

PROGRESOS RECIENTES EN INMUNOLOGIA BASICA A NIVEL CELULAR

Dr. Andrés Soyano L.*

* Centro de Medicina Experimental
Inst. Venezolano de Investigaciones
Científicas (I.V.I.C.).

En los últimos 25 años, la inmunología y sus diversas subdisciplinas han sufrido un cambio cualitativo y cuantitativo extraordinario que les ha permitido adquirir una fisonomía propia. Particularmente, en lo que va de la década de 1980 se han hecho avances notables en el conocimiento de los fenómenos y mecanismos involucrados en la regulación de la respuesta inmunitaria. Tales avances han sido posibles gracias a la aplicación de técnicas derivadas de la genética molecular y al desarrollo de nuevas técnicas inmunológicas propiamente dichas, utilizadas ambas dentro de una nueva concepción investigativa. Estos métodos, desarrollados inicialmente para investigaciones biológicas básicas, han comenzado también a aplicarse al estudio de problemas de patología humana, área donde han generado nuevos conocimientos sobre la patogénesis de ciertas enfermedades, lo cual, a su debido tiempo, permitirá obtener nuevas posibilidades terapéuticas.

Desde una perspectiva muy personal, las áreas donde estos progresos se han realizado, están enumerados en la tabla 1, y serán discutidos en mayor detalle a continuación.

Tabla No. 1
ASEAS DE PROGRESOS RECIENTES EN
INMUNOLOGIA BASICA

1. Hibridación y clonaje de células inmunitarias.
2. Estudios genéticos moleculares.
3. Caracterización de los antígenos de histocompatibilidad y su función biológica.
4. Mecanismos inmunitarios efectores.
5. Mecanismos de inmunoregulación

1. HIBRIDACION Y CLONAJE DE CELULAS **INMUNITARIAS**

La técnica de hibridación de células inmunocompetentes con células de mieloma, introducida en 1975 por Georg Köhler y César Milstein⁽⁹⁾, la cual permite la formación de hibridomas o estirpes celulares "inmortales", ha continuado dando numerosos frutos. Además de los an-

ticuerpos monoclonales descritos alrededor de 1980, que permiten reconocer diversas subpoblaciones de linfocitos y monocitos, se han producido anticuerpos monoclonales contra diversas estructuras de la superficie celular involucradas en las interacciones celulares. Así, por ejemplo, además de las moléculas T3, T4 y T8, que caracterizan a los linfocitos T en general, a los linfocitos T cooperadores y a los linfocitos T citotóxicos/supresores, respectivamente, se ha postulado la existencia de una molécula T1, que probablemente corresponde al receptor antigénico de los linfocitos T⁽¹³⁾. También se han producido anticuerpos monoclonales que permiten diferenciar o subdividir la subpoblación T8, en sus dos componentes, los linfocitos citotóxicos y los supresores. Es importante señalar que la nomenclatura para designar los marcadores de superficie de los leucocitos humanos ha sido modificada recientemente, sugiriéndose el uso de las siglas CD (complejo (cluster) de diferenciación) seguidas de un número, para designar los diferentes antígenos de superficie; así, los marcadores de linfocitos, T3, T4 y T8, deben designarse ahora CD3, CD4 y CD8, respectivamente.⁽²⁾

Mediante la técnica de hibridación celular, se han podido producir también hibridomas de linfocitos T con una función particular, por ejemplo, hibridomas citotóxicas, supresores o cooperadores. Esto ha permitido el estudio más detallado de dichas funciones celulares bajo condiciones mejor controladas experimentalmente.

Por otra parte, el aislamiento y caracterización de moléculas involucradas en las interacciones celulares que tienen lugar en una respuesta inmunitaria, ha permitido mantener en cultivo, durante largos períodos de tiempo, a linfocitos normales, obteniéndose así subpoblaciones relativamente puras que ejercen una determinada función y que pueden ser consideradas como clones linfocitarios.⁽¹¹⁾ Entre tales sustancias, resalta fundamentalmente la interleuquina 2, conocida anteriormente con el extenso nombre de "factor de crecimiento de linfocitos T" (TCGF, en sus siglas inglesas). El clonaje de linfocitos T ha facilitado, entre otras cosas, el aislamiento del receptor antigénico de linfocitos T y el mecanismo de lisis de las células citotóxicas. Ambos aspectos serán discutidos más adelante.

2. ESTUDIOS GENETICOS MOLECULARES

La aplicación de técnicas de genética molecular al estudio de la organización genética en linfocitos ha producido frutos realmente extraordinarios. Ello ha permitido extender el estudio de los genes que codifican la síntesis de las inmunoglobulinas, sustanciándose aún más el concepto introducido por Susumu Tonegawa y sus colaboradores en 1976, según el cual, tales genes sufren un proceso de reorganización durante el proceso de maduración celular, que culmina con la formación de un gen estructuralmente activo.⁽¹⁷⁾ Estos genes, como era de esperarse, también están presentes en el genoma de células no linfoides, pero en ellas, no sufren el proceso de reorganización. Este concepto básico ha comenzado a tener su aplicación a nivel clínico, especialmente en el estudio de linfomas y leucemias, facilitando la identificación de las células involucradas en estos procesos, y contribuyendo además a establecer una base más adecuada para un mejor entendimiento del proceso de transformación maligna en general.⁽⁶⁾ Para mencionar un solo ejemplo, baste decir que un porcentaje alto de tumores linfoides que antes eran clasificados como de tipo "nulo" o "ni T ni B" por carecer de marcadores de superficie correspondientes a dichas células, ahora pueden ser considerados de tipo B, ya que presentan genes de inmunoglobulinas reorganizados, fenómeno que sólo se observa en células de la estirpe de los linfocitos B. En la actualidad, estas técnicas son todavía algo complicadas para su aplicación clínica rutinaria, pero probablemente es sólo cuestión de tiempo el que se logre una mejoría tecnológica que permita su mayor uso y aplicación a nivel clínico.⁽⁶⁾

Otros aspectos genéticos relacionados con el tema en discusión es el relacionado con translocaciones cromosómicas y activación de oncogenes en células linfoides, lo cual puede contribuir a un mejor entendimiento del proceso oncogénico en general. Se ha postulado la idea de que la oncogénesis puede ser el resultado de la activación de oncogenes durante eventos de translocación cromosómica, lo cual conduciría a una proliferación incontrolada, propia de las células malignas. Este fenómeno ha sido detectado tanto en linfomas de Burkitt como en linfomas foliculares.⁽⁶⁾

El uso de las técnicas de ADN recombinante ha permitido recientemente la producción en cantidades puras y abundantes de varias sustancias de importancia en la regulación de la respuesta inmunitaria, como ejemplo de lo cual se pueden mencionar las interleuquinas 1 (IL-1) y 2 (IL-2).⁽⁴⁾⁽¹⁴⁾

Haré un breve paréntesis para referirme a investigaciones recientes sobre la naturaleza del receptor antigénico de los linfocitos T. Debemos recordar que las bases moleculares por las cuales los linfocitos T reconocen al antígeno ha sido uno de los aspectos más intensamente investigados en los últimos 15 años, con resultados sumamente controversiales. Sin embargo, nuevas investigaciones en esta área permiten establecer una mejor perspectiva, cuyos frutos están finalmente a j vista. Dos principales aproximaciones han sido fundamentales para lograr dilucidar la naturaleza de este receptor antigénico. En una de ellas, se han aislado

moléculas de la superficie celular que son clonotípicas, es decir, que están presentes solamente en la superficie de un determinado clon de linfocitos T⁽¹⁴⁾. Anticuerpos preparados contra esas moléculas inhiben la activación de los correspondientes linfocitos por el antígeno apropiadamente presentado. Tales moléculas han sido parcialmente caracterizadas en su estructura bioquímica, estableciéndose que, en forma similar a lo que ocurre con las inmunoglobulinas, presentan una región variable y una constante, y están formadas por 2 cadenas que han sido denominadas alfa y beta.⁽¹⁵⁾⁽¹⁸⁾

La segunda aproximación ha sido mediante técnicas de genética molecular, lo cual ha permitido aislar los genes correspondientes a las cadenas alfa y beta, previamente mencionadas.⁽¹⁵⁾ Estos genes tienen las siguientes características, que son las que se esperarían de los genes que codifican al receptor antigénico en cuestión:

1. Se expresan sólo en linfocitos T.
2. Están estructuralmente relacionados con los genes que codifican la síntesis de inmunoglobulinas, que como se sabe, actúan como el receptor antigénico en los linfocitos B.
3. Al igual que los genes de inmunoglobulinas, sufren un proceso de reorganización a medida que el linfocito T madura.

Nuevos estudios se necesitan para afinar este nuevo concepto, pero esto representa un avance notable sobre el caos existente en dicha área, unos pocos años atrás.

3. CARACTERIZACION DE LOS ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y SU FUNCION BIOLOGICA

Las técnicas de genética molecular también han sido aplicadas exitosamente a la caracterización molecular y a la organización genética de los antígenos de histocompatibilidad.⁽⁵⁾ Por otra parte, en años recientes se ha consolidado el concepto, según el cual el reconocimiento del antígeno por parte de linfocitos T no supresores sólo es posible cuando dicho antígeno es "presentado" por una célula adecuada, la cual debe poseer una determinada clase de antígenos de histocompatibilidad, que también son reconocidos.⁽¹²⁾ Tal fenómeno se ha denominado reconocimiento asociativo. Así, los linfocitos T cooperadores (Th) reconocen al antígeno en asociación con moléculas Ia o H2-D, y los citolíticos (Tc), en asociación con moléculas H2-D o K (en el modelo murino) o HLA-A, B o C (en el modelo humano). La interacción de linfocitos T con un antígeno en ausencia de la célula presentadora adecuada, conduce a la activación de linfocitos T supresores, en vez de linfocitos T cooperadores. Además de esta restricción en el reconocimiento antigénico, algunos linfocitos T interactúan con linfocitos B, en los cuales reconocen específicamente el isotipo de las inmunoglobulinas de superficie, la cual actúa como elemento restrictivo. Así pues, el reconocimiento asociativo o restringido del antígeno parece ser un fenómeno general dentro de la población de linfocitos T.

4. MECANISMOS INMUNITARIOS EFECTORES

Durante la década de 1970, se estableció el concepto de que el rechazo de trasplantes se realiza principalmente a través de la subpoblación de linfocitos T, asumiéndose que eran los linfocitos T citolíticos (Tc) los encargados de ejercer tal efecto. Sin embargo, desde 1981 se han venido reportando evidencias que sugieren que los linfocitos T cooperadores (Tc) también desempeñan un papel importante en el rechazo de trasplantes, el cual se ejecuta más efectivamente a través de una combinación de linfocitos Tc y Th. El papel de los linfocitos Th sería fundamentalmente el de producir sustancias o moléculas críticas para el desarrollo de los linfocitos Tc, que serían los que directamente afectarían las células del trasplante. Además, secretarían "factores no específicos" que promoverían fenómenos inflamatorios y subsecuente daño tisular.⁽¹⁶⁾

Un fenómeno que ha sido investigado activamente en los últimos años es el del mecanismo de acción de los linfocitos T citolíticos, cuya función es de gran importancia, no sólo en el rechazo de trasplantes, sino también en la destrucción de células neoplásicas o células infectadas por virus. Recientemente se han descrito lesiones características en las membranas de células lisadas por linfocitos Tc, que semejan las lesiones producidas por el sistema del complemento. Tales lesiones se presentan como estructuras tubulares transmembranosas que alteran la permeabilidad celular y conducen a la lisis osmótica de la célula afectada. Estas nuevas estructuras han sido denominadas poliperforinas y tienen su origen en gránulos citoplasmáticos de las células citolíticas tanto de tipo NK como Tc.⁽³⁾

5. MECANISMOS DE INMUNOREGULACION

Investigaciones recientes, especialmente en modelos in vitro, sugieren que los eventos de una respuesta inmunitaria, por ejemplo, la producción de anticuerpos, ocurren conforme al siguiente patrón:⁽¹⁾

1. Procesamiento del antígeno por células del sistema fagocitario mononuclear.
2. Presentación del antígeno por células que poseen los antígenos de histocompatibilidad pertinentes (usualmente macrófagos), y reconocimiento asociativo por parte de los linfocitos T, lo cual lleva al establecimiento de un estrecho contacto entre ambos tipos de células.
3. De esta interacción, ambas células se activan, el macrófago secreta interleuquina 1, la cual actúa sobre los linfocitos T, estimulando su producción de interleuquina 2.
4. Esta última sustancia actúa sobre los linfocitos T cooperadores con receptores específicos para la interleuquina, promoviendo su crecimiento o proliferación.
5. Los linfocitos Th así generados reconocen el antígeno en asociación con moléculas de histocompatibilidad en la superficie de linfocitos B, y secretan linfoquinas que estimulan la proliferación y diferenciación de éstos en plasmocitos.

A pesar de que el panorama de estas interacciones celulares se ha aclarado notablemente, todavía quedan algunos aspectos por resolverse, los cuales serán dilucidados, muy

probablemente, en los próximos años.

In vivo, se han añadido nuevas evidencias al concepto de la regulación idiotípica, propuesta por Niels Jerne en 1975.⁽¹⁾⁽⁷⁾ El elemento central de esta teoría señala que durante la generación de una respuesta inmunitaria, los anticuerpos producidos, expresan determinantes antigénicos (idiotipos) para los cuales el organismo no es tolerante, por lo cual se genera una segunda respuesta contra tales idiotipos (anticuerpos anti-idiotípicos). A su vez, estos anticuerpos presentarán nuevos idiotipos, los cuales estimularán una nueva respuesta (anticuerpos anti-anti-idiotípicos), y así sucesivamente. Los diversos anticuerpos generados en esta forma, estarían interconectados en una especie de red que potencialmente involucraría a todo el sistema inmunitario. La teoría de la red idiotípica incluye además un postulado de importancia fundamental, según el cual el sistema inmunitario contiene dentro de su conjunto de receptores antigénicos (anticuerpos y receptores de linfocitos T), imágenes o duplicados de todos los determinantes antigénicos contra los cuales él es capaz de reaccionar. Esto significa que el sistema se desarrollaría independientemente de la presencia de antígenos externos al organismo, al menos a un nivel mínimo o basal. Según este concepto, sería posible inmunizar a un individuo con anticuerpos anti-idiotípicos que fueran la imagen interna de un determinado antígeno externo. Esta especulación ha sido confirmada en años recientes y ha generado una gran actividad investigativa, fundamentalmente por su potencial en la creación de nuevas vacunas. Un ejemplo de esto ha sido demostrado con el virus de la hepatitis.⁽⁸⁾ Un animal que ha sido inmunizado con este virus genera anticuerpos antivirales específicos; estos anticuerpos se pueden utilizar para inmunizar un segundo animal, el cual producirá anticuerpos, entre los cuales se encontrarán anticuerpos anti-idiotípicos que serán la imagen interna de los determinantes antigénicos del virus de la hepatitis. Se ha observado que la inmunización activa de un tercer animal con los anticuerpos anti-idiotípicos genera inmunidad antiviral específica contra el virus de la hepatitis. Así pues, se ha demostrado la factibilidad de inmunizar contra una determinada enfermedad viral, utilizando los anticuerpos anti-idiotípicos correspondientes en vez del antígeno viral o el virus propiamente dicho.

Otro aspecto a considerar en el área de la inmunoregulación, especialmente a nivel clínico-terapéutico, es el desarrollo del conocimiento sobre sustancias inmunoreguladoras, entre las cuales se encuentran las interleuquinas, los interferones y los leucotrienos, entre otras. Especialmente las dos primeras pueden ser producidas en forma muy purificada y en cantidades relativamente abundantes mediante el uso de clones celulares o a través de la inserción del gen correspondiente en bacterias (técnica del ADN recombinante).⁽⁴⁾⁽¹⁴⁾ Esto ha permitido una mejor caracterización de estas moléculas desde los puntos de vista estructural y funcional, y el inicio de las primeras pruebas clínicas, especialmente en el tratamiento de tumores e inmunodeficiencias.

En conclusión, podemos decir que la inmunología, a nivel básico, ha continuado revolucionando nuestro conoci-

miento sobre la organización y funcionamiento del sistema inmunitario y ampliando nuestras perspectivas sobre la posible aplicación de tales conocimientos a la medicina.

BIBLIOGRAFIA

1. ABDU N.I.: The idiotype-antiidiotype network in human autoimmunity. *J. Clin. Immunol.* 5: 365, 1985.
2. BERNARD A., BOUMSELL L.: The clusters of differentiation (CD) defined by the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens, *Human Immunol.* 11: 1, 1984.
3. CRIADO M., LINDSTROM J.M., ANDERSON C.G., DENNERT G.: Cytotoxic granules from killer cells: specificity of granules and insertion of channels of defined size into target membranes. *J. Immunol.* 135: 4245, 1985.
4. DURUM S.K., SCHMIDT J.A., OPPENHEIM J.J.: Interleukin 1: an immunological perspective. *Ann. Rev. Immunol.* 3: 263, 1985.
5. GERMAIN R.N., BENTLEY D.M., BROWN M.A., LECHLER R., MARGULIES D.H., NORCROSS M.A., TOU J.: Use of molecular techniques for analysis of structure-function relationships. *Fed. Proc.* 44: 2730, 1985.
6. HARRIS N.L.: The impact of molecular genetics on the study of lymphoid neoplasia. *Lab. Inv.* 53: 509, 1985.
7. JERNE N.K.: Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol.* 125: 373, 1974.
8. KENNEDY R.C., DREESMAN G. R.: Enhancement of the immune response to hepatitis B surface antigen: In vivo administration of antiidiotype induces anti-HBs antibodies that express a similar idiotype. *J. Exp. Med.* 159: 655, 1984.
9. KOHLER G., MILSTEIN C.: Continuous culture of fused cells secreting antibody of predetermined specificity. *Nature* 256:495, 1975.
10. KOHLER H., McNAMARA M.K., WARD R.E.: Idiotype regulation: a model for B cell tolerance. *Fed. Proc.* 44: 2480, 1985.
11. MARRACK P., HANNUM C., HARRIS M., HASKINS K., KUBO R., PIGEON M., SHIMONKEVITZ R., WHITE J., KAPPLER J.: Antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted T cell receptors. *Immunol. Rev.* 76: 131, 1983.
12. PAUL W.: The immune system: an introduction. En: "Fundamental Immunology", Cap. 1, pp. 3-22. Raven Press, New York, 1984.
13. REINHERZ E.L., MEUER S. C., SCHLOSSMAN S.F.: The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. *Immunol. Today* 4: 5, 1983.
14. ROBB R.J.: Interleukin 2: the molecule and its function. *Immunol. Today* 5: 203, 1984.
15. SIU G., CLARK S.P., YOSHIKAI Y., MALISSEN M., YANAGI Y., STRAUSS E., MAK T.W., HOOD L.: The human T cell antigen receptor is encoded by variable, diversity, and joining gene segments that rearrange to generate a complete V gene. *Cell* 37: 393, 1984.
16. STEINMULLER D.: Which T cells mediate allograft rejection? *Transplantation* 40: 229, 1985.
17. TONEGAWA S.: Reiteration frequency of immunoglobulin light chain genes. Further evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73: 203, 1976.
18. YAGUE J., WHITE J., COLECLOUGH C., KAPPLER J., PALMER E., MARRACK P.: The T cell receptor: The alpha and beta chains define idiotype, and antigen and MHC specificity. *Cell* 42: 81, 1985.