivos sin la ayuda de la Corona. Tampoco nosotros podríamos alcanzar nuestros objetivos científicos sin las ayudas recibidas por distintas instituciones americanas, europeas y funda-

ciones. La lección de Balmis de ser generoso con los demás, contando con ayuda institucional, la podemos aplicar a nuestros días. España está produciendo científicos de excelencia, pero que necesitan del apoyo de nuestras instituciones para que podamos alcanzar el lugar que nos corresponde como país en las ciencias biomédicas y contribuir al desarrollo de nuevas vacunas contra enfermedades que nos afectan a todos y sobremanera a los países pobres. Ese es nuestro reto.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es una adaptación del discurso de toma de posesión como Académico de Número de la RANF el día 26 de enero 2006. Mi agradecimiento a todo el personal que ha trabajado y sigue trabajando en mi laboratorio, así como a los distintos organismos nacionales (Plan Nacional, FIS, FIPSE, Fundación Botín) e internacionales (NIH, Unión Europea, Fundación Gates), que financian la investigación de mi grupo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferreria, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline,

- S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigo, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yo-seph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh, and X. Zhu. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351.
2. Collins, F. S., M. Morgan, and A. Patrinos. 2003. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science* 300:286-290.
 3. Snow, R. W., M. Craig, U. Deichmann, and K. Marsh. 1999. Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population. *Bull World Health Organ* 77:624-640.
 4. Ashford, R. W., P. Desjeux, and P. Deraadt. 1992. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. *Parasitol Today* 8:104-105.
 5. 2000. WHO/LEISH. *World Health Organization* 42:1-12.
 6. Gonzalo, R. M., D. Rodriguez, A. Garcia-Sastre, J. R. Rodriguez, P. Palese, and M. Esteban. 1999. Enhanced CD8+ T cell response to HIV-1 env by combined immunization with influenza and vaccinia virus recombinants. *Vaccine* 17:887-892.
 7. Gonzalo, R. M., J. R. Rodriguez, D. Rodriguez, G. Gonzalez-Aseguinolaza, V. Larraga, and M. Esteban. 2001. Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. *Microbes Infect* 3:701-711.
 8. Gradoni, L. 2001. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol* 100:87-103.
 9. Berrahal, F., C. Mary, M. Roze, A. Berenger, K. Escoffier, D. Lamouroux, and S. Dunan. 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 55:273-277.

10. Lanotte, G., J. A. Rioux, J. Perieres, and Y. Vollhardt. 1979. [Ecology of leishmaniasis in the south of France. 10. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology. (author's transl)]. *Ann Parasitol Hum Comp* 54:277-295.
11. 1995. WHO/LEISH. *World Health Organization* 95:1-14.
12. 2005. UNIAIDS, WHO. *World Health Organization*.
13. Kaufmann, S. H., and A. J. McMichael. 2005. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat Med* 11:S33-44.
14. Shepard, C. W., L. Finelli, and M. J. Alter. 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5:558-567.
15. Shimotohno, K. 2000. Hepatitis C virus and its pathogenesis. *Semin Cancer Biol* 10:233-240.
16. Kochanek, K. D., S. L. Murphy, R. N. Anderson, and C. Scott. 2004. Deaths: final data for 2002. *Natl Vital Stat Rep* 53:1-115.
17. Moynagh, P. N. 2005. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol* 26:469-476.
18. Bowie, A. G., and I. R. Haga. 2005. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol Immunol* 42:859-867.
19. Isaacs, A., and J. Lindenmann. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147:258-267.
20. Isaacs, A., J. Lindenmann, and R. C. Valentine. 1957. Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147:268-273.
21. Plataniias, L. C. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5:375-386.
22. Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman, and R. D. Schreiber. 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67:227-264.
23. Pestka, S., C. D. Krause, and M. R. Walter. 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202:8-32.
24. Pestka, S., J. A. Langer, K. C. Zoon, and C. E. Samuel. 1987. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 56:727-777.
25. Katze, M. G., Y. He, and M. Gale, Jr. 2002. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2:675-687.
26. Taniguchi, T., Y. Fujii-Kuriyama, and M. Muramatsu. 1980. Molecular cloning of human interferon cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:4003-4006.
27. Taniguchi, T., L. Guarente, T. M. Roberts, D. Kimelman, J. Douhan, 3rd, and M. Ptashne. 1980. Expression of the human fibroblast interferon gene in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:5230-5233.

28. Darnell, J. E., Jr., I. M. Kerr, and G. R. Stark. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415-1421.
29. Bach, E. A., M. Aguet, and R. D. Schreiber. 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15:563-591.
30. Darnell, J. E., Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-1635.
31. Der, S. D., A. Zhou, B. R. Williams, and R. H. Silverman. 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15623-15628.
32. Samuel, C. E. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14:778-809, table of contents.
33. Metz, D. H., and M. Esteban. 1972. Interferon inhibits viral protein synthesis in L cells infected with vaccinia virus. *Nature* 238:385-388.
34. Esteban, M., and D. H. Metz. 1973. Inhibition of early vaccinia virus protein synthesis in interferon-treated chicken embryo fibroblasts. *J Gen Virol* 20:111-115.
35. Friedman, R. M., R. M. Esteban, D. H. Metz, D. R. Tovell, I. M. Kerr, and R. Williamson. 1972. Translation of RNA by L cell extracts: Effect of interferon. *FEBS Lett* 24:273-277.
36. Friedman, R. M., D. H. Metz, R. M. Esteban, D. R. Tovell, L. A. Ball, and I. M. Kerr. 1972. Mechanism of interferon action: inhibition of viral messenger ribonucleic acid translation in L-cell extracts. *J Virol* 10:1184-1198.
37. Metz, D. H., M. Esteban, and G. Danielescu. 1975. The formation of virus polyribosomes in L cells infected with vaccinia virus. *J Gen Virol* 27:181-195.
38. Barber, G. N. 2005. The dsRNA-dependent protein kinase, PKR and cell death. *Cell Death Differ* 12:563-570.
39. Williams, B. R. 1999. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18:6112-6120.
40. Fierro-Monti, I., and M. B. Mathews. 2000. Proteins binding to duplexed RNA: one motif, multiple functions. *Trends Biochem Sci* 25:241-246.
41. Schneider, R. J., and I. Mohr. 2003. Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem Sci* 28:130-136.
42. Gil, J. a. E. M. 2004. Vaccinia virus recombinants as a model system to analyze IFN-induced pathways. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 24.
43. Droin, N. M., and D. R. Green. 2004. Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. *Biochim Biophys Acta* 1644:179-188.

44. Gil, J., J. Alcami, and M. Esteban. 2000. Activation of NF-kappa B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR involves the I kappa B kinase complex. *Oncogene* 19:1369-1378.
45. Gil, J., and M. Esteban. 2000. The interferon-induced protein kinase (PKR), triggers apoptosis through FADD-mediated activation of caspase 8 in a manner independent of Fas and TNF-alpha receptors. *Oncogene* 19:3665-3674.
46. Baldwin, A. S., Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14:649-683.
47. Beg, A. A., and D. Baltimore. 1996. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274:782-784.
48. Gil, J., M. A. Garcia, P. Gomez-Puertas, S. Guerra, J. Rullas, H. Nakano, J. Alcami, and M. Esteban. 2004. TRAF family proteins link PKR with NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* 24:4502-4512.
49. Lee, S. B., and M. Esteban. 1994. The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis. *Virology* 199:491-496.
50. Riedl, S. J., and Y. Shi. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:897-907.
51. Bossy-Wetzel, E., D. D. Newmeyer, and D. R. Green. 1998. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J* 17:37-49.
52. Chawla-Sarkar, M., D. J. Lindner, Y. F. Liu, B. R. Williams, G. C. Sen, R. H. Silverman, and E. C. Borden. 2003. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* 8:237-249.
53. Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, M. Saito, S. Weiler, K. J. Oh, and P. H. Schlesinger. 2000. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7:1166-1173.
54. Li, G., Y. Xiang, K. Sabapathy, and R. H. Silverman. 2004. An apoptotic signaling pathway in the interferon antiviral response mediated by RNase L and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Biol Chem* 279:1123-1131.
55. Martin, A. G., and H. O. Fearnhead. 2002. Apocytochrome c blocks caspase-9 activation and Bax-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277:50834-50841.
56. Martinou, J. C., S. Desagher, and B. Antonsson. 2000. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol* 2:E41-43.
57. Ricci, J. E., R. A. Gottlieb, and D. R. Green. 2003. Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biol* 160:65-75.

58. Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15:2922-2933.
59. Gil, J., M. A. Garcia, and M. Esteban. 2002. Caspase 9 activation by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR: molecular mechanism and relevance. *FEBS Lett* 529:249-255.
60. Jagus, R., B. Joshi, and G. N. Barber. 1999. PKR, apoptosis and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 31:123-138.
61. Vorburger, S. A., A. Pataer, S. G. Swisher, and K. K. Hunt. 2004. Genetically targeted cancer therapy: tumor destruction by PKR activation. *Am J Pharmacogenomics* 4:189-198.
62. Kerr, I. M., and R. E. Brown. 1978. pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:256-260.
63. Mashimo, T., P. Glaser, M. Lucas, D. Simon-Chazottes, P. E. Ceccaldi, X. Montagutelli, P. Despres, and J. L. Guenet. 2003. Structural and functional genomics and evolutionary relationships in the cluster of genes encoding murine 2',5'-oligoadenylate synthetases. *Genomics* 82:537-552.
64. Zhou, A., B. A. Hassel, and R. H. Silverman. 1993. Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell* 72:753-765.
65. Rebouillat, D., and A. G. Hovanessian. 1999. The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res* 19:295-308.
66. Carpten, J., N. Nupponen, S. Isaacs, R. Sood, C. Robbins, J. Xu, M. Faruque, T. Moses, C. Ewing, E. Gillanders, P. Hu, P. Bujnovszky, I. Makalowska, A. Baffoe-Bonnie, D. Faith, J. Smith, D. Stephan, K. Wiley, M. Brownstein, D. Gildea, B. Kelly, R. Jenkins, G. Hostetter, M. Matikainen, J. Schleutker, K. Klinger, T. Connors, Y. Xiang, Z. Wang, A. De Marzo, N. Papadopoulos, O. P. Kallioniemi, R. Burk, D. Meyers, H. Gronberg, P. Meltzer, R. Silverman, J. Bailey-Wilson, P. Walsh, W. Isaacs, and J. Trent. 2002. Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. *Nat Genet* 30:181-184.
67. Silverman, R. H. 2003. Implications for RNase L in prostate cancer biology. *Biochemistry* 42:1805-1812.
68. Diaz-Guerra, M., C. Rivas, and M. Esteban. 1997. Inducible expression of the 2-5A synthetase/RNase L system results in inhibition of vaccinia virus replication. *Virology* 227:220-228.
69. Diaz-Guerra, M., C. Rivas, and M. Esteban. 1997. Activation of the IFN-inducible enzyme RNase L causes apoptosis of animal cells. *Virology* 236:354-363.

70. Castelli, J. C., B. A. Hassel, A. Maran, J. Paranjape, J. A. Hewitt, X. L. Li, Y. T. Hsu, R. H. Silverman, and R. J. Youle. 1998. The role of 2'-5' oligoadenylate-activated ribonuclease L in apoptosis. *Cell Death Differ* 5:313-320.
71. Domingo-Gil, E., and M. Esteban. 2006. Role of mitochondria in apoptosis induced by the 2-5A system and mechanisms involved. *Apoptosis* 11:725-738.
72. Hengel, H., U. H. Koszinowski, and K. K. Conzelmann. 2005. Viruses know it all: new insights into IFN networks. *Trends Immunol* 26:396-401.
73. Paez, E., and M. Esteban. 1984. Resistance of vaccinia virus to interferon is related to an interference phenomenon between the virus and the interferon system. *Virology* 134:12-28.
74. McFadden, G. 2005. Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol* 3:201-213.
75. Moss, B., and J. L. Shisler. 2001. Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes. *Semin Immunol* 13:59-66.
76. Beattie, E., K. L. Denzler, J. Tartaglia, M. E. Perkus, E. Paoletti, and B. L. Jacobs. 1995. Reversal of the interferon-sensitive phenotype of a vaccinia virus lacking E3L by expression of the reovirus S4 gene. *J Virol* 69:499-505.
77. Chang, H. W., J. C. Watson, and B. L. Jacobs. 1992. The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4825-4829.
78. Rivas, C., J. Gil, Z. Melkova, M. Esteban, and M. Diaz-Guerra. 1998. Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (i.f.n.)-induced 2-5A synthetase enzyme. *Virology* 243:406-414.
79. Sharp, T. V., F. Moonan, A. Romashko, B. Joshi, G. N. Barber, and R. Jagus. 1998. The vaccinia virus E3L gene product interacts with both the regulatory and the substrate binding regions of PKR: implications for PKR autoregulation. *Virology* 250:302-315.
80. Beattie, E., E. Paoletti, and J. Tartaglia. 1995. Distinct patterns of IFN sensitivity observed in cells infected with vaccinia K3L- and E3L- mutant viruses. *Virology* 210:254-263.
81. Gil, J., J. Rullas, J. Alcamí, and M. Esteban. 2001. MC159L protein from the poxvirus molluscum contagiosum virus inhibits NF-kappaB activation and apoptosis induced by PKR. *J Gen Virol* 82:3027-3034.
82. Brun, A., C. Rivas, M. Esteban, J. M. Escribano, and C. Alonso. 1996. African swine fever virus gene A179L, a viral homologue of bcl-2, protects cells from programmed cell death. *Virology* 225:227-230.
83. Suarez, P., M. Diaz-Guerra, C. Prieto, M. Esteban, J. M. Castro, A. Nieto, and J. Ortin. 1996. Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J Virol* 70:2876-2882.

84. Esteban, M., M. A. Garcia, E. Domingo-Gil, J. Arroyo, C. Nombela, and C. Rivas. 2003. The latency protein LANA2 from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus inhibits apoptosis induced by dsRNA-activated protein kinase but not RNase L activation. *J Gen Virol* 84:1463-1470.
85. Patel, R. C., and G. C. Sen. 1998. PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *Embo J* 17:4379-4390.
86. Barber, G. N., S. Thompson, T. G. Lee, T. Strom, R. Jagus, A. Darveau, and M. G. Katze. 1994. The 58-kilodalton inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase is a tetratricopeptide repeat protein with oncogenic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4278-4282.
87. Gil, J., M. Esteban, and D. Roth. 2000. In vivo regulation of the dsRNA-dependent protein kinase PKR by the cellular glycoprotein p67. *Biochemistry* 39:16016-16025.
88. Munoz-Fontela, C., M. Angel Garcia, I. Garcia-Cao, M. Collado, J. Arroyo, M. Esteban, M. Serrano, and C. Rivas. 2005. Resistance to viral infection of super p53 mice. *Oncogene*.
89. Garcia, M. A., M. Collado, C. Munoz-Fontela, A. Matheu, L. Marcos-Villar, J. Arroyo, M. Esteban, M. Serrano, and C. Rivas. 2006. Antiviral action of the tumor suppressor ARF. *Embo J* 25:4284-4292.
90. Guerra, S., L. A. Lopez-Fernandez, M. A. Garcia, A. Zaballos, and M. Esteban. 2006. Human gene profiling in response to the active protein kinase, interferon-induced serine/threonine protein kinase (PKR), in infected cells. Involvement of the transcription factor ATF-3 IN PKR-induced apoptosis. *J Biol Chem* 281:18734-18745.
91. Borden, E. C. 2005. Review: Milstein Award lecture: interferons and cancer: where from here? *J Interferon Cytokine Res* 25:511-527.
92. Arnason, B. G. 2005. Long-term experience with interferon beta-1b (Betaferon) in multiple sclerosis. *J Neurol* 252 Suppl 3:iii28-iii33.
93. Jacobson, I. M., S. A. Gonzalez, F. Ahmed, E. Lebovics, A. D. Min, H. C. Bodenheimer, Jr., S. P. Esposito, R. S. Brown, Jr., N. Brau, F. M. Klion, H. Tobias, E. J. Bini, N. Brodsky, M. A. Cerulli, A. Aytaman, P. W. Gardner, J. M. Geders, J. E. Spivack, M. G. Rahmin, D. H. Berman, J. Ehrlich, M. W. Russo, M. Chait, D. Rovner, and B. R. Edlin. 2005. A randomized trial of pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin in the retreatment of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 100:2453-2462.
94. Smith, G. L., and G. McFadden. 2002. Smallpox: anything to declare? *Nat Rev Immunol* 2:521-527.
95. Sutter, G., L. S. Wyatt, P. L. Foley, J. R. Bennink, and B. Moss. 1994. A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine* 12:1032-1040.

96. Syed, V., K. Mukherjee, J. Lyons-Weiler, K. M. Lau, T. Mashima, T. Tsuruo, and S. M. Ho. 2005. Identification of ATF-3, caveolin-1, DLC-1, and NM23-H2 as putative antitumorigenic, progesterone-regulated genes for ovarian cancer cells by gene profiling. *Oncogene* 24:1774-1787.
97. Fenner, F., Anderson, D.A., Arita, I., Jezek, Z and Ladnyi, I.D. 1988. *Smallpox and its eradication*. World Health Organization, Geneva.
98. Jenner, E. 1799. *Further observations on the variola vaccine*. Sampson Low, London.
99. Jenner, E. 1799. *An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccine, a disease discovered in some of the Western Countries of England, particularly Gloucestershire and known by the name of Cow-pox*. Sampson Low.
100. Baxby, D. 1999. Edward Jenner's Inquiry; a bicentenary analysis. *Vaccine* 17:301-307.
101. Ramirez, S., Valenciano, L., Nájera, R, and Enjuanes, L. 2004. *La Real Expedición Filantrópica de la Vacuna: doscientos años de lucha contra la viruela*, Madrid.
102. Berche, P. 2001. The threat of smallpox and bioterrorism. *Trends Microbiol* 9:15-18.
103. Moss, B. 2001. *Poxviruses and their replication*. Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia.
104. Lewis-Jones, S. 2004. Zoonotic poxvirus infections in humans. *Curr Opin Infect Dis* 17:81-89.
105. Bray, M., and C. J. Roy. 2004. Antiviral prophylaxis of smallpox. *J Antimicrob Chemother* 54:1-5.
106. Seet, B. T., J. B. Johnston, C. R. Brunetti, J. W. Barrett, H. Everett, C. Cameron, J. Sypula, S. H. Nazarian, A. Lucas, and G. McFadden. 2003. Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol* 21:377-423.
107. Moss, B. 1996. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11341-11348.
108. Paoletti, E. 1996. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11349-11353.
109. Smith, G. L., A. Vanderplasschen, and M. Law. 2002. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J Gen Virol* 83:2915-2931.
110. Cudmore, S., P. Cossart, G. Griffiths, and M. Way. 1995. Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* 378:636-638.
111. de Magalhaes, J. C., A. A. Andrade, P. N. Silva, L. P. Sousa, C. Ropert, P. C. Ferreira, E. G. Kroon, R. T. Gazzinelli, and C. A. Bonjardim. 2001. A mitogenic signal triggered at an early stage of vaccinia virus infection: implication of MEK/ERK and protein kinase A in virus multiplication. *J Biol Chem* 276:38353-38360.

112. Cyrklaff, M., C. Risco, J. J. Fernandez, M. V. Jimenez, M. Esteban, W. Baumeister, and J. L. Carrascosa. 2005. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2772-2777.
113. Gubser, C., S. Hue, P. Kellam, and G. L. Smith. 2004. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol* 85:105-117.
114. Massung, R. F., L. I. Liu, J. Qi, J. C. Knight, T. E. Yuran, A. R. Kerlavage, J. M. Parsons, J. C. Venter, and J. J. Esposito. 1994. Analysis of the complete genome of smallpox variola major virus strain Bangladesh-1975. *Virology* 201:215-240.
115. Lai, C. F., S. C. Gong, and M. Esteban. 1991. The purified 14-kilodalton envelope protein of vaccinia virus produced in *Escherichia coli* induces virus immunity in animals. *J Virol* 65:5631-5635.
116. Bieniasz, P. D. 2004. Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat Immunol* 5:1109-1115.
117. Chaudhri, G., V. Panchanathan, R. M. Buller, A. J. van den Eertwegh, E. Claassen, J. Zhou, R. de Chazal, J. D. Laman, and G. Karupiah. 2004. Polarized type 1 cytokine response and cell-mediated immunity determine genetic resistance to mousepox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9057-9062.
118. Guerra, S., L. A. Lopez-Fernandez, R. Conde, A. Pascual-Montano, K. Harshman, and M. Esteban. 2004. Microarray analysis reveals characteristic changes of host cell gene expression in response to attenuated modified vaccinia virus Ankara infection of human HeLa cells. *J Virol* 78:5820-5834.
119. Guerra, S., L. A. Lopez-Fernandez, A. Pascual-Montano, M. Munoz, K. Harshman, and M. Esteban. 2003. Cellular gene expression survey of vaccinia virus infection of human HeLa cells. *J Virol* 77:6493-6506.
120. Guerra, S., M. Aracil, R. Conde, A. Bernad, and M. Esteban. 2005. Wiskott-Aldrich syndrome protein is needed for vaccinia virus pathogenesis. *J Virol* 79:2133-2140.
121. Guerra, S., L. A. Lopez-Fernandez, A. Pascual-Montano, J. L. Najera, A. Zaballo, and M. Esteban. 2006. Host response to the attenuated poxvirus vector NYVAC: upregulation of apoptotic genes and NF-kappaB-responsive genes in infected HeLa cells. *J Virol* 80:985-998.
122. Staib, C., I. Drexler, and G. Sutter. 2004. Construction and isolation of recombinant MVA. *Methods Mol Biol* 269:77-100.
123. Pastoret, P. P., and A. Vanderplasschen. 2003. Poxviruses as vaccine vectors. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 26:343-355.
124. Mayr, A., H. Stickl, H. K. Muller, K. Danner, and H. Singer. 1978. [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol [B]* 167:375-390.

125. Moss, B., M. W. Carroll, L. S. Wyatt, J. R. Bennink, V. M. Hirsch, S. Goldstein, W. R. Elkins, T. R. Fuerst, J. D. Lifson, M. Piatak, N. P. Restifo, W. Overwijk, R. Chamberlain, S. A. Rosenberg, and G. Sutter. 1996. Host range restricted, non-replicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates. *Adv Exp Med Biol* 397:7-13.
126. Sutter, G., and C. Staib. 2003. Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr Drug Targets Infect Disord* 3:263-271.
127. Li, S., M. Rodrigues, D. Rodriguez, J. R. Rodriguez, M. Esteban, P. Palese, R. S. Nussenzweig, and F. Zavala. 1993. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5214-5218.
128. Rodrigues, M., S. Li, K. Murata, D. Rodriguez, J. R. Rodriguez, I. Bacik, J. R. Bennink, J. W. Yewdell, A. Garcia-Sastre, R. S. Nussenzweig, and *et al.* 1994. Influenza and vaccinia viruses expressing malaria CD8+ T and B cell epitopes. Comparison of their immunogenicity and capacity to induce protective immunity. *J Immunol* 153:4636-4648.
129. Miyahira, Y., A. Garcia-Sastre, D. Rodriguez, J. R. Rodriguez, K. Murata, M. Tsuji, P. Palese, M. Esteban, F. Zavala, and R. S. Nussenzweig. 1998. Recombinant viruses expressing a human malaria antigen can elicit potentially protective immune CD8+ responses in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3954-3959.
130. Gherardi, M. M., E. Perez-Jimenez, J. L. Najera, and M. Esteban. 2004. Induction of HIV immunity in the genital tract after intranasal delivery of a MVA vector: enhanced immunogenicity after DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost immunization schedule. *J Immunol* 172:6209-6220.
131. Dondji, B., E. Perez-Jimenez, K. Goldsmith-Pestana, M. Esteban, and D. McMahon-Pratt. 2005. Heterologous prime-boost vaccination with the LACK antigen protects against murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 73:5286-5289.
132. Perez-Jimenez, E., G. Kochan, M. M. Gherardi, and M. Esteban. 2006. MVA-LACK as a safe and efficient vector for vaccination against leishmaniasis. *Microbes Infect* 8:810-822.
133. Alonso, P. L., J. Sacarlal, J. J. Aponte, A. Leach, E. Macete, P. Aide, B. Sigauque, J. Milman, I. Mandomando, Q. Bassat, C. Guinovart, M. Espasa, S. Corachan, M. Lievens, M. M. Navia, M. C. Dubois, C. Menendez, F. Dubovsky, J. Cohen, R. Thompson, and W. R. Ballou. 2005. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of Plasmodium falciparum disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet* 366:2012-2018.

134. Alcami, A. 2003. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat Rev Immunol* 3:36-50.
135. Gherardi, M. M., and M. Esteban. 2005. Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors. *J Gen Virol* 86:2925-2936.
136. Gherardi, M. M., J. C. Ramirez, D. Rodriguez, J. R. Rodriguez, G. Sano, F. Zavala, and M. Esteban. 1999. IL-12 delivery from recombinant vaccinia virus attenuates the vector and enhances the cellular immune response against HIV-1 Env in a dose-dependent manner. *J Immunol* 162:6724-6733.
137. Gherardi, M. M., J. C. Ramirez, and M. Esteban. 2003. IL-12 and IL-18 act in synergy to clear vaccinia virus infection: involvement of innate and adaptive components of the immune system. *J Gen Virol* 84:1961-1972.

Reconstitución inmune en niños infectados por VIH

M.^a ÁNGELES MUÑOZ FERNÁNDEZ

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune consiste en una intrincada interacción de células y moléculas organizadas para actuar de forma efectiva frente a procesos dañinos para el organismo. En particular, las infecciones virales son controladas inicialmente por una respuesta específica mediada por linfocitos T. Sin embargo, la infección por VIH supone un desafío para este mecanismo de protección. Nuestro sistema inmune es potencialmente capaz de controlar, en parte, la replicación del VIH como indican un pequeño grupo de pacientes (1%), conocidos como «no progresores a largo plazo» los cuales no progresan a SIDA/enfermedad a pesar de llevar infectados más de 15 años¹. Por añadidura, la respuesta inmune específica frente al virus en pacientes que han estado expuestos al VIH pero no han sido infectados está también documentada². Todas estas observaciones, junto con otras evidencias procedentes de modelos murinos experimentales, sugieren fuertemente que el sistema inmune, realmente, puede ser capaz de controlar la infección por VIH de un modo efectivo si se sintoniza/organiza de la manera adecuada³.

No obstante, los investigadores y clínicos que luchan contra la epidemia del SIDA, de alguna manera, han subestimado durante mucho tiempo la importancia del sistema inmune y su potencial control sobre la replicación viral. Esto ha causado que, hasta muy recientemente, la mayoría de los esfuerzos terapéuticos han estado dirigidos hacia el desarrollo de nuevos agentes antivirales que inhibirían enzimas virales fundamentales y, de ese modo, bloquear el ciclo de infección del virus. Sin embargo, la erradicación del VIH solo por medios farmacológicos parece posible todavía. La implantación de

la terapias antiretrovirales, como la terapia antiretriviral de gran actividad (TARGA), lograron una considerable reducción de la carga viral, y/o una supresión de la replicación viral por debajo de niveles detectables. Esto conduce a un drástico descenso en la mortalidad relacionada con SIDA y la incidencia de infecciones oportunistas ⁴. A pesar de ello, todas estas estrategias terapéuticas anteriormente mencionadas, han fracasado en la eliminación del virus del cuerpo.

Las causas subyacentes de este fracaso están aún bajo debate, aunque dos de las hipótesis parecen ser bastante plausibles. Por un lado, un *pool* de células CD4+ memoria latente infectadas y otros tipos celulares pueden constituir un reservorio para el virus, que de este modo permanecería seguro frente a las terapias antiretrovirales ^{5,6}. Por otro lado, la aparición de resistencias contra el limitado número de drogas actualmente disponibles explica la pérdida de eficacia terapéutica. Como resultado, ninguna terapia actual logra un éxito completo y el sistema inmune es progresivamente deteriorado.

La reconstitución inmune en los pacientes infectados por VIH no es una tarea fácil. Además de la recirculación de las células T «secuestradas» y la rediversificación de los repertorios de células T, un fallo en la producción de células por parte del timo y la homeostasis periférica, pueden ser los elementos clave en la interacción entre las diferentes partes del compartimento linfóide una vez que el virus ha producido un daño severo. Esta reconstitución inmune es particularmente preocupante en los niños infectados por VIH. A causa de las diferentes funciones inmunológicas y metabólicas, los niños tienen una respuesta inmune diferente a la de los adultos. Desde los primeros casos de infección por VIH en niños, se ha hecho claro que la historia natural de la infección era diferente a la de los adultos ⁷⁻⁹. La infección por VIH en niños presenta una distribución bimodal: i) un periodo corto de incubación seguido de una rápida progresión en el curso de la infección, con una severa inmunodeficiencia desarrollada antes de los 18 primeros meses de vida y caracterizada por síntomas clínicos de SIDA; y ii) un lento y crónico desarrollo de la enfermedad similar al modelo descrito en adultos infectados por VIH ^{8,9}. Las nuevas estrategias de tratamiento usadas en los últimos años han modificado además, la apariencia clínica de la infección por VIH en niños, pero que en conjunto inducen la mayoría de los efectos secundarios, muchos de ellos irreversibles.

Esta revisión se centra en el mecanismo subyacente de la reconstitución inmune en niños infectados por VIH, poniendo juntas algunas de las últimas ideas sobre la dinámica de las células T y el papel que juega el timo.

RESPUESTA CELULAR ESPECÍFICA FRENTE AL VIH

El sello distintivo de la infección por VIH es la progresiva eliminación de las células T-CD4+ primarias. La vida media de las células T-CD4+ tras la infección por VIH se acorta de 82 días en individuos controles no infectados a 23 en individuos VIH+¹⁰. Esta linfopenia es debida al tiempo de supervivencia de las células T-CD4+ a un fracaso en el incremento de células T circulantes. Sin embargo, la extensión y la naturaleza de esta depleción celular, y el mecanismo por el cual ello surge es aún tema de debate. La recuperación de los niveles de células T puede ser debido a diferentes mecanismos, incluyendo la redistribución o la expansión periférica de células pre-existentes. Por lo tanto, las localizaciones y mecanismos envueltos en la producción de las células T-CD4+ son las cuestiones clave para entender y promover una apropiada reconstitución del sistema inmune.

Ya que la citopaticidad del virus, por si sola, es incapaz de proporcionar una explicación satisfactoria como causa de la enfermedad, se piensa que otras células del sistema inmune juegan también un papel esencial. Entre ellas, los linfocitos T-CD8+ tienen una función doble en la respuesta celular específica frente al VIH. Por un lado, son los responsables de eliminar las células infectadas. Por otro lado, son cruciales provocando y manteniendo la respuesta inmune específica frente al virus durante toda la fase crónica de infección¹¹⁻¹³. Desde el momento en que las CD4+ empiezan a ser infectadas por el VIH, hay un progresivo descenso en su número que es la clave para el desarrollo de la enfermedad¹⁴. A pesar de los niveles normales de células CD4+ que pueden estar presentes en los estadios más tempranos de la infección, algunas de sus funciones como la capacidad de proliferación están dañadas^{15,16}. Curiosamente, los pacientes infectados por VIH que están en terapia antiretroviral (TAR) pueden presentar respuestas de CD4+ apropiadas contra otros virus como citomegalovirus¹⁷.

A pesar de esta reconstitución inmune en pacientes infectados, es evidente que la respuesta inmune específica frente a VIH no puede ser recuperada después de TAR (figura 1). En particular, estos pacientes se caracterizan por tener células T-CD4+ VIH específicas con funciones efectoras, pero sus precursores («células T cooperadoras») son selectivamente destruidos desde el inicio de la infección¹⁸⁻²⁰. Una posible explicación de esta destrucción celular selectiva podría encontrarse en la masiva replicación viral que tiene lugar en su interior. Niveles elevados de antígenos virales podrían ser liberados, rápidamente consumidos por las células VIH específicas, de modo que el *pool* de células T-CD4+ memoria dejarían indefenso al organismo para controlar la infección³. La ausencia de estas células

Antiretroviral therapy and CD4+ T cell homeostasis

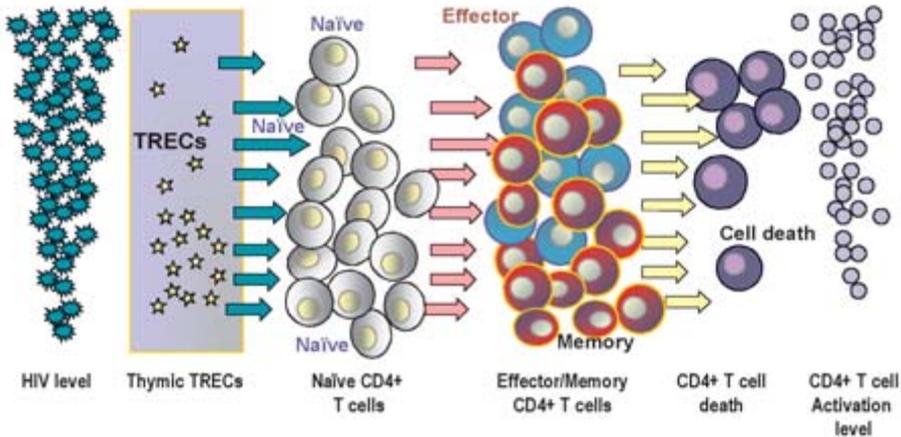


FIGURA 1. *Relación entre el efecto de la terapia antiretroviral y la homeostasis de células T CD4+.* La disminución de la carga viral producida por la TARGA reduce la infección del timo, permitiendo un incremento de la función tímica para poder liberar las células que han emigrado recientemente. De esta forma, las células vírgenes crecen en número en la periferia como consecuencia de este incremento en la producción tímica. Las células T de memoria incrementan principalmente debido a un efecto de redistribución periférica. Se reduce la activación del sistema inmunológico debido al VIH y disminuye la apoptosis.

cooperadoras o sus precursores conducirían entonces a un progresivo descenso de las diferentes subpoblaciones T-CD4+ VIH específicas. Esto, a lo largo de la depleción celular inducida por el virus, explicaría el drástico descenso de las células T-CD4+ vistas en estos pacientes. La ausencia de esas células T-CD4+ VIH específicas conduce además a una insuficiente producción de ciertos factores solubles esenciales para el proceso de maduración y la supervivencia de las células T-CD8+ efectoras. Todo esto apoya la administración de la TARGA desde las fases más primarias de la infección, para preservar la respuesta específica de las células T-CD4+ cooperadoras²⁰. A este respecto, es sabido que la recuperación del número de células T en los dos primeros años después de la depleción inducida por la quimioterapia sigue un modelo determinado: mientras que la recuperación de los niveles de células T-CD8+ es rápido y ocurre por expansión periférica, la recuperación de los niveles de células T-CD4+ es limitada y retrasada, y esta restringida por la timopoyesis que decae en función de la edad^{21,22}. Una recuperación exitosa de las células T-CD4+ es debida a un alto grado de producción tímica. En contraste, la recuperación de las células T-CD8+ no es dependiente de la edad²³ ni de la producción tímica.

No obstante, es algo intrigante que el número de células T-CD8+ específicas del virus durante la infección crónica, a menudo excede a las células infectadas en las que el virus se está replicando. Esto indica un fallo en sus propiedades citolíticas, las cuales parecen estar relacionadas con defectos en la perforina²⁴, señalización defectiva debida a CD3ε y modulación negativa de CD28²⁵, un modelo de maduración ensartado¹⁹, y/o un inefectivo tráfico a los lugares de infección. La mayoría de las células T-CD8+ antivirales en la infección crónica no expresan perforina, molécula requerida para la citolisis. Las células T-CD8+ pueden perder rápidamente su función citotóxica, independientemente de la depleción de CD4²⁶. Controlando la replicación viral con drogas, especialmente durante las primeras semanas o meses después de la infección, se reduce la carga viral y podría bloquear el desarrollo de la anergia de las células T²⁶.

Pacientes infectados siguiendo un régimen de TAR efectivo, normalmente experimentan un aumento en los niveles de CD4+. El inicial incremento de las células CD4+ circulantes es debido, probablemente, a la redistribución de las células previamente atrapadas por la cantidad de antígeno viral en el tejido linfoide²⁷⁻²⁹. Consecuentemente, hay un incremento gradual de las células T-CD4+ naïve, posiblemente debido a una combinación de expansión periférica y a una continua producción tímica de células T. Además, la TAR disminuye la activación inmune inducida por el virus^{27, 29, 30}, lo cual puede conducir a una disminución de la muerte de los linfocitos T activados. No obstante, se produce una rápida y remarcable reducción en la expresión de los marcadores de activación de superficie de células T, de forma paralela al control de la replicación del virus^{27, 29-31}. De un modo similar, los niveles en plasma de las citoquinas inflamatorias TNF-α e IL-6, también se reducen. Ambos fenómenos pueden ayudar a reducir el anormal nivel de muerte celular observado durante el curso natural de la infección por VIH en pacientes no tratados y la recuperación de los números normales de células T³³.

PAPEL DEL TIMO EN LA RESPUESTA INMUNE PEDIÁTRICA

El timo es esencial para establecer un *pool* de células T periféricas. Hay recientes evidencias en ratones de que el *pool* de células T-CD8+ naïve y memoria son regulados de forma independiente, de lo que se deduce que cada *pool* de células T tiene su propio nicho. Está establecido que la infección por VIH-1 afecta negativamente al timo, tanto en niños como en adultos (tabla1)^{34, 35}. A pesar de ello, las consecuencias de esta inhibición tímica son peores en los niños, que progresan más tempranamente hacia la enfermedad³⁶⁻³⁸. La TAR ha de-

TABLA 1. Producción tímica estimada en niños y adultos infectados por VIH.

Edad	0-1 year	2-10 year	11-25 year	26-49 year	≥ 50 year
Espacio tímico epitelial (percentil)	93%	88%	63%	45%	18%
Producción diaria estimada de timocitos en individuos no VIH	≥ 10 ⁹	8.8x10 ⁸	6.3x10 ⁸	4.5x10 ⁸	1.8x10 ⁸
Producción diaria estimada de timocitos en individuos VIH+	2x10 ⁸	1.8x10 ⁸	1.3x10 ⁸	9.0*10 ⁷	1.8x10 ⁷

mostrado ser efectiva en la recuperación de los niveles adecuados de linfocitos T-CD4+ en pacientes infectados con bajos niveles de CD4+^{28, 39, 40}, posiblemente a través de la producción de nuevas células T desde el timo. Este hecho es particularmente importante en niños, que tienen un *pool* de células T más pequeño y sin embargo dependen de su producción tímica para la generación de células T memoria inmuno-competentes. A este respecto, la repoblación originada en el timo permitiría la recuperación de todo el repertorio de especificidades, incluyendo las células VIH específicas. Esto contrasta con los efectos de la redistribución o expansión periférica que solo aumentaría el número de células de aquellos clones que hubieran sobrevivido a la infección, sin recuperar respuestas específicas frente a patógenos oportunistas y VIH.

La expansión periférica de las células T postímicas tampoco es eficiente en la reconstitución del *pool* de células T periféricas ni en la regeneración de un completo repertorio de células T^{41, 42}. Por lo tanto, un incremento cuantitativo en la población de linfocitos T-CD4+ no es suficiente para reconstituir el sistema inmune. Se necesita también una mejora funcional. A este respecto, adultos y niños deben ser separados cuando consideramos el papel que juega el timo. En adultos, la habilidad del timo para producir nuevas células T a lo largo de la vida, disminuye progresivamente con la involución de la glándula⁴³. Aunque una reducción de un 80% de la producción normal esta basada en la medida de los niveles de TRECs en sangre periférica, que ocurre en los pacientes VIH+ con independencia de la edad (tabla1), el número real en adultos es mucho menor para reponer el *pool* periférico. Además, la recuperación de las células T-CD4+ después del tratamiento en adultos, se cree que tiene un origen periférico. En contraste, el timo de los niños mantiene toda su funcionalidad después del tratamiento y tiene un gran potencial para reconstituir su debilitado sistema inmune. Desde el momento

en que el sistema inmune del niño está aún en formación, cualquier efecto potencialmente negativo del virus en su función tímica puede comprometer de un modo importante la maduración y la correcta instauración del sistema inmune, convirtiéndose en más susceptible a los efectos del VIH.

El descenso en los linfocitos T-CD4+ circulantes es más marcado en los niños infectados que en los adultos. En estos últimos, hay un efecto combinado del descenso natural de las células T-CD4+ que ocurre con la edad y el resultado por la infección por VIH^{44,46}. Además, la evolución de la carga viral se comporta de modo diferente en niños infectados verticalmente que en adultos. En los niños, los altos niveles de carga viral persisten durante más tiempo, posiblemente debido a la presencia de un sistema inmune más inmaduro^{45,46}.

Resultados de nuestro grupo muestran como tras el nacimiento, los niños infectados verticalmente por VIH se caracterizan por una producción tímica más baja que los controles sanos de la misma edad⁴⁷. Este efecto inhibitorio sobre el timo puede ser debido a la habilidad del VIH para infectar y destruir los timocitos^{35,48}. Esto disminuiría la producción tímica de nuevas células T y comprometería la adecuada maduración del sistema inmune del niño y la reconstitución de las células perdidas como consecuencia de la infección. Las terapias antirretrovirales y la TARGA actualmente empleada, han demostrado ser muy efectivas en el descenso de la carga viral y el incremento de los niveles de células T-CD4+. Cuando nosotros analizamos la función tímica de estos niños VIH+ en tratamiento antirretroviral mediante la evaluación de los círculos de escisión del reagrupamiento de los receptores de las células T (TRECs), el descenso de la carga viral conduce a un marcado incremento de su función tímica^{44,47}. Como esperábamos, este incremento en la producción tímica se correlaciona perfectamente con la recuperación de la población de células T-CD4+⁴⁰. Además, el descenso en la carga viral debido a los antirretrovirales restauraría la función tímica permitiendo la producción de nuevas células T que reconstituirían el *pool* de células T-CD4+ perdido después de la infección. Esta habilidad del timo de los niños para repoblar el repertorio de linfocitos podría explicar porque estos niños se mantienen asintomáticos y con unos niveles de CD4+ adecuados durante un periodo indefinido.

A pesar de todo, los efectos del VIH-1 varían un poco dependiendo del tropismo de cepa involucrada. El tropismo celular se refiere a la habilidad de ciertos aislados virales para crecer en macrófagos o en células T *in vitro*. De este modo, los aislados virales capaces de crecer en macrófagos y en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) pero no en células T se denominan monocitotrópicos (M-trópicos) y están caracterizados por el uso del receptor de quimiocinas CCR5 como co-receptor para su entrada en las células. Por otro lado,

los aislados virales capaces de crecer en CMSP y linfocitos T pero no en macrófagos, se denominan linfocitotrópicos (T-trópicos) y usan CXCR4 como co-receptor para su entrada en las células ⁴⁹. La infección primaria por VIH está caracterizada por el empleo del co-receptor CCR5 para la entrada, y por un fenotipo no inductor de sincitios (NSI) en células linfoides ^{50,51}. Por el contrario, las variantes VIH que aparecen en estadios más avanzados de la infección son cepas inductoras de sincitios que usan el co-receptor CXCR4 ^{51,52}. La rápida progresión hacia la enfermedad o la marcada caída de los niveles de CD4+, han sido asociados con la aparición de cepas VIH linfocitotrópicas tanto en adultos como en niños ^{53,54}. Las cepas VIH T-trópicas tienen un mayor efecto inhibitorio sobre la función tímica, usando el co-receptor CXCR4 presente en los timocitos para infectar estas células, en contraposición con el co-receptor CCR5 usado por las cepas M-trópicas y que no aparece en timocitos ⁵⁵. Esto explica la mayor caída en los linfocitos CD4+ en los niños después de la aparición de estas cepas y es una de las claves en el papel que juega el timo en el mantenimiento de los niveles adecuados de células T-CD4+. Este hecho se ajusta con la hipótesis propuesta de que las cepas X4 causan una mayor disfunción tímica ⁵⁶. El número de timocitos infectados así como la carga viral es mayor en los niños con infección X4. Las diferencias entre las infecciones por X4 o R5 en los niveles celulares son menos marcadas en adultos que en niños, y esto puede explicarse asumiendo que la producción de células T por el timo no es el mayor determinante en el número de células T en adultos y/o por el reducido número de timocitos potencialmente infectados en adultos debido a la involución tímica que se produce con la edad. Sin embargo, el análisis del co-receptor usado por los aislados virales tímicos primarios procedentes de neonatos han mostrado que ambos aislados, con tropismo por X4 y R5, estaban presentes y eran igualmente citopáticos para los timocitos ⁵⁷.

MECANISMOS HOMEOSTÁTICOS EN CÉLULAS T. PAPEL DE LA IL-7

Como se ha mencionado previamente, tres mecanismos permiten la recuperación de las células CD4+: la redistribución de las células T memoria de diferentes tejidos, la regeneración de células T naïve desde el timo, y la reducción del síndrome inflamatorio. No obstante, esta reconstitución temprana no se refleja solamente en la proliferación de las células T memoria. En efecto, el incremento temprano de de las células T-CD4 incluye células T memoria activadas CD45RO+ que no incorporan marcadores de proliferación. Además, se cree que las células T secuestradas en los tejidos linfoides son liberadas a la sangre

siendo capaces de ajustar sus niveles de proliferación y muerte para mantener la homeostasis con la edad, aunque no está claro si esto es lo que ocurre en la infección por VIH. Existe debate acerca de la respuesta tímica en la depleción de las células T periféricas. De hecho, la recuperación de los niveles de células T-CD4+ en niños después de terapia antiretroviral apoya la existencia de algunos mecanismos homeostáticos que detectan los bajos niveles de CD4+ y activan los mecanismos necesarios para aumentar la repoblación celular. Nuestra experiencia es que el timo juega un papel clave en esta repoblación, siendo probable que estos mecanismos homeostáticos lleven a un incremento en la producción de nuevas células T³⁹. Uno de los candidatos a jugar un papel clave in este mecanismo es la interleukina 7 (IL-7).

IL-7 es una citoquina involucrada en la diferenciación de los timocitos a células T, que salen del timo y son liberadas a sangre periférica⁵⁸. Además se ha probado el papel esencial de la IL-7 en el mantenimiento de la población T en modelos murinos⁵⁸ y la inducción de la reconstitución de la población de células T en ratones inmunosuprimidos⁵⁹. Los pacientes infectados por VIH se caracterizan por niveles plasmáticos de IL-7 anormalmente altos, relacionados con bajos niveles de células T-CD4+. Esto sugiere que bajos niveles de CD4+ estimularían las células dendríticas periféricas y los ganglios linfáticos para producir IL-7, en un intento de activar los mecanismos que permiten la repoblación celular⁵⁸ (figura 2). Por el contrario, otros autores discuten que los niveles plasmáticos de IL-7 puedan reflejar la dinámica de unión de la IL-7 secretada a las células T: a menor células T circulantes, mayor IL-7 libre⁵⁹. Sin embargo, estos elevados valores de IL-7 son insuficientes en adultos para incrementar la producción tímica o para la recuperación del repertorio de células T-CD4 que se ha observado, debido posiblemente, a la limitada habilidad del timo de los adultos para producir nuevas células T. En contraste, la experiencia no ha enseñado como los elevados valores de IL-7 observados en niños con bajos niveles de linfocitos T-CD4+ conducen a un marcado aumento en la producción tímica de nuevas células T y a una marcada recuperación de los niveles de CD4+. Este incremento en su actividad tímica tiene lugar cuando los niveles de carga viral son lo suficientemente bajos como para fracasar en la inhibición del timo. Más tarde, una vez que se han recuperado los niveles de CD4+, los niveles de IL-7 vuelven a sus valores basales como consecuencia de un mecanismo de retroalimentación (feedback)⁶⁰. Esto ha sido publicado para otros tipos de linfopenias, donde los elevados niveles de IL-7 se normalizan cuando la linfopenia se resuelve por sí misma^{58,60}.

Sin embargo, IL-7 incrementa la susceptibilidad de los linfocitos a ser infectados por VIH *in vitro*, induciendo la expresión del co-receptor CXCR4 en cé-

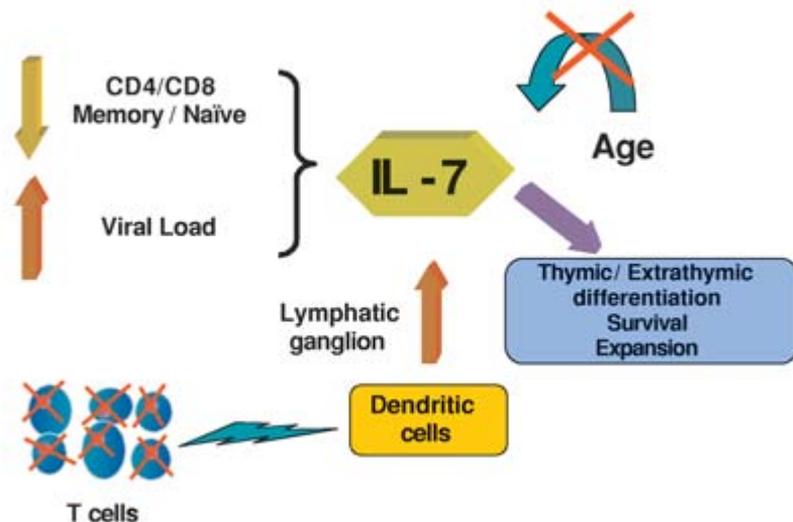


FIGURA 2. *Papel homeostático de la IL-7. La infección por el VIH induce una disminución de células T que es detectado por las células dendríticas, la cuales producen IL-7. Esta IL-7 puede incrementar los procesos tímicos y extratímicos así como la supervivencia de la expansión de células T.*

lulas T-CD4+ memoria inactivas ⁶². Esto significa que los altos niveles de IL-7 *in vivo* podrían ser deletereos, llevando a la selección de las variantes SI/X4 que podrían acelerar la progresión a SIDA ⁴⁴. Sin embargo, resultados muy recientes, procedentes de macacos infectados, demuestran que ello no es probable ⁶³.

Se ha realizado un gran progreso en las terapias para la infección pediátrica por VIH, que ha pasado de ser una enfermedad fatal a un modelo de enfermedad crónica. Los esfuerzos actuales están enfocados en desarrollar regímenes terapéuticos más sencillos y más efectivos, que supriman y finalmente, eliminen la infección y que estimulen la reconstitución inmune. Los clínicos que atienden a niños infectados por VIH están considerando la seguridad de terapias profilácticas discontinuas en niños con sustanciales mejoras inmunológicas por la terapia antiretroviral. A pesar de estos avances, los médicos pueden anticipar que los niños infectados por VIH continuaran desarrollando infecciones oportunistas y otras complicaciones relacionadas con la infección. Algunos niños fracasan en la respuesta a las terapias antiretrovirales, mientras que otros no son capaces de tolerar los complejos regímenes de medicación. La mayoría requieren una terapia de mantenimiento de por vida, en ausencia de reconstitución inmune.

Podemos concluir que el sistema inmune tiene la habilidad potencial de controlar la infección por VIH, disparando mecanismos homeostáticos encargados de restaurar las células perdidas y las respuestas inmunes apropiadas para luchar contra el virus en sangre y dentro de las células. Los datos revisados no proporcionan respuestas definitivas pero indican prometedoras rutas para mejorar la vida de los pacientes. Un mejor entendimiento de los mecanismos virales y las respuestas inmunes que están involucradas, nos conducirán a nuevos acercamientos en el estudio de terapias inmunoestimuladoras, permitiendo un control efectivo de la infección del sistema inmune por si mismo. Esto evitaría el desarrollo de SIDA o convertiría la infección crónica por VIH en una enfermedad crónica asintomática sin consecuencias para la salud del paciente y una mejora en la calidad de vida del niño.

REFERENCIAS

1. Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, *et al.* Studies in subjects with long-term non-progressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995; 332: 209-216.
2. Rowland-Jones SL, McMichael A. Immune responses in HIV-exposed seronegatives: have they repelled the virus? *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 448-455.
3. Harari A, Pantaleo G. New insights in the immune control of HIV-1 infection. *AIDS Rev* 2001; 3: 201-207.
4. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998; 338: 853-860.
5. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, *et al.* Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997; 278: 1295-1300.
6. Persaud D, Zhou Y, Siciliano JM, Siciliano RF. «Latency in human immunodeficiency virus type 1 infection: no easy answers». *J Virol* 2003, 77: 1659-1665.
7. Duliege AM, Messiah A, Blanche S, Tardieu M, Griscelli C, Spira A. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 infection in children: prognostic value of laboratory tests on the bimodal progression of the disease. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11: 630-635.
8. Blanche S, Tardieu M, Duliege A, *et al.* Longitudinal study of 94 symptomatic infants with perinatally acquired human immunodeficiency virus infection. Evidence for a bimodal expression of clinical and biological symptoms. *Am J Dis Child* 1990; 144: 1210-1215.

9. Pizzo PA, Wilfert CM. Markers and determinants of disease progression in children with HIV infection. The Pediatric AIDS Siena Workshop II. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 8: 30-44.
10. Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D, Siler S, Papageorgopoulos C, Wieder Schmidt D, Hoh R, Neese R, Macallan D, Deeks S, McCune JM. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1 infected humans. *Nat Med* 1999, 5 :83-89.
11. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* 1994: 68: 8056-8063.
12. Von Herrath MG, Yokoyama M, Dockter J, Oldstone MB, Whitton JL. CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge. *J Virol* 1996: 70: 1072-1079.
13. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, Von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4(+) T cells are required for secondary expansion and memory in CD8(+) T lymphocytes. *Nature* 2003: 421: 852-856.
14. Pantaleo G, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Immunol* 1995: 13: 487-512.
15. Lane HC, Depper JM, Greene WC, Whalen G, Waldmann TA, Fauci AS. Qualitative analysis of immune function in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Evidence for a selective defect in soluble antigen recognition. *N Engl J Med* 1985: 313: 79-84.
16. Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, *et al.* Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging. *J Clin Invest* 1989: 84: 1892-1899.
17. Komanduri KV, Donahoe SM, Moretto WJ, *et al.* Direct measurement of CD4+ and CD8+ T-cell responses to CMV in HIV-1- infected subjects. *Virology* 2001: 279: 459-470.
18. Pitcher CJ, Quittner C, Peterson DM, *et al.* HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression [see comments]. *Nat Med* 1999: 5: 518-525.
19. Champagne P, Ogg GS, King AS, *et al.* Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 2001, 410: 106-111.
20. Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, *et al.* Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 2000, 407: 523-526.

21. Atkinson K, Hansen JA, Storb R, Goehle S, Goldstein G, Thomas ED. T cell subpopulations identified by monoclonal antibodies after human marrow transplantation. I. Helper-inducer and cytotoxic suppressor subsets. *Blood* 1982, 59: 1292-98.
22. Watanabe N, DeRosa SC, Cmelak A, Hoppe R, Herzenberg LA, *et al.* Long-term depletion of naive T cells in patients treated for Hodgkin's disease. *Blood* 1997, 90: 3662-72.
23. Cohen Stuart JW, Slieker WA, Rijkers GT, Noest A, Boucher CA, *et al.* Early recovery of CD4+ T lymphocytes in children on highly active antiretroviral therapy. Dutch study group for children with HIV infections. *AIDS* 1998, 12 : 2155-59.
24. Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A, Ogg GS, Spiegel HM, Conlon C, Spina CA *et al.* HIV-specific CD8+ T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000, 192 : 63-75.
25. Trimble LA, Shankar P, Patterson M, Daily JP, Lieberman J. Human immunodeficiency virus-specific circulating CD8 T lymphocytes have down-modulated CD3T and CD28, key signaling molecules for T-cell activation. *J Virol* 2000, 74 : 7320-7330.
26. Lieberman J, Manjunath N, Shankar P. Avoiding the kiss of death : how HIV and other chronic viruses survive. *Curr Opin Immunol* 2002, 14: 478-486.
27. Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, Katlama C, Debre P, Leibowitch J. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 1997, 277: 112-116.
28. Pakker NG, Notermans DW, de Boer RJ, Roos MT, de Wolf F, Hill A, Leonard JM, Danner SA, Miedema F, Schellekens PT. Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection : a composite of redistribution and proliferation. *Nat Med* 1998, 4 : 208-214.
29. Bucy RP, Hockett RD, Derdeyn CA, Saag MS, Squires K, Sillers M, Mitsuyasu RT, Kilby JM. Initial increase in blood CD4+ lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues. *J Clin Invest* 1999, 103 : 1391- 1398.
30. Lederman MM, Connick E, Landay A, Kuritzkes DR, Spritzler J, St Clair M, Kotzin BL, Fox L, Chiozzi MH, Leonard JM, Rousseau F, Wade M, Roe JD, Martinez A, Kessler H. Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and ritonavir : results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *J Infect Dis* 1998, 178 : 70- 79.
31. Anderson J, Fehninger TE, Patterson BK. Early reduction of immune activation in lymphoid tissue following highly active HIV therapy. *AIDS* 1999, 12 F123-F129.
32. Hazenberg MD, Otto SA, Cohen Stuart JW, Verschuren MC, Borleffs JC, Boucher CA, Coutinho RA, Lange JM, Rinke de Wit TF, Tsegaye A, van Dongen JJ, Ha-

- man D, de Boer RJ, Miedema F. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat Med* 2000, 6 : 1036-1042.
33. Weichold FF, Bryant JL, Pati S, Barabitskaya O, Gallo RC, Reitz MS. HIV-1 protease inhibitor ritonavir modulates susceptibility to apoptosis of uninfected T cells. *J Hum Virol* 1999, 2 : 261-269.
 34. Haynes BF, Markert ML, Sempowski GD, Patel DD, Hale LP. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 2000, 18 : 529-560.
 35. McCune J. Thymic function in HIV-1 disease. *Semin Immunol* 1997, 9 : 397-404.
 36. Kourtis AP, Ibegbu C, Nahmias AJ, Lee FK, Clark WS, *et al.* Early progression of disease in HIV-infected infants with thymus dysfunction. *N Engl J Med* 1996, 335 :1431-36.
 37. Nahmias AJ, Clarks WS, Kourtis AP, Lee FK, Cotsonis G, *et al.* Thymic dysfunction and time of infection predict mortality in human immunodeficiency virus-infected infants. CDC Perinatal AIDS Collaborative TRTansmission Study Group. *J Infect Dis* 1998, 178 : 680-85.
 38. Meyers A, Shah A, Cleveland RH, Cranley WR, Wood B, *et al.* Thymic size on chest radiograph and rapid disease progression in human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr Infect Dis J* 2001, 20 : 1112- 18.
 39. Resino S, Correa R, Bellon J, Sanchez-Ramon S, Muñoz-Fernandez M. Characterizing Immune Reconstitution after Long-Term HAART in Pediatric AIDS. *AIDS Res Hum Retrovir* 2002: 18: 1395-1406.
 40. Correa R, Muñoz-Fernández MA. Effect of HAART on Thymic Reconstitution of CD4 T lymphocytes in vertically HIV-infected Children. *AIDS* 2002: 16: 1181-1183.
 41. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, Magrath IT, Wexler LH, Dimitrov DS, Gress Re. Distinctions between CD8+ and CD4+ T cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* 1997, 89: 3700-7.
 42. Mackall CL, Bare CV, Granger LA, Sharrow SO, Titus JA, Gress RE. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J Immunol* 1996, 156: 4609-16.
 43. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, *et al.* Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998: 396: 690-695.
 44. Resino S, Gurbindo MD, Bellón JM, Sanchez-Ramón S, Muñoz-Fernández MA. Predictive markers of clinical outcome in vertically HIV-1 infected infants. A prospective longitudinal study. *Pediatr Res* 2000: 47: 509-515.

45. Mofenson LM, Korelitz J, Meyer WA, 3rd, *et al.* The relationship between serum human immunodeficiency virus type 1 (HIV- 1) RNA level, CD4 lymphocyte percent, and long-term mortality risk in HIV-1-infected children. National Institute of Child Health and Human Development Intravenous Immunoglobulin Clinical Trial Study Group. *J Infect Dis* 1997; 175: 1029-1038.
46. Blanche S, Newell ML, Mayaux MJ, *et al.* Morbidity and mortality in European children vertically infected by HIV- 1. The French Pediatric HIV Infection Study Group and European Collaborative Study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 14: 442-450.
47. Correa R, Munoz-Fernandez MA. Production of new T cells by thymus in children: effect of HIV infection and antiretroviral therapy. *Pediatr Res* 2002; 52: 207-212.
48. Burke A, Anderson D, Benson W, *et al.* Localization of human immunodeficiency virus 1 RNA in thymic tissues from asymptomatic drug addicts. *Arch Pathol Lab Med.* 1995; 119: 36-41.
49. Fenyo EM, Albert J, Asjo B. Replicative capacity, cytopathic effect and cell tropism of HIV. *AIDS* 1989; 3: S97-100.
50. Simmons G, Clapham PR, Picard L, *et al.* Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* 1997; 276: 276-279.
51. Zaitseva MB, Lee S, Rabin RL, *et al.* CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV- 1 infection. *J Immunol* 1998; 161: 3103-3113.
52. Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med* 1996; 124: 654-663.
53. De Martino M, Rossi ME, Azzari C, Gelli MG, Galli L, Vierucci A. Different meaning of CD38 molecule expression on CD4+ and CD8+ cells of children perinatally infected with human immunodeficiency virus type 1 infection surviving longer than five years. *Pediatr Res* 1998; 43: 752-758.
54. Resino S, Navarro J, Bellón JM, Gurbindo D, León JA, Muñoz-Fernández MA. Naïve and memory CD4+ T-cells and T-cell activation markers in HIV-1 infected children on HAART. *Clin Exp Immunol* 2001; 125: 266-273.
55. Correa R, Muñoz-Fernández MA. Viral phenotype affects the thymical production of new T-cells in HIV-1 infected children. *AIDS* 2001; 15: 1959-1963.
56. Ye P, Kourtis AP, Kirschner DE. Reconstitution of thymic function in HIV-1 patients treated with highly active antiretroviral therapy. *Clin Immunol* 2003, 106: 95-105.
57. Pedroza-Martins L, Boscardin WJ, Anisman-Posner DJ, Schols D, Bryson YJ, *et al.* Impact of cytokines on replication in the thymus of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates from infants. *J Virol* 2002, 76: 6929-43.

58. Napolitano LA, Grant RM, Deeks SG, *et al.* Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat Med* 2001; 7: 73-79.
59. Bolotin E, Annett G, Parkman R, Weinberg K. Serum levels of Il-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count. *Bone Marrow Transpl* 1999, 23 : 783-88.
60. Correa R, Resino S, Muñoz-Fernández MA. Increased Interleukin-7 plasma levels, led to a recovery of CD4+ T cells in HIV-infected children. *J Clin Immunol* 2003:: In Press.
61. Mackall CL, Fry TJ, Bare C, Morgan P, Galbraith A, Gress RE. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood* 2001; 97: 1491-1497.
62. Jourdan P, Vendrell JP, Hugué MF, *et al.* Cytokines and cell surface molecules independently induce CXCR4 expression on CD4+ CCR7+ human memory T cells. *J Immunol* 2000; 165: 716-724.
63. Israel N. Second International AIDS Conference. Paris, July 2003.



INSTITUTO DE ESPAÑA