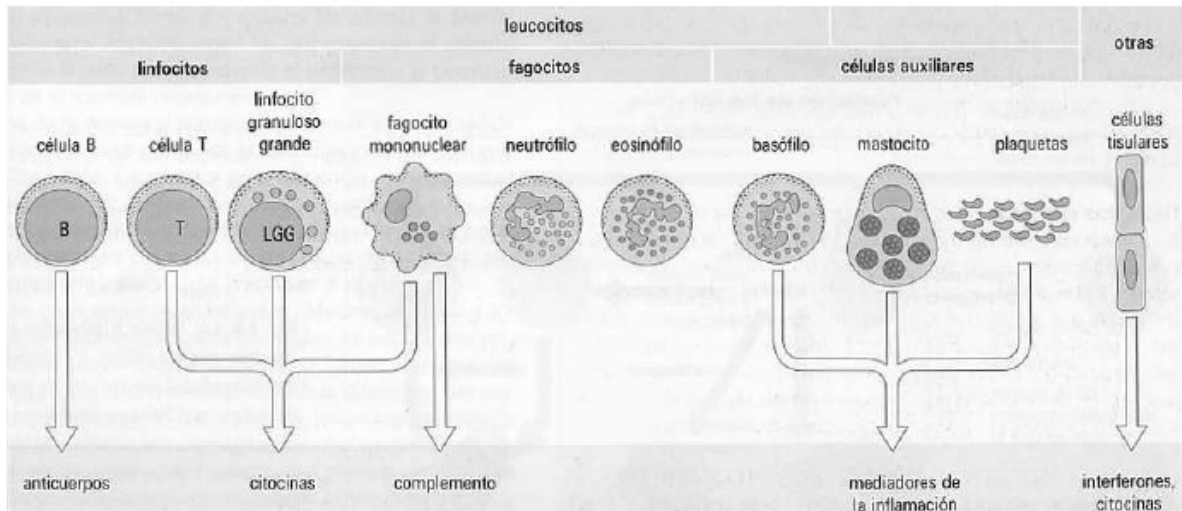


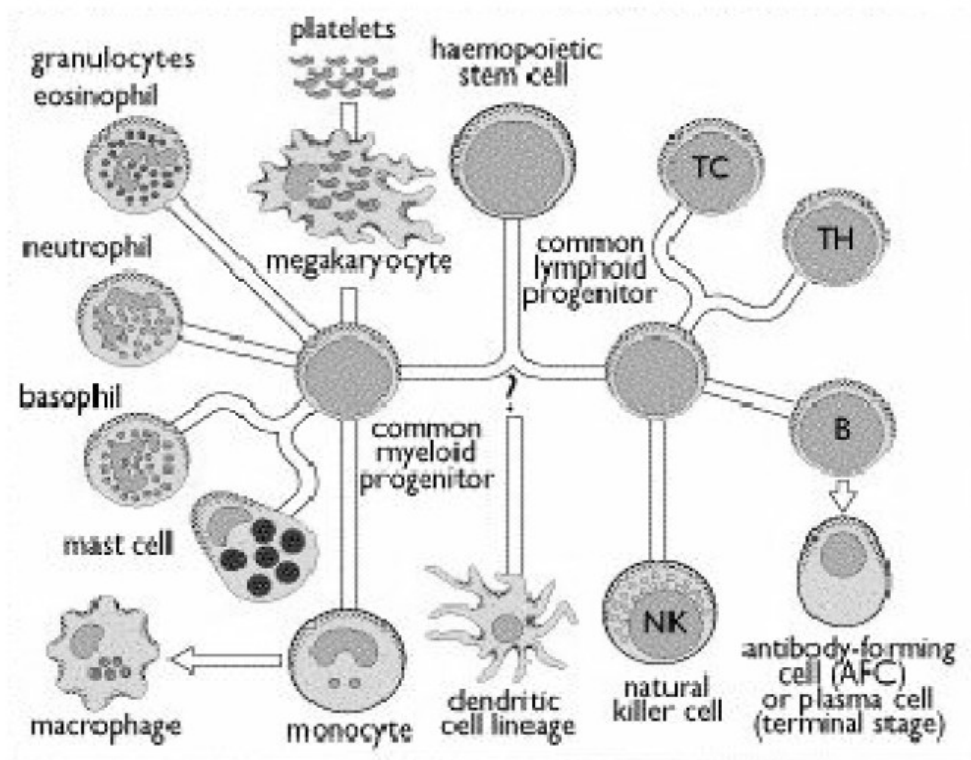
Tema 1 -INTRODUCCIÓN AL SISTEMA INMUNE

El sistema inmunitario se divide, desde el punto de vista funcional, en **innato** y **adaptativo**. La inmunidad innata actúa como una primera línea de defensa **inespecífica**, mientras que la inmunidad adquirida se caracteriza por la elaboración de una reacción **específica** frente al agente infeccioso y que es **memorizada**, lo que permite una defensa más eficaz frente a un nuevo ataque del mismo agente.

CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO



Las células encargadas de la respuesta inmunitaria innata son los **fagocitos** (monocitos, macrófagos y polimorfonucleares), que ingieren y degradan antígenos y microorganismos patógenos. Los **linfocitos** son responsables del reconocimiento específico de los antígenos, existiendo dos estirpes: 1) las **células B**, encargadas de codificar receptores de superficie específicos frente a los antígenos y que, activadas por éste, se diferencian en células plasmáticas productoras del correspondiente anticuerpo (forma soluble del receptor específico); y 2) las **células T**, de las que existen diversos tipos, que contribuyen a la activación de las células B y macrófagos (**células Th** o *helper*), y a la destrucción de células infectadas por virus u otros agentes patógenos intracelulares (**células Tc** o *citotóxicas*). Los **linfocitos NK** (*Natural killer*) son capaces también de destruir células pero mediante un mecanismo inespecífico.



MEDIADORES SOLUBLES DE LA INMUNIDAD.

Estos factores solubles suelen ser de carácter inespecífico (proteína C reactiva, complemento y citocinas) o específico (anticuerpos). Una proteína de fase aguda es la **proteína C reactiva**, que produce **opsonización** y activación del complemento. El **complemento** está formado por un grupo de proteínas séricas que se activan secuencialmente y actúan en los mecanismos de defensa inflamatorios con los siguientes efectos: 1) opsonización de microorganismos, facilitando su fagocitosis; 2) quimiotaxis de los fagocitos; 3) aumento de la permeabilidad vascular; y 4) lesión de la membrana de la célula que ha inducido su activación. Las **citocinas** son moléculas diversas que transmiten señales entre los linfocitos, los fagocitos y otras células del organismo. Entre ellas se incluyen: 1) los **interferones**, que son proteínas que aumentan la resistencia celular a la infección vírica, siendo producidas por células infectadas o activadas por virus, actuando en la fase precoz de la infección; 2) las **interleucinas**, cuya función principal es la de inducir la activación y diferenciación de otras células; 3) los **factores estimuladores de colonias (CSF)**, que favorecen la multiplicación de las células a partir de sus precursoras; y 4) otras citocinas como el **factor de necrosis tumoral (TNF)** y el **factor de crecimiento transformador (TGF)**. Los **anticuerpos** son moléculas que constituyen el factor soluble de la inmunidad adaptativa. Su extremo variable (Fab) se une al antígeno mientras que el otro extremo (Fc) es reconocido por receptores de diversas células, permitiendo la unión de la molécula extraña (antígeno) con la célula fagocitaria. Están producidos por los linfocitos B de forma que cada clon de éstos es capaz de sintetizar un anticuerpo con una especificidad determinada. En el reconocimiento de Ag intervienen inmunoglobulinas y receptores, antígenos específicos de los linfocitos T.

ANTÍGENOS.

Son las moléculas que generan el reconocimiento específico por un anticuerpo. La región a la que se une el anticuerpo se denomina **epitopo**, Cuando se introducen en el organismo son fagocitados por las células del sistema inmunitario innato y expresados en la superficie de las mismas, lo que permite el reconocimiento por parte del sistema linfocitario.

RESPUESTA INMUNITARIA.

La respuesta inmunitaria consta de dos fases:

1) reconocimiento del antígeno y

2) eliminación del antígeno. La necesidad de reconocer millones de moléculas extrañas se consigue mediante la **selección clonal** de la célula productora del antígeno específico y un mecanismo de **recombinación genética** que permite la síntesis de otros tantos millones de anticuerpos de distinta especificidad. La eliminación del antígeno se consigue por tres mecanismos: neutralización, fagocitosis y reacciones citotóxicas y de apoptosis

INFLAMACIÓN.

La inflamación es la reacción local a una agresión habitualmente procedente del exterior. En ella se producen tres efectos: 1) aumento del flujo sanguíneo hacia la zona dañada; 2) aumento de la permeabilidad capilar; debido a la retracción de las células endoteliales, y 3) migración leucocitaria (**quimiotaxis**).

DEFENSA FRENTE A AGENTES PATÓGENOS EXTRACELULARES E INTRACELULARES

Cuando el sistema inmunitario actúa contra agentes patógenos extracelulares, su objetivo es destruir al propio agente y neutralizar sus productos. Por el contrario, cuando se trata de agentes intracelulares se intenta destruir la células infectadas (citotoxicidad) o activar a las misma célula para eliminar al agente patógeno, mediante la secreción de citocinas por los linfocitos T cooperadores.

VACUNACIÓN.

La especificidad y la memoria son las dos propiedades de la inmunidad adaptativa que son utilizadas en la vacunación. Puesto que la respuesta secundaria a un antígeno es mucho más intensa que la primaria, consiste en la sensibilización con un **antígeno modificado** capaz de inducir una respuesta inmune sin provocar daño al organismo.

INMUNOPATOLOGÍA.

En algunas ocasiones el propio sistema inmunitario se comporta como una causa de enfermedad o produce consecuencias negativas para el organismo. Estos errores pueden ser debidos a tres causas diferentes:

1) respuesta inadecuada frente a autoantígenos o **autoinmunidad**, en el cual se establecen respuestas de defensa frente a antígenos propios y conduce a la aparición de enfermedades autoinmunes;

2) respuestas inmunitaria ineficaz o **inmunodeficiencia**, si existe un defecto en los elementos del sistema inmunitario y el individuo no puede contrarrestar adecuadamente las infecciones; y

3) respuesta inmunitaria exagerada o **hipersensibilidad**, en la que ocurre una desproporción entre el daño que puede provocar un agente extraño y la respuesta de defensa que ocasiona.

TEMA 2. Células implicadas en la respuesta inmunitaria y estructura del sistema inmune. Linfocitos. Fagocitos mononucleares. Células presentadoras de antígenos. Polimorfonucleares y mastocitos.

Artificialmente realizamos una serie de divisiones en la inmunidad que sin embargo esta totalmente interrelacionada, de hecho vamos a referirnos a algunos conceptos del tema anterior.

INNATA/ADAPTATIVA O INESPECÍFICA/ESPECÍFICA

- **Innata** No necesita de un reconocimiento previo. Va a actuar contra una variedad de superficies extrañas al organismo, que tienen características distintas a las propias. Pero aunque la llamamos inespecífica, si que hace diferencias, no destruye cualquier superficie, de hecho en condiciones normales no destruye las superficies propias sanas.
 - **Celular** Macrófagos, Polimorfonucleares,
 - **Humoral** Complemento
- **Específica** Va a tener moléculas en su superficie que les va a permitir distinguir con un alto grado de **especificidad** unas moléculas de otras. Incluso cambios en un aminoácido o cambios tan sutiles como que un aminoácido esté fosforilado o que una base del DNA este metilada. Otra característica de la inmunidad especifica es la de poseer **memoria**. (esta memoria no es mas que la persistencia en un mayor número de linfocitos correspondientes a clones que ya han sido utilizadas en algunos casos, estos linfocitos tendrán sus receptores para el antígeno "perfeccionados").
 - **Celular** Linfocitos B, T, NK??
 - **Humoral** Anticuerpos

Las respuestas innatas y adaptativas están íntimamente **interrelacionadas**: en muchos casos un linfocito T helper (especifico) reconozca un antígeno presentado por un macrófago (inespecífico) que previamente lo ha fagocitado.

La inmunidad celular y humoral también esta muy interrelacionada. Un linfocito B (celular) reconoce un antígeno a través de su receptor de superficie que no es mas que un anticuerpo anclado en su membrana y eso hace que se diferencie en célula plasmática y empiece a segregar anticuerpo (humoral) de la misma especificidad. El sistema de complemento (humoral) puede marcar bacterias para ser fagocitadas por macrófagos (celular).

Un antígeno unido a un anticuerpo (humoral especifico) será fagocitado con mas facilidad cuando ese anticuerpo se una a receptores especiales en la superficie de Polimorfonucleares (celular inespecífico).

CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE

A la hora de presentar las células que pertenecen al sistema inmune nos fijaremos sobre todo en características funcionales. Haremos, sin embargo, algunas referencias a características morfológicas, que ya habéis estudiado, para que relacionéis conocimientos anteriores.

La **función** de las células del sistema inmune y de cualquier célula esta muy determinada por los **receptores** que tengan en su superficie que son los que le van a permitir recibir y dar instrucciones a otras células del sistema inmune y de otros sistemas. Este intercambio de información se produce cuando el receptor interactúa con su **ligando**.

incluso una célula, solo es infectada por un virus si posee receptores que éste pueda reconocer (no es que la célula haya desarrollado un receptor para el virus, sino que el virus ha evolucionado para ser capaz de utilizar receptores de la célula como puerta de entrada).

Cuando hablamos de receptor de superficie, de que este receptor intercambia información con otras moléculas, nos referimos a moléculas que tienen una forma determinada y que encajan perfectamente con otras, provocando un cambio en una de ellas o en las dos que transmiten información al interior de la célula (Figura 1). Cuando hablamos de que las células "saben" o "aprenden" aprender por ejemplo a distinguir lo propio de lo extraño, significa que las células en un determinado momento de su desarrollo cuando su receptor ha encajado perfectamente con el de otra célula del entorno, ha recibido señales que han puesto en marcha la maquinaria de la célula que les hacía "suicidarse" o que por el contrario les hace sobrevivir más tiempo.

CLUSTER DESIGNATION (CD)

En inmunología a casi todas estas moléculas de superficie, a estos receptores, se les denomina con las siglas "**CD**" (cluster designation), seguido de un número (vamos por más del 130). Cada cuatro años los inmunólogos nos reunimos, para poner en común toda la información que se haya recogido durante esos cuatro años acerca de en qué células se expresa, en qué momentos de la diferenciación, qué función tiene, etc. y para seguir asignando números a las moléculas nuevas. Durante esos cuatro años los laboratorios que participan se han estado intercambiando anticuerpos para testarlos en múltiples experimentos y tener la mayor información posible sobre esas moléculas nuevas. Antes de la existencia de esa nomenclatura, cada laboratorio que estudiaba una molécula la denominaba como quería y solo después de mucho tiempo se veía que estaban hablando de la misma molécula, estudiando funciones diferentes.

La **SECUENCIA** habitual para caracterizar estas moléculas sería:

- **Desarrollo de anticuerpos (AC)** contra la molécula (por ejemplo queremos saber si unas células implicadas en una reacción autoinmune en un exudado de una artritis, por Ej. expresan alguna molécula no identificada anteriormente, tomamos esas células y las inyectamos en un ratón provocando la generación de anticuerpos contra ellas, producimos y aislamos **anticuerpos monoclonales**, (como su nombre indica cada anticuerpo monoclonal reconocerá un determinante antigénico o **idiotipo** de cada una de las posibles moléculas que tengamos en nuestra preparación).
- Usamos esos anticuerpos monoclonales, para determinar en que **tipo de células se expresa**, "marcando" las células a la vez con el AC problema y otro conocido marcado con colores distintos (técnica de IF doble).
- Lisamos células, realizamos una preparación de proteínas y realizamos una electroforesis, (recordáis, eso nos permite separar las proteínas en un gel de acuerdo con su peso molecular).
- Podemos usar el AC para **purificar** la proteína, unir el anticuerpo a una base sólida incubarlo con un lisado celular lavar para retirar lo inespecífico y finalmente quedarnos con una gran cantidad de proteína que nos va a permitir secuenciarla y conocer la composición de AA.
- **Clonaje del gen**: Siguiendo el siguiente paso será la identificación del gen (lo que se llama clonar el gen) para ellos tendremos lo que se llama librerías genéticas que son trozos de genoma metidos en plásmidos bacteriano y estos a su vez en bacterias.
 - **Identificación mediante el AC**: Podemos hacer que las bacterias expresen los distintos trozos de genes que tengan en su interior y reconocer que clon bacteriano tiene nuestro gen identificándolo con nuestro anticuerpo.
 - **Identificación mediante sondas de DNA**: Oligonucleótidos o bien fragmentos generados usando técnicas de PCR, basándonos en la secuencia de la proteína purificada y secuenciada a partir de la cual se diseña lo que se ha dado en llamar Oligonucleótidos degenerados.
 - **Introducción de la genoteca en células eucariotas**: usando vectores de expresión en eucariotas identificando las células que expresan el gen de interés mediante el anticuerpo.
- Una vez que tenemos el gen podemos aun mejor **analizar la función** del mismo, básicamente sobreexpresarlo en células, o bien usar secuencias antisentido para inhibir su expresión y analizar el efecto en la función de la célula. También podemos destruir el gen, en ratones, mediante recombinación homóloga del gen (técnica de **KO**).
- Analizar el tipo de **segundos mensajeros** que se ponen en marcha cuando se actúa sobre ese receptor.
- Con algunas de las técnicas anteriores podemos descubrir **la relación del gen con alguna enfermedad humana**, lo cual abrirá las puertas para la sustitución de ese gen por terapia génica.

CÉLULAS

Todas las células del sistema inmune, con excepción de las células foliculares dendríticas se originan en la médula ósea.

LINFOCITOS

Los linfocitos T y B reconocen antígenos de forma específica, gracias a los receptores para el antígeno situados en su superficie. La interacción con esos receptores, da lugar a modificaciones de segundos mensajeros, expresión de moléculas de superficie y expresión de determinados genes que se conoce con el nombre de **activación**, que podrá desembocar en la proliferación de las células activadas con **expansión** de aquellos clones que han reconocido al antígeno (**expansión clonal**) y en algunos casos a la **diferenciación** a células efectoras.

Linfocitos B: Morfológicamente son indistinguibles de los L-T si bien lo podemos diferenciar gracias a las moléculas de superficie (CD). Los linfocitos B deben su nombre a que proceden en las aves de la **Bursa de Fabricio**, en humanos no hay Bursa, sino que como los linfocitos T proceden de la medula ósea (**Bone Marrow**).

Son las células especializadas en la producción de anticuerpos, aunque para ello antes tienen que diferenciarse a **célula plasmática**. Esta diferenciación solo se produce tras ser activados por el antígeno, a través del receptor para el antígeno de la célula B (**BCR**). El BCR no es más que una Inmunoglobulina anclada a la membrana con la capacidad de transmitir señales al interior de la célula, se le denomina **inmunoglobulina de superficie** y reconoce antígenos en solución.

Una vez activado el Linfocito B se transformará en **célula plasmática**, que secretará anticuerpos de la misma especificidad que la inmunoglobulina de superficie del linfocito B que le dio origen. La célula plasmática es más grande que el linfocito T o B y tienen un gran retículo endoplásmico dado que están especializadas en producir grandes cantidades de Inmunoglobulinas.

A parte de la inmunoglobulina de superficie, la célula B se caracteriza por expresar **MHC-II**, receptores para mitógenos y para el virus de Epstein-Barr (**EBV**), **CD21** también receptor para el factor **C3d** del complemento. El EBV causa inmortalización de células B "in vitro", lo que nos permite mantener células B en cultivo y estudiarlas más fácilmente, pero también "in vivo" relacionándose con el linfoma de Burkitt.

Linfocitos T:

Se caracterizan por **desarrollarse en el timo** donde como dijimos aprenden a diferenciar lo propio de lo extraño. Están **restringidos al MHC**, solo reconocen el antígeno en el contexto del MHC (si el Ag no está unido a MHC no se reconoce), cuando ha sido procesado y convenientemente presentado en la molécula MHC. Esto también hace que reconozcan como extrañas las moléculas MHC de otro individuo.

Expresan el **receptor de la célula T (TcR)**

Todos los linfocitos T maduros expresan el marcador **CD2**, que es importante al unirse a su ligando **CD58**, molécula de adhesión que permite mantener un mayor contacto durante el reconocimiento antigénico. También expresan **CD3** que forma parte del complejo del receptor TcR y funciona transmitiendo la señal antigénica al interior de la célula.

Tipos de Linfocitos T

CD4+ (o simplemente CD4) La molécula CD4 interacciona con la molécula HLA-II y además transmite señales al interior de la célula durante el reconocimiento antigénico. Estas células son la estrella de la inmunidad específica, la mayoría de ellos son **helper o cooperadores**. Es decir gracias a las sustancias que secretan y a sus moléculas de superficie, activan otros tipos celulares. Se distinguen dos subpoblaciones según el perfil de citoquinas que producen:

Th1: (IL2 e IFN γ) Participan en la regulación de la respuesta celular. Activan sobre todo a linfocitos T citotóxicos y otras células. Están hiperactivos en enfermedades autoinmunes tejido específicas.

Th2: (IL4, IL5, IL10) Participan en la regulación de la respuesta humoral (Ac), activando a los linfocitos B. Están hiperactivos en algunas enfermedades alérgicas.

CD8+ (o simplemente CD8) La mayoría son **citotóxicos**, lisan las células que le presentan antígenos extraños. La molécula CD8 interacciona con la molécula HLA-I, transmitiendo señales al interior de la célula.

En sangre periférica, los linfocitos CD4 predominan sobre los CD8 (relación 2:1), en SIDA esta relación se invierte porque mueren específicamente los CD4, a pesar de ello en SIDA existe una elevada tasa de anticuerpos a costa de la colaboración de linfocitos CD8+ Th2 (pregunta MIR).

Algunos linfocitos tienen función supresora, es decir en vez de activar otras células las inhiben. Clásicamente se consideraba que estos linfocitos supresores eran CD8+, aunque ahora no está claro si se trata de una población claramente diferenciada.

Linfocitos Granulares Grandes (LGL-Large Granular Lymphocytes). Células NK y K: Representan aproximadamente el 10% de las células mononucleares de sangre periférica. Son capaces de destruir células tumorales, células infectadas por virus y células procedentes de otros individuos sin sensibilización previa, por lo que se les llamo asesinas naturales (NK). Inicialmente se pensaba que la actuación de las células NK era inespecífica, sin embargo recientemente se sabe que poseen receptores de superficie estimuladores (KAR killer activatory receptor) e inhibidores (KIR killer inhibitory receptor). Los mejor conocidos son los KIR, como es el caso de **Ly49**, que al reconocer el MHC-I propio envía señales inhibitoras al interior de la célula. Este mecanismo es muy importante en casos de células tumorales o infectadas por virus, que dejan de producir moléculas MHC, para no presentar antígenos a los linfocitos CD8 y así escapar de la lisis producida por éstos. Pues bien al no tener MHC-I en su superficie, dejarán de proporcionar señales inhibitoras a las células NK y por tanto serán lisadas por éstas.

Tienen un tamaño superior al del resto de linfocitos (de ahí LGL), y carecen de marcadores de linfocitos T ó B, es decir no expresan ni TcR/CD3, ni inmunoglobulina de superficie, por lo que se les llamó **células nulas**.

Sí expresan moléculas **CD2** al igual que los Linfocitos T y expresan los marcadores **CD56** (molécula que interviene en adhesión y **CD16** receptor para el fragmento Fc de la Inmunoglobulina G). La existencia de **CD16**, es la responsable de la llamada actividad **ADCC** (Antibody dependent cell mediated cytotoxicity), la cual se caracteriza por la destrucción de todas las células con anticuerpos pegados a su superficie, ya sean propias o extrañas. La actividad **ADCC** se denominó inicialmente killer y a las células responsables células killer a pesar de que con posterioridad se vio que se trataba de las mismas NK. Este fenómeno dota de aún más especificidad a la lisis NK dotándola de la especificidad del anticuerpo.

Las células NK pueden ser estimuladas por la citoquina IL2 pero solo a altas concentraciones, ya que carecen de la cadena α (**CD25**), que confiere al receptor de la IL2 una mayor afinidad por dicha citoquina. Las células NK en presencia de altas concentraciones de IL2 se diferencian en células **LAK** (lymphokine activated killing) de mayor capacidad citolítica que son capaces no solo de lisar una gran variedad de células tumorales sino también células epiteliales normales. Esta actividad se cree que está relacionada con el papel de las células NK en la enfermedad de **injerto contra huésped (GVHD graft versus host disease)** que se observa en casos de trasplante de médula ósea.

Las células NK son capaces de producir algunas citoquinas como TNF α e IFN γ .

CÉLULAS MIELOMONOCITICAS

Sistema Retículo-endotelial o monocelular fagocítico. Este es el nombre por el que se conoce en la actualidad el conjunto de macrófagos distribuidos en varios lugares del organismo y que pueden tener morfología distinta y reciben distintas denominaciones según el lugar en el que se encuentren.

Funciones:

En la Inmunidad Natural:

- Fagocitan sustancias extrañas e incluso tejidos propios lesionados o muertos.
- Producen citoquinas que traen al sitio de la infección otras células inflamatorias. (son responsable de muchos de los efectos sistémicos de la inflamación (fiebre).
- Producen factores de crecimiento para fibroblastos y endotelio contribuyendo a la reparación de los tejidos dañados.

En la Inmunidad Específica:

- Células Presentadoras de Antígenos (**APC**).
- Efectores de la inmunidad mediada por células. Tras ser activados por citoquinas producidas por linfocitos activados (poseen receptores para citoquinas).
- Efectores de la inmunidad humoral. Al presentar receptores para inmunoglobulina (receptores para la región Fc de la IgG y complemento (**CD11b** y **CD35**).

También poseen receptores para el factor inhibidor de la migración de macrófagos y el receptor **CD14** (receptor de LPS) que define a las células de estirpe monocítica.

CÉLULAS DENDRÍTICAS Son células con prolongaciones membranosas o en forma de espina que tienen una gran importancia en la respuesta inmune. Existen dos tipos:

Células dendríticas interdigitadas o simplemente células dendríticas. Proceden de la médula ósea y están relacionadas con los fagocitos mononucleares. Se encuentran en el intersticio de la mayoría de los órganos y en las zonas ricas en células T del bazo y ganglios linfáticos y también en la epidermis donde se llaman **células de Langerhans**. Son capaces de recoger una gran cantidad de antígenos proteicos y presentarlos a las células T CD4+ de forma muy eficiente. En el caso de las células de Langerhans recogen antígenos en la piel llevándolos a los ganglios linfáticos de drenaje, donde se iniciará la respuesta inmune.

Células Foliculares dendríticas. A diferencia de las anteriores estas células no proceden de la médula ósea. Se encuentran en los centros germinales de los folículos linfoides en los ganglios linfáticos, bazo y tejido asociado a mucosa (**MALT**). Atrapan antígenos unido a anticuerpos o complemento para que entren en contacto con los linfocitos B.

CELULAS PRESENTADORAS DE ANTIGENOS (CPA o APC)

Son todas aquellas capaces de presentar antígenos a los linfocitos T. Es decir capaces de procesar antígenos y ensamblar fragmentos peptídicos procedentes de los mismos en sus moléculas del MHC. Sin embargo consideramos **Células Presentadoras de Antígenos Profesionales** a aquellas que presentan antígenos a los linfocitos colaboradores o CD4 y que por tanto expresan MHC-II y además son capaces de expresar moléculas coestimuladoras. Consideramos por lo tanto APCs profesionales a las células dendríticas, macrófagos, células B y células endoteliales de la microvasculatura en humanos.

GRANULOCITOS Son células con capacidad fagocítica que realizan un papel importante en la respuesta inflamatoria eliminando de forma inespecífica microbios, y tejidos muertos.

Neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares. Son las células principales en una reacción inflamatoria. Responden a estímulos quimiotácticos y también son estimulados por citoquinas producidas por macrófagos y células endoteliales. También poseen receptores para el fragmento Fc de la IgG y se acumulan en sitios donde se está produciendo la activación del complemento. Con lo cual también actúan en la fase efectora de la inmunidad humoral y celular.

Eosinófilos. Son especialmente efectivos destruyendo parásitos helmintos, que estimulan la producción de IgE para cuyo fragmento Fc poseen receptores en su superficie. Pero de menor afinidad que los basófilos con lo cual actuarán solo a mayores concentraciones de IgE.

También están relacionados con los fenómenos alérgicos (hipersensibilidad inmediata) contribuyendo a la inflamación y lesión tisular que se produce en estos casos.

Son activados por la IL5 producida por los linfocitos Th2.

Basófilos. Son los mastocitos circulantes. Expresan receptores de alta afinidad para la IgE. Cuando interactúan con la IgE liberan sus gránulos liberando los mediadores de la hipersensibilidad inmediata. Siendo las células efectoras de la hipersensibilidad inmediata mediada por IgE.

Tema 3. Anatomía funcional de los Órganos linfoides primarios y secundarios. La médula ósea. El timo. El bazo. Ganglios linfáticos. Placas linfoides intestinales. Bursa de Fabricio. Circulación de los linfocitos.

Lugares de concentración de células linfoides y de antígenos

PRIMARIOS

Donde los linfocitos expresan por primera vez los receptores antigénicos y alcanzan la madurez fenotípica y funcional.

MEDULA OSEA

Generación de células inmunes a partir de Células pluripotenciales. Estimuladas por citoquinas producidas por:

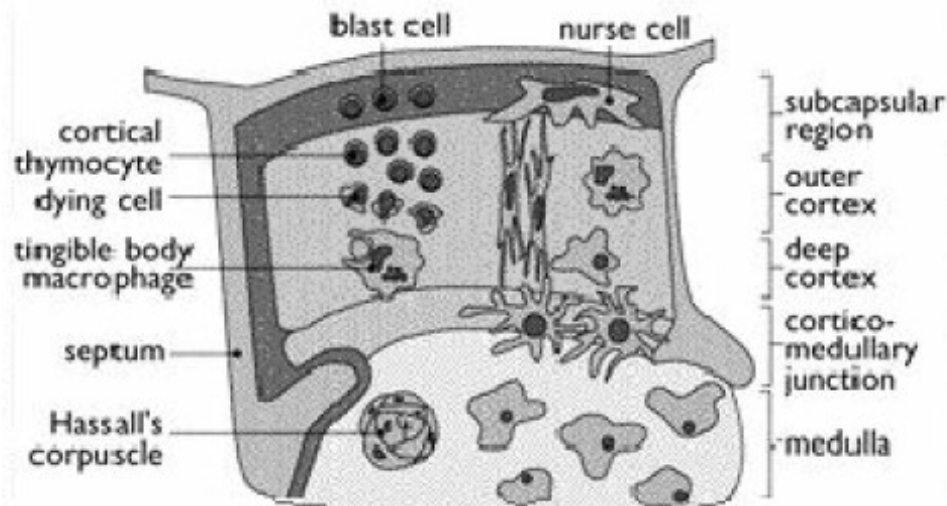
Células del estroma y macrófagos de médula ósea

Linfocitos activados. Aumento de producción en caso de infección.

TIMO

Lugar de maduración del linfocito T. Desarrollo al 3^{er} mes intrauterino. Involución en el adulto.

Los linfocitos inmaduros entran por la parte externa (**corteza**) y van migrando hacia la **médula** madurando al encontrarse con células dendríticas, macrófagos y células epiteliales (células nodriza)



SECUNDARIOS

Lugar en que las células ya maduras entran en contacto con los antígenos. En todos ellos están delimitadas las zonas de linfocitos T de las B.

GANGLIOS LINFATICOS Zona de drenaje de antígenos desde el intersticio a través del sistema linfático. Principal lugar para la respuesta inmune a antígenos vehiculados por la linfa.

Zona B Folículos: Primarios células B en reposo
 Secundarios Células B activadas.
 Células plasmáticas.

Zona T Región parafolicular paracortical

Los linfocitos T vírgenes llegan por los conductos aferentes de la corteza. En la zona T encuentran células dendríticas y otras APC.

Los linfocitos B llegan por el aferente y se encuentran con las células T que le darán la cooperación celular necesaria.

BAZO Lugar mas importante para la respuesta inmune frente a antígenos vehiculados por sangre.

Zona T Alrededor de la arteriola

Zona B En folículos primarios o secundarios.

Zona Marginal Linfocitos CD4+, B y macrófagos

En esta zona se inicia la estimulación de los linfocitos B.

MALT (Mucosal associated lymphoid tissue)

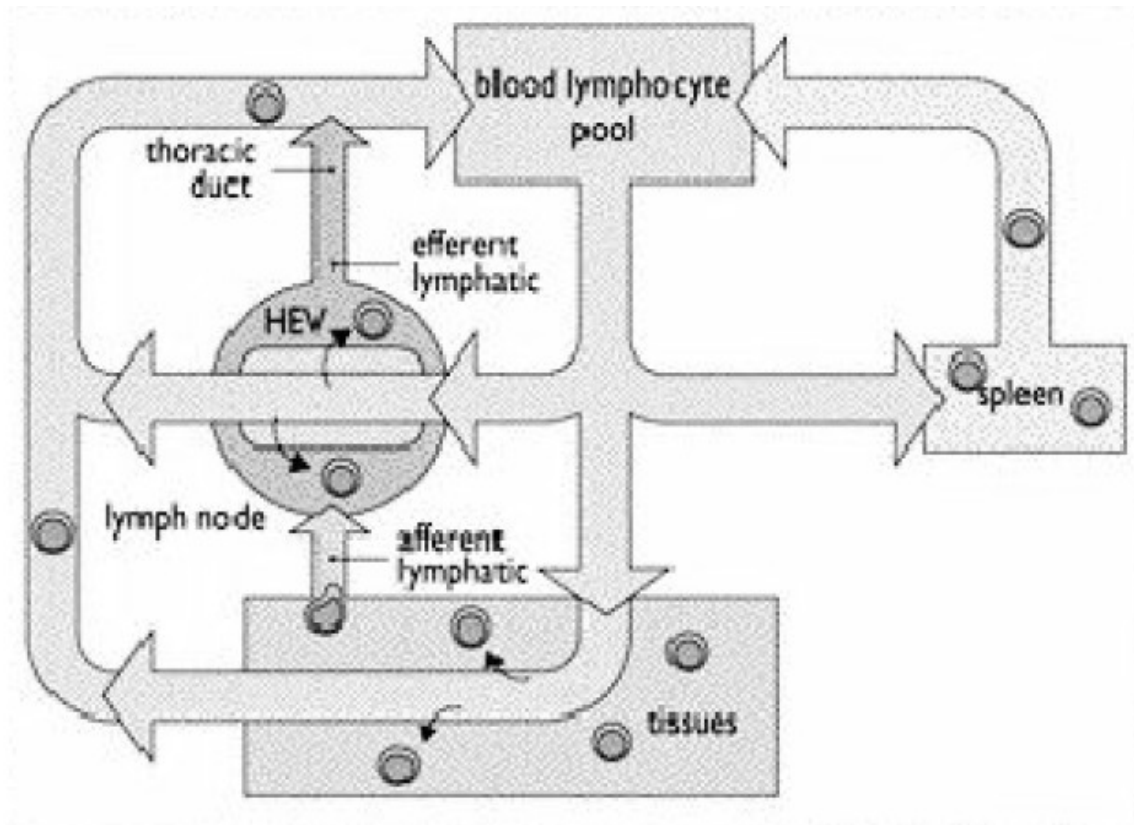
En submucosa gastrointestinal, respiratoria y urogenital

Difusa u organizada en folículos (Placas de Peyer en tracto intestinal)

Los antígenos penetran a través de la luz de la mucosa gracias a las **células M**

SISTEMA INMUNE CUTANEO Células accesoria y linfocitos en epidermis y dermis.

TEJIDO INMUNE ECTOPICO En casos de fuerte respuesta inmune localizada.



CIRCULACION DE LINFOCITOS

Todas las células del sistema inmune a excepción de las células foliculares dendríticas, se generan en la médula ósea. En el caso de los linfocitos T, su primera migración será hacia el timo, donde tendrá lugar su maduración y selección en función de su capacidad de no reconocer antígenos propios presentes en el timo. La selección de las células B se produce en la médula ósea.

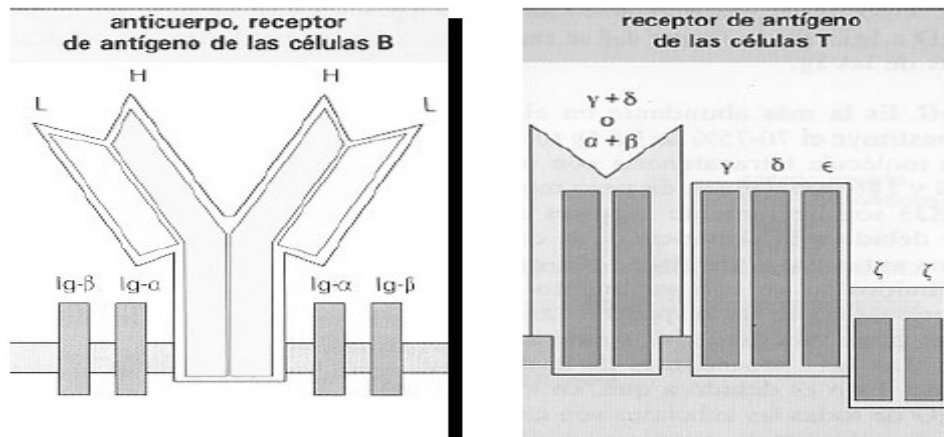
Una vez maduros saldrán a la sangre, desde donde circularán a través de toda la economía. Durante su circulación y gracias a receptores de **alojamiento (homing)** se verán retenidos en un órgano linfático determinado donde quedarán como centinelas en espera de encontrar el antígeno para el que son específicos. Esta distribución de los linfocitos es muy importante, al haber muy pocos para cada especificidad.

Las células presentadoras de antígenos y otras células inflamatorias, también procedentes de la médula ósea, habrán estado circulando por la economía, habrán sido atraídas por factores quimiotácticos producidos por inflamaciones existentes en diversos tejidos, y una vez fagocitados antígenos y tejidos muertos, habrán acudido a los diversos órganos linfoides secundarios (a través de los vasos linfáticos a los ganglios linfáticos de drenaje del tejido correspondiente, al bazo a través de la sangre, a los malt procedentes de cualquier mucosa, o a cualquier otro órgano linfoide secundario). Las células presentadoras de antígenos presentarán antígenos a los linfocitos T CD4+ que a su vez darán ayuda a los linfocitos B que se diferenciarán a células plasmáticas y secretarán anticuerpos que terminarán en la sangre. Una vez activados los linfocitos volverán a circular para facilitar el encuentro de antígenos y una vez eliminados los antígenos, muchos de los linfocitos que han participado en la lucha contra ellos terminarán muriendo. Quedarán sin embargo linfocitos B y T memoria que también se distribuirán por los órganos linfoides secundarios en espera de encontrar de nuevo a su antígeno. La entrada desde la sangre a cualquiera de los órganos linfoides secundarios, a excepción del bazo, se produce a través de las venulas de epitelio cúbico o HEV (high endothelial venules). El paso de linfocitos desde la sangre a la linfa podrá también producirse de forma masiva a través del ductus torácico.

Tema 4: ANTICUERPOS

En el reconocimiento del antígeno intervienen dos tipos de moléculas: las **inmunoglobulinas** y los **receptores antígeno-específicos de los linfocitos T**. Estas moléculas se caracterizan por la diversidad y la heterogeneidad de sus estructuras, capaces de reconocer a antígenos muy distintos.

Las **inmunoglobulinas** o **anticuerpos** son glicoproteínas presentes en el suero y en los líquidos orgánicos y que son producidos en grandes cantidades por las **células plasmáticas**, que constituyen el estado de activación proliferativa de los linfocitos B. Estos linfocitos expresan en su membrana el mismo tipo de anticuerpo y se requiere el contacto con el antígeno para la proliferación de la célula plasmática.

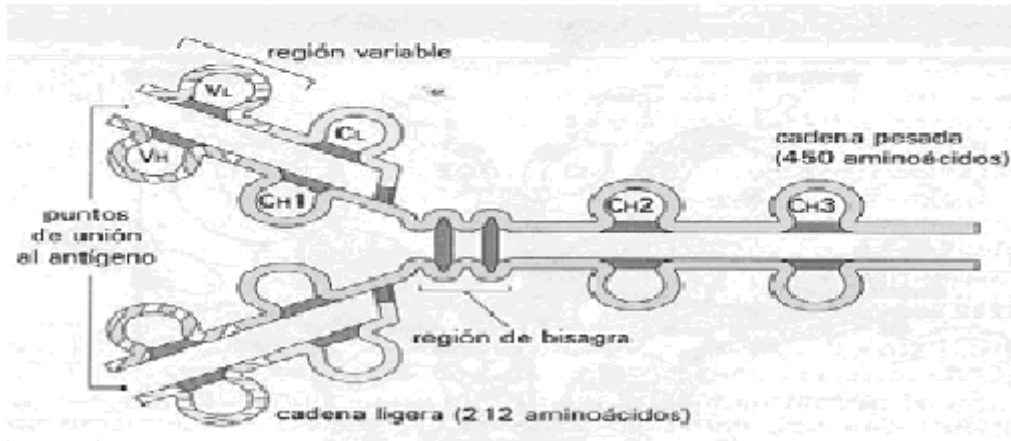
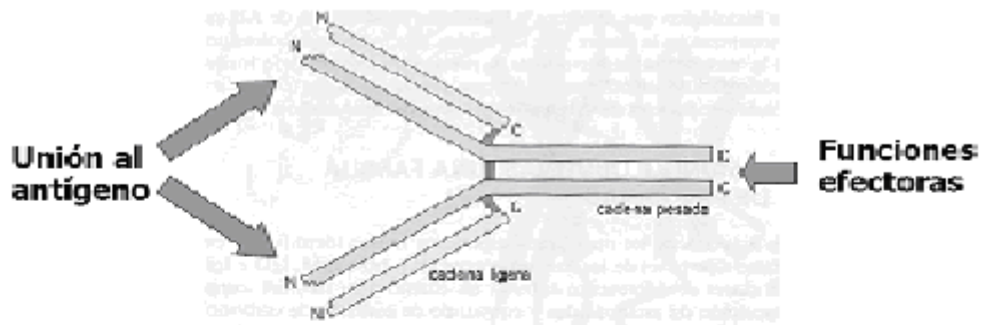


Los **receptores antígeno-específicos de las células T** se expresan exclusivamente como proteínas de membrana de los linfocitos T. El reconocimiento del antígeno por este receptor conduce a la **activación** de los linfocitos T cooperadores y supresores, los mecanismos de citotoxicidad y la actividad NK.

INMUNOGLOBULINAS.

Se reconocen cinco clases distintas: **IgG**, **IgA**, **IgM**, **IgD** e **IgE**. Difieren en tamaño, carga, composición de aminoácidos y contenido en carbohidratos. En el proteinograma sérico su perfil electroforético se sitúa entre las gamma globulinas (en el caso de la IgG) hasta las beta globulinas (IgM). La estructura básica de una inmunoglobulina está constituida por **cuatro cadenas peptídicas**. Es una molécula **bifuncional**, puesto que una región interviene en la **unión específica con el antígeno**, mientras que la otra es responsable de la **unión a los tejidos y moléculas del huésped**, incluyendo diversas células del sistema inmunitario y fracciones del complemento (C1q).

En la estructura básica de una inmunoglobulina se reconocen dos cadenas peptídicas **ligeras** (L) y dos **pesadas** (H), unidas por puentes disulfuro. La clase de una inmunoglobulina viene determinada por su cadena pesada. En la clase IgG se reconocen cuatro subclases (**IgG1**, **IgG2**, **IgG3** e **IgG4**) y en la clase IgA dos subclases (**IgA1** e **IgA2**).



Propiedades generales.

IgG: es la inmunoglobulina principal en el suero humano (70-75%). Se encuentra distribuida de manera uniforme, es la predominante en la respuesta secundaria de anticuerpos y es la única que actúa como antitoxina (neutralizante).

IgM: representa alrededor del 10% del total de las inmunoglobulinas. Tiene una estructura pentámera y es predominante en la respuesta primaria de anticuerpos.

IgA: es el 15-20% del reservorio de inmunoglobulinas séricas. Suele presentarse en forma dimérica. Es predominante en las secreciones seromucosas (saliva, leche, secreciones respiratorias, etc.).

IgD: representa menos del 1% de las inmunoglobulinas plasmáticas, pero existe en grandes cantidades en las membranas de linfocitos B circulantes. Puede intervenir en la diferenciación linfocitaria desencadenada por antígenos.

IgE: se halla en la membrana de los basófilos y mastocitos. Tiene un papel en la inmunidad activa frente a parásitos y está asociada a procesos de hipersensibilidad.

Heterogeneidad de los anticuerpos.

Los polipéptidos que componen la estructura del anticuerpo están codificados por diversos genes que se expresan de forma secuencial, lo que da lugar a una variabilidad enorme en la composición de la proteína. Existen tres tipos de variaciones: 1) **isotípica**, correspondientes a las variedades de clase y subclase comunes en todos los miembros de la especie; 2) **alotípica**, que implica la expresión de alelos distintos en ciertos locus, y por tanto pueden estar presentes en algunas personas y en otras no; y 3) **idiotípica**, es la variación que corresponde a la región de reconocimiento con el antígeno, por lo que permite obtener múltiples variaciones.

Funciones efectoras de los anticuerpos.

La función primaria es unirse al antígeno, pero también son muy importantes las funciones efectoras secundarias, tales como la **activación del complemento**, la **capacidad de atravesar la placenta**, con lo que puede conferir inmunidad pasiva al recién nacido y las **interacciones que mantiene con las células inmunitarias** (fagocitos y mastocitos/basófilos).

inmunoglobulina	función efectora							
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA	IgD	IgE
fijación del complemento (vía clásica)	++	+	+++	-	+++	-	-	-
transferencia placentaria	+	+	+	+	-	-	-	-
unión a la proteína A estafilocócica	+++	+++	-	+++	-	-	-	-
unión a la proteína G estreptocócica	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-

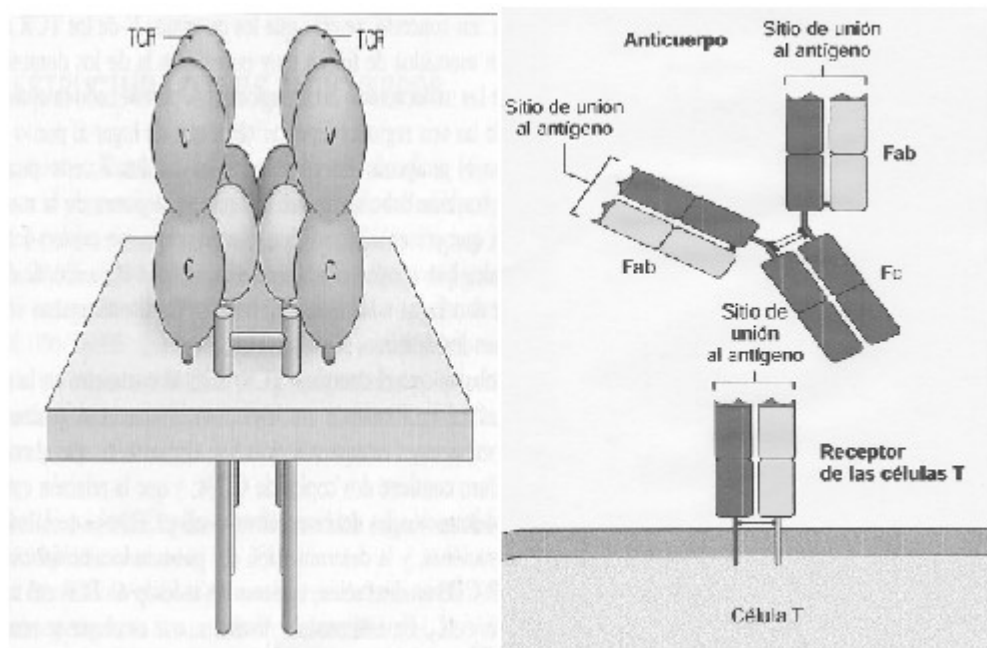
Estructura en relación con la función.

La hidrólisis con determinadas enzimas permite romper la molécula en fragmentos de distinta funcionalidad. La **papaína** divide a la inmunoglobulina en un fragmento Fc (de fijación a la célula) y dos fragmentos Fab (de unión al antígeno). La **pepsina**, por el contrario, mantiene el fragmento Fab en forma bivalente al permanecer unido por puentes disulfuro. Los dominios C2 y C3 (extremos del Fc) sirven para fijarse a células. El dominio C2 fija el C1q del complemento y el C1 fija la fracción C4b del complemento. Los extremos Fab se unen al antígeno. Esta región contiene tres zonas hipervariables (**CDR1-3**) que son los encargados de reconocer el epítipo antigénico. Las zonas peptídicas intermedias son 4 (**FR1-4**).

Tema 5: RECEPTOR DE ANTÍGENO DE LAS CÉLULAS T (TCR)

El reconocimiento de los antígenos por parte de las células T es esencial para la iniciación y regulación de una respuesta inmunitaria eficaz.

Esta función la realiza el **receptor de antígeno de las células T (TCR)**, que es una glicoproteína heterodimérica (formada por dos cadenas α y β). La estructura es similar a la que presenta el extremo Fab de los anticuerpos, con la diferencia de que se mantiene insertada en la membrana por una cadena polipeptídica (cola citoplásmica). Ya que los Fab son móviles.



En cada una de las cadenas se reconoce un segmento constante y otro variable. La región variable es la encargada de tomar contacto con el antígeno.

TCR se expresa junto a un complejo proteico que presentan las células T en membrana que se denomina CD3. Este se compone de varios péptidos (γ , δ , ϵ y ζ). El péptido ζ se asocia a una forma escindida denominada η , de modo que puede expresarse en las tres formas (ζ - ζ , ζ - η y η - η). Los péptidos de CD \cdot , cargados negativamente, se equilibran con la carga positiva de las cadenas α y β del TCR.

El CD3 es necesario para que el complejo TCR se exprese en la superficie celular. Los componentes de CD3 no presentan variabilidad en la composición de aminoácidos pero participan en la señal de transducción, tras el reconocimiento del antígeno por parte del TCR.

El plegamiento del complejo TCR en su región variable es análogo al que se observa en la región V_L de los anticuerpos.

Presenta tres regiones hipervariables denominadas también regiones determinantes de complementariedad (CDR), y es el lugar por el que toma contacto estrecho con el antígeno (expresados con números en el dibujo). El plegamiento facilita la unión de las tres regiones

de ambas cadenas, de forma muy similar a como los anticuerpos se acoplan al determinante antigénico.

La diversidad en las regiones hipervariables se consigue con la expresión de un polipéptido que se obtiene del reordenamiento por recombinación somática durante el desarrollo de las células T, de diversos genes (V, D, J, C) de los cuales existen, a su vez, múltiples segmentos variables.

RECONOCIMIENTO DEL ANTÍGENO

Para que el TCR reconozca a el antígeno éste debe ser presentado en presencia de una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o II que se expresa en la membrana de la célula que interacciona con el linfocito T.

Linfocito T CD4+ —————▶ MHC II

Linfocito T CD8+ —————▶ MHC I

Restricción haplotípica o restricción MHC :

Quando el linfocito T solo reconoce al Ag cuando está asociado a una molécula de histocompatibilidad determinada.

El reconocimiento específico por la región variable del TCR sólo se produce cuando el TCR es capaz de acoplarse a ambas moléculas (MHC y péptido).

Aunque sólo unos pocos aminoácidos pueden estar expuestos dentro del surco de unión y establecer contactos con el TCR, las células T son capaces de discriminar eficazmente entre muchos complejos péptido/MHC diferentes.

TCR $\delta\gamma$

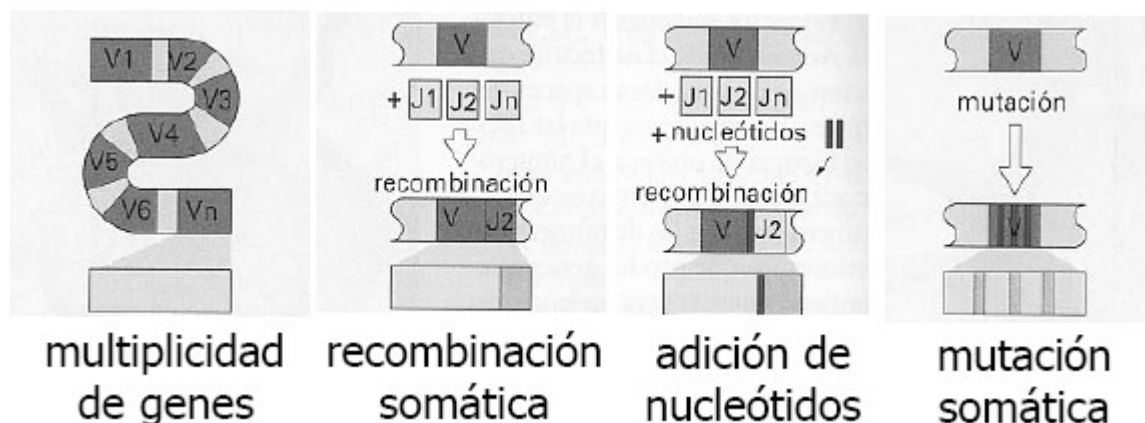
Una minoría de linfocitos T, que en el ratón se localizan en epitelios y cierto tejidos, expresan cadenas $\delta\gamma$, en lugar de las habituales $\beta\alpha$. Estos linfocitos parecen actuar más precozmente y constituyen una primera línea de defensa específica.

Tema 6 GENERACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE LOS ANTICUERPOS

La capacidad del sistema inmune para reconocer a los antígenos depende de los anticuerpos producidos por las células B y de los receptores de antígeno que expresan las células T.

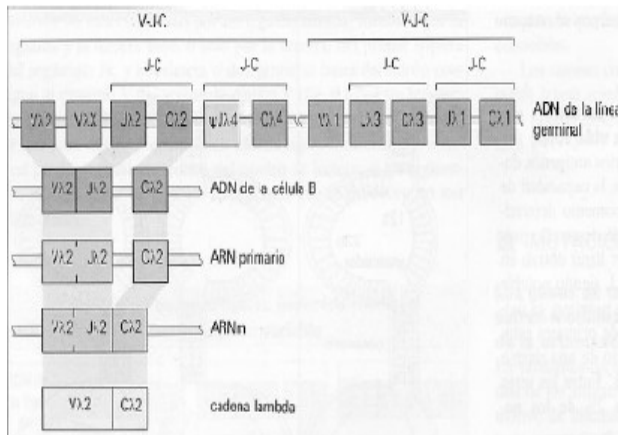
Existen cinco mecanismos que intervienen en la generación de la diversidad:

- 1) la **multiplicidad de genes** de la región V en las células germinales;
- 2) la **mutación somática** producida a lo largo de la ontogenia de las células B;
- 3) la **recombinación somática** de ciertos segmentos génicos (J_1 - J_N);
- 4) la **conversión génica** que copia fragmentos de pseudoregiones V dentro de la región V;
- 5) la **adición de nucleótidos** que se insertan al cortarse las regiones V y J y antes de que éstas vuelvan a unirse.

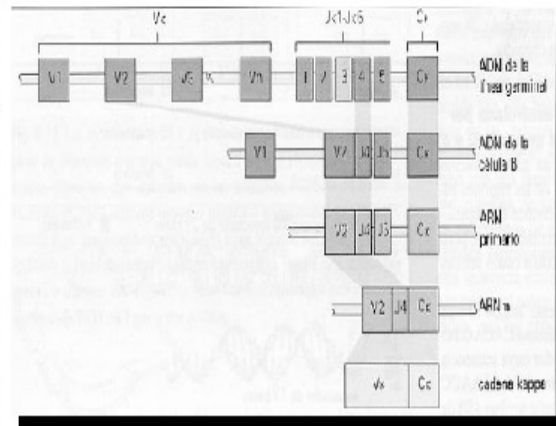


RECOMBINACIÓN DE LOS GENES DE INMUNOGLOBULINAS

La región variable de las cadenas ligeras (6 y 8) son codificadas recombinando los segmentos génicos V y J. Para la síntesis de las cadenas 6 hay un número elevado de segmentos génicos V6 (35 potencialmente funcionales en los humanos) que se pueden combinar con 5 segmentos J6. Para las cadenas 8 existen un grupo de genes V8 y siete J8-C8. La región variable de las cadenas pesadas se forma recombinando los segmentos V, D y J. Existen de 87 genes V (al menos 32 son pseudogenes), 30 genes D y 6 genes J. La existencia de pequeñas variaciones en cuanto a las posiciones en que se recombinan los segmentos genera aún más diversidad.



cadena lambda



cadena kappa

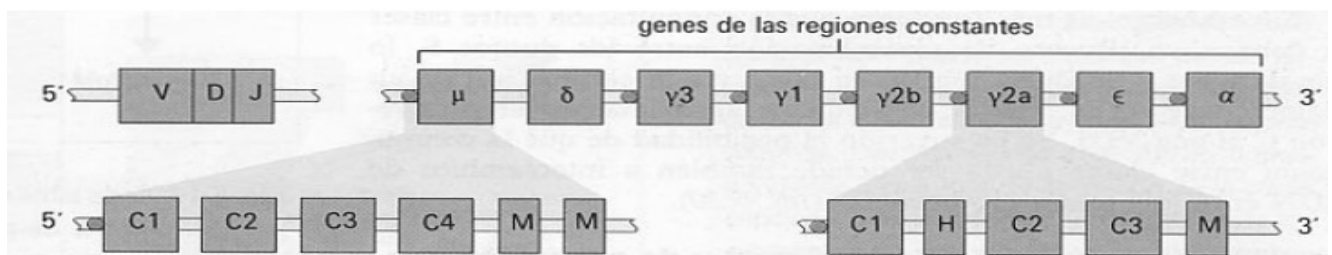
MUTACIÓN SOMÁTICA

La recombinación somática no explica totalmente la diversidad de los anticuerpos. A los mecanismos anteriores se une los fenómenos de mutación somática que se producen en las células que han tomado contacto con el antígeno. Se comprueba que a partir de la secuencia que presenta la célula germinal, el contacto con el antígeno ocasiona múltiples mutaciones que van aumentando la especificidad del anticuerpo sintetizado. Esto resulta especialmente cierto para los anticuerpos de las clases IgA e IgG, lo que sugiere que las mutaciones están asociadas con la conmutación entre las diferentes clases de anticuerpo.

GENES DE LA REGIÓN CONSTANTE DE LAS CADENAS PESADAS

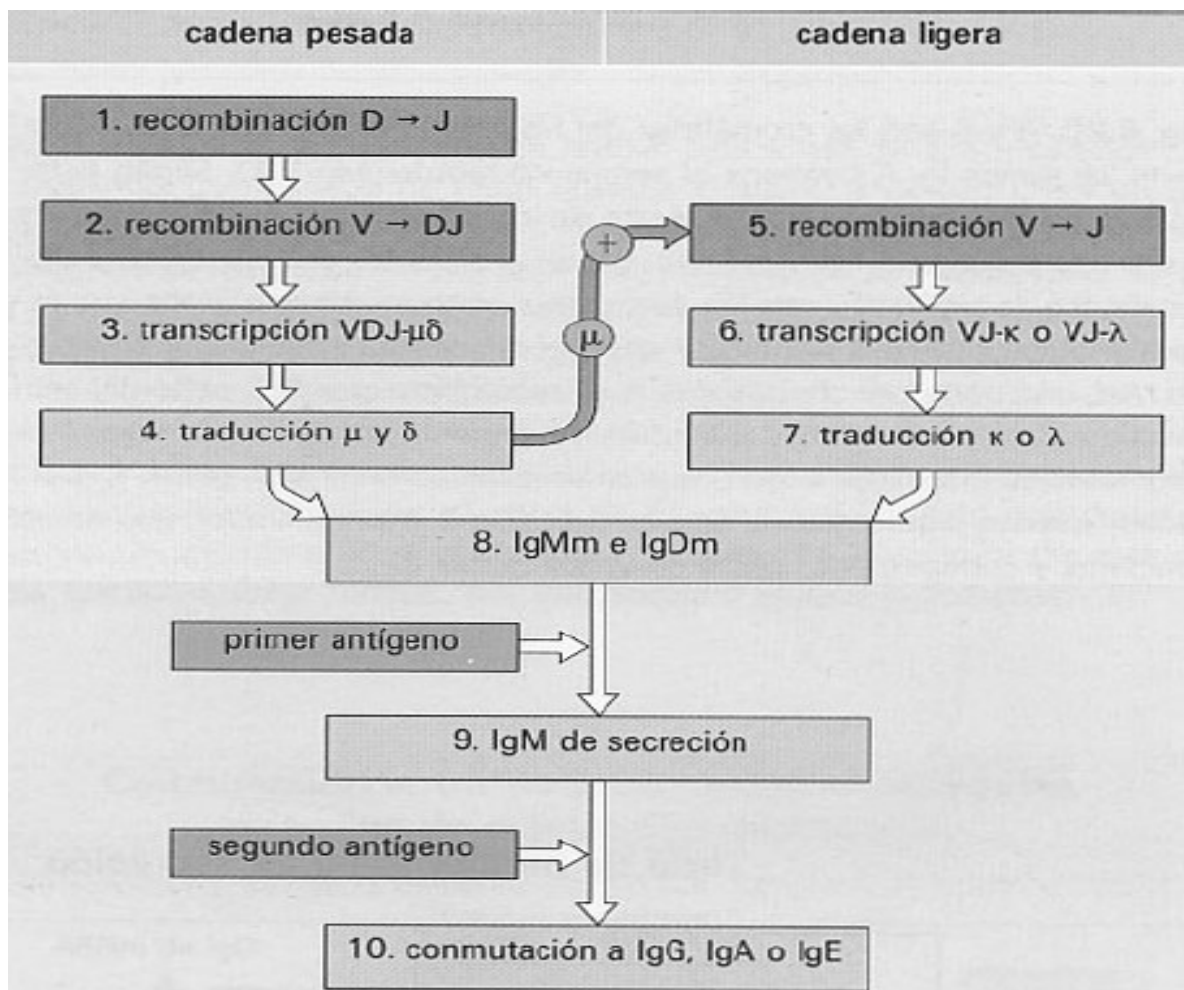
Todas las clases de inmunoglobulinas utilizan el mismo conjunto de regiones variables. Cuando una célula productora de anticuerpos conmuta la clase de inmunoglobulina, los cambios que se producen afectan solamente a la región constante de las cadenas pesadas. Los genes de las regiones constantes están situados después de los segmentos J y existe un gen para cada uno de los isotipos IgM, IgD, IgE e IgA y cuatro para cada una las subclases de IgG.

La conmutación de clases suele deberse a un proceso de recombinación que da lugar a la formación de un bucle y a la eliminación de un segmento de ADN, con la consiguiente aproximación de otra región C al gen VDJ.



SÍNTESIS DE INMUNOGLOBULINAS

Las células pre-B recombinan los segmentos D y J de las cadenas pesadas, que después se recombinan con un segmento V para originar un gen funcional de cadenas pesadas V-D-J, que es transcrito junto con los genes γ y δ y traducido, con lo que se obtienen las cadenas de membrana γ y δ . La cadena μ induce recombinaciones en los loci de las cadenas ligeras y se producen la recombinación, transcripción y traducción de éstas. Las células B vírgenes expresan IgM e IgD de membrana. Tras la primera estimulación antigénica, la célula puede sintetizar IgM de secreción; tras la estimulación por un antígeno dependiente de células T, y con la colaboración de estas últimas, la célula puede conmutar la clase de Ig producida, dando lugar a IgG, IgA o IgE.



Tema 7. Reconocimiento de antígeno

Unión antígeno-anticuerpo. Especificidad y afinidad del anticuerpo. Estructura de los antígenos. Reconocimiento del antígeno por linfocitos T.

UNIÓN ANTÍGENO ANTICUERPO

Clásicamente se llamaba antígeno a toda molécula capaz de **generar** un anticuerpo. En la actualidad sin embargo, se considera antígeno a cualquier molécula capaz de **unirse** a un anticuerpo independientemente de que pueda, por si sola, generarlo. Aquellas moléculas que además sean capaces de generar un anticuerpo se les denomina **inmunógenas**. En este sentido existen moléculas demasiado pequeñas que llamamos **haptenos**, que para generar anticuerpos necesitan ir unidas a moléculas más grandes llamadas **carrier**. Una vez que se han generado de este modo, anticuerpos contra el hapteno, éste puede unirse a los anticuerpos. El hapteno es por tanto, una molécula antigénica pero no inmunógena.

Lo dicho anteriormente tiene una gran importancia de cara a la generación de anticuerpos frente a péptidos (con fines experimentales, o de profilaxis mediante vacunación), ya que tendremos que unir covalentemente el péptido contra el que queremos generar anticuerpos, a una proteína transportadora (carrier). O bien construir una proteína de fusión recombinante uniendo los genes que codifican para el péptido y la proteína transportadora, seguidamente expresarla de forma recombinante y utilizarla como vacuna.

La razón por la que un hapteno no es inmunógeno pero si antigénico, radica en que aunque posee algún epitopo reconocido por los BCR (receptores del linfocito B o anticuerpo de superficie), no posee ningún "epitopo" que el linfocito B pueda presentar al linfocito T, por lo que no habrá ningún Linfocito T que preste "**ayuda T**" al linfocito B que reconoce el péptido. Los linfocitos B en ausencia de "ayuda T" no resultarán estimulados convenientemente y no generaran una respuesta de anticuerpos adecuada contra el péptido. La presencia de hapteno y carrier en la misma molécula permite al linfocito B presentar algún péptido del carrier para el que si habrá algún linfocito T específico. Este linfocito T prestara la ayuda T necesaria. Una vez generados los anticuerpos el hapteno será suficiente para unirse a ellos puesto que el epitopo reconocido por el anticuerpo se encuentra en el hapteno.

ESTRUCTURA DE LOS ANTIGENOS

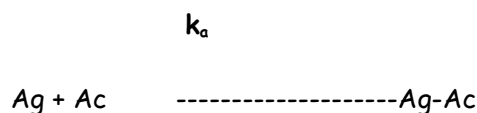
En general los antígenos son de mayor tamaño que la zona que participa en la unión con el anticuerpo, de modo que un anticuerpo solo se une a una zona muy restringida del antígeno. A esta zona del antígeno que participa en la unión con el anticuerpo se le denomina **epitopo** o **determinante antigénico**. La mayoría de los antígenos poseen múltiples epitopos, con lo que pueden unir múltiples anticuerpos a la vez, siempre que los epitopos estén suficientemente alejados entre ellos para que no existan interferencias estéricas que lo impidan (es decir que físicamente se entorpezcan uno a otro. Los epitopos pueden estar formados por aminoácidos consecutivos en la secuencia de la proteína. Sin embargo y como las proteínas se encuentran normalmente dobladas sobre si mismas según lo que llamamos estructura terciaria, en la mayoría de los casos los anticuerpos generados contra este tipo de epitopos solo reconocerán a la proteína desnaturalizada o "linearizada" y por ello se les llama **epitopos lineales**. En la mayoría de los casos los epitopos suelen estar formados por aminoácidos del antígeno que solo se encuentran suficientemente cerca unos de otros en la proteína nativa, es decir en la proteína que tiene estructura terciaria conservada, es decir aquella que se encuentra en una conformación adecuada, por lo que a estos epitopos se les

llama **epitopos conformacionales** (Figura 3.19). Cuando inmunizamos un animal con una proteína, generaremos una serie de anticuerpos dirigidos contra los distintos epitopos de la misma, todos esos anticuerpos se encontraran circulando en el suero del animal al que, una vez extraído, llamaremos antisuero. El tipo de anticuerpos que compondrán ese antisuero dependerá en gran medida de la forma en que hayamos preparado la proteína para la inmunización, si la hemos preparado desnaturalizada, solo existirán epitopos lineales, mientras que si hemos inyectado la proteína en su estado nativo, coexistirán en el antisuero anticuerpos que reconozcan epitopos conformacionales con otros que reconozcan epitopos lineales. En el caso de anticuerpos monoclonales, todas los anticuerpos procederán de un clon de celulas plasmáticas y por tanto estarán dirigidos contra un solo epitopo que será de un tipo u otro. La importancia radica, en que dependiendo del tipo de epitopos que reconozcan los anticuerpos, las aplicaciones diagnosticas o de investigación serán distintas. En general, los anticuerpos que reconocen epitopos lineales serán útiles para técnicas de Western Blot (donde se analiza la proteína generalmente desnaturalizada) mientras los que reconocen epitopos conformacionales lo serán para técnicas de inmunofluorecencia, inmunoprecipitación, etc.

Las inmunoglobulinas se unen a los epitopos de los antígenos por sus **sitios activos**, constituidos como se ha indicado anteriormente, por los segmentos variables de las cadenas pesadas y ligeras (Figura 3.20) y donde intervienen principalmente las regiones hipervariables (Figura 3.21). Esta zona de unión al epitopo se conoce con el nombre de **paratopo**.

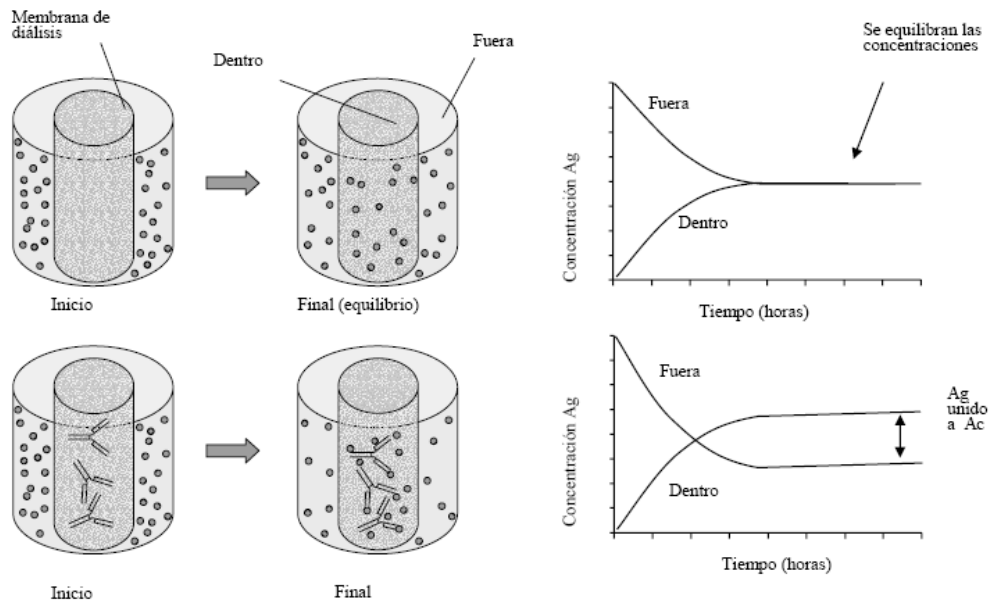
ESPECIFICIDAD Y AFINIDAD

La unión del antígeno (Ag) con el anticuerpo (Ac) o inmunoglobulina es semejante a la que se establece entre la enzima y su substrato o entre proteínas que pertenecen a cualquier vía de señalización intracelular. Estas interacciones (unión Ag-Ac) se deben a la formación de múltiples enlaces no covalentes (enlaces de hidrogeno, interacciones electrostáticas, de Van der Waals e hidrófobas), cada uno de los cuales por si solo es débil. Sin embargo, como se establecen múltiples interacciones, la fuerza total de la unión puede ser muy elevada. Para que las interacciones mencionadas lleguen a ser efectivas, los grupos entre los que se establece deben estar situados a distancias muy cortas, y para que esto sea posible y se puedan producir un gran número de interacciones, el epitopo (zona específica del Ag que se une al Ac) y el paratopo (zona del Ac o de la Ig que se une al epitopo del Ag) deben **encajar perfectamente**, dependiendo de ello la "fuerza" de la interacción, que conocemos con el nombre de **afinidad**. La afinidad de esta interacción es de vital importancia, por cuanto de ello dependerá tanto la utilidad diagnóstica y de investigación de un anticuerpo, como su importancia fisiopatológica. Para cuantificar la afinidad de una interacción, deberemos entender primero una serie de conceptos de los que nos ocuparemos a continuación. Al tratarse de uniones no covalentes, la unión Ag/Ac será reversible de modo que cuando el antígeno y el anticuerpo se mezclan en solución, se estarán formando y disociando complejos constantemente de acuerdo con la siguiente ecuación:



k_d

donde k_a representa la constante de velocidad y k_d la de disociación



Llegara un momento en que las velocidades de asociación y disociación se igualen, es decir, que el número de complejos Ag/Ac que se formen sea el mismo que el que se disocie, entonces decimos que se ha llegado a una situación de **equilibrio dinámico**. Una forma indirecta de medir la afinidad de la interacción de una pareja Ag/Ac, será medir la velocidad de asociación y disociación antes de que se llegue al equilibrio, lo cual puede realizarse actualmente mediante biosensores. Cuanto mayor sea la velocidad de asociación y menor la de disociación mayor será la afinidad de la interacción de esa pareja Ag/Ac. Otra forma complementaria y más directa de cuantificar la afinidad de la interacción Ag/Ac, es hacerlo una vez que se ha alcanzado el equilibrio y utilizando concentraciones bajas de anticuerpo. En estas condiciones la concentración de antígeno que permite que la mitad de los anticuerpos estén unidos a ellos y la otra mitad libre, medida en molaridad, se denomina **constante de disociación (K_D)** y es una medida directa de la afinidad de la interacción. Cuanto menor sea la K_D mayor será la afinidad puesto que indica que es necesaria una menor concentración de antígeno para que la mitad de los anticuerpos estén ocupados. La inversa de la K_D es la **constante de asociación (K_A)** cuyo valor es directamente proporcional a la afinidad de la interacción.

Para determinar experimentalmente estas constantes tendremos que conocer las concentraciones de antígeno libre y unido, para lo cual existen varios métodos entre los que

se encuentra el que se muestra en la figura 3.22 denominado **diálisis de equilibrio**. Esta técnica se basa en la utilización de una membrana semipermeable de un poro tal, que permita el paso de un antígeno suficientemente pequeño (un hapteno) pero no del anticuerpo. A concentraciones bajas de antígeno, la concentración de anticuerpo libre irá bajando rápidamente hasta que se alcance el equilibrio, puesto que todo el antígeno que entre a través de la membrana semipermeable quedará retenido por el anticuerpo. Realizando el experimento anterior con varias concentraciones de antígeno, podremos encontrar aquella en la que la mitad del anticuerpo se encuentra unido al antígeno que como hemos dicho corresponde a la K_D . La afinidad que hayamos calculado corresponderá exclusivamente a la de la interacción de esa pareja Ag/Ac. Un determinado anticuerpo podrá unirse a más de un antígeno con afinidades distintas en cada caso.

Como apuntábamos anteriormente, el fenómeno de la unión Ag/Ac es en realidad mucho más complejo, pues cada uno de los antígenos posee varios epitopos distintos, por lo que podrán unirse más de un anticuerpo. Cada molécula de anticuerpo, por su parte, podrá unirse al menos a dos moléculas de antígeno, una por cada Fab (cadena ligera: región variable-Ag, y región constante; cadena pesada: región variable-Ag y la región constante) y en el caso de la IgM hasta diez moléculas (como se comentó anteriormente las inmunoglobulinas IgM se ensamblan en unidades funcionales constituidas por cinco moléculas de anticuerpo). Finalmente en un antígeno, un determinado epitopo puede estar representado varias veces siendo capaz de unirse a varias moléculas del mismo anticuerpo. La fuerza total de la interacción que considera todas las interacciones epitopo/paratopo que tienen lugar entre antígenos y anticuerpos **multivalentes** (con varios sitios de unión), se denomina **avidéz** y es mucho mayor que la suma de las afinidades puesto que las distintas interacciones se estabilizan entre ellas. Estas interacciones multivalentes poseen una gran importancia fisiopatológica por cuanto cuando se encuentren Ag y Ac en solución, como es el caso del plasma o los tejidos, se formarán agregados constituidos por muchas moléculas que denominamos **Inmunocomplejos**. A concentraciones equivalentes de Ag y Ac estos Inmunocomplejos serán de gran tamaño y podrán quedar atrapados en los tejidos, iniciando una respuesta inflamatoria y dando lugar a las llamadas **enfermedades por depósito de Inmunocomplejos**.

La unión entre el Ag y el Ac, tiene una gran **especificidad**, de tal manera que una Ig se unirá fundamentalmente y con mayor avidéz, a un antígeno determinado. En algunos casos la inmunoglobulina podrá unirse a antígenos con epitopos similares pero no idénticos, aunque en este caso la **afinidad** de la unión es mucho menor (Tabla 3.7). También es posible que un mismo epitopo se encuentre en dos antígenos diferentes en cuyo caso el anticuerpo reaccionará con los dos antígenos, diciéndose entonces que existe una **reactividad cruzada**.

Afinidad de un Ac preparado frente a proteína-DNP (2-4-Dinitrofenil-L-lisil)	
Hapteno frente al que se hace reaccionar	Afinidad
DNP-L-lisina	Máxima
DNP-L-ornitina	Alta
2,4-dinitroalanina	Baja
m-dinitrobenceno	Muy baja

Tomado de Biochemistry. 3, 996, 1964.

RECONOCIMIENTO DEL ANTIGENO POR EL LINFOCITO T

Los linfocitos T no reconocen antígenos solubles sino péptidos procedentes del procesamiento intracelular de esos antígenos una vez asociados a moléculas MHC.

Este dato se conoció gracias a una serie de experimentos:

Doherty y Zinkernalgel realizaron un experimento, que les valió el premio Nóbel, en el que demostraron que células citotóxicas de un ratón que había sido infectado por el virus de la coriomeningitis linfocitaria, solo podían lisar células infectadas por el mismo virus si tenían el mismo Haplotipo MHC.

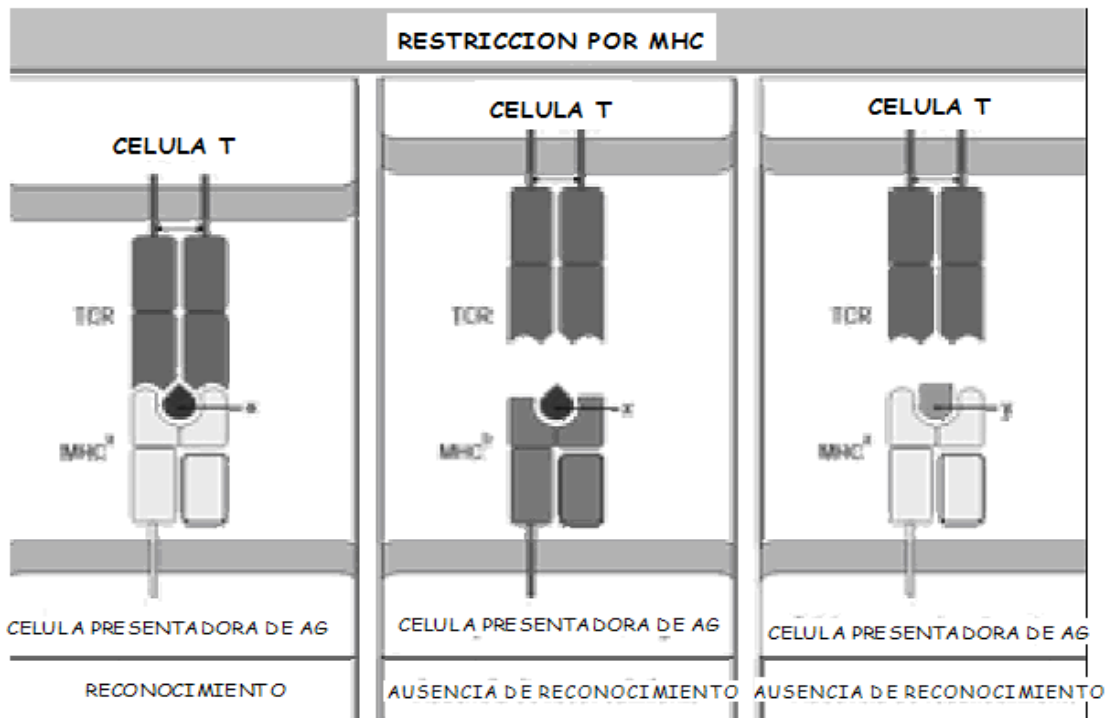
Anticuerpos contra MHC I eran capaces de bloquear la lisis, mientras los anticuerpos contra la proteína del virus no bloqueaban.

Los experimentos anteriores también pudieron reproducirse en humanos, utilizando células infectadas por el virus de la gripe.

Experimentos similares demostraron que también los linfocitos CD4+ (Th1 respuesta celular, linfocito T citotóxico. Th2 respuesta humoral, células B) reconocían los antígenos de manera similar si bien presentadas por MHC-II. Así Linfocitos CD4+ que proliferaban contra un péptido de la ovoalbúmina solo lo hacían si este péptido era presentado por células presentadoras con un determinado haplotipo MHC.

Todo lo anterior nos demuestra no solo que las células T reconocen los antígenos en forma de péptidos antigénicos presentados por el MHC, sino también que este MHC tienen que ser de un Haplotipo determinado. Este fenómeno que indica que el reconocimiento de péptidos antigénicos por parte de linfocitos T solo se produce cuando estos son presentados por un MHC determinado, se denomina **Restricción haplotípica** o **Restricción MHC** de la

presentación de antígenos a los Linfocitos T. Los linfocitos T solo van a reconocer Ag (péptidos de Ag) si están presentados por una MHC determinada.



CELULA T

Solo algunos péptidos de una determinada proteína antigénica serán reconocidos por el TcR de un Linfocito T, determinado. Estos péptidos podrán ser considerados epitopos para el linfocito T. Del mismo modo que cada antígeno tenía varios epitopos reconocidos por linfocito B de especificidades diferentes, también tendrá distintos péptidos capaces de ser reconocidos por TcR distintos y por tanto por clones de Linfocitos T distintos. Un antígeno dará lugar por tanto a la activación de varios clones tanto de linfocitos B como de linfocitos T.

Dado un antígeno, éste será reconocido tanto por linfocitos T como por linfocitos B, de hecho un determinado clon T, solo prestará **ayuda T** al linfocito B que reconozca el mismo antígeno que él. Lo que si es cierto es que los epitopos reconocidos por el linfocito T y B no tienen por qué ser los mismos, en este sentido se ha demostrado experimentalmente, utilizando haptenos y carriers distintos, que al menos en algunos casos los linfocitos T y B reconocen regiones distintas de un antígeno o dicho de otro modo que los epitopos de los linfocitos T y B no tienen por qué coincidir.

Tema 8. Sistema Principal de Histocompatibilidad (CPH).

En humanos MHC = HLA.

El Complejo Principal de Histocompatibilidad humano (HLA). Genes Clase I. Genes Clase II. Genes Clase III. Regulación de su expresión génica. Desequilibrio de unión. Histocompatibilidad. Complejo Mayor de Histocompatibilidad en el ratón (H-2). Cepas singénicas, alogénicas y congénicas. Antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (CPH). Estructura y funciones de las moléculas de los productos del CPH. Biosíntesis y transporte intracelular. Recambio y degradación. Distribución tisular de las moléculas clase I y II.

COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (CPH)

Cuando hablamos del Complejo Principal de Histocompatibilidad **MHC** (Main Histocompatibility Complex), nos referimos al conjunto de genes que codifican para las proteínas del CPH. Cuando hablamos de las proteínas nos referiremos a **moléculas MHC** o **antígenos MHC**.

Fueron descubiertas en los años 40 como los **genes responsables del rechazo de trasplantes**. Para su estudio se generaron cepas **congénicas** para ello se cruzaron ratones de dos cepas distintas y se fue seleccionando la progenie que rechazaba la piel del progenitor de una de las especies, cruzándolo con el progenitor, así sucesivamente se conseguían ratones que eran genéticamente iguales a su progenitor en todo, salvo en algo que causaba el rechazo de trasplantes, ese algo era algún antígeno MHC.

Es uno de los sistemas mas **polimórficos** de organismo. La mayoría de los genes del organismo son no polimórficos (son iguales en todos los individuos de una misma especie, por Ej. la albúmina de todos nosotros es muy similar, podríamos inyectar albúmina de unos a otros sin ocasionar una respuesta inmune), o bien poco polimórficos (tienen poca variación, el pigmento del color de ojos por Ej.). Sin embargo los genes polimórficos, tienen un gran número de secuencias posibles, por lo que la probabilidad de que sean iguales en dos personas no relacionadas es muy baja. En el locus de MHC-I B, por Ej. puede haber mas de 50 posibilidades. Cada una de estas posibilidades son **alelos** de ese gen. Individuos que expresa alelos distintos de un gen (Un individuo que sea MHC B14 frente a otro que sea B4) son individuos **alogénicos**. Como sabéis si tienen el mismo alelo en los dos cromosomas, es decir si es MHC-B42/B42, será **homocigoto** en este caso será "homocigoto para HLA B42" y si tiene alelos distintos (MHC B42/B70) será **heterocigoto** para MHC B.

En **humanos** los MHC se descubrieron gracias a estudios en individuos politransfundidos que obviamente desarrollaban anticuerpos contra aquellos antígenos de histocompatibilidad de los donantes que fueran distintos a los suyos. Estos anticuerpos hacían que el suero de estos individuos lisaran linfocitos del donante y también de terceras personas que tuvieran los mismos alelos que el donante. Estos sueros se llamaron **aloantisueros**, porque reaccionaban frente a individuos que eran alogénicos para uno o varios genes MHC (que tenían un alelo distinto. Ej. Que en el locus MHC-B tenían la forma 42 en vez de la 14). Por este método se caracterizaron múltiples especificidades del MHC (MHCs con secuencias distintas para un locus determinados). Como lo que se descubrían eran los antígenos que

reconocían los antisueros, se les llamó **antígenos de histocompatibilidad** y al MHC humano se le llama HLA (**H**uman **L**eukocyte **A**ntigen).

Los antisueros se siguen usando en la actualidad en el llamado **test de linfocitotoxicidad** para realizar el **tipaje HLA** que permite identificar los antígenos de histocompatibilidad de un determinado individuo. En casos como los trasplantes de riñón, dado que tenemos una abundante población de individuos sin función renal, mantenidos con diálisis esperando un donante HLA compatible y dado que existen muchos individuos que mueren en accidentes, algunos de los cuales donan sus órganos, podemos encontrar individuos cuyo HLA es compatibles con los enfermos en lista de espera. De este modo podremos transplantar con bastantes alelos compatibles. En trasplantes de hígado y corazón, dado que no tenemos maquinaria que sustituya su función de estos órganos de forma efectiva, tenemos que transplantar el órgano disponible a la persona que esté mas grave, sin poder esperar a buscar aquellos histológicamente mas compatibles. Esto nos obligara a mantenerlos con mayor terapia inmunosupresora lo cual empeorara su calidad de vida (mayor susceptibilidad a infecciones y toxicidad de los inmunosupresores).

En otro trasplante en el que la compatibilidad HLA es incluso mas critica es en el de medula ósea, al transplantar la medula ósea que es de donde proceden todas las células de la sangre, incluyendo las células inmunes (a excepción de las células foliculares dendríticas), lo que ocurre no es que se rechace el órgano transplantado sino que la médula ósea transplantada "rechaza" al huésped, ocasionando la denominada **enfermedad injerto contra huésped** (GVHD graft versus host disease). En estos casos no solo se realizan ensayos de linfocitotoxicidad sino también **cultivo mixto linfocitario (MLR mixed lymphocyte reaction)** y secuenciación o hibridación específica de la zona polimórfica (**tipaje génico**). Aquí también nos da tiempo a **tipar** a los donantes al realizarse la donación es "ex-vivo" puesto que para donar la medula basta con realizar punción aspiración de un hueso plano del donante e inyectarla en el receptor por venopunción. Por esta razón podemos buscar donantes idóneos entre los hermanos del paciente, algunos de los cuales pueden haber heredado los mismos alelos y ser HLA idénticos. Si no tiene hermanos HLA idénticos habrá que buscar entre donantes de todo el mundo (fundación Carreras o similares) para encontrar un individuo HLA idéntico.

A parte de los trasplantes el tipaje HLA también se utiliza para **estudios de paternidad** y para **identificación de individuos** a partir de casi cualquier muestra biológica. Dado que el DNA es bastante estable es posible conseguir suficiente cantidad del mismo, procedente de restos de un cadáver por ejemplo o de material biológico dejado en el lugar donde se ha cometido un crimen. (Por supuesto tenemos que comparar el tipaje del sospechoso con el encontrado en el área del crimen).

FUNCIONES

- El MHC no desarrolló evolutivamente su polimorfismo para dificultar los trasplantes de órganos sino debido a su función fisiológica: la de **presentar antígenos**. Como veremos seguidamente el linfocito T reconoce péptidos antigénicos presentados junto a regiones polimórficas del MHC. En este sentido, y teniendo en cuenta que unos MHC son mas adecuados para presentar un determinado antígeno que otro, se explica que haya evolucionado como polimórfico. Si no fuera polimórfico, en el caso de que el MHC de una especie no fuera capaz de presentar un determinado antígeno, útil para luchar contra un determinado agente patógeno,

la especie desaparecería víctima de una infección por ese agente. El hecho de que entre toda la especie haya muchas formas distintas de presentar el antígeno aumenta la probabilidad de que haya individuos de la especie que sobrevivan. Esa es la razón por la que los habitantes de americanos murieron en masa víctimas de infecciones llevadas por los europeos. Solo los europeos que habían sido capaz de presentar efectivamente antígenos de las infecciones frecuentes en Europa, habían sobrevivido, sin embargo los americanos, no habían sido seleccionados para ser capaz de presentar antígenos de infecciones hasta entonces inexistentes en América. MHC fundamental para presentar el Ag al linfocito T (que solo lo reconocerá si el Ag está unido a una molécula de Ac adecuada.

- Definen personalidad biológica individuo.
- Regulan la Citotoxicidad.
- Marcadores de activación celular.

COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

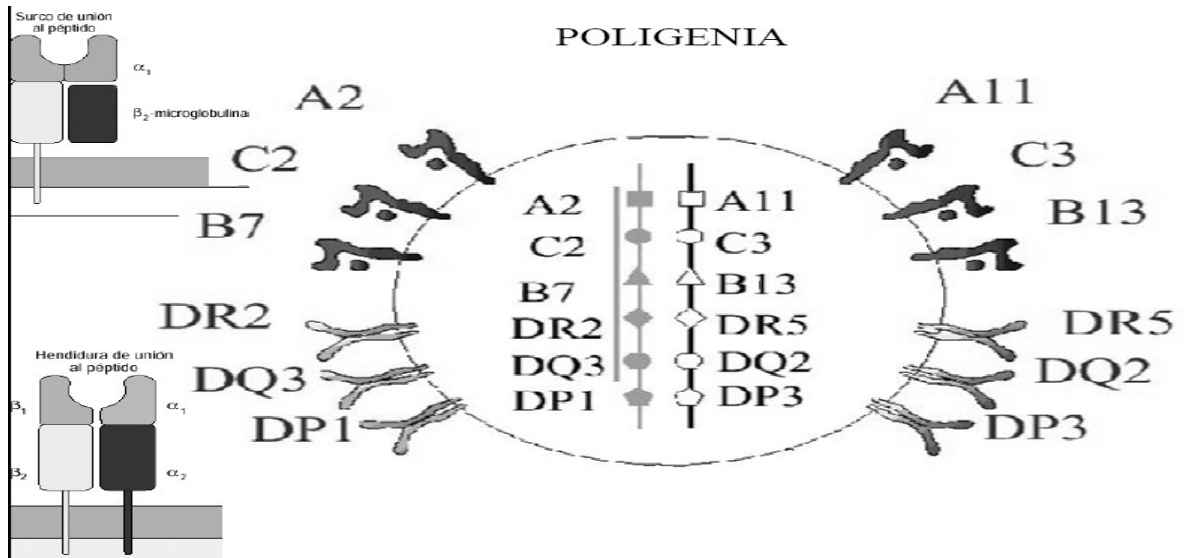
El complejo Principal de Histocompatibilidad en el hombre se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6 y también se conoce con el nombre de **HLA** (Human leucocyte antigen).

Entre los de Clase I HLA-I o MHC-I se encuentra los loci A, B y C.

Entre los de Clase II HLA-II o MHC-II se encuentran los loci DR, DQ y DP.

Cuando hablamos de locus, hablamos de un sitio en el DNA, la secuencia de ese DNA el alelo que una determinada persona tendrá, podrá tener múltiples posibilidades que luego se traducirán en que la molécula será distinta en esa zona.

El conjunto de todos los alelos que presenta un individuo en cada cromosoma, se llama **Haplotipo**. Es decir un individuo tendrá por Ej. en un cromosoma los alelos A1 B39 C4 (no confundir con el sistema del complemento) DR10 DQ6 DP5 y en el otro cromosoma A3 B7 C4 DR7 DQ4 DP5. Todo individuo tendrá dos haplotipos, salvo en el hipotético caso de una persona homocigota para todos los loci caso en el que tendría un solo Haplotipo, (esto no ocurre en humanos pero si en cepas de ratones **singénicos** que han sido cruzados entre ellos durante muchas generaciones seleccionados por la característica de rechazar transplantes de piel entre ellos. Estas cepas son genéticamente idénticos no solo en su HLA sino también en todo el resto del genoma).



HERENCIA

Estos genes se **heredan** según las leyes de Mendel como **codominantes simples**. Es decir cada individuo recibe un Haplotipo de la madre y otro del padre. Tanto los genes procedentes del padre como los de la madre se expresan. Como cada Haplotipo está en un cromosoma, es probable que recibamos el Haplotipo en bloque, (si nuestra madre tiene A1 y B39 en un cromosoma que recibió a su vez de su madre y A4 y B21 en el otro recibido de su padre - diríamos que su tipaje es A1/4 B39/21- y nuestro padre es A3/7 B7/16. Es probable que si recibimos el A1 de nuestra madre, recibamos el cromosoma entero y por tanto también recibamos el B39, es decir heredamos los genes "ligados" unos a otros). Esto que ocurre con frecuencia, cuando consideramos una sola generación, no sucede siempre, porque como sabéis durante la meiosis se intercambia material genético entre los dos cromosomas homólogos, con lo que, en nuestro ejemplo, la secuencia A1 que estaba en uno de los cromosomas de la madre junto con el B39, puede intercambiarse con el B21 del otro cromosoma y podemos heredar el A1 con el B21 en vez de con el B39. Por ello nosotros seremos. Cuanto más cerca estén las secuencias que determinan uno u otro alelo, más probable es que si se intercambian con otra secuencia homóloga del otro cromosoma lo hagan juntas y por tanto se hereden en bloque. Por este fenómeno que se denomina **desequilibrio en el ligamiento**, algunos alelos se heredan junto a otros con mayor frecuencia de la esperada, por Ej. HLA A1/B8/DR3 se suele heredar en bloque.

HLA Y SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDAD

Un determinado HLA predispone a sufrir determinadas enfermedades. Se trata de una mayor predisposición de una mayor probabilidad de padecer la enfermedad. No se ha encontrado ninguna asociación absoluta. La susceptibilidad de algunos alelos a una enfermedad se mide con el riesgo relativo (**RR**). Cuanto más alto sea el RR más probabilidad tendremos de sufrir esa enfermedad si tenemos ese HLA.

En caso de enfermedad autoinmune, la causa de esta asociación puede estar relacionada con el papel fisiológico de la molécula HLA, con su función de presentar antígenos. Un HLA determinado Ej. DR3, asociado a un péptido determinado puede parecerse a un antígeno propio por Ej. alguna molécula de la célula B del páncreas y dar lugar a una respuesta inmune contra ella, que causara diabetes tipo I.

En otros casos la asociación con enfermedad no está relacionada con la función del MHC y se debe a otros genes que están cerca en el cromosoma. Si un gen responsable de la predisposición a una enfermedad se encuentra próximo en el cromosoma a la secuencia característica de un determinado HLA, por el fenómeno de **desequilibrio en el ligamiento** tenderá a heredarse junto a él y así nosotros relacionaremos la susceptibilidad a la enfermedad con un determinado alelo del HLA cuando en realidad éste solo nos sirve como marcador, sin que la enfermedad tenga nada que ver con el MHC o con el sistema inmune.

Enfermedad		
Narcolepsia	DR2	130
Espondilitis Anquilopoyetica	B27	97

Diabetes tipo I	DR3/DR4	47
Enfermedad Celiaca	DR3	11
Hemocromatosis	A3/B14	90

MOLECULA MHC O HLA

Todas las células nucleadas expresan moléculas MHC de clase I (MHC-I ó HLA-I), excepto los hematíes sincitiotrofoblasto y algunos timocitos (que como recordareis es el nombre que reciben los linfocitos T mientras se desarrollan en el timo). Las células presentadoras de antígenos CPA (APC antigen presenting cells -monocitos/macrófagos, células dendríticas y células B) expresan además moléculas MHC clase II (MHC-II ó HLA-II).

CLASE I Las moléculas de clase I están compuestas por una cadena pesada a unida de forma no covalente a la cadena ligera b , que es la b_2 microglobulina que no forma parte del MHC. Cuando decimos que no forma parte del MHC, queremos decir que el gen que codifica para ella no se encuentra en la región del MHC, encontrándose incluso en otro cromosoma (en el cromosoma 15 en el hombre y en el cromosoma 2 en el ratón). También a diferencia del MHC la b_2 microglobulina no es polimórfica.

- En la **CADENA a** se distinguen las siguientes zonas:
 - **Zona extracelular que consta de tres dominios, a_1 , a_2 y a_3** , de los cuales a_3 es similar a los dominios constantes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, por lo que se dice que pertenece a la **superfamilia de la inmunoglobulinas**. Entre los dominios a_1 y a_2 se forma el surco de unión del péptido y también están situadas las regiones polimórficas del HLA I. Este hecho se descubrió cuando al resolver la estructura de las moléculas de clase I se observó que en este área existía mayor densidad electrónica que la que justificaba por la secuencia de aminoácidos (AA), lo que permitió descubrir que existía una secuencia erógena que se trataba de un péptido. Variaciones en la secuencia de aminoácidos en el área de unión al péptido, modifican notablemente la unión de un péptido determinado.
 - **Región transmembrana.** Como la mayoría de las regiones transmembranas es hidrofóbica puesto que esta inmersa en la bicapa lipídica.
 - **Región citoplásmica.** Siempre que hablamos de una región citoplásmica tenemos que pensar que puede tener que ver con transmisión de señales hacia el interior de la células. Aunque ésta región no está muy conservada entre las distintas moléculas de clase I, (cuando hay una región con importancia funcional, suele estar conservada tanto con otras moléculas parecidas como filogenéticamente). Los que sí están conservados son algunos residuos consenso de *fosforilación* (que suelen estar relacionados con transmisión de señales) y de *transpeptidación*, La función exacta de esos residuos consenso no se conoce, aunque se sabe que es necesaria para que la molécula pueda internalizarse. A esta conclusión se ha llegado mediante experimentos en los que, mediante ingeniería genética, se ha eliminado esa región del gen con el resultado de que la

molécula resultante no es capaz de internalizarse. La internalización de estas moléculas es importante para regular la cantidad de moléculas MHC en la superficie de la célula y quizá para transmitir señales a su interior.

- **CADENA b**, Como dijimos la **b₂ microglobulina** también pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, se une a la cadena a en su dominio extracelular. No establece contacto con la membrana plasmática.

CLASE II

Esta formada por dos cadenas a y b asociadas de forma no covalente. En este caso las dos cadenas son muy similares y ambas están codificadas por genes del MHC. En la mayoría de los casos las dos cadenas tienen regiones polimórficas. En ellas se distinguen:

- **Zona extracelular:** Esta constituida por los dominios a₁ y a₂ en el caso de la cadena a y b₁ y b₂ en el caso de la b. Los dominios a₁ y b₁ forman el surco de unión al péptido y es también la zona donde se encuentra la región variable o polimórfica. Los dominios a₂ y b₂, pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (como el dominio a₃ del MHC-I), no son polimórficos y están relativamente conservados entre todas las moléculas de clase II del mismo loci, aunque son distintas entre loci distintos (Es decir son distintos entre DR, DQ o DP).
- **Región transmembrana.** Como la mayoría de las regiones transmembranas es hidrofóbica.
- **Región citoplásmica.** Mas corta que en el caso de las Clase I y menos conocida.

En la región del HLA II, se encuentran otros genes que codifican para moléculas no relacionadas con histocompatibilidad, pero si importantes para procesamiento de antígenos. Se trata de genes no polimórficos que codifican para los transportadores TAP 1 y 2 y para proteínas del proteosoma LPM2 y 7.

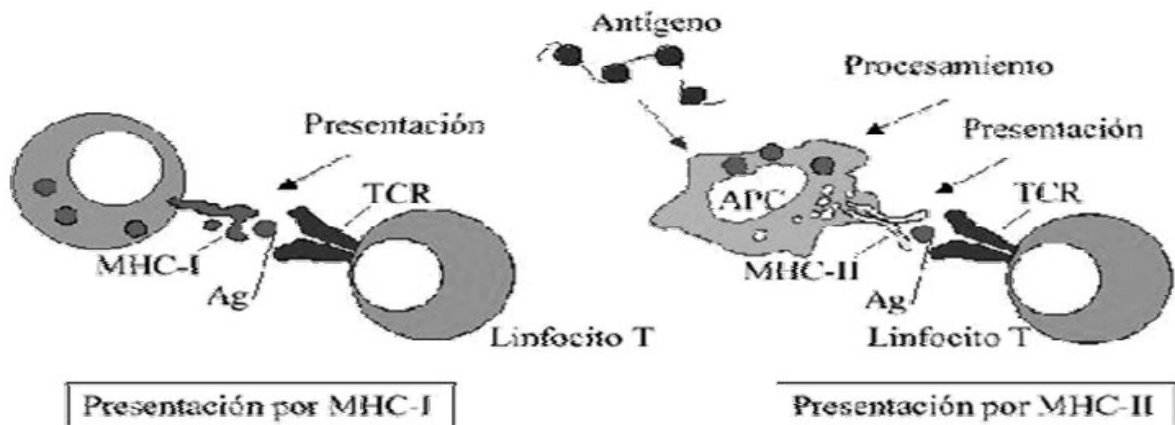
CLASE III

Se trata de genes no relacionados con histocompatibilidad y que no son polimórficos o al menos tan polimórficos como los loci HLA I o II. Se trata de genes que codifican para proteínas del sistema de complemento y para TNF.

Tema 9. Procesamiento y presentación de antígeno.

Procesamiento del antígeno. Vías de procesamiento del antígeno. Proteosomas.

Los linfocitos T reconocen el antígeno cuando éste les es presentado ensamblado en moléculas MHC. La molécula encargada de esta presentación, será distinta según se trate de un linfocito CD8 (MHC de tipo I) o de un linfocito CD4 (MHC de tipo II). En este tema vamos a describir el proceso por el cual los péptidos son "cargados" en las moléculas MHC en el interior de la célula presentadora. Este proceso será también distinto según se trate de moléculas MHC de tipo I (que están presentes en todas las células nucleadas) o de tipo II (que solo se expresan en células presentadoras de antígenos profesionales) de modo que existen dos vías de procesamiento una para cada tipo de moléculas MHC. También la procedencia de los péptidos que se ensamblaran a uno u otro tipo de moléculas será distinto.



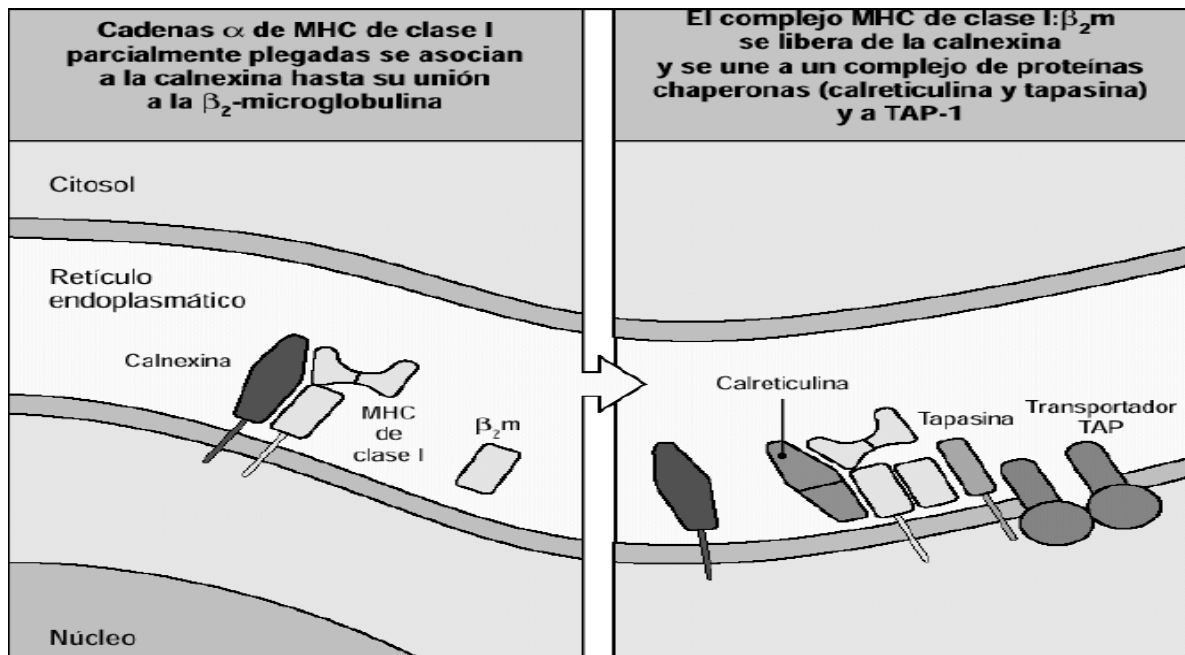
VIAS DE PROCESAMIENTO DEL ANTIGENO

1. MHC I

Los péptidos que se van a ensamblar con las moléculas MHC I, van a proceder del citosol. En el caso de que una célula este infectada por virus, las proteínas virales que se estén formando en el citosol, serán ensambladas en las moléculas MHC I, expresadas en la superficie y podrán ser reconocidas por linfocitos CD8 que tengan el TcR que reconozca a ese MHC I ensamblado con ese péptido. También péptidos procedentes de proteínas propias serán ensambladas a moléculas MHC y expresadas en la superficie, pero en este caso los linfocitos que reconocían estos péptidos ya habrán sido eliminados durante el desarrollo (Tema 15 tolerancia).

A continuación describiremos cómo se ensamblan las distintas subunidades que constituyen la molécula MHC I y como se produce el ensamblaje con el péptido.

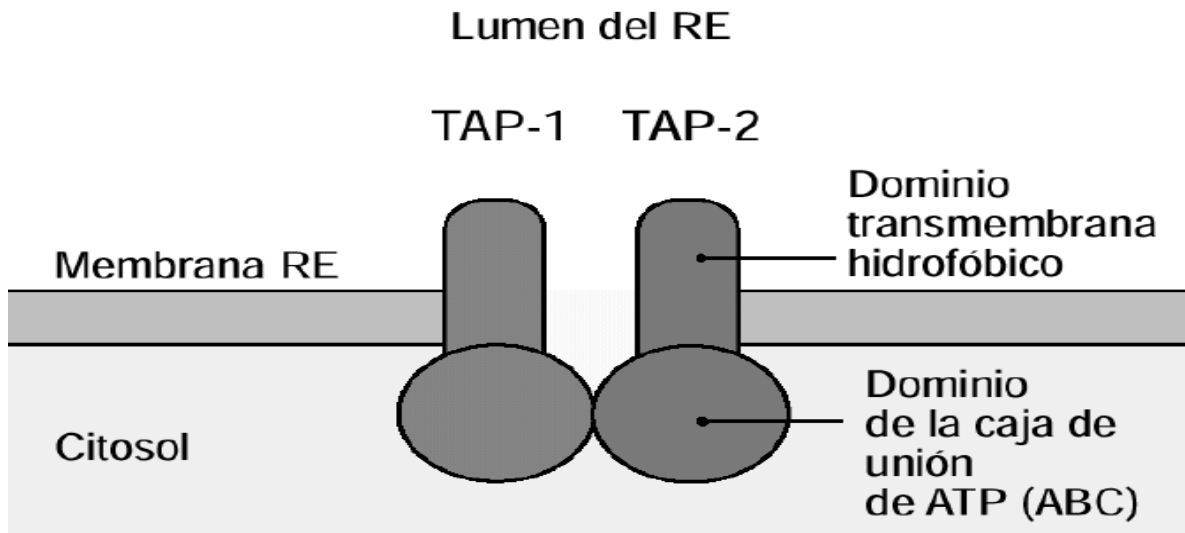
Las moléculas de RNA mensajero (mRNA) producidas como consecuencia de la transcripción de los distintos genes del MHC I, es decir aquellos que codifican para las cadenas α (cada individuo tendrá 6 moléculas distintas), migraran al citosol y en el serán traducidas a proteínas.



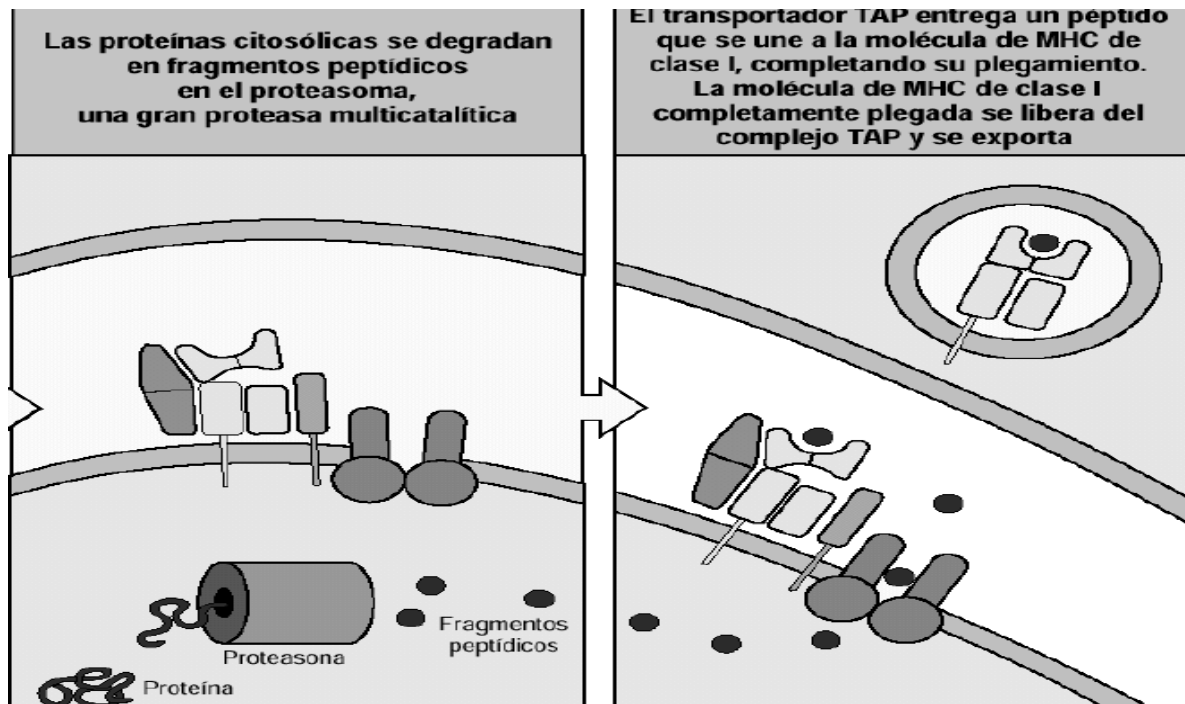
Estas cadenas α del MHC I, pasaran al retículo endoplásmico donde su estructura tridimensional será mantenida gracias a la **calnexina**. La calnexina es una proteína con función de chaperón (los chaperones son proteínas que se encargan de mantener la estructura tridimensional de las proteínas que lo necesitan), que es necesaria puesto que las moléculas MHC I en ausencia de β_2 microglobulina y péptido no son capaces de mantener su estructura adecuadamente.

Seguidamente la cadena α se unirá a la β_2 microglobulina (que también habrá llegado al RE una vez transcrito el gen que codifica para ella y traducido a proteína). Al unirse a β_2 microglobulina se soltará de la calnexina y se unirá a otro chaperón, la **calreticulina**, que también tiene funciones de chaperón.

El complejo α / β_2 microglobulina/ calreticulina, se unirá a la **tapasina** (La tapasina también está codificada por un gen situado en la región del MHC). La tapasina se encargará de anclar el complejo al transportador encargado de introducir los péptidos procedentes del citoplasma en el RE este transportador, está formado por dos subunidades **TAP-1** y **TAP-2** (Transporters Associated with Antigen Presentation). Cada subunidad está constituida por dos dominios, uno hidrofóbico encastrado en la membrana y otro dominio encargado de unir ATP que se dará lugar a la energía necesaria para transportar los péptidos al interior del retículo endoplásmico. Los genes que codifican para los TAP también están codificados por genes situados en la región del MHC.

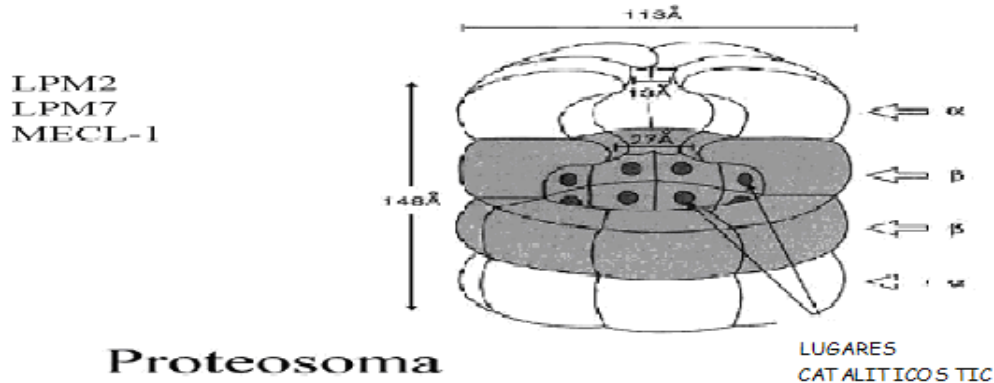


Los péptidos proceden de proteínas citosólicas (endógenas o de virus que están utilizando la maquinaria celular para sintetizar sus propias proteínas), que son fragmentadas, en péptidos, en el **proteosoma**.



El **PROTEOSOMA** está constituido por 28 subunidades proteicas dispuestas en forma de cilindro. Algunas de las proteínas que forman el proteosoma tienen actividad proteasa y serán las encargadas de destruir proteínas citosólicas transformándolas en péptidos. Las proteínas citosólicas que serán destruidas fundamentalmente son aquellas previamente marcadas por ubiquitina. De especial interés para la generación de péptidos de características óptimas para su ensamblaje en las moléculas del MHC-I, son las subunidades LMP2 y LMP7 cuyos genes se encuentran en la región del MHC. Estas dos subunidades junto con la subunidad MECL-1, (cuyo gen no se encuentra en el MHC) son

inducidas (es decir su síntesis aumenta) por interferón, lo cual permite que en casos de infección vírica al aumentar la presencia de interferón, algunas unidades constitutivas del proteosoma sean sustituidas por LPM2, LPM7 y MECL-1 aumentando la generación de péptidos de características óptimas para su ensamblaje con las moléculas del MHC-I.



Los péptidos generados en el proteosoma serán transportados al interior del RE gracias al TAP y cargados en las moléculas MHC-I que estaban ancladas al TAP a través de la tapasina. La unión de los péptidos a la molécula de MHC-I hará que se suelte de la calreticulína y tapasina quedando libre para ser transportada a través del aparato de Golgi a la superficie de la célula.

Aquellas moléculas de MHC-I que no se hayan unido a péptidos serán transportadas de nuevo al citosol y serán destruidas.

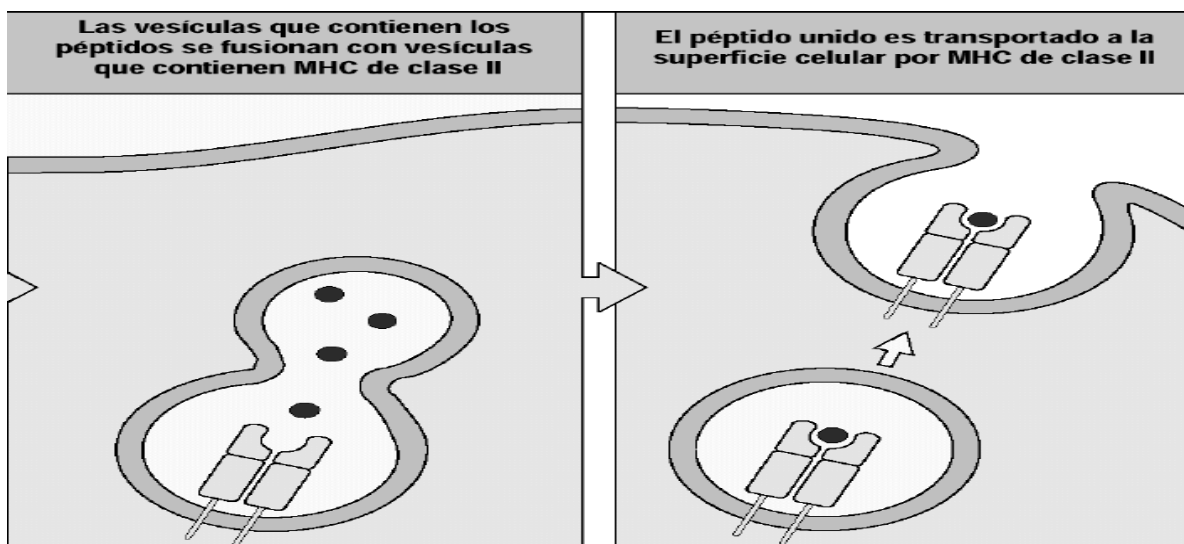
Las moléculas anteriores tienen gran importancia fisiopatológica. Los TAP fueron descubiertos en unas células que no eran capaces de presentar péptidos en moléculas MHC-I, a pesar de no tener defecto alguno en los genes del MHC-I. Este hallazgo fisiopatológico no solo permitió descubrir las moléculas TAP sino también conocer la importancia de la presencia de péptidos para que las moléculas de MHC-I sean estables y capaces de ser expresados en la superficie celular.

Algunos virus han evolucionado para sobrevivir a base de impedir la expresión de MHC-I y de este modo impedir que sus péptidos virales sean presentados en la superficie de la célula y esta destruida por los linfocitos CD8+:

- El virus del herpes simple, produce una proteína que se une al TAP y lo inhibe impidiendo el transporte de péptidos al retículo endoplásmico.
- Los adenovirus, producen una proteína que se une al MHC-I reteniéndola en el retículo.
- El citomegalovirus, acelera el transporte de las moléculas MHC-I de vuelta al citosol, donde son destruidas.

2. MHC-II

Los péptidos que se van a ensamblar con las moléculas MHC-II van a proceder de vesículas intracelulares o endosomas, las proteínas situadas en estas vesículas no son accesibles al proteosoma, sino que serán degradadas por las proteasas ácidas de la propia vesícula, fundamentalmente proteínas procedentes de patógeno extracelular. A estas vesículas llegan las **proteínas de bacterias que se desarrollan en las propias vesículas intracelulares**, como es el caso de *Leishmania* spp y micobacterias leprae y tuberculosis. También aquellas proteínas que han sido internalizadas por fagocitosis o endocitosis (por Ej. antígenos unidos al anticuerpo de superficie de la célula B), es decir procedentes fundamentalmente de **patógenos extracelulares**. No hay que olvidar que también proteínas propias son endocitadas en el curso de destrucción tisular y/o muerte celular y que muchas proteínas de membrana también son endocitadas, sin embargo estas proteínas propias aunque también son presentadas en las moléculas MHC-II no darán lugar, en condiciones fisiológicas a una respuesta inmune gracias a los mecanismos de tolerancia (Tema 15 tolerancia).

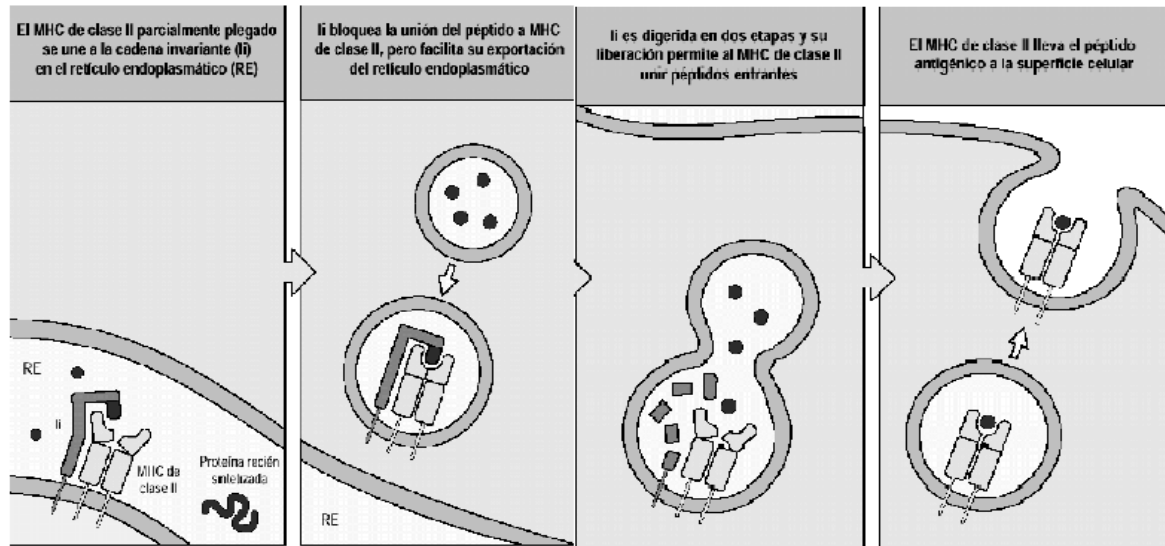


Las proteínas en el interior de las vesículas intracelulares serán degradadas gracias a las proteasas ácidas, que reciben este nombre por cuanto actúan a pH ácido, (fármacos como la cloroquina que aumenta el pH de las vesículas inhiben la presentación de antígenos vía MHC-II).

Las moléculas de mRNA producidas como consecuencia de la transcripción de los distintos genes que codifican para las cadenas a y b del MHC-II, serán traducidas a proteínas en el citosol y pasaran al retículo endoplásmico.

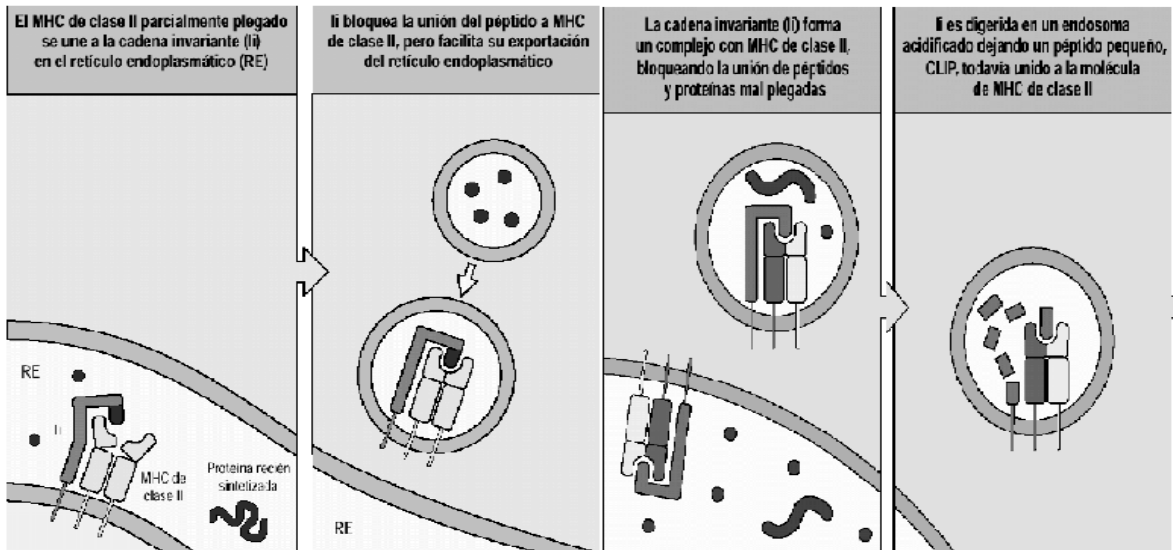
En el retículo endoplásmico y para evitar que se unan a los péptidos que son llevados allí por los TAP (en cuyo caso harían lo mismo que las MHC-I), se unirán a la **cadena invariante (Ii)**. La cadena invariante esta formada por tres subunidades, de modo que cada subunidad se une a tres moléculas de MHC-II (Durante el ensamblaje también ayudara el chaperón **calnexina**). La **Ii** también es la encargada de dirigir el transporte del complejo a un compartimiento endosómico donde gracias a las proteasas ácidas la **Ii** será degradada, quedando solo un péptido, denominado **CLIP (Class II-associated Invariant Chain Peptide)** unido al surco de unión del péptido de la molécula MHC-II. Este complejo se une ahora a la

molécula **HLA-DM**. **HLA-DM** es una molécula de estructura similar a MHC-II y codificada por genes situados en la región del MHC-II pero cuya función no es la de presentar antígenos sino la de estabilizar las moléculas de MHC-II, catalizar la suelta del CLIP y la unión de otros péptidos presentes en los endosomas.

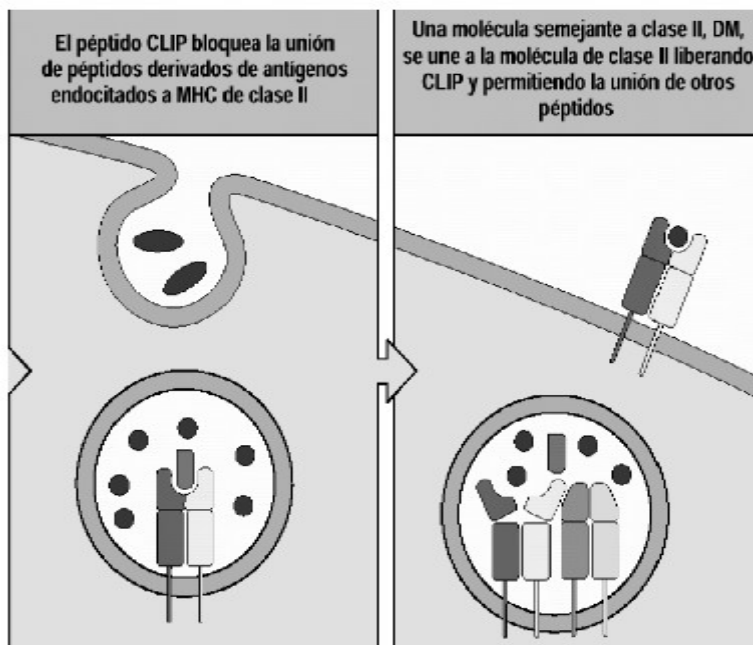


En algunas células existe otra molécula denominada **HLA-DO**, también de estructura similar a MHC-II y constituida por un heterodímero codificado por genes presentes en el MHC-II, concretamente HLA-DN para la cadena a y HLA-DO para la b. HLA-DO es un inhibidor de HLA-DM al que se une inhibiendo su función.

También en el caso de la presentación a través de MHC-II, la patología humana ayudó al descubrimiento de las distintas proteínas que componen la vía y de los genes que codifican para ellas. Concretamente la molécula HLA-DM se descubrió en células humanas que a pesar de disponer de todas las moléculas conocidas hasta el momento e implicadas en presentación mediante MHC-II, no eran capaces de presentar péptidos procedentes de proteínas internalizadas y expresaban en la superficie, moléculas de MHC-II que todavía estaban unidas a CLIP.



Así mismo, pacientes que presentan el llamado síndrome del linfocito desnudo (Bare Lymphocyte síndrome), carecen de moléculas de MHC-II por un defecto en un factor de transcripción inducido por IFN γ y llamado CIITA (MHC Class II TransActivator). Estos pacientes no son capaces de presentar péptidos a través de MHC-II, lo cual tiene como consecuencia la ausencia de linfocitos CD4+ al no ser estos seleccionados positivamente en el timo. La ausencia de CD4+, dará lugar no solo a la falta de función de linfocitos T sino también de producción de anticuerpos al no recibir los linfocitos B la necesaria ayuda T, constituyendo una de las causas del síndrome clínico denominado inmunodeficiencia severa combinada (llamada **severa** por sus gravedad clínica y **combinada** por la falta combinada de función T y B).



Tema 10. Desarrollo del sistema inmunitario.

Células mieloides. Desarrollo de las células B. Desarrollo de las células T.

Todas las células del sistema inmune se desarrollan en la médula ósea a excepción de las células foliculares dendríticas, sin embargo solo nos dedicaremos en este tema al desarrollo y maduración de las células B y T. Por cuanto el desarrollo de las células de estirpe mioide se aborda ampliamente en otras asignaturas.

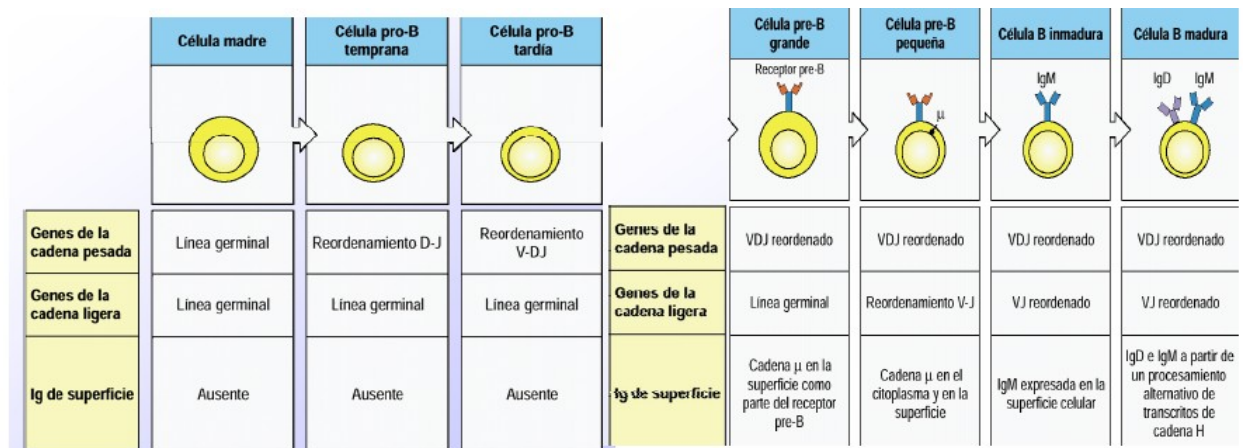
CELULAS B

Como hemos dicho el desarrollo de las células B se produce en la médula ósea. La maduración ocurre al mismo tiempo que migran desde las capas exteriores cercanas al endostio del hueso a las regiones centrales de la médula donde esperaran en senos a ser exportadas a la circulación.

Durante su desarrollo la célula que será B pasa por una serie de estadios donde el evento mas importante es el reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas. Inicialmente en el estadio de célula madre, aún no ha reordenado estos genes. El reordenamiento comienza con los genes D y J en el estadio de célula **pro-B temprana**, para seguir con el reordenamiento de los genes V que ya se habrá completado en el estadio de célula **Pre-B grande**. En este estadio, comienzan a expresar cadenas m en la membrana formando parte del receptor Pre-B. El receptor Pre-B se diferencia fundamentalmente del receptor B maduro (BCR), en que en este estadio no tiene una cadena ligera propiamente dicha (aun no se ha reordenado el gen que codifica para ella), sino una cadena ligera no polimórfica que se denomina cadena ligera sucedánea. El receptor Pre-B es fundamental para la interacción con las células epiteliales transmitiendo señales de activación que van a permitir a la célula Pre-B sobrevivir y continuar al estadio siguiente. Debido a ésta estimulación, las células Pre-B que sobreviven están en continua división, de ahí su tamaño. En el estadio siguiente de célula **Pre-B pequeña**, el receptor Pre-B parece que no es activo, (por lo que las células ya no se dividen y presentan un tamaño menor) y las cadenas m se acumulan en el citoplasma. Durante esta fase, comienza el reordenamiento de los genes V y J de las cadenas ligeras, de modo que en el siguiente estadio ya de **célula B inmadura**, se produce la expresión de una IgM de superficie constituyendo ya el receptor de superficie de la célula B o BCR, en este estadio el receptor Pre-B ya no se expresa. La fase de célula B madura esta marcada por la expresión en superficie de BCR del tipo IgD además de los IgM. En el periodo de célula B inmadura en que solo expresa IgM la activación del BCR tiene como consecuencia la muerte de la célula B, de modo que la mayor parte de células B que reconozcan antígenos propios serán eliminadas.

En los distintos estadios del desarrollo y a parte de la expresión de las cadenas del receptor de la célula B y Pre-B, se produce la expresión de una serie de genes cuyos productos son importantes para el desarrollo de las células B:

- **RAG-I** y **RAG-2**, son genes que se expresan exclusivamente en células linfoides siendo imprescindibles para el reordenamiento tanto de los genes de las inmunoglobulinas como del TcR. La expresión de estos genes se produce por supuesto en los estadios en que se están produciendo reordenamientos.



- TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase)** El reordenamiento no es el único mecanismo para generar diversidad de los anticuerpos, sino que gracias a la TdT, se produce la adición de unos pocos nucleótidos en los extremos de los dos fragmentos que se van a unir, dando como consecuencia la generación de una mayor diversidad.
- Iga e Igb** son componentes tanto del BCR como del receptor Pre-B, con lo cual se expresa en los estadios en que se expresan estos receptores.
- I5 y VpreB** que forman parte de la cadena ligera sucedánea, se expresarán por tanto en el estadio en que se expresa el receptor Pre-B.
- Btk (Bruton's tyrosin kinase)** Proteína importante para la transmisión de señales por parte de la célula B y cuyo defecto da lugar a la ausencia de desarrollo B a partir del estadio Pre-B. Este defecto es responsable de una inmunodeficiencia denominada agammaglobulinemia de Bruton ligada al X (XLA)
- EBF y pax-5** Son factores de transcripción que regulan la expresión de genes importantes para el desarrollo de células B (como es el caso de Iga, I5 y VpreB, entre otros) y cuyo defecto origina alteraciones en el desarrollo de las mismas.

Conocer el estado de reordenamiento de los genes de inmunoglobulinas, es importante para filiar los tumores de células B y saber a que estadio del desarrollo corresponde el crecimiento tumoral, hecho éste fundamental para tratamiento y pronóstico. En todas las células del cuerpo salvo las células B, los genes de las inmunoglobulinas estarán en configuración germinal, es decir con los genes de inmunoglobulinas no reordenados. Utilizando sondas de DNA adecuadas que se unan a la región de los genes de las inmunoglobulinas y utilizando enzimas de restricción (que cortaran el DNA en secuencias determinadas) podremos detectar la presencia de los fragmentos de DNA que se encuentren en cantidad suficiente. Si Tomamos una muestra de sangre periférica de un individuo normal, extraemos DNA geonómico, digerimos con enzimas de restricción, separamos por tamaño los fragmentos generados mediante electroforesis, transferimos y detectamos los que corresponden a la región de los genes de las inmunoglobulinas utilizando una sonda de DNA, podremos valorar la presencia de una sola banda puesto que la mayoría de las moléculas de DNA corresponderán a DNA no reordenado (esto es así no solo porque

la mayoría de las células de sangre periférica no son B sino porque cada célula B ha reordenado los genes de forma distinta, con lo que cada reordenamiento está representado de forma mínima en la sangre del individuo sano. En un individuo que padece una leucemia de células B, sin embargo, la mayor parte de las células de sangre periférica van a corresponder a células tumorales procedentes en la mayoría de los casos de un solo clon, con lo que el tamaño característico debido al reordenamiento que ha experimentado ese clon, será detectable en sangre periférica como una banda adicional a la que corresponde a la banda característica de los genes no reordenados. La banda correspondiente a las células tumorales, desaparecerá si el tratamiento tiene éxito y nos servirá de marcador de recidiva.

Las **células B1** se producen de forma temprana durante el periodo fetal y se autorrenuevan en la periferia. Poseen BCR del tipo IgM con muy poco IgD, incluso cuando ya son maduras. El BCR tiene una variabilidad limitada, lo que se corresponde con una ausencia de expresión de TdT. Reconocen antígenos del tipo de carbohidratos, reconociendo antígenos bacterianos comunes, lo que las hace importante en las fases tempranas de la respuesta inmune cuando aún no se ha desarrollado la inmunidad adaptativa. Se localizan fundamentalmente en las cavidades pleural y peritoneal.

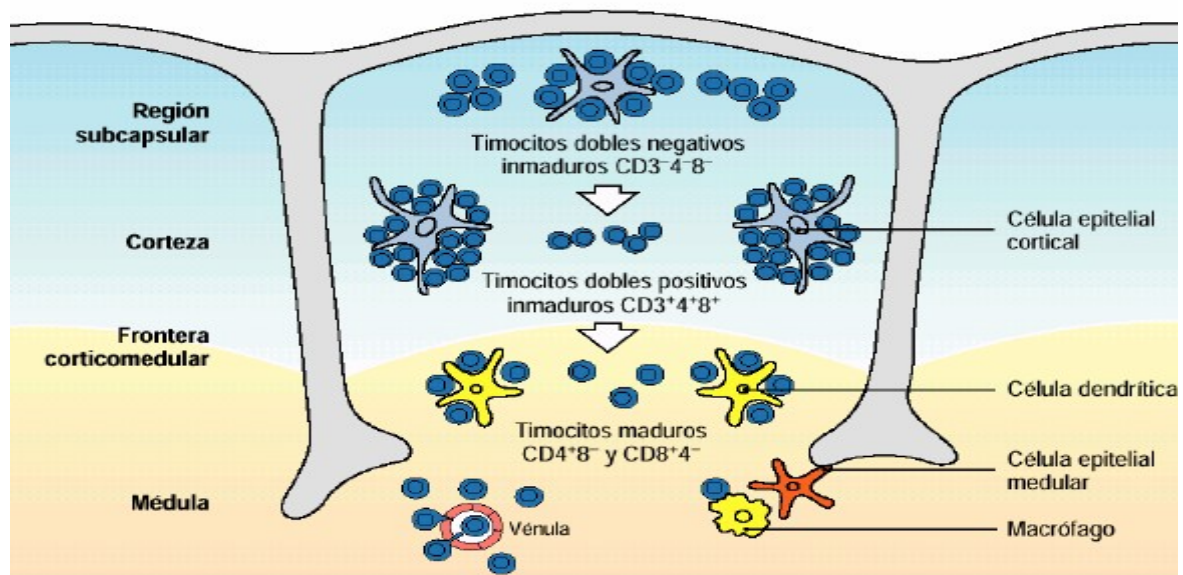
CELULAS T

El precursor que dará origen a la célula T, procedente de células madre de médula ósea, migran al timo donde se desarrollarán como linfocitos T (también llamadas células T).

El desarrollo de las células T, se produce en el timo. La importancia de éste órgano para el desarrollo de las células T, se pone de manifiesto por cuanto en el Síndrome de DiGeorge, en el que existe agenesia del timo por un defecto embriológico que afecta al 3^{er} y 4^o arcos faríngeos, los linfocitos T están disminuidos y suelen ser inmaduros. Los pacientes afectados de este síndrome, carecen de paratiroides por lo que presentan hipocalcemia y como consecuencia tetania, que es la manifestación clínica más temprana del síndrome.

En experimentos utilizando células de **ratones** que **carecen de timo** (denominados ratones nude o desnudos puesto que además carecen de pelo, por lo que los ratones homocigotos para esa mutación se representa nu/nu) y ratones que poseen una mutación que impide el normal desarrollo de las células T (scid/scid), se observa que ambas cepas de ratones carecen de células T. Si transferimos células de médula ósea de los ratones nu/nu a los ratones scid observamos que podemos restablecer una población de linfocitos T periféricos normales, indicando que los linfocitos T de los ratones nu/nu son normales. Si transferimos el timo de ratones scid a ratones nu/nu, también podremos restablecer una población de células T normal, indicando que era el timo lo que faltaba a los ratones nu/nu, y resaltando la importancia del timo para el desarrollo de los linfocitos T.

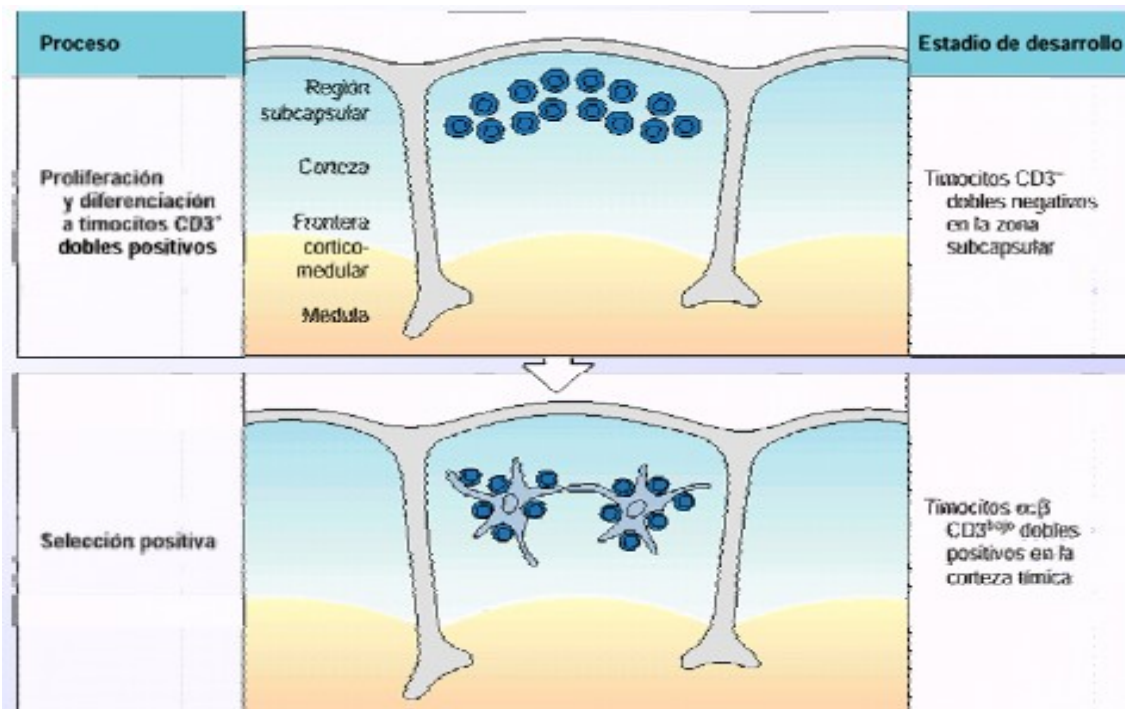
Los precursores que llegan al timo a través de las vénulas y migran a la región subcapsular. En este estadio todavía no expresan TcR, CD3 ni ningún otro marcador característico de las células T no expresan ni CD4 ni CD8 por lo que se les denomina Timocitos dobles negativos. En este estadio de dobles negativos, comienzan a reordenar la cadena b del TcR. El gen de la cadena b reordenada se expresa y se asocia con una cadena a sucedánea y en la superficie de la célula, formando el receptor **Pre-T**. La estimulación de este receptor hace que el timocito comience a dividirse, que cese el reordenamiento de la cadena b y que exprese CD4 y CD8 en la misma célula. En este estadio se denomina **timocito doble positivo grande** (debido a que esta en división). Seguidamente el timocito dejara de dividirse disminuyendo de tamaño y convirtiéndose en **timocito doble positivo pequeño**, además en este estadio, comienza a reordenar el gen para la cadena a del TcR, pasando las células a expresar pequeñas cantidades del TcR en la superficie junto al complejo CD3 (el complejo CD3, siempre estará asociado al TcR encargado como hemos descrito de transmitir señales al interior de la célula). Los timocitos dobles positivos pequeños han migrado ya a la región cortical del timo y están listos para la **selección positiva**.



SELECCIÓN POSITIVA

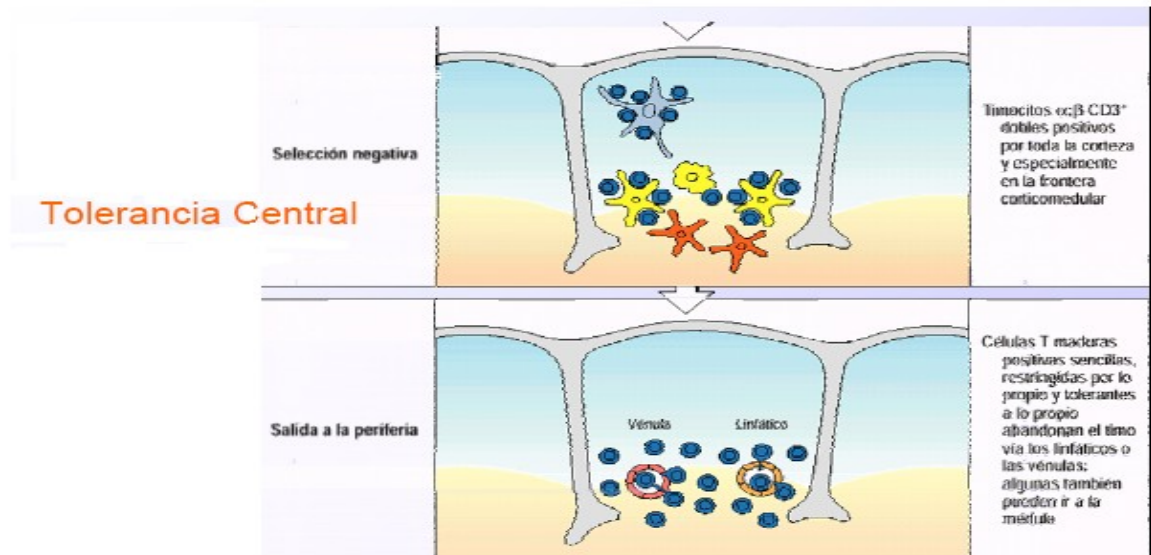
En este estadio los timocitos cuyos TcR no sea estimulado adecuadamente, es decir aquellos que posean TcRs que no encajen suficientemente bien con los MHC de las células epiteliales del timo, no sobrevivirán. Solo aquellos que sean estimulados, sobrevivirán, es decir serán seleccionados positivamente. Según que el TcR interactúe con MHC de tipo I ó II, terminaran perdiendo el correceptor que no hayan utilizado (es decir si interactúan con un MHC-I, utilizarán por tanto su correceptor CD8, y terminaran perdiendo el CD4 convirtiéndose en timocito CD8 simple positivo, aquellos timocitos cuyo TcR interactúe con MHC-II utilizarán por tanto el correceptor CD4 y terminaran perdiendo el CD8 convirtiéndose por tanto en timocitos CD4 simple positivo). Mediante la selección positiva, se seleccionaran solo aquellos linfocitos que posean TcR capaces de interactuar con MHC, puesto que será así como deberán reconocer los péptidos presentados por las células presentadoras de antígenos.

Sin embargo para evitar el riesgo de que interaccionen demasiado bien con los complejos MHC péptidos propios, el timocito todavía tendrá que sufrir una nueva selección, la selección negativa



SELECCIÓN NEGATIVA

Antes de perder ningún correceptor, es decir cuando todavía es dobles positivo, el timocito migrará mas profundamente en el timo, un poco mas hacia la unión corticomedular, encontrándose con células dendríticas y macrófagos que le presentaran antígenos propios mediante su MHC. En este estadio si su TcR interacciona con mucha afinidad (es decir encaja demasiado bien) con el complejo MHC-péptido presentado por las células dendríticas o macrófagos, será inducido a morir, proceso que se denomina **selección negativa**. El proceso de selección negativa es fundamental para la generación de tolerancia a antígenos propios es decir para eliminar o deleccionar clones de linfocitos T que encajen tan bien con complejos MHC/péptidos propios que pudieran desarrollar una respuesta inmune contra antígenos propios originando una enfermedad autoinmune.

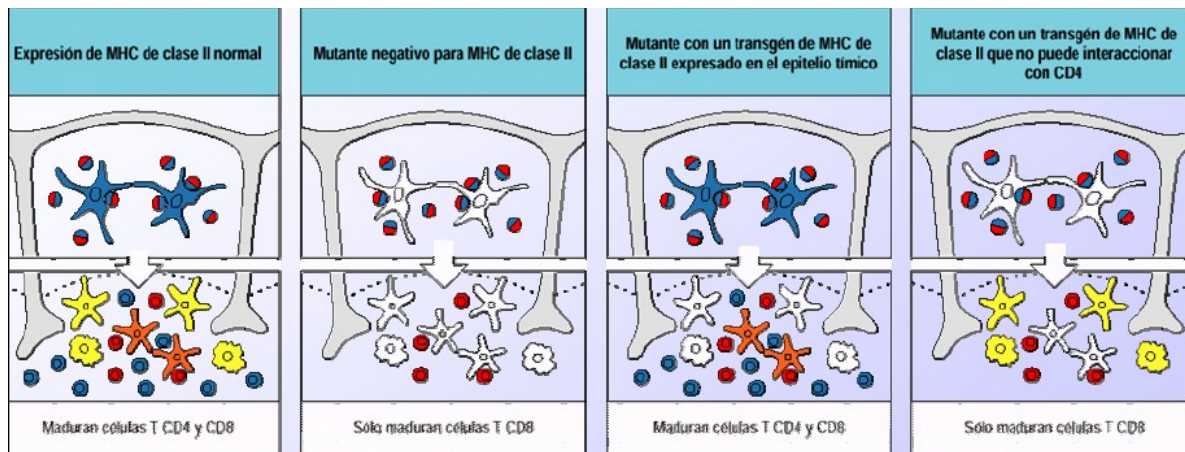


Durante el proceso de maduración en el timo más del 95% de los timocitos dobles positivos morirán, bien por no ser seleccionados positivamente o por ser seleccionados negativamente. Solo aquellos timocitos cuyo TcR encajen suficientemente bien con el MHC como para ser seleccionados positivamente pero no tan bien como para ser seleccionados negativamente sobrevivirán. Sobreviven por tanto aquellos timocitos que tienen TcRs que aun no han encontrado el complejo MHC-péptido con el que encajen de forma idónea y que corresponderá al MHC unido a algún péptido extraño (o algún MHC extraño unido a un péptido extraño o propio que se parezca a algún MHC unido a péptido extraño en el caso del reconocimiento alógeno).

Una vez descritos los acontecimientos que se producen en el desarrollo tímico repasaremos algunos de experimentos en los que se basan los modelos que hemos descrito.

Durante algún tiempo no se explicaba con claridad como un timocito con un mismo TcR, podía sufrir primero una selección positiva y luego una selección negativa interactuando con la misma molécula en ambos casos (el MHC). Lo fundamental como hemos descrito, es la afinidad de la interacción. Esto se ha demostrado utilizando antagonistas y agonistas parciales, es decir cambiando experimentalmente la fuerza de la interacción mediante modificaciones en el antígeno en vez de en el TcR (como ocurre en la situación fisiológica). Los antígenos que no estimulan el TcR, no son capaces de inducir la selección positiva y no permitirán que la célula sobreviva. Los que inducen señales fuertes (agonistas) inducen selección positiva pero también negativa con lo que tampoco sobrevivirán. Solo aquellos que interactúen con el TcR con una afinidad intermedia, (agonistas parciales) serán capaces de inducir selección positiva pero no selección negativa.

También hay que tener en cuenta que en la selección positiva y negativa la célula que presenta el MHC-péptido, es distinta, en el primer caso se trata de células epiteliales tímicas y en el segundo caso de células procedentes de médula ósea (macrófagos y células dendríticas).



Demostración de que la selección positiva esta mediada por la expresión de MHC en el epitelio tímico. Si utilizamos un ratón que no expresa MHC-II, podremos comprobar que no tendrá linfocitos CD4+ sino solo CD8. Si sobre ese animal transgénico construimos un transgénico que exprese MHC-II solo en el epitelio tímico, pasara a tener cantidades normales de linfocitos CD4.

Demostración de que la selección negativa está mediada por la expresión de MHC en células procedentes de médula ósea. Si cruzamos un ratón MHC^a con otro MHC^b su progenie sera MHC^{ab}. Si ahora tomamos médula ósea de este ratón MHC^{ab} y la introducimos en el ratón MHC^a (previamente irradiado para eliminar su propia medula ósea) veremos que este ratón no rechaza injertos de piel de un ratón MHC^b a pesar de que las únicas células MHC^b con las que han estado en contacto son con células de médula ósea procedentes del ratón ab, mientras que el epitelio tímico, era exclusivamente a. Lo anterior indica que los linfocitos del ratón que reconocen MHC^b han sido delecionados como consecuencia de su interacción con células de medula osea del ratón ab.

Los péptidos unidos a MHC pueden afectar el repertorio de TcRs que no se delecionan y por tanto aquel que persiste hasta la madurez. En ratones en que el homólogo del HLA-DM (ver tema 9 presentación de antígenos) humano no es funcionante y en los que por tanto todos los MHC-II tienen ensamblados el péptido CLIP, y no péptidos propios, persisten linfocitos con TcR que reconocen péptidos propios y que responden fuertemente a células presentadoras de antígenos de cepas congénicas normales.

Demostración de que los timocitos mantienen el correceptor que utilizan durante su desarrollo en el timo. Si construimos un ratón transgénico en el que todas las células T expresan el mismo TcR (puesto que construimos un animal transgénico en el que introducimos el gen que codifica para un TcR ya reordenado, con un promotor que hará que se exprese antes de que se reordene ningún otro TcR, con lo que el reordenamiento de los TcR se vera inhibido y todos los linfocitos expresaran un TcR que reconocerá el mismo antígeno) Pues bien, si el TcR que hemos elegido interacciona con MHC-I, todos los linfocitos maduros de este ratón transgénico serán CD8, y si el TcR de nuestro ratón transgénico interacciona con MHC-II, todos los linfocitos del ratón transgénico serán CD4.

Tema 11. Tolerancia inmunológica. Tolerancia tímica central y posttímica frente a los autoantígenos. Tolerancia de las células B frente a los autoantígenos. Pérdida de la auto-tolerancia y autoinmunidad. Aplicaciones terapéuticas de la tolerancia.

TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

La Tolerancia consiste en una ausencia de respuesta **específica** frente a un determinado Ag.

A diferencia de la Inmunosupresión que anula la respuesta de todos los clones del sistema inmune, en la tolerancia se mantiene la capacidad de responder contra todos los demás Ag, puesto que afecta sólo a un clon.

1. La tolerancia ocurre de **forma fisiológica** y permite evitar una respuesta inmune que destruya elementos del propio individuo.
2. Sin embargo, también puede ser inducida frente a **Ag ajenos**:
 - Artificialmente a determinados Ag administrados por vía **oral** (Tolerancia Oral), o bien administrados a dosis muy **altas** o muy **bajas** sin adyuvantes.
 - Algunos agentes patógenos también son capaces de burlar al sistema inmune induciendo tolerancia.

Los mecanismos celulares y moleculares de inducción de tolerancia, son muy similares independientemente de que se trate de Ag propios o ajenos, dependiendo sobre todo del estadio de desarrollo en el que se encuentre el linfocito y/o de la forma en que el Ag le sea presentado.

La tolerancia es un proceso **aprendido**, no heredado. Todas las especificidades posibles de los receptores para Ag se producen al azar (por reordenamiento de los genes que codifican para las partes variables del TCR o de las Ig), en todos los individuos. Pero con posterioridad, aquellas especificidades que reconozcan los Ag propios de cada individuo (que si serán distintos en función de su herencia, por Ej. el HLA), tendrán que ser eliminadas. A este proceso de eliminación física (**delección**) o funcional (**anergia**) de una especificidad es a lo que llamamos Tolerancia, y tiene por tanto la consecuencia de la eliminación del clon que reconoce esa especificidad.

HISTORIA

Owen observó que unos gemelos divitelinos (HLA distintos) que nacieron con su sistema circulatorio unido y que fueron separados al nacimiento, eran capaces de tolerar transplantes de otro gemelo durante toda la vida.

La explicación es que durante el desarrollo los sistemas inmunes de los dos gemelos habían estado en contacto desarrollando tolerancia entre ellos. El hecho de que la tolerancia se mantuviera durante toda la vida se explica porque células linfoblásticas de un gemelo habían quedado en la médula ósea del otro, manteniendo la situación de tolerancia, tanto B como T puesto que también estas células linfoblásticas viajarían al timo.

A los individuos que tienen en su médula ósea células procedentes de dos individuos distintos se les llama **quimeras**. Este fenómeno también se produce en casos de trasplante de médula ósea en los que se mantienen algunas células del receptor que va a mantener la tolerancia del sistema inmune del donante frente a él.

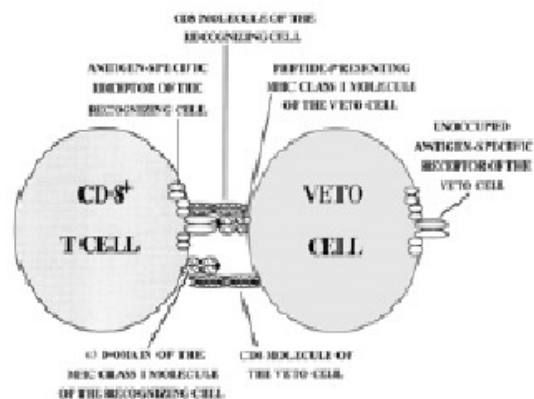
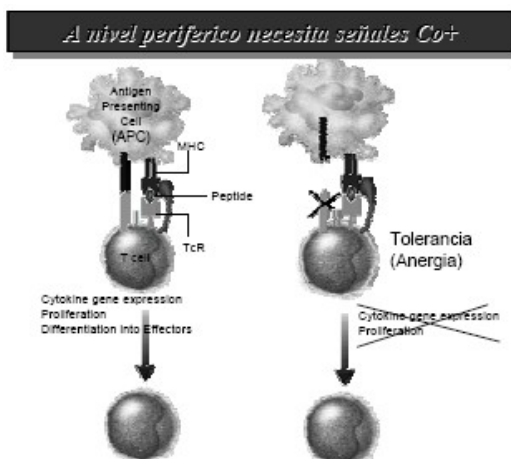
Medawar tomó ratones de tres cepas (A, B, C) con distinto MHC y que por tanto no admitían en condiciones normales trasplantes entre ellas. Inyectó al nacimiento células linfoblásticas de la cepa B a la cepa A. Con posterioridad trasplanto piel procedente de ratones de la cepa B ó C a los ratones inyectados. Observo que los ratones que habían sido inyectados con células linfoblásticas de ratones B toleraban específicamente trasplantes de piel procedentes de ratones de la cepa B y no de la C. Aquellos ratones A que no habían sido inyectados rechazaban los trasplantes procedentes de las dos cepas.

CLASIFICACION

a) **CENTRAL** Se produce en los órganos linfoides primarios, el timo para los linfocitos T y en la médula ósea para los linfocitos B. El mecanismo más importante es la delección clonal.

Los linfocitos inmaduros son más susceptibles a la inducción de tolerancia.

b) **PERIFERICA** Algunos clones autoreactivos no se hacen tolerantes a nivel central entre otras razones porque algunos Ag tejido específicos no se expresan en el timo o en la médula ósea. Con lo cual siguen existiendo mecanismos a nivel periférico que dan lugar a tolerancia. El mecanismo más importante de inducción de tolerancia periférica es la anergia.



MECANISMOS DE INDUCCION DE TOLERANCIA

Delección: Consiste en la **eliminación física** mediante muerte por apoptosis del clon que reacciona con un determinado antígeno. Es el mecanismo más importante de inducción de tolerancia a nivel central.

Anergia: Consiste en la **eliminación funcional**. Es decir el linfocito anérgico no muere pero no es capaz de responder al antígeno. Es el mecanismo más importante de inducción de tolerancia a nivel periférico.

Ignorancia: A diferencia de la anergia en que el linfocito que reconoce el antígeno, se activa, pero prolifera sino que queda en una situación en que no responderá al antígeno en un encuentro posterior. En la Ignorancia es como si el linfocito no hubiera reconocido el antígeno, con lo cual en el siguiente encuentro con el antígeno sí que podría responder.

Supresión: En algunos casos es posible inducir tolerancia frente a un antígeno y después transferirla al transferir la médula ósea del animal tolerante a otro animal singénico. Las células responsables de este fenómeno, parecen ser linfocitos T que suprimen a los linfocitos T específicos para el mismo antígeno del animal que recibe la transferencia. Aunque inicialmente se creía que existía una población de linfocitos T supresora (algunos CD8), en la actualidad no está claro si los linfocitos supresores pertenecen a una subpoblación especial o si se trata de linfocitos que en determinadas condiciones sintetizan sustancias inhibitorias (citoquinas y/o moléculas de superficie).

INDUCCION DE TOLERANCIA EN LINFOCITOS T

Central Los linfocitos T durante una etapa de su desarrollo en el timo, concretamente durante el estadio en el que expresan CD4 y CD8 (timocitos CD4CD8 dobles positivos con expresión de TcR/CD3 baja), son inducidos a morir si reconocen con una determinada intensidad Ag presentados por el MHC-I o II. El proceso anterior que se denominó **Selección Negativa Tímica** y produce la delección de clones autoreactivos. Es el mecanismo más importante de tolerancia a nivel central y afecta tanto a linfocitos CD8+ como a CD4+.

Periférica

Linfocitos CD4+ La inducción de tolerancia en los linfocitos Th es la más importante por cuanto si un linfocito Th específico para un antígeno es tolerante, no podrá brindar la ayuda necesaria para los linfocitos B que reconozcan el mismo antígeno (estímulos vía CD40 mediante el CD40L ni IL4) ni para los linfocitos CD8 (producción de citoquinas que el linfocito CD8 no es capaz de sintetizar per se en cantidades suficientes).

- **Anergia** Si la presentación de un antígeno a un linfocito CD4 se produce en ausencia de coestimulación de CD28 (mediante las moléculas coestimuladoras B7-1 y/o B7-2), el linfocito no será capaz de producir IL2 suficiente para su propia proliferación. Las señales a través del TcR serán, sin embargo, suficientes para que se active (y por tanto expresara la cadena α del receptor de la IL2, constituyendo así junto a β y γ el receptor de alta afinidad). Este linfocito que se ha activado pero no prolifera quedará en una situación de anergia, según la cual ya no

podrá proliferar en subsiguientes encuentros con el Ag aunque estos se produzcan con coestimulación.

Si añadimos IL2 exógena, el linfocito que como hemos dicho está activado, si que será capaz de proliferar y en este caso no se volverá anérgico. Si por el contrario no permitimos que el linfocito proliferase usando sustancias inhibitoras de la proliferación, se volverá anérgico aunque exista coestimulación. Por lo tanto, lo central es que el linfocito T que se activa y no prolifera se vuelve anérgico, las señales coestimuladoras permiten al linfocito T CD4 producir suficiente cantidad de IL2 como para proliferar y es por eso por lo que no se vuelve anérgico.

- **Señales negativas por parte de las CPA** Son las llamadas células veto, que inactivan a aquel linfocito con el que interactúan, lo "vetan".
- **Péptidos de muy alta afinidad** Modificaciones en péptidos que normalmente provocan activación de sus linfocitos T específicos, pueden dar lugar a bloqueo de los mismos. Esto es posible porque el péptido modificado y presentado por el MHC, puede unirse al TcR con mayor afinidad que el péptido original (con lo cual no permitirá que se una el péptido original), pero sin producir el cambio conformacional necesario en el TcR para transmitir señales estimuladoras.
- **Altas concentraciones de IL2 antes o durante la estimulación.** Cuando existen altas concentraciones de IL2 en el medio antes o durante el reconocimiento de un antígeno por parte del linfocito CD4, este muere por **apoptosis**. Este es un mecanismo de seguridad para evitar que el linfocito que está reconociendo un antígeno propio presentado por una CPA no profesional (por Ej. una célula B del páncreas que no expresa en condiciones normales moléculas coestimuladoras) y que por tanto se volverá anérgico, proliferase como respuesta a la IL2 que está siendo producida por otros linfocitos como consecuencia de una infección concurrente. De esta forma el linfocito solo evitará la anergia si a lo que está respondiendo es a la IL2 producida por el mismo, que por tanto se empezará a producir un poco después del reconocimiento y inicialmente en pequeñas cantidades.
- **Inhibición** por otras subpoblaciones. Una respuesta de tipo Th1 podrá ser contrapesada por una respuesta Th2 que inhibirá la primera.

Linfocitos CD8+

No está claro si se puede inducir tolerancia periférica en linfocitos CD8 con alguno de los mecanismos mencionados para los linfocitos CD4. Lo que sí está claro es que la estimulación del linfocito CD8 por su antígeno (por supuesto en el contexto del MHC I), en ausencia suficiente de IL2 producida por el linfocito Th1, dará lugar a anergia del linfocito CD8.

TOLERANCIA EN LINFOCITOS B

Central La estimulación antigénica de los linfocitos B inmaduros en el estadio en que solo expresan IgM de superficie, dará lugar a su delección. En este periodo del desarrollo los clones de linfocitos B que encuentren autoantígenos en la médula ósea serán deleccionados.

Este fenómeno no se produce cuando maduran y expresan también IgD de superficie. Inicialmente se pensó que era debido a la estimulación por el antígeno de IgM de superficie en ausencia de estimulación de IgD, pero experimentos realizados en ratones que carecían del gen para sintetizar la cadena pesada de la IgD (KO), demostraron que las células B maduras no eran deleccionadas aunque solo expresaran IgM de superficie (no podían expresar IgD aunque fueran maduros al no tener el gen). Por ello, en la actualidad se piensa que lo que determina la delección en las células B inmaduras es algún otro factor que coincide con esa etapa del desarrollo en que solo expresan IgM.

Periférica Experimentalmente se ha demostrado que existen muchos casos de animales que a pesar de ser tolerantes tienen células B que no lo son. Con lo que se demuestra que lo que determina que un individuo sea tolerante o no es fundamentalmente el estado de tolerancia de la célula T.

La estimulación del linfocito B por un antígeno en ausencia de ayuda T dará lugar a anergia periférica. Con lo que si el linfocito T es anérgico para un antígeno, en la mayoría de los casos también el B se hará anérgico o simplemente no podrá responder al no recibir la necesaria ayuda T puesto que el linfocito T que reconoce el mismo antígeno no podrá prestársela al ser anérgico.

La anergia en las células B, sin embargo, presenta dos características diferenciales con respecto a las de las células T:

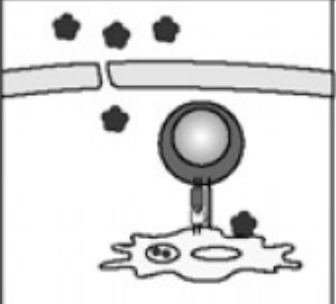
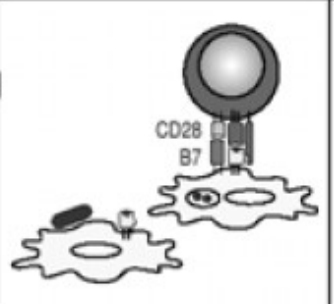
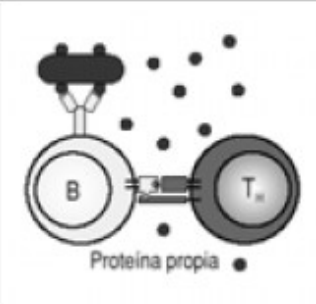
- Son necesarias dosis más altas de Ag para inducirla
- Dura menos que la inducida en linfocitos T.

TOLERANCIA EN CELULAS NK

Las células NK también parecen ser susceptibles de algún tipo de inducción de tolerancia. Ya hemos descrito como las NK, lisan células que no expresan MHC, sin embargo si previamente cultivamos NK con células que no expresan MHC, perderán su capacidad de lisan estas células, fenómeno que se interpreta como algún tipo de inducción de tolerancia.

PÉRDIDA DE LA AUTO-TOLERANCIA Y AUTOINMUNIDAD

Ruptura de Tolerancia ➔ AUTOINMUNIDAD

Mecanismo	Interrupción de la barrera celular o tisular	Infección de las células presentadoras de antígeno	Unión del agente patógeno a proteínas propias
Efecto	Liberación de antígeno propio secuestrado; activación de células no tolerizadas	Inducción de actividad coestimuladora en las células presentadoras de antígeno	El agente patógeno actúa como portador para permitir respuestas contra lo propio
Ejemplo	Oftalmia simpática	Efecto de adyuvantes en la inducción de EAE	¿Nefritis intersticial?
			

La desaparición de la tolerancia frente a antígenos propios traerá como consecuencia el ataque inmunológico contra ese antígeno con la consecuente destrucción de tejidos y aparición de una enfermedad autoinmune. Una vez conocidos los mecanismos que existen para la generación de tolerancia, podemos entender como el fallo de alguno de ellos puede desembocar en la aparición de enfermedades autoinmunes. En la tabla siguiente se describen algunos de los mecanismos:

Interrupción de la barrera

Liberación de antígeno propio

celular o tisular	secuestrado; activación de células no tolerizadas
Infección de las células presentadoras de antígeno	Inducción de actividad coestimuladora en las células presentadoras de antígeno
Unión del agente patógeno a proteínas propias	El agente patógeno actúa como portador para permitir respuestas contra lo propio
Mimetismo molecular	Producción de anticuerpos o células T con reacción cruzada
Superantígeno	Activación policlonal de células T autorreactivas

APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA TOLERANCIA

La consecución de un estado de tolerancia es la meta ideal que nos proponemos para el tratamiento del rechazo a los trasplantes de órganos y de las enfermedades autoinmunes antigénico específicas puesto que permite obtener una no respuesta específica para los antígenos que queremos preservar mientras que el sistema inmune sigue siendo competente para luchar contra las infecciones. La creación de un estado de tolerancia como tratamiento del rechazo de órganos y las enfermedades autoinmunes, no tendría por tanto los efectos indeseables asociados a las terapias inmunosupresoras actuales que producen una inmunosupresión generalizada con la consiguiente inmunodeficiencia iatrogénica.

En la actualidad se están llevando a cabo diversos ensayos clínicos para introducir terapias basadas en la inducción de tolerancia.

Concretamente el grupo del profesor Nadler de la Universidad de Harvard, está obteniendo resultados muy prometedores basados en el bloqueo de las moléculas coestimuladoras previas al trasplante de médula ósea en

pacientes sin donante idóneo. La técnica consiste en tomar células irradiadas del receptor (que está en fase de remisión de una leucemia o linfoma), y ponerlas en contacto con médula ósea del donante en presencia de moléculas que bloqueen la interacción de B7 con CD28. De este modo se consigue que la médula ósea del donante se haga anérgica a las células del receptor.

También en trasplantes de órganos sólidos se están obteniendo resultados prometedores mediante el bloqueo de moléculas coestimuladoras.

ANIMALES TRANSGENICOS

Cuando se aborda el estudio "in vivo", de la tolerancia frente a un antígeno, nos encontramos con el problema de que tenemos que analizar la respuesta de las pocas células específicas para el antígeno entre todos los linfocitos del individuo. Para superar esa dificultad se han "construido" mediante técnicas de ingeniería genética animales transgénicos para un determinado receptor de antígeno. Esto se ha hecho tanto en células T (TcR transgénico) como en células B (Ig transgénicos). Al mismo tiempo se han construido transgénicos que expresen los antígenos específicos de los receptores, en distintos lugares del organismo permitiéndonos analizar que ocurre con los linfocitos cuando reconocen su antígeno en distintas formas o en distintos momentos de su desarrollo.

Como sabéis la generación de los distintos TcR o Ig específicas se produce al azar por reordenamiento de los genes que codifican para las regiones variables de los mismos. Una vez que una célula reordena su receptor (para evitar ser específico para dos antígenos a la vez), deja de reordenar sus genes.

CONSTRUCCIÓN DE UN ANIMAL TRANSGENICO PARA UN RECEPTOR DE ANTÍGENO Para construir un animal transgénico en el que todos sus linfocitos reconozcan un antígeno determinado, (TcR transgénico o Ig transgénico), seguiremos los siguientes pasos:

1. Generamos un clon de linfocitos específicos para un determinado antígeno (por conveniencia alguna antígeno que no se exprese en el animal) y dejaremos que proliferen estimulándolo con el antígeno hasta que tengamos bastantes.
2. Aislamos el DNA que codifica para su receptor, que como se trata de un linfocito maduro estará ya reordenado.
3. Inyectamos ese gen en un óvulo con lo cual durante las mitosis subsiguientes, se integrará en el genoma. Se expresara solo en los linfocitos (T o B según se trata de transgénico para el TcR o la Ig), puesto que el promotor que gobierna a ese gen solo es funcionante en los linfocitos.
4. Identificamos los animales que expresan el transgen.
5. Como el gen que hemos introducido ya tiene sus regiones variables reordenadas, **ningún linfocito reordenara** ninguna otra, con lo cual todos los linfocitos serán específicos para el mismo antígeno.

CONSTRUCCIÓN DE UN ANIMAL TRANSGENICO PARA ANTÍGENO

1. Aislamos el fragmento de DNA que codifica para el antígeno.
2. Lo unimos usando enzimas de restricción a un promotor que permita su transcripción en los tejidos que nos interese (por Ej. solo en timo o solo en médula ósea o en todos los órganos). También podemos unirlo a fragmentos de DNA que codifican para secuencias de localización en membrana o secuencias que haga que se secrete, etc
3. Inyectamos el fragmento anterior en un óvulo fecundado como en el proceso anterior. Al igual que en el caso anterior ese fragmento de DNA quedara en algunos casos integrado en el genoma.
4. Identificamos los animales que expresan el transgen.

CRUZAMOS LOS DOS ANIMALES

1. Cruzamos los animales transgénicos para el TcR o Ig con los animales transgénicos para el antígeno.
2. Analizamos la progenie que habrá heredado los transgenes según una herencia mendeliana e identificamos los animales transgénicos solo para el TcR o Ig y los dobles transgénicos que también expresan el antígeno.
3. Analizamos que ocurre con los linfocitos que han encontrado el antígeno en los distintos estadios de su desarrollo comparándolos con los simples transgénicos que no han estado en contacto con el antígeno.

La utilización de animales transgénicos ha sido una herramienta de incalculable valor para conocer como se producen los fenómenos de tolerancia:

se construyeron ratones transgénicos en la que todos los linfocitos B expresan Ig de superficie (y por tanto producirán anticuerpos) contra el antígeno HEL (Hen egg lysozyme -lisozima del huevo de gallina-), antígeno que no existe en el ratón normal (wt -wild type-).

Tema 12. Regulación y control genético de la respuesta inmunitaria.
Regulación por el antígeno. Regulación por el anticuerpo. Regulación por los

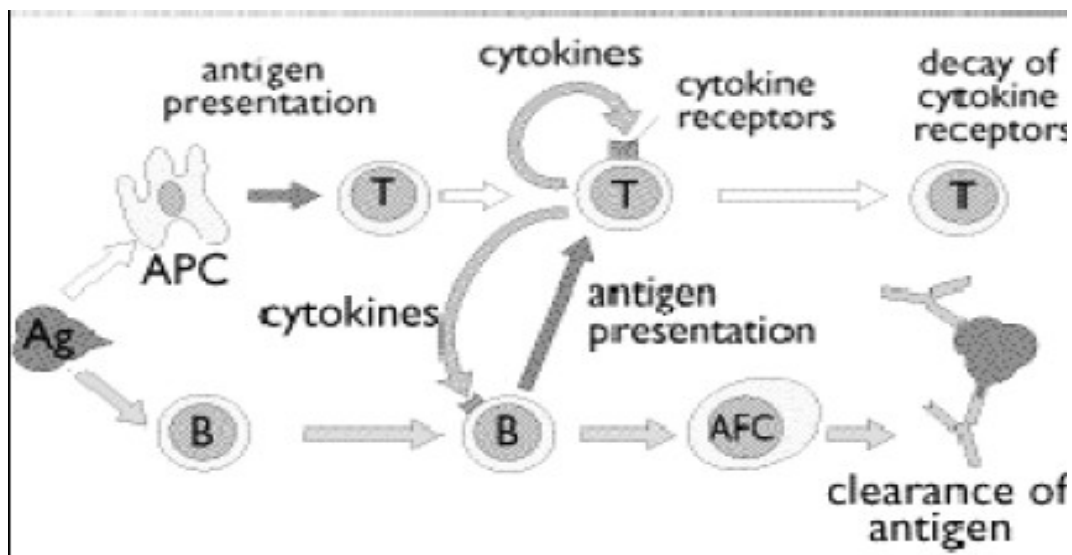
linfocitos. Modulación idiotípica y neuroendocrina de las respuestas inmunitarias. Genes que controlan la respuesta inmunitaria.

El sistema inmune se encuentra íntimamente regulado para evitar que los potentes efectos de una estimulación inadecuada del mismo, sean nocivos para el organismo.

Estudiar el sistema inmune, es sobre todo, estudiar su regulación. La regulación del sistema inmune ha sido abordada repetidamente en otros temas, sin embargo tocaremos en este tema algunos aspectos que no hayan sido suficientemente desarrollados.

REGULACIÓN POR EL ANTÍGENO.

El Antígeno es el iniciador de la respuesta inmune, de modo que en condiciones fisiológicas ésta continuará mientras persista el antígeno. Una vez que desaparece el antígeno la estimulación inicial desaparece y los mecanismos compensadores hacen que los linfocitos dejen de proliferar e incluso que muchos de ellos al dejar de ser estimulados sufran un proceso de apoptosis



REGULACIÓN POR EL ANTICUERPO.

ACTIVADORES

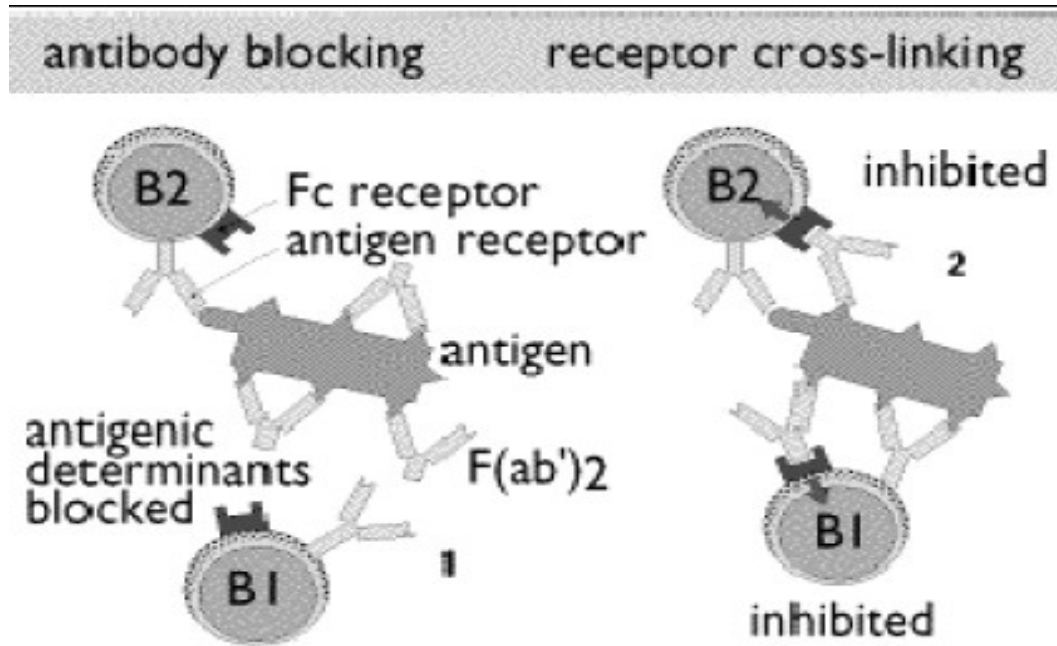
Aumenta la cantidad de células T y de la ayuda por parte de células B.

La presencia de anticuerpos y su unión al antígeno que estimuló su producción, dará lugar a la formación de IC facilitando la localización de antígenos en los centros germinales.

Estimulan la fagocitosis con el consecuente aumento de la presentación de antígenos a los linfocitos T por macrófagos, lo cual aumentará la activación de la célula T, que a su vez proveerá de ayuda a los linfocitos B, aumentando su activación y diferenciación a célula plasmática con la secreción de más anticuerpos.

INHIBIDORES

Sin embargo cuando al mismo tiempo que se produce la activación del BCR por el antígeno, se están uniendo inmunocomplejos a receptores Fc situados en la superficie de la célula B, se producirá la inhibición de la proliferación de esa célula B (la IgG es la más eficiente en realizar esta inhibición). Este mecanismo es una forma de indicarle al linfocito B que hay mucho anticuerpo.



Los anticuerpos también pueden inhibir la producción de más anticuerpo al bloquear el epítopo, impidiendo que éste interactúe con el BCR de otros linfocitos B que por tanto no serán activados.

REGULACIÓN POR LOS LINFOCITOS.

Ya hemos descrito en otros temas la importancia de las interacciones entre linfocitos para regular la respuesta inmune.

MODULACIÓN IDIOTÍPICA

Durante el desarrollo se produce tolerancia a los antígenos pero en el caso de los anticuerpos solo las regiones constantes están en cantidad suficiente para inducir tolerancia, mientras que cada una de las regiones variables está en tan pequeña cantidad que pasan desapercibidas para el sistema inmune no produciéndose tolerancia.

Cuando se produce una respuesta inmune contra un antígeno, las partes variables correspondientes al anticuerpo correspondiente llegan a estar en cantidades mucho mayores con lo que se produce una respuesta inmune contra ellas con la consiguiente producción de anticuerpos. Estos anticuerpos formados contra la región variable se llaman anticuerpos anti-idiotipo. Una vez que se producen los anticuerpos anti-idiotipo ahora estos también estarán en suficiente cantidad como para inducir también una respuesta inmune contra ellos con la formación de anticuerpos anti-antiidiotipo. Y así sucesivamente

formando una red de regulación descrita inicialmente por Jerne "red de Jerne". La existencia de estos anticuerpos se ha confirmado, sin embargo no parecen tener la importancia crucial para la regulación del sistema inmune que inicialmente se pensó.

NEUROENDOCRINA DE LAS RESPUESTAS INMUNITARIAS.

Timo, bazo y ganglios linfáticos, reciben inervación noradrenérgica. Esta inervación, regula los vasos y por tanto el tráfico de linfocitos, pero además parecen existir interacciones directas con algunas células.

El stress da lugar a liberación de ACTH que aumenta la secreción de corticoides por parte de la médula adrenal. Tanto corticoides como encefalinas y endorfinas, tienen efectos inmunosupresores por su efecto sobre los linfocitos.

Los mismos linfocitos producen ACTH en respuesta a CRF induciendo por tanto la producción de corticoides. Las catecolaminas de la medula adrenal también afectan la migración linfocitaria. Los linfocitos tienen así mismo receptores para múltiples hormonas (Insulina, tiroxina, GH y somatostatina), neurotransmisores y neuropéptidos.

GENES QUE CONTROLAN LA RESPUESTA INMUNITARIA.

Los genes que codifican para cada una de las proteínas reguladoras que hemos mencionado en los diferentes temas de inmunología básica, regulan la respuesta inmunitaria. Sirva como ejemplo los genes del MHC que determinan la capacidad de presentación de antígenos de cada individuo. No es de extrañar por tanto que alteraciones en algunos de los genes reguladores, den lugar a un funcionamiento defectuoso del sistema inmune.

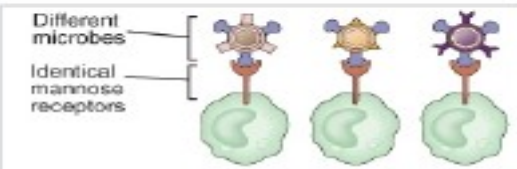
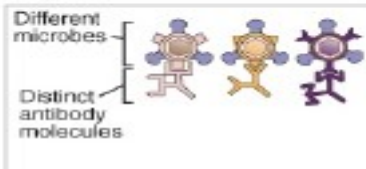
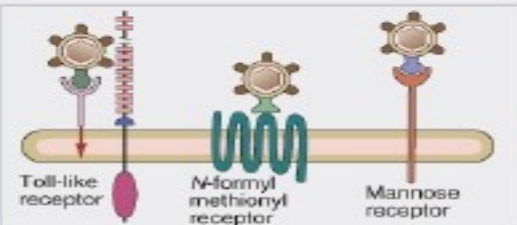
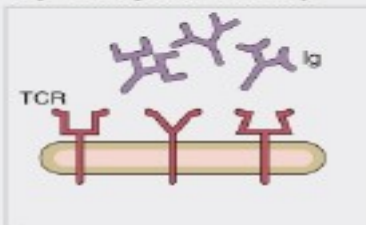
Tema 13. Mecanismos Efectores I. Migración celular e inflamación. Complemento.

Patrones de migración celular. Moléculas de adherencia intercelular y mecanismos de migración. Inflamación. Activación del complemento. Efectos biológicos del complemento. Receptores.

INTRODUCCION

Una vez que el antígeno ha atravesado las barreras naturales de piel y/o mucosas y comienza a tener efectos mas o menos lesivos para los tejidos, se va a producir una respuesta inflamatoria que atraerá al foco una serie de células encargadas de eliminar el agente antigénico. Inicialmente la defensa estará a cargo de la **inmunidad innata**, puesto que las células antígeno específicas responsables de la inmunidad adaptativa están en cantidades tan pequeñas para cada antígeno, que antes de ser efectivas tendrán que proliferar y diferenciarse en células efectoras (células plasmáticas en el caso de las células B, células Th1 o Th2 en el caso de las CD4+ y células citotóxicas en el caso de las CD8).

En la inmunidad innata, van a intervenir factores humorales como el complemento y factores celulares como es el caso de los Fagocitos (neutrófilos, macrófagos, etc.).

	Innate immunity	Adaptive immunity
Specificity	For structures shared by classes of microbes ("molecular patterns") 	For structural detail of microbial molecules (antigens); may recognize nonmicrobial antigens 
Receptors	Encoded in germline; limited diversity 	Encoded by genes produced by somatic recombination of gene segments; greater diversity 
Distribution of receptors	Nonclonal: identical receptors on all cells of the same lineage	Clonal: clones of lymphocytes with distinct specificities express different receptors
Discrimination of self and nonself	Yes; host cells are not recognized or they may express molecules that prevent innate immune reactions	Yes; based on selection against self-reactive lymphocytes; may be imperfect (giving rise to autoimmunity)

© Elsevier: Abbas & Lichtman: Basic Immunology, Updated 2e - www.studentconsult.com

En algunos casos el antígeno podrá ser contenido por los mecanismos de la inmunidad innata, que se caracterizaran por su rapidez pero por su falta de adaptación, de modo que en un subsiguiente ataque por el mismo antígeno su actuación no habrá mejorado.

En los casos en que el antígeno no sea contenido por la inmunidad innata y cuando se supere una dosis umbral de antígeno (o si esta es muy alta desde el principio debido a un inóculo muy importante), se pondrán en marcha los mecanismos de la **inmunidad adaptativa**. Para ello la inmunidad innata precedente, es fundamental y esta íntimamente relacionada

con la adaptativa. Los macrófagos que hayan fagocitado antígenos en el foco inflamatorio, viajarán a los órganos linfoides secundarios (Ganglios linfáticos de drenaje, MALT, bazo, etc.) y allí presentarán antígenos a los linfocitos T que resultaran estimulados y ayudaran a la activación de los linfocitos B que se diferenciarán en células plasmáticas y secretaran anticuerpos. La migración y acceso al foco de células efectoras tanto específicas como inespecíficas se verá facilitada en todo momento por la existencia del fenómeno inflamatorio. Finalmente se cerrara el círculo cuando los linfocitos gracias a la secreción de citoquinas, estimulen a las células fagocíticas aumentando su función y cuando los anticuerpos producidos, marquen los antígenos, facilitando su fagocitosis. Así mismo los anticuerpos que encuentren antígenos solubles formaran inmunocomplejos con ellos (complejos antígeno/anticuerpo). Los inmunocomplejos tendrán que ser retirados de la circulación para evitar que precipiten en los tejidos y causen inflamación y destrucción tisular a distancia. Estos inmunocomplejos serán retirados gracias a la capacidad de los anticuerpos de unir complemento que a su vez se unirá a receptores en la membrana de fagocitos dando lugar a la fagocitosis de los inmunocomplejos o en a la membrana de los hematíes siendo retirados de la circulación a su paso por el bazo.

Una vez que se ponga en marcha la respuesta adaptativa, el organismo dispondrá de métodos más específicos de reconocimiento del antígeno, lo cual permitirá destruirlo directamente o marcarlo para su destrucción, sin embargo en la eliminación final del antígeno, van a estar implicados prácticamente los mismos mecanismos efectoras de la inmunidad adaptativa (complemento, fagocitos, etc.).

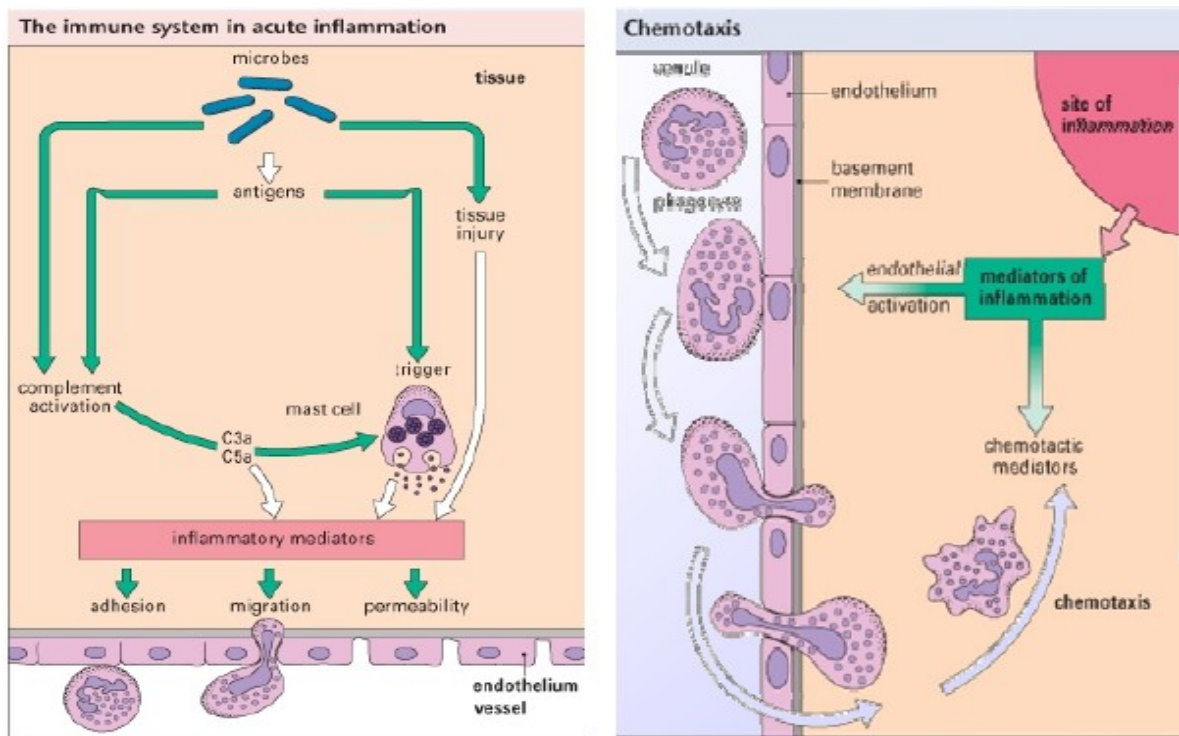
MIGRACIÓN CELULAR E INFLAMACIÓN. Patrones de migración celular. Moléculas de adherencia intercelular y mecanismos de migración. Inflamación

El evento que inicia la respuesta inmune es el fenómeno inflamatorio.

La Inflamación es la reacción del organismo frente a la invasión por un agente infeccioso, cualquier otro estímulo antigénico o simplemente lesiones físicas.

Tendrá como consecuencia la **migración de células inmunes** al foco inflamatorio y la **llegada de moléculas** implicadas en el proceso inflamatorio.

La inflamación dará lugar a un aumento del aporte sanguíneo local y a un incremento de la permeabilidad vascular. El **aumento de aporte sanguíneo** permitirá una mayor rapidez en la llegada al foco inflamatorio y el **aumento de permeabilidad vascular** permitirá el paso de moléculas relativamente grandes que en condiciones normales no serían capaces de llegar al foco. Finalmente los pequeños vasos terminaran **coagulándose** evitando una dispersión de la infección al resto del organismo. El fluido y células retenido en el foco inflamatorio terminara drenando a los ganglios linfáticos donde se iniciará la respuesta adaptativa.



Durante el proceso inflamatorio se producirán agentes **quimiotáticos** que atraerán al foco inflamatorio las distintas células del sistema inmune. También se expresarán moléculas de **adhesión** en el endotelio de los vasos circundantes a la lesión, permitiendo que las células inmunes queden adheridas en las inmediaciones del foco inflamatorio e inicien la migración a los tejidos inflamados. Este proceso por el cual el leucocito llega al foco inflamatorio se produce en varias fases denominadas rodamiento, unión fuerte, diapédesis y migración. Para ello la pared endotelial de los vasos cercanos al foco inflamatorio, expresará unas moléculas de adhesión denominadas **selectinas**. La unión de las células inflamatorias a la pared endotelial a través de las selectinas tendrá la misión de enlentecer estas células. Al no ser una unión muy fuerte, las células irán siendo arrastradas por el flujo, **rodando** sobre el endotelio. Sin embargo la expresión de otra molécula de adhesión en el endotelio (ICAM-1), interaccionará con LFA-1 y MAC-1 en el leucocito dando lugar a una **unión mas fuerte**. Finalmente la unión del leucocito a la unión entre las células endoteliales a través de CD31, permitirá la **diapédesis**. Una vez en el espacio extravascular el leucocito **migrará** atraído por un gradiente de quemoquinas.

En definitiva todo el proceso inflamatorio va a sentar las condiciones óptimas para que lleguen al foco todos los agentes inmunes necesarios para controlar el agente o agentes causante del mismo.

El fenómeno inflamatorio, tan importante en el inicio de la respuesta inmune, se instaurará por varias vías que nos son mutuamente excluyentes.

- El propio **daño tisular** va a activar el sistema de las quininas, con la activación de bradiquinina y lisil-bradiquinina, dos potentes mediadores vasoactivos, que también estarán implicados en la iniciación de una respuesta inflamatoria que atraerá al foco a otros agentes de la inmunidad innata. Tanto los **fagocitos** como el sistema de **complemento** también son capaces de detectar estructuras comunes a muchos patógenos pero inexistentes en las células del organismo, permitiendo una

respuesta rápida, aunque eso si poco específica. La actuación inicial de los fagocitos (citoquinas) dará lugar a proteínas de fase aguda, activación de complemento y fagocitos, fiebre e inflamación.

- Los **FAGOCITOS** sobre todo los neutrófilos son las primeras células en llegar al foco inflamatorio, bien directamente o atraídos por factores quimiotácticos liberados por la activación del complemento. Van a poseer receptores que reconocen componentes microbianos (como es el caso de CD14 receptor para LPS), dando lugar a la fagocitosis de los mismos y a la liberación de citoquinas que contribuirán en la eclosión del fenómeno inflamatorio. También tendrán receptores para moléculas del sistema de complemento (CR4- formado por CD11c/CD18), lo cual les permite fagocitar aun mas eficientemente los antígenos opsonizados por complemento en el caso de que el complemento se activara antes. Algunas citoquinas producidas por los fagocitos tendrán tres efectos fundamentales en los inicios de la respuesta inmune:
 - Inducirán la síntesis por el hígado de **proteínas de fase aguda**, que podrán unirse a la superficie de las bacterias y activar complemento o fagocitos.
 - Aumentan la **temperatura corporal (fiebre)**, que parece afectar negativamente a los microorganismos al mismo tiempo que aumenta la respuesta inmune.
 - Inducen **inflamación**.

Sin embargo si la producción de citoquinas se generaliza puede tener efectos nefastos para el organismo, como es el caso de la secreción sistémica de TNF α como consecuencia de una infección generalizada, sobre todo por bacterias Gram-negativas. TNF α es una citoquina cuya secreción en el foco inflamatorio, es muy importante en el establecimiento de la inflamación, que como hemos dicho es fundamental para que se inicie y sea efectiva la respuesta inmune. Sin embargo si se produce un efecto de TNF α a nivel sistémico, todos los procesos del fenómeno inflamatorio se producirán a nivel sistémico, produciéndose una vasodilatación generalizada de pequeños vasos con la consiguiente disminución de la tensión arterial e instauración de shock, coagulación intravascular diseminada con el subsiguiente consumo de factores de coagulación y la producción de múltiples hemorragias, fallo multiorgánico y muerte.

Infección local con bacterias Gram.-negativas	Infección sistémica con bacterias Gram-negativas (sepsis)
Macrófagos activados para secretar TNF- α en el tejido.	Macrófagos activados en el hígado y el bazo secretan TNF- α a la corriente sanguínea.
<p>Liberación elevada de proteínas plasmáticas al tejido.</p> <p>Aumento en la migración de linfocitos y fagocitos al tejido.</p> <p>Aumento en la adhesión de plaquetas a la pared del vaso sanguíneo.</p>	<p>Edema sistémico que causa un descenso del volumen de sangre, hipoproteïnemia anemia y neutropenia seguidas de neutrofilia.</p> <p>El descenso del volumen sanguíneo causa un colapso de los vasos sanguíneos.</p>
<p>Fagocitos de las bacterias.</p> <p>Oclusión local de los capilares.</p> <p>El plasma y las células drenan al ganglio linfático local</p>	Coagulación intravascular diseminada que lleva al desgaste y al fallo múltiple de órganos
<p>Eliminación de la infección</p> <p>Inmunidad adaptativa</p>	Muerte

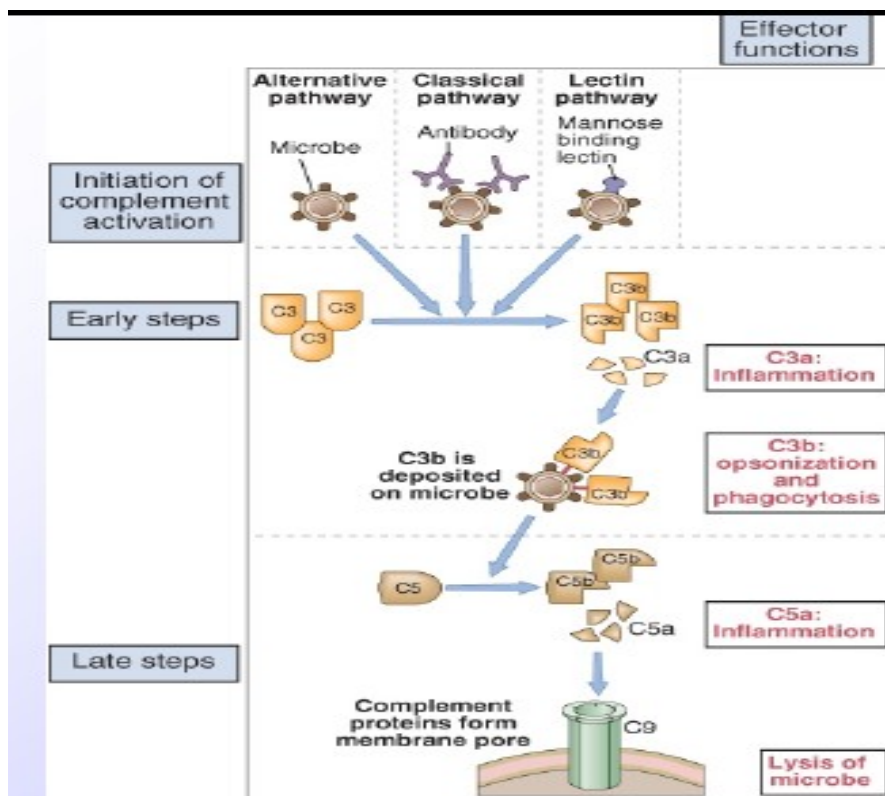
Por su parte la activación del **COMPLEMENTO** provocará la liberación de sustancias anafilácticas que atraerán al foco inflamatorio a células fagocíticas.

Cualquiera que sean los mecanismos iniciales, la inflamación facilitará la llegada de fagocitos y otras células y moléculas. También facilitará la llegada de los mecanismos específicos que una vez pasada la infección quedarán como memoria para una actuación efectiva más rápida en el próximo encuentro con el antígeno.

Otros mediadores inmunes de limitada especificidad pero de efecto rápido (**células NK, células B-1, células Tg/d**) también están preparados desde los primeros momentos para luchar contra antígenos frecuentes.

COMPLEMENTO

Llamamos Complemento a un sistema de proteínas cuya función es la **defensa contra la infección por microorganismos y la eliminación de Inmunocomplejos (complejos Ag-Ac)**. Las proteínas inactivas que constituyen el sistema del Complemento se activan por proteólisis de su extremo N-terminal. Durante la proteólisis de cada una de estas proteínas, se libera un fragmento pequeño que se denomina "a", mientras el fragmento mayor queda unido al inmunocomplejo o microorganismo que lo activó. Este es el denominado fragmento "b". (Con anterioridad a 1993 en el caso de C2 se aplicaba la nomenclatura de forma inversa de forma que el fragmento mayor y menor se denominaban a y b respectivamente).



- Los fragmentos **b** resultantes de la activación del complemento (principalmente C3b y C4b), que como hemos dicho quedan unidos al agente que los activó, marcarán a éste y facilitarán su captura e ingestión. Este es el proceso denominado **opsonización**.
- Los fragmentos **a** que se liberan (principalmente C3a, C4a y C5a), se denominan **anafilotoxinas** y son poderosos **factores quimiotácticos**.

El complemento se descubrió como una actividad (se llama "actividad" a una o varias sustancias presentes en una solución cuando todavía no hemos caracterizado de qué sustancia o sustancias se trata) del suero que "complementaba" la actividad del anticuerpo, pues la adición de esas fracciones del suero, permitía que algunos anticuerpos (hoy se sabe

que aquellos que unan C) lizarán bacterias, cosa que en ausencia de esa actividad no eran capaces de hacer.

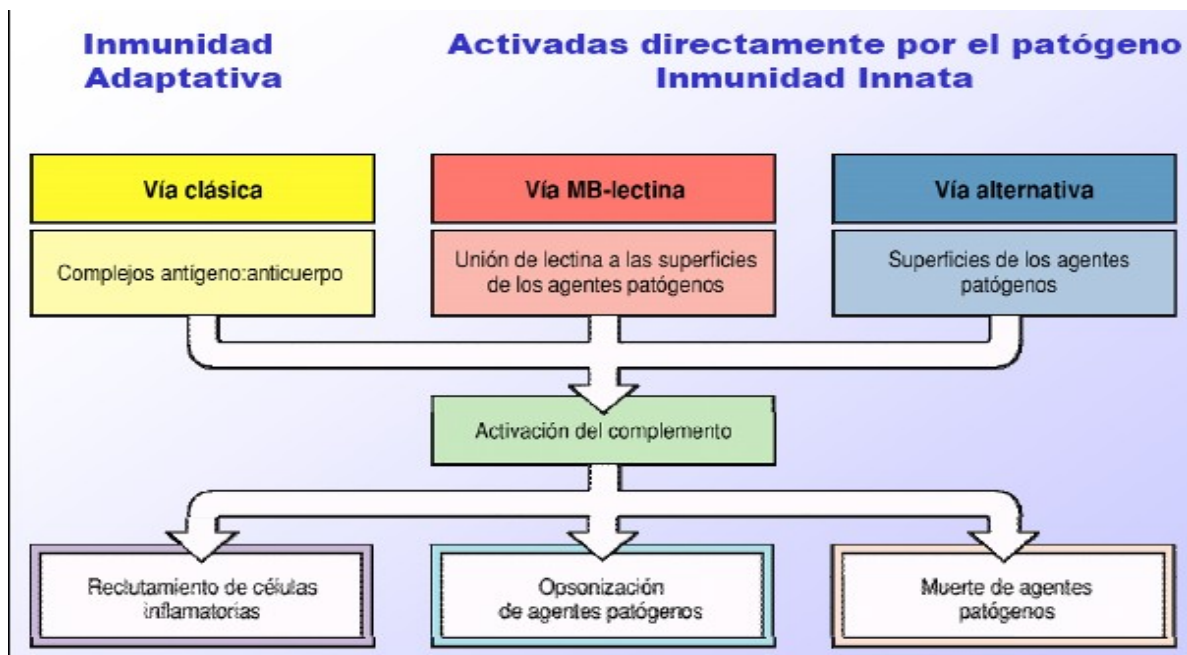
Puede ser activado por la llamada **Vía clásica** (que es como se descubrió, de ahí el nombre de clásica) por anticuerpos siempre que estén unidos a antígenos, puesto que para activar el complemento, se necesita más de un anticuerpo dispuesto a una distancia determinada o un anticuerpo tipo IgM en una disposición de grapa que solo tienen cuando están unidos a un antígeno

Pero también puede ser activada directamente por bacterias a través de la **Vía alternativa** o de la

Vía MB-Lectina.

La **vía alternativa** también puede actuar como amplificadora de la **Vía clásica**

Aunque la vía alternativa se activa antes que la clásica puesto que la segunda necesita de la respuesta de anticuerpos específicos, las vamos a ver conjuntamente.



ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO

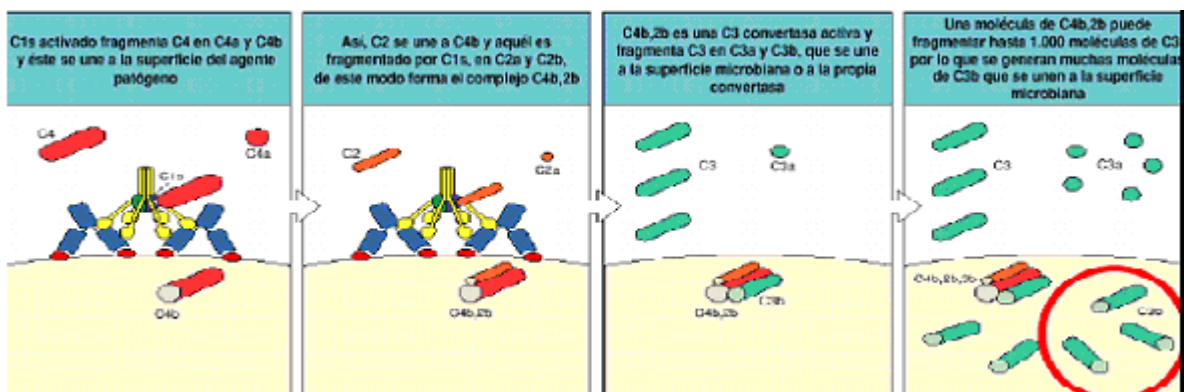
El Complemento puede ser activado bien por la "Vía Clásica", por la "vía Alternativa" o por la Vía de la MB-Lectina. En todos los casos, el efecto final será la activación de C3 y subsiguientemente de C5. A partir de este punto las dos vías confluyen con la activación del Complejo de Ataque a la Membrana (CAM) que dará lugar a la lisis del microorganismo. La activación no siempre deberá concluir con la activación del CAM y la lisis, puesto que desde el momento que se comienza a activar el complemento ya se está produciendo la opsonización de la superficie sobre la que se estén uniendo los fragmentos b y la quimiotaxis, gracias a los factores a que se están liberando.

- **Vía Clásica**

Participan los componentes **C1, C4, C2** y **C3**.

Las moléculas que activan la vía clásica, son sobre todo **Inmunocomplejos** que contienen **IgG** o **IgM**. La capacidad de los distintos isotipos de inmunoglobulinas para activar el complemento varía, siendo en orden decreciente **IgM>IgG₁>IgG₃>IgG₂**. **IgG₄** no fija complemento, tampoco **IgA, IgD** o **IgE**.

El primer factor que se activa es **C1** que está formado por seis subunidades de la molécula **C1q**, unidas a las moléculas **C1r** y **C1s**. Para activar el complemento por esta vía tienen que unirse al menos dos fragmentos **Fc** a sendas subunidades de **C1q**. La activación de **C1q**, libera la actividad proteasa de **C1r** que corta **C1s** liberando a su vez su actividad proteasa. **C1s** corta primero a **C4** liberando el fragmento **C4a** que es una anafilotoxina y el fragmento **C4b**, que se une covalentemente a la superficie a la que está unido el anticuerpo que lo activó. Seguidamente, **C4b** une a **C2**, haciéndolo a su vez susceptible al corte con **C1s**, y dando lugar a **C4b-C2b** que es la **C3-convertasa de la vía Clásica** (en ella **C4b** no es una proteasa sino que sirve para anclar **C2b** a la superficie). La **C3-convertasa** es una enzima lábil que se inactiva rápidamente pero antes gracias a la actividad proteasa de **C2b**, actúa sobre **C3** liberando la anafilotoxina **C3a** y el fragmento **C3b**. **C3b** se unirá a la **C4b-C2b** dando lugar a **C4b-C2b-C3b**, que es la **C5 convertasa de la vía Clásica**, la cual también gracias a la actividad proteasa de **C2b** actuará sobre **C5** liberando un fragmento **C5a** que es la anafilotoxina más potente y un fragmento **C5b** que también quedará unido a la superficie.



El hecho de que **C4** se una de forma covalente, hace que solo se active sobre la superficie y no de forma libre. Si no se une covalentemente a una superficie la zona expuesta hace que sea hidrolizada. **C2b** tampoco es susceptible a **C1s** a no ser que esté unido a **C4b**. Y lo mismo ocurre con **C3b**, que si no está unido a una superficie es hidrolizado. Así mismo y a pesar de que mucho **C3b** será hidrolizado y quedará unido a la superficie del patógeno, sin estar unido a **C4bC2b**, solo el **C5** que se une al **C4bC2bC3b** será hidrolizado por la actividad proteasa de **C2b** y no el que se une al **C3b** libre, por tanto solo se generaran un número limitado de moléculas **C5b**. El **C3b** que no está unido a **C4bC2b** no va a tener ningún efecto en activar a **C5** (es decir no va a formar parte de la **C5 convertasa**), sin embargo, si que va a tener importantes funciones de opsonización, mientras que el **C3a** que se está liberando va a tener importantes funciones quimiotácticas.

Como decíamos antes la activación del complemento no siempre tiene que culminar con la activación del CAM, de hecho lo descrito hasta ahora es responsable de las funciones mas importantes del complemento, como se desprende del hecho de que es la que da una patología mas florida en casos de deficiencias de los factores descritos.

- **Vía de la MB-Lectina**

Todos estos fenómeno salvo los debidos a C1 se producen en la vía de MB lectina. La activación del complemento por esta vía, se produce como consecuencia de la unión de una lectina del suero, la **lectina de unión a manosa**, a carbohidratos que contengan manosa, hecho que ocurre en la superficie de bacterias y virus. Una vez unida a manosa, la lectina de unión a manosa unirá a **MASP-1 y 2 (Mannan binding lectin Associated Serum Protease)** que serán las que actúen sobre **C4 y C2**.

La existencia de esta vía permite la activación directa del sistema de complemento por los patógenos sin tener que esperar a la generación de anticuerpos específicos contra ellos que activarían la vía clásica.

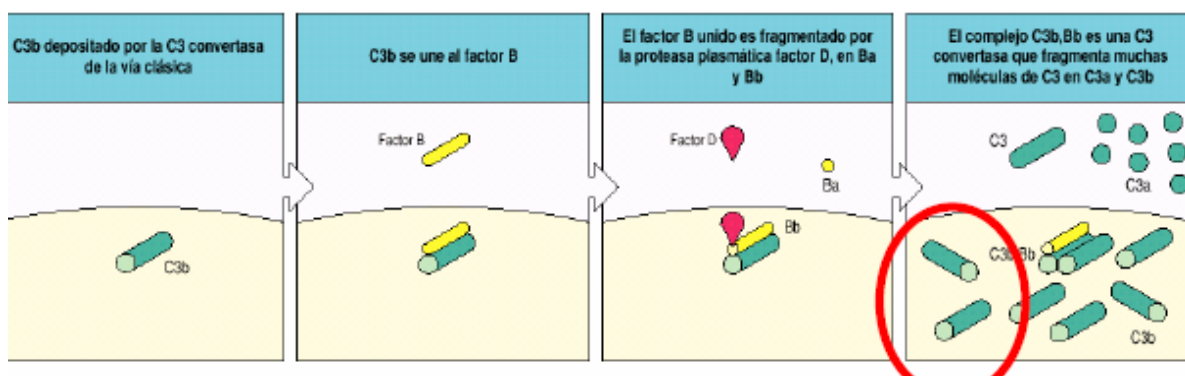
- **Vía Alternativa**

Está formada por los componentes **C3**, factor **B**, factor **D** y las proteínas reguladoras factor **H** e **I** y properdina.

Esta vía sirve para amplificar la activación del complemento por la vía clásica, pero también puede ser activada directamente por el agente patógeno.

- Como Amplificación de la Vía Clásica

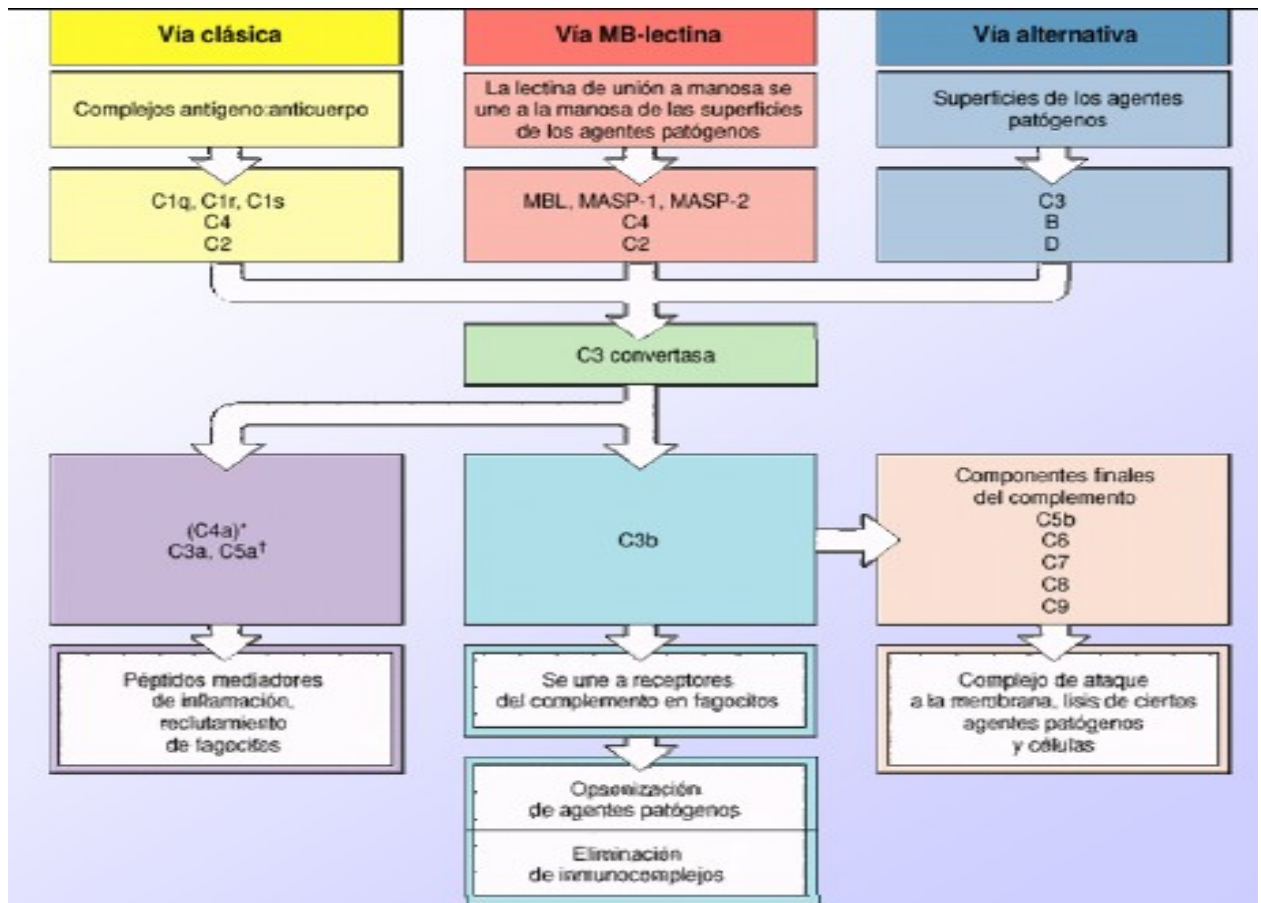
Como dijimos anteriormente debido a la activación de la vía clásica, se están generando una gran cantidad de **C3b** que queda unido a la superficie y que puede unir al **factor B** de la vía alternativa, haciendo que sea susceptible al corte por factor **D** que liberará el factor **Ba**, quedando el factor **Bb** (homologo a **C2b** y por tanto con actividad proteasa) unido a **C3b**. El complejo **C3bBb** es la **C3-convertasa de la vía Alternativa** que podrá actuar sobre mas **C3** activándolo al generar mas **C3a** (que se liberar) y mas **C3b** (que quedará unido a la superficie).



- Activado directamente por los agentes Patógenos

Un pequeño porcentaje de moléculas nativas de C3 hidroliza de forma espontánea su enlace tío-éster generando **C3b** (en realidad es una molécula parecida denominada C3i). Este C3b, a su vez se unirá al factor B como en el caso anterior con el resultado final de la generación de la **C3-convertasa de la vía Alternativa**. Este complejo se disocia con bastante rapidez a no ser que sea estabilizado por la **Properdina**. Como esta convertasa actúa en fase líquida, la mayor parte del C3b generado por esta vía es hidrolizado e inactivado por una serie de proteínas reguladoras que impiden que sean lesivas para superficies propias. Sin embargo, si se encuentra cerca de la superficie de una estructura ajena (como es el caso de superficie de bacterias), denominada permisiva, se une covalentemente a la misma e inicia el circuito de la vía alternativa, dando lugar a nuevas moléculas C3b. Algunas de las moléculas de C3b generado, se unen a C3bBb originando C3bBbC3b, que es la **C5 convertasa de la vía Alternativa** y que será capaz de actuar sobre C5, activándolo. Como hemos visto, la vía alternativa se activa espontáneamente sin necesidad de la intervención de anticuerpos, no obstante se requiere la presencia de estructuras extrañas o ajenas para que el C3b activado por esta vía no se hidrolice y de esta forma se inactive, por eso podemos decir que puede ser activado directamente por agentes patógenos. Estas sustancias extrañas son:

- Inmunocomplejos IgA, IgG o IgE, de forma menos efectiva que en la vía Clásica.
- Determinadas cepas de Bacterias Gram+ o Gram-
- Células infectadas por virus (Ej. Epstein Barr Virus, EBV)
- Tripanosomas, Leishmania, Hongos.
- Veneno de Cobra, que por esta razón se ha utilizado experimentalmente para estudiar la actividad de la vía alternativa.

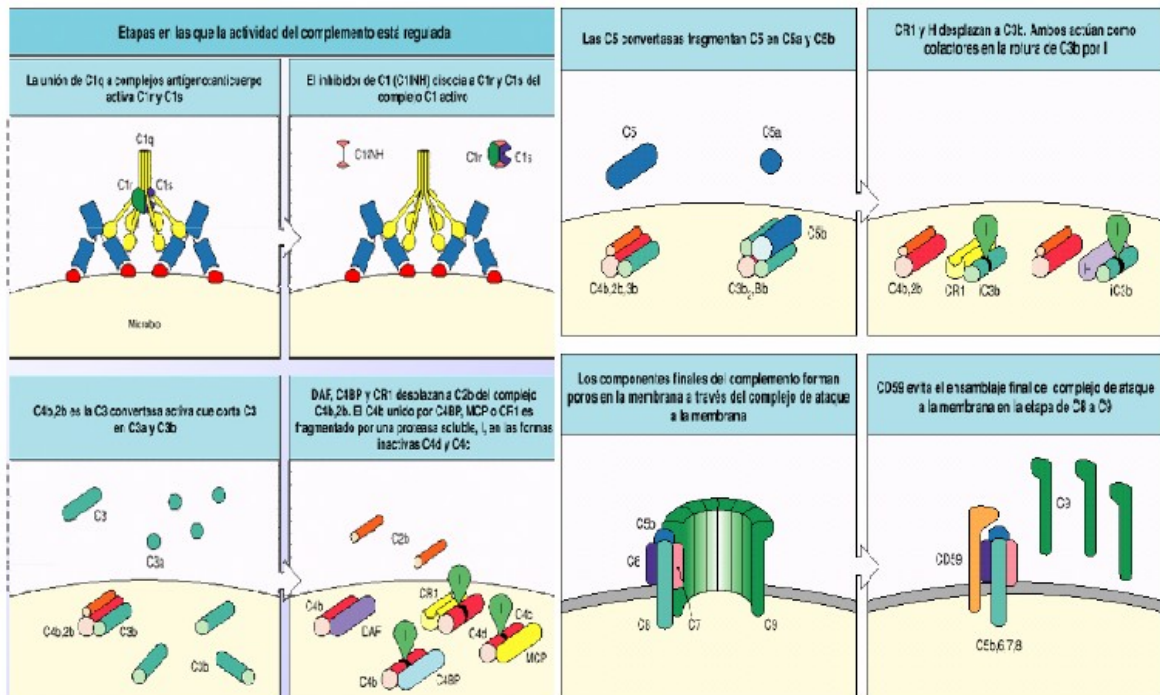
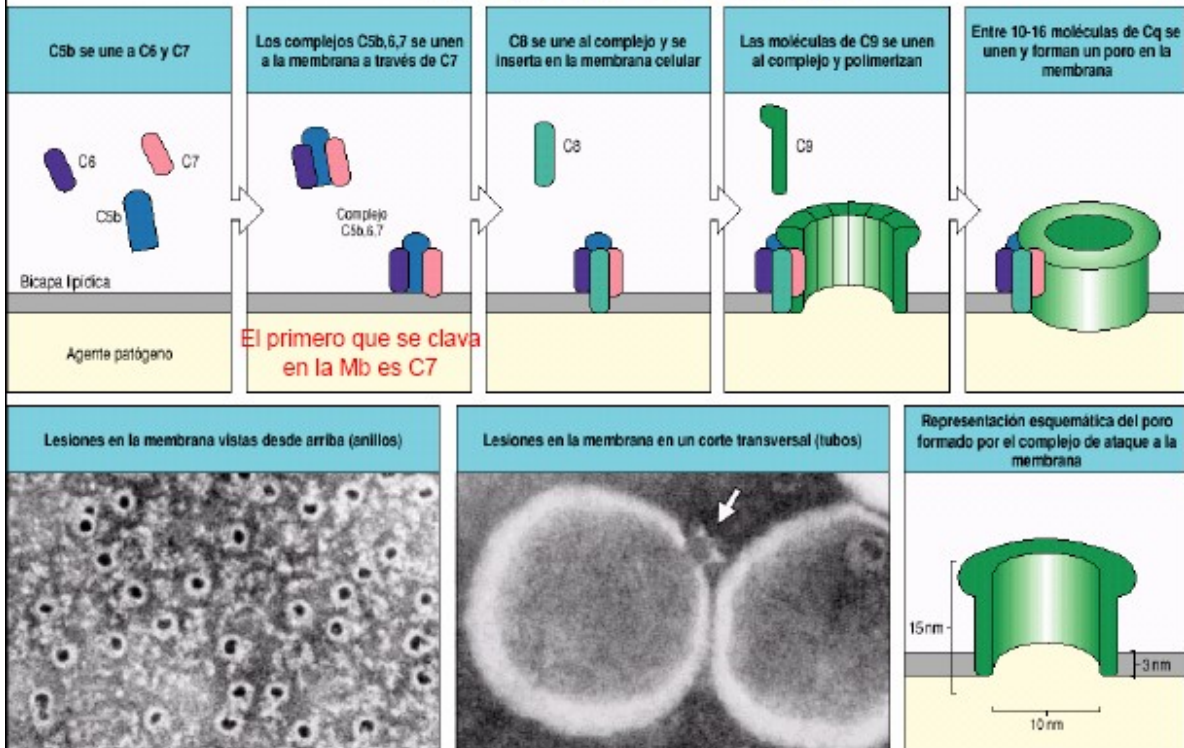


Fase Lítica: Complejo de Ataque a la Membrana (CAM)

La Fase Lítica comienza con la ruptura de C5 catalizada por cualquiera de las dos convertasas, liberando la anafilotoxina C5a y el fragmento C5b. C5b, que permanecerá unido a la membrana que lo activó, es el núcleo de ensamblaje del CAM. Sobre él se unirá C6 y C7, que se ancla fuertemente a la bicapa lipídica y se agrega formando oligómeros. Al complejo anterior se incorporará C8 formando estructuras que debilitan la membrana y la hacen permeable a pequeños solutos y al agua. Finalmente, a C5bC6C7C8 se unirá C9 que se insertará en la membrana y se polimerizará lo cual amplifica las lesiones de la membrana celular. El resultado final es la formación de un canal o poro transmembrana que permite el libre intercambio de agua y provoca finalmente la lisis de la célula afectada.

COMPLEJO DE ATAQUE A LA MEMBRANA

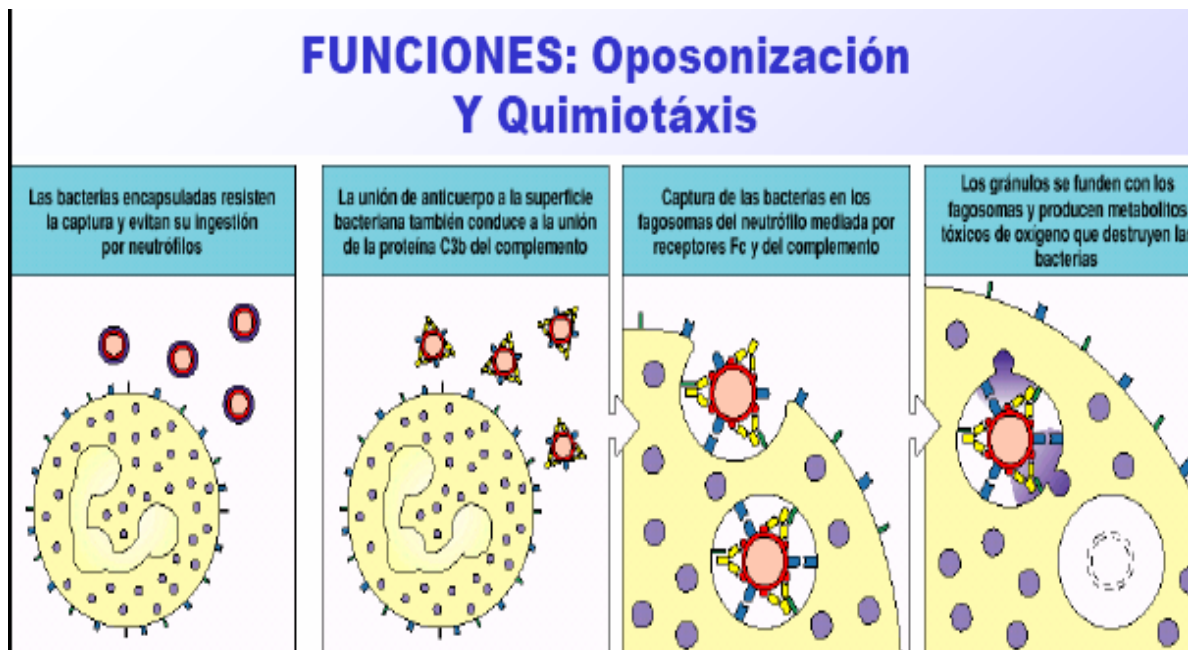
FUNCIONES: LISISIS



EFFECTOS BIOLÓGICOS DEL COMPLEMENTO(FUNCIONES DEL COMPLEMENTO)

Oponización

La unión de C3b a una superficie, la hará mas susceptible a ser fagocitada. al activar C3b a los receptores para C3b (CR1), situados en la superficie de los fagocitos. Sin embargo la activación del receptor de complemento en el fagocito, no es suficiente para inducir a la fagocitosis salvo que el fagocito este previamente activado (esto solo ocurrirá si además se ha producido la anafilotoxina C5a sinergizará en la activación del fagocito), o que el antígeno no solo este unido a complemento sino también a anticuerpos del isotipo IgG (no IgM). En estos casos si que podrá inducir fagocitosis en ausencia de quimiotaxis por C5a, al activar también los receptores Fc para IgG (es decir Fcg) del fagocito.



Vemos una vez mas como si la vía adaptativa esta en marcha es mas efectiva. Y como la IgG, característica de la respuesta secundaria, es más efectiva.

La principal opsonina es C3b sobre todo por la gran cantidad de C3b que va quedando en la superficie en la que se a activado el complemento.

La función de Oponización, es fundamental para fagocitar bacterias encapsuladas, por eso las infecciones por estas bacterias son típicas en las deficiencias de factores de complemento previas a la activación de C3.

Respuesta Inflamatoria (Anafilotoxinas)

Las anafilotoxinas C3a, C4a y C5a (C5a es 100 veces mas potente que C3a y 1000 veces mas que C4a), estimulan la

- Quimiotaxis de neutrófilos

- Degranulación de Basófilos y Mastocitos con liberación de Histamina y Leucotrienos. Que a su vez darán lugar a quimiotaxis de Neutrófilos y monocitos así como aumento de la permeabilidad vascular.

En situaciones de contacto de la sangre con materiales no biológicos, durante la circulación extracorpórea o by pass, se produce la activación de la vía alternativa e incluso de la vía clásica (en el caso del by pass cardiopulmonar), dando lugar a la producción de anafilotoxinas responsables de la granulocitopenia transitoria que se produce en los primeros minutos de la diálisis.

Aclaramiento de inmunocomplejos (IC)

Los complejos antígeno anticuerpo en determinadas proporciones de antígeno tienden a precipitar provocando daño tisular (glomerulonefritis, artritis...).

En condiciones normales el sistema de complemento recubre los IC con la consecuencia de que:

- Evita la precipitación de IC manteniendo su solubilidad.
- Los IC recubiertos de C3b son reconocidos por CR1 de la superficie de células sanguíneas (hematíes) quedando unidos a ellas. De este modo los IC serán retirados de la circulación y destruidos cuando lo sean las células que los acarrearán.
- Durante el paso de las células por hígado y bazo, los IC son transferidos a células fagocíticas que se encargarán de su eliminación.

FUNCIONES: Aclaramiento de IC Receptores

Receptor	Especificidad	Funciones	Tipos celulares
CR1	C3b, C4b	Promueve la disminución de C3b y C4b Estimula fagocitosis Transporte de inmunocomplejos por parte de eritrocitos	Eritrocitos, macrófagos, monocitos, leucocitos polimorfonucleares, células B, FDC
CR2 (CD21)	C3d, iC3b, C3dg Virus de Epstein-Barr	Parte del correceptor de las células B Receptor del virus de Epstein-Barr	Células B, FDC
CR3 (CD11b/CD18)	iC3b	Estimula fagocitosis	Macrófagos, monocitos, leucocitos polimorfonucleares, FDC
CR4 (gp150, 95) (CD11c/CD18)	iC3b	Estimula fagocitosis	Macrófagos, monocitos, leucocitos polimorfonucleares
Receptor de C1q	C1q (región de colágeno)	Unión de inmunocomplejos a fagocitos	Células B, macrófagos, monocitos, plaquetas, células endoteliales

RECEPTORES DEL COMPLEMENTO

Para realizar muchas de sus funciones, una vez activado el complemento tendrá que unirse a receptores situados en fagocitos, hematíes, etc. Los mas importantes son los receptores para fragmentos derivados de C3 y sobre todos aquellos para C3b.

Receptor	Especificidad	Funciones	Tipos celulares
CR1	C3b, C4b	Promueve la disminución de C3b y C4b. Estimula fagocitosis Transporte de Inmunocomplejos por parte de eritrocitos	Eritrocitos, macrófagos, monocitos, leucocitos polimorfonucleares, células B, FDC
CR2 (CD21)	C3d, iC3b, C3dg Virus de Epstein Bar	Parte del correceptor de las células B Receptor del virus de Epstein-Barr	Células B, FDC
CR3 (CD11b / CD18)	iC3b	Estimula fagocitosis	Macrófagos, monocitos, leucocitos polimorfonucleares, FDC
CR4 (gp150, 95) (CD11c /CD18)	iC3b	Estimula fagocitosis	Macrófagos, monocitos, leucocitos polimorfonucleares, FDC
Receptor de C1q	C1q (región de colágeno)	Unión de inmunocomplejos a fagocitos	Células B, macrófagos, monocitos, plaquetas, células endoteliales

REGULACION DEL COMPLEMENTO

Para que el sistema del Complemento no destruya a las propias células, debe estar perfectamente regulado y ser inactivado cuando ya no sea necesario. Existen reguladores solubles y reguladores que actúan sobre el complemento ya unido a membranas. La regulación se produce sobre todo a nivel de C1, C3 y C4.

Proteínas que controlan las vías clásica y alternativa

Nombre (símbolo)	Papel en la regulación de la activación del
------------------	---

	complemento
Inhibidor de C1 (C1INH)	Se une a C1r:C1s activado, y lo disocia de C1q
Proteína de unión a C4 (C4BP)	Se une a C4b y desplaza a C2b; cofactor para la rotura de C4b por I
Receptor 1 del complemento (CR1)	Se une a C4b y desplaza a C2b, o a C3b tras desplazar a Bb; cofactor de I
Factor H (H)	Se une a C3b y desplaza a Bb; cofactor de I
Factor I (I)	Serino proteasa que fragmenta C3b y C4b; ayudado por H, MCP, C4BP o CR1
Factor Acelerador del Deterioro (DAF)	Proteína de membrana que desplaza a Bb de C3b y a C2b de C4b
Proteína cofactor de membrana (MCP)	Proteína de membrana que promueve la inactivación de C3b y C4b por I
CD59 (protectina)	Evita la formación del complejo de ataque a la membrana en células homólogas. Ampliamente expresado en membranas

- Actuando sobre **C1**:

C1 Inhibidor: Interacciona reversiblemente con C1 no activado impidiendo la activación espontánea de C1r. El efecto de C1inh es contrapesado por los activadores de la vía clásica, sobre todo por los inmunocomplejos. También interacciona con las formas activas C1r y C1s, uniéndose con ellos de forma covalente, dando lugar a la inactivación definitiva del C1 activado.

C3b y C4b: Cuando se han depositado en cantidad suficiente inhiben a C1.

- Actuando sobre **C3 y C4**

En fase líquida:

El factor **H** compite con el factor **B** por la unión a C3b, siendo capaz de desplazar B del C3bB, inactivando la convertasa de C3. Una vez unido a C3, **H** permitirá la inactivación de C3b por el factor **I**, que degradará C3b dando lugar a fragmentos más pequeños e inactivos iC3b, C3c, C3d, C3f, C3g.. (recordamos que si el que se unía era B daría lugar a C3iB que solo en presencia de superficies permisivas y si era estabilizado por la Properdina, permanecería activo permitiendo la producción de más C3b).

C4BP (C4 Binding Protein): Compite con C2 por la unión a C4b. Si el que se une a C4 es C4BP servirá de cofactor para el factor **I** que hará que C4b se hidrolice e inactive.

En Membranas: Evitan que el complemento lise las membranas propias. Actúan sobre la C3 convertasa:

MCP

DAF (Factor acelerador de la descomposición)

MCP, DAF y **Cr1** aceleran la disociación de las C3 convertasas (C31Bb o C4b2b).

MCP y DAF actúan en la membrana del mismo modo que H en fase líquida, como cofactor del factor I permitiendo la hidrólisis de C3b.

- **Regulación del complejo de ataque a la Membrana.** Evitan que el CAM activado sobre una superficie ajena, se traslade a la membrana de una superficie propia y la lise:

En **fase líquida: Vitronectina o Proteína S.** Se une a C5b-6-7 evitando que se inserte a bicapas lipídicas.

En **Membranas:** Si el complejo C5b-6-7 llegara a unirse a membranas propias, existe un mecanismo para evitar la lisis por el complemento propio.

CD59 se une al C8 del complejo C5b-6-7-8 impidiendo la inserción y el despliegue de C9.

HRF (Homologous Restriction Factor) Posee una actividad parecida a C9 pero más débil.

- **Regulación de las Anafilotoxinas C3a, C4a y C5a:** Las anafilotoxinas son rápidamente controladas en sangre por la **Carboxipeptidasa N.**

GENETICA Y DÉFICITS DE COMPLEMENTO

Todos los factores del complemento están codificados por genes situados en un solo locus autosómico, a excepción de C4 que lo está por más de uno.

C2, C4 y factor B están formando un grupo de ligamiento en la región del MHC.

Los déficits de complemento se heredan de forma autosómica recesiva a excepción de C1inh que es autosómico dominante.

El déficit de C2 es el más frecuente (si no consideramos el de C1inh).

El déficit de C3 es raro pero de los más graves, aumentando la susceptibilidad a infecciones por bacterias piógenas

Los defectos en las fases precoces son más graves que aquellos que afectan a las fases tardías, es decir en la fase de lisis. La patología de los defectos precoces será debida, fundamentalmente a la pérdida de las funciones de quimiotaxis y opsonización que serán las responsables de la aparición de infecciones por bacterias piógenas. También se producirá patología como consecuencia de los defectos en el aclaramiento de inmunocomplejos lo cual ocasionará el depósito de los mismos en diversos tejidos como riñón y articulaciones. El depósito de inmunocomplejos por déficits de complemento, da lugar a una patología similar al de algunas enfermedades autoinmunes sistémicas (como es el caso del lupus eritematoso

sistémico), denominadas enfermedades por depósito de Inmunocomplejos. En estas enfermedades autoinmunes sistémicas, la etiología es distinta al defecto en el sistema de complemento, siendo debida a la generación de anticuerpos contra antígenos propios, lo cual dará lugar a inmunocomplejos de tamaño pequeño que son difíciles de retirar por el sistema de complemento aunque éste sea funcional. De cualquier forma la similitud de las dos patologías es responsable de que se llame al síndrome por déficit de complemento síndrome "autoimmune like" o síndrome "lupus like" por su similitud con la enfermedad autoinmune por depósito de inmunocomplejos, lupus eritematoso sistémico.

Déficit de C1Inh Edema Angioneurotico Familiar. Es el déficit de complemento más frecuente en Europa.

Herencia: autosómica recesiva

Causa: Congénita: Tipo I (85%): Déficit de C1inh

Tipo II (15%): C1inh no funcional

Adquirida: Asociada a síndromes linfoproliferativos B

Autoinmunes como consecuencia de anticuerpos anti C1inh.

Clínica: Ataques agudos y recurrentes de edemas.

Patogenia: La activación incontrolada del complemento no produce lisis de células del huésped por cuanto C4b es inactivado en el plasma antes de que se forme la C3 convertasa.

Sin embargo se genera C2a que será hidrolizado dando lugar al **C2quinina**. Y por otra parte también se activa de forma no controlada la **bradiquinina** puesto que el C1inh en condiciones fisiológicas, también inhibe la calicreína, inhibiendo de este modo la vía de las quininas. Tanto C2quinina como bradiquinina, serán responsables del masivo edema que se produce en esta enfermedad.

Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. Debida a un déficit de una enzima que sirve para anclar a la membrana tanto a las proteínas reguladoras de complemento DAF y CD59, con lo que se produce un defecto de las dos y una lisis descontrolada sobre todo de hematíes, lo cual origina la hemoglobinuria. Los defectos que afectan solo a CD59 dan lugar a una patología parecida.

COMPLEMENTO Y AGENTES PATÓGENOS

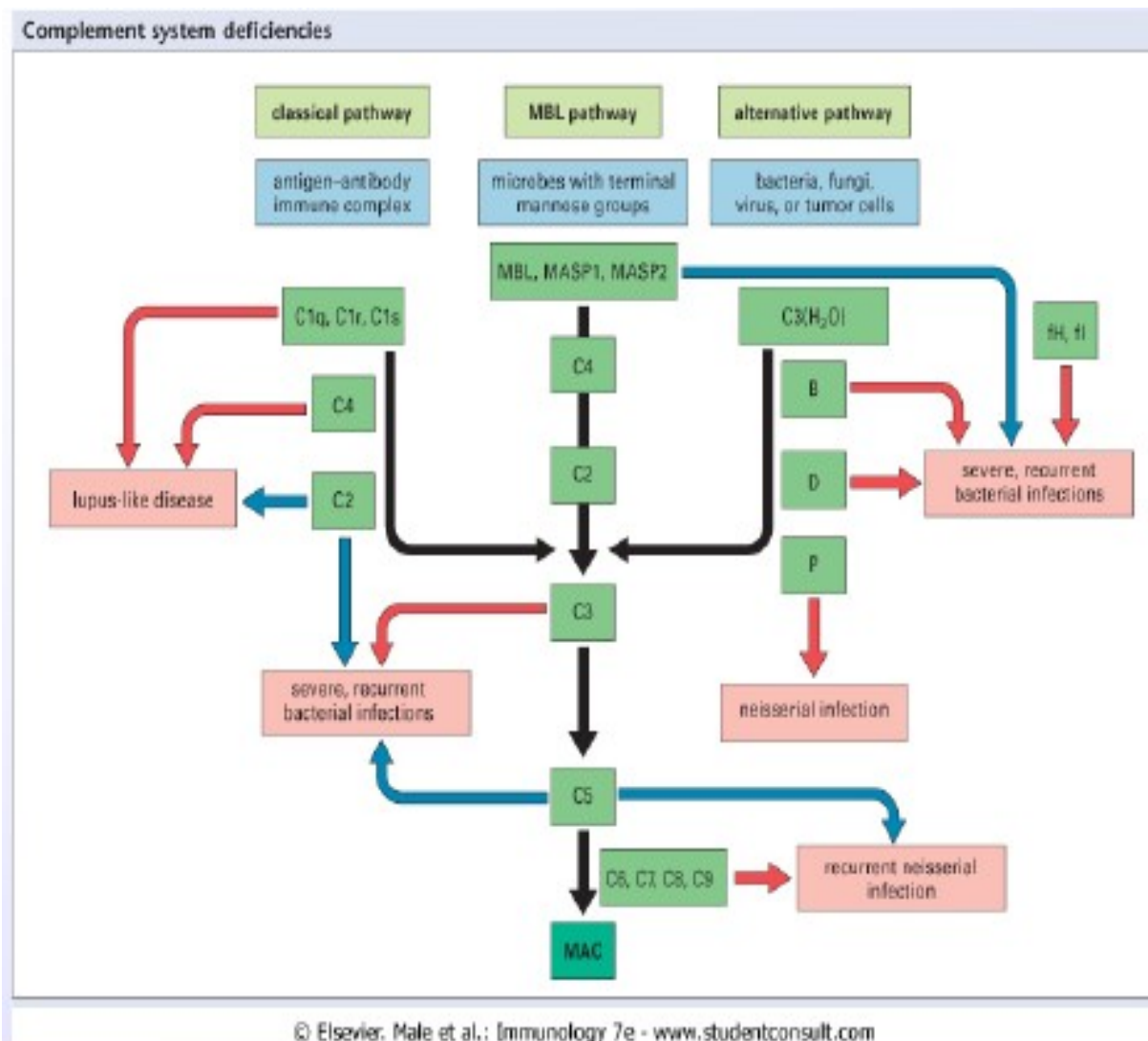
Complemento y Virus: Generalmente la activación se produce por la Vía Clásica.

- Partículas víricas libres

- Los virus recubiertos de membrana son normalmente lisados por el CAM.

- Los virus recubiertos de cápside son opsonizados y fagocitados.
- Células infectadas por virus. Pueden activar directamente el Complemento en ausencia de anticuerpos.

Complemento y Parásitos: Algunos parásitos son capaces de activar la vía Alternativa. En algunos casos el Complemento impide la diseminación de los parásitos (Entamoeba Histolytica), mientras que en otros facilita su entrada (Babesia y Leishmania), a través de receptores del Complemento.

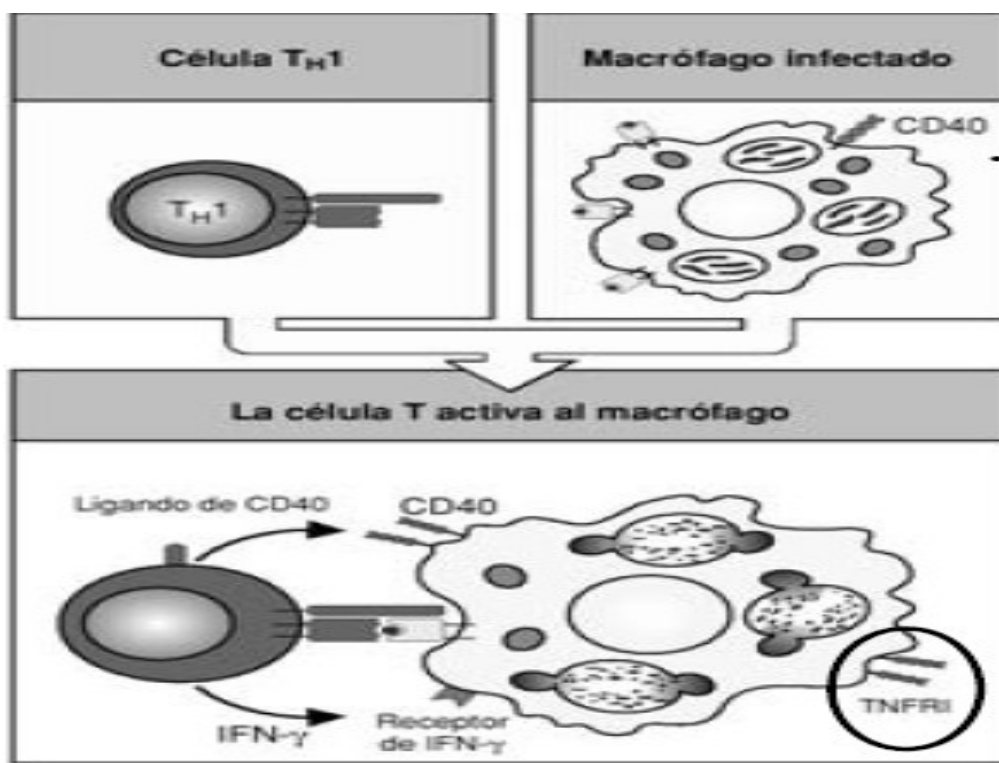


Tema 14. Mecanismos Efectores II. Respuesta inmunitaria mediada por células.

Mecanismos de defensa no dependientes de células T. Respuestas mediadas por células y dependientes de células T. Citotoxicidad mediada por células. Papel del macrófago en la respuesta inmunitaria. La red de citocinas.

La célula T que haya sobrevivido a su paso por el timo, es decir, aquellas que tengan receptores capaces de encajar con el MHC propio (por tanto habrán sido seleccionados positivamente) pero que no reconozcan antígenos propios (no han sido seleccionados negativamente) llegaran al ganglio linfático. Entrarán a través de las vénulas de epitelio cúbico (HEV) en la corteza del ganglio linfático. En la corteza del ganglio encontrarán muchas APCs (células presentadoras de antígenos) (macrófagos y células dendríticas). Aquellas que interaccionen con APCs que **no presenten su antígeno**, no se activaran pero recibirán señales que le permitirán sobrevivir, saliendo de nuevo del ganglio a través de los vasos linfáticos eferentes.

Aquellas que interaccionen con APCs que **presenten su antígeno**, se activaran y producirán suficiente IL2 para proliferar y diferenciarse en células T efectoras. Una vez activadas, también abandonaran el ganglio.



En ambos casos y antes de que se produzca la interacción del MHC de la célula presentadora con el TcR de la célula T, el linfocito T establecerá contacto con la APC, a través de **moléculas de adhesión** cuya misión será la de mantener en contacto al linfocito T y a la célula presentadora el tiempo suficiente para que el MHC de la célula presentadora y el TcR de la célula T, interaccionen (es decir que la APC presente antígenos al linfocito T), es decir para que se pueda producir la **interacción específica**. Si cuando se produce esta interacción el péptido presentado en el MHC es el que específicamente reconoce el TcR, se transmitirán señales a través de CD3 (encargado de transmitir las señales del TcR) lo cual provocará un cambio conformacional en las moléculas de adhesión que hará mas estable la interacción, manteniendo mas tiempo unidas a la APC y a la célula T que está reconociendo específicamente el Ag que la APC presenta. El reconocimiento por parte del TcR del MHC unido al antígeno específico, y la transmisión de señales estas señales a través de TcR, dará lugar también a la activación del linfocito T con la expresión de una serie de genes y la expresión en la superficie celular de una serie de moléculas de activación entre las que se

encuentra la cadena α del receptor de IL2 que al ensamblarse con las cadenas β y γ preexistentes conformara el receptor de alta afinidad para IL2 dejando al linfocito T preparado para responder a esta citoquina.

Sin embargo la señal específica a través del TcR (llamada primera señal), no es suficiente para que el linfocito T secrete suficiente cantidad de IL2 y por tanto para que proliferen, que necesita de otras señales denominadas **coestimuladoras**.

Las señales coestimuladoras son suministradas por las células presentadoras de antígenos llamadas profesionales que no solo expresan MHC-II sino también las llamadas moléculas coestimuladoras. En la actualidad se considera que las señales coestimuladoras más importantes son las suministradas por las moléculas B7-1 y B7-2 que estimulan el receptor CD28 del linfocito T. Estas señales coestimuladoras son tan importantes que en su ausencia, el linfocito T no producirá suficiente IL2 para su propia proliferación, con lo que este linfocito T que ha sido activado a través del TcR, que ha expresado el receptor de alta afinidad para IL2, pero que no recibe suficiente IL2, no solo no proliferará sino que no será capaz de proliferar nunca más, quedando en un estado de no respuesta denominado **anergia** (que como veremos en el tema 15, es uno de los mecanismos más importantes para evitar la respuestas inmune a antígenos propio por parte de clones de linfocitos T que reconozcan antígenos propios pero que no hayan sido seleccionados en el timo).

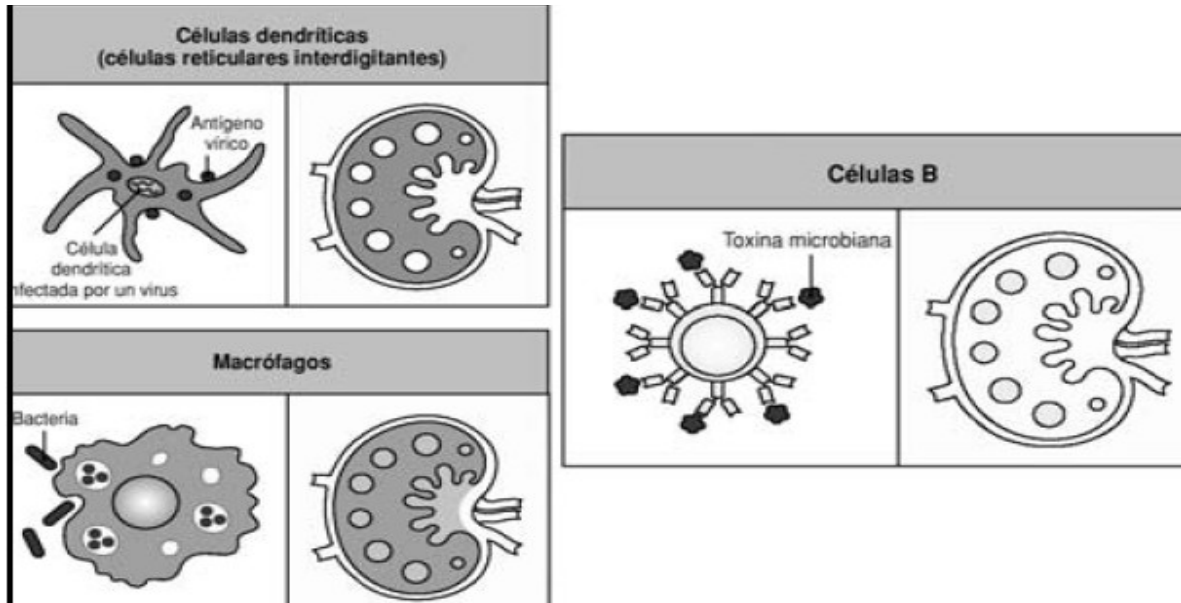
Las señales activadoras, sin embargo, tienen su mecanismo de retroalimentación para evitar que la proliferación continúe indefinidamente. La propia activación de la célula T dará lugar a la expresión de una molécula de superficie, **CTLA4**, que cuando es activada envía señales inhibitoras al interior de la célula. CTLA4 es estimulado también al interactuar con las moléculas B7-1 y B7-2, que como dijimos activan a CD28, sin embargo como la afinidad de B7 por CTLA4 es mucho mayor que por CD28, en el momento que se empieza a expresar CTLA4 en la superficie celular, la mayor parte de las moléculas B7 presentes en la APC, interactuarán con CTLA4 convirtiéndose en inhibitoras. La función de CTLA4 y su importancia, solo se puso de manifiesto recientemente al ver que ratones en los que se había destruido el gen que codifica para CTLA4, presentaban tumores debidos a la inexistencia de señales inhibitoras que limitaran la proliferación de los linfocitos T.

En el caso de los linfocitos CD8, la estimulación se produce como en el caso anterior, con la única diferencia de que necesitan aún mayor cantidad de moléculas coestimuladoras para ser capaces ellos mismos de secretar la suficiente cantidad de IL-2 para su crecimiento. Tal cantidad de moléculas coestimuladoras solo puede ser proporcionada por células dendríticas (que como dijimos son las APCs más potentes), en los demás casos necesitaran de la IL-2 producida por un linfocito CD4+ que este reconociendo el mismo antígeno al mismo tiempo. Esta ayuda la realiza el linfocito T CD4+ o colaborador de dos formas posibles que no son mutuamente excluyentes: bien proporcionando directamente la IL-2 que el CD8 necesita y/o induciendo en la APC la expresión de más moléculas coestimuladoras.

CELULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS

Como hemos visto, las células presentadoras de antígenos profesionales tienen una función crucial a la hora de regular la respuesta inmune dado que son las únicas que en condiciones fisiológicas expresan moléculas coestimuladoras tan necesarias para la estimulación de los linfocitos T. Tanto es así que incluso en las APCs profesionales, el momento en que estas moléculas se expresan esta estrechamente regulado.

Células Dendríticas: Son las células presentadoras de antígenos más potentes que se conocen. Procedentes de progenitores de médula ósea migran a los tejidos periféricos y órganos linfoides secundarios, inicialmente son fagocíticas y no expresan moléculas coestimuladoras. Una vez que han recogido antígenos en los tejidos periféricos, migran al ganglio linfático a través de los ganglios aferentes. En el ganglio ya expresan grandes cantidades de moléculas coestimuladoras pero ya han perdido su capacidad fagocítica. Como hemos dicho la capacidad de presentación de antígenos por parte de la célula dendrítica es muy grande, sin embargo los estímulos que inducen a la célula dendrítica a migrar solo se producen en el curso de una infección.



Las células de Langerhans, no son más que un subtipo de célula dendrítica y su evolución es similar al de otras células dendríticas con la única diferencia de que están especializadas en recoger antígenos de la piel.

En el caso de las **células B** y los **macrófagos**, tienen que ser inducidos a expresar moléculas coestimuladoras por constituyentes bacterianos. Gracias a este mecanismo, cuando están presentando antígenos propios, en ausencia de componentes bacterianos no serán capaces de expresar moléculas coestimuladoras y por tanto no inducirán proliferación de los linfocitos que reconozcan estos antígenos. Solo en el curso de una infección los componentes microbianos inducirán la expresión de moléculas coestimuladoras y ahora si estarán serán capaces de inducir la proliferación de los linfocitos T que reconozcan los antígenos que ellas presenten.

El hecho de que sea necesaria la presencia de componentes microbianos para inducir coestimulación en células B y macrófagos, explica la necesidad del uso de adyuvantes para las inmunizaciones. El llamado adyuvante completo de Freund, contiene micobacterias muertas que al ser administradas junto a la vacuna, hará que cuando sean fagocitadas por los macrófagos junto a la proteína induciendo coestimulación en los macrófagos y permitiendo así que estos estimulen a los linfocitos T (que a su vez estimularán la producción de anticuerpos por los linfocitos B).

En el primer contacto con el antígeno y sobre todo para antígenos solubles, los macrófagos y células dendríticas serán las células presentadoras más importantes, las células B para ese antígeno en particular presentes en muy pequeñas cantidades, no tendrán mucha importancia como APCs. Sin embargo en el curso de un subsiguiente encuentro con el antígeno, sobre todo si éste es soluble y dado que ya existen células B memoria para ese antígeno, estas serán mucho más importantes como células presentadoras de antígenos.

**RESPUESTA MEDIADA POR CELULAS Y DEPENDIENTE DE LINFOCITOS T.
MECANISMOS EFECTORES DEPENDIENTES DE LINFOCITOS T**

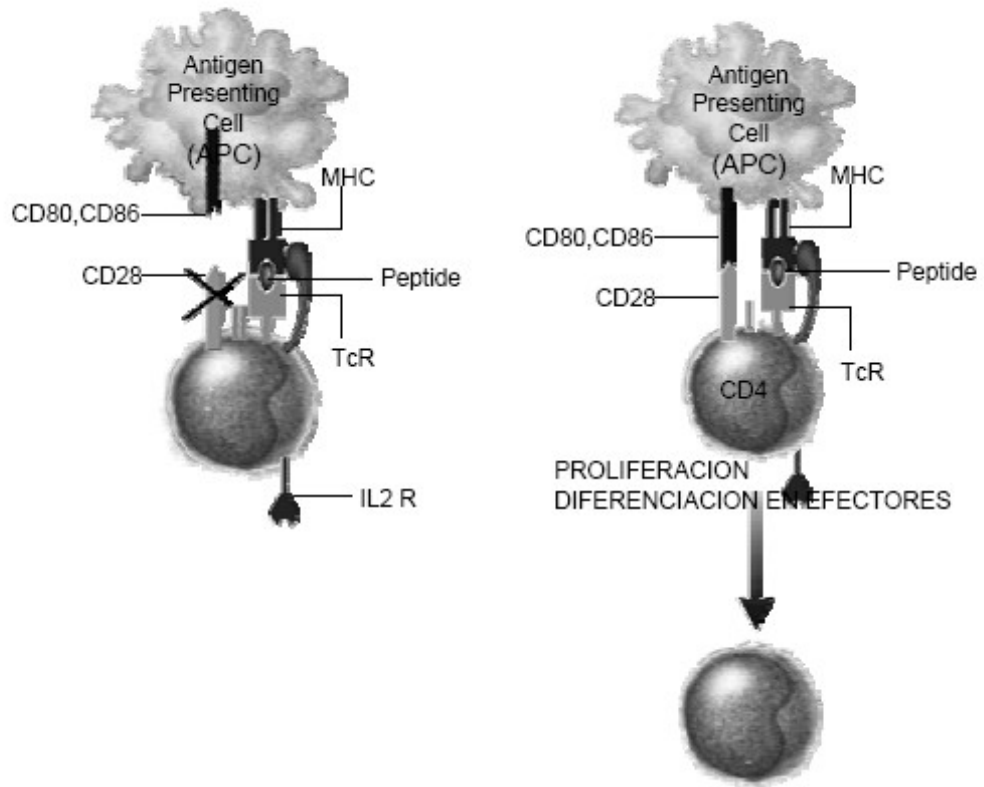
Una vez que el linfocito T ha reconocido el antígeno, por supuesto en el contexto de MHC y en presencia de moléculas coestimuladoras suficientes para que produzca la IL-2 necesaria, la IL-2 producida, actuará sobre el receptor de alta afinidad para la IL-2 que el linfocito T ya expresaba dando lugar a su proliferación. Las células hijas serán iguales a aquellas que les han dado origen en su TcR, es decir reconocerán exactamente el mismo antígeno, razón por la que la llamamos clónicas, sin embargo algunas de ellas se diferenciarán a células efectoras.

· **LINFOCITOS CD4+**

En el caso de los linfocitos CD4, la diferenciación podrá ser a Th1 o a Th2 que a su vez activarán la inmunidad celular o humoral respectivamente.

SUBCLASE	INTERLEUQUINAS	EFEECTO
Th1	IL2	Estimula la respuesta celular
	IFN γ	(células T citotóxicas, NK, macrófagos) inhibe por tanto la acción de la IL y de IFN γ
Th2	IL4	Estimulan linfocito B, mastocitos y eosinófilos
	IL5	
	IL10	IL10 inhibe la respuesta celular

CD4



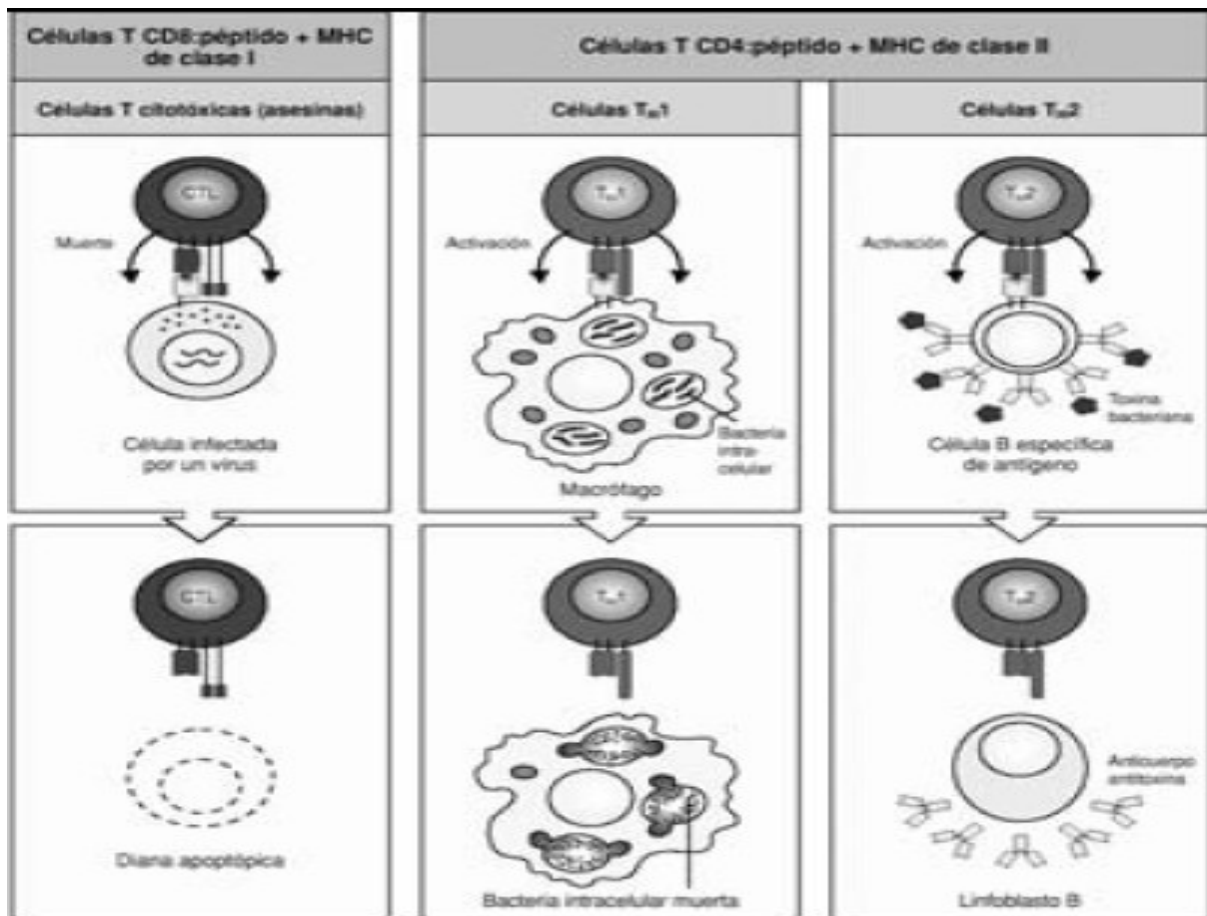
Los mecanismos por los que se produce la ayuda del linfocito Th2 al linfocito B para la producción de anticuerpos, ya fueron estudiados en detalle en el tema 10, así que aquí destacaremos sobre todo en la siguiente tabla los distintos mecanismos de actuación de los efectores Th1:

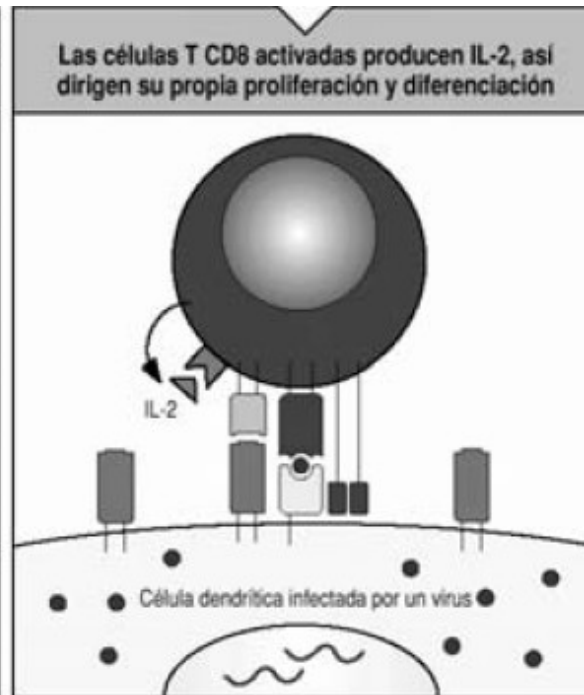
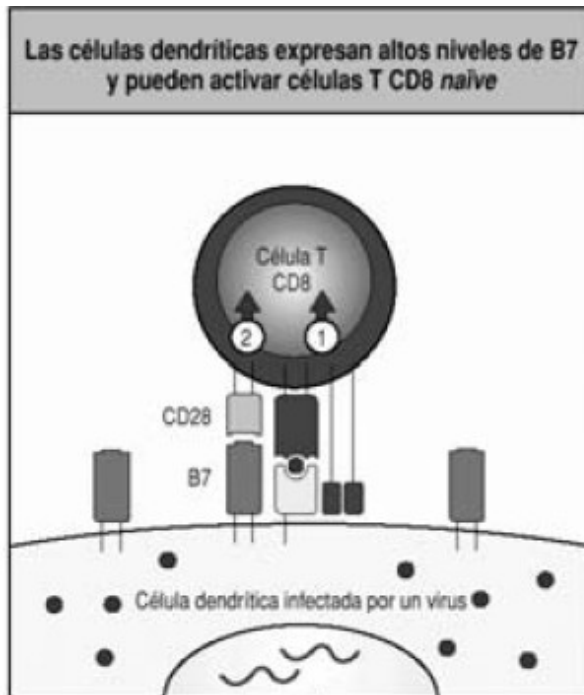
IFN- γ y ligando de CD40	Ligando de Fas o TNF- β	IL-2	IL-3 + GM-CSF	LT + TNF- α	MCF
Activa macrófagos para destruir bacterias capturadas	Mata células crónicamente infectadas, de este modo libera las bacterias para que sean	Induce proliferación de células T, así aumenta el número de	Induce diferenciación de macrófagos en la médula ósea	Activa el endotelio para que induzca unión de macrófagos y salida del	Produce acumulación de macrófagos en el sitio de infección

	destruidas por macrófagos frescos	células efectoras		vaso sanguíneo al sitio de infección	
--	-----------------------------------	-------------------	--	--------------------------------------	--

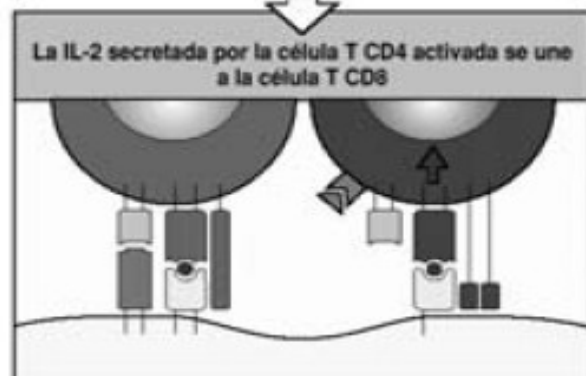
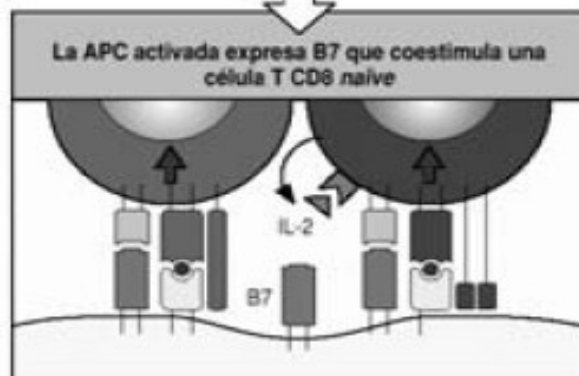
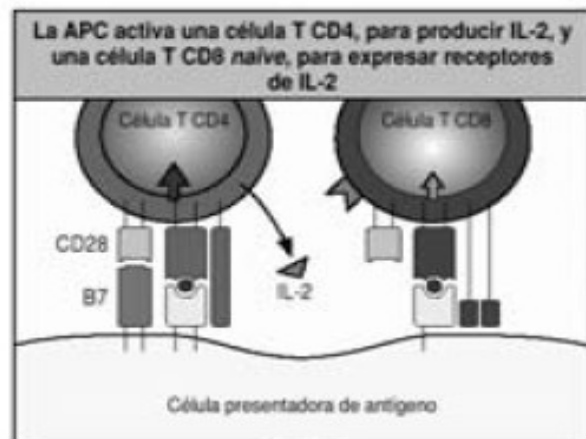
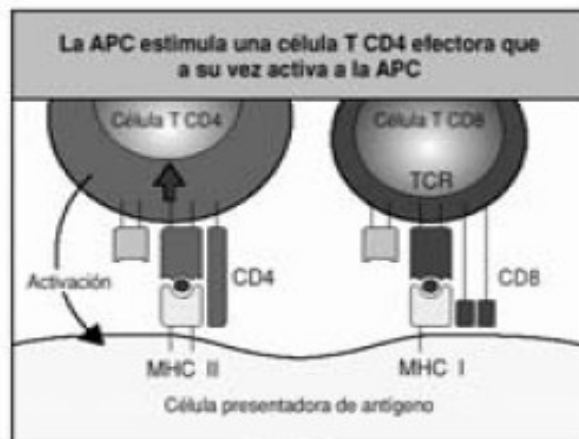
LINFOCITOS CD8+

En el caso del linfocito T CD8+, la diferenciación será, en la mayoría de los casos a células citotóxicas, que como hemos dicho tendrán la misma especificidad que la célula que le dio origen pero en este caso cuando reconozca su antígeno presentado en el MHC-I de una célula la lizará. Una vez diferenciados ya no necesitaran de coestimulación, con lo que serán capaces de lisar cualquier célula que le este presentando su antígeno en el contexto de MHC-I, por Ej. cualquier célula infectada por virus.





CD8 (Ayuda Th1)



CITOTOXICIDAD MEDIADA POR LINFOCITOS

MECANISMO DE LISIS POR LINFOCITOS Se produce en las siguientes fases:

1.- El primer paso de la lisis es la unión de la célula citotóxica a la célula que va a ser lisada (que denominamos **diana**), a través del TcR (en el caso del linfocito CD8, la lisis mediante NK es similar aunque en este caso intervienen otros receptores). Esta interacción da lugar a una polarización del linfocito hacia la célula diana de modo que todas sus gránulos se orientan hacia ella para realizar una lisis exclusivamente de la célula que le está presentando antígenos extraños.

2.- Liberación del contenido de las vesículas. Las vesículas contienen **perforina** que en presencia de Ca^{2+} y gracias a una **serín esterasa** también contenida en las vesículas, polimeriza y forma canales en la membrana de la célula diana. A través de estos canales la célula citotóxica introduce moléculas (fundamentalmente **granzimas**) en el interior de la célula diana que fragmentarán el DNA de la misma dando lugar a su muerte por apoptosis. Los restos (**cuerpos apoptóticos**) serán luego fagocitados sin llegar a producir fenómenos inflamatorios. Existen otros mecanismo no dependientes de perforina que pueden producir la lisis de la célula diana pero con menor eficiencia.

Las vesículas también contienen TNF α , TNF β (linfotóxina) y en el caso de las NK, factor citotóxico NK, que también puede producir apoptosis al estimular receptores en la membrana de la célula diana, sin necesidad por tanto de perforar su membrana. Otro mecanismo de muerte está mediado por una molécula expresada en la superficie del linfocito denominada FasL, esta molécula también puede inducir apoptosis en las células que expresen Fas. Todos estos receptores de la célula diana tienen en común secuencias en sus dominios citoplasmáticos que se han dado en llamar "dominios de muerte".

LINFOCITOS T

El linfocito T citotóxico, lizará específicamente las células que le presenten (mediante la molécula MHC-I o CD8+), el péptido para el que su TcR es específico (recordamos que el MHC de la APC y Linfocito T, tiene que ser de la misma especificidad -restricción por MHC-). Es el mecanismo más importante para lizar células infectadas por virus, por ello en la mayoría de los casos suelen ser antígenos intracelulares, presentados por lo tanto por MHC-I. La mayoría de los linfocitos citotóxicos son CD8+ (aunque hay algunos CD4+).

CELULAS NK (no expresan TcR, es similar a decir "no reordenan los genes de TcR")

Lisan las células que no presentan MHC o aquellas que presentan una especificidad de MHC-I muy distinta a la suya.

Las células que sí expresan MHC de su misma especificidad activan receptores inhibidores en la superficie de la célula NK evitando así ser lisadas por las células NK. Algunos de estos receptores inhibidores en la superficie de la célula NK pertenecen a la familia Ly-49).

Cualquier fenómeno que **active los linfocitos** dará lugar a un incremento en su capacidad de lisis.

LINFOCITOS T

Podemos activar los linfocitos in vitro con mitógenos como PHA o anticuerpos mitogénicos frente a CD3, CD2, etc.

CELULAS NK

Podemos activar la célula NK in vitro con anticuerpos anti-CD2, anti-CD16 y también con mitógenos como PHA (por tanto si tratamos in vitro una población celular de sangre periférica con PHA, tendremos actividad citotóxica debida tanto a linfocitos T como a NK).

Fisiológicamente, in vivo se activan al unirse complejos antígeno/anticuerpo a sus receptores Fc, fenómeno conocido como ADCC o actividad **Killer** (**Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity**). También se activan con altas concentraciones de IL2 fenómeno LAK (**Lymphokine Activated Killing**) Importante en el **GVHD** (graft versus host disease).

CITOTOXICIDAD MEDIADA POR CELULAS MIELOIDES

Los macrófagos a parte de fagocitar y lisar el material fagocitado, también pueden lisar células no fagocitadas (citotoxicidad). En la mayoría de los casos la citotoxicidad por parte de los macrófagos, está mediada por TNF α . También pueden liberar reactivos de oxígeno y nitrógeno que intervienen en la destrucción de los patógenos fagocitados.

Los macrófagos y también granulocitos pueden **lisar parásitos** y células tumorales recubiertas de anticuerpos. En estos casos los anticuerpos suelen ser de tipo IgE. La IgE unida a antígenos, en primer lugar activaría los mastocitos (que tienen receptores Fc de alta afinidad), los mastocitos liberarían gránulos conteniendo factor quimiotáctico de eosinófilos que se verían atraídos al foco. Una vez allí, se unirían a la célula diana recubierta también de IgE a través de los receptores Fc del eosinófilo (recordáis que eran de baja afinidad) dando lugar a la liberación de agentes citotóxicos y a la destrucción de la célula diana.

OTRAS FUNCIONES DE LOS MACROFAGOS

A parte de la citolisis, los macrófagos tienen también funciones de:

- Protector de acción rápida como parte de la inmunidad innata, al fagocitar patógenos.
- Procesamiento y presentación de antígenos.
- Célula antiinflamatoria antitumoral y antimicrobiana.

REGULACION DE LOS MACROFAGOS

Los macrófagos constituyen una población celular **heterogénea**, difieren en expresión de clase II, receptores para Fc, receptores para citoquinas (y por tanto respuesta a las mismas)

- Los macrófagos son **activados** por:
 - o **Citoquinas**, especialmente IFN γ . La secuencia de aparición de estas citoquinas es importante para el efecto estimulador, así mismo la función de los macrófagos que se estimule, dependerá de la proporción de las distintas citoquinas presentes. La activación del macrófago por citoquinas, **no es específica** del organismo que ocasiono la producción de citoquinas por los linfocitos T.
 - o **Endotoxinas** bacterianas y mediadores **inflamatorios**.
- Los macrófagos son **desactivados**:

Prostaglandina E, glucocorticoides, MDF (macrophage deactivating factor), IL4, CGRP (calcitonin gene related peptide), TGF β .

- Acción **reguladora** de los macrófagos:

Los macrófagos activados por IFN γ expresan 1-hidroxilasa lo cual les permite producir 1,25 hidroxicolecalciferol (Tb. llamada Vitamina D₃ o calciferol). Este producto activa a los macrófagos y ejerce una acción de retroalimentación negativa al inhibir la diferenciación a Th1. Este fenómeno es muy importante en situaciones en que no se puede eliminar el parásito y la respuesta celular se cronifica para intentar parar la respuesta celular potenciando la diferenciación de los Th a Th2 en vez de Th1 con el consiguiente cambio a mecanismo efector humoral. Esta Vitamina D producida por los macrófagos puede llegar a tener efectos sistémicos como la hipercalcemia que se puede observar en la tuberculosis y en la sarcoidosis.

Formación de **Granulomas**: Cuando la respuesta celular no consigue eliminar el agente que la inició, se forman granulomas. Esto ocurre en los siguientes casos:

- Infecciones por organismos intracelulares (M tuberculosis, M leprae, Leishmania, Listeria)
- Infecciones por organismos persistentes y de gran tamaño (huevos de esquistosomas)
- Casos en los que no pueda destruirse el antígeno debido a sus especiales características, como en el caso de sustancias metálicas (granuloma de cuerpo extraño)

- En otros casos no puede destruirse el antígeno porque existe un defecto en la capacidad bactericida del macrófago (E. Enfermedad Granulomatosa Crónica)

En todos estos casos existe un cuerpo central de macrófagos infectados, que puede incluir células epitelioides (macrófagos gigantes) y células gigantes multinucleadas (macrófagos fusionados). Este cuerpo central está rodeado por células T. Sobre todo Th1, que siguen produciendo citoquinas y atrayendo a más linfocitos T citotóxicos y macrófagos.

INMUNOPATOLOGIA DEBIDAS A INMUNIDAD CELULAR

CITOTOXICIDAD Destrucción de células del huésped. Este daño tisular que no es producido directamente por el agente infeccioso sino por las células inmunes del huésped se denomina **lesión tisular de origen inmunopatológico**.

INFLAMACION CRONICA La activación de células inmunológicas y las sustancias por ellas producidas pueden producir una situación de inflamación crónica que daña los tejidos (Enfermedad De Crohn, sarcoidosis, psoriasis, esclerosis múltiple, diabetes tipo I).

LESIONES OCUPANTES DE ESPACIO Los granulomas pueden provocar compresiones de tejidos circundantes (Ej. Daño de los nervios por granulomas provocados por *M leprae*).

SECRECION EXCESIVA DE CITOQUINAS La secreción excesiva de algunas citoquinas como TNF α , puede dar lugar a efectos sistémicos como Síndrome de shock tóxico, necrosis hemorrágica, reacción de Schwartzman, fenómeno de Koch.

SEÑALES INTRACELULARES EN LOS LINFOCITOS T

Las señales que las células reciben del medio exterior a través de sus receptores de superficie son integradas y enviadas al interior de la célula con el efecto final de la activación de una serie de genes y la inhibición de otros. Estas señales se transmiten gracias a la interacción de distintas moléculas denominadas segundos mensajeros que encajan unas con otras como piezas de un rompecabezas y que ocasionan en la molécula siguientes cambios conformacionales o cambios en su estado de fosforilación lo cual hace que sea capaz de actuar sobre la molécula siguiente. Por esta razón se han llamado **vías de estimulación**.

La interacción del TcR con el MHC que presente su péptido específico, da lugar a la activación de tirosina kinasas que fosforila los tallos citosólicos de las cadenas que forman el complejo CD3 (una serie de moléculas adosadas al TcR encargadas de enviar señales al interior). Concretamente se fosforilan unos aminoácidos situados en las regiones citosólicas de las cadenas que componen CD3 denominadas ITAMS (**I**mmunoreceptor **T**yrosin-**B**ased **A**ctivation **M**otif). Una vez fosforilados los ITAMs, pueden unirse a otra kinasa, ZAP-70. ZAP-70 solo resulta activada si también la molécula CD4 o CD8 también interacciona con el MHC I o II, (si bien con una zona no polimórfica), de modo que la kinasas asociadas a CD4 o CD8 fosforila a ZAP-70 y la activa. ZAP-70 activada activa por un lado GEF (que a su vez

activa la vía de las **MAP kinasas**) y la Fosfolipasa C (PLC- γ) que a partir de los fosfolípidos de membrana da lugar a Diacilglicerol (DAG) e Inositol Fosfato (IP_3).

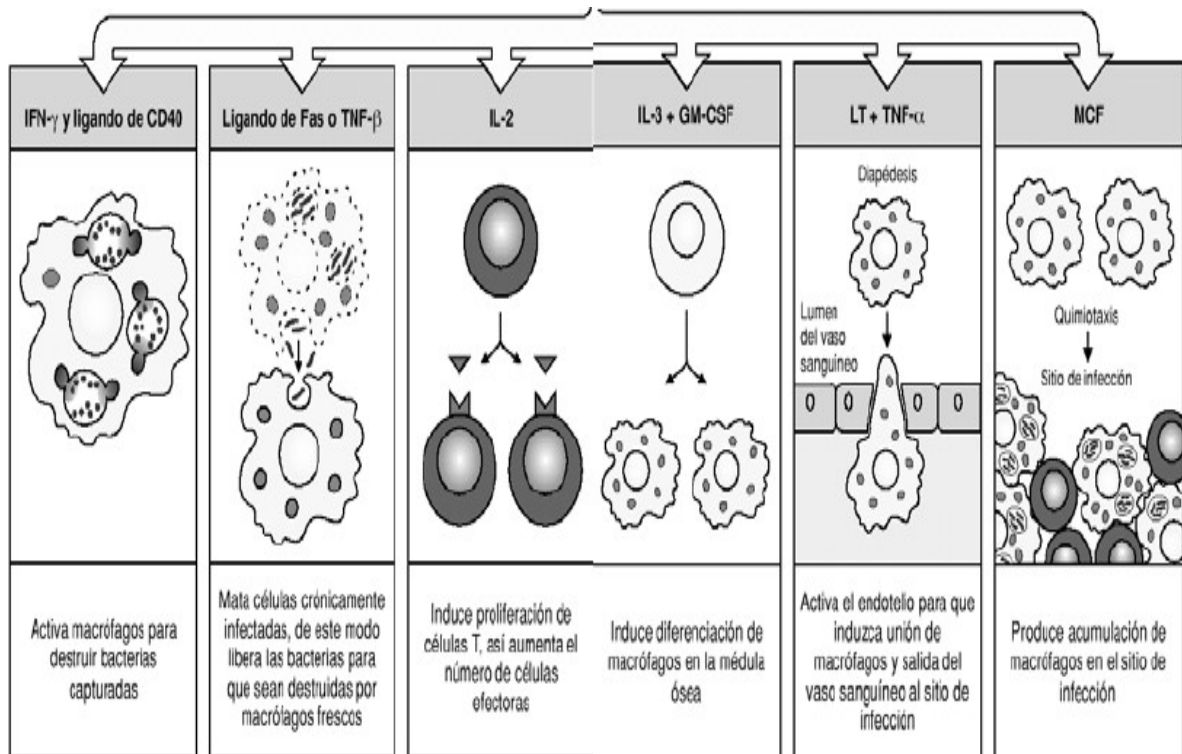
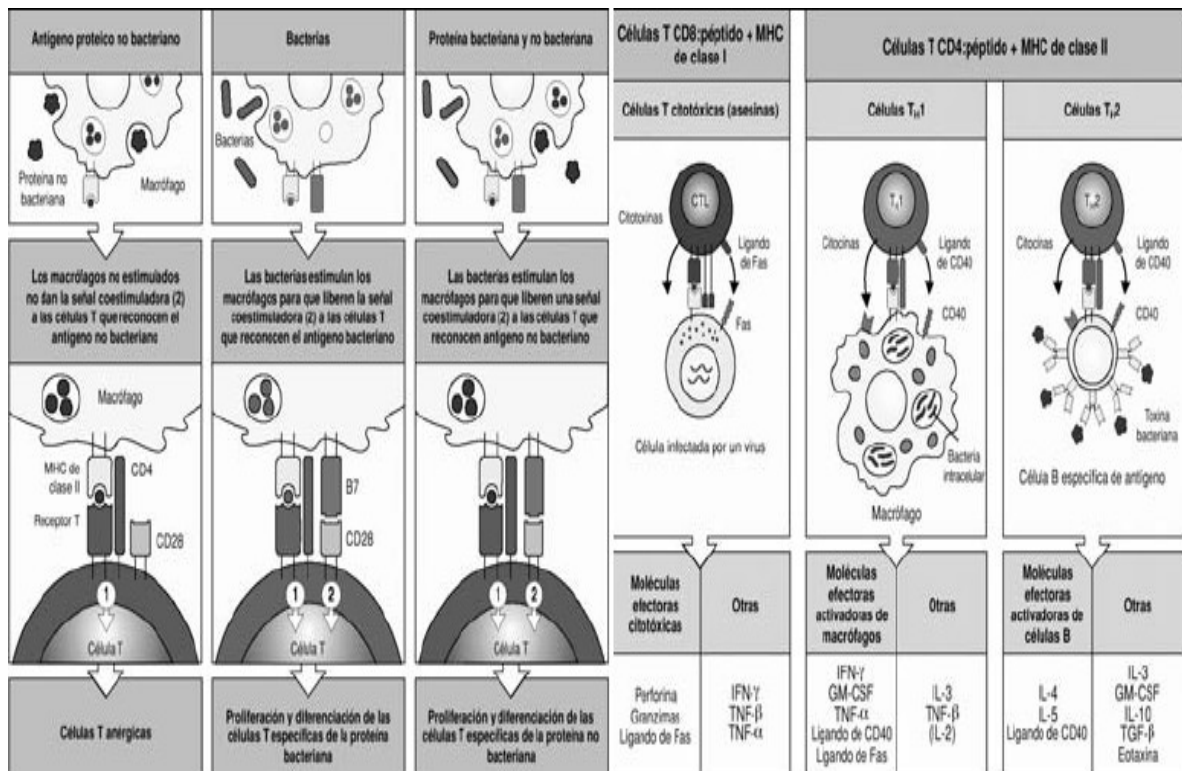
- El DAG activa a la proteína Kinasa C que a su vez activa el factor de transcripción NFKB.
- El IP_3 da lugar a la apertura de los canales de calcio con la consiguiente entrada de grandes cantidades de calcio. El calcio activa a la fosfatasa calcineurina que a su vez defosforila a otro factor de transcripción, NFAT. La importancia de la fosfatasa calcineurina se pone de manifiesto por cuanto los potentes inmunosupresores Ciclosporina A y FK506, actúan inhibiendo a esta enzima impidiendo por tanto la activación del factor de transcripción NFAT con lo que el linfocito no será capaz de producir suficiente IL-2 para proliferar. Produciéndose una importante inmunosupresión que se utiliza para evitar el rechazo de los órganos transplantados y también en algunos casos para tratar enfermedades autoinmunes muy graves.

Existen varias vías dependientes de MAP kinasas, unas activadas como hemos dicho a través de la activación del TcR, pero otras activadas por la activación de CD28 que a su vez son activadas por las moléculas coestimuladoras de las células presentadoras de Antígenos. Cada vía activa a un factor de transcripción determinado, de modo que la activación del linfocito en presencia o ausencia de señales coestimuladoras, tendrá una correlación con el tipo de factores de transcripción que resulten activados y de ello a su vez dependerá el tipo de genes que se activen, con consecuencias tan dispares como la proliferación o la anergia.

La transmisión de señales en las células NK será muy similar a la que hemos descrito para los linfocitos T, si bien la estimulación inicial será debida a receptores distintos al TcR.

Existen también receptores que transmiten señales inhibitoras, como es el caso de CTLA4 en linfocitos T o los KIR de las NK. Esos receptores tienen en sus tallos citoplásmicos secuencias denominadas **ITIMs** (Immunoreceptor Tyrosin based Inhibitory Motifs). Esos tallos citoplásmicos encargados de transmitir señales son los que se encargan de ensamblarse con segundos mensajeros que en este caso serán inhibidores y darán lugar al bloqueo en la activación de algunos de los factores de transcripción mencionados o bien a la activación de factores que inhiban la transcripción. De hecho si construimos por ingeniería genética una quimera con el tallo citoplásmico de un receptor y el extracelular de otro, podemos cambiar el sentido que tiene la unión con el ligando que será del signo del tallo citoplásmico.

También los receptores que inducen a la muerte celular por apoptosis, como es el caso de Fas o el receptor para TNF α , tienen una forma específica de transmitir señales al interior de la célula. Los tallos citosólicos de estos receptores son similares entre ellos y se han dado en llamar dominios de muerte. Cuando el ligando que suele ser un trímero se une al receptor, lo que hace es traer juntos tres receptores y por tanto tres de esos dominios de muerte. Estos dominios de muerte, ahora serán capaces de interactuar con otros segundos mensajeros, que en este caso también tienen dominios de muerte. Toda esta vía tendrá como consecuencia final la activación de caspasas, que activaran a una DNAsa, que a su vez fragmentara el DNA de la célula que por tanto morirá.



Tema 15. CITOKINAS.

Nomenclatura. Actividad de las distintas citokinas. Organización molecular y regulación genética de las citokinas. Receptores de citoquinas. Distribución celular de los receptores. Regulación de su expresión en la superficie celular. Señales bioquímicas de los receptores de citokinas.

Nomenclatura

Las citoquinas son mediadores que sirven para transmitir señales entre células. Regulan muchos procesos biológicos (crecimiento celular, activación, inflamación, inmunidad, reparación tisular, fibrosis, morfogénesis). A aquellas producidas por los linfocitos se les llaman **linfoquinas**.

Inicialmente recibieron el nombre de **Interleuquinas** puesto que muchas de ellas eran producidas por leucocitos, con efecto sobre leucocitos. En la actualidad se sabe que gran cantidad de citoquinas están producidas por células no leucocitarias y tienen efectos también sobre células no leucocitarias.

Los **interferones** son proteínas con actividad antivírica.

Citocina	Fuente de células T	Efectos en					Efecto del KO del gen
		Células B	Células T	Macrófagos	Células hematopoyéticas	Otras células somáticas	
Interleucina-2 (IL-2)	T _H 0, T _H 1, algunas CTL	Estimula el crecimiento y la síntesis de cadena J	Crecimiento	–	Estimula el crecimiento de células NK	–	↓ Respuesta T, IBD
Interferón-γ (IFN-γ)	T _H 1, CTL	Diferenciación, síntesis de IgG2a	Inhibe el crecimiento de T _H 2	Activación, ↑ MHC de clase I y clase II	Activa células NK	Antivírico, ↑ MHC de clase I y clase II	Susceptible a micobacteria
Linfotoxina (LT, TNF-β)	T _H 1, algunas CTL	Inhibe	Mata	Activa, induce producción de NO	Activa neutrófilos	Mata fibroblastos y células tumorales	Ausencia de ganglios linfáticos. Bazo desorganizado
Interleucina-4 (IL-4)	T _H 2	Activación, crecimiento, IgG1, IgE, ↑ inducción de MHC de clase II	Crecimiento, supervivencia	Inhibe la activación de macrófagos	↑ Crecimiento de mastocitos	–	No aparecen células T _H 2
Interleucina-5 (IL-5)	T _H 2	Diferenciación, síntesis de IgA	–	–	↑ Crecimiento y diferenciación de eosinófilos	–	–
Interleucina-10 (IL-10)	T _H 2	↑ MHC de clase II	Inhibe T _H 1	Inhibe la liberación de citocinas	Coestimula el crecimiento de mastocitos	–	IBD

Algunas citoquinas pertenecen a la misma familia estructural (IL1 a y b), (TNF a y b), (EGF y TGF) las 20 proteínas pertenecientes a la familia de IFN α . Sin embargo las distintas familias no están relacionadas estructuralmente entre si.

Citocina	Fuente de células T	Efectos en					Efecto del KO del gen
		Células B	Células T	Macrófagos	Células hematopoyéticas	Otras células somáticas	
Interleucina-3 (IL-3)	T _H 1, T _H 2, algunas CTL	-	-	-	Factor de crecimiento de células hematopoyéticas (multi-CSF)	-	-
Factores de necrosis tumoral- α (TNF- α)	T _H 1, algunas T _H 2, algunas CTL	-	-	Activa, induce producción de NO	-	Activa el endotelio microvascular	Resistencia a sepsis gramnegativa
Factor estimulador de colonias granulocito/macrófago (GM-CSF)	T _H 1, algunas T _H 2, algunas CTL	Diferenciación	Inhibe el crecimiento	Activación. Diferenciación a células dendríticas	↑ Producción de granulocitos y macrófagos (mielopoiesis) y células dendríticas	-	-
Factor de crecimiento transformante- β (TGF- β)	Células T CD4	Inhibe el crecimiento, factor de cambio a IgA	-	Inhibe la activación	Activa los neutrófilos	Inhibe/estimula el crecimiento celular	Muerte a las ~10 semanas

Cuando se describieron recibieron nombres según la función que desempeñaban. Dado que muchas de estas citoquinas tienen funciones muy distintas, la misma proteína recibía nombres distintos en los distintos laboratorios según la función que se descubriera en cada caso. El factor de necrosis tumoral **TNF α** -tumoral growth factor- produce la necrosis de tumores a lo que debe su nombre, pero también produce caquexia, con lo que se le llamo caquectina en otro laboratorio. A la **IL1** se le llamo inicialmente pirógeno endógeno (porque daba lugar a fiebre), factor activador de linfocitos y catabolín.

La utilización de técnicas de Biología Molecular, permitió clonar las distintas citoquinas. De modo que en la actualidad solo se admite una nueva citoquina si disponemos de su cDNA clonado. De este modo cada citoquina clonada recibirá un número con independencia del número de funciones distintas que puedan desempeñar. El disponer del cDNA de cada citoquina y nos permitirá poder producirlas de forma recombinante con lo que podremos disponer de proteína pura para analizar su función. Al disponer del gen, también podemos "construir" animales transgénicos que expresaran la citoquina en los tejidos que nosotros decidamos según el promotor que utilizemos y así estudiar la función en los distintos tejidos. También podremos construir ratones que carezcan de citoquina funcional destruyendo el gen mediante técnicas de KO para conocer que defectos se deben al déficit de una citoquina determinada.

De cualquier forma el estudio de la función de las citoquinas es complejo por cuanto las citoquinas no actúan de forma independiente in vivo, y una determinada citoquina a diferentes concentraciones, puede tener efectos distintos e incluso contrapuestos.

ACTIVIDAD DE LAS DISTINTAS CITOQUINAS

IFN γ : Sintetizado por linfocitos T activados y NK. Aumenta la actividad de las CPA y favorece la diferenciación a Th1.

IFN α y **β** : Sintetizado por leucocitos y fibroblastos respectivamente, en respuesta a virus o AND. Se han utilizado como anticancerígenos por su inhibición en el crecimiento celular. El IFN α se ha utilizado en enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, por su efecto anti-IFN γ .

IL1 Estimula células T y B

Inflamación (producción de prostaglandinas, enzimas catabólicas)

Efecto a nivel de Sistema Nervioso Central: fiebre incrementa la producción de corticosteroides

Hígado: Induce producción de proteínas de fase aguda.

IL2 Producida sobre todo por las células T CD4+ (las CD8+ también producen en menor cantidad)

Es el factor de crecimiento más importante de las células T. También actúa como factor de crecimiento y diferenciación de células NK y Linfocitos B.

Activa macrófagos y oligodendrocitos

Se ha utilizado en el tto de algunos cánceres y de algunas inmunodeficiencias.

IL3 Factor hematopoyético

También actúa sobre la población CD4-CD8- de linfocitos T

IL4 Sobre **Linfocitos B**: Principal factor de activación y diferenciación de. Colabora en la inducción de cambio de isotipo de Inmunoglobulinas (a IgE e IgG).

Sobre **Linfocitos T**: Factor de crecimiento y diferenciación, promueve diferenciación hacia Th2

En **Macrófagos** induce expresión de clase II pero inhibe citoquinas inflamatorias IL1 y TNF α

Su hiperproducción está relacionada con fenómenos **alérgicos**

IL5 Factor de crecimiento y diferenciación de **Eosinófilos**. Causante de la **eosinofilia** en las enfermedades parasitarias

IL6 Factor de diferenciación de células B.

Estimula la producción de proteínas de fase aguda a nivel hepático.

Actúa sobre otros tipos celulares.

IL7 Se sintetiza en el estroma de la médula ósea donde actúa activando las células pre-B

También se sintetiza en el timo donde actúa sobre los timocitos.

Es también factor de crecimiento de Linfocitos T y macrófagos

IL8 Producidas por la mayoría de las células del organismo. Relacionadas con la inflamación y la migración celular.

Pertenece a una familia de proteínas de bajo peso molecular con actividad quimiotáctica a la que este grupo debe su nombre: **chemoquina** (de **Chemotactic Cytokine**). Recientemente han cobrado gran importancia por cuanto algunos receptores de chemoquinas son imprescindibles como correceptores para la infección de las células por el virus HIC. Explicando la resistencia de algunos individuos que poseen mutaciones en estos receptores a la infección por algunas cepas de HIV.

Otra chemoquina, **RANTES**, es quimiotáctica para linfocitos T memoria y monocitos.

IL10 Inhibe la expresión de células coestimuladoras (CD80, CD86) por parte de las CPA inhibiendo por tanto la presentación de antígenos.

Inhibe la producción de IFN γ , IL1, IL6 y TNF α

Favorece la activación de la célula B

IL12 Favorece la diferenciación a Th1

Activa macrófagos y células NK

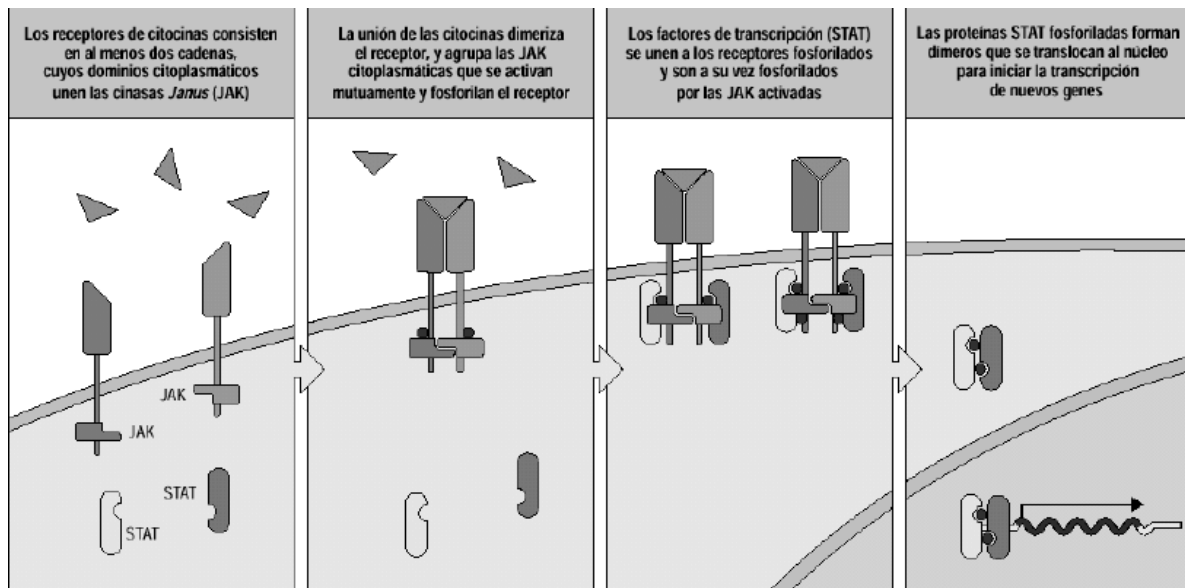
Induce producción de IFN γ .

IL13 Proliferación de células B.

TGFb Transforming Growth Factor b. Inhibe prácticamente todas las funciones inmunitarias y hematopoyéticas.

Estimula el crecimiento del tejido conectivo y la formación de colágeno.

RECEPTORES DE CITOQUINAS



Pertencen a diferentes familias de proteínas no necesariamente relacionadas entre si. Existen tres familias de receptores de citocinas, de modo que los receptores pertenecientes a una misma familia son similares estructuralmente:

- Familia del receptor de eritropoyetina: Receptores para IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL9, IL13, IL15, GM-CSF y cadenas β y γ del receptor para IL2,
- Familia del Receptor de TNF: Receptores I y II para TNF, CD40, Fas, CD30, CD27, receptor para factor de crecimiento nervioso.
- Familia del Receptor de quimiocinas: CCR1-5, CXR1-4

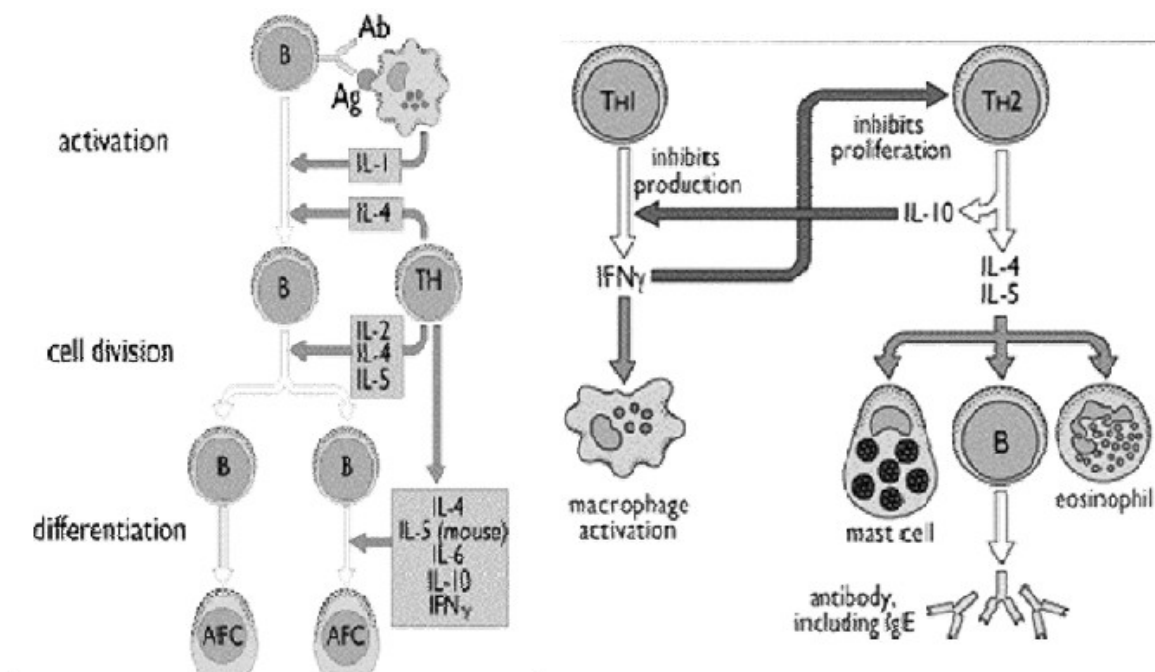
<p>Familia del receptor de hematopoyetina</p>		<p>Cadenas β y γ del receptor de IL-2, receptores de IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 y GM-CSF, receptores de eritropoyetina y de hormona del crecimiento</p>
<p>Familia del receptor de TNF</p>		<p>Receptores I y II del factor de necrosis tumoral (TNF), CD40, Fas (Apo 1), CD30, CD27, receptor del factor de crecimiento del nervio</p>
<p>Familia de receptores de quimiocinas</p>		<p>CCR1-5, CXCR1-4</p>

Muchos de ellos poseen **varias cadenas**, están formados por varias proteínas procedentes por tanto de genes distintos.

Algunas de estas **cadena** forman parte de **receptores distintos**. Una de las cadenas de IL3, GM-CSF e IL5 es igual en todas ellas. La cadena g del receptor de la IL2 también esta presente en IL4, IL7, IL9 e IL5.

Las distintas cadenas **se expresan de forma desigual** en las distintas células. Las cadenas b y g del receptor de la IL2 se expresa de forma constitutiva en muchas células, constituyendo el receptor de baja afinidad, mientras la cadena a solo se expresa en algunos linfocitos activados (las células NK no pueden expresarla), constituyendo al unirse a las cadenas b y g el receptor de alta afinidad.

En cualquier caso los receptores de Interleuquinas son receptores de **alta afinidad** ya que son capaces de detectar concentraciones relativamente pequeñas de citoquinas (del orden de pg/ml 10^{-12} g).



SEÑALES BIOQUÍMICAS DE LOS RECEPTORES DE CITOQUINAS

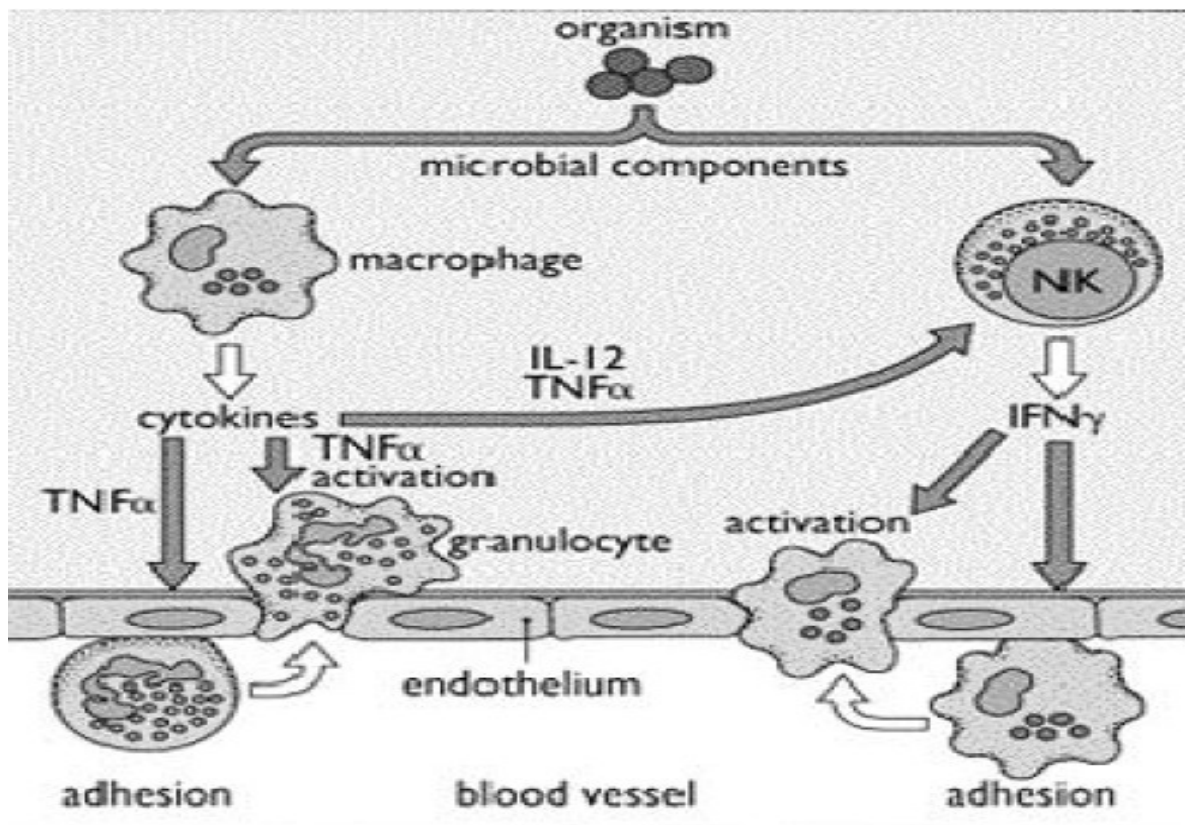
La información de los receptores se transmite al interior de la célula dado que la región citosólica de cada cadena del receptor puede unirse a unas kinasas denominadas **JAK** (**Janus Kinase**- denominadas así por tener dos actividades kinasa, en tirosina y en serina-treonina, es decir del mismo modo que el dios Jano tienen dos "caras"). Al unirse la citoquina al receptor, traerá las distintas cadenas del mismo juntas, lo cual a su vez, traerá juntas las JAK unidas a cada cadena. Las JAKs se fosforilarán entre ellas lo cual les permite fosforilar los tallos citosólicos del receptor. Cada tallo citosólico fosforilado podrá unir un factor de transcripción denominado STAT (signal transducer and activator of transcription) que ahora también serán fosforilados por los JAKs. Los STAT fosforilados dimerizan y pueden migrar al núcleo donde se unen a los promotores de una serie de genes activando su transcripción. Cada citoquina se une a su receptor específico y cada receptor es capaz de activar un JAK determinado y éste a su vez fosforila a un STAT determinado con lo que la transmisión de señales producida por cada citoquina es bastante específica, explicando que una misma célula, que puede tener receptores para distintas citoquinas, pueda responder de forma distinta según la citoquina que este actuando en cada momento.

ANTAGONISTAS DE LAS CITOQUINAS

Antagonistas de los receptores. Sustancias que se unen al receptores sin activarlo pero impidiendo que se una la citoquinas activadora.

Fragmentos del dominio extracelular de receptores de citoquinas que son secretados y se unen a las citoquinas correspondientes impidiendo que lleguen a unirse al receptor situado en la membrana de las células donde ejercerían su acción. (IL2, IL4, IL6, IL7, IFN γ , TNF).

Otra forma de inhibir la acción de una citoquina es mediante otra citoquina de acción contrapuesta.



Tema 16. MECANISMOS EFECTORES III. Los anticuerpos como mecanismos efectores. Colaboración celular en la respuesta de anticuerpos. Presentación del antígeno a las células T. Interacciones entre células B y T. Respuestas de anticuerpos in vivo.

Las células B reconocen el antígeno a través del receptor para el antígeno de la célula B (**BCR B Cell Receptor**) que no es más que un anticuerpo anclado a la membrana y que por tanto también se llama **anticuerpo de superficie** o **inmunoglobulina de superficie** de la célula B. La interacción del antígeno con el BCR dará lugar a un cambio conformacional en las cadenas asociadas al BCR Iga e Igb (llamadas cadenas invariantes pero que no deben ser confundidas con la cadena invariante encargada del ensamblaje de péptidos a MHC-II), encargadas de transmitir señales al interior de la célula y necesarias para que se exprese el BCR en la superficie de la célula. La transmisión de señales a través de Iga e Igb, consiste en la fosforilación en tirosina de unos residuos activadores presentes en sus tallos citosólicos y que se denominan **ITAMS (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif)**. Los ITAMS una vez fosforilados serán capaces de unir otras kinasas que a su vez continuarán transmitiendo señales hasta llegar al núcleo. En el caso de antígenos T independientes, las señales mencionadas serán suficientes para que el linfocito B proliferara y para que algunos de las células hijas se diferencien a células plasmáticas que secretaran anticuerpos de la misma especificidad que el linfocito B del que proceden.

El BCR tiene otra función además de indicar al linfocito B que ha reconocido su antígeno. La interacción del antígeno con el BCR dará lugar a la endocitosis del complejo BCR/antígeno. Este complejo endocitado será proteolizado en el endosoma, de modo que algunos péptidos procedentes del antígeno serán ensamblados con moléculas MHC-II, que serán expresadas en la superficie, permitiendo al linfocito B presentar péptidos del antígeno al linfocito T que reconoce ese péptido. Solo así, presentando péptidos del antígeno que él mismo reconoce y que por tanto ha endocitado, a un linfocito T (específico por tanto para el mismo antígeno), este linfocito T prestará la "**ayuda T**" necesaria para que el linfocito B proliferara y se diferencie. La ayuda T además permitirá que el linfocito B que la recibe, realice un **cambio de isotipo de inmunoglobulinas** pasando de IgM a IgG o IgE, permitirá a su vez una **maduración de la afinidad** de los anticuerpos y finalmente permitirá la generación de **linfocitos B memoria**.

1. ANTÍGENOS T INDEPENDIENTES

La ayuda T es necesaria para la mayoría de los antígenos. Todos estos antígenos se denominan por ello, **Antígenos T Dependientes**, por cuanto es necesaria la ayuda T para que el linfocito B que los reconoce proliferara y se diferencie a célula plasmática.

Algunos antígenos, como es el caso de algunos polisacáridos bacterianos, proteínas poliméricas y Lipopolisacáridos, tienen características especiales que les permiten activar a los linfocitos B sin la necesidad de ayuda T, denominándose **Antígenos T Independientes**. La respuesta a antígenos T independientes tendrá la ventaja de ser más rápida, pero no se producirá cambio de isotipo de inmunoglobulinas (los anticuerpos producidos serán siempre IgM) y no se producirá maduración de la afinidad ni memoria.

Los antígenos T independientes pueden ser de dos tipos:

- **TIPO I** Tienen una capacidad intrínseca de estimular a las células B de modo que a altas concentraciones pueden estimular todas las células B con independencia de la especificidad de las mismas, es decir dan lugar a una estimulación policlonal. Dado que son capaces de inducir proliferación, es decir mitosis, en todas las células B se les llama **mitógenos** de células B. A concentraciones más bajas, sin embargo, activan solo a algunas células B. Son capaces de activar células B inmaduras a diferencia de los tipo II.
- **TIPO II** Se trata de antígenos con estructuras repetitivas, como es el caso de las paredes bacterianas o el polisacárido capsular. La respuesta frente a este tipo de antígenos se lleva a cabo fundamentalmente por células B del tipo B1 o CD5+, que son de una subpoblación de células B con capacidad de autoreplicarse (es decir no tienen que seguir produciéndose en la médula ósea). La respuesta frente a este tipo de antígenos es fundamental para la destrucción de patógenos extracelulares piogénicos, con paredes celular polisacáridas que los protegen de la ingestión por fagocitos y que al no ser fagocitados por los macrófagos tampoco son inicialmente presentados a los linfocitos T. De modo que los anticuerpos producidos de forma rápida por las células B1 en respuesta a estos antígenos T independientes, es fundamental para cubrir estos patógenos que de este modo pueden ser destruidos. El bazo es el reservorio más importante de los linfocitos B encargados de la respuesta contra antígenos T independientes, por ello tras la esplenectomía existe un mayor riesgo de infecciones por bacterias piógenas (neumococo y haemophilus).

2. ANTÍGENOS T DEPENDIENTES. COLABORACION CÉLULAR (AYUDA T) EN LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS

¿En que consiste la ayuda T? Cuando el linfocito B presenta un péptido al linfocito T CD4+ Th2, éste se activará y proliferará produciendo no solo IL-2 para su propio crecimiento (el del linfocito T) sino también produciendo **IL-4** y expresando **CD40L** para activar al linfocito B. La interacción de CD40L con la molécula CD40 del linfocito B, constituirá la segunda señal fundamental para la proliferación y diferenciación del linfocito B, así como para el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas, maduración de afinidad y generación de memoria. La importancia de la molécula CD40L se puso de manifiesto recientemente al descubrirse que la causa de una inmunodeficiencia denominada **síndrome hiper IgM ligado al cromosoma X** era una mutación en CD40L. A pesar de que las células B de estos individuos son normales, solo son capaces de producir pequeñas cantidades de anticuerpo en respuesta a antígenos y solo del isotipo IgM, no siendo capaces de producir anticuerpos de isotipos IgG o IgE y padeciendo una inmunodeficiencia.

La necesidad de ayuda T es también la razón por la que los **haptenos no son inmunógenos**: Al tratarse de fragmentos demasiado pequeños, son reconocidos por el BCR y son endocitados, pero no existe ningún fragmento peptídico que pueda ser ensamblado al MHC-II por lo que ningún linfocito T será inducido específicamente a expresar CD40L y por

tanto no brindará ayuda T a ese linfocito B. El linfocito B al no ser capaz de obtener ayuda T, no proliferará ni se diferenciara a célula plasmática y por tanto no se producirán anticuerpos. Sin embargo si unimos el hapteno de forma covalente a una proteína que llamamos **transportadora** o **carrier** (o generamos una proteína de fusión por ingeniería genética), ahora cuando el linfocito B que reconoce el hapteno, lo endocita, endocitará también la proteína transportadora que esta unida a él y al degradarla tendrá fragmentos peptídicos que podrá ensamblar a las moléculas MHC-II y presentar al linfocito T, con lo cual ahora si que recibirá la ayuda T, proliferará y se diferenciará en célula plasmática productora de anticuerpos.

3. RESPUESTAS DE ANTICUERPOS IN VIVO

Todo el proceso de reconocimiento del antígeno y ayuda T, se produce in vivo en los órganos linfoides secundarios y concretamente en áreas determinadas de los mismos, que permitan a los linfocitos B, no solo encontrar a su antígeno, sino también a un linfocito que reconozca el mismo antígeno para que le preste la necesaria ayuda T. El encuentro mencionado no solo esta dificultado por el escaso numero de linfocitos T o B específicos para un antígeno determinado (sobre todo en el primer contacto con el antígeno,), sino también por el hecho de que linfocitos T y B ocupan sitios distintos en los órganos linfoides.

Las células presentadoras de antígenos (APCs) (macrófagos o células dendríticas), una vez cargadas de antígenos, habrán viajado al ganglio linfático. Cuando un linfocito T específico para algunos de los antígenos presentados por APCs, llegue al ganglio linfático a través de las vénulas de epitelio cúbico o alto (**HEV High Endothelial Venules**), será activado por las APCs y quedara atrapado en la zona T. Las células B entran en el ganglio también a través de las **HEV**. Para llegar a los folículos (zona B), tienen que atravesar las zonas T donde pueden encontrar antígenos y Linfocitos T que reconozca el mismo antígeno que ellos están presentando y le presten la ayuda T. Si cualquiera de los dos eventos anteriores no sucediera, el linfocito B continuara su migración hasta el folículo linfoide primario donde interaccionan con las células foliculares dendríticas que son fundamentales para la supervivencia y recirculación de las células B no activadas o "Naive".

El reconocimiento del antígeno en presencia de ayuda T, dará lugar a la activación del linfocito B que comenzará a proliferar originando un **foco primario** de expansión clonal. Todas las células hijas tendrán la misma especificidad que la célula que les dio origen, reconocerán el mismo antígeno, constituyendo por tanto un clon.

Algunas células hijas, se diferenciaran a células plasmáticas, migrando a los cordones medulares del ganglio donde constituirán una fuente precoz de anticuerpos (que aun serán de tipo IgM porque no ha dado tiempo a que se produzca el cambio de isotipo). Están en la medula cercanos a la salida de los ganglios de modo que también pueden salir de los ganglio por los vasos linfáticos eferentes para continuar produciendo anticuerpos en otras localizaciones.

Otras células hijas pertenecientes al mismo clon, siguen su migración hacia los folículos primarios donde seguirán proliferando formando los llamados centros germinales o centro claros, que son los que le dan el aspecto macroscópico de centro claro, característico del folículo que pasará a llamarse **folículo secundario**. Estas células inicialmente tendrán características propias de células en división o blastos y se denominan **centroblastos** que

se diferenciarán en **centrocitos** que son los que se disponen en el centro del folículo secundario, en la zona clara que le da nombre. En estas células hijas que siguen proliferando en el folículo secundario se producirán los fenómenos de hipermutación somática, el cambio de isotipo de inmunoglobulinas y finalmente algunas de esas células hijas se diferenciarán en células memoria.

HIPERMUTACION SOMATICA

En los **centroblastos** en rápida división se van acumulando mutaciones en la región variable, lo que dará lugar a una mayor variabilidad y por tanto a anticuerpos ligeramente distintos a los anteriores y que por tanto encajarán mejor o peor con el antígeno, es decir las distintas mutaciones darán lugar a anticuerpos de mayor o menor afinidad. Una vez diferenciados a centrocitos, aquellas mutaciones que hayan dado lugar a anticuerpos de mayor afinidad unirán con mayor frecuencia el antígeno, con lo que los centrocitos que tengan anticuerpos de superficie de mayor afinidad serán los que más proliferen mientras que los centrocitos con anticuerpos de superficie inútiles o de menor afinidad morirán. Mediante este proceso se originarán nuevos centrocitos hijos que procederán de aquellos que unían el antígeno con mayor afinidad y que por tanto ellos mismo a su vez tendrán anticuerpos de superficie que unirán al antígeno con mayor afinidad. Algunos de estos centrocitos se diferenciarán a células memoria mientras otros se diferenciarán a células plasmáticas y producirán anticuerpos cuya afinidad también habrá mejorado. Mediante este proceso de hipermutación somática, se producirá lo que se denomina **Maduración de la Afinidad** de los anticuerpos.

CAMBIO DE ISOTIPO DE INMUNOGLOBULINAS

En el apartado anterior describimos como se produce una optimización de la región variable, que dará lugar a una mayor afinidad de unión con el antígeno. Sin embargo la ayuda T también dará lugar a una optimización de la región constante que es la responsable de las características efectoras de un anticuerpo, es decir de los mecanismos que pueden poner en marcha para la destrucción del antígeno que reconocen.

En la célula B en ausencia de ayuda T, se produce la transcripción de las cadenas pesadas m y d que son las que se encuentran más cerca de las regiones variables, quedando unidas en el RNA mensajero las regiones que codifican para las regiones variables seguidas de la región que codifica para una de las cadenas pesadas mencionadas. Este transcrito, será luego traducido a proteína.

La activación del linfocito B en presencia de ayuda T (estimulación de CD40 y citoquinas), da lugar a la transcripción de las regiones que codifican para cadenas pesadas g, e ó a que se encuentran más alejadas de las zonas que codifican para las regiones variables. Esas regiones serán posteriormente cortadas y pegadas cerca de la región que codifica para las regiones variables, de modo que cuando se produzca la traducción a proteína, las regiones variables queden seguidas de una región constante de un tipo u otro.

FUNCIONES EFECTORAS DE LOS ANTICUERPOS Los anticuerpos unidos a los antígenos, serán capaces de activar a través de su extremo Fc una serie de actividades que conducen a la destrucción neutralización y/o eliminación del antígeno. Los anticuerpos de distinto isotipo, tienen distinta efectividad a la hora de realizar las diferentes funciones, por lo que es fundamental que se produzca el cambio de isotipo.

- **NEUTRALIZACIÓN** evitando la unión de toxinas virus o bacterias a sus receptores con lo cual no podrán internalizarse en las células. **IgG** e **IgA** son los isotipos mas efectivos
- **TOXINAS**
- **VIRUS**
- **BACTERIAS**
- **OPSONIZACIÓN** Los patógenos cubiertos de anticuerpos serán mas fácilmente fagocitados, gracias a la propiedad de algunos anticuerpos (sobre todo **IgG**) de activar receptores Fc situados en la superficie del fagocito, lo que dará lugar a la activación del mismo. Los anticuerpos solo activan los fagocitos cuando se encuentra unidos al antígeno por cuanto de este modo pueden unir varios receptores Fc a la vez.
- **SENSIBILIZACION DE NK (ADCC)** Células unidas a anticuerpos de tipo **IgG** son mas susceptibles a la lisis por células NK, al ser estimulados receptores Fc situados en la superficie de las células NK por los extremos Fc de los anticuerpos que recubren la célula diana.
- **SUSCEPTIBILIDAD A LA DESTRUCCIÓN POR MASTOCITOS Y EOSINOFILOS** Los parásitos recubiertos por **IgE** son susceptibles a ser destruidos por mastocitos o eosinófilos gracias a la activación de receptores Fcε de su superficie.

DISTRIBUCIÓN TISULAR DE LOS ANTICUERPOS

Los distintos isotipos están distribuidos de forma selectiva en el organismo. **IgG** e **IgM** predominan en el plasma, **IgG** e **IgA** monomérica son las mas frecuentes en los fluidos. **IgA** polimérica se encuentra fundamentalmente en secreciones. La **IgG** es la única que atraviesa la barrera placentaria mediante transporte. **IgE** suele encontrarse debajo de las superficies epiteliales. En el cerebro no existen inmunoglobulinas.

La distribución diferencial de los distintos isotipos es posible gracias a la existencia de sistemas de transporte especializado que permiten el paso de determinadas membranas a los anticuerpos de un isotipo y no de otro.

En el caso de la **IgA** el receptor **poly-Ig**, se une a la unidad J del dímero de **IgA**, difunde a través de la membrana basal, es transportado a través de la célula en una vesícula y al llegar a la superficie apical, el receptor poly-Ig es separado dejando a la **IgA** con un resto del mismo que es lo que constituye la **unidad secretora**.

Tema 20. INMUNOLOGÍA TUMORAL. Vigilancia inmunitaria. Antígenos asociados a los tumores. Respuesta inmunitaria frente a los tumores y mecanismos de evasión. Inmunodiagnóstico. Inmunoterapia.

1. INTRODUCCION

En los organismos superiores existe un delicado equilibrio entre la maquinaria que induce a la célula a proliferar y aquella que la dirige a diferenciarse y realizar su función. Para ello la célula normal ha de recibir estímulos del exterior y ser capaz de integrarlos mediante una correcta regulación de su expresión génica en el proceso conocido como *ciclo celular*. En la célula tumoral o cancerosa, el equilibrio entre proliferación y diferenciación se rompe en favor del primero, de forma que en los tumores un número significativamente alto de células se está dividiendo en contraste con el escaso porcentaje de células que se dividen en los tejidos normales.

El proceso de transformación de una célula normal en una tumoral, se conoce con el nombre de **transformación maligna** o **malignización**. Un mecanismo común de malignización celular lo constituye la activación inadecuada de los llamados *protooncogenes*. En la célula normal, los protooncogenes están implicados en el control del crecimiento y de la diferenciación celular, sin embargo su activación inadecuada los convierte en *oncogenes* o genes que inducen la malignización celular. La inadecuada activación de estos genes se produce como consecuencia de alteraciones en el código genético o mutaciones que se pueden producir como resultado de la exposición a factores ambientales, tales como ciertos agentes químicos, físicos (radiaciones ionizantes), o biológicos (interacción de ciertos agentes virales con el genoma de la célula huésped) o a errores producidos durante la duplicación del DNA durante el proceso de división. En la mayoría de los casos, la célula normal posee mecanismos para reparar el DNA gracias a la información codificada en los genes supresores del cáncer o *antioncogenes*, sin embargo también pueden producirse mutaciones en los antioncogenes contribuyendo a la malignización celular.

2. SISTEMA INMUNE Y MALIGNIZACION CELULAR

Considerando la alta incidencia de mutaciones celulares, cabe pensar que el organismo debe poseer algún sistema que le proteja frente al desarrollo y crecimiento de células tumorales, en tanto que la incidencia de tumores no es tan elevada como cabría esperar.

2.1. Teoría de vigilancia inmunológica.

Efectivamente, gracias a los estudios de Burnet publicados en 1970 y 1971, hoy sabemos que el sistema inmune juega un importante papel defendiendo al individuo frente al crecimiento de células neoplásicas, a través de una función de vigilancia constante. Esta teoría de *inmunovigilancia* supone que las células tumorales **poseen antígenos, que no están presentes en las células normales**, estos antígenos serían reconocidos por el sistema inmune dando lugar a la destrucción de las células tumorales que se vayan formando. El tumor solo se formaría cuando alguna de las células tumorales *escapa* al sistema. Existen pruebas de la existencia de una estrecha relación entre la aparición y desarrollo de cánceres y el estado funcional del sistema inmune:

- La incidencia de cánceres es mayor en estados de **inmunodeficiencia** como el síndrome de Wiskott-Aldrich, ataxia telangiectasia y otros.
- También lo es en estados de **inmunosupresión**, producidos como consecuencia de tratamientos inhibidores del sistema inmune para evitar el rechazo de órganos trasplantados.
- La acción antitumoral se pone de manifiesto *in vivo* en animales por cuanto la **destrucción del sistema inmune mediante irradiación**, elimina cualquier efecto protector y permite el crecimiento tumoral. La respuesta inmune frente al tumor es específica por cuanto en ratones a los que se les inyectan células de un determinado tipo de tumor y linfocitos, solo se aprecia una inhibición casi total del crecimiento tumoral, cuando los linfocitos inyectados se encontraban previamente sensibilizados específicamente frente a dicho tumor.
- La existencia de **regresiones** espontáneas.
- La existencia de una correlación entre la **infiltración linfocitaria**, principalmente linfocitos y macrófagos, en los tumores con un mejor pronóstico
- La existencia en las zonas de drenaje de los tumores o sus metástasis de una respuesta ganglionar en forma de **hiperplasia**.
- En los individuos portadores de cáncer se han encontrado **inmunoglobulinas** con capacidad antitumoral y **linfocitos T citotóxicos (CTLs *cytotoxic T lymphocytes*)** sensibilizados frente al tumor. Esta sensibilización de tipo celular puede ser demostrada enfrentando linfocitos de individuos portadores de cáncer con células cancerosas, observándose entonces como los linfocitos se transforman e incluso adquieren después de dos o tres días de cultivo una potente acción inhibitoria del crecimiento tumoral.
- Los estudios basados en el uso de los genes del receptor de la célula T de los linfocitos infiltrantes de tumor (**TIL *Tumor infiltrating Lymphocytes***) demuestran una cierta oligoclonalidad en los linfocitos del infiltrado tumoral.

Sin embargo, varios datos que parecían incompatibles con la teoría de la inmunovigilancia pusieron en entredicho durante un tiempo el papel del sistema inmune en la lucha contra los tumores:

1. Los ratones atímicos, a pesar de no tener respuesta celular T, no tienen una alta incidencia de tumores.
2. Aunque existe una mayor incidencia de tumores en pacientes inmunosuprimidos, los tumores que se generan pertenecen solo a un grupo particular, la mayoría son de origen linforreticular, y probablemente con **patogénea viral**. Lo anterior indujo a pensar durante un tiempo que lo que el sistema inmune reconoce son los antígenos virales asociados al tumor. La misma objeción se puede hacer para las remisiones espontáneas, descritas fundamentalmente en melanomas, cáncer renal y linfomas.
3. La baja inmunogenicidad de los tumores espontáneos.

Desde las primeras experiencias en tumores inducidos por agentes carcinogénicos, en las que era posible provocar una respuesta de rechazo en ratones singénicos frente a un segundo trasplante, hasta la aceptación de que en humanos se pueden detectar respuestas celulares citotóxicas, se especuló que los **antígenos tumorales específicos de trasplante (TSTA *transplantation specific tumor antigens*)** eran artefactos de laboratorio. Sin embargo varios avances científicos recientes han transformado de forma clara la inmunología tumoral gracias al abordaje de los mecanismos moleculares de la respuesta celular.

En este sentido, ya han sido identificadas mediante técnicas de clonaje molecular con Linfocitos T citotóxicos (CTLs), varios antígenos de tumores. Estos experimentos han demostrado la existencia de verdaderos antígenos tumorales y de linfocitos capaces de detectarlos en células tumorales. Por último, las experiencias recientes de transferencia génica, que abordaremos posteriormente, han revelado que no es que no exista respuesta inmunológica, sino más bien que ésta es inadecuada.

3. ANTIGENOS DE RECHAZO TUMORAL

Al menos alguno de los mecanismos de la oncogénesis involucra la alteración estructural de genes implicados en diferenciación y/o proliferación. Esto daría lugar a la aparición de proteínas alteradas que funcionarían como verdaderos antígenos de rechazo.

Efectivamente, hoy sabemos que las células tumorales poseen antígenos y/o sustancias que o no se expresan o lo hacen de forma muy débil en células normales. Estos antígenos, conocidos como antígenos asociados al tumor, no están presentes en los tejidos normales y se denominan *antígenos específicos de tumor* (TSA). La más clara evidencia de la existencia de tales antígenos se busca en los estudios de trasplante de células tumorales, ya que alguno de estos antígenos tumorales inducen respuestas mediadas por linfocitos T en huéspedes singénicos. No obstante, la naturaleza de tales antígenos ha sido difícil de probar, dado que no existían anticuerpos adecuados que reconocieran estas moléculas, hecho que no resulta sorprendente si tenemos en cuenta que los linfocitos T a diferencia de los anticuerpos, reconocen pequeños péptidos antigénicos presentados dentro del hueco del que disponen las moléculas de histocompatibilidad. Al no disponer de anticuerpos, no ha sido posible la identificación de estos antígenos por inmunoprecipitación. Sin embargo en la actualidad, la aplicación de técnicas de clonaje molecular, se hizo extensiva al melanoma humano, con el descubrimiento de los *genes de la familia MAGE* que codifican para antígenos tumorales reconocidos por CTLs. Mediante transferencia de DNA, fragmentos del gen MAGE-1 fueron clonados en vectores de expresión e introducidos en líneas de células tumorales. Las células tumorales que expresaban los fragmentos del gen MAGE-1, eran específicamente lisadas por CTLs en ensayos *in vitro*. En la tabla siguiente se recogen los distintos grupos de antígenos tumorales que inducen respuestas mediadas por células T:

ANTÍGENOS DE RECHAZO IDENTIFICADOS POR CTL

ANTÍGENOS	CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTALES
Origen viral	Productos del gen EBNA-1 del virus EBV y genes E6 y E7 en HPV
Genes embrionarios	MAGE-1 en melanomas y otros cánceres
Prot. oncogénicas	Mutaciones en ras, p53, productos de reordenamientos: bcr-abl y sobreexpresión de proto-oncogenes HER/neu.
Idiotipos	Ig de superficie de linfomas B y LLC-B
Otros	Mutaciones en genes irrelevantes P91A, proteínas de choque térmico y proteínas tejido-específicas.

3.1. Antígenos de origen viral.

Un grupo importante de tumores presentan una fuerte asociación con virus y expresan una serie de productos virales. Los antígenos virales pueden ser directamente responsables de la malignización o no. Así por ejemplo, una significativa proporción de linfomas de Hodgkin, y de linfomas de Burkitt se asocian con la presencia de virus de Epstein-Barr (EBV) y expresan la proteína viral EBNA-1. Otro ejemplo lo constituye la asociación cercana al 90 % entre el papilomavirus humano y el cáncer de cervix en el que se detectan productos de los genes virales E6 y E7. En algunos casos se ha podido demostrar la existencia tanto de anticuerpos como de linfocitos T sensibilizados frente a estos productos. Estos antígenos son siempre específicos del tipo de virus inductor del tumor, independientemente del tipo de célula o tejido en donde éste se desarrolle.

3.2. Antígenos procedentes de reactivación de genes embrionarios.

El producto del gen específico del melanoma *MAGE-1* fue identificado a través de la generación de CTLs específicos y no se encuentra mutado en las células malignas. Esto representa un hallazgo relevante a la par que introduce un importante grupo de antígenos tumorales expresados por genes normalmente silentes y que son **reactivados** durante la transformación tumoral. Entre los ejemplos más conocidos de estos productos se encuentran: *el antígeno carcinoembrionario (CEA)*, la *α -fetoproteína* y el *antígeno peptídico tisular*. Estos antígenos se producen normalmente por células embrionarias o fetales. En el adulto las células normales dejan de producirlos en cantidades significativas, encontrándose sólo en ciertos tipos de células cancerosas, quizá por derepresión del gen regulador de su síntesis. Se ha intentado explicar la inmunogenicidad de estos antígenos, por el hecho de que su expresión, en condiciones normales, sea anterior a la maduración del sistema inmune, por tener lugar en tejidos inmunológicamente privilegiados.

3.3. Proteínas oncogénicas

Los productos de oncogenes o genes supresores mutados pueden constituir antígenos específicos de tumor. En este sentido se han descrito respuestas T específicas en ratones inmunizados con péptidos mutados de la proteína *RAS*, que se encuentra mutada en un 10 % de tumores humanos. Se han generado linfocitos T citotóxicos frente a *p53* mutada. Asimismo se han identificado péptidos capaces de unirse a HLA-A2, procedentes de la proteína de fusión de *p210 BCR-ABL* característica de la leucemia mieloide crónica. Por último, la proteína del proto-oncogen *HER2/neu* se encuentra sobreexpresada en tumores de mama, ovario y pulmón, y se ha demostrado capaz de generar CTLs *in vitro*.

3.4. Idiotipos

El idiotipo de las inmunoglobulinas de superficie de las neoplasias de células B, así como el idiotipo del TCR en los linfomas T, pueden ser considerados antígenos específicos de tumor por cuanto se pueden generar anticuerpos anti-idiotipo como parte de una estrategia inmunoterapéutica.

3.5. Otros antígenos

Los productos de otros muchos genes pueden participar también en la generación de respuestas citotóxicas específicas. **Mutaciones al azar** en genes no relacionados con malignización, como por ejemplo la mutación P91 A en el mastocitoma P815. Las mucinas se expresan diferencialmente en tumores y han demostrado ser capaces de actuar como dianas de CTL específicos. Por último, la inmunización de ratones con *proteínas de choque térmico* (HSP heat shock proteins), induce inmunidad mediada por células T frente a antígenos virales y tumorales.

4.MECANISMOS EFECTORES ANTITUMORALES

Los mecanismos responsables de la acción citostática y citotóxica del sistema inmune son muy heterogeneos. Aquí trataremos solo algunos de los aspectos mas esenciales.

4.1. Linfocitos T

En experimentos de transferencia de células, se ha podido demostrar que tanto las células CD4 como las células CD8 tienen capacidad para inducir resistencia contra el crecimiento tumoral, aunque por mecanismos distintos. La transferencia de células CD8 induce un efecto antitumoral directo, presumiblemente por su capacidad citotóxica, mientras que la resistencia mediada por CD4 puede ser debida al reclutamiento y activación de células del huésped, posiblemente por la mediación de citocinas. De todas formas, los últimos años han resultado claves para el conocimiento de qué es inmunogénico para las células T y bajo qué circunstancias. Así por ejemplo, por una parte pueden aislarse péptidos de las moléculas del MHC por cromatografía líquida; y por otra, hoy se conocen las bases moleculares de la coestimulación de las células T. Ambos logros están permitiendo el desarrollo de nuevas estrategias en inmunoterapia del cáncer.

4.2. Acción antitumoral de células NK

El hecho, que la mayor parte de los tumores espontáneos no son aparentemente inmunógenos y de que ratones atímicos, deficientes en células T, no presentan una mayor incidencia de tumores, cuestionaron la teoría de la vigilancia inmunológica. Sin embargo, el descubrimiento de que las células NK se encuentran presentes en los ratones atímicos rehabilitó la teoría de la vigilancia inmunológica, cuyo mediador celular principal, en algunos tumores, serían las células NK y no los linfocitos T citotóxicos (Tc).

Efectivamente, se ha demostrado que las células NK poseen una importante capacidad de lisis de células tumorales *in vitro* e *in vivo*. Así, mediante la reconstitución de animales irradiados con clones de células NK, se pueden inhibir tumores trasplantados y metástasis tumorales experimentales. De igual manera, se ha demostrado en humanos, empleando células de melanoma, que la actividad NK es efectiva en la resistencia antitumoral.

En modelos experimentales, se han demostrado efectos antitumorales de células tratadas *in vitro* con IL-2 a grandes dosis que actúan produciendo células activadas conocidas como LAK (*Lymphokine activated killer*) que mayoritariamente derivarían de las células NK.

Hoy sabemos que las células NK tienen dos clases de receptores, unos de activación y otros de inhibición. Los primeros activan las células cuando reconocen ciertas estructuras

en las células tumorales y los segundos bloquean la maquinaria lítica de la célula NK cuando reconocen ciertas moléculas HLA, que en este caso actuarían inhibiendo a la célula NK, al contrario de lo que ocurre con la célula Tc que requiere para su activación la presencia de moléculas HLA.

4.3. Acción antitumoral de macrófagos

Los macrófagos son constituyentes importantes en el infiltrado leucocitario de los tumores y pueden afectar al crecimiento tumoral por varias vías. Pueden influir directamente sobre la capacidad de proliferación, y promueven también la formación de estroma y la angiogénesis. Además, pueden atacar directamente a las células tumorales, sólo o en cooperación con otros mecanismos efectores. No obstante, en algunas condiciones, los macrófagos pueden promover el crecimiento tumoral. En algunos sistemas, algunos productos de macrófagos como IL-1 ó TNF han aumentado la capacidad metastásica, actuando como factores de crecimiento en el cáncer de ovario, e induciendo la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales del estroma.

4.4. Acción antitumoral de mediadores solubles de la respuesta inmune

Los factores químicos de la respuesta inmune cuya acción se ha demostrado más efectiva frente al desarrollo y crecimiento de la célula tumoral son el *α*-interferón, *interleucina 2* y TNF (factor necrosante tumoral). Todo ello sin incluir los factores predominantemente inflamatorios producidos a lo largo de la respuesta inmune inespecífica.

El interferón γ (IFN γ), ha sido evaluado por su uso potencial como agente inmunoterapéutico. Aunque la base inicial para su empleo radicó en la demostración de su capacidad de afectar el crecimiento tumoral *in vitro*, parece claro que el IFN γ presenta una serie de efectos pleiotrópicos sobre el sistema inmune. Inicialmente fue demostrada su eficacia en la leucemia de células peludas *hairy cell leukemia*, extendiéndose posteriormente su uso, entre otros campos a la leucemia mieloide crónica y al melanoma.

La *interleucina 2*. La insuficiente producción de IL-2 debido al menos en parte a una falta de ayuda por parte de la célula T colaboradora, podría ser responsable del fallo en la respuesta inmune antitumoral. En este sentido, sería la secreción local de linfocinas tales como IL-2 lo mediante la activación de los CTLs, la base molecular de la función de la célula T colaboradora. Se ha observado que la administración de altas dosis de IL-2 en pacientes con cáncer renal o melanoma maligno avanzado produce remisión parcial o completa.

El factor de necrosis tumoral fue descubierto en el 1975 cuando se observó que el suero de ratones inyectados primero con BCG o *Corinebacterium Parvum* y reestimulados después con endotoxina contenía una sustancia que causaba necrosis hemorrágica de ciertos tumores en el ratón y la lisis de células tumorales *in vitro*. La sustancia activa de estos sueros se ha identificado posteriormente como una proteína de peso molecular 17 kD que fue denominada, *factor de necrosis tumoral* (TNF). Las principales células productoras de esta citocina son los macrófagos habiendo sido contrastada la actividad antitumoral de los TNF en muchas líneas celulares (*in vitro*) y en animales portadores de tumores (*in vivo*). Esta actividad se lleva a cabo de forma directa mediante la lisis del tumor, así como de manera indirecta mediante la atracción al entorno tumoral de células inmunocompetentes capaces de lisar las células tumorales.

5. MECANISMOS DE ESCAPE DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA

A pesar de que en muchos pacientes se pueden generar reacciones citotóxicas frente a células autólogas, mediadas por linfocitos T *in vitro*, estas raramente reflejan la capacidad de destrucción del tumor *in vivo*. Esto indica que algunos factores deben operar *in vivo*, permitiendo el crecimiento del tumor y su escape al control inmunológico.

Aunque hay algunas evidencias de que los pacientes con cáncer sufren una cierta debilidad en su respuesta inmune, traducida en un descenso de la capacidad citolítica y proliferativa de los linfocitos; no siempre los tumores aparecen en sujetos con sistema inmune funcionalmente deficiente. Entonces, ¿cómo justificar su aparición? ¿Por qué no fueron destruidos en el momento de su aparición? Estas preguntas pueden ser contestadas sin excluir el papel vigilante del sistema inmune por los siguientes mecanismos:

- a) Baja inmunogenicidad de las células tumorales
- b) Descenso en la expresión de antígenos del sistema HLA
- c) Bloqueo en la respuesta inmune antitumoral
- d) Anergia por ausencia de moléculas coestimuladoras en las células tumorales.

5.1. Baja inmunogenicidad de las células tumorales.

La poca capacidad inmunógena de ciertos tumores se viene atribuyendo desde antiguo como causa de su desarrollo y se podría deber a:

1. Aparición de las células tumorales en lugares poco accesibles para el sistema inmune, no produciendo, por tanto, una estimulación antigénica en sus comienzos.
2. Una gran capacidad de cambio a lo largo del tiempo de la estructura de los antígenos específicos del tumor, de tal forma que cuando se desarrolla una respuesta frente a los antígenos, ésta se hace inefectiva debido al cambio de los mismos y a la aparición de otros nuevos. El fenómeno de modulación antigénica fue demostrado en el sistema T1a del ratón. Se esperaba que ratones inmunizados frente a antígenos T1a y que presentaran anticuerpos citotóxicos resistieran a inóculos de células leucémicas T1a⁺. Por el contrario, los ratones morían por el tumor y las células leucémicas recuperadas eran insensibles a los anticuerpos anti-T1a *in vitro*.

5.2. Descenso en la expresión de antígenos HLA.

Para que un linfocito T citotóxico reconozca y destruya a una célula tumoral o infectada por virus, es requisito imprescindible que ésta exprese antígenos de histocompatibilidad de clase I en su membrana celular. De modo que si la célula tumoral deja de expresar moléculas HLA de clase I, el reconocimiento por los linfocitos T citotóxicos (Tc) no se produce. Empleando técnicas de transfección (transferencia génica) se ha demostrado que cuando un tumor no expresa antígenos HLA de clase I, es resistente a la destrucción por parte de un animal inmunocompetente, mientras que cuando se restaura la expresión (introduciendo en la célula el gen que codifica para HLA I), vuelve a hacerse susceptible a la lisis.

EFFECTO DE LA TRANSFECCIÓN DE GENES HLA CLASE I SOBRE EL DESARROLLO DEL TUMOR *IN VIVO*

TUMOR	EXPRESIÓN DE HLA-I	DESARROLLO DEL TUMOR
K36.16	No	Si (10 días)
K36.16+genes clase I	Si	NO

La pérdida frecuente de antígenos HLA se observa en tumores de todo tipo, indicando que éste fenómeno tiene que tener una relevancia biológica, posiblemente al presentar una ventaja selectiva para el crecimiento tumoral. Se ha podido observar que en algunos tipos de tumor existe una relación estrecha entre alteraciones en la expresión de antígenos HLA y presentación de estadios más avanzados del tumor. En términos generales se ha podido observar que la pérdida de expresión de HLA I, es un hallazgo ligado a la malignización, dado que no se detecta en lesiones tumorales benignas, observándose siempre en estadios posteriores a carcinoma in situ y frecuentemente asociada a dediferenciación.

Los posibles mecanismos implicados en la alteración del MHC en tumores son: a) factores que afectan a la transcripción, b) factores que afectan al transporte de las cadenas y c) factores que afectan al procesamiento y glicosilación.

5.3. Bloqueo de la respuesta inmune antitumoral

Varios factores y circunstancias pueden ser responsables de un bloqueo de la respuesta antitumoral :

1. **Liberación de antígenos del propio tumor** que bloquearían su destrucción por parte de linfocitos inmunes. Parece ser que los antígenos libres se unen a los linfocitos, bloqueando sus receptores.

2. **Anticuerpos no citotóxicos** que, al unirse a células tumorales, bloquean el acceso a las mismas del complemento y de los linfocitos T. Estos anticuerpos corresponden a los tipos que no fijan complemento ni tienen capacidad de opsonización.

3. **Factores solubles de acción inmunosupresora.** Estos factores han sido identificados tanto en cultivos celulares como en pacientes tumorales. Por ejemplo, muchos tumores

liberan **IL-10**. Otros liberan *factor transformador de crecimiento TGFb*, que puede inhibir respuestas de CTLs. También se ha demostrado acción inmunodepresora de la **α -fetoproteína** producida por tumores y de otros factores que han sido descubiertos en el suero de individuos con tumores sólidos.

4. **Alteración estructural y funcional del TcR**. Este mecanismo descrito recientemente. Se basa en el hecho de que la presencia de células tumorales en un organismo puede dar lugar a largo plazo a una alteración en los mecanismos de transmisión de señales durante la activación de la célula T. Se ha especulado con que este fenómeno pueda ser debido a algún factor soluble liberado por las células cancerosas que induciría una alteración en el receptor de la célula T. Concretamente, las células T de los ratones portadores del tumor muestran en el complejo CD3 unos bajos niveles de expresión de la cadena **β** , siendo además indetectable la cadena **α** . En lugar de esta última cadena, aparece en la superficie un componente del receptor de la IgE. Esta alteración de CD3 lleva aparejada la inexistencia de las tirosin kinasas Lck y Fyn porque éstas no pueden acoplarse al receptor. Los resultados obtenidos en ratones portadores de cáncer son extrapolables al cáncer humano, donde también se han detectado alteraciones del receptor.

5. **Anergia por ausencia de moléculas facilitadoras de la presentación antigénica**. Una razón por la cual las células tumorales pueden fallar en la inducción de inmunidad al no proveen las **señales coestimuladoras** necesarias para la activación de los linfocitos T. Recordamos como para una óptima activación de los linfocitos T, son necesarias una señal antígeno-específica a través del TcR y una segunda señal no antígeno-específica sin la cual la célula T CD4⁺ entraría en un estado de **Anergia**. Esta segunda señal se produce como consecuencia de la estimulación del la molecula CD28 en los linfocitos T gracias a la interaccion con las moleculas B7 expresadas en las células presentadora de antígeno (CPA). El hecho de que B7 sea expresado por CPA profesionales y no por células tumorales, permitiría entender cómo las células tumorales serían ineficaces a la hora de inducir una respuesta antitumoral.

6. ASPECTOS INMUNOLOGICOS DE LAS METASTASIS

La capacidad metastatizante y la heterogeneidad biológica del cáncer son los principales problemas para su erradicación. Aun cuando potencialmente un gran número de células tumorales son capaces de introducirse en la circulación, sólo una mínima proporción de células generan metástasis. Este fenómeno está relacionado con el control genético que rige la formación de metástasis. En este contexto, las metástasis y la tumorigenicidad pueden presentar controles genéticos distintos, como se deriva del hecho de que algunos oncogenes estén específicamente relacionados con la capacidad metastática. Sin embargo, desde una perspectiva inmunológica, el control por el sistema inmune de la formación de metástasis no debe diferir del ejercido durante la malignización. No obstante, pueden existir algunas diferencias entre las celulas que componen el tumor original y las metastasis que explican la aparición de éstas:

1. Es posible que la metástasis se desarrolle concomitantemente con un inadecuada respuesta efectora a través de una insuficiente estimulación, por alteraciones en la expresión de determinadas moléculas coestimuladoras, de adhesión, etc (B7, ICAM-1, LFA-3, VCAM-1...).
2. Las células que origina las metástasis pueden poseer características diferentes a las del tumor del que proceden. Se ha podido comprobar que la composición proteica de las

membranas celulares de clones tumorales, aun procediendo del mismo tumor, son diferentes entre sí dependiendo de su capacidad metastática. En experimentos realizados con tumores de ratón se ha observado que aquellos clones que no expresan antígenos de histocompatibilidad clase I en su membrana, poseen capacidad metastática, capacidad que pierden al ser transfectados con genes HLA clase I. Ello parece indicar que estos antígenos juegan un importante papel en la génesis de las metástasis tumorales.

7. INMUNOLOGIA Y DIAGNOSTICO TUMORAL

La inmunología a través del inmunodiagnóstico puede colaborar en la detección del cáncer en general o bien de un tipo específico de cancer en individuos en que tengamos una sospecha diagnóstica:

- a) Búsqueda en sangre de productos específicos de determinados tumores (**marcadores tumorales**),
- b) Análisis de **moléculas** propias de tumor
- c) En la **localización anatómica** de tumores o sus metástasis mediante anticuerpos dirigidos contra algunos antígenos del tumor
- d) Evaluación del **estado funcional** del sistema inmune del individuo que padece cáncer.

7.1. Estudio de los productos específicos de tumor

Marcadores Tumorales Muchas de las sustancias específicas de tumores son liberadas por los mismos y se encuentran en sangre, en donde pueden ser identificadas y medidas desde fases muy tempranas del desarrollo tumoral. En los últimos años, ha aumentado el interés por la determinación de estas sustancias, cuya presencia o aumento puede servir para el diagnóstico y seguimiento de los tumores malignos. A estas sustancias, en cuanto que se utilizan con fines diagnósticos, se las conoce como **marcadores tumorales**. A diferencia de los llamados antígenos tumorales se han descubierto por su elevada expresión en algunos tumores y no por ser inmunogénicos.

Las sustancias comúnmente utilizadas en este sentido son: el *antígeno carcinoembrionario (CEA)* y la *α-fetoproteína (AFP)*, ambos producidos durante la vida fetal por células intestinales y hepáticas, respectivamente. Sin embargo, los niveles de estas sustancias en el adulto son muy bajos en condiciones normales, apareciendo sólo niveles altos de CEA en la mayoría de enfermos con carcinoma hepático y tumores testiculares. Por tanto, la presencia de grandes cantidades de estos marcadores es indicativa del padecimiento de los tumores indicados con dos precisiones: primera, que los niveles deben de ser altos; y segunda, que éstos no siempre son patognomónicos de dichos cánceres. Por ejemplo, en cánceres de mama y de pulmón pueden aparecer niveles altos de CEA y AFP pero también pueden encontrarse elevados en la hepatitis vírica.

La medida de estos marcadores es también de utilidad en el control que se hace después de la resección quirúrgica, en tanto que, cuando la extirpación del tumor ha sido

total, en pocas semanas descienden los niveles de éstos, mientras que si no lo ha sido o han quedado metástasis, los niveles no descienden. Estos marcadores tumorales, además de ser de utilidad clínica en relación con el **diagnóstico**, también son útiles en el cálculo del **volumen de la masa tumoral**, **pronóstico**, eficacia de la **terapia**, **remisión** y desarrollo de **recurrencias**. En la siguiente tabla se recoge una lista de los principales marcadores que se vienen utilizando en la actualidad y su valor diagnóstico.

APLICACIONES DE LOS MARCADORES TUMORALES EN EL DIAGNÓSTICO

MARCADORES	TUMORES CON LOS QUE SE RELACIONAN
CEA	Tumores colorrectales, carcinoma bronquial, carcinoma gástrico.
AFP	Carcinoma hepatocelular primario, tumores germinales.
HCG, SP1	Carcinomas coriónico, embrionario y teratoide
TPA	Tumores de mama y vejiga.
CA19.9	Tumores gastrointestinales (especialmente carcinoma de páncreas).
CA12.5	Tumores del ovario.
beta 2m	Enfermedades tumorales del sistema linfático
Calcitonina	Carcinoma tiroideo medular, carcinoma bronquial.
Tiroglobulina	Carcinoma tiroideo.
TAP	Carcinoma de próstata.
Ferritina	Enf. de Hodgkin, leucemia linfática y mieloides tumores germinales.

Por otra parte, hoy se comienza también a emplear la detección de algunas **oncoproteínas** en el diagnóstico tumoral. Ello es posible al disponer de anticuerpos monoclonales frente a las oncoproteínas codificadas por los *oncogenes c-myc, c-ras, c-erb-C, c-sys y c-fos*. Algunos carcinomas colorrectales poseen niveles altos de la *proteína p21* (c-ras) cuando invaden la mucosa; en carcinomas de próstata, la expresión de esta misma proteína parece correlacionarse con el grado de anaplasia de las células tumorales. Otras proteínas oncogénicas, como la *p62* (c-myc), han sido detectadas en niveles altos en carcinomas de colon, mama y testículos, variando sus niveles según el grado de diferenciación celular.

ESTRUCTURAS PROPIAS DE TUMOR, se han definido antígenos que son comunes a un determinado grupo de leucemias, como es el caso del *antígeno común de las leucemias agudas linfoblásticas (CALLA)*, etc. En este sentido, el uso combinado de distintos anticuerpos monoclonales a la hora de estudiar diferentes procesos leucémicos, contribuye a establecer con gran precisión y seguridad el diagnóstico correspondiente. Asimismo se pueden utilizar algunos marcadores para la definición de los fenotipos leucémicos y por

tanto para la detección de la enfermedad mínima residual. Así por ejemplo, ocurre con la combinación de marcadores tales como TdT⁺/CD3 ó CD1/TdT⁺ en el caso de las LAL-T, dado que estos fenotipos son exclusivos del timo y no de linfocitos de sangre periférica. Otro ejemplo la combinación CD10/CD19 podría ser muy aconsejable en el rastreo de enfermedad mínima residual de un subgrupo de leucemias B.

MARCADORES LINFOIDES MÁS UTILIZADOS EN EL DIAGNÓSTICO DE PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS DE TIPO B

Marcadores	LLC-B	Discrasias Plasmáticas	LLA-nulas	LLA-común	LLA-pre B	LLA-B
CD 19	+	--	+	+	+	+
CD 9	+	--	-/+	+	+	-
CD 10	+	-/+	-	+	+	-/+
CD21	+	--	-	-	-	-
Igs	+	--	-	-	-	IgM
CD38	-	+	-	-	-	-

MARCADORES MÁS UTILIZADOS EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES MALIGNAS DE CÉLULAS T

	LLC-T	Síndrome de Sezary	LLT-A	Linfomas linfoblásticos	LLA-T
CD 3	+	+	+	-	-
CD 4	-/+	+	+	-	-
CE 1	-	-	-	-	+
CD 8	-/+	-	-	-	-
CD 7	-/+	-	-	+	+
CD 2	+	+	+	+	+
CD 5	-/+	+	+	-	-/+
HLA (II)	-	-/+	-/+	-	-
CD 25	-	-	+	-	-
TdT	-	-	+/-	-	+

7.2. Evaluación del sistema inmune en individuos cancerosos.

La evaluación del sistema inmune en individuos cancerosos es de gran importancia para el establecimiento del pronóstico de dichos pacientes. Este tipo de evaluación se realiza empleando las técnicas ya indicadas en el capítulo 5. Con ello se estudia el comportamiento general de cada uno de los tipos de respuesta específica (respuesta humoral y celular), así como de macrófagos, y células NK.

7.4. Localización anatómica de tumores y metástasis

Cuando se trata de tumores sólidos, uno de los problemas más serios a la hora de evaluar el pronóstico de un enfermo oncológico es determinar la existencia de micrometástasis, dado que en muchos casos éstas no son detectables por los métodos convencionales. Los métodos más sofisticados utilizados hasta el momento con este fin, han sido la *tomografía axial computerizada* (TAC) y la *técnica de inmunoescintografía*.

La técnica de inmunoescintografía consiste en la administración al paciente de un anticuerpo monoclonal marcado con un radioisótopo y que reconozca específicamente un determinado antígeno del tumor. Después de un período de tiempo variable, el anticuerpo marcado quedará retenido en las zonas donde existan células cuya localización anatómica se podrá realizar utilizando una gammacámara. A través de este mecanismo pueden detectarse desde tumores de gran tamaño a metástasis de muy pequeño tamaño no detectables por otros procedimientos. Mediante este procedimiento, y empleando Fab anti-CEA, se pueden detectar del 80 al 90 por 100 de los carcinomas de colon o sus metástasis.

8. INMUNOTERAPIA

Las formas habituales de tratamiento de los enfermos cancerosos con *radioterapia*, *cirugía* y *quimioterapia* no son suficientes en multitud de casos, sobre todo en cánceres con gran invasión de tejidos o con metástasis. Prueba de ello es que, en la actualidad, la segunda causa de muerte es el cáncer, lo que está dando lugar a un gran esfuerzo de médicos e investigadores para encontrar terapias alternativas. Ello se está llevando a cabo a través del perfeccionamiento de los sistemas tradicionales de tratamiento y a través de la introducción de nuevas formas terapéuticas, entre las cuales se tienen puestas grandes esperanzas en el desarrollo de la *inmunoterapia*. Desde el punto de vista inmunológico, el éxito del tratamiento inmunoterapéutico va a depender sobre todo de la capacidad del sistema inmune para desarrollar una respuesta citolítica.

Efectivamente, desde que se tienen pruebas de que la aparición y desarrollo de tumores se relaciona con un posible fallo funcional del sistema inmune, se piensa que la activación del mismo en enfermos cancerosos podría ser un medio eficaz de lucha contra esta enfermedad, de igual forma que ha ocurrido con la profilaxis y el tratamiento de las enfermedades infecciosas. En ciertos tipos de tumores los resultados que se están obteniendo son realmente esperanzadores, sobre todo en tumores de células libres (leucemias), y también en la extirpación de los tumores sólidos para evitar el crecimiento y desarrollo de metástasis.

Las nuevas estrategias en la inmunoterapia incluyen la administración de citocinas y otros agentes inmunoterapéuticos, la transferencia de células autólogas estimuladas *in vitro* y por último la utilización de vacunas a partir de células tumorales modificadas o alteradas genéticamente.

8.1. Citoquinas y otros agentes

La utilización de citocinas en la inmunoterapia del cáncer ha estado focalizada hacia la estimulación de las propias defensas del individuo (IL-2, IFN γ , etc) o hacia la destrucción de las células tumorales (TNF α). La terapia con citoquinas se ha beneficiado recientemente de la posibilidad de disponer de ellas de forma recombinante, sin embargo

en la mayoría de los casos su administración sistémica da lugar a la aparición de importantes efectos secundarios.

IL-2. La obtención y purificación de *interleucina 2* humana primero y la producción de IL-2 humana recombinante después, ha permitido disponer de ella en la investigación biológica y en estudios sobre inmunoterapia del cáncer. El grupo de Rosenberg ha podido demostrar que la utilización de IL-2 sola o en combinación con LAK media la regresión de micrometástasis pulmonares y hepáticas en animales, potenciando significativamente la generación de células citolíticas, existiendo una relación directa entre la cantidad de IL-2 administrada y el efecto terapéutico desarrollado. En la actualidad, se está comenzando también a utilizar con carácter experimental la IL-2 como agente inmunoterapéutico frente a tumores y metástasis humanos. Altas dosis de IL-2 son necesarias para el tratamiento del carcinoma renal y el melanoma, mostrando sin embargo una severa toxicidad. Muchos de los efectos tóxicos se pueden suprimir con inhibidores de la producción de TNF tales como la pentoxifilina, lo cual ha abierto nuevas expectativas del tratamiento con IL-2.

TNF. Estudios muy recientes indican que la administración sistémica de TNF en ratones portadores de tumor induce una regresión de algunos de ellos. De igual manera su aplicación en clínica parece ejercer algún efecto en algunos tumores de mama, a través de mecanismos aún no bien establecidos, si bien el componente inflamatorio local parece participar de manera importante. La disponibilidad actual de TNF recombinante permitirá un mejor conocimiento de su potencial terapéutico en humanos. Sin embargo, los estudios en humanos han revelado una gran toxicidad de esta citocina. La acción citotóxica es debida a la interacción con el receptor R55, que es expresado en un gran número de células. Por contra se cree que la toxicidad, es debida a la interacción con el receptor R75 presente en células de estirpe hematopoyética. En este sentido se están diseñando moléculas de TNF modificadas que presentan mucha mayor afinidad por el receptor R55.

GM-CSF. El factor estimulador de la formación de colonias de estirpe gránulo-macrofágica es a la vez un factor de crecimiento de las células dendríticas y de otras células presentadoras de antígenos. Es posible que un aumento de la inmunogenicidad de los tumores sea la responsable de la inducción de respuestas antitumorales, tanto de origen humoral como celular.

BCG. El tratamiento con el bacilo de Calmette-Guérin en el cáncer superficial de vejiga ha producido excelentes resultados. El mecanismo por el que éste bacilo actúa no está claro, pero este tratamiento induce una potente respuesta inflamatoria del epitelio.

Inmunotoxinas. Están constituidas por anticuerpos monoclonales acoplados a una potente toxina y dirigidos contra alguna molécula expresada por las células cancerosas. Este tipo de tratamientos reduciría en gran medida la falta de especificidad de los tratamientos convencionales, con lo cual permitiría una reducción de la dosis del fármaco, gracias a la mayor concentración del fármaco citotóxico en las inmediaciones del tumor. Las toxinas más comúnmente empleadas son derivados de bacterias y plantas (toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina de ricina, etc), citostáticos (metotrexato, 5-fluorouracilo), isótopos (^{131}I). Mientras, los ligandos hacia los que van dirigidos los anticuerpos pueden ser receptores de factores de crecimiento, o moléculas asociadas a tumor.

La introducción de técnicas de clonaje ha permitido la obtención de anticuerpos humanizados que reducen significativamente la sensibilización que cabe esperar por la utilización de anticuerpos murinos, inconveniente más destacado de los tratamientos prolongados con inmunotoxinas.

8.2. Activación de células *in vitro*

La inmunoterapia celular está basada en la transferencia de linfocitos T autólogos activados con IL-2 en combinación con la administración sistémica de IL-2. En primer lugar se realiza la activación *in vitro*, tratando linfocitos (bien de sangre periférica o infiltrantes del tumor) con IL-2 durante 3 a 4 días dando lugar de esta forma a células LAK lo cual potencia los efectos sistémicos de la IL-2. Esta terapia se ha mostrado eficaz principalmente en tratamientos contra melanomas y cánceres de colon. Los TIL han demostrado ser 50 a 100 veces más eficaces en el tratamiento y erradicación de micrometástasis. Además, cuando se administran conjuntamente con ciclofosfamida e IL-2 se han mostrado capaces de erradicar tumores de gran tamaño frente a los que las LAK de sangre periférica no son eficaces. Los riesgos de este tipo de inmunoterapia son debidos también a la toxicidad de la IL-2 que, ya ha sido abordada en el apartado anterior.

8.3. Vacunas

La utilización de células tumorales como vacunas constituye una estrategia de tratamiento antitumoral que goza ya de una larga historia. Los avances más significativos se han obtenido con la utilización de células tumorales con adyuvantes o con el empleo de células tumorales modificadas genéticamente.

Vacunas tumorales con adyuvantes. Normalmente estas estrategias parten de células tumorales autólogas irradiadas. Los resultados más alentadores en la clínica oncológica se están obteniendo a través de la activación inespecífica del sistema inmune mediante el empleo de vacunas con BCG y *Clostridium parvum*. En este mismo sentido, también en humanos se están obteniendo resultados muy alentadores por parte de diferentes equipos médicos, entre los que se cuenta el grupo del Dr. Mathè, que obtuvo un notable incremento en la supervivencia de pacientes con leucemia mieloide crónica, cuando además de quimioterapia usaba vacunación con BCG y células tumorales inactivas.

Vacunas con células tumorales modificadas genéticamente. Estas estrategias van dirigidas hacia la alteración de la célula tumoral con el objetivo de aumentar su inmunogenicidad. Si recordamos el modelo de doble señal para la activación de la célula T que ya ha sido mencionado, no nos sorprenderá que las aproximaciones más importantes se hayan dirigido hacia la potenciación de la primera o de la segunda señal. Así tenemos:

Introducción de genes del MHC. Como ya ha sido mencionado, los tumores pierden con relativa frecuencia los antígenos del MHC. Por tanto, esta modificación implica la restauración de la expresión de moléculas, generalmente de clase I. En la práctica esta aproximación implica una individualización del tratamiento, por lo que únicamente ha sido abordada a nivel experimental.

Introducción del gen B7. La transfección de este gen ha llevado aparejado el rechazo de las células tumorales en huéspedes singénicos. Se ha postulado que el mecanismo por el cual B7 actuaría sería el de su participación como segunda señal en la activación de la célula T, por lo que las propias células tumorales podrían activar directamente a los linfocitos .

Introducción de genes de citocinas. El objetivo de estas estrategias es alterar el microambiente tumoral, facilitando el reclutamiento y la activación de los mecanismos efectores celulares. Muchas citocinas han variado tanto las condiciones de inmunogenicidad como las de crecimiento del tumor. Los efectos biológicos observados son muy variables y van a depender de la citocina en cuestión.

EFFECTO PRODUCIDO POR LA INTRODUCCIÓN DE GENES DE CITOCINAS EN CÉLULAS TUMORALES SOBRE LA RESPUESTA ANTITUMORAL

CITOQUINA	EFFECTO IN VIVO
IL-2	Masiva infiltración de linfocitos y regresión.
IL-4	Masiva infiltración de macrófagos y eosinófilos, aumento de la capacidad de presentación antigénica a células CD8 y CD4 y regresión del tumor.
IFN γ	Aumento de MHC I y II y en algunos tumores se obtiene una respuesta de rechazo.
TNF α	Crecimiento más lento de las células transfectadas in vitro.
IL-7	Respuesta antitumoral sistémica en mielomastocitomas.
GM-CSF	Masiva infiltración de linfocitos y regresión.

Introducción de antígenos de rechazo. La identificación de antígenos de rechazo a partir de los trabajos pioneros del grupo de T. Boon ha abierto nuevas perspectivas de inmunointervención, a través de la introducción de genes que codifican proteínas o péptidos mutados capaces de despertar una intensa respuesta citolítica.

BIBLIOGRAFIA

1. Bishop JM. 1987. *The molecular genetics of cáncer.* Science 235:305-311
2. Linsley PS.1992. *Costimulation of antitumor Immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4.* Cell 71:1093-1102
3. Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern PL. 1993. *Natural history of HLA expression during tumor development.* Immunology Today, 14:491-499
4. Klein E, Mantovani A.1993. *Action of natural killer cells and macrophages in cancer.* Curr Op Immunology, 5:714-718

5. Peña J y Solana R.:1992. *MHC antigens in NK recognition and lysis*. Immunology Research, 11:130-140.
6. Schirmacher V. 1992. *Immunity and metastasis: In situ activation of protective T cells by virus modified cancer vaccines*. Cáncer Surveys 1992, 13:129-154
7. *immunotherapy of cancer*. Critical Care Medicine, 18:144
8. Vitetta ES, Thorpe PE, Uhr JW.1992. *Immunotoxins: magic bullets or misguided missiles?*. Immunology Today, 14:252-259
9. Sogn JA. 1999. Tumor Immunology: The glass is half full. Immunity 6:757-764
10. Toes REM, Ossendorp F, Offringa R, Melief JM. 1999. CD4 T cells and their role in antitumor Immune response. J. Exp. Med. 189:753-756