

NOTAS INMUNOLÓGICAS

ANA CATALINA ALVAREZ CHICA, DIANA MARCELA PAEZ ANAYA

(II Semestre de Medicina)

NOTAS INMUNOLÓGICAS.

A través de los años de evolución y progreso en el campo de la Medicina, la Inmunología como tal ha servido como una valiosa herramienta en las diversas investigaciones que actualmente se adelantan. Además, en el propio contexto de ésta el avance ha sido sorprendente: cada día se descubren nuevas cosas ya sea relacionadas con sus componentes celulares, estructurales y bioquímicos o con el tratamiento exitoso de las patologías que este sistema conlleva..

PROCESOS MOLECULARES Y CELULARES

En la presente sección, daremos a conocer interesantes experimentos que utilizando el potencial de los Anticuerpos, han aportado numerosos e innovadores datos sobre los procesos principales que comprometen el sistema inmune.

I.APOPTOSIS

La Apoptosis es un mecanismo celular que puede ser responsable de numerosos acontecimientos fisiológicos y patológicos, de los cuales cabe mencionar:

- La destrucción programada de las células durante la embriogénesis
- Involución Hormonodependiente en el adulto
- Deleción celular en la proliferación de poblaciones celulares
- Muerte celular en tumores
- Muerte de las células inmunitarias.
- Muerte celular inducida por células T Citotóxicas

Los últimos numerales son los que directamente se relacionan con los proyectos realizados..

1. Proteína en la membrana mitocondrial definida por un nuevo anticuerpo monoclonal es preferencialmente detectada en las células apoptóticas.

El presente estudio, ha marcado un paso importante en el camino hacia el entendimiento claro y preciso del proceso apoptótico. Se identificaron algunos de los genes y sus productos , los cuales regulan este mecanismo celular.

Un panel de genes llamados mAbs fueron cultivados por inmunización junto con células moribundas de ratones que estaban bajo las condiciones de la apoptosis, Uno de estos genes el anti- 7A6, se encontró que reaccionaba con las células apoptóticas.

En otro cultivo realizado usando la prueba de ELISA y la citometría de flujo observaron una pequeña reactividad del anti-7A6 en condiciones normales, contra linfocitos en sangre periférica y contra un gran número de la línea hematopoyética celular.

Posteriormente el Ab, reaccionaba fuertemente contra estas células cuando eran inducidas al proceso apoptótico por irradiación o tratamiento con agentes inductores de apoptosis.

Los estudios de clasificación de las células, fragmentación de su DNA revelaron que las células 7A6 positivas, y no las 7A6 negativas poseían aparentemente fragmentos de DNA característicos de células bajo condiciones de apoptosis. A continuación por medio del inmunoblotter y bajo las condiciones adecuadas, se encontró que el anti-7A6 detectaba una banda proteica, la 38-kDa la cual se situaba en las células lisadas por la apoptosis. Luego, la microscopia inmunoelectrónica mostró que el antígeno 7A6 se localizaba en la membrana mitocondrial de las células apoptóticas.

Como conclusión estos resultados indicaron que el anti 7A6 definía un nuevo epítotope en la membrana mitocondrial, que aparecía cuando se exponía a la célula a la apoptosis, sugiriendo que la molécula 7A6 podría estar envuelta en la cascada molecular de la muerte celular programada.

The Journal of Immunology: Volume: 157 Number :9 pages. November 1 1996

2. Las células T humanas requieren de la Interleukina 2 para el proceso de la transición a adquirir sensibilidad para la Apoptosis mediada por Fas.

Se ha considerado que la interacción entre Fas y el ligando Fas en las células T activadas, es la mayor vía en la regulación de la muerte celular de estas células activadas. Así, las células T que expresen en su membrana Fas son inicialmente resistentes a la inducción de la apoptosis por medio de anti-Fas y comienzan a ser susceptibles sólo después de su proliferación in vitro. Desde que se conoce que la IL-2 (Interleukina 2) juega un papel importante en la regulación de la muerte de las células se han estudiado los efectos de IL-2 o del anti-Fas en la mediación de la apoptosis.

Los investigadores realizaron una serie de experimentos en los cuales se interfería con la vía de IL-2:

- 1.) La inhibición de la síntesis de esta citokina utilizando Ciclosporina A o FK506.
- 2.) Neutralizando a IL-2 por medio de anti-IL-2 Ab.
- 3.) La inhibición de la unión de IL-2R con CD25 en la membrana de la célula T.
- 4.) El bloqueo de la señal de IL-2R por medio de la Rapamicina.

Además comprobaron que la que la expresión del Fas era independiente de la vía de IL-2, donde la apoptosis mediada por Fas no ocurría ni se desarrollaba en la presencia de inhibidores de la producción de IL-2, o de bloqueadores de su señal. Mientras que la adición de rIL-2 reversaba el efecto inhibitorio de la Ciclosporina A y del FK506. Otro dato interesante es que aunque se le adicionara IL-4, IL-7 o IFN-gamma no inducían a esta célula a la fase S (susceptible de apoptosis) del ciclo celular; aunque estas citokinas tuvieran la capacidad de realizarlo en otras células.

Así, se llegó a la conclusión de que la apoptosis mediada por Fas era controlada por señales generadas por la IL-2, esto se confirmó mas aún con una alteración de la apoptosis reportada en ratones, los cuales poseían una deficiencia en IL-2 o IL-2R..

The Journal of Immunology: Volume: 157 Number :10 pages. November 15 1996

3. Implicación del ligando Fas y de la vía mediada por Fas en la citotoxicidad de las células humanas NK (natural killer).

Se ha creído siempre que la citotoxicidad de las NK es un proceso mediado principalmente por la vía dependiente de las perforinas. Este paradigma ha sido cuestionado y revaluado por un grupo de científicos, los cuales han investigado la implicación de la vía mediada por Fas en la actividad citotóxica de células CD3, CD16 y NK purificadas. El ligando de Fas en el mRNA era expresado en células NK aisladas y frescas.

El proceso de apoptosis se identificó por la cromatina fragmentada en células individuales, la cual era inducida en células que expresaban altos niveles de Fas y que por vía directa estaban interaccionando con las células NK, aun cuando existiera calcio libre en el medio, (se ha afirmado que la presencia de Calcio puede inhibir la formación de los poros por medio de la perforina). La apoptosis en ambos casos, ausencia o presencia de calcio era inhibida por Fab o anti-Fas mAb.

La transfección del gen Fas a las células target facilitaba la inducción de la apoptosis, comparando los resultados con la línea de células parenterales.

La función de la vía mediada por Fas en asociación con la vía dependiente de Perforina fue examinada en 10 líneas celulares expresando diferentes niveles de Fas por calcio y luego se observaron las características morfológicas de cada una de las células. Tomando como parámetro un nivel límite, se asociaron los siguientes datos:

Los altos niveles de expresión de Fas en las células target fueron relacionados con un gran grado de necrosis aguda debida a un severo daño de la membrana celular luego del contacto de estas células con las NK.

Así, concluyeron que la interacción entre el ligando Fas/Fas está presente y juega un papel significativo en la apoptosis inducida por las células NK humanas.

The Journal of Immunology: Volume: 157 Number :07 pages. November 1, 1996

REACCIÓN DEL HUÉSPED.

En los siguientes artículos e informes se expondrán estudios realizados acerca de Cómo el sistema inmune reacciona frente a los microorganismos extraños y de cuales son los últimos descubrimientos en esta área. Además se mostrarán algunos de los avances realizados en el campo clínico, en el tratamiento y manejo de las enfermedades que afectan al Sistema Inmune.

1. Gangliósidos derivados del Cerebro regulan la producción de citocinas y la proliferación de células T activadas.

Los gangliósidos pueden regular la actividad del sistema inmune in vivo., particularmente dentro de tejidos como los neoplasmas del sistema nervioso central donde proliferan abundantemente. Sin embargo los mecanismos por los cuales los gangliósidos modulan la función no son todavía comprendidos.

Se han caracterizado los efectos que los gangliósidos derivados del cerebro tienen en los pasos de activación de células T in vitro.

Los gangliósidos inhiben la proliferación de células T desde los eventos tempranos de activación que son desviados farmacológicamente utilizando la combinación de un éster de forbol más un ionóforo del calcio. Estos lípidos bloquean la transcripción de los genes de la IL-2 e IFN-gamma, sin inhibir la producción del RNAmensajero para la IL-4 y IL-10.

Esto puede ser mediado por la habilidad de los gangliósidos cerebrales para prevenir la activación del NF-kappa-B en células T lo cual estimula al proceso de mitosis. A pesar de la producción inhibida de la IL-2, los efectos antiproliferativos de los gangliósidos no son reversibles por la adición suplementaria de IL-2 al medio de cultivo. Este defecto persiste porque los gangliósidos también bloquean la entrada de células T dentro del ciclo celular.

En medio de este escenario, la fosforilación del gen del retinoblastoma, una proteína cuyo estado fosforilado es un regulador importante de la progresión normal del ciclo celular. Estos estudios ayudan a definir como los gangliósidos modulan la función de las células T efectoras in vitro. También resalta el hecho de que ciertas células T responden, es decir la producción de citocinas Th2 asociadas, no son inhibidas por sus acciones

2. Las células dendríticas humanas fagocitan y procesan el *Borrelia Burgdorferi* (Bb)

Hay una fuerte evidencia de que la respuesta inmune al parásito *Borrelia Burgdorferi* contribuye a la patogénesis de la Enfermedad de Lyme. El parásito es transmitido por las picaduras de las garrapatas en la piel la cual es particularmente rica en células dendríticas (DC). La reacción inicial de estas células presentadoras de antígeno (CPA) podría ya seguir el curso de la patogénesis inmune. Para estudiar el papel de las DC, se incubaron biopsias de piel humana con el parásito Bb y se investigaron con microscopía electrónica. En adición las DC frescas, aisladas de las de la dermis (DDC) y epidermis (Células de Langerhans) eran comparadas con las células DC derivadas de la sangre.

Así el Bb se encontró en la capa dérmica de la piel y en las BDC, pero nunca en las células de Langerhans; lo que ocurría realmente era que las células dendríticas de la dermis (DDC) y las células dendríticas de la sangre (BDC) absorbían el Bb preferencialmente utilizando una fagocitosis tipo enrollante. Los Bb internalizados en la célula eran localizados libres en el citosol y en los fagolisosomas de las DDC y BDC.

Los antígenos Bb intra vesiculares están colocalizados con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II. En adición el parásito Bb induce la producción de IL-12 en las BDC. El Bb induce una activación simple de las células dendríticas y genera células T autólogas específicas para el parásito Bb, lo que conlleva a una transcripción del gen CSF y a una respuesta proliferativa las cuales son los primeros síntomas en la evolución de la enfermedad de LYME. Estos datos indican que las DC humanas fagocitan, procesan y presentan los antígenos Bb. El camino por el cual las DC podrían influenciar en la respuesta inmune en la enfermedad de LYME, no obstante muchos detalles de este proceso faltan por ser evaluados.

The Journal of Immunology: Volume 157 Number: 07 October 1/1996

ENSAYOS CLÍNICOS

Los siguientes informes son estudios realizados acerca de algunas de las patologías del sistema inmune y las posibles alternativas que se ensayan para su tratamiento.

1. La mutación *xid* disminuye la generación de memoria en las células B pero no afecta su hipermutación somática y selección.

En este estudio se examinó la relación entre la primaria y secundaria respuesta inmune dependiente de células T usando un modelo experimental en el cual las células cultivadas respondían a un hapteno (4-hidroxi-3-nitro fenil acetil).

La reducida respuesta inmune primaria de la mutación *xid* fue demostrada por ser causada por un sustancial de crecimiento en la generación de células AFC. Además la reacción del centro germinal en la respuesta primaria era disminuída y la frecuencia de la memoria específica de las células B para el hapteno luego de una segunda inmunización era diez veces reducida.

A pesar de la pobre respuesta primaria de las células CID, la secundaria exposición al antígeno generaba una respuesta que era cualitativa y cuantitativamente igual a la de las células normales. El número de IgG1 y de AFC en el bazo y médula ósea se incrementan igualmente en ambos grupos, como bien la proporción de AFC secretados tienen una alta afinidad por el antígeno en ambos cultivos. La proliferación y los procesos de hipermutación somática y

selección en la respuesta de las células B era encontrados normales, indicando que el producto del gen *xid* no es crítico para los procesos que implican la maduración final de las células.

Así aunque el cultivo *xid* generaba memoria en las células B con un genotipo normal, existía una sustancial baja frecuencia de memoria, por lo tanto estos resultados implicaron que una reducida frecuencia en la memoria de las células B era todavía cerca al valor del umbral necesario para una normal respuesta secundaria inmune

2. Protección contra letal infección viral por vacunación con péptidos no inmuno- dominantes

La respuesta inmune al virus PRB de la influenza esta siendo soportada por el NP una nucleoproteína derivada de un péptido inmuno dominante el (NP 366 PRB). Esta molécula tiene tres péptidos no inmuno dominantes correspondientes a los NP17, NP55, NP97, secuencias que tienen una intermedia y baja afinidad por la molécula D

En un reporte previo se mostró que el péptido NP55 es procesado naturalmente por las células infectadas. En el presente informe se estudiara y comprobara si estos péptidos inmuno dominantes pueden realmente proteger contra esta infección viral.

La protección anti-viral fué evaluada teniendo en cuenta tres parámetros:

- Supervivencia luego de la inoculación de una dosis letal del virus PRB adaptado a ratones
- Porcentaje de las lesiones pulmonares en los ratones sobrevivientes.
- Evacuación del virus de los pulmones del ratón infectado.

Los resultados mostrarán que la inmunización del ratón con los péptidos no inmuno dominantes protegían de la infección del virus PRB aunque era menos eficiente que la inmunización con el péptido NP 366 PRB. La protección era mediada por células T CD8. La eficacia de los péptidos no inmuno dominantes se correlaciona con su afinidad por la unión de la molécula D ; la baja afinidad de los ligandos NP17 y NP 97 inducen una más débil protección que la afinidad intermedia en NP55. Una mezcla de NP366 PRB y los péptidos no inmuno dominantes dan una mas alta protección que el NP366 solo.

En conclusión los péptidos no inmuno dominantes protegen contra una infección viral con una eficacia que es proporcional a su afinidad por las moléculas de restricción clase I

3. Protección contra el letal virus de la encefalitis por medio de un "cebador" intranasal compuesto por moléculas CD8 y células T de memoria.

El virus cerebral de la influenza A/WSN (H1N1) causa una rápida y fatal encefalitis, luego de la inoculación intracerebral dentro de ratones de modelos experimentales. La inmunización intranasal con el mismo virus (homotípico) protegía completamente a los ratones contra un subsecuente cambio intracerebral del A/WSN; allí no se dictaminaba una enfermedad clínica, pero de la infección viral el cerebro no podría recuperarse.

En vivo la disminución de las células CD4, CD8 y T no afectaba la protección homotípica, y los cachorros de las madres inmunizadas eran también protegidos contra los cambios letales intracerebrales del A/WSN, sugiriendo que el anticuerpo producido por el "cebador" intranasal era suficiente para proteger contra posteriores infecciones.

La inmunización intranasal con el virus de influenza cerebral heterotópico A/X31 (H3N2) no producía un anticuerpo protector, y generaba una aguda enfermedad, a pesar de ello el 80% de los ratones sobrevivía a posteriores cambios del virus. Así, la protección inmune era

asociada con la infiltración de la sustancia a través del cerebro, que contenía una muestra de células CD8 y células T, al mismo tiempo se asociaba con la extensión de una baja regulación en la expresión de los complejos intracerebrales MHC clase I y II.

En vivo la depleción de células T mostraba que la protección heterotópica dependía de la expresión de células CD8 pero no de CD4 más células T.

Este modelo experimental demostró algunos de los mecanismos a través de los cuales, la inmunidad es generada por una inicial infección extracerebral la cual puede proteger más tarde contra una posible replicación del virus.

4. Un anticuerpo predominante en gatos protege contra la Inmunodeficiencia felina por vacunación.

Modelos animales del H1-V juegan un papel principal en la elucidación de los mecanismos celulares responsables de la inmunidad protectora. La vacunación de gatos domésticos con el virus, intacto, de la inmunodeficiencia felina (FIV) lo que provoca virus neutralizantes Abs y virus específicos - CTLs en sangre periférica y en los órganos linfoides, además proporciona protección contra cambios homólogos del virus.

En el presente estudio se confirmó la inducción de virus específicos- CTL, con la subsiguiente inmunización con la vacuna íntegra e inactivada del FIV y además se demostró que los gatos quedaban protegidos contra el virus hasta un año después de la vacunación. La protección a largo término en los gatos vacunados se asociaba con altos niveles de FIV y CTL específico en sangre periférica sumado a la vacunación y a la presencia de células CD8 de memoria específicas para FIV y CTL en los nódulos linfoides, estos niveles persistían cerca de un año luego de la vacunación y el tratamiento, siguiendo el desafío de encontrarse con la ausencia del virus.

Las respuestas CTL observadas en los gatos vacunados diferían cualitativamente de aquellos infectados con FIV. El último grupo no generaba una respuesta CTL de memoria o exhibía una respuesta específica de memoria contra el antígeno.

Concluyendo, estos resultados demostraron que la inmunidad observada en los gatos vacunados se asociaba con altos niveles de CTL.

INTRODUCCIÓN

La inmunidad es una propiedad maravillosamente necesaria en todo ser y organismo viviente. Sin ella, el ejército de microorganismos y agentes patógenos que diariamente nos rodean ya habrían destruido por alguna incipiente infección la vida. Por esta razón es que el sistema inmune constituye uno de los aparatos más complejos y coordinados, pero a la vez fascinantes y misteriosos.

En la actualidad la inmunología constituye uno de los frentes más avanzados en el campo de la medicina, en cuanto a investigaciones y descubrimientos; precisamente el más reciente premio nobel de fisiología y medicina fue conferido a un trabajo de investigación en este campo por esto en la presente monografía, hemos querido resaltar y dar unas pinceladas de lo que constituyen interesantes experimentos realizados en el campo de la inmunología alrededor de todo el mundo.

Expuestos en un lenguaje ameno y sencillo y que para nosotros como estudiantes principiantes del curso representan la aplicabilidad práctica de la información teórica ya estudiada.

Se ha dividido el trabajo en tres secciones:

- Procesos Moleculares y Celulares.

- Reacción del Huésped.

- Ensayos Clínicos

Cada una de ellas contiene algunas de las últimas investigaciones realizadas en la Asociación de Inmunólogos Americanos y en los diferentes departamentos de inmunología de las principales universidades del mundo.

Es un reto para nosotros abordar el campo de la inmunología pero pretendemos simplemente conocer sólo un poco más de lo mucho que en el mundo de la ciencia se descubre día a día y que a nosotros nos falta por recorrer.

DISCUSIÓN

La experiencia de búsqueda en INTERNET fue interesante, el tener acceso a la más variada y actualizada información en el campo de la medicina y específicamente en el de la inmunología. El interaccionar con otras instituciones médicas y científicas reconocidas a nivel mundial fué gratificante, además que aportó mucho a nuestra cultura y nos mostró un mundo muy grande y fascinante que hasta ahora hemos comenzado a conocer.

Los avances, en el esfuerzo por combatir aquellas patologías que comprometen el sistema inmunológico han sido asombrosos; la experimentación en ratones ha aportado nuevas teorías acerca del mecanismo de acción de los agentes patógenos y además ha proporcionado una luz de esperanza para aquellos casos en los que años atrás la ciencia se veía impotente.

La elucidación de algunos de los mecanismos más importantes y que comprometen el sistema inmune va viento en popa, sobre todo aquellas que tienen que ver con el proceso de apoptosis: un mecanismo celular, que hasta hace poco no se conocía de su existencia y que actualmente se cree, reviste una importancia fundamental en el proceso de envejecimiento celular. El descubrimiento de algunos epítopes que median su aparición ha sido el punto de partida de innovadores tratamientos en los cuales se pretende mediar la muerte celular de células malignas.

El estudio de la inmunología como materia en las carreras de medicina y afines, es relativamente nuevo. Por esto consideramos un privilegio poder ser parte de esta nueva generación que investiga y se asombra de uno de los sistemas más hermosos que el cuerpo humano posee. Se dice que la inmunología mandará la parada en los experimentos científicos de siglo XXI y creemos que sucederá así ya que los procesos celulares y moleculares inmunológicos son de los más precisos, específicos y coordinados y esto lo demuestran todas las investigaciones realizadas y aquellas que van en camino.