

ASOCIACIÓN ENTRE LA ENFERMEDAD INFECCIOSA Y LA FUNCIÓN BIOLÓGICA DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE I

Infectious Disease Association Between The Biological Function And Major Histocompatibility Complex Class I

Bibiana Matilde Bernal Gómez

Profesora Escuela de Medicina UPTC. Financiada por el Convenio Uptc-Colciencias-Laspau
Estudiante de Doctorado en Medicina Universidad de Zaragoza, España Grupo de
Investigación en Salud Pública

Recibido:	día	mes	año	Revisado:	día	mes	año
Corregido:	día	mes	año	Aceptado:	día	mes	año

Estilo de referencias: Vancouver APA 6 Harvard ICONTEC

Ponencia

En general, la enfermedad se ha definido como el cambio de un sistema de funcionamiento considerado normal a otro de anormalidad con repercusiones y sufrimiento en la vida de un organismo.

Para el modelo holístico del materialismo histórico, la enfermedad humana se concibe además como el conjunto dinámico de lo biológico con los determinantes ambientales sociales, económicos y políticos, contexto que hace del ser humano un animal diferente.

En los últimos cien años hemos vivido una época influenciada por rápidos y múltiples avances de la ciencia, la tecnología y la información, muy relevantes en el campo de la biología y de la biotecnología (como hitos históricos el descubrimiento del DNA, el conocimiento de la secuencia del genoma humano, la medicina del trasplante entre otros).

Sin embargo la humanidad no habría podido erradicar y controlar algunas de las más importantes enfermedades infecciosas sin el avance sociológico de los últimos tres siglos: tanto los derechos humanos como la higiene y la salud pública, el conocer el derecho a la vida y la evolución en la producción económica de la gran mayoría de las sociedades fueron los hechos fundamentales para el accionar de la medicina preventiva.

La medicina preventiva basada en los conceptos científicos sobre las enfermedades infecciosas, junto a las políticas sanitarias y los sistemas de salud en el mundo son los responsables de la mejoría en las expectativas y calidad de la vida.

Pero no de toda la humanidad y particularmente, no para todas las enfermedades infecciosas. Esto tiene que ver con algunos de los patógenos humanos más arteros, que reemergen, se encubren y se reinstalan en nuevos ambientes con nuevas expresiones.

La mayor parte de la explicación de la persistencia de las enfermedades infecciosas en el mundo está relacionada con la pobreza, falta de educación y acceso al cuidado médico pero los patógenos humanos no se han erradicado del planeta porque también existen condiciones biológicas de susceptibilidad a la enfermedad infecciosa que resurgen al tambalear las condiciones económicas de las sociedades y al menor descuido del entorno vital del individuo, por malnutrición o por otros patógenos como el Virus de Inmunodeficiencia Humana.

La asociación entre la enfermedad infecciosa y la función biológica del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I es uno de los recursos que puede proporcionar la inmunología (ciencia que describe la respuesta inmune) a la patología infecciosa.

La asociación del HLA de tipo I con enfermedades de tipo autoinmune ha sido de lo más estudiado y un ejemplo es la histórica asociación encontrada entre el HLA B27 y la espondilitis anquilosante, una enfermedad degenerativa crónica. Así mismo se han hallado asociaciones con el cáncer, pues el tener un determinado haplotipo, nos hace ser individuos con diferente predisposición a la enfermedad.

El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) o complejo antígeno leucocitario humano (HLA) es una gran familia de genes que codifican las moléculas de histocompatibilidad denominadas así por ser descubiertas y definidas inicialmente como antígenos involucrados en el rechazo a los trasplantes. Son moléculas peptídicas que se unen a los receptores celulares de patógenos con el fin de ser reconocidas por los linfocitos T participando así en la respuesta inmunitaria específica o adquirida. Se clasifican en tres regiones genómicas (I, II y III). Las moléculas de clase I se han descrito presentes en todas las células nucleadas del cuerpo y en las plaquetas, y participan en la respuesta inmunitaria adquirida a virus y microorganismos intracelulares como son fragmentos de hongos, parásitos y micobacterias, al unirse a fragmentos peptídicos de las proteínas ajenas para presentarlas así a los linfocitos T específicos.

El poseer un tipo especial de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y la predisposición o susceptibilidad a tener una enfermedad infecciosa es un evento biológico que ha sido limitado por la clara relación causal entre un agente infeccioso y la enfermedad; No obstante las variadas manifestaciones de algunas patologías infecciosas hacen del estudio de la influencia de la regulación inmunogenética, una clave en su diagnóstico más preciso y su manejo y a nivel epidemiológico son un aporte al estudio de las asociaciones causales en enfermedades de etiología desconocida.

Los fenómenos empíricos de enfermedades infecciosas por virus y micobacterias y sin explicación conclusiva son uno de los puntos de partida para proponer temas de investigación: por ejemplo el hecho de existir pacientes infectados con virus de inmunodeficiencia humana (VIH) que no progresan rápidamente a síndrome de inmunodeficiencia adquirida SIDA (LTNP de las siglas en inglés Long Term Non Progressors), el que algunos pacientes con VIH tengan las reacciones naturales a antivirales de la terapia TARGA o HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) como el abacavir y el hecho de tener una base de datos con algunas descripciones de genotipos susceptibles a tuberculosis, tuberculosis multirresistente y tuberculosis latente.

El sistema inmune humano posee una gran sofisticación para defenderse de los patógenos humanos pero también estos, sobretodo los más exitosos, han evolucionado compleja y eficientemente con características propias que pueden evadir la respuesta natural y adaptativa humana, lo que produce infecciones crónicas sin eliminación del patógeno.

La inmunidad específica contra virus y microorganismos intracelulares se activa con la unión entre las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I unidas a los linfocitos T CD8+.

Los linfocitos T CD8+ son una clase de linfocitos vitales para la defensa contra células infectadas por virus y para la erradicación de las células transformadas (preneoplásicas y neoplásicas). Su función específica es la citotoxicidad y producen citólisis. Son inductores de la muerte celular principalmente por el mecanismo bioquímico de apoptosis. En la actualidad se han descrito en los LTC tres vías de inducir la apoptosis en las células infectadas por virus mediante la acción de los ligandos de muerte de FAS (CD95-Apo-1), por la secreción de citocinas de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) y por la acción de gránulos de proteasas que contienen perforina y proteínas asociadas a gránulos o granzimas (proteasas de serina asociadas a la apoptosis).

Cuando un linfocito T se une a una célula presentadora de antígeno (APC antigen presenting cell), el receptor de la célula T (TCR) reconoce al antígeno dentro del CMH y se inducen moléculas de membrana que aumentan el contacto entre ambas células y transmiten dos señales de activación: una CD3-TCR y la segunda o coestimuladora CD28 -CD80 (B7.1). Durante este evento deja de ser un linfocito de memoria o naïve y pasa a ser un linfocito activado o efector. Las acciones de los linfocitos T efectores se desarrollan selectivamente sobre las células que muestran el antígeno para el que son específicas, de modo que sólo eliminarán las células que lo presentan, es decir las reconocidas por moléculas de histocompatibilidad. Esta interacción bioquímica y contacto directo entre el linfocito T y el antígeno es llamada sinapsis inmunológica.

Un LT no expuesto identifica un antígeno en una APC, pero al no existir la co estimulación necesaria, no se genera una respuesta celular. La respuesta celular se produce cuando unen CD28 con B7 y la misma se extingue al interferir CTLA-4 en dicha unión

El complejo TCR/CD3 del linfocito T se une al complejo antígeno/CMH de la célula que lo presenta y permite además dirigir la liberación de moléculas efectoras (citocinas, perforinas)

en la zona de contacto intercelular evitando dañar a otros tejidos no infectados del propio organismo.

Para el proceso de lisis de los tejidos lesionados, por los linfocitos Tc, es muy importante la unión de CD95L (ligando de Fas) a CD95 (Fas) en la célula diana. Los patógenos intracelulares no son accesibles a los anticuerpos, y la única forma de eliminarlos es por medio de la destrucción de la célula infectada. Los linfocitos Tc efectores realizan esta función de citólisis mediante el reconocimiento específico por el TCR de los complejos péptido extraño/CMH I, son capaces de distinguir las células que se encuentran infectadas de las células sanas y polarizan tanto las moléculas de membrana como los factores solubles que participan en la lisis celular (citolisinas, citocinas) en la zona de reconocimiento del antígeno, aumentando la precisión de la lisis celular. Los linfocitos T citolíticos eliminan las células extrañas por medio de tres vías, la vía de Fas / Fas Ligando escogida principalmente para la muerte por medio de LT CD8+ para las células transformadas, la vía del TNF (factor de necrosis tumoral Beta) en los Th1 y la de CD40 en Th2 y la eliminación de células infectadas a través del sistema de perforina y granzimas.

Los microorganismos realizan estrategias contra los linfocitos citolíticos expresando homólogos del CMH-I y modulando la expresión del mismo en la célula infectada, bloqueando la activación de citoquinas producidas por las células Natural Killer y los Linfocitos T citolíticos como al interferon, realizando una función antagónica a los receptores de las NKs e inhibiendo las vías efectoras de las NK y los LTC.

Algunos virus pueden inhibir la presentación de antígeno restringida por el CMH-tipo I de la célula infectada, fenómeno más desconocido con la función del CMH tipo II tanto en virus como en bacterias. También los virus pueden interferir en la presentación y función de las células dendríticas.

Los mecanismos de evasión viral alteran las vías similares de eliminación de células infectadas que comparte Linfocitos citolíticos y Natural Killer (el sistema granzima/perforina o la vía de Fas). Mientras que la respuesta antiviral de las NK es rápida la de los LT CD8+ junto con el CMH tipo I es lenta pero más eficaz y específica, pero puede durar días o semanas en ser óptimamente madura y esto es aprovechado por el patógeno para replicarse

En esta ponencia quiero además reproducir los métodos de estudio con base en la inmunología que he realizado durante mis estudios doctorales y con el fin de repetirlos en la Uptc. La oportunidad de observar procesos biológicos dinámicos gracias a las técnicas de medida de la biología molecular y celular, aporta los conocimientos sobre los mecanismos de la fisiopatología. Las enfermedades comparten en común múltiples hallazgos indirectos o directos de mecanismos inmunitarios alterados. Estos mecanismos han sido descritos en modelos humanos y animales de las diferentes enfermedades y se han transferido al campo del diagnóstico clínico.

Estos métodos los usé en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, España, hospital universitario donde se realiza el diagnóstico inmunológico del

inmunofenotipo para trasplantes y el análisis molecular de confirmación del HLA. Para la propuesta de estudio me he basado en la inmunofenotipificación de linfocitos T de muestras de sangre de donantes recogidas con anticoagulante EDTA.

Cómo se obtiene en primer lugar, la muestra de linfocitos?

El procedimiento es así:

Para la separación de las poblaciones celulares sanguíneas se usa la técnica del gradiente de densidad, con Ficoll-Histopaque. El ficoll es un glúcido ramificado artificial que tiene una densidad de 1,077 a 20°C y para las experiencias realizadas se mantuvo estéril, refrigerado a 4 °C y protegido de la luz. Las células mononucleares de sangre periférica PBL (Peripheral blood lymphocytes) se obtienen al centrifugar en un tubo falcon de 15 ml, 5 ml de ficoll sobre el que se ha depositado cuidadosamente un volumen similar de sangre total (5ml) evitando la mezcla de las dos fases en el tubo. La sangre sobre el ficoll se centrifuga de manera inmediata a 400 g (1400 rpm) en una centrífuga Eppendorf 5810 R durante 20 minutos (sin freno, para mejorar los resultados de la separación).

Se obtienen tres fases, una superior sérica, un anillo de color blanquecino nuboso donde se concentran las PBL y un sedimento con los eritrocitos. Se recoge la fase con las PBL, se agrega a un tubo falcon limpio y se lava con 4 ml de PBS o medio de cultivo RPMI. Luego se centrifuga a 285 g (1200 rpm) durante 10 minutos con el fin de separar y eliminar las plaquetas y eliminar la toxicidad del ficoll. Se repite el lavado con un centrifugado rápido de 7 minutos a una velocidad más baja de (127 g u 800 rpm) para eliminar todas las plaquetas posibles.

Las células se resuspenden en un volumen de 4 ml de PBS y se cuentan al microscopio utilizando el colorante de viabilidad azul trypan. Se obtienen entre 760.000 y 810.000 PBL. La suspensión celular se diluye de manera que queden entre 95.000 y 150.000 células por cada 100 µL, para proceder al marcaje con anticuerpos fluorescentes.

Cómo se realiza el fenotipado?

El fenotipado de las células se hace por medio de la técnica de citometría de flujo, haciendo uso de una selección de anticuerpos monoclonales fluorescentes.

La citometría de flujo de fluorescencia (Fluorescence-Activated Cell Sorting) o FACS es un eficaz método de estudio de la biología celular: con ella se miden características y componentes celulares como son el tamaño y la granularidad del citoplasma, la forma de la célula, el potencial de membrana, el pH intracelular, la viabilidad celular, la autofluorescencia y el estado redox intracelular. De los componentes intracelulares se pueden medir el DNA, el RNA, la Proteína total, los lípidos, diversos antígenos, actividad enzimática, carbohidratos de superficie, receptores de superficie, contenido de PHB, calcio intracelular y contenido de ergosterol

Además de que puede describir características de las células integrantes de un sistema lo hace también con las interacciones dentro del mismo enfocándose en las propiedades individuales

de cada una. Los métodos de clasificación inmunológica se basa en la utilización de anticuerpos dirigidos contra epítomos celulares y en la práctica, las características fisicoquímicas son las más utilizadas para la separación o “sorteo celular”; que incluyen características como tamaño, volumen, densidad, propiedades de dispersión de la luz, potencial de membrana, pH, carga eléctrica y contenido celular de diferentes antígenos FACS es usado para determinar las características físicas celulares de tamaño, densidad, y el contenido de organelos intracelulares; algunas características químicas como son la presencia de moléculas específicas bioquímicamente detectables y las características inmunológicas es decir aquellas relacionadas con la presencia de antígenos intracitoplasmáticos, nucleares o de superficie, que pueden ser detectadas gracias a la presencia de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos.

Se realizan dos tipos de marcaje: uno de superficie y otro intracelular. Los marcajes de membrana de un prototipo de estudio pueden ser así: en el caso de identificar una respuesta inmunitaria celular de memoria de tipo T en artritis reumatoide se marca para CD3, CD4, CD8 y CD62L y se realiza un marcaje intracelular para granzima B o FAS. En este tipo de perfil de inmunofenotipo los anticuerpos utilizados son marcados con uno de los siguientes fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), Pacific blue (fluoróforo con base en la 6,8-difluoro-7-hidroxycumarina) Percep C5y5 (Peridinina clorófila) o Alofocianina (APC). Como controles isotípicos se utilizaron inmunoglobulinas (Ig) de tipo Ig G1 o Ig G2 marcadas con PE o FITC (en función del anticuerpo utilizado en cada marcaje). Se usan también blancos de células sin marcar con anticuerpos.

Marcaje de Superficie:

Para realizar el marcaje se prepara una suspensión celular de aproximadamente 106 células/mL en una solución de PBS (Phosphate buffered saline) . Se añaden 100 µL de dicha suspensión a cada tubo de citometría sobre los que se agrega la cantidad adecuada del anticuerpo monoclonal específico correspondiente (5µL). En los casos de marcaje múltiple, los anticuerpos se añaden secuencialmente así: 2 µL de anti CD3, 2 µL de anti CD8 y 2 µL de anti CD62L. La mezcla células/monoclonal se agita en un vórtex durante 5 segundos. La incubación con los anticuerpos fluorescentes se lleva a cabo durante 15 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Seguidamente las células se diluyen con PBS hasta un volumen final de 500 µL.

Marcaje intracelular:

Este tipo de marcaje se utiliza únicamente para gránulos intracitoplasmáticos, en este modelo que expongo, de granzima B, en células que previamente han sido marcadas con anticuerpos anti CD3, CD8 y CD62L. Una vez transcurridos los 15 minutos de incubación del marcaje de membrana se inicia el proceso del marcaje intracelular, el cual se hace con paraformaldehído y saponina. Es útil usar algunos kit de reactivos como el intracell™ de Immunostep. En ese caso se adicionan 100 µL de una solución de fijación A (paraformaldehído al 1%) y se deja esta mezcla por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añaden 500 µL de PBS y se centrifuga el tubo durante 5 minutos a 285 g

(1200 rpm). Se retira el sobrenadante, se lava y centrifuga el pellet por 5 minutos más y después se agrega la solución permeabilizante B (saponina). Se mezcla bien con el vórtex y se agregan 0.75 μ L de anticuerpo anti granzima B. Se incuba en cuarto oscuro durante 15 minutos más.

Cómo se miden las células?

Una vez marcadas, las células se analizan en un citómetro de flujo. En este modelo se usó un FACS Aria, y su propio software de BD (Becton, Dickinson and company) FACS Diva. En todas las medidas se adquieren y se guardan entre 10000 y 50.000 eventos para el análisis estadístico. El análisis de las células se hace seleccionando la población CD3 positiva, lo que determina la población de linfocitos T. Se compara la población CD3+ CD4+ con la CD3+ y CD8+. Se analiza el inmunofenotípico de linfocitos T CD8+ en donantes sin la enfermedad y se compara con sangre de pacientes.

Se encuentran diferencias cuantitativas y cualitativas en los linfocitos de enfermedades infecciosas, autoinmunes y cáncer. En el caso de mi trabajo de investigación, en artritis reumatoide, pero en diversas más enfermedades dependiendo del problema a investigar.

La Investigación básica biomédica con impacto en la salud pública consiste en dirigir el conocimiento obtenido de la ciencia básica fruto del trabajo experimental hacia la solución de un problema tanto en la medicina preventiva como en la curativa, lo que se llama hoy en día ciencia traslacional.

Si se identifica empíricamente por la clínica o por la epidemiología la variación en la enfermedad infecciosa, y se puede identificar un potencial marcador de susceptibilidad individual, al construir un marco teórico de referencia y/o seleccionar con un modelo matemático un candidato a estudio (obtenido por metanálisis, epidemiología, investigación básica biomédica) posteriormente se puede diseñar un estudio inmunofenotípico para encontrar diferencias entre dos tipos de poblaciones humanas.

Los estudios clínicos y animales, así como los estudios sobre cultivos celulares han enfatizado para la ciencia la necesidad de estudiar la respuesta inmune en diferentes etapas de evolución natural de la enfermedad con el fin de tener parámetros biológicos cada vez más tempranos específicos de la aparición de algunas de ellas y límites claros para evidenciar las respuestas fisiológicas a los tratamientos. Productos séricos, células, proteínas o reacciones celulares se han convertido en marcadores de salud o enfermedad, y muchos marcadores inmunológicos obtenidos tras años de investigación biomédica pueden ser usados como guía de la evolución natural de una enfermedad o de una terapia. Lo que se realiza en el laboratorio de inmunología es el usar y obtener biomarcadores para la validación posterior en la medicina clínica

Bibliografía

AGUILÓ ANENTO, JUAN IGNACIO. Mecanismos Efectores Y De Activación De Linfocitos T Citotóxicos Y Células NK (Tesis Doctoral) Universidad de Zaragoza. 2009

BERNAL BIBIANA. Actividad De La Granzima B En Linfocitos T CD8+ De Pacientes Con Artritis Reumatoide. Trabajo de investigación presentado para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados en Inmunología Septiembre 2010.

BOJARSKA-JUNAK A, HUS I, SIEKLUCKA M, WASIK-SZCZEPANEK E, MAZURKIEWICZ T, POLAK P, DMOSZYNSKA A, ROLINSKI J. NATURAL KILLER-LIKE T CD3+/CD16+CD56+ Cells In Chronic Lymphocytic Leukemia: Intracellular Cytokine Expression And Relationship With Clinical Outcome. *Oncology Reports*. (2010) Sep;24(3):803-10.

CHAMPAGNE P, OGG GS, KING AS, KNABENHANS C, ELLEFSEN K, NOBILE M, APPAY V, RIZZARDI GP, FLEURY S, LIPP M, FÖRSTER R, ROWLAND-JONES S, SÉKALY RP, MCMICHAEL AJ, PANTALEO G. Skewed Maturation Of Memory Hiv-Specific Cd8 T Lymphocytes. *Nature*. (2001) Mar 1;410(6824):106-11.

FACS Protocol: Surface and Intracellular Staining of Human Whole Blood Altman Laboratory at Emory University encontrado en http://www.microbiology.emory.edu/altman/jdaWebSite_v3/p_WholeBloodStaining.html

GOLDSBY, R.A. KINDT, T. OSBORNE B. KUBY J. *Inmunología* Mc Graw Hill 5 ed. 2008

JACKSON SS, SCHMITZ JE, KURODA MJ, MCKAY PF, SUMIDA SM, MARTIN KL. ET AL. Evaluation of CD62L expression as a marker for vaccine-elicited memory cytotoxic T lymphocytes. *Immunology*. 2005 Dec; 116(4):443-53

JANEWAY C. TRAVERS P WALPART M. SHLOMCHIK MJ. *Inmunobiología: El Sistema Inmunitario En Condiciones De Salud Y Enfermedad* 2ª Ed. 2003

LIST OF HUMAN CLUSTERS OF DIFFERENTIATION en la página web: http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_human_clusters_of_differentiation

MALDONADO A. MUELLER, Y. THOMAS P., BOJCZUK P., O'CONNORS C., KATSIKIS P.D. Decreased Effector Memory CD45ra+ CD62L- CD8+ T Cells And Increased Central Memory CD45ra- CD62L+ CD8+ T Cells In Peripheral Blood Of Rheumatoid Arthritis Patients *Arthritis Res Ther* (2003), 5:R91-R96doi:10.1186/ar619

MANSOUR, I. DOINEL, C. ROUGER P. Dichotomy Of Two CD8+ Lymphocyte Subsets In Hiv Infection. Depletion Of CD8+ CD3- And Expansion Of CD8+ CD3+ Subsets: Consequence On The CD4/CD8 Ratio. Clin Exp Immunol. (1991) September; 85(3): 481–484.

MARGOLICK, J. et al. Changes In T-Lymphocyte Subsets In Intravenous Drug Users With HIV-1 Infection. JAMA. (1992);267:1631-1636

PARDO JIMENO, JULIAN Mecanismos Citolíticos De Los Linfocitos T Citotóxicos: Perforina/Granzimas, Granulinas E Inducción De FasL (Tesis Doctoral) Universidad de Zaragoza. 2003

REGUEIRO GONZÁLEZ JR. LÓPEZ LARREA C. GONZALEZ RODRÍGUEZ S. MARTINEZ NAVES E. Inmunología: Biología Y Patología Del Sistema Inmune.2008

ROSEN A. CASCIOLA R.L. Autoantigens In Systemic Autoimmunity: Critical Partner In Pathogenesis Journal of Internal Medicine, (2009): 265: 625–631. doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02102.

RUSSEL, J. LEY, T. Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity. Annu Rev Immunology (2002).20:323-70

SALGADO LYNN, Milena. Citometría De Flujo: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) Curso De Métodos En Biotecnología. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA. Mayo de 2002

COMO CITAR ESTE ARTICULO:

Bernal B. Asociación entre la enfermedad infecciosa y la función biológica del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I Rev salud hist sanid on-line 2011; 6(1). Disponible en: <http://www.histosaluduptc.org/ojs-2.2.2/index.php?journal=shs>. Consultado en: (fecha de consulta)

Los textos publicados en esta revista pueden ser reproducidos citando las fuentes.

Todos los contenidos de los artículos publicados, son responsabilidad de sus autores.

Copyright. Revista Salud Historia y Sanidad ©

Grupo de Investigación en Salud Pública GISP-UPTC
Grupo de investigación Historia de la salud de Boyacá.

Tunja 2011