



La coestimulación B7:CD28 (posible papel patogénico en el Lupus Eritematoso Sistémico)

Carlos Alberto Cañas, MD, César Jiménez, MD, Residentes I de Reumatología; José Félix Restrepo, MD, Federico Rondón, MD, Profesores Asistentes; Antonio Iglesias G., MD, Profesor Asociado, Mario Peña, MD, Profesor Titular. Unidad de Reumatología, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. Hospital San Juan de Dios.

En la presente revisión se analizan los diferentes cambios fisiológicos que se presentan durante la estimulación de los linfocitos T, partiendo de la presentación antigénica. Además se indica la importancia de la coestimulación en la que participa el complejo B7:CD28 y cómo defectos en su expresión, pueden tener importancia patogénica en el LES.

INTRODUCCIÓN

Las células presentadoras de antígeno (CPA), expresan en su membrana celular las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), encargadas de transportar un antígeno procesado el cual presentarán a los linfocitos T (LT), en un sitio específico conocido como receptor de célula T (RCT). Una vez se lleva a cabo esta presentación antigénica, se activan señales intracelulares que determinarán la transcripción genética y la síntesis protéica. Para que este proceso se realice adecuadamente es necesario que estas dos células entren en contacto en otros sitios de sus membranas celulares, generándose estímulos amplificadores de dicha respuesta, evento conocido como "coestimulación". Las proteínas que participan en dicha unión son conocidas como "moléculas coestimuladoras". Unas de estas moléculas son la B7 de la CPA que se pone en contacto con la CD28 del LT.

LA PRESENTACIÓN ANTI-GÉNICA Y LA GENERACIÓN DE SEÑALES INTRACELULARES

En las células del sistema inmune se han identificado aproximadamente 200 tipos de antígenos de superficie los cuales están restringidos al tipo de célula, su nivel de maduración y su interacción con otros grupos celulares (1). Estos antígenos están comprometidos en varios procesos fisiológicos, entre ellos el reconocimiento, la adhesión, la activación de señales intracelulares que llevan a la síntesis protéica, la inducción de proliferación celular y su

mantenimiento, así como la muerte programada (apoptosis) (2).

La activación del LT por parte de la CPA, se realiza mediante tres formas de interacción: la adhesión, el reconocimiento antigénico y la coestimulación, procesos que están mediados por el contacto entre diferentes proteínas de las membranas celulares (Figura 1).

Una vez se lleven a cabo la adhesión, el reconocimiento antigénico y la coestimulación, se desencadena una serie de señales intracelulares que

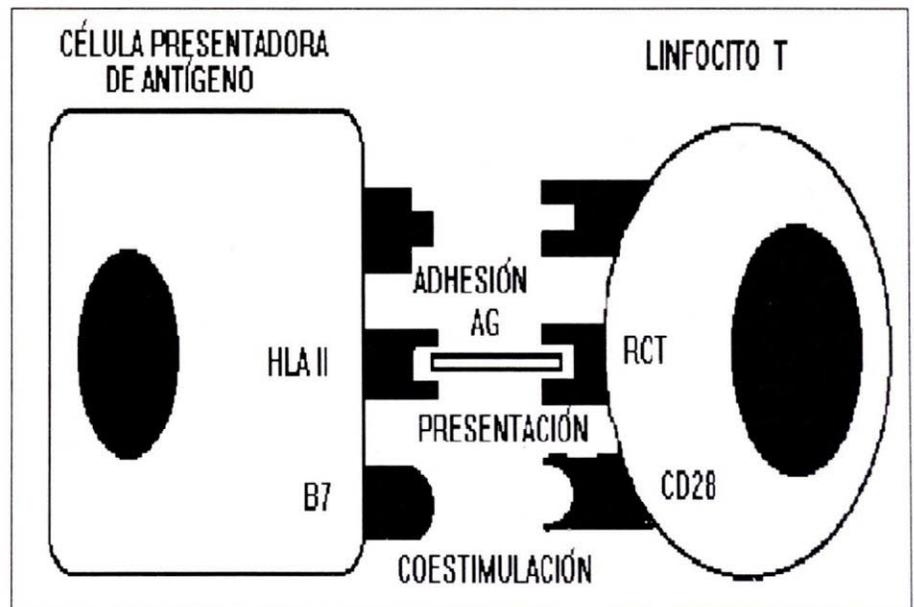


Figura 1. Tres formas de interacción entre la célula presentadora de antígeno y el linfocito T.

parten de la fosforilación de proteínas citoplasmáticas en algunos sitios específicos con residuos de tirosina. Para que esta fosforilación se ejecute, es necesaria la participación de enzimas fosfotirosinquinasa (PTK). Se han identificado varias PTKs como son la P56-lck, la P59-fyn, la P60-yes, y la ZAP, homóloga de la Syk de los Linfocitos B (LB). Estas enzimas son proteínas cuyo extremo amino se encuentra unido a la cara interna de la membrana celular y su extremo carboxilo se encuentra libre en el citoplasma. Tienen varios dominios, denominados SH1, SH2 y SH3, donde se unen otros tipos de moléculas: en el

SH1, fosfatos que tienen como objeto fosforilar otras proteínas, en el SH3, la fosfoinositol-3-quinasa (PI-3-K) (3).

La señalización intracelular parte de la fosforilación de proteínas enzimáticas, las cuales se activan. Este es el caso de la fosfatidilinositol:fosfolipasa C (PI:PLC 1), que participa en la formación del inositol trifosfato (IP3), y del diacilglicerol (DAG) a partir del fosfatidilinositol-bisfosfato (PIP2). El IP3 tiene como función generar el aumento de las concentraciones de calcio intracelular, el cual a su vez al unirse a la calmodulina, activa fosfoproteínas como el NF-ATc. Este

último es un factor de transcripción que, como resultado de su activación, se le confiere la capacidad para pasar del citoplasma al núcleo, convirtiéndose en una proteína funcional a este nivel (NF-ATn). Este factor de transcripción al unirse a sitios específicos del DNA, genera la síntesis de RNAm, y luego la producción de citoquinas, como la interleuquina-2 (IL-2), responsable de la proliferación clonal de los LT. De otra parte el DAG participa en la activación de la proteínquinasa-C (PK-C), la cual media la fosforilación de proteínas que inducen la síntesis de los protooncogenes fos y jun, que al unirse forman el AP-1, otro factor de

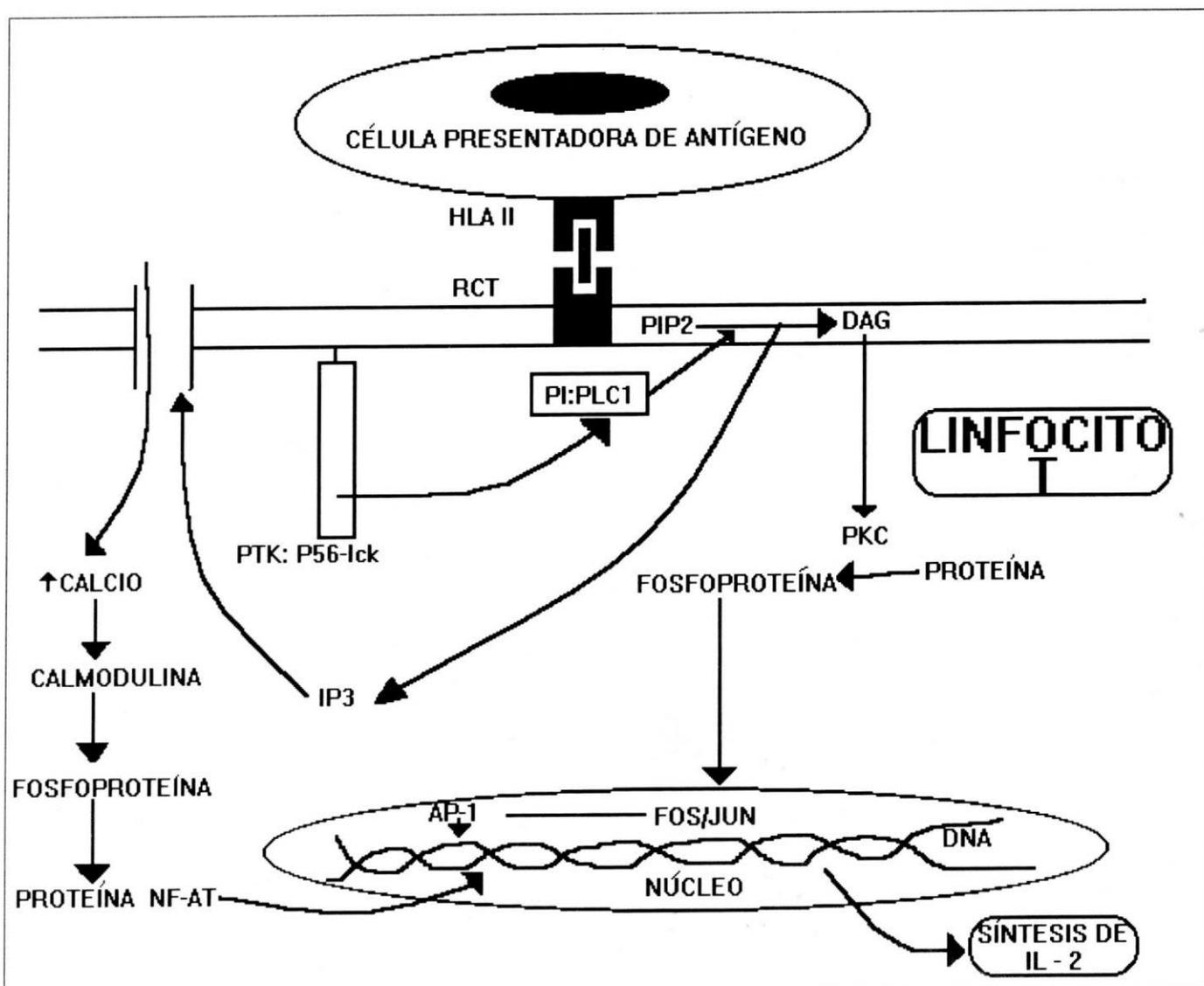


Figura 2. Señales intracelulares secundarias a la presentación antigénica.

transcripción que también induce la síntesis de citoquinas (4) (Figura 2).

MOLÉCULAS QUE PARTICIPAN EN LA COESTIMULACIÓN

Diferentes estudios realizados hasta el momento han concluido que las moléculas coestimuladoras que nos ocupan (B7 y CD28) no son proteínas solas, sino que hacen parte de un grupo que comparten características morfológicas y funcionales similares.

Familia de las B7. Son dos moléculas transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas, denominadas B7-1 y B7-2, que se presentan como monómeros con dos dominios disulfuros y se diferencian en la longitud de la porción intracelular, la cual es mayor en la B7-2 (5). Sus genes han sido clonados y se encuentran en el locus ubicado entre las posiciones 3q13.3 y 3q21 (6). Se expresan en CPA como los monocitos y los LB, influenciados por el estímulo del gamma interferón. Se ponen en contacto con moléculas de la familia CD28 de los LT, específicamente la B7-1 con la CD28 propiamente dicha y la B7-1 con la CTLA-4 (7).

Familia de las CD28. También son moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas, las cuales actúan como homodímeros glicoprotéicos de 44 KDa, con un dominio disulfuro. Tienen 202 residuos de aminoácidos, de los cuales 134 se encuentran a nivel extracelular (8). Su expresión en las células del linaje de los linfocitos T, es diferente según el grado de madurez y el tipo celular, así, en los timocitos inmaduros CD3-, se presentan en el 5% de ellos, en el 50% de los linfocitos CD3+ CD8+, y en el 95%, de los CD3+ CD4+ (9). Se han identificado tres miembros de esta familia: uno denominado CD28 propiamente dicho, que es el receptor de la B7-1, y dos moléculas denominadas CTLA-4, una que actúa como dímero, la cual es

receptor de la B7-2, y otra como monómero, cuya proteína estimuladora no se ha identificado (10).

EFFECTOS DE LA COESTIMULACIÓN B7:CD28

Al estar en contacto las moléculas B7 de la CPA y las CD28 del LT, como un evento paralelo a la presentación antigénica, se llevan a cabo dos procesos: uno por el cual se inhibe la degradación del RNAm que se formó como parte de las señales antes descritas y que en últimas van a perpetuar la síntesis de citoquinas (11), y otro que es la activación de otra vía de señales intracelulares que actúan paralelamente. Esta forma de señalización se inicia también con la fosforilación de la enzimas PI-3-K, la cual, según se comentó, tiene un sitio de unión específico con el dominio SH3 de las PTKs y que participa en la activación de la PKC, con la consecuente expresión de la molécula de transcripción AP-1 (8). (Figura 3).

Desde el punto de vista funcional, la importancia de estos efectos coestimuladores tienen que ver con la

amplificación y perpetuación de la señal primaria inducida por la presentación antigénica. Así el LT no sólo cumple funciones de regulación autocrina sino también paracrina (8). La activación de la CD28 también tiene que ver con la regulación de la muerte celular programada (apoptosis), fundamental entre otros procesos, en la selección negativa de los LT a nivel tímico, evento que evita el escape a la periferia de células que puedan reaccionar contra antígenos propios (12).

La disfunción de estas formas de coestimulación generan un estado de anergia, debido a la imposibilidad de sintetizar en forma adecuada citoquinas que tienen función paracrina. La presentación antigénica no coestimulada, induce la síntesis de citoquinas y sus receptores así como su expresión, para llevar a cabo únicamente la regulación autocrina (Figura 4). En forma experimental se ha logrado la inhibición de la coestimulación, utilizando anticuerpos contra receptores de proteasas de la membrana (específicamnte el EPR-1). Ésto podría tener implicaciones futuras para el desarrollo de inmunosupresores

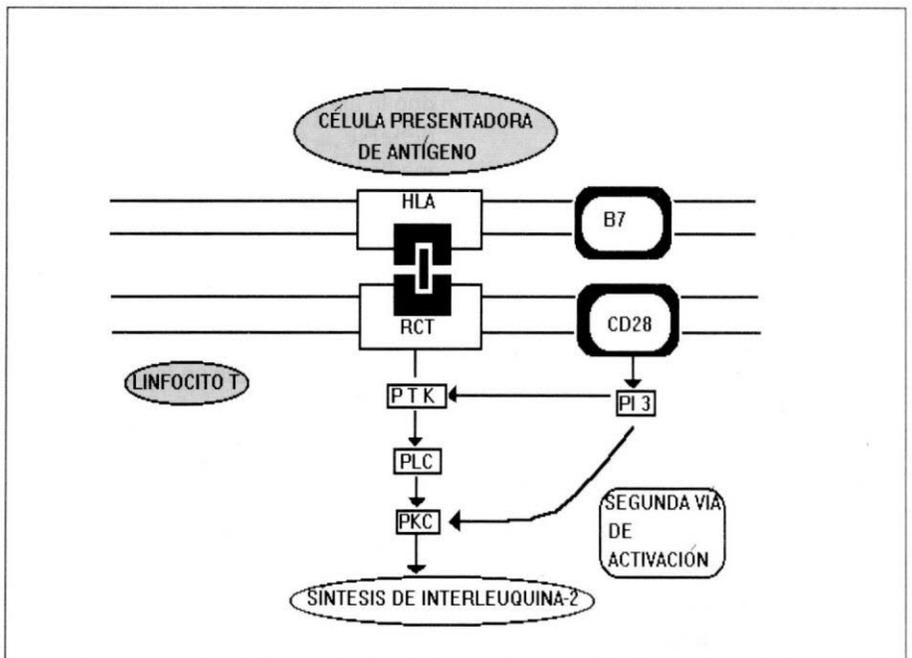


Figura 3. Señalización relacionada con la coestimulación B7:CD28.

biológicos (13).

Otro campo de investigación relacionado con la vía coestimuladora mediada por el CD28, es su implicación en la resistencia a la acción de la ciclosporina. Este medicamento, inhibidor de la inmunidad celular, se utiliza en la prevención y el tratamiento de rechazo de tejidos en pacientes con trasplante de órganos. Su mecanismo de acción se ejerce a través de la formación de un complejo con una molécula citoplasmática del grupo de las inmunofilinas (específicamente la ciclofilina), el cual inhibe la activación de factores de transcripción intracitoplasmáticos (el NF-AT y el NFIL-2A), y así su capacidad para poder ingresar al núcleo celular (14). En pacientes con resistencia a la ciclosporina, se han investigado sus LT, y se ha encontrado que dichos factores de transcripción están funcionalmente intactos, lo que conlleva a una activación normal de la célula. En modelos experimentales se ha llegado a concluir que dicha activación se lleva a cabo a través de las señales mediadas por el CD28, vía que escapa a la acción del medicamento (2).

DEFECTO DE LA COESTIMULACIÓN B7:CD28 EN LA PATOGENIA DEL LES

En los pacientes con LES se encuentran en forma paralela una reacción de autoinmunidad, y una disfunción de las células T tanto cuantitativa como cualitativa. Varios grupos de investigación han tratado de correlacionar estos defectos con una inhibición de la vía coestimuladora mediada por el complejo B7:CD28, y más específicamente en los tópicos que se describen a continuación:

1. Aumento de la apoptosis de los LT relacionado con la disminución de la expresión de la molécula B7-1

La disminución en el número de células

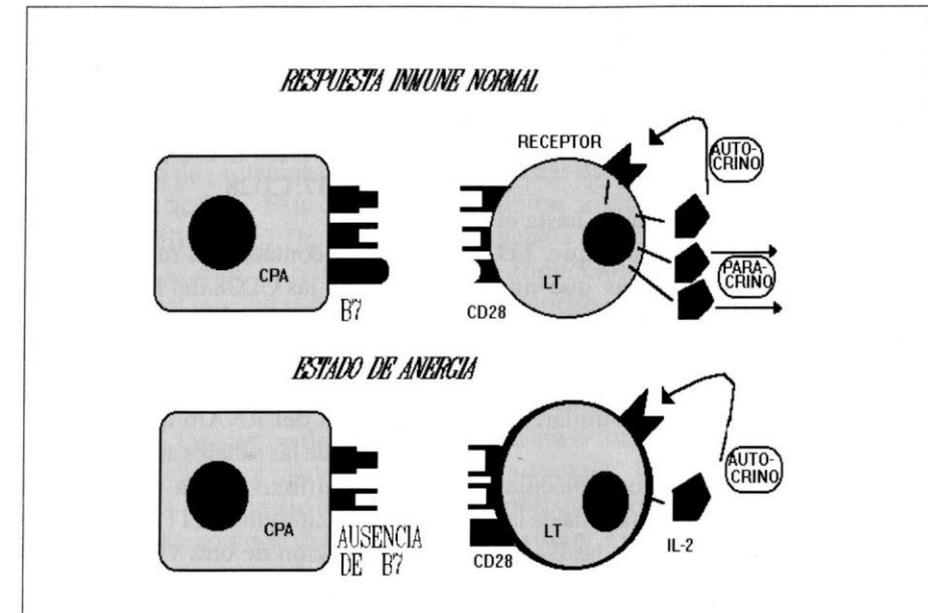


Figura 4. Modelo experimental de supresión de la acción de CD28 con la inducción de estado de anergia.

T, en parte está mediada por un aumento en la apoptosis, donde la muerte celular se presenta como un proceso programado genéticamente, y que conlleva a la síntesis de enzimas para la autodigestión celular (15). Esta activación genética depende del balance que existe entre factores que la estimulan y otros que la inhiben. Entre estos factores se encuentran la expresión de moléculas de membrana, o la activación de genes promotores o inhibidores. En este sentido se conoce que la apoptosis de las células T puede deberse a señales coestimuladoras, mediadas por las moléculas de membrana "fas" que la inducen, y la CD28 que la inhiben (16). Conociéndose experimentalmente que en el LES hay un defecto en la expresión de la molécula B7-1 en la CPA (17), y que siendo esta molécula un factor necesario para la estimulación de la CD28, una sobreexpresión funcional de la molécula "fas" podría estar implicada en el aumento de señales que promueven la apoptosis. Se postula además que esta muerte celular temprana y excesiva va a generar la liberación de nucleosomas, productos de la degradación del núcleo celular, los cuales son inmunogénicos

y exponen sus epítopes en forma abundante, lo suficiente para generar una respuesta humoral que induce la generación de autoanticuerpos (20).

2. Defecto en la expresión del B7, como consecuencia del aumento de la IL-10.

En el LES se ha encontrado un aumento en los niveles de IL-10, citoquina que por diferentes mecanismos promueve la inmunidad humoral e inhibe la inmunidad celular (18). Esta última se encuentra deprimida como consecuencia de diversos procesos donde participa directamente la IL-10, disminuyendo la activación de los LT por afectarse la presentación antigénica (inhibe la expresión de las moléculas del CMH por parte del macrófago), y la vía coestimuladora B7:CD28 (disminución de la expresión de la molécula B7 en la membrana del macrófago). Este efecto sobre la vía coestimuladora es reversible (19).

3. Disminución de la producción de citoquinas por parte de los LT, debido a la inhibición de la vía coestimuladora B7:CD28.

En cuanto a los defectos funcionales de

las células T en el LES, se ha evidenciado por ejemplo una disminución en la producción de citoquinas (v.g.: la IL-1) (21). Algunos investigadores postulan que este defecto podría deberse a alteraciones durante la presentación antigénica determinadas por una disminución en la coestimulación. En este sentido ya se había comentado que en las CPA de pacientes con LES se ha encontrado una disminución de la expresi-

ón de B7-1, defecto que conduce a una pobre activación de la célula T efectora.

CONCLUSIONES

Existen evidencias a favor de que en la patogénesis del LES, existen defectos tanto en la presentación antigénica como en la coestimulación. Con respecto a esta última tiene particular importancia la inhibición que se observa en la vía

mediada por el complejo B7:CD28 y sus consecuencias, como son: el aumento de la apoptosis de los linfocitos, disminuyendo el número de LT y aumentando la liberación de nucleosomas, los cuales son inmunogénicos, y la reducción de la producción de citoquinas. Estos hallazgos podrían tener implicaciones para el desarrollo de modalidades terapéuticas dirigidas a corregir defectos a nivel coestimulador.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Schlossmann SF, Boumsell L, Gilks JM y Hurlan T. CD Antigens 1993. *Blood* 1994; 83: 879.
- Guinan EC, Gribben JG, Bussiotis VA, Freeman GJ, Nardler LM y col. Pivotal role of the B7:CD28 Pathway in transplantation tolerance an tumor immunity. *Blood* 1994; 84: 3261.
- Rudd CE, Janssen O, Cai YC, Da Silva A, Raab M y col. Two-step TCR/CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SH3 domains, protein-tyrosine an lipid Kinases. *Immunol Today* 1994; 15: 225.
- Abbas AR, Lichtman AH, Pober JS. Fosforilación de tirosina en la activación de la célula T. En: *Inmunología Celular y Molecular*. Madrid: Mc-Graw-Hill; 1995: 176.
- Freeman GJ, Fredman AS, Segil JM, Lee G. B7, a new member of the Ig Superfamily with unique expresion on activated and neoplastic B cell. *J Immunol* 1989; 143: 2714.
- Freeman GJ, Gribben JG, Bossiotis VA. Cloning of B7-2:ACTA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 1993; 262: 909.
- Kuiper HM, De Jong R, Brouer M y col. Influence of CD28 costimulation on cytokine production is mainly regulated via interleukin-2. *Immunology* 1994; 83: 38.
- June CH, Ledbetter JA, Linsley PS, Thompson LB. Role of CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 1990; 11: 211.
- Damle NK, Mohaghehpous N, Haaussen JA, Eugleman EG. Alloantigen specific cytotoxic and suppressor T lymphocytes are derived from phenotypically distinct precursors. *J Immunol* 1983; 131: 2296.
- Lindsten T, Lee KP, Harris ES y col. Characteritation of CTLA-4 structure and expression on humman T cells. *J Immunol* 1993; 151: 3489.
- Lindslens J, June CH, Ledbetter JA, Stella G y Thompson CB. Regulation of lymphokinemessenger-RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 1990; 244: 339.
- Punt JA, Osborne BA, Takahama Y, Sharrow SO y Singer A. Negative selection of CD4+ CD8+ thymocytes by T cell receptor induced apoptosis require a costimulatory sygnal that can be provided by CD28. *J Exp Med* 1994; 197: 709.
- Buchosal M A, Rothermel AL, McConakey PJ, Dixon FJ. In vivo immunosuppression by trageting a novel proteasa receptor. *Nature* 1996; 380: 352-356.
- Scheriebler SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK 506. *Immunol Today* 1992; 13: 136.
- Ogawa N, Dang H, Talal N. Apoptosis and autoimmunity. *J Immunol* 1995; 8: 1.
- Gill BM, Nishitrata H, Chan G, Delovite TL y Ochi A. Fas Antigen and sphingomyelin-ceramide turnover-mediated signaling: Role in life and death of T lymphocytes. *Immunol Reviews* 1994; 142: 113.
- Tsokos GC, Kovacs B, Sfrikakis PP, Theocharis S. Defective antigen-presenting cell function in patients whit systemic lupus erythematosus- Role of the B7-1 (CD80) costimulatory molecule. *Arthritis Rheum* 1996; 36: 600.
- Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R, Alcocer-Varela J, Wijdenes J, Fourrier BM, Galanaud P y Emilie D. In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in Rheumatoid Arthritis, Sjögren's Syndrome, and Systemic Lupus Erythematosus. A potential mechanism of B-lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. *Arthritis Rheum* 1994; 11: 1647.
- Ding L, Linsley PS, Huang LY, Shevach MS. IL-10 inhibity macrophage coestimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 1993; 151: 1224.
- Emlen W, Niebur J, Kadera R. Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 1994; 152: 3685.
- Linker IM, Bakke AC, Kitridou RC y col. Defective production of interleukin 1 and interleukin 2 in patient with Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 1993; 130: 2651.