

RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO POR EL BCR Y ACTIVACIÓN DEL LINFOCITO B

Diana Castaño Monsalve
Universidad de Antioquia

Abreviaturas usadas en este capítulo

AID: Citidina desaminasa	LAT: Unidor de células T activadas
APRIL: Ligando productor de proliferación	LB: Linfocitos B
BCMA: Antígeno de maduración de la célula B	LPS: Lipopolisacárido
BCR: Receptor de antígeno de la célula B	LT: Linfocitos T
BLyS: Estimulador del LB	MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos
Btk: Tirosina quinasa de Bruton	mIg: Inmunoglobulina de membrana
CDF: Células dendríticas foliculares	NK: Asesinas naturales
CG: Centro germinal	PI3K: Fosfatidil inositol 3 quinasa.
CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad	PIP₂: Fosfatidil inositol bifosfato
CPA: Células presentadoras de antígeno	PTK: Proteínas quinasas de tirosinas
CTLA-4: Antígeno-4 de linfocitos T citotóxicos	PLC: Fosfolipasa C
DAG: Diacilglicerol	RAG: Genes activadores de la recombinación
FcR: Receptores para los dominios Fc de las inmunoglobulinas	SAC: Cepa de <i>S. aureus</i> Cowan I
ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1	SH2: Dominios de homología 2 a la proteína Src
ICOS: Coestimulador inducible	TACI: Activador transmembrana modulador de calcio y ligando de la ciclofilina
IFN: Interferón	TCR: Receptor de antígeno de la célula T
Ig: Inmunoglobulina	TD: Respuestas dependientes de células T
IP₃: Inositol trifosfato	TI: Respuestas independientes de células T
ITAM: Motivos de activación de inmunoreceptores basados en tirosinas	TNF: Factor de necrosis tumoral
ITIM: Motivo de inhibición de inmunoreceptores basados en tirosinas	TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral

INTRODUCCIÓN

Un organismo se encuentra en contacto permanente con una gran variedad de antígenos, muchos de ellos provenientes de agentes patógenos para lograr que el organismo establezca una respuesta protectora contra estos agentes requiere de una respuesta inmune altamente coordinada. La protección contra las infecciones repetidas depende de una respuesta de memoria, que a diferencia de la respuesta primaria es rápida y de alta especificidad. Esta respuesta de memoria o secundaria pone en marcha una serie de mecanismos efectores cuya coordinación depende de una comunicación adecuada entre las células del sistema inmune y de estas células con otras células presentes en el microambiente donde se establece la respuesta.

Uno de los mecanismos inmunes efectores más eficaces para evitar el establecimiento de una infección lo constituye la producción de anticuerpos por parte de los LB. Puesto que éstos son moléculas solubles con una alta afinidad por su antígeno el cual se encuentra en circulación, se distribuyen en los distintos compartimentos corporales y además son secretados en las mucosas que están en contacto con el medio externo, rápidamente pueden entrar en contacto con el antígeno blanco y neutralizarlo o desencadenar distintos mecanismos efectores que permiten su eliminación. La producción de estos anticuerpos depende de la activación y la diferenciación adecuadas de los LB en los órganos linfoides secundarios, fenómenos que se encuentran regulados por las señales transmitidas a partir de diferentes receptores, como son el receptor antigénico, los receptores de citoquinas y por moléculas accesorias que favorecen el contacto célula-célula.

La activación del LB se produce mediante una secuencia de eventos, durante los cuales, además de entrar en contacto con su antígeno específico, el LB recibe unas señales adicionales,

8 tanto dependientes del contacto con otras células como de moléculas solubles, todo lo cual es necesario para establecer una respuesta humoral específica. Los procesos involucrados en esta respuesta son el tema a discutir a lo largo de este capítulo.

EL COMPLEJO RECEPTOR DE LA CÉLULA B

El BCR es un complejo multiproteico encargado de interactuar con antígenos extraños con el fin de inducir diversas respuestas y de determinar el destino de los LB. Esta estructura hetero-oligomérica, cuya composición es similar a la del TCR, se caracteriza por poseer dos tipos de moléculas: una que establece la unión al antígeno y otra encargada de iniciar la transmisión de señales al interior de la célula. El BCR se compone, en primera instancia, de una molécula de inmunoglobulina acoplada a la membrana que se encarga de interactuar con el antígeno para el cual es específico. Todas las isotipos de inmunoglobulinas (IgM, IgD, IgG, IgA e IgE) pueden existir como componentes estructurales del BCR, pero la gran mayoría, aproximadamente el 90% de estos receptores están compuestos por IgM e IgD. Esto se debe a que $C\mu$ y $C\delta$ son los genes C más proximales a la región recombinada VDJ del locus de la cadena pesada (para una revisión más detallada revisar los capítulos sobre ontogenia y estructura de las inmunoglobulinas). Los otros isotipos de inmunoglobulinas se pueden expresar únicamente en los LB que hayan entrado en contacto con su antígeno específico y que posteriormente hayan realizado un cambio de isotipo.

Las moléculas de Ig son complejos tetraméricos que están conformados por un homodímero de cadenas pesadas (H) junto a dos cadenas livianas (L), las cuales se encuentra unidas entre sí de forma covalente mediante puentes

disulfuro. Cada inmunoglobulina tiene dos sitios de unión al antígeno los cuales están conformados por las regiones hipervariables VH-VL. Las mIg difieren considerablemente de las Ig secretadas, pues estas últimas carecen de las secuencias que codifican para la región transmembrana y citoplasmática. Sin embargo, la cola citoplasmática de las mIg es muy corta (entre 3-28 aminoácidos) y carece de capacidad de señalización intrínseca.

La mIg se encuentra asociada a dos moléculas, la $Ig\alpha$ (CD79a) y la $Ig\beta$ (CD79b), las cuales forman heterodímeros por medio de enlaces disulfuro que las unen entre sí (Figura 1). Estas moléculas son glicoproteínas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, las cuales poseen un solo dominio extracelular tipo Ig y una cola citoplasmática de 61 ($Ig\alpha$) y 48 ($Ig\beta$) aminoácidos. Esta porción citoplasmática posee residuos de tirosinas, los cuales hacen parte de los motivos de activación tipo ITAM. En el caso de $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, estos ITAM se caracterizan por la presencia de seis aminoácidos conservados, que hacen parte de la secuencia consenso: D/E-X₇-D/E-X₂-Y-X₂-L/I-X₇-Y-X₂-L/I. Se ha determinado que estos residuos de tirosinas son esenciales para la activación del LB mediada por el BCR, ya que los LB que poseen una mutación en las porciones citoplasmáticas de

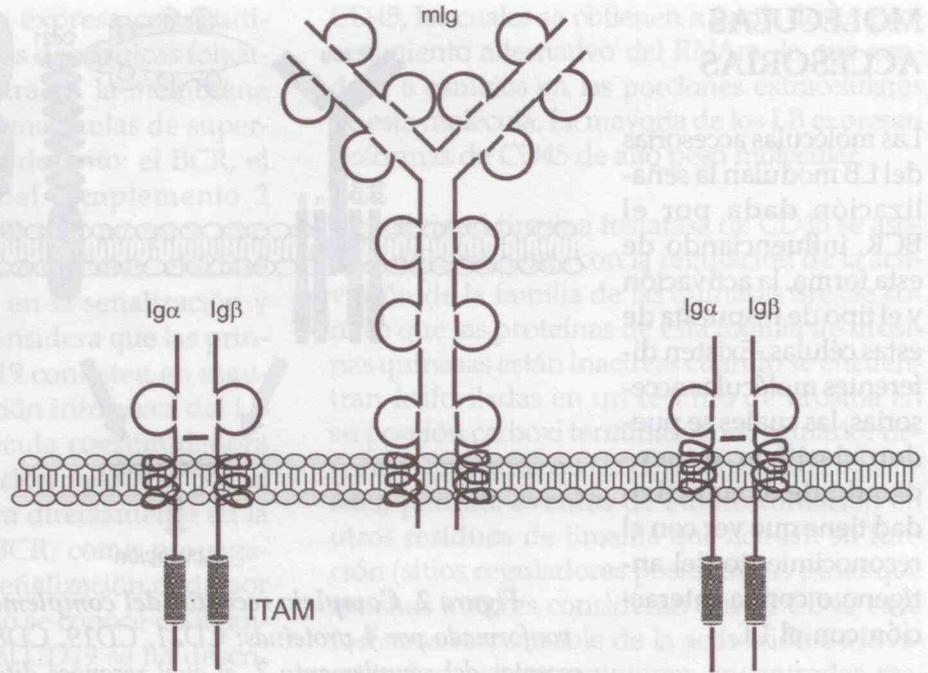


Figura 1. Complejo receptor de la célula B. El BCR se encuentra conformado por una inmunoglobulina anclada a la membrana y dos heterodímeros $Ig\alpha/Ig\beta$. La mIg es la responsable del reconocimiento del antígeno en su conformación nativa. Las cadenas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ se encargan de la señalización mediada por dicho reconocimiento, lo cual se logra por medio de unos motivos ITAM localizados en la cola citoplasmática de éstas moléculas.

las cadenas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, no responden ante estímulos antigénicos. Una vez ocurre el entrecruzamiento de las mIg con su antígeno o mediante el uso de anticuerpos anti-Ig, las colas citoplasmáticas de $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ se fosforilan rápidamente en sus residuos de tirosinas. Adicionalmente, la importancia de estas cadenas se observó gracias al desarrollo de ratones deficientes para $Ig\beta$ ($Ig\beta^{-/-}$). Si bien estos ratones $Ig\beta^{-/-}$ tienen intacto el gen que codifica para $Ig\alpha$ (la cual puede formar homodímeros), presentan una inhibición de la recombinación de la región V del gen de las cadenas pesadas, lo cual se manifiesta en un defecto en la maduración de las células B. Esta evidencia confirma que el heterodímero $Ig\alpha/Ig\beta$ constituye la unidad señalizadora del BCR.

MOLÉCULAS ACCESORIAS

Las moléculas accesorias del LB modulan la señalización dada por el BCR, influenciando de esta forma, la activación y el tipo de respuesta de estas células. Existen diferentes moléculas accesorias, las cuales se pueden clasificar dependiendo de si su actividad tiene que ver con el reconocimiento del antígeno o con la interacción con el LT.

Moléculas que participan en el reconocimiento del antígeno

Complejo CD19/CD21/CD81(TAPA)/Leu-13(CD225)

Este complejo multimérico se conoce comúnmente como el complejo receptor del complemento 2, el cual cumple un papel importante en el reconocimiento de antígenos y en la activación de los LB, principalmente, en el caso de estímulos que activan el LB sin ser reconocidos por el BCR o de antígenos monovalentes que no propician el entrecruzamiento del receptor antigénico (Figura 2). Si bien esta estructura heterodimérica está conformada por 4 moléculas, solamente dos de éstas, el CD21 y el CD19, son las mejor estudiadas y caracterizadas.

CD21. Es una glicoproteína de 145 kDa expresada diferencialmente en los LB y en células dendríticas foliculares. El CD21 es el receptor

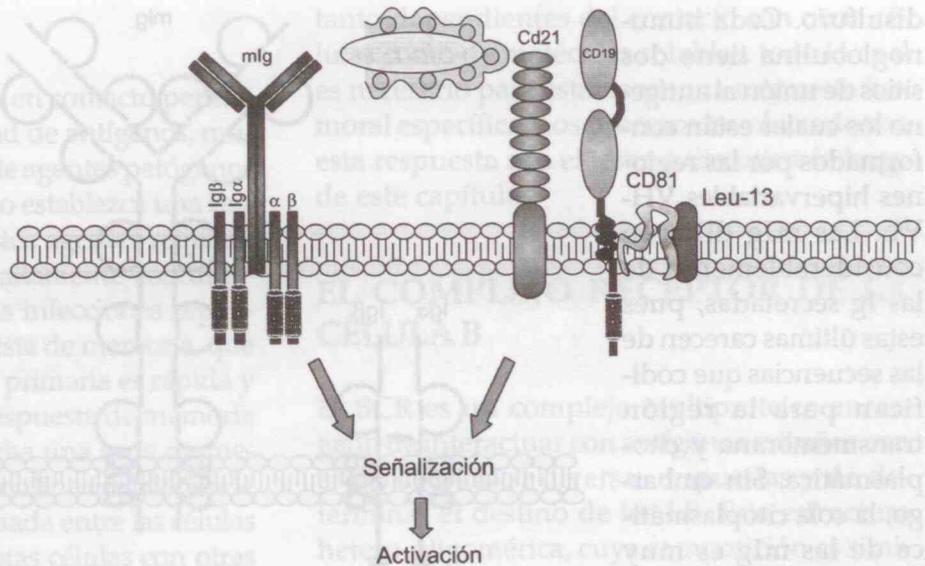


Figura 2. Complejo receptor del complemento 2. Es un receptor conformado por 4 proteínas: CD21, CD19, CD81 y Leu13. El CD21 es el receptor del complemento 2, el cual reconoce diferentes fracciones de C3. El CD19 es la molécula responsable de la señalización del complejo por medio de un motivo ITAM presente en su cola citoplasmática. El complejo receptor del complemento 2 junto al BCR y FcR, son los responsables de la señalización intracelular y de la activación del LB mediada por el antígeno.

del complemento 2 (CR2), el cual reconoce las fracciones C3b, C3d y C3dg del tercer componente del complemento y es el ligando natural del virus Epstein Barr. El CD21 requiere estar asociado con otras moléculas como el CD19, para realizar su función. El estímulo mediante este receptor, sólo o en conjunto con el BCR, conduce a movilización de calcio y a proliferación celular. Los ratones deficientes para CD21 manifiestan muchos de los defectos observados en los ratones deficientes de CD19, aunque con un fenotipo más leve. Dentro de estos defectos se encuentran: capacidad reducida de formación de centros germinales, respuesta defectuosa a antígenos TD, alteraciones en la maduración de la afinidad, entre otros.

CD19. Es una glicoproteína de membrana de 95 kDa que hace parte de la superfamilia de

las inmunoglobulinas, se expresa constitutivamente en LB y en células dendríticas foliculares. El CD19 se encuentra en la membrana de los LB asociado a otras moléculas de superficie, entre las que se han descrito: el BCR, el complejo del receptor del complemento 2 (CD21/CD81/Leu-13/CD19) y el receptor tipo Toll RP-105. Junto a estas moléculas, el CD19 cumple un papel central en la señalización y activación de los LB. Se considera que las principales funciones del CD19 consisten en regular el umbral de señalización intrínseca del LB y actuar como una molécula coestimuladora que amplifica la señalización mediada por el BCR. El CD19 se involucra directamente en la vía de señalización del BCR, como propagador y amplificador de la señalización dada por la proteína Btk. Aunque no se conoce un ligando específico y directo del CD19 se ha descrito que esta molécula tiene una interacción de baja afinidad con IgM, IgG3 y heparán sulfato. El entrecruzamiento del CD19 en los LB desencadena el aumento sostenido del calcio intracelular, la internalización de sí misma, la proliferación celular, la adhesión o agregación homotípica y la regulación positiva de la expresión de las moléculas B7-1 y B7-2. Los ratones "knock-out" para CD19 (CD19^{-/-}) exhiben una deficiencia marcada en la respuesta inmune humoral *in vivo*, principalmente hacia antígenos TD, tales como alteraciones en la formación de centros germinales, maduración de la afinidad y reducción en los niveles de IgM del 75% y en los niveles de IgG del 77% - 90%, entre otros.

CD45.

El CD45 es una glicoproteína de membrana que se expresa en las células hematopoyéticas nucleadas, la cual posee en su cola citoplasmática una actividad fosfatasa de tirosinas, que es importante para la activación y la señalización tanto del LT como del LB. En los linfocitos existe una expresión diferencial de varias isoformas de

CD45, las cuales se obtienen a partir de un procesamiento alternativo del RNAm, lo que conduce a cambios en las porciones extracelulares de esta molécula. La mayoría de los LB expresan isoformas de CD45 de alto peso molecular.

La actividad tirosina fosfatasa de CD45 se asocia principalmente con la regulación de la activación de la familia de las quinasas Src. Se conoce que las proteínas de esta familia de tirosinas quinasas están inactivas cuando se encuentran fosforiladas en un residuo de tirosina en su porción carboxi terminal (sitio regulador negativo), mientras que la desfosforilación de este sitio, permite eventos de autofosforilación en otros residuos de tirosina que activan su función (sitios reguladores positivos). A pesar que muchos autores consideran que el CD45 es la fosfatasa responsable de la activación de la familia Src, existen opiniones encontradas respecto a su papel regulador de la señalización del BCR, ya que ciertas evidencias muestran que el CD45 también tiene la capacidad de desfosforilar los sitios reguladores positivos. Sin embargo, un estudio reciente sugiere que si bien CD45 cumple ambos papeles, la ubicación temprana de esta molécula en la sinapsis inmunológica y el posterior desplazamiento de la misma, garantiza que su actividad fosfatasa está estimulando inicialmente la cascada de señalización y que en eventos posteriores no la inhibe. La importancia de esta molécula en la señalización del BCR, se corrobora con el estudio de ratones deficientes para CD45, los cuales no responden ante estímulos con anticuerpos anti-Ig (presentan defectos en los flujos de calcio, en la proliferación ante mitógenos y en la activación de PLC y de las MAPK). Por lo tanto, la expresión de CD45 se considera esencial en la transducción de señales antígeno específicas en el LB.

CD38.

La molécula CD38 es una glicoproteína de 42 kDa que se expresa en una gran variedad de

células y en los LB se encuentra asociada al BCR. La interacción de anticuerpos específicos contra el CD38 en presencia de otros factores tales como IL-4, IL-5 y LPS induce una señal proliferativa muy potente. Además, la señalización desencadenada por esta molécula rescata a los LB de los centros germinales de la apoptosis.

Moléculas que participan en la interacción con el LT

La producción de anticuerpos contra antígenos proteicos es dependiente de los linfocitos T CD4+CD8- (Respuesta dependiente de T). Esta respuesta humoral requiere de la cooperación, comunicación e interacción física entre los LB y los LT específicos de antígeno (Figura 3). Este fenómeno de interacción LT-LB se conoce con el nombre de sinapsis inmunológica. La sinapsis comienza con el reconocimiento de péptidos presentados por el LB en el contexto del CMH clase II por parte del TCR. Aunque la interacción con el TCR es esencial y determina la especificidad de la respuesta inmune, se requiere de la interacción de otros receptores independientes de antígeno (presentes en ambas clases de linfocitos) que contribuyen con la estabilización de la interacción y con la señalización intracelular necesaria para una adecuada activación. Dentro de estos receptores encontramos las moléculas de adhesión, los receptores de citoquinas y las moléculas coestimuladoras. Estas últimas cumplen

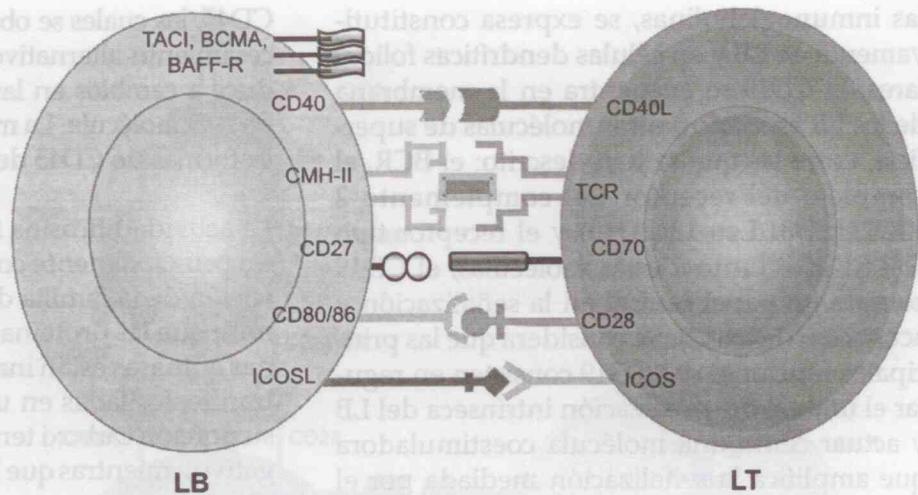


Figura 3. Interacción LT-LB. Esta interacción se logra por el reconocimiento del TCR de un epítipo antigénico presentado en el contexto del CMH clase II en el LB. Sin embargo, la participación de otros receptores (receptores de citoquinas, moléculas de adhesión y moléculas coestimuladoras) es importante en la cooperación LT-LB. Las moléculas coestimuladoras juegan un papel importante en la señalización y activación de los linfocitos.

un papel muy importante en la activación y señalización celular, por lo cual están encargadas de dirigir y definir la naturaleza de la respuesta inmune de los LT y los LB hacia la proliferación, la diferenciación a un estado efector o de memoria, o la prevención de la respuesta inmune (anergia, apoptosis). A continuación, se exponen algunas generalidades sobre las moléculas coestimuladoras involucradas en la activación del LB. En la tabla 1 se presentan los aspectos más importantes de algunas moléculas coestimuladoras que no son explicadas en el texto.

CD40/CD40L

EL CD40 es una glicoproteína de superficie de 49 kDa perteneciente a la familia de los TNFR, la cual se expresa constitutivamente en las CPA, como es el caso de los LB. El ligando para CD40, la proteína transmembrana CD40L

(CD154) pertenece a la familia del TNF y se expresa en los LT después de su activación. La señalización por el CD40 es un evento crítico para la generación de los centros germinales en los órganos linfoides, así como para el cambio de isotipo en los LB. Individuos con el síndrome de hiperinmoglobulinemia M, los cuales tienen un defecto en esta vía de coestimulación, no desarrollan centros germinales, ni logran producir inmunoglobulinas de clases diferentes a la IgM. Además los ratones "knock-out" para CD40L presentan defectos en la inmunidad humoral hacia antígenos TD, particularmente en la formación de centros germinales y en el cambio de isotipo. Adicionalmente, cuando se interrumpe esta vía de coestimulación mediante el uso de anticuerpos bloqueadores, se interrumpe la generación de maduración de la afinidad, el cambio de isotipo y la generación de LB de memoria. En general, las señales desencadenadas por esta vía de coestimulación inducen la activación de los factores de transcripción NFκB y AP-1, estimulan la producción de quimioquinas (IL-8, proteína quimiotáctica de los monocitos 1), regulan positivamente la expresión de receptores de citoquinas (IL-2R, IL-4R e IL-5R) y de otros genes como el CD23, ICAM-1, Fas, B7-1, B7-2, Bcl-x, Bcl-2 entre otros.

MOLÉCULA COESTIMULADORA	EXPRESIÓN	LIGANDO	EXPRESIÓN	FUNCIÓN
ICOS. Miembro de la familia CD28/B7	Inducible por activación en LT, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales	ICOSL (B7-H2, B7RP-1, LINCOS)	Constitutiva en LB y macrófagos	Aumenta la producción de IL-4, IL-10 e IL-13. Promueve la diferenciación hacia células Th2 y la producción de LT de memoria.
OX40 (CD134). Miembro de la familia TNF	LT activados	OX40L	CPA activadas	Estimula la proliferación y secreción de Ig. Promueve la proliferación y la generación de memoria de los LT
4-1BB (CD137). Miembro de la familia TNFR	LT y NK activadas, neutrófilos y cosinófilos	4-1BBL	CPA activadas	Estimulador de los LT (producción de IL-2 e IFNγ, actividad citolítica, factores de sobrevivencia). Vía de señalización importante en la proliferación, producción de anticuerpos y cambio de isotipo en los LB.
LIGHT (LT5). Miembro de la familia TNF	LT activados, monocitos, granulocitos y células dendríticas inmaduras	LTβR, DcR3 HVEM/TR2	LTβR: Células estromales y células hematopoyéticas no linfoides DcR3: Carcinomas de colon y pulmón. HVEM/TR2: LT, LB, NK, células dendríticas, endotelio.	Activación de los LT (proliferación y producción de citoquinas Th1)

Tabla 1. Otras moléculas coestimuladoras

B7-1, B7-2/CD28

Las moléculas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) se encuentran presentes en las CPA, y así como otras de las moléculas descritas hasta el momento hacen parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas. El B7-2 se expresa constitutivamente en bajos niveles mientras el B7-1 solo se expresa después de la estimulación de la CPA. Los ligandos para estas moléculas son el CD28 y el CTLA-4. El CD28 se expresa constitutivamente en el LT, en el cual cumple funciones coestimuladoras, mientras que el CTLA-4, el cual se expresa en los LT después de ser activados inhibe la función de éstos. La coestimulación mediada por la vía B7/CD28 es esen-

cial para la activación, inducción de la proliferación, la producción de IL-2, la inducción de señales antiapoptóticas (Bcl-2 y Bcl-x), la expresión de CD40L y del coestimulador inducible en el LT. Por lo tanto, esta vía de señalización es esencial para la correcta activación del LT y por ende para que se establezca una adecuada coestimulación al LB. Esto se ha comprobado en ratones "knock-out" para CD28, los cuales presentan alteraciones severas en la proliferación y activación de los LT, pero así mismo en la formación de centros germinales, en el cambio de isotipo y en la producción de inmunoglobulinas por parte del LB.

CD27/CD70

El CD27 es una molécula coestimuladora miembro de la familia del TNF, la cual se expresa constitutivamente en la mayoría de los LT, mientras que su expresión en los LB va incrementando con la edad, hasta ser ligeramente mayor del 40% en los LB circulantes. Esto se debe a que solo los LB de memoria expresan CD27, por lo cual se le considera un marcador diferencial de estas células. El ligando de CD27 es el CD70, un receptor perteneciente a la familia TNFR, el cual se expresa en los LT y los LB activados. Esta vía de coestimulación promueve la proliferación de LB, la diferenciación de LB de memoria a células plasmáticas y aumenta la producción de inmunoglobulinas por parte de estas células.

BlyS y APRIL

El estimulador del LB (BlyS, también conocido como BAFF, TALL-1, THANK y zTNF4) es un miembro recién descrito de la familia del TNF, el cual se puede encontrar anclado a la membrana o en forma soluble. BlyS se expresa en los mononucleares de sangre periférica,

médula ósea y nódulos linfáticos, principalmente en las CPA. Esta molécula se une selectivamente a tres receptores miembros de la familia TNFR que se expresan selectivamente en los LB: el TACI, también expresado en LT, el BCMA y el receptor de BAFF. Tanto la forma soluble de BlyS como la unidad a la membrana pueden unirse a los LB, desencadenando una fuerte estimulación de estas células en presencia de entrecruzamiento del BCR. Esta activación es similar a la producida por la vía de CD40/CD40L, la cual conduce al aumento de moléculas antiapoptóticas como el NFκB y el Bcl-2 y a la activación de la vía de las MAPK. Ratones con ausencia de BlyS presentan una deficiencia humoral, con un defecto severo en la producción de anticuerpos tipo IgG e IgA.

La molécula APRIL, también conocida como TRDL-1, es otro miembro de la familia TNF que se expresa en los leucocitos de sangre periférica, principalmente en las CPA. APRIL sufre un procesamiento intracelular y por lo tanto se cree que solo se expresa de forma soluble; los ligandos de APRIL son BCMA y TACI. El papel de APRIL en la regulación de la respuesta inmune es menos claro que el de BlyS. Se ha descrito que APRIL estimula la producción de IgM. Un estudio reciente demostró que una modulación positiva de BlyS y APRIL en células dendríticas regula positivamente del cambio de isotipo (IgG, IgA e IgE) en respuestas independientes de LT.

RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO

Para la activación de los LB se requiere la existencia de un reconocimiento antigénico. Durante esta fase ocurre la interacción de las mIg con un antígeno específico, el cual se debe encontrar en su conformación nativa e idealmente debe ser multivalente, es decir que posea varios determinantes antigénicos. Se ha

observado que las diferencias en la geometría del antígeno, el número de determinantes antigénicos reconocidos por el BCR, así como el grado de agrupamiento de los receptores inducido por el antígeno, son elementos determinantes de la respuesta del LB.

Cuando el BCR de un LB reconoce con alta afinidad el determinante antigénico de un agente extraño, ocurre una primera interacción antígeno-mIg, la cual favorece la polarización del reconocimiento y el entrecruzamiento de los BCR. Este fenómeno consiste en el redireccionamiento y agrupamiento de los receptores antigénicos hacia el lugar de interacción con el antígeno. Este evento se logra por la polarización de microdominios de la membrana plasmática (ricos en esfingolípidos y colesterol) hacia el centro del reconocimiento antigénico. Estos microdominios membranales se encuentran asociados a receptores accesorios, proteínas de señalización y elementos del citoesqueleto, permitiendo de esta forma el acceso de un grupo de activación supramolecular al sitio de reconocimiento antigénico. Esto favorece la generación de múltiples señales, las cuales se concentran y se integran con el fin de alcanzar el umbral de señalización necesario para la activación del LB. La participación de estos microdominios de membrana en la activación de los LB ha sido ampliamente descrito y comprobado. El tratamiento de LB con anticuerpos anti-Ig, favorece el redireccionamiento de estas porciones membranales en LB maduros, más no en LB inmaduros (se cree que este evento está jugando un papel importante en la tolerancia de LB); adicionalmente, la alteración de estos microdominios resulta en la pérdida completa de la activación celular mediada por el BCR.

El reconocimiento antigénico puede darse adicionalmente por medio del complejo receptor de complemento 2 ó del FcR (CD23), los cuales reconocen antígenos opsonizados con

fracciones del complemento o con anticuerpos, respectivamente. Estos receptores potencian la señalización otorgada por el BCR, permitiendo alcanzar más fácilmente el umbral de activación del LB.

SEÑALIZACIÓN DEL BCR

El papel del BCR en la señalización y en la activación del LB ha sido ampliamente estudiado. Las principales funciones del BCR son reconocer el antígeno, internalizarlo y transmitir una serie de señales intracelulares con el fin de promover la activación y la respuesta de los LB. Estos eventos estimulan la presentación de epítopos antigénicos en el contexto del CMH clase II y proporcionan otro tipo de señales que posteriormente estimulan a los LT. Este tipo de respuestas específicas de antígeno son mediadas por la transmisión de señales que inicia el BCR. Los mecanismos por los cuales las señales antigénicas son transmitidas por el receptor y propagadas por una serie de proteínas, son altamente complejos y en la actualidad, aunque se han caracterizado muchos de los elementos implicados, faltan bastantes aspectos por dilucidar. En general, la señalización mediada por el BCR se puede dividir en la activación inicial de proteínas quinasas de tirosinas, seguida por la activación de varias proteínas adaptadoras y de enzimas que, en último término, estimulan diferentes factores de transcripción, los cuales a su vez activan la transcripción de diversos genes implicados en la respuesta funcional de los LB (Figura 4).

El entrecruzamiento del BCR desencadena un cambio topológico o conformacional, que propicia la señalización intracelular. Aunque el BCR no posee una actividad quinasa de tirosinas intrínseca, existen tres tipos de PKT asociadas con este complejo que cumplen esta función: la familia de las quinasas Src (Lyn, Blk

y Fyn), la proteína Syk y la proteína Btk. Una vez ocurre el entrecruzamiento del BCR, las tirosinas quinasas de la familia Src son activadas por la acción de la fosfatasa CD45. Estas PKT son las responsables de la fosforilación de los dos residuos de tirosinas en los ITAM de las cadenas I α e I β . Por su parte Syk, el homólogo de Zap-70 del LT, se une a los ITAM fosforilados por medio de sus dominios SH2 (los cuales reconocen tirosinas fosforiladas), lo cual induce autofosforilaciones o transfosforilaciones mediadas por la familia Src.

BLNK (proteína unidora de linfocitos B, SLP-65), es una proteína adaptadora homóloga a la proteína LAT en los LT, la cual se expresa únicamente en los LB. BLNK interactúa con Syk y es fosforilada por ésta o por miembros de la familia Src. Una vez BLNK es fosforilada, se asocia y permite la activación de otras vías de señalización corriente abajo como la PLC, las MAPK y la PI3K. La vía mejor caracterizada es la que desencadena la elevación de calcio intracelular. Una vez se da el entrecruzamiento del BCR, BLNK recluta y activa la enzima PLC γ , la cual hidroliza el fosfolípido de membrana PIP $_2$ en dos componentes: IP $_3$ y DAG. El DAG, en presencia de calcio, activa las isoformas de PKC α , β y δ , mientras que el IP $_3$ estimula la liberación de calcio desde compartimientos intracelulares como el retículo endoplásmico e induce el in-

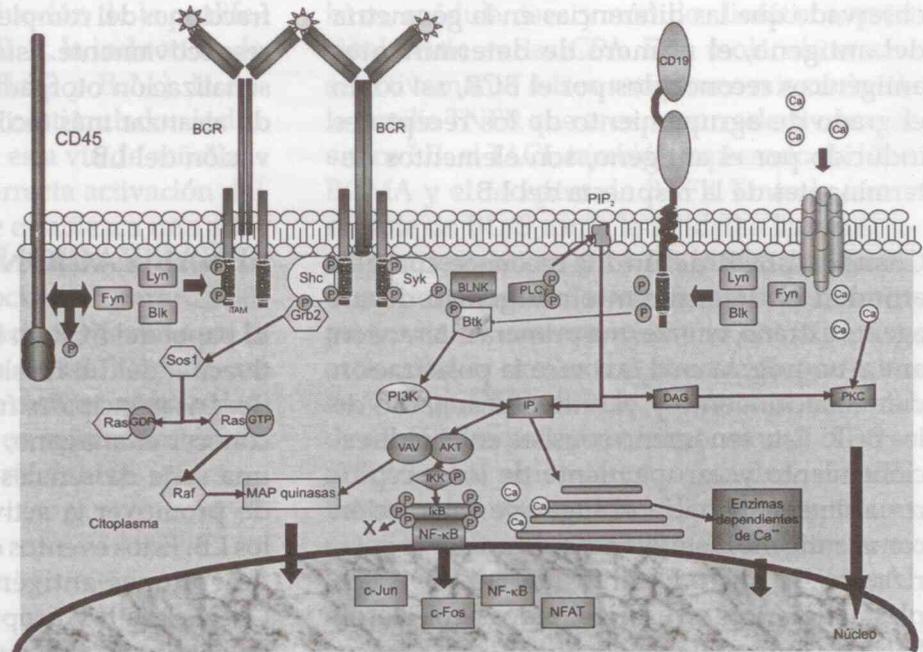


Figura 4. Señalización del BCR. La transducción de señales desencadenadas por el BCR requieren del entrecruzamiento de estos receptores antigénicos, de la participación de un grupo de quinasas, de proteínas adaptadoras y de otras enzimas, las cuales activan factores de transcripción que se translocan al núcleo y activan la transcripción de varios genes responsables de las diferentes respuestas de los LB.

greso de calcio extracelular. El aumento del calcio intracelular promueve la activación de enzimas dependientes de calcio, como la calcineurina, la cual promueve la desfosforilación y activación del factor de transcripción NFAT.

Otra vía importante en la señalización del BCR es la activación de las MAPK. Algunos investigadores han reportado que la proteína adaptadora Shc, se asocia directamente con las tirosinas fosforiladas del BCR. Una vez Shc se acopla a los ITAM es fosforilada por miembros de la familia Src. Posteriormente, Shc fosforilada, recluta a la quinasa de tirosinas, Grb2. A su vez Grb2 es responsable de la activación y reclutamiento de la proteína Sos1. Sos activa directamente a la proteína Ras pues ac-

tiva el intercambio de GDP por GTP. Ras por su parte activa a la quinasa Raf, la cual inicia secuencialmente una serie de fosforilaciones en residuos serinas/treoninas en las MAPK. Las MAPK constituyen un grupo de proteínas involucradas en la señalización, las cuales se caracterizan por realizar fosforilaciones sucesivas entre las distintas proteínas que las conforman. Finalmente, esta vía permite la activación de c-Fos y c-Jun, los cuales se translocan al núcleo y forman un heterodímero que constituye el factor de transcripción AP-1.

Finalmente, otra vía importante en la señalización del BCR, involucra a Btk, un miembro de la familia Tec. Esta proteína es reclutada por BLNK fosforilada, mediante la interacción con dominios SH2. La importancia de la Btk para la activación del LB se demostró inicialmente en humanos, gracias a la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X; estos pacientes tienen alterado el gen que codifica para esta quinasa de tirosinas, lo cual se asocia con un defecto marcado en la maduración de los LB. Tanto Btk como Syk han sido implicadas en el reclutamiento y activación de PI3K. PI3K es una molécula que si bien estimula la liberación de calcio, también logra estimular la quinasa de serinas/treoninas Akt (PKB), la cual a su vez, en asociación con la proteína Vav, estimula la vía de las MAPK. Akt tiene efectos directos sobre la regulación de la vía del NF κ B, debido a que fosforila directamente a la quinasa del inhibidor de κ B (I κ K), la cual una vez está activa, fosforila al inhibidor κ B (I κ B), lo cual resulta en ubiquitinación y degradación del I κ B y por ende en la activación del factor de transcripción NF κ B.

Regulación negativa de la activación de los linfocitos B

Con el fin de evitar el desarrollo de una respuesta autoinmune después de un estímulo

persistente, la señalización en el LB debe terminar en algún momento. Esto se logra gracias a la actividad de un grupo de elementos de señalización bien definidos, los cuales se componen principalmente de fosfatasa y GTPasas. La activación de estos sistemas en el LB se desencadena principalmente por la acción del Fc γ RIIB y del CD22. El Fc γ RIIB, es una molécula que participa en la regulación de los LB por retroalimentación de la producción de anticuerpos, ya que reconoce las fracciones Fc de las Ig que se encuentran acopladas a un antígeno. La modulación de la respuesta inmune por este receptor se describe con detalle en el capítulo de mecanismos reguladores negativos de la respuesta inmune. Por su parte, el CD22 es una proteína de adhesión la cual se expresa desde el estadio pre-B hasta que los LB maduros se diferencian a células plasmáticas. Esta molécula actúa como un inhibidor de las respuestas inducidas por el BCR, lo cual se ha corroborado porque los ratones "knock-out" para CD22 presentan una hiperrespuesta a estímulos mediados por el BCR. Su acción se debe a que posee un motivo ITIM, el cual es fosforilado por la tirosina quinasa de la familia Src, Lyn. Esta PTK a su vez recluta la fosfatasa SHP-1, la cual es responsable de la función inhibidora del receptor.

RESPUESTAS DEL LINFOCITO B A ANTÍGENOS TIMO-DEPENDIENTES

Con el fin de explicar la manera como los linfocitos logran discriminar las señales responsables de su activación, se ha propuesto el modelo conocido como el de "las dos señales". De acuerdo con este modelo, para que exista una activación óptima de cualquier linfocito se requiere en primer término, de un reconocimiento específico por parte de su receptor antigénico (primera señal o interacción receptor-

antígeno) y adicionalmente de señales accesorias, conocidas como señales coestimuladoras (segunda señal) (Figura 5). Las segundas señales son independientes del receptor antigénico y son críticas para la activación, proliferación sostenida e inducción de diferenciación celular. En ausencia de las segundas señales, los linfocitos fallan en responder y se vuelven anérgicos o sufren apoptosis. Este modelo explica perfectamente la forma como responden los LB que reconocen antígenos de naturaleza proteica, es decir antígenos TD. Es importante aclarar que la respuesta de LB a antígenos no proteicos o antígenos TI, tiene diferencias marcadas con la respuesta hacia antígenos proteicos. A continuación, se exponen las principales respuestas de los LB con base en antígenos TD. En otro aparte posterior, se aclararán las características principales de las respuestas a antígenos TI.

Respuesta al reconocer un antígeno proteico

La respuesta del LB frente antígenos proteicos se puede dividir en dos fases: una fase de activación y proliferación y otra de diferenciación. Cuando el BCR interactúa con

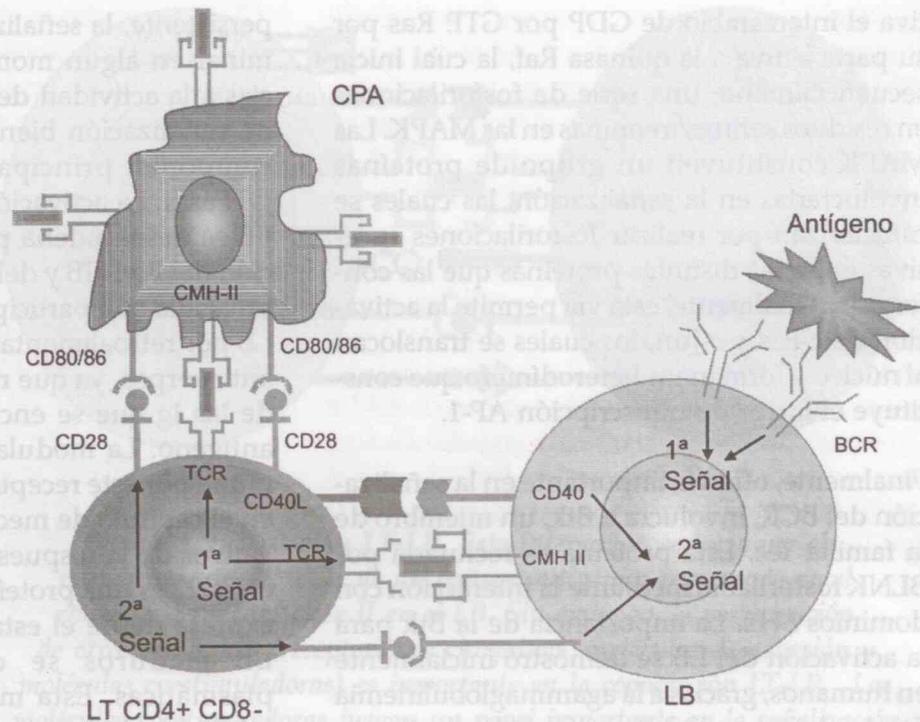


Figura 5. Señales requeridas para la activación de los linfocitos. Según el modelo de "las dos señales", se requiere de una primera señal dada por el receptor antigénico; en el caso de los LT a través del TCR y de los LB por medio del BCR. Adicionalmente, se necesitan segundas señales generadas por moléculas de adhesión, receptores de citoquinas y moléculas coestimuladoras. En la figura se ilustran la primera y la segunda (solamente con algunas moléculas coestimuladoras) señal.

su antígeno específico, se inicia la señalización desde el receptor antigénico y las moléculas asociadas a él, promoviendo así la activación del LB. Existen varias respuestas que indican la activación de estos LB, tales como proliferación, producción de citoquinas, expresión de ciertas moléculas de superficie, cambios en la adhesión y movilidad celular, entre otros; sin embargo, la proliferación es una de las respuestas más importantes, más evidentes y fáciles de analizar. La proliferación del LB permite la expansión clonal de las células que respondieron al antígeno, lo cual garantiza la disponibilidad de un número importante de células respondedoras. Pue-

den existir varias clonas de respuesta al mismo antígeno, ya que éstas pueden reconocer determinantes antigénicos diferentes o epítopes distintos en el mismo agente. Adicionalmente, cuando se produce el reconocimiento antigénico por parte del linfocito B, se promueve la internalización del antígeno, el cual es degradado y posteriormente presentado en el contexto de CMH clase II. Este evento es esencial para que ocurra la interacción del LB presentador con el LT CD4+. De cierta forma, se podría decir, que el reconocimiento antigénico, es un evento que prepara al LB para responder a la coestimulación otorgada posteriormente por el LT. El estímulo antigénico proporciona la señal para que el LB que estaba en reposo, avance en su ciclo celular (pase de la fase G₀ a G₁). Este estímulo induce la síntesis y expresión de un gran número de proteínas, entre las cuales se encuentran proteínas antiapoptóticas, las moléculas del CMH clase II y las moléculas coestimuladoras. De tal forma que, una vez se da el reconocimiento antigénico, el LB se encuentra preparado para interactuar, activar y a su vez recibir la estimulación del LT específico de antígeno.

Respuesta al interactuar con linfocitos T específicos de antígeno

Una amplia variedad de estudios reportan que la interacción entre los LT y LB específicos de antígeno es esencial para la activación completa de las células T y las células B y para la producción de una respuesta inmune humoral adecuada a antígenos proteicos. Las señales accesorias otorgadas por el LT al LB, permiten que estos últimos se diferencien a células productoras de anticuerpo o a células de memoria y además son esenciales para que ocurra la maduración de afinidad y el cambio de isotipo.

Maduración de la afinidad

La maduración de la afinidad es el proceso por medio del cual se aumenta la afinidad de los anticuerpos hacia su antígeno específico. Como ya se ha mencionado previamente en este y otros capítulos, la especificidad y la afinidad de unión a un antígeno esta dada por la secuencia de la región V de la molécula del anticuerpo, el resultado de la combinación aleatoria de diferentes segmentos genéticos, lo que sumado a la existencia de otros factores de diversidad, permite obtener un repertorio de clonas de LB altamente diverso. Sin embargo, los LB poseen otra adaptación que le permite aumentar la especificidad del receptor antigénico. Esta adaptación se conoce con el nombre de maduración de la afinidad, la cual le imprime mayor eficiencia a la respuesta inmune humoral, ya que incrementa la afinidad de las inmunoglobulinas, por un antígeno particular, hasta 10 veces más.

La maduración de la afinidad se logra mediante mutaciones somáticas secuenciales en porciones VH y VL de los genes de inmunoglobulina. Las células B de los centros germinales que proliferan, presentan una tasa de mutación muy elevada en las secuencias de DNA de las regiones V rearrregladas. Esta tasa de mutaciones se ha calculado en una mutación por cada 10⁻³ bases por generación, la cual se encuentra muy por encima (de 10³ a 10⁴ veces más) de las que normalmente se espera para cualquier fragmento genómico. Los centros germinales son los únicos sitios anatómicos en los cuales se hace hipermutación somática. Esto lleva a concluir que la disponibilidad de los componentes del centro germinal, entre ellos los LT, son esenciales para la generación de estas mutaciones. Una vasta mayoría de las respuestas inmunes primarias tardías, así como las respuestas secundarias de anticuerpos, exhiben cambios importan-

tes de la secuencia V de línea germinal; por lo tanto, la mayoría de LB de memoria poseen un receptor de antígeno que ha sufrido un proceso de mutación somática adicional al que ocurrió durante su diferenciación a célula B.

A pesar que la maduración de la afinidad es un evento claramente definido, aún se desconoce el mecanismo exacto responsable de este fenómeno. Inicialmente se postuló que la región VDJ rearrreglada se convertía en una zona muy susceptible, posiblemente por el reconocimiento de proteínas unidoras de DNA, que tienen la capacidad de alterar la secuencia. Estudios *in vitro*, en los cuales las células B humanas se cultivaron en presencia de anti-Ig y LT ayudadores, lograron mantener los procesos de hipermutación somática, indicando la necesidad de las señales de los LT para este proceso. Adicionalmente, se han reportado la existencia de puntos calientes de mutación intrínsecos a las secuencias V, los motivos TAA y RGYW, los cuales se encuentran en regiones que entran en contacto con el antígeno. Sin embargo, mutaciones por fuera de estos motivos se han descrito con una frecuencia similar. Finalmente, algunos hallazgos recientes han involucrado a la enzima AID y a las DNA polimerasas que cometen errores con alta frecuencia durante la polimerización y la reparación (pol α , pol β , pol δ , pol ϵ , pol η , pol θ , pol ζ , pol ι , pol κ , pol λ , pol μ). En ciertos trabajos acerca del papel de AID en los centros germinales, se determinó que la actividad de desaminación de citidinas de esta enzima es esencial para el proceso de mutación somática. Se postula que el proceso de desaminación, genera sitios de restricción para algún tipo de endonucleasas, las cuales cortan el DNA y promueven de esta forma, la generación de una de reparación asociada a altas tasas de cambios en la secuencia mediada posiblemente por la acción de algunas polimerasas. La ocurrencia de estos

cambios podría dar paso a una frecuencia alta de sustituciones que explicarían el fenómeno de hipermutación. Sin embargo, el papel de AID y de estas polimerasas así como su predilección por estas regiones V debe ser confirmado.

La asociación de defectos en la maduración de la afinidad con susceptibilidad a infecciones, se ha hecho en pacientes con hiperinmunoglobulinemia M, los cuales además de no hacer cambio de isotipo, no presentan hipermutaciones somáticas y poseen una frecuencia aumentada a diferentes tipos de infecciones.

Es importante anotar que no todas las inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgE) presentan mutaciones somáticas, indicando que los eventos de maduración de la afinidad y de cambio de isotipo son independientes.

Cambio de isotipo

El cambio de isotipo es el mecanismo por el cual una clona de células B es capaz de secretar un anticuerpo con igual especificidad pero con capacidades efectoras diferentes. Esto se logra gracias a eventos de recombinación genética, que conducen a que la región genética $C\mu$ se remplace con otras secuencias de CH ($C\alpha$, $C\gamma$, $C\epsilon$) y de esta forma se produzcan inmunoglobulinas con isotipos diferentes a la IgM y a la IgD: IgA, IgG e IgE. Como se mencionó, los genes que codifican para la cadena pesada de las inmunoglobulinas, están compuestos por una región V (resultante de la recombinación VDJ) y una región C. Cuando un LB maduro es activado, se promueve el reemplazo del grupo de exones que codifica la región constante. Este proceso se le denomina recombinación de cambio de isotipo o simplemente cambio de isotipo.

Durante el cambio de isotipo, la porción CH de la inmunoglobulina es reemplazada por otra, mientras se preserva la región V de unión al antígeno de la línea germinal. Este evento involucra un proceso de deleción o eliminación de material genético que generalmente ocurre entre la región VDJ recombinada y la región CH a recombinar. Existen unas secuencias de cambio (S) que definen las regiones que serán recombinadas. Las regiones S son secuencias pentaméricas repetitivas de 1-10 kb, las cuales se encuentran justo corriente arriba de todas las regiones C; de esta forma, la región C tiene la siguiente composición: 5'-V(D)J-S μ -C μ -C δ -S γ 3-C γ 3-S γ 1-C γ 1-S γ 2b-C γ 2b...-3'. Así, el cambio de isotipo involucra un evento de recombinación entre la región S μ y otra región S corriente abajo, con una posterior eliminación del DNA que se encuentra entre los dos sitios de recombinación. Este DNA se libera en forma de una molécula circular.

La forma en la cual se da el cambio de isotipo, se determina principalmente por el tipo de estímulo empleado. Es ampliamente conocido, que el cambio de isotipo es altamente dependiente de la coestimulación suministrada por los LT. Se ha demostrado que la interacción CD40-CD40L, así como diferentes citoquinas secretas por los LT dirigen e influencia el cambio de isotipo (Tabla 2). Estos estímulos favorecen la formación de transcritos de línea

ISOTIPO	CITOQUINA	EFEECTO
IgG1	IL-4 (murino)	+
	IFN γ (murino)	-
	TGF β (murino)	-
	IL-10 (humano)	+
IgG2a	IFN γ (murino)	+
	IL-4 (murino)	-
IgG2b	TGF β (murino)	+
	IL-4 (murino)	-
IgG3	IFN γ (murino)	+
	IL-4 (murino)	-
	IL-10 (humano)	+
IgG4	IL-4 (humano)	+
IgE	IL-4 (humano y murino)	+
	IL-13 (humano)	+
IgA	TGF β (humano y murino)	+
	IL-4 (murino)	+
	IL-5 (murino)	+

Tabla 2. Estímulos de citoquinas para el cambio de isotipo

germinal, los cuales corresponden a la transcripción diferencial dada a partir de los promotores presentes corriente arriba de cada una de las secuencias S. Existe evidencia creciente que prueba que la generación de estos transcritos es necesaria para la recombinación que lleva al cambio de isotipo; se cree que el principal papel es favorecer la accesibilidad de las regiones S para que la maquinaria de recombinación interactúe directamente con estas regiones.

Estudios recientes han sugerido que la enzima AID, podría tener algún papel en el proceso de recombinación entre las regiones S (Figura 6). Consecuente con esto, varios estudios han descrito que el cambio de isotipo es un proceso completamente dependiente de la activación de la enzima AID que pertenece a la familia de enzimas editoras de RNA. Esta enzima

se expresa únicamente en los LB de los centros germinales después de la estimulación de CD40. La importancia de AID se evidencia en pacientes con la forma autosómica recesiva del síndrome de hiperIgM, quienes presentan una mutación en esta enzima que los incapacita para la realización de la maduración de la afinidad y del cambio de isotipo. En estudios recientes se ha comprobado que la actividad de desaminación de la AID es esencial para su función, por lo tanto se propone que la AID actúa en cadenas de DNA sencillas que se exponen durante la transcripción.

Centros germinales

La forma de respuesta más obvia de los LB en los órganos linfoides secundarios es la formación de centros germinales. Los LB de centros germinales se asocian con expansión clonal, hipermutación somática, cambio de isotipo, selección de LB con base en su afinidad y diferenciación hacia LB efectoras (plasmocitos) o LB de memoria. Los centros germinales se desarrollan en los folículos de LB en los múltiples tejidos linfoides secundarios y cuando están maduros se diferencian en zona clara y zona oscura.

Durante la respuesta inflamatoria, las células dendríticas inmaduras que han capturado y

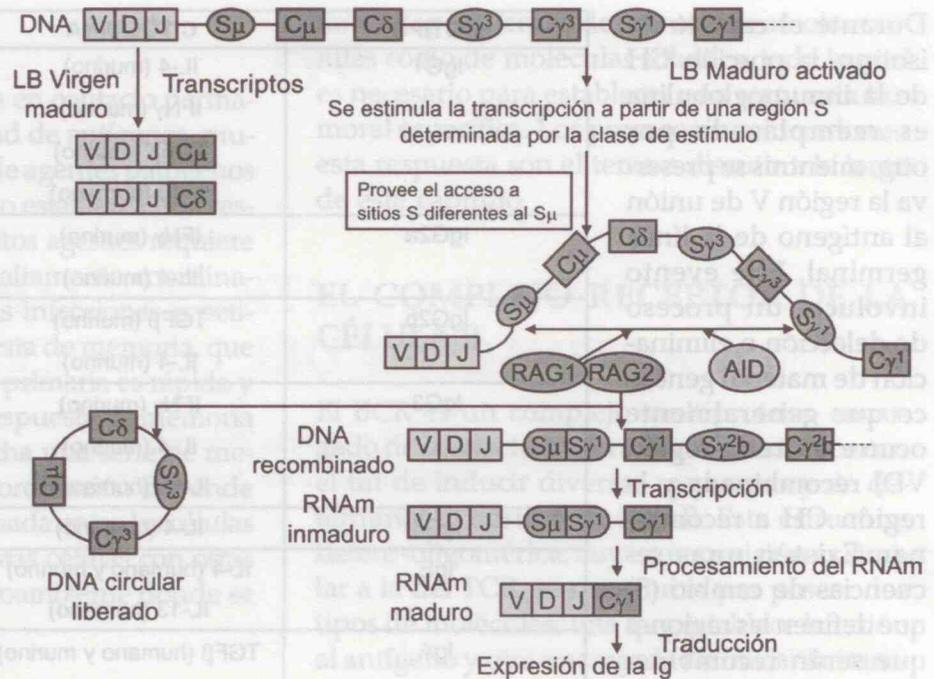


Figura 6. Recombinación de cambio de isotipo. Un LB maduro que ha recibido el estímulo antigénico y la coestimulación por parte del LT, principalmente a través de la vía CD40/CD40L y de diferentes citoquinas, transcribe una región S diferente a S μ . Esto favorece el acceso de la maquinaria de recombinación responsable del rearrreglo de las regiones S. Una vez el DNA ha sido recombinado, la cadena C de las inmunoglobulinas se puede transcribir y traducir a proteína. Adicionalmente, se libera un DNA circular con la secuencia que fue delecionada.

procesado un antígeno en la periferia, realizan un proceso de maduración que les permite migrar a aquellos órganos linfoides secundarios más cercanos. En estos órganos, presentan el antígeno a los LT en el contexto de CMH clase II, en la zona rica en LT. En esta misma zona, los LB pueden capturar el antígeno en su conformación nativa. De esta forma el reconocimiento antigénico constituye una primera señal de activación, tanto para el LT como para el LB, la cual suministra las señales necesarias para la regulación positiva de moléculas de superficie y de citoquinas que promuevan la interacción posterior entre estas dos células.

las. Es necesario que los linfocitos reconozcan primero el antígeno por separado antes de interactuar entre ellos; de esta forma, se garantiza que la respuesta inmune humoral desencadenada sea específica de antígeno. Una vez ocurre esta interacción en la región adyacente a los folículos primarios, el LB recibe estimulación adicional que le permite migrar al interior de un folículo para formar un centro germinal o folículo linfoide secundario (Figura 7). Inicialmente el LB se ubica en la zona oscura del CG, en la cual realiza una rápida expansión clonal (centroblastos). Durante esta replicación acelerada del DNA, se presentan las mutaciones somáticas en la región variable que son responsables de la maduración de la afinidad de los LB. Tres tipos de mutantes se generan en este proceso, mutantes con un BCR de alta afinidad, de baja afinidad o autoreactivos (centrocitos). Estos mutantes posteriormente migran a la zona basal clara del CG, en la cual se encuentran con las CDF. Las CDF son las encargadas de seleccionar las mutantes de alta afinidad; estas células forman una red y poseen la capacidad de tomar el antígeno y mantenerlo expresado en su superficie celular por períodos largos de tiempo (hasta por un año). Las CDF presentan los antígenos en forma de complejos inmunes, por

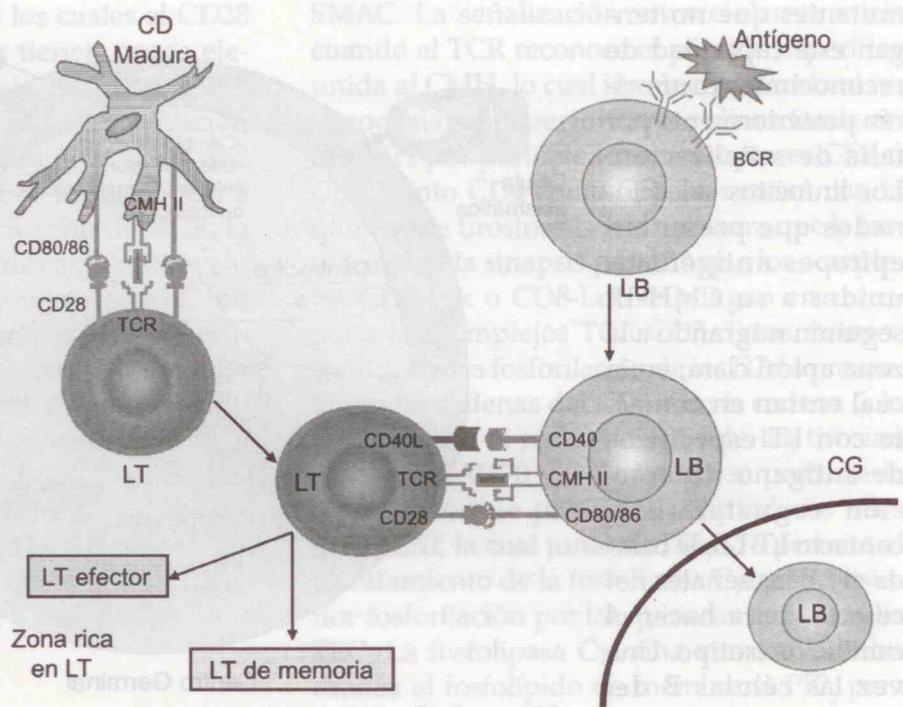


Figura 7. Secuencia de activación de los linfocitos. Una célula dendrítica madura que llega a la zona rica en células T de un ganglio, estimula a los LT específicos del antígeno que estas células están presentando. Por otra parte, el antígeno en conformación nativa que logra acceder al ganglio, tiene la capacidad de estimular a los LB específicos para dicho antígeno. Posteriormente, los LT y LB activados inicialmente logran interactuar en la zona adyacente a los folículos del ganglio. Luego de lo cual, los LT se diferencian a LT efector o de memoria y los LB pasan a un folículo linfoide para formar un centro germinal.

medio de receptores de complemento y del FcR. Una vez los LB han hecho hipermutación somática y han pasado a la zona basal clara, tienen la posibilidad de entrar en contacto con los antígenos presentados por las CDF. Solamente la interacción de las mutantes de alta afinidad con el complejo inmune presentado por las CDF posibilitará que el antígeno reconocido sea tomado, endocitado y presentado posteriormente en el contexto CMH clase II a los LT CD4+ presentes en el folículo. Estas interacciones proporcionan señales a los LB para rescatarlos de la apoptosis; sin embargo, los

mutantes que no tengan esta capacidad de reconocimiento morirán posteriormente por falta de señalización. Los linfocitos seleccionados que presentan epítopes antigénicos unidos a su CMH-II, seguirán migrando a la zona apical clara, en la cual entran en contacto con LT específicos de antígeno (interacción cognata). Este contacto LT-LB, le brinda al LB las señales necesarias para hacer el cambio de isotipo. Una vez las células B del centro germinal hacen maduración de la afinidad, cambio de isotipo y son seleccionadas por las células dendríticas foliculares, se diferenciarán en LB de memoria o células plasmáticas, las cuales salen del centro germinal a poblar otros tejidos (Figura 8).

Diferenciación a células de memoria o células plasmáticas

La memoria inmunológica está definida como la habilidad del sistema inmune adaptativo para generar una respuesta inmune rápida, robusta y efectiva después de un segundo encuentro con el antígeno. Las únicas células del sistema inmune conocidas como responsables de esta memoria son los LT y LB. Las células de memoria se encuentran en un estado que

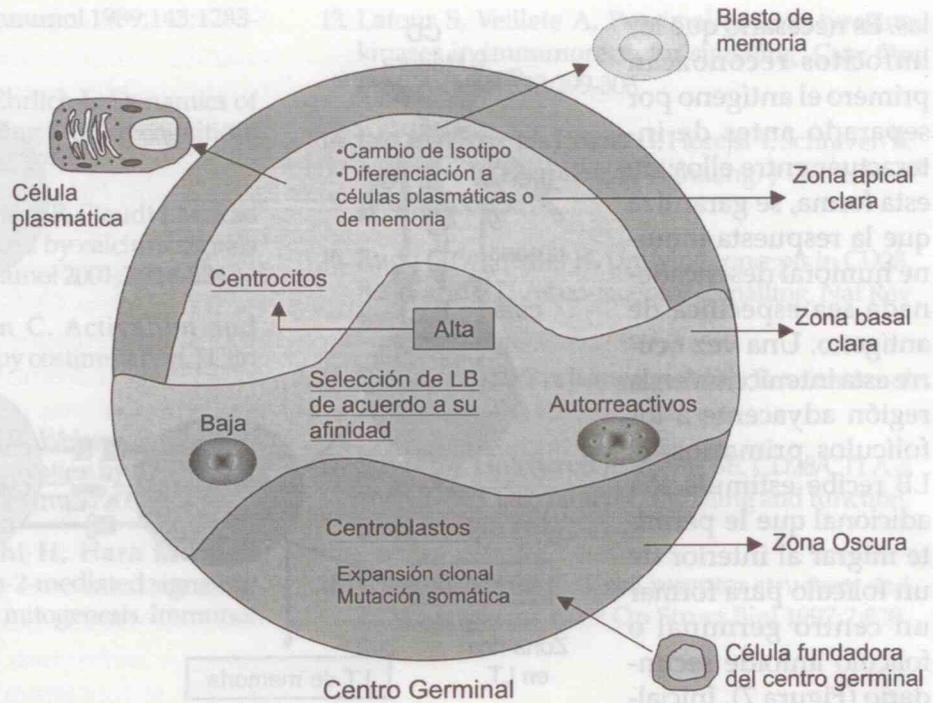


Figura 8. Centro germinal. Los centros germinales tienen una zona clara y una oscura. En la zona oscura se lleva a cabo una proliferación masiva de los LB y la hipermutación somática de los mismos. Mientras que en la zona clara se hace la selección de los mutantes de alta afinidad y el cambio de isotipo. Finalmente los LB salen del centro germinal como células efectoras o células de memoria

se puede decir que es inactivo desde el punto de vista funcional; una cantidad considerable de estas células recirculan, por lo que finalmente se encuentran en sangre periférica o en cualquier tejido linfoide.

La memoria de los LB se caracteriza por una respuesta de anticuerpos rápida, de gran magnitud y de larga duración. En general, después de la re-estimulación antigénica de los LB de memoria, éstos producen anticuerpos específicos de antígeno con mayor afinidad y de otras clases de isotipos diferentes a la IgM. Se sugiere que las células B de memoria y los plasmocitos provienen de un precursor común, pero a pesar que las señales que permiten la diferenciación de estas células aún es contro-

versial, algunos de los requerimientos que controlan estos eventos ya se conocen. Es evidente que la generación de memoria a antígenos TD requiere la colaboración de células T. Mientras que la interacción CD40-CD40L junto con ciertas citoquinas (IL-2, IL-10) es esencial para la diferenciación de los LB del centro germinal a células de memoria, las células plasmáticas se generan sin la coestimulación de CD40-CD40L. Finalmente, varias citoquinas se han asociado con aumento en la síntesis y secreción de anticuerpos (IL-2, IL-4 y la IL-6). Inicialmente se pensaba que las células de memoria permanecían en reposo indefinidamente hasta que existiera un segundo encuentro antigénico que estimulara su proliferación. Actualmente, las hipótesis apuntan hacia la existencia de estímulos continuos que permitan la permanencia de estas células por periodos de tiempo extensos. Ciertos estudios han sugerido que las CDF, las cuales logran retener los complejos inmunes por largos periodos, tiene un papel importante en este evento. De esta forma, la permanencia del antígeno permite que los LB estén en contacto permanente con él y de esta forma, se dispone de rondas continuas de activación. Sin embargo, esto no ofrece explicación para periodos de memoria tan largos como 20, 30 o más años. Otra teoría al respecto se basa en la reacción cruzada con otros antígenos, no obstante, esto parece poco probable, debido a la alta especificidad del sistema inmune. Una nueva posibilidad surgió recientemente, la cual hace referencia al descubrimiento de receptores de reconocimientos de patrones en los LB de memoria. Se ha observado que los LB de memoria tiene una expresión constitutiva de algunos receptores tipo toll (TLR-9, TLR-10 y RP-105); la estimulación de estos receptores, promueven la expansión clonal y la producción de inmunoglobulinas de diferentes clonas de LB de memoria. Esto demuestra como un estímulo no específico de clona puede estar lle-

vando a la preservación de diferentes células de memoria.

La mayoría de las células de memoria presentan receptores antigénicos de gran afinidad, lo cual era considerado el mejor parámetro para definir la población de LB de memoria; sin embargo, datos recientes indican que el principal marcador de memoria es la molécula CD27. Como se mencionó antes, la expresión de CD27 en los LB se incrementa con la edad, de tal manera que los LB de sangre del cordón umbilical no expresan CD27, mientras en un adulto, aproximadamente el 40% de sus células B son positivas para este marcador.

El desarrollo de células plasmáticas es esencial para la producción y secreción de anticuerpos, los cuales se constituyen en las moléculas efectoras de la inmunidad humoral. La diferencia que existe entre un LB que reconoce antígenos mediante su mIg y una célula plasmática efectora, es la capacidad de esta última para secretar inmunoglobulinas en vez de expresarlas en membrana. Las células plasmáticas representan el punto final de la diferenciación de las células B. Después de la primera estimulación antigénica, los LB vírgenes maduros pueden diferenciarse a células plasmáticas de corta vida que secretan inmunoglobulinas que no han sufrido hipermutación somática y que corresponden al isotipo IgM. Con la persistencia del antígeno, se generan células plasmáticas con regiones V altamente mutadas y que secretan anticuerpos de diferentes clases. La diferenciación de los LB a células plasmáticas se debe a un cambio marcado en la regulación génica; algunos factores de transcripción se han asociado fuertemente con este evento (la proteína de unión 1 a Xbox, factor de unión 1 al dominio I, BSAP/Pax 5, entre otros). Esta regulación conduce a la expresión de un fenotipo diferente, lo cual se ve reflejado en las características morfológicas que adoptan los plasmocitos,

por ejemplo, la reducción en la relación citoplasma-núcleo de estas células; adicionalmente, pierden la expresión de una serie de marcadores específicos y diferenciales de los LB tales como CD19, CD20, CD21, CD22, mIg, mientras modulan positivamente la expresión de otros (CD38, CD56). La señal de CD27 es importante para la generación de células plasmáticas, pues las células B de memoria CD27+ que son estimuladas con CD70, junto con IL-10, SAC e IL-2, o mediante CD40 más IL-4 se diferencian a células plasmáticas.

Los plasmocitos se encuentran principalmente en la pulpa roja del bazo y en la médula de los ganglios y en condiciones normales estas células no recirculan; sin embargo, algunas de ellas migran a la médula ósea o a la lámina propia de las mucosas donde se pueden diferenciar hacia células plasmáticas de larga vida.

RESPUESTAS DEL LINFOCITO B A ANTÍGENOS TIMO-INDEPENDIENTES

La respuesta de los linfocitos B es diferente dependiendo de si el antígeno implicado es TD o TI. Como se describió en los apartes anteriores, los antígenos TD corresponden a proteínas, las cuales requieren que el LB reciba la cooperación de los LT para lograr un umbral de activación adecuado e inducir la producción de inmunoglobulinas, cambio de isotipo, maduración de la afinidad, entre otras respuestas; por lo tanto, se conoce como respuesta dependiente de LT. Los antígenos no proteicos (polisacáridos, lípidos, glucolípidos, ácidos nucleicos, etc.) son conocidos como antígenos TI y la producción de anticuerpos para éstos no requiere la ayuda de LT. Sin embargo, existen dos clases de antígenos TI: TI-1 y TI-2, los cuales se diferencian por que los antígenos TI-2, requieren en alguna medida de la presencia de LT; en ausencia de éstos no logran activar al

LB, mientras que los TI-1 pueden estimular por sí solos a los LB.

Las principales características de las respuestas TI son:

1. Los LB que reconocen antígenos TI no requieren de las segundas señales dadas por la cooperación del LT. Los antígenos TI se caracterizan por inducir una respuesta de anticuerpos en ratones atímicos; esto se explica debido a que antígenos de naturaleza no proteica no pueden ser procesados ni presentados en el contexto de CMH clase II y por lo tanto no pueden ser reconocidos por los LT CD4+. La respuesta a antígenos TI-1 mejor caracterizada es la respuesta al LPS en ratones. El LPS es conocido como un estímulo policlonal para los LB de ratones, más no de humanos; es importante aclarar que en los LB de ratones, adicional al BCR, expresan otros receptores que reconocen específicamente al LPS, el TLR-4 y el RP105. Estos receptores pertenecientes a la familia Toll, se han documentado como los principales responsables de las respuestas de los LB al LPS. Recientemente se describió que los LB humanos activados regulan positivamente la expresión de estos receptores de LPS y que en los LB de memoria su expresión es constitutiva. Sin embargo, aún no se conoce el papel que juegan estos receptores en los LB humanos.
2. La maduración de la afinidad solo ocurre en respuesta a antígenos proteicos dependientes de los LT. En las respuestas TI no se presenta maduración de la afinidad, por lo cual, los anticuerpos que se generan son de baja afinidad. Adicionalmente, después de inmunizaciones repetidas con antígenos TI, la mayoría de anticuerpos que se detectan son del isotipo IgM, aunque también se encuentra en menor grado de los subtipos IgG. Con base en esto, se deduce que la au-

sencia de cooperación de los LT evita que se logre una respuesta masiva de diferentes clases de inmunoglobulina, así como la producción de Ig de alta afinidad. Sin embargo, recientemente se reportó la inducción de cambio de isotipo en respuesta a antígenos TI en un modelo *in vitro*, lo cual parece deberse a que las moléculas coestimuladoras BlyS y APRIL expresadas en células dendríticas inducen el cambio de isotipo en LB ante antígenos TI.

3. Varios investigadores han sugerido que las respuestas a antígenos TI inducen poca memoria inmunológica. Sin embargo, los humanos inmunizados con la vacuna para neumococo presentan inmunidad duradera. Es más, la exposición secundaria a antígenos TI generalmente produce respuestas secundarias amplias y rápidas, pero sin cambio de isotipo ni maduración de la afinidad.
4. Los antígenos TI son polímeros altamente repetitivos (polivalentes), los cuales poseen múltiples epítopes antigénicos que permiten un entrecruzamiento masivo de los BCR de membrana. Mientras que los antígenos proteicos presentan una o pocas copias de los epítopes antigénicos, por lo cual el entrecruzamiento que generan es menos importante. Este tipo de entrecruzamiento conduce a una activación que no requiere la coopera-

ción del LT. Adicional a esto, muchos de los polisacáridos activan la vía alternativa del complemento propiciando así el reconocimiento por el complejo receptor del complemento 2.

LA RESPUESTA SECUNDARIA

La respuesta inmune secundaria se caracteriza por el estímulo de células de memoria que se generaron durante una primera exposición antigénica. Este mecanismo se considera una adaptación del sistema inmune que permite que ante exposiciones repetidas se desarrolle una respuesta más eficiente. Las respuestas secundarias son las principales responsables de la maduración de la afinidad y del cambio de isotipo de los anticuerpos; aunque si bien estos eventos pueden ocurrir durante una exposición inicial y prolongada al mismo antígeno, su intensidad es baja; por lo tanto, la respuesta inmune secundaria propicia la maduración de la afinidad y el cambio de isotipo de una manera mucho más eficaz. Aunque las señales otorgadas por los LT son esenciales para el desarrollo de estos eventos, la cooperación de estos linfocitos en las respuestas posteriores es menor que en respuestas inmunes primarias, ya que se requiere menor número de células y menores cantidades de antígeno para lograr una respuesta mucho mayor.

LECTURAS RECOMENDADAS

1. Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Komiyama A. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol Today* 2000;21(5):204-6.
2. Arpin C, Dechanet J, Van Kooten C, Merville P, Grouard G, Briere F, et al. Generation of memory B

cells and plasma cells *in vitro*. *Science* 1995;268(5211):720-2.

3. Baba Y, Hashimoto S, Matsushita M, Watanabe D, Kishimoto T, Kurosaki T, et al. BLNK mediates Syk-dependent Btk activation. *Proc Natl Acad Sci US A* 2001;98(5):2582-6.

4. Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 2003;101(11):4500-4.
5. Dudley DD, Manis JP, Zarrin AA, Kaylor L, Tian M, Alt FW. Internal IgH class switch region deletions are position-independent and enhanced by AID expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(15):9984-9.
6. Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest* 2002;109(3):295-9.
7. Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 111-35.
8. Gupta N, DeFranco AL. Visualizing lipid raft dynamics and early signaling events during antigen receptor-mediated B-lymphocyte activation. *Mol Biol Cell* 2003;14(2):432-44.
9. Hodgkin PD, Rush J, Gett AV, Bartell G, Hasbold J. The logic of intercellular communication in the immune system. *Immunol Cell Biol* 1998; 76 (5): 448-53.
10. Kinoshita K, Honjo T. Linking class-switch recombination with somatic hypermutation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(7):493-503.
11. Kurosaki T. Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 555-92.
12. Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 2003;21:231-64.
13. Morimoto S, Kanno Y, Tanaka Y, Tokano Y, Hashimoto H, Jacquot S, et al. CD134L engagement enhances human B cell Ig production: CD154/CD40, CD70/CD27, and CD134/CD134L interactions coordinately regulate T cell-dependent B cell responses. *J Immunol* 2000; 164 (8): 4097-104.
14. Pleiman CM, D'Ambrosio D, Cambier JC. The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. *Immunol Today* 1994; 15 (9): 393-9.
15. Reth M, Wienands J. Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 1997;15:453-79.

LECTURAS RECOMENDADAS

cells and plasma cells in vitro. *Science* 1995;268(5211):730-2

J. Bae & Hashimoto S. Maturation M. Watanabe D. Hashimoto T. Kurosaki T. et al. BLNK mediates Syk-dependent B cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(5):2882-6

Agematsu K, Holbro S, Nagumo H, Komiyama A. CD25 a memory B-cell marker. *Immunol Today* 2001;22(6):314-6

Agarwal C, Dehnan J, Van Kester C, Merville B, Goodrich G, Brent E, et al. Generation of memory B