

15
2 ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán

**"MODELOS DEL MECANISMO DE PROCESAMIENTO
Y PRESENTACION DE ANTIGENO"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
RUPERTO CARBAJAL CORTEZ

ASESOR DE TESIS:
Q.F.B. VÍCTOR MANUEL ZENDEJAS BUITRÓN

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

PAGINA

Abreviaturas 1

Objetivo 3

CAPITULO

Capítulo 1

Resumen 4

Capítulo 2

Introducción 6

Capítulo 3

¿Qué es el complejo principal de histocompatibilidad?. . . . 9

Capítulo 4

Estructura del complejo principal de histocompatibilidad.

4.1 Estructura del complejo principal de histocompatibilidad 10

PAGINA

4.2 Cadena ligera o Beta-2 microglobulina 12

4.3 Estructura de la molécula MHC clase II 13

Capítulo 5

Función de complejo principal de histocompatibilidad 15

Capítulo 6

Mapa genético del complejo principal de histocompatibilidad.

6.1 Mapa genético de la molécula clase II 20

6.1.1. Región DP 21

6.1.2. Región DQ 21

6.1.3. Región DR 25

6.1.4. Región DOB y DNA 25

6.2 mapa genético de la molécula clase I 27

Capítulo 7

Clasificación de antígenos 29

7.1 Antígenos nativos 30

7.2 Antígenos exógenos 30

7.3 Antígenos endógenos 31

7.3 Antígenos endógenos 31

Capítulo 8

Células presentadoras de antígeno. 33

Capítulo 9

Mecanismo de captación de antígeno 39

9.1 Pinocitosis en fase fluida 40

9.2 Endocitosis mediante receptores de membrana 40

9.3 Fagocitosis 42

Capítulo 10

Receptores específicos de antígeno sobre APCs 43

Capítulo 11

Procesamiento de antígeno 45

11.1 Sitio de procesamiento de antígeno 46

11.2 Proteólisis 50

11.3 Acidificación endosomal 57

11.4 Procesamiento de antígeno dependiente de tiempo y temperatura 58

11.5 Requerimiento de ATP en la degradación de antígeno . . 64

11.6 Modelo de ensamble entre el péptido inmunogénico y
la molécula MHC.

11.6.1 Ensamble del péptido inmunogénico a la molécula MHC
clase I 66

11.6.1.1 Moléculas transportadoras de péptidos endógenos . . 68

11.6.1.2 Modelo del ensamble entre el péptido y la molécula
clase I 71

11.6.2 Modelo del ensamble entre el péptido inmunogénico y
la molécula MHC clase II 75

Capítulo 12

Presentación de antígeno 83

Conclusiones 88

Bibliografía 90

RELACION DE FIGURAS

No. FIGURA	PAGINA
1	Molécula H-2 combinada con una molécula beta 2-microglobulina. 11
2	Organización de la molécula MHC clase II 14
3	Surco de unión entre el péptido y la molécula MHC. . 17
4	Model de los dominios de la molécula MHC clase II. . 19
5	Mapa esquemático de la molécula MHC 22
6	Mapa del MHC humano 22 A
7	Mapa de la región DP. 23
8	Mapa de la región DQ. 24
9	Mapa de la región DP. 26
10	Distribución de genes en la molécula MHC. 28
11	Interacción entre el antígeno y receptores de superficie. 41
12	Interacción entre linfocitos B y T. 41

No. FIGURA	PAGINA
13	Endocitosis del antígeno. 49
14	Estructura de la cathepsina L 53
15	Modelo del paso doble 56
16	Degradación del complejo manosa-BSA 59
17	Degradación del ligando a diferentes pHs. 60
18	Procesamiento de Ag a diferentes temperaturas 62
19	Degradación del ligando dependiente de ATP. 65
20	Molécula de MHC que denota la posición de los genes que codifican péptidos transportadoras. 67
21	Degradación de antígeno proteico citoplásmico 69
22	Ensamble del péptido a la molécula MHC clase I. . . . 73
23	Modelo de procesamiento, ensamble y presentación de antígeno endógeno 74
24	Transporte del complejo MHC clase II-cadena Ii a través del aparato de Golgi. 78
25	Función de las chaperonas. 81
26	Modelo de procesamiento, ensamble y presentación de antígeno exógeno 82

No. FIGURA**PAGINA**

27	Presentación de antígeno por linfocitos B a linfocitos T.	87
----	---	----

No. TABLAS**PAGINA**

1	Células presentadoras de antígeno.	34
2	Tipo de proteasas	51

A B R E V I A T U R A S

Células presentadoras de antígenos	APC
Complejo principal de histocompatibilidad	MHC
Antígeno	Ag
Anticuerpo	Ab
Linfocito B	LB
Linfocito T	LT
Linfocito T cooperador	LTh
Linfocito T citotóxico	LTC
Macrofago	Mφ
Beta2 - microglobulina	B2m
Amino terminal	NH ₂
Carboxilo terminal	COOH
Kilodaltones	KDa
Aminoácidos	a.a.
Cadena invariante Ii	cadena Ii
Antígeno de leucocitos humanos	HLA
MHC clase II	Ia
Interferón gamma	IFN
Interleucinas	IL
Fracción cristalizable	Fc
Immunoglobulinas	Igs
Derivado proteico purificado	PDD
Centelleos por minuto	CPM
Kilocalorias	Kcal
Factor de necrosis tumoral	TNF
Péptido de bajo peso molecular	LMP

Aparato de Golgi AG
Reticulo endoplásmico RE
Proteína de choque térmico hsp 70
Proteína que enlaza péptidos PBP 72/74
Chaperonas Bip

OBJETIVOS

- 1.- Establecer la importancia que existe en el procesamiento de un antígeno exógeno y un antígeno endógeno.
- 2.- Señalar la importancia del ensamble de antígeno, tanto endógeno como exógeno.
- 3.- Señalar la importancia de la presentación de antígeno endógeno, así como antígeno exógeno.
- 4.- Apartir de la información recopilada, plantear un modelo de procesamiento, ensamble, presentación de antígeno tanto para la molécula clase I, así como para la molécula clase II

CAPITULO 1.0

RESUMEN

El término MHC denota a un grupo de genes localizados en el cromosoma 6 en seres humanos y en el cromosoma 17 en ratones a éstos cromosomas se les conoce también como HLA y H-2 respectivamente. Se ha demostrado que en las moléculas MHC existen 5 loci para la molécula clase II los cuáles son : DP, DQ, DR, DOB, DNA, mientras que para la molécula clase I solo existen 3 loci éstos son A, B, y C. En años recientes han encontrado en la misma molécula MHC genes que codifican proteosomas, moléculas hsp-70, moléculas transportadoras , complemento, colágena y TNF.

Los proteosomas se han definido como candidatos para generar péptidos inmunogénicos, los cuáles serán transportados hasta el retículo mediante péptidos transportadores, de éstos, se ha postulado que existen varios los cuáles son: el complejo LMP, mtp molécula HAM y como principal candidato como acarreador es el complejo ABC, del cuál existen evidencias para definirlo como principal acarreador de los péptidos, pero aún continúan los estudios sobre éstas moléculas.

El procesamiento de antígeno por APCs, requiere de factores tales como temperatura, pH enzimas proteolíticas, un tiempo de procesamiento y ATP.

El ensamble del péptido resultante de la degradación con moléculas clase I que se lleva a cabo en el retículo endoplásmico, requiere de ATP aunque existen algunos autores que no están de acuerdo con esto, sino que dicen, que el ATP solamente actúa en el transporte del péptido. Por otro lado en ausencia de ATP se ha demostrado que existen moléculas que se encargan de concentrar los péptidos, pero no los ensamblan sino solamente en presencia de ATP, éstas moléculas se han definido como chaperonas o Bip es decir el mecanismo de ensamble entre el péptido y la molécula clase I es dependiente de ATP.

Por otro lado el ensamble del péptido con la molécula clase II aún está muy difuso, porque todavía no se conoce a ciencia cierta los acarreadores de péptidos, pero existe la hipótesis que éste evento puede ser análogo al que se lleva a cabo con moléculas clase I. Otra teoría que existe en base a los acarreadores que las moléculas familias de las chaperonas, PBP72/74, pueden funcionar como acarreadoras y catalizadoras del ensamble y disociación de la molécula clase II y la cadena invariante. Esta última molécula actúa estabilizando la molécula MHC clase II impidiendo la unión de los péptidos endógenos, evitando así errores en la presentación del péptido exógeno. Hasta ahora no hay algo claro sobre el mecanismo de ensamble entre la molécula clase II y el péptido exógeno.

Las moléculas clase I están constituidas de una cadena pesada y una cadena ligera denominada beta-2 microglobulina, la cuál estabiliza a la cadena pesada durante el ensamble. Mientras que las moléculas clase II están constituidas por dos cadenas pesadas polipéptidicas, la molécula clase I como la II, son glicoproteínas transmembranales y su función es el de presentar antígeno endógeno y exógeno respectivamente a los receptores del linfocito T.

La activación de las linfocitos T está en función del contacto entre los receptores alfabeta, gammadelta, CD2, CD3, CD4 y LF A-1 que se encuentran distribuidos clonalmente sobre linfocitos T y las moléculas clase I y clase II sobre las APCs, aunadas a éstas también se ha encontrado moléculas tales como la LFA-3 e ICAM-1 que se unen específicamente a CD2 y LFA-1 respectivamente. Existen aun muchas dudas sobre el procesamiento y ensamble del péptido a la molécula MHC tanto clase I como clase II y también sobre los receptores de los linfocitos T, en cuanto a cantidad de éstos y función de los mismos.

CAPITULO 2.0

INTRODUCCION

El siguiente trabajo está enfocado, en determinar los mecanismos que las células presentadoras de antígeno (APC) llevan a cabo en la degradación de antígeno, para generar péptidos inmunogénicos y ensamblarlos a la molécula principal de histocompatibilidad (MHC) ya sea clase I o clase II. La importancia del complejo principal de histocompatibilidad, es indiscutible, ya que estas moléculas, las cuáles se encuentran sobre las APC, restringen la especificidad y el reconocimiento del antígeno por los linfocitos T. Es decir su función es trascendental en la respuesta inmune celular.(1,2,3,4).

A la molécula MHC la podemos clasificar en tres clases, de las cuáles solo se tratarán la clase I y clase II, debido a su importancia para el desarrollo de éste tema. La molécula clase I es importante, debido a que éstas presentan antígenos endógenos a linfocitos T citotóxicos.(2,7). Mientras que las moléculas MHC clase II presentan antígenos exógenos a linfocitos T cooperadores. (8).

En cuanto a clasificación de antígenos, existen varias, pero más sencillas es clasificarlos en antígenos: 1) "Exógenos" y 2) "Endógenos". Los primeros son endocitados por APC y los péptidos generados son considerados como productos del procesamiento intracelular de antígenos proteicos. (2,3,24).

Los segundos se caracterizan por que son antígenos secretados o están dirigidos hacia la superficie celular, o pueden simplemente permanecer dentro del núcleo, por ejemplo, los antígenos que están dirigidos hacia la superficie celular pueden ser hemaglutininas virales, desechos bacterianos etc. Los fragmentos antígenicos de sistemas endocíticos son presentados por moléculas clase I. (10, 20, 22).

Para que se despierte la respuesta inmune es necesario que el antígeno (Ag) cualquiera que sea su naturaleza, es captado inicialmente por APC, a las cuales se les conoce también como células accesorias. (Dichas células son críticas en la respuesta inmune celular). Toda la atención ha sido enfocada casi exclusivamente sobre macrófagos (MΦ), debido a que estas células son consideradas como el prototipo de las APC, y debido a que han sido las más estudiadas. Sin embargo un gran número de estudios han demostrado la capacidad de otras células para actuar como APCs por ejemplo: linfocitos B, células dendríticas células de langerhans de piel y otras. (25, 27, 29).

Después de que las APCs han captado al antígeno se activa la "máquinaria" para el procesamiento del antígeno. El procesamiento aunque es un aspecto principal para la activación de linfocitos T continúa siendo una "caja negra", en términos de eventos moleculares y celulares involucrados. Hay pocos datos claros sobre la captura inicial del antígeno, el tráfico del antígeno a través de los compartimentos celulares interconectados, las modificaciones que el antígeno sufre allí, el ensamble que se lleva a cabo entre el péptido y la molécula MHC y finalmente la presentación del antígeno. Sin embargo el procesamiento del antígeno es de significancia no solamente como un fenómeno celular en sí, sino, como un eslabón en la respuesta inmune. Es decir el procesamiento no solamente determina si un antígeno, puede o no activar a linfocitos T, sino, también, que estructura molecular es reconocida y cuáles linfocitos T son seleccionados para actuar. Una definición operacional que ha sido aceptada universalmente acerca del procesamiento de antígeno es: "que el procesamiento del antígeno es una serie de eventos bioquímicos, que se llevan a cabo entre la captación del antígeno y el tiempo en el que el antígeno es reconocido por los linfocitos. T". (23).

Muchos linfocitos T, se activan al reconocer el complejo péptido-molécula MHC, ya sea clase I o clase II, las cuales son muy polimórficas. (73,77). El potencial inmune de una célula T de manera individual depende de la cantidad de antígeno que puede ser enlazado por la molécula MHC y por la eficiencia del conjunto de receptores "alfa-beta" y/o "gamma-delta" distribuidos clonalmente sobre los linfocitos T. (77). También se ha demostrado que las células T son activadas a través de señales durante el contacto celular, ésta observación ha ganado más aceptación. (73,79).

Existen dos tipos de linfocitos T, en términos generales los cuales pueden ser distinguidos en base a su función y sus propiedades de reconocimiento. La mayoría de linfocitos cooperadores reconocen antígeno en conjunción a moléculas MHC clase II y los linfocitos T citotóxicos reconocen antígenos en conjunción a moléculas MHC clase I. Dándose así la presentación de antígeno. (79).

CAPITULO 3.0

¿Que es el complejo principal de histocompatibilidad?

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) es un conjunto de fragmentos de genes que codifican para moléculas que restringen la especificidad del reconocimiento del antígeno por linfocitos . La palabra "Histocompatibilidad" se refiere al factor de reconocimiento de las moléculas MHC clase I y clase II por receptores del linfocito T. El término "Principal" en la designación MHC se refiere a que hay muchos loci que participan en la compatibilidad entre tejidos. Y el término "Complejo" se refiere a que más de un locus está involucrado.

El MHC es un término que es usado de manera general para referirse al grupo de genes de cualquier especie. Como se sabe las moléculas MHC de diferentes especies tienen nombres específicos por ejemplo H-2 ó histocompatibilidad-2 en ratones, HLA ó antígeno de leucocito humano, (1,2.) aunque ha permanecido el nombre con el que se le conocio inicialmente, es claro que la función principal de estas moléculas es servir como moléculas presentadoras de antígeno (2).

CAPITULO 4.0

Estructura del complejo principal de histocompatibilidad.

4.1 Estructura de la molécula MHC clase I.

La molécula clase I consiste de una cadena peptídica pesada también denominada cadena alfa de 43KDa, unida de manera no covalente a un péptido pequeño de 11KDa, cadena ligera, o llamado también "Beta-microglobulina". La parte más larga de la cadena pesada está organizada en tres dominios, alfa 1,2 y 3 la cual sobresale de la superficie celular. Una sección hidrofóbica está anclada en la membrana. Y la secuencia corta hidrofílica que lleva el carboxilo terminal está dentro del citoplasma. (Ver Fig. 1)

Como ya se mencionó, cada molécula MHC clase I, consiste de una cadena glicoproteica pesada y una subunidad proteica ligera. Solamente la porción proteica de la subunidad pesada está controlada por la región MHC., mientras que la cadena ligera está controlada por un gen diferente. (-cromosoma 2 en el ratón y en el cromosoma 15 en humanos-). (1,3,4)

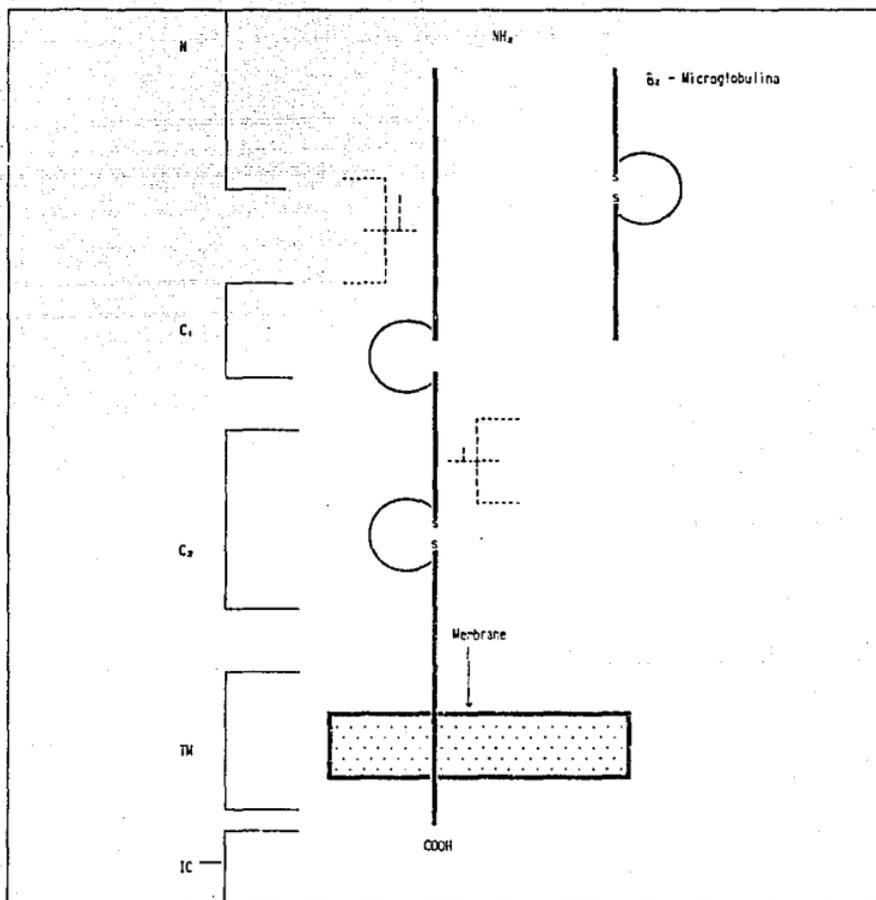


FIG. 1 MUESTRA UNA MOLECULA H-2 COMBINADA CON UNA SOLA MOLECULA DE BETA-2 MICROGLOBULINA. LAS LINEAS PUNTEADAS INDICAN CARBOHIDRATOS. C₁ Y C₂ INDICAN PUENTES DE DISULFURO.

(DE J. KLEIN; SCIENCE 203:516 - 521 1979).

TM (REGION TRANSMEMBRANAL).

C₂

IC (REGION INTRACITROPLASMICA).

V (REGION VARIABLE.)

C₁ (REGION CONSTANTES 1 Y 2).

4.2 Cadena ligera o Beta- microglobulina.

En 1968 se aislò de orina humana un componente de bajo peso molecular, el cual, es un campo electroforético migrò hacia la regiòn de los beta-globulinas. Es decir con respecto a su pequeña dimensiòn y migraciòn en el campo electroforético se le denominò "Beta 2-Microglobulina" (B2m). Los inmunólogos se interesaron en la B2m durante cuatro primeros años, posteriormente se secuenciò la proteïna y descubrieron que estructuralmente estaba relacionada con las inmunoglobulinas. Posteriormente algunos grupos de investigadores demostraron casi simultáneamente que la B2m es una proteïna asociada a la membrana celular con moléculas MHC clase I. La B2m también se encuentra asociada con la familia de antígenos Q₂, moléculas MHC, T1a y CD1. La B2m humana tiene un peso molecular de 12KDa y contiene 100 aminoácidos (a.a). La B2m es sintetizada virtualmente por todas las células somáticas y el desgaste de superficies celulares, provoca liberaciòn de pequeñas cantidades de B2m a los fluidos corporales. (1,3).

Ademàs se ha demostrado que la B2m se asocia con el receptor Fc de células intestinales, induce la actividad de colagenasa en fibroblastos y puede servir como una proteïna quimiotáctica en el timo fetal. (9)

4.3. Estructura de la molécula MHC clase II

Las moléculas clase II consisten de cadenas polipéptidicas alfa y beta de dimensiones similares, y sus pesos moleculares son de 34KDa y 28KDa respectivamente. Las moléculas MHC clase II, también son glicoproteínas transmembranales. (1,3,4). Ambas cadenas están unidas entre sí por enlaces no covalentes. La diferencia en cuanto al peso molecular se atribuye al contenido de carbohidratos. La cadena alfa tiene dos mientras que la beta solamente tiene uno. Cada cadena posee dominios externos y regiones transmembranales y citoplásmicas. Tres de cuatro dominios externos de ambas unidades tienen enlaces disulfuros intracadena. (7) (Fig. 2)

Como ya se mencionó, las moléculas clase II son heterodímeros glicoproteicos transmembranales, que enlazan y presentan el antígeno peptídico procesado a linfocitos T CD4. Intracelularmente las moléculas MHC clase II se asocian con una tercera subunidad denominada "Cadena invariante". Describiéndose las características fisicoquímicas obtenidas en cromatografía de exclusión y velocidad de sedimentación, se demuestra que el complejo alfa-beta-II está formada por nueve subunidades. Este complejo contiene tres dímeros alfa-beta asociada con un trímero de cadena II. La organización de la molécula MHC clase II, es decir las subunidades alfa y beta, en tal complejo, juegan un papel importante en la capacidad que tiene la cadena II, para inhibir al péptido enlazado a moléculas clase II. La formación del complejo alfa-beta-II, puede inducir cambios estructurales necesarios para vencer o sobreponerse a las señales responsables de la retención citoplasmática. (8)

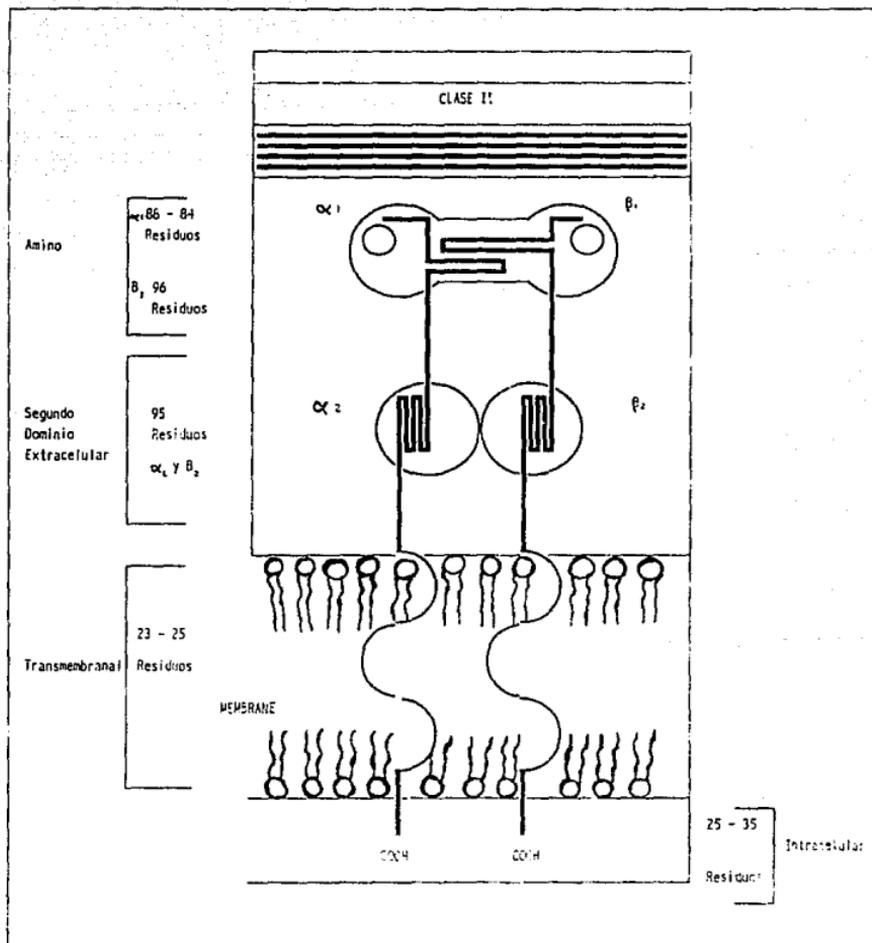


FIG. 2

ESQUEMA QUE MUESTRA LA ORGANIZACION DE LA MOLECULA DEL MHC CLASE II
 (BJORKAN P. J. ET AL NALPE 329; 506. 1987).

CAPITULO 5.0

Funci3n del complejo principal de histocompatibilidad.

La teoria instruccionista que usaron los inmuniquimicos fu3 para justificar el infinito n3mero de anticuerpos especificos. La 3nica estructura de un antígeno quimicamente definido determin3 la plegabilidad y especificidad del anticuerpo gen3ticamente invariante, pero conformacionalmente flexible. Estas teorias persistieron durante aproximadamente 50 a3os, hasta que se demostr3 que el anticuerpo de especificidad definida hacía el antígeno, podria ser completamente desnaturalizado y entonces replegado en la ausencia de antígeno para dar la especificidad original. Despu3 de 3stos conceptos la teoria instruccionista qued3 fosilizada, hasta que algunos investigadores la "revivieron", pero solo dentro del contexto de la interacci3n entre receptores del linfocitos T y la mol3cula MHC, que ahora son reconocidas por ser fundamentales en la activaci3n y desarrollo en la selecci3n de linfocitos T. Demostrando que las mol3culas MHC se enrolla alrededor del p3ptido, para que 3ste sea presentado a linfocitos T (interactuando con sus receptores). Adem3s no solamente revivieron la teoria de la herejia instruccionista, sino proporcionaron la base para muchas observaciones inexplicables sobre la mol3cula MHC clase I. Despu3 de que se realizaron m3ltiples experimentos, los resultados sugirieron que al menos un componente adicional es requerido para el plegamiento de la cadena pesada y su asociaci3n con la cadena B2m. Todos estos intentos por encontrar tales componentes fueron in3tiles y el problema permaneci3 por m3s de una d3cada, hasta que se esclareci3 la funci3n del MHC, es la de enlazar fragmentos peptídicos de antígeno degradado dentro de las c3lulas presentadoras de antígeno. (5).

Cabe mencionar que tanto las moléculas MHC clase I y II juegan un papel crucial en la respuesta presentadora del antígeno. (6)

Se han descrito más de 60 efectos que son controlados por el MHC, y nuevos efectos se están descubriendo. Las moléculas MHC son utilizadas en funciones biológicas vitales, tales como: en la reparación del DNA, aumento en la síntesis de DNA, y aumenta los niveles de AMPc (adenosín-monofosfato.cíclico). (14). El MHC ha estado implicado también en una variedad de fenómenos no inmunológicos tales como: peso corporal del ratón, producción de huevos en gallinas y tipo de mandíbula, muchos de estos fenómenos pueden tener una base hormonal, ya que existen evidencias de que las moléculas clase I pueden también funcionar como componentes de receptores hormonales por ejemplo: en el glucagón, en el factor de crecimiento epidérmico, y en la gamma endorfina. (4)

Aunque si bien se ha demostrado que el loci clase I y clase II son los mediadores de algunos efectos, los cuales son en naturaleza tipo inmunológico, y éstos pueden ser reducidos a un común denominador que es la estimulación de linfocitos T. Es decir la "verdadera" función es servir como marcador en sí para el reconocimiento de los receptores de linfocitos T. (1)

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I, presenta péptidos derivados de proteínas celulares a linfocitos T citotóxicos. Hace dos años la primera estructura tridimensional reveló como el péptido es enlazado a la molécula MHC clase I, denotándose la geometría de la "trampa" para el enlace del péptido. (1) (ver Fig. 3)

FIG. 3. ESQUEMA DEL SURCO DONDE
SE UNE EL PEPTIDO, A LA MOLECULA MHC
CLASE I (BJORKMAN P.J. ET AL NATURE:
329; 586; 1987)

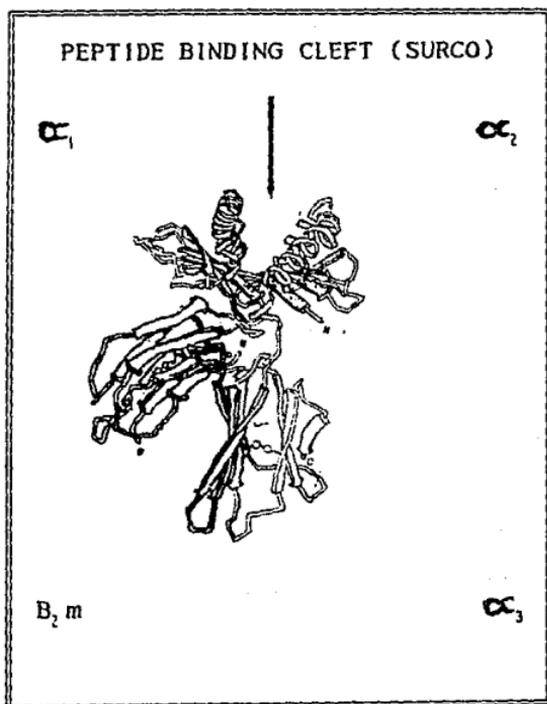


FIG. 3

Las dificultades que se han encontrado en los intentos para demostrar el enlace del péptido in vitro, solamente han conllevado a sugerir que el péptido se convierte en parte integral de la molécula MHC clase I durante la biosíntesis. (1) Además el péptido puede ser el instrumento en el correcto desdoblamiento de la cadena pesada, permitiendo la asociación con la cadena B2m (5,7,10).

Las moléculas MHC clase II antígenos exógenos es decir péptidos derivados del procesamiento o degradación intracelular. (2) Los péptidos procesados son enlazados en un sitio específico sobre la molécula clase II, para posteriormente ser presentado a linfocitos T (de lo cual se hablará más adelante) . Dicha capacidad presentadora está dada fundamentalmente por la estructura polimórfica de la molécula MHC clase II. (3,7) (ver Fig. 4)

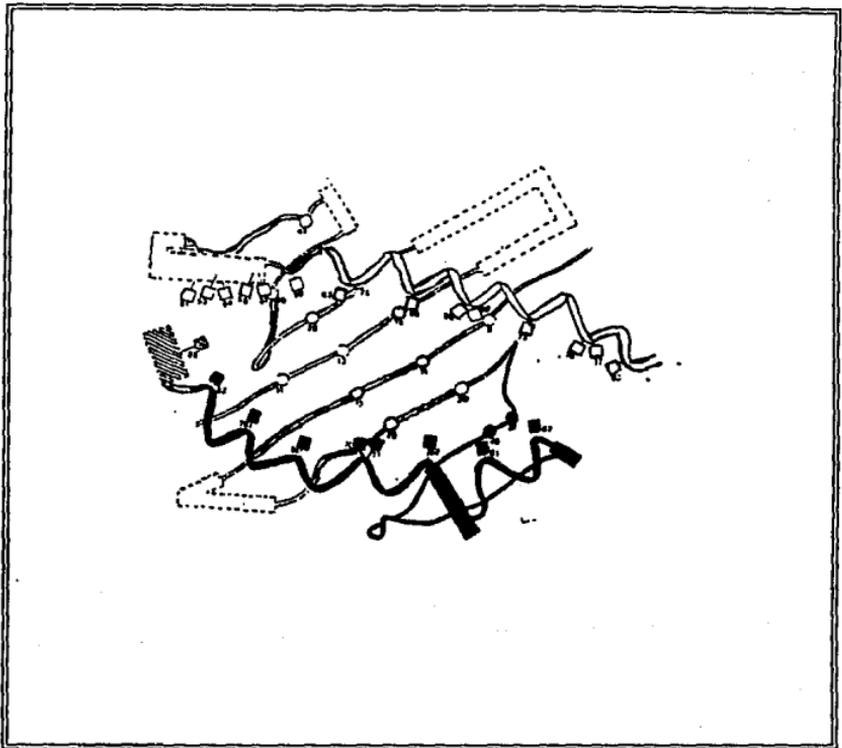


FIG. 4

FIG. 4. MODELO DE LOS DOMINIOS α_2 Y β_1 DE LA MOLECULA MHC CLASE II (VISTO DESDE ARRIBA).

LOS HIPOTETICOS SITIOS DE RECONOCIMIENTO SON INDICADOS POR CUADROS Y CIRCULOS. LAS AREAS NEGRAS DENOTAN PARTE DE LA CADENA BETA Y LA REGION PUNTEADA INDICA EL RESTO DE LA CADENA (LARS R. ET AL. AUTOIMMUNITY 8:238, 1991).

CAPITULO 6.0

Mapa genético del complejo principal de histocompatibilidad.

6.1 Mapa genético de la molécula clase II.

El término MHC denota a un grupo de genes localizados en el cromosoma 6 en seres humanos y en el cromosoma 17 en ratones, dichos cromosomas se les conoce también como HLA Y H-2 respectivamente. Un individuo hereda un cromosoma 6 paterno y otro materno, es decir un haplotipo HLA de cada uno. Las moléculas codificadas por estos genes desempeñan una función importante en el proceso inmunitario, y están presentes sobre la superficie celular y son los agentes causales del reconocimiento de la naturaleza extraña de los tejidos trasplantados, de un individuo a otro de la misma especie, derivándose de aquí el nombre de antígenos de histocompatibilidad.

El HLA, están los genes clase II situados de manera centromérica con respecto a los genes complementarios y a los genes clase I. Clonas moleculares han demostrado que seis genes alfa y de siete a diez genes beta están presentes, sin embargo, no todos esos genes son funcionales. (12) (Ver Fig. 10)

Hoy en día es posible definir (al menos serológicamente) tres loci para la molécula MHC clase II los cuales son: primeramente se tiene DR (la R relacionado al locus D) posteriormente se definieron a DP y a DQ (P y Q por su orden alfabético), aunados a los genes anteriores otros dos genes de clase II se han sido descritos, los cuales son DOB y DNA. (13) (Ver fig. 5 Y 6)

6.1.1. Región DP.

Las regiones DP presentan dos genes alfa y dos beta. Dentro de cada uno de los pares de genes DP1 - DPB1 y DPA2 - DPB2, sus regiones promotoras están adyacentes a cada una de las otras. Sin embargo se ha concluido que esas formas de los genes DP son funcionales, sino que sólo son el resultado de una serie de duplicaciones, contracciones, e inversión de genes. Lo más importante del análisis de la secuencia de estos genes es que se ha demostrado que dos de esos genes DPA1 y DPA2 son pseudogenes. (12) (Ver fig. 7).

6.1.2. Región DQ.

Parece ser que la región DQ en humanos invariablemente contiene tres genes beta DQ y dos genes alfa DQ. El análisis de la secuencia de esos genes, demostraron que ninguno de ellos contiene un aparente pseudogen (12) (Ver Fig. 8)

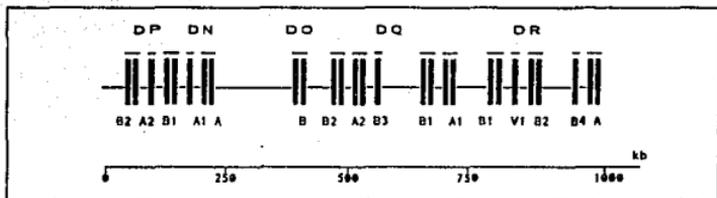
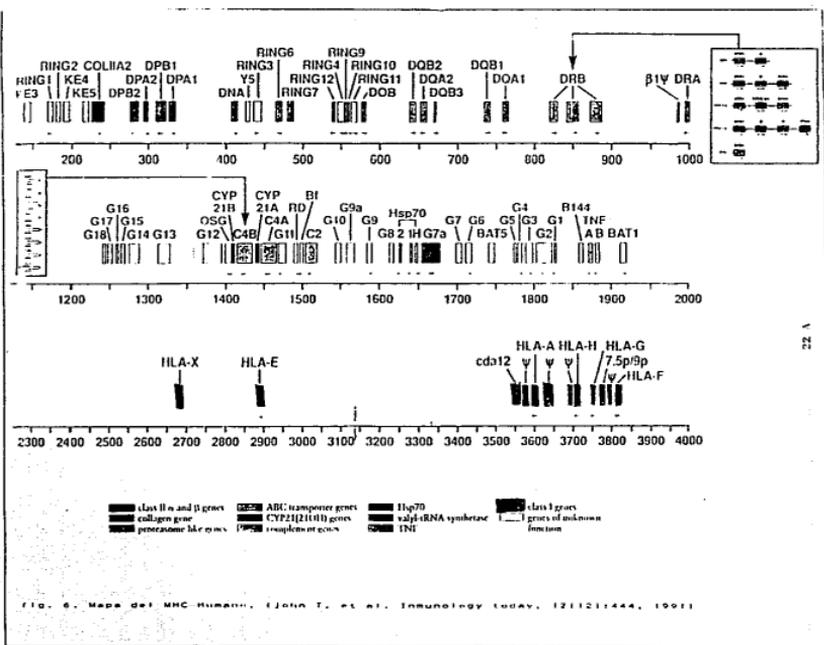


Fig 5. Mapa esquemático de la molécula MHC clase II (Lars R, et al, Autoimmunity 8:237-244 1991).



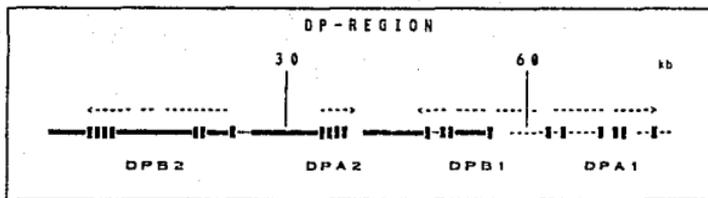


fig 7. Mapa molecular de la región DP (Lars R. et al. Autoimmunity 6:237-244 1991).

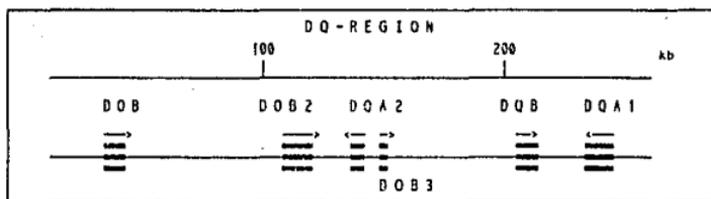


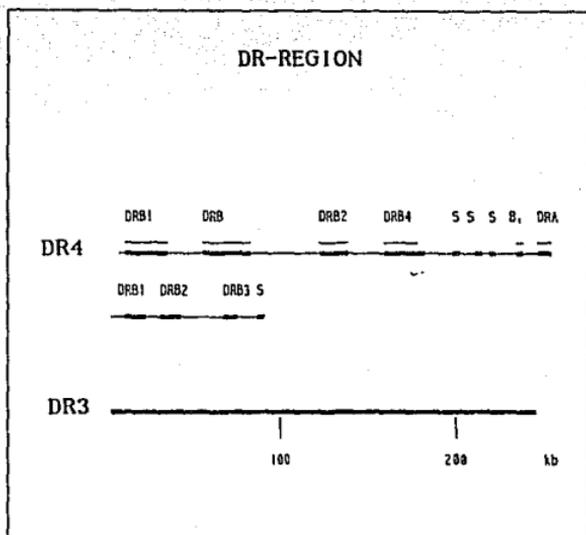
fig 8. Mapa molecular de la region DQ (Lars R. et al. Autoimmunity, 8:239- 1991).

6.1.3. Región DR.

En la región DR, de los individuos investigados, un sólo gen DR-alfa ha sido encontrado, en contraste al número de genes DR-beta, que varía en los diferentes individuos. Los genes en la región DR3 y DR4, han sido caracterizados y se ha demostrado que la región DR3 contiene tres genes beta (DRB1, DRB2 y DRB3). DRB1 y DRB3 codifican cadenas beta, mientras que DRB2 es un pseudogen con un exón 2 suprimido. La región DR4 tiene una similar organización, con la principal excepción de pseudogen adicional. DR4 codifica para la molécula DRW52, de la que aún no se conoce su función (12) (Ver Fig. 9)

6.1.4 Región DOB y DNA

El grupo principal de nuevos genes, se encuentra entre los genes HLA-DNA y HLA-DOB, estas regiones contienen tres principales tipos de genes, a) aquellos genes que no tienen una obvia asociación con el sistema inmune (RING 3). b) Los genes RING 6 y RING 7, los cuales están altamente relacionados a cadenas alfa y beta de la molécula clase II, (al igual como para clase I) y se ha sugerido denominar los HLA-DMA y HLA-DMB respectivamente, y c) Aquellos genes se consideran están involucrados en el procesamiento del antígeno (RING 10 y RING 12) y transporte del péptido dentro del retículo endoplásmico (RING 4 y RING 11). (14)



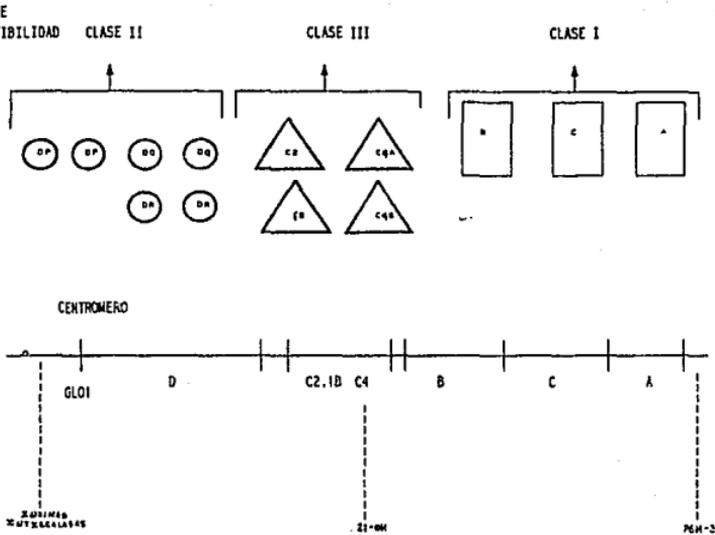
MAPA MOLECULAR DE REGION DR (HILOTIPO 4 Y 3)
CLASE II (LARS R. ET AL. AUTOIMMUNITY. 8:240 1991)

(FIGURA 9)

6.2 Mapa genético de la molécula clase I.

A las moléculas de clase I pertenecen las proteínas codificadas por los loci A, B, y C, que se expresan en la membrana de todas las células (incluyendo eritrocitos y plaquetas). (Vease Fig. 10) (13).

ANTIGENOS DE
HISTOCOMPATIBILIDAD



SE APRECIA LA DISTRIBUCION DE LOS GENES QUE CODIFICAN LAS DIVERSAS PROTEINAS DEL MHC

(JUAN J. H. ET AL., BIOQUIMICA E INMUNOLOGIA, VOL. II, LA ED. 1988 PP 526).

CAPITULO 7.0

Clasificación de antígenos

Un grupo de investigadores han descrito tres tipos de antígenos, basandose, en el grado de procesamiento para la posterior presentación del antígeno. Esto son:

- 1) Aquellos antígenos, los que pueden ser presentados como antígenos nativos por las células presentadoras de antígenos (APC).
- 2) Aquellos antígenos los que requieren de una degradación proteolítica por las APC para su posterior presentación, (antígenos, endógenos y exógenos los cuales se explicarán más adelante).
- 3) Aquellos antígenos los cuales requieren solamente reducción de grupos disulfuro. (14)

De estos tres tipos de antígenos que requieren de una degradación por las APC, se han clasificado en términos generales en: Antígenos, Exógenos y Endógenos.

7.1 Antígenos Nativos.

Recientemente se examinó el procesamiento y presentación de una proteína larga humana denominada "fibrinógeno". Esta proteína sorpresivamente no necesitó procesamiento por las APCs, y se presentaron el fibrinógeno a un panel de hibridomas de linfocitos T. Estos resultados conllevaron a deducir que una proteína de 34-KD de peso molecular parece no necesitar procesamiento. El determinante antigénico reconocido por los linfocitos específicos de fibrinógeno, ha sido localizado en la porción carboxilo terminal de la cadena alfa. Dicha región es muy hidrofílica y por lo tanto capaz de formar el determinante antigénico. (23,45,46)

7.2 Antígenos Exógenos

Los antígenos exógenos son endocitados por células presentadoras de antígeno (APC) y dichos péptidos producidos son considerados como productos de un "procesamiento" o degradación intracelular de antígenos proteicos. Estos péptidos resultantes se les conoce como "péptidos derivados exógenamente" y son presentados por moléculas MHC clase II, mientras que los péptidos antigénicos sintetizados endógenamente son presentados por moléculas MHC clase I. Los antígenos exógenos son endocitados y procesados en endosomas y los péptidos resultantes, se piensa que se asocian en vesículas post-golgi, con moléculas MHC clase II recicladas o nuevamente sintetizadas. Algunos autores han descrito que las moléculas MHC clase II se asocian con una cadena invariante en el retículo endoplásmico (RE) para impedir el enlace del péptido exógeno. Dicho mecanismo se explicará ampliamente más adelante. (2, 3, 17, 18).

7.3 Antígenos Endógenos

Los antígenos endógenos los han clasificado de dos categorías; 1) Aquellos que están dirigidos hacia la superficie celular o son secretados, y 2) Los que permanecen dentro del citosol o núcleo. Los primeros penetran al retículo endoplásmico adquiriendo la configuración adecuada, para unirse a la molécula clase I, las cuales pueden ser recicladas o sintetizadas de novo, que finalmente migran hacia la superficie. En general ambos tipos de antígenos son presentados por moléculas clase I. (2).

La respuesta inmune de células T citotóxicas (CTL o CDS), están dirigidas contra fragmentos antigénicos de los péptidos derivados de proteínas citosólicas, generalmente de origen biosintético (hemaglutininas virales y núcleo proteínas virales), que son presentados eficientemente a los receptores de los linfocitos T por el MHC clase I. (7, 10, 15, 16).

Hay genes llamados HAM-1 y HAM-2 en el ratón que codifican proteínas que postulan que están involucrados en el transporte de fragmentos péptidicos dentro del retículo endoplásmico, asociándose a moléculas clase I. Pero el mecanismo por el cual se producen tales fragmentos peptídicos permanece aún sin conocerse. Solo se especula de un mecanismo donde el complejo proteínas-multicatalítico (CMP) juega un papel importante en el procesamiento del antígeno, este complejo se encontró en células eucariotas examinadas. (15, 16).

Otros autores describen que los péptidos procesados se complejan con las moléculas clase I en un compartimiento pre/Golgi, dicho mecanismo se explicará ampliamente más adelante. (17).

CAPITULO 8.0

Células presentadoras de antígeno (APC)

Toda la atención ha sido enfocada casi exclusivamente sobre macrófagos (M ϕ) como célula accesoria crítica en la respuesta inmune. Sin embargo un gran número de estudios han documentado la capacidad de otros tipos de células para actuar como células accesorias, debido a que su tejido u órgano de distribución es más importante que los M ϕ , en ciertas situaciones. (20).

Los monocitos-M ϕ existen tanto en circulación como en el tejido y junto a leucocitos polimorfonucleares (PMN), forman la primera barrera de defensa contra patógenos extraños. Los M ϕ tienen la capacidad de fagocitar antígenos particulados y solubles para degradarlos y presentarlos a los linfocitos T. (21).

Estudios recientes han demostrado que además de los Mφ otras células también pueden actuar como APCs efectivas. En general todas las células capaces de presentar antígeno a linfocitos T, constitutivamente presentan o expresan antígenos clase II en su superficie, o pueden ser inducidas a hacerlo aunque no se entienden el papel que juegan, pero hay evidencias de numerosos laboratorios que sugieren que los Mφ, linfocitos B, y células dendríticas son las principales APCs, presentes en el tejido linfóide. (19, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 28).

La siguiente tabla(1) nos muestra las diferentes APCs, que se conocen.

Células presentadoras de antígenos

- 1.- Linfocitos B.
- 2.- Células Dendríticas.
- 3.- Células Kupffer de hígado.
- 4.- Células Langerhans de piel.
- 5.- Células Vasculo/endotelial.
- 6.- Células Cobadas.
- 7.- Células Tímicas Estromales.
- 8.- Astrocitos.
- 9.- Fibroblastos.
- 10.- Células de Schwann.

Tabla 1.- Existen básicamente 10 tipos de APCs en tejido linfóide, enlistados en la tabla 1.

Las células de langerhans de piel, de Kupffer y dendríticas, presentan antígeno protéico soluble a células T "primarias y actúan como estimuladores celulares en la reacción linfocítica secundaria. La principal célula no linfocítica de la cual ha sido estudiada por su capacidad presentadora de antígeno es la célula endotelial y algunos grupos han demostrado independientemente la capacidad de las células endoteliales de vena umbilical humana, para estimular linfocitos T en una reacción secundaria. Estas células no expresan MHC clase II(Ia) sino son inducidas a hacerlo por activación del interferón gamma. Existen algunos datos que sugieren que las células T activadas expresan Ia, pero se ha concluido que estas células no son capaces de activar la respuesta inmune sino por el contrario solamente liberan señales, (que activan a otros linfocitos) tolerogénicas. Se han propuesto que las células madres del timo las cuales expresan Ia juegan un papel importante en cuanto, a la educación del timocito. También se ha demostrado que los queratinocitos de piel, son Ia negativos, pero son capaces de expresar Ia después de ser activados y se han demostrado que producen una citocina soluble con propiedades muy similares a la interleucina-1 (IL-1). (20).

Existen dos tipos de células encontradas en el bazo y en nódulos linfáticos, las cuales aparentemente no expresan Ia, por que en su íntima asociación con los linfocitos B, juegan un papel "estratégico" al retener al antígeno. Hay Mφ en zona marginal anudadas a las células dendríticas foliculares cuya principal característica es el retener antígeno enlazado a su superficie celular, (antígeno en su forma no procesada) durante un año aproximadamente. Esta característica es ventajosa debido a que confiere una persistente fuente de antígeno para el reconocimiento por los linfocitos B, éstos en contraste a linfocitos T reconocen antígeno independientemente de la molécula Ia. (19,20,21).

Como ya se mencionó, los M ϕ juegan un papel importante en el manejo del antígeno, especialmente cuando el antígeno se encuentra en forma de complejo inmune. (30).

Muchos de los complejos inmunes son captados, endocitados y catabolizados por los M ϕ , sin embargo existe una variedad de células no fagocíticas con morfología dendrítica, que también atrapan complejos inmunes en los nódulos linfáticos aferentes y en los sinusoides de nódulos linfáticos deferente. Estas células representan una alternativa en relación a M ϕ y este es el paso donde el mecanismo clásico y alterno de la presentación del antígeno difiere. El antígeno sobre estas células dendríticas foliculares es transportado hacia los nodulos linfáticos. Además se encontró que el antígeno en el mecanismo alterno, juega un papel importante, no solamente en la generación de células B de memoria, sino también en la inducción de anticuerpos en la respuesta secundaria. (30).

Para definir si las células B eran también capaces de actuar como APC, inicialmente se hipotetizó que las células B, expresan una alta cantidad de moléculas MHC clase II, las cuales se pensó que estaban involucradas en la comunicación entre células B y T, y luego también hipotetizó que la iniciación de la respuesta de anticuerpos requiere de un "puenteo" entre células B y T. Considerando esto lógico, se presume que estas células pueden actuar como células accesorias. Recientemente se demostró que los linfocitos B pueden presentar antígeno con la misma eficiencia que el M ϕ . (19, 31, 33).

Desde hace una década algunos grupos de investigadores han demostrado que las células B o híbridomas de células B pueden procesar y presentar antígeno a células T, tanto in vivo como in vitro. In vitro se midieron funciones tales como proliferación de linfocitos T y la producción de linfocinas. (25, 26).

La naturaleza de las APCs, tienen una profunda influencia sobre el tipo de linfocitos T seleccionados. Se ha especulado que los linfocitos B en particular linfocitos B CD5+, pueden funcionar como APC, hacia las células CD5+, producen anticuerpos de alta especificidad, frecuentemente para un número de autoantígenos aparentemente de estructura no relacionada. Lo importante es que ocupan un lugar en órganos linfoides, denominado "el manto de folículos linfoides", donde tienen oportunidad para interactuar con linfocitos T. (27)

Recientemente se ha demostrado que sí bien las células B en general son efectivas APC, quizá no sean capaces de proporcionar, todas las señales necesarias para la proliferación de los linfocitos T. (31)

Los receptores inmunoglobulínicos de los linfocitos B, específicamente enlazan antígeno en concentraciones de 10^{-3} a $10^{-6}M$, facilitando así su endocitosis y por lo tanto el procesamiento. Estas células pueden entonces presentar antígeno a linfocitos T, las células en turno producen las linfocinas necesarias para activar las células B productoras de anticuerpos y producir linfocitos B de memoria. (30,31)

Es posible que la diferencia en todas las APCs estribe en la "maquinaria enzimática" requerida para dirigir proteínas y producir péptidos que presentan diferentes epitopes. También la diferencia puede deberse en cuanto a la generación de una segunda señal de la molécula accesoria a la secreción de citocinas. (27)

Por otro lado siempre se ha sabido que las células cebadas, juegan un papel muy importante en las reacciones alérgicas secretando histamina y otros mediadores hipersensibilidad inmediata, sin embargo y a pesar de éstas funciones, los inmunólogos se hacían la pregunta de que si también funcionaban como APCs. Por lo que se realizó un experimento donde se evaluó la expresión del MHC clase II en células cebadas y su posible papel en la presentación de antígeno. En ratas se demostró que el 10% de células cebadas aisladas de cavidad pleural expresaron el MHC unido al antígeno de clase II, y después de haberse incubado entre 48 y 72 horas con interferón gamma, de un 60 a un 80% de células incrementaron su expresión del MHC clase II. Estos resultados sugirieron que las células cebadas aunado a su función secretora de mediadores de la inflamación, pueden también funcionar como células APC y activarse localmente, a través de un enlace corto e interactuado, con los linfocitos T cooperadores y linfocitos B, aumentando su función como parte de la reacción alérgica. (29)

CAPITULO 9.0

Mecanismo de Capacitación de antígeno por APCs.

La idea acerca del procesamiento de antígeno (Ag.) previo a la presentación, ha cambiado drásticamente en la última década. Al principio se pensaba que el antígeno se enlazaba a la superficie de la célula accesoria, donde éste permanecía para el reconocimiento por los linfocitos T, por ejemplo, en el caso de los linfocitos B, se creía que mediante las inmunoglobulinas (Igs) de superficie, enlazaban y presentaban el antígeno a linfocitos T (sin previo procesamiento) formando un "puente" entre los receptores del linfocito T y el receptor Ig específico del hapteno del linfocito B. Continuaron las investigaciones y algunos grupos de investigadores concluyeron que, para muchos antígenos proteicos solubles, así como para antígenos bacterianos, requieran ser captados y transportados hacia el interior de la célula para ser procesado y posteriormente presentado. (20)

El antígeno puede ser endocitado mediante tres mecanismos los cuáles son;
a) Pinocitosis en fase fluida b) Endocitosis mediante receptores de membrana y
c) Fagocitosis. (20,34)

9.1 PINOCITOSIS EN FASE FLUIDA.

Este mecanismo no involucra el enlace de antígeno por receptores específicos, sin embargo éste mecanismo puede servir como una forma de mecanismo para la endocitosis de antígeno, que resulta apropiado para el procesamiento y presentación del antígeno. Aunque éste mecanismo no ha sido claramente establecido. Se ha demostrado que los antígenos proteicos solubles son presentados eficientemente por fibroblastos, los cuáles expresan cadena invariante y llevan a cabo éste mecanismo. (20,34)

9.2 Endocitosis mediante receptores de membrana.

El enlace del antígeno por células accesorias ocurre de dos maneras; primero, que ocurra un enlace no específico con interacciones no covalentes a estructuras todavía no definidas sobre la membrana plasmática de las APCs., y segundo que haya un enlace con receptores específicos tales como Inmunoglobulinas (23,35) ó interacción del complejo Ag-Anticuerpo, con receptores Fc o C3. (20) y LFA-3. (19,36) Esta última molécula se expresa sobre células del tejido endotelial, epitelial, y conectivo humano, también como en linfocitos T y B y eritrocitos. (19,36), (vease fig. 11 y 12)

La presentación, cuando el antígeno es captado por linfocitos B vía Igs es mas eficiente comparandolo con la vía no específica. (20)

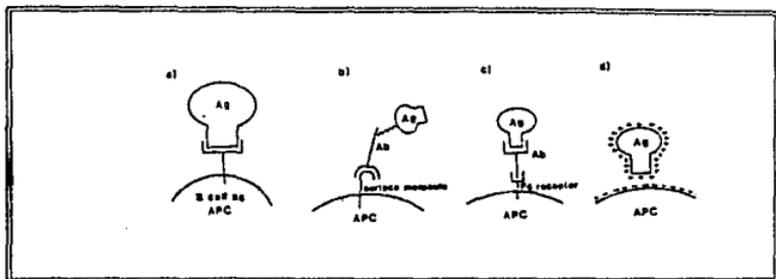


FIG. 11

FIG. 11. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LAS DIFERENTES FORMAS DE AUMENTAR LA INTERACCION ENTRE ANTIGENO Y RECEPTORES SUPERFICIALES EN APCs.
(BENJAMIN ET AL. IMMUNOLOGICAL REVIEW, 106: 43 1988)

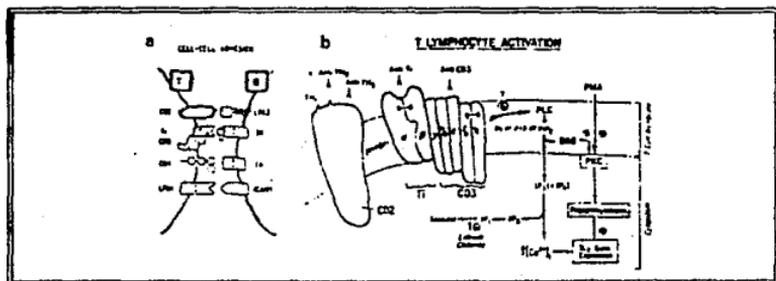


FIG. 12

FIG. 12. MOLECULAS DE SUPERFICIE INVOLUCRADAS EN LA ADHESION CELULA - CELULA, Y EN LA ACTIVACION DE LINFOCITOS T (PHILIPPE ET AL. IMMUNOLOGICAL REVIEW, 111: 113, 1989)

Los macrófagos(MΦ) también enlazan antígeno,vía receptores de membrana,aunque se sabe que éstos están especializados en fagocitar antígeno.Los macrófagos tienen lectinas,las cuales tienen la capacidad de reconocer oligosacáridos con manosa, N-acetilglucosamina,o L -fucosa terminal. El MΦ endocita el complejo, receptor-ligando rápidamente(2×10^6 moléculas/célula/hora) en un compartimiento prelisosomal en donde ocurre la disociación a pH ácido.Posterior a la disociación,el ligando libre pasa a los lisosomas entre 15 a 20 minutos,mientras los receptores regresan a la superficie.(37)

9.3 Fagocitosis.

Este último mecanismo por el cual las APCs pueden introducir antígeno, (la célula fagocítica prototipo es sin lugar a dudas el MΦ) es el más conocido. Aunque los MΦ presentan pobremente Ags.,proteicos solubles,éstos son extremadamente potentes APC,de partículas,fagocitandolas para posteriormente presentarlas en forma de péptidos inmunogénicos.(34)

CAPITULO 10.0

Receptores específicos de antígeno sobre APC

Como ya se mencionó anteriormente, se han hecho más estudios sobre MØ, fibroblastos y linfocitos B que sobre el resto de las APCs, es por ello que se sabe, que los fibroblastos carecen propiamente de receptores y solamente expresan cadena invariante, (20). Mientras que los MØ y linfocitos B sí los expresan. Estudios en los años 60s demostraron que los linfocitos B expresaban moléculas Igs, que les servían de receptores de antígeno e inicialmente se pensó que los receptores eran las mismas Igs encontradas en suero. Sin embargo, estudios en los años 70s, establecieron que el principal receptor de Ag-específico sobre los linfocitos B, son las moléculas monoméricas tales como IgG e IgD, las cuáles tienen especificidad para el antígeno e idiotipo y cada una contiene un dominio carboxilo transmembranal responsable de anclar al receptor a la membrana de los linfocitos B. Posteriormente se reportó que los linfocitos B pueden expresar otra clase de Ig sobre su superficie dependiendo de su estado de diferenciación y que esos receptores también pueden expresar segmentos transmembranales. Además de que las células B, frecuentemente expresan más de un isotipo de Ig de superficie, para el reconocimiento de la porción hapténica de un conjugado, hapténo-acarreador, mientras que los linfocitos T expresan un receptor de especificidad diferente, que reconoce porciones del acarreador. (19)

Además de los receptores inmunoglobulínicos, se sabe que los linfocitos B contienen otros tipos de receptores no globulínicos tales como los receptores para el fragmento cristalizante, de las Igs, que interactúan con el complejo Ag-Ab, (vease fig 11), receptores para C3, y las moléculas tales como LFA-1 alfa y LFA-3 (descritas anteriormente). (19,20,36)

Como hemos ya señalado éstos receptores son necesarios para la captación de antígeno y así facilitar la fagocitosis, del antígeno, para posteriormente darse el procesamiento.

CAPITULO 11.0

Procesamiento de Antígeno.

El procesamiento de antígeno, continúa siendo el aspecto primordial para la activación de linfocitos T, esto es esencialmente una "caja negra" en términos de los eventos moleculares y celulares involucrados. Se conocen algunos detalles moleculares de la interacción del Ag., con moléculas MHC, que pueden ser analizados como un paso final en el procesamiento del antígeno. Existen pocos datos claros sobre el proceso previo a la presentación de antígeno es decir, sobre la captura de antígeno, el tráfico del antígeno a través de los compartimentos interconectados de la célula y las modificaciones que suceden allí. Sin embargo el procesamiento del Ag es de significancia no solamente como un fenómeno celular en sí, si no, como un eslabón en la respuesta inmune. Como se sabe también, los linfocitos T son parte importante en la respuesta inmune, los cuáles generalmente no enlazan y ni se activan en presencia de antígeno en circulación, sino solamente reconocen Ag cuando ésta físicamente asociada a moléculas MHC sobre la superficie de las APC. Sin embargo las moléculas MHC no están involucradas como receptores para proteínas nativas solubles (u otros antígenos). El procesamiento del Ag es por lo tanto una transformación esencial de el Ag soluble y particulado para que subsecuentemente pueda ser ensamblado a moléculas MHC, ya sea clase I o clase II. El procesamiento determina no solamente si un Ag puede activar a linfocitos T, sino que, también determina que estructura molecular es reconocida y cuáles linfocitos T son seleccionados. Una definición operacional que ha sido aceptada universalmente es: "El procesamiento de Ag es una serie de eventos bioquímicos, que se llevan a cabo entre la captación del Ag y el tiempo en que el Ag es reconocido por los linfocitos T.(23)

11.1. Sitio de procesamiento de antígenos.

Algunos Ags no requieren una extensa degradación para ser procesados y no hay correlación entre procesamiento y actividad lisosomal de diferentes tipos de células. El lisosoma es un candidato poco probable para ser el sitio de procesamiento del antígeno y parecería ser a priori un sitio ineficiente, ya que la mayoría de material que se pone en contacto con lisosomas es degradado por una batería de endo y exoproteasas a pequeños fragmentos, los cuales es difícil pensar que retengan cualquier sitio inmunogénico. (23)

Se ha sugerido que el proceso de antígeno se lleva a cabo intracelularmente, además es dependiente de tiempo y temperatura y puede ser inhibido por agentes que interfieren con la función lisosomal. Los eventos del procesamiento en MØ y linfocitos B puede ser muy similar, aunque es posible que los linfocitos B pueden conducir al Ag a lisosomas. (19)

La evidencia inicial para la existencia de un procesamiento de Ag fue debido a la observación que se hizo cuando las APC se incubaron con Ag, habiendo un periodo de aproximadamente 45 minutos antes de que las APCs puedan estimular a linfocitos T.

Durante este periodo de tiempo las APCs introducen y procesan Ag. Los primeros estudios que dieron indicios del procesamiento de Ag, fueron reportados en 1982, y se encontró que el procesamiento de Ag fue inhibido con reactivos que elevan intracelularmente el pH. Subsecuentemente el mismo efecto fue encontrado en reactivos lisosomotrópicos, tales como cloroquina monensín y cloruro de amonio. Los inhibidores de cisteína proteasa ácida tales como leupeptina, también pueden bloquear el procesamiento de antigeno. Todos estos resultados condujeron a la hipótesis de que el procesamiento de Ag ocurre en el endosoma de las APCs medidas por proteasa ácida o catepsinas y que los fragmentos peptídicos generados son ensambladas a moléculas MHC clase I ó clase II recién sintetizadas, posiblemente en el "trans-Golgi", antes de que el complejo sea transportado a la membrana plásmica. (del ensamble se hablará más adelante). Sin embargo se sabe que hay dos compartimientos principales que tienen un medio ácido y actividad de catepsinas los cuáles son: "Endosomas" y "Lisomas". No solamente los reactivos lisosomotrópicos elevan el pH en todos los compartimientos intracelulares, sino que, también tienen efectos secundarios sobre las células, incluyendo alteración del mecanismo de transporte, reciclado de moléculas MHC, inhibición de la fusión de vesículas y efectos sobre el procesamiento de la cadena invariante.(38,39)

Hay algunos linfocitos T restringidos específicamente a moléculas MHC clase I, que pueden ser activados por pequeños péptidos, los cuáles no fueron bloqueados por inhibidores lisosomales, esto ha sugerido que el antígeno - (proteínas exógenas, virales o proteínas celulares), pueden ser procesados por un mecanismo no endosomal, el cual no es bien entendido ni conocido.(40)

Se ha encontrado que en todos los casos de procesamiento endosomal, ocurre solo si éste se lleva a cabo a pH ácido (de 3-5) mientras que la formación del complejo MHC-Ag se lleva a cabo a pH de 7.0 (23) (vease la fig 13)

Por otro lado, se ha estudiado el destino de la manosa-BSA en MØ alveolares de conejo, para determinar si la degradación ocurre en un comportamiento prelisosomal. Concluyéndose de que esa degradación de manosa-BSA sí ocurre, y ocurre seis minutos después de haber introducido el antígeno. Posteriormente se demostró que las vesículas endocíticas, cuando se sepepan de lisosomas por fraccionamiento subcelular, son capaces de degradar manosa-BSA de manera intravesicular. También se proporcionaron evidencias de que ésta proteólisis es dependiente del pH y ATP, no así, dependiente de ADP. Se ha demostrado que una proteína "catepsina D" análoga a la proteasa, es responsable de la degradación de manosa-BSA prelisosomal en MØ. En general el fraccionamiento subcelular de MØ alveolares, demostró que los ligados que producen de un compartimiento no lisosomal en tres minutos se enlazan a la membrana plasmática. Este compartimiento ha sido referido simplemente como endosomas o como receptosomas ó compartimiento de desacoplamiento del ligando-receptor, este desacoplamiento se dá en presencia de protones que tienen la capacidad de reducir el pH.(27)

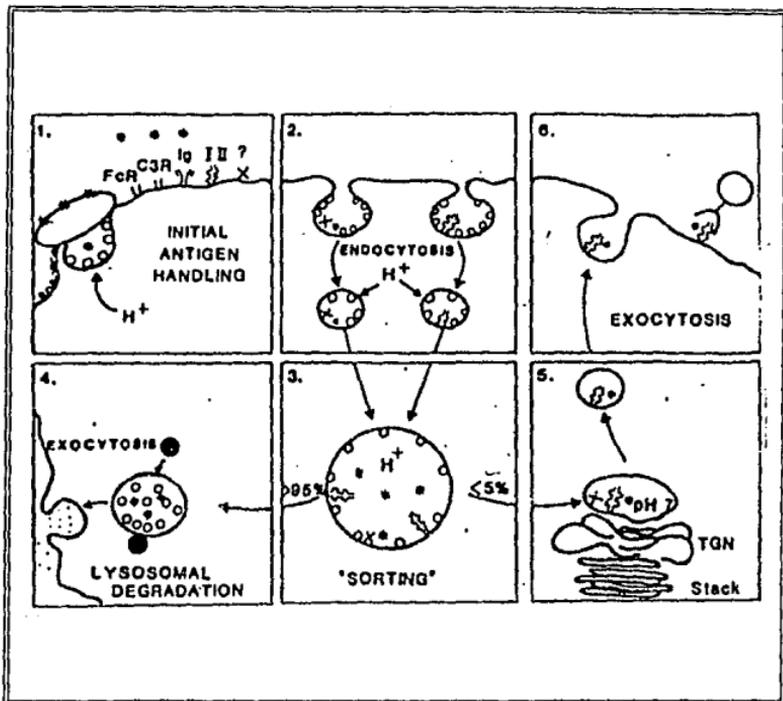


FIG. 13

FIG. 13. EL ANTIGENO ES ENDOCITADO EN UN COMPARTIMIENTO ENDOSOMAL ACIDO (ii y iii) DONDE PERMANECE HASTA QUE OCURRE LA REACCION, DE AQUI PASA A LISOSOMAS PARA SER DEGRADADO O REGRESA A COMPLEJARSE CON LA MOLECULA MHC a pH DE 7.0 (V) (BENJAMIN W. ET AL. IMMUNOLOGICAL REVIEW, 106:45, 1988)

11.2 Proteólisis.

Una de las primeras indicaciones que involucró procesamiento, más que un simple rompimiento proteolítico fueron los estudios con ovalbumina donde utilizando hibridomas de linfocitos T, el procesamiento podría ser; ya sea desdoblamiento de la cadena polipeptídica o su rompimiento proteolítico, mientras que para otros hibridomas de linfocitos T el procesamiento del Ag requirió absolutamente rompimiento proteolítico. Los factores que emergieron de éstos estudios fueron; primeramente, la definición bioquímica de procesamiento de Ag que incluye desnaturalización también como rompimiento proteolítico de Ag y segundo, la definición de procesamiento de Ag, que esto depende del tipo de antígeno estudiado y el tipo de linfocitos T que reconocen al Ag procesado.(39)

Desafortunadamente la especificidad de muchas proteasas no es tan conocida como lo es para las tripsina, sin embargo se ha estado intentando identificar las proteasas involucradas en el procesamiento de la proteína mioglobina, por que se cree que el procesamiento involucra rompimientos internos de las proteína, antes de remover simplemente aminoácidos (-a.a-) terminales. Otros estudios fueron enfocados sobre endoproteasas a las cuáles las han dividido en cuatro clases en base a su función sobre el sitio activo, y por lo tanto su mecanismo de acción, éstas son; (a) Thiol proteasas, (b) Serina proteasas, (c) Carboxil proteasas y (d) Metallo proteasas, y para cada clase de éstas proteasas se tiene el tipo de proteasas. (vease tabla 2)

TIPO DE PROTEASAS

CATEGORIA DE PROTEASAS	PROTEASAS
1.- TIOL	PAPAINA, PLASMINA, CATEPSINA A Y B
2.- SERINA	TRIPICINA, QUIMOTRIPSINA
3.- ACIDA	PEPSINA, CATEPSINA D
4.- METALO	TERMOLISINA

TABLA 2 INDICA LA CATEGORIA Y EL TIPO DE PROTEASAS.

Estudios sobre el procesamiento de mioglobina indicaron que las tior proteasas, tales como la catepsina B o L fueron necesarias para el procesamiento. Aunque la especificidad de la catepsina B no se ha definido aún, como la de la tripsina, la cual corta preferencialmente después de pares de a.a. básicos tales como lys-lys, lys-Arg o después de phe-Arg.(40,41)

Los fibroblastos transformados de ratón, sintetizan y secretan grandes cantidades de una proteína de peso molecular de 39KD denominada MEP (de major excreted protein) éste polipéptido es el precursor de la cisteína proteasa ácida ahora, se conoce como "catepsina L". El precursor de la catepsina L, acarrea al lisosoma la unidad de reconocimiento, manosa-6-fosfato(M6PO4) como la forma más madura de la enzima.(42) (vease fig 14).

Después de la síntesis y movimiento dentro del lisosoma, la forma del precursor es normalmente procesado por autocatálisis a dos formas de peso molecular más bajo una de 29 KD y la otra de 20 KD. Todas éstas formas de la catepsina L tienen actividad proteolítica hacia múltiples sitios, bajo condiciones ácidas. Solamente la forma precursora es secretada por fibroblastos transformados.(42)

Forms of Cathepsin L

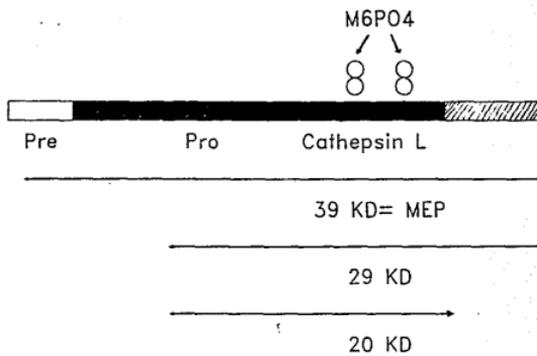


FIG.14 Estructura de la cathepsina L, y su precursor peso molecular 39KD, y esta a su vez es precursora de dos fragmentos de peso molecular 29KD y 20KD, teniendo los tres fragmentos, capacidad proteolítica bajo condiciones ácidas. (38).

La cinética de endocitosis y procesamiento del precursor de la catepsina L (p-catepsina L) en las dos formas de más bajo peso molecular, fueron identificadas con el isótopo radiactivo p-catepsina L. Después de la incubación durante varios periodos de tiempo, la catepsina L fue inmunoprecipitada y analizada en electroforésis usando geles de poliacrilamida, la forma de peso molecular de 29, KD fue detectada a la hora y la forma de 20, desapareció a las tres horas. Estos resultados sugieren que el p-catepsina L se convierte activo enzimáticamente durante la primera hora, por movimientos en el compartimiento ácido. Por lo tanto ambas catepsinas pueden generar y destruir determinantes antigénicos y crear péptidos inmunógenicos. (42).

Otras de las proteasas bien caracterizadas es la catepsina D (aspartil proteasas). Esta proteasa se purificó y se examinó, la cual se utilizó para procesar ovalbúmina, encontrándose que muestra, suficiente actividad para procesar selectivamente, sin destruir la estructura del epitope. (43).

Como ya se ha mencionado, el procesamiento del Ag involucra la generación de péptidos, de proteínas citosólicas y su transporte hacia el retículo endoplásmico, donde se ensamblará con moléculas MHC clase I y beta-2-microglobulina (B2m) para formar una molécula estable y funcional, análoga a MHC clase II y cadena Li. (44,45,46).

Otro candidato en la proteólisis de proteínas es el proteosoma, éste lo consideran como un complejo no lisosomal, de enzimas proteicas, presentes en el citosol. Los proteosomas tienen algunos sitios proteolíticamente activos y son complejos de un relativo alto peso molecular (600Kd), éste complejo está formado de 20 a 30 subunidades con un peso molecular de aproximadamente 15 a 30 KDa. (44).

La región clase II contiene genes que codifican para al menos dos subunidades de complejos proteolíticos intracelularmente, éste complejo es bioquímicamente similar al proteosoma. Estas dos subunidades son LMP-1 y LMP-2 (de Low Molecular peptide) se piensa que éstas dos subunidades se requieren para la traslocación del péptido endógeno dentro del retículo endoplásmico, para asociarse con moléculas MHC clase I. Estas observaciones sugieren que el complejo LMP, puede ser responsable en la generación de péptidos de Ag citoplasmático durante el procesamiento. (41).

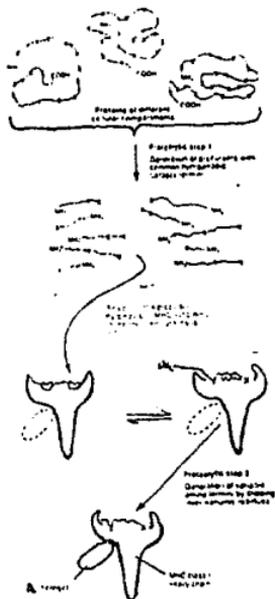
Se ha sugerido recientemente que durante el proceso, se llevan a cabo complementos sucesivos de grupos carboxilos y aminoácidos terminales, resultando el modelo del "Paso doble". En el primer paso los péptidos precursores generados, se produce un carboxilo terminal, mientras que el amino terminal es generado en un segundo paso, bajo la participación de moléculas MHC alelo-específicas. (14) (vease fig 15).

FIG. 15 MUESTRA EL MODELO DEL

PASO DOBLE.

PASO 1: LOS PEPTIDOS PRECURSORES CON CARBOXILO TERMINAL, SON PRODUCIDOS POR PROTEOLISIS ESPECIFICO O NO ESPECIFICO DE PROTEINAS DE DIFERENTES COMPARTIMENTOS.

PASO 2: EL ANCHO TERMINAL DEL EL PRECURSOR ES ORGANIZADO A LA CORRECTA DIMENSION BAJO LA PARTICIPACION DE LA MOLECULA MHC.
(OLAF R. ET AL. IMMUNOL. TODAY 12(12):453,1991)



La dimensión del péptido completamente procesado es importante, en cuanto a la habilidad para enlazarse finalmente a la cadena pesada e inducir un cambio conformacional, la cual puede promover el transporte hacia la superficie celular. Los complejos débilmente formados por largos péptidos, pueden facilitar un intercambio de precursores enlazados, durante el ensamble. El rompimiento puede ocurrir durante o después del ensamble por proteasas, por las propias moléculas MHC. Una actividad proteolítica ha sido demostrada en algunos comportamientos de la vía secretora, incluyendo al retículo endoplásmico, división de salvamento en el retículo-asociado y la red trans-Golgi. El mecanismo de transporte intracelular entre compartimientos es poco entendido y junto a la degradación citosólica hay algunos otros compartimientos no lisosomales que potencialmente proveen la requerida actividad proteolítica para generar péptidos, estos compartimientos no lisosomales aún no están bien estudiados. (14).

11.3. Acidificación Endosomal.

Los endosomas son complejos de organelos y han sido identificados tres subpoblaciones distintas, bioquímica y funcionalmente. La heterogeneidad de los endosomas probablemente reflejan los diferentes papeles que juegan en la selección y captación de ligandos. Los endosomas aislados de las células de ovario, de hamster chino (CHO) pierden su acidificación y se desconoce si esto sucede en todas las subpoblaciones de endosomas o solamente en algunas. Junto a los endosomas otros organelos acidificados no son afectados por la mutación de las células CHO y esto significa que, podría ser el lugar donde el procesamiento residual ocurra. Por ejemplo, los lisosomas mantienen su pH ácido en las células mutadas, otra posibilidad es la sección periférica de la región trans-Golgi, ésta región de trans-Golgi se piensa que también se

acidifica, aunque no ha sido medido directamente su pH. Finalmente una alternativa descrita recientemente, son las vesículas que poseen una característica mixta, tanto endosomal como lisosomal, en general se ha demostrado que la acidificación endosomal es un importante paso en el procesamiento de antígeno. (48).

En otro orden de ideas, para determinar si las vesículas prelisosomales contienen proteasas, ligandos y receptores, fueron incubadas bajo condiciones cuya disociación de manosa- BSA de los receptores, se demostró que se llevó a cabo en las vesículas endocíticas, libres de lisosomas. Estas vesículas endocíticas mostraron incapacidad para degradar manosa- BSA-1125 a pH de 7.4, mientras que a pH de 5.0, se detectaron fragmentos de ligandos solubles en solución de ácido tricloro acético (TCA). Esto nos demuestra que a un pH ácido, procede la degradación rápidamente, en un rango de 2.1 pg/minuto. (37) (vease fig. 16 y 17).

11.4. El procesamiento del ag es dependiente de tiempo y temperatura.

Los linfocitos T citotóxicos y cooperadores son activados por antígenos proteicos a través de una complicada cadena de eventos, celulares, moleculares y secretores, que ocurren dentro de las APC. Posteriormente a éste conjunto de eventos, es liberada la señal estimuladora por APC, durante una interacción física entre las dos. (49).

TCA SOLUBLE LIGAND (mg)

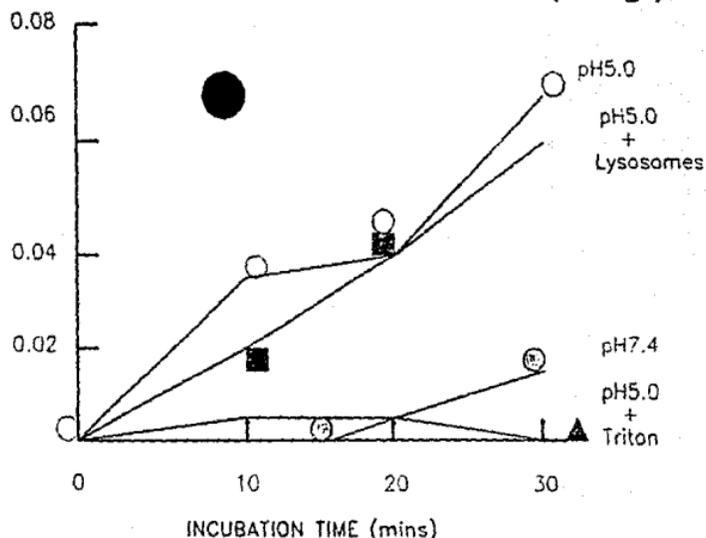


FIG: 16 Se muestra la degradación de manosa-BSA (ligando) dentro de vesículas endocíticas, después de incubarse a pH5.0 (o) y a 7.0 (o). (Stepanie D. et. j. Bio, Chemis. 260(28);15313,1985).

TCA SOLUBLE LIGAND (mg)

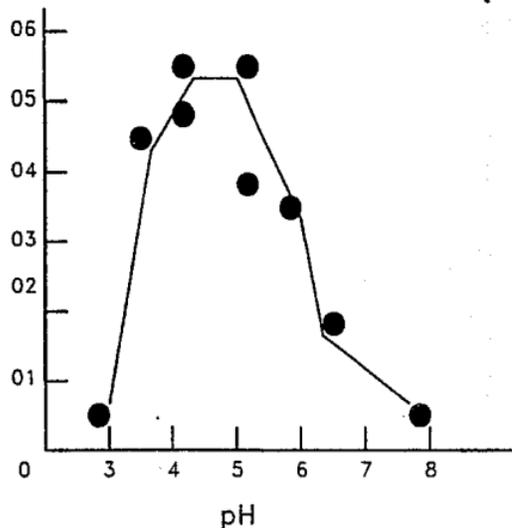


FIG: 17 Degradación de ligando, dependiente de pH 1.8 ng de ligando incubados en solución isotónica a pH de 3-7.4 e incubada a 37°C. (ref. 37).

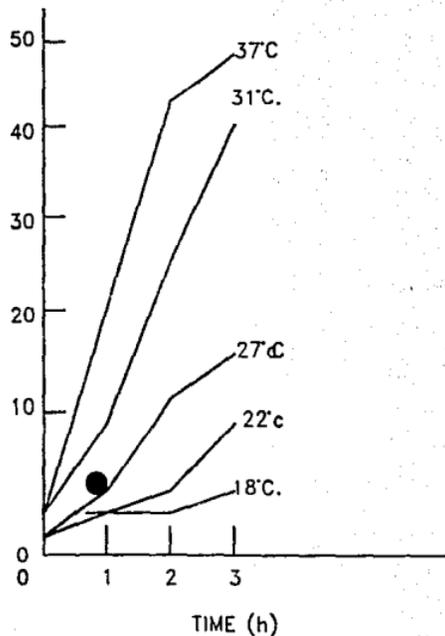
Los primeros experimentos cinéticos han revelado un tiempo intermedio, entre el tiempo necesario para que el antígeno se enlace a la superficie de la APC y el tiempo que es necesario para que el Ag sea reconocido por linfocitos T, dicho tiempo se ha estimado que es de entre 45 a 60 minutos. (20,49,50,51).

Uno de los primeros estudios sobre la cinética de degradación del Ag, usaron, un Ag particulado como es Listeria monocytogenes. (38,51) Otros investigadores emplearon linfomas de linfocitos B y como Ag usaron Ig de conejo anti-ratón. (50) Por otro lado se han empleado como Ag, derivado proteico purificado (PPD) y como APCs, usaron células de exudado peritoneal de cobayo y lo que midieron todos en común fue proliferación de linfocitos T y cuantificar la IL-1, incubando de 0 a 37°C. A 0°C toda la actividad de endocitosis cesó, demostrándose así que a esta temperatura no se lleva a cabo procesamiento de Ag, entre 15 y 20°C, las APC fueron capaces de procesar y presentar Ag, aunque en una proporción menor, comparada con aquellas APC que se incubaron a 37°C. (49) (vease fig. 18).

Se ha encontrado que en un tiempo de 30 minutos, después de exponer el Ag frente a APC, se presentaba la primera señal de presentación de Ag. La capacidad estimulatoria se incrementó de manera lineal, observándose una meseta entre dos y cuatro horas, después de que las células se incubaron a 37°C. Algunos Ag proteicos "grandes" fueron examinados, encontrándose. La proporción de procesamiento de Ag fue dosis dependiente, es decir al exponer una mayor concentración de Ag a APC, conduce a un incremento en la proporción de Ag procesado. (49).

TCA SOLUBLE LIGAND (mg)

FIG. 18 El procesamiento de Ag es independiente de temperatura y el tiempo.
(Soren B. et. al. Acta path microbiol. immunol scand sect,94:21,1986)



El paralelismo entre el efecto de la temperatura, endocitocitosis y degradación lisosomal de proteínas, (descrito por otros autores) confirma que el procesamiento de Ag, es una serie de eventos que requieren energía (por ejemplo ATP) asumiendo que la capacidad estimuladora de las APCs, medidas en centelleos por minuto (CPM) incorporando H-timidina, es directamente proporcional a la cantidad de Ag procesado, que se presenta sobre la superficie de las APC. un requerimiento de aproximadamente 24Kcal/mol. se ha encontrado que es suficiente para llevarse acabo el procesamiento de Ag. se ha encontrado una similar cantidad de energía en el fenómeno de pinocitosis absorptiva y en la función entre la vacuola endocítica y el lisosoma. muchos procesos químicos tienen una energía de activación en éste rango. (49).

11.5. Requerimiento ATP en la degradación de Ag.

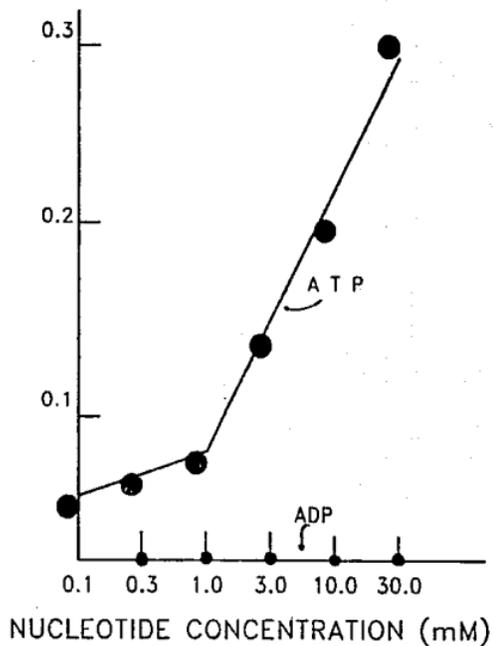
Como ya se mencionó, la degradación de Ag requiere de energía, es decir, la degradación de ligandos en endosomas requiere de ATP. se ha demostrado que las vesículas que contienen ligando, I125 (manosa BSA) se enlazan a receptores de manosa y puede acidificarse agregando ATP, como resultado de ésto el complejo receptor-ligado se disocia, y se prepara para el ensamble. las vesículas crudas que contienen el ligando, para el estudio se han suspendido en un amortiguador de pH 7.4, durante 5 minutos a 37°C, (el amortiguador contiene ATP y ADP) se encontró que la degradación fue directamente proporcional a la concentración del nucleotido, pero éste fenómeno solo se observó en la presencia de ATP en una concentración de 0.3mM, un 13.5% de degradación de ligado intravesicular, en 10 minutos (37) (vease fig. 19).

Después de que el antígeno nativo ha sido degradado, el péptido resultante adquiere dos distintas formas de configuración o dos "caras", las cuáles tiene la capacidad de hacer contacto con los receptores del linfocito T, al igual que para enlazarse a moléculas MHC. Estas dos caras han sido designadas como "Epitopo" Sitio de contacto con linfocitos T y el "Agretopo" Sitio de contacto con la molécula MHC clase I y clase II. Ahora es claro que tanto el epitopo como el agretepo, están compuestos de dos a tres residuos de aminoácidos(a.a). Se ha identificado por ejemplo que para la lisozima de huevo, se tienen de 52 a 61 péptidos y cada uno está compuesto por tres a.a.

(54)

TCA SOLUBLE LIGAND (mg)

FIG. 19 Muestra, la degradación de ligando que es proporcional a la concentración de ATP y no de ADP (de Stephanie D. et. al, J. Biol.Chems, 260,(28):15313,1985).



11.6. Modelo de ensamble entre el péptido inmunogénico y la molécula MHC.

11.6.1. ensamble del péptido inmunogénico a la molécula MHC clase I.

El curso inmunológico de las moléculas MHC clase I depende del suministro intracelular de péptidos cortos, un ensamble, del transporte a la membrana plasmática y la longevidad molecular de la molécula clase I. Estos son considerados como factores para un enlace adecuado del péptido. El descubrimiento de que los péptidos enlazados por moléculas clase I, frecuentemente derivan de proteínas citoplasmáticas, sugiriendo, un transporte transmembranal activo de péptidos del citoplasma al retículo endoplásmico, (55,56,57,58).

Una suposición viene de la caracterización de líneas celulares mutantes, las cuáles ensamblan ineficientemente moléculas clase I y tienen propiedades consistentes en cuanto a defectos del transporte de péptidos, por ejemplo células 174,721,T1 y T2. Se han hecho esfuerzos por encontrar evidencias sobre un transportador de péptidos. Los primeros estudios que se hicieron, dieron a conocer que los genes que controlan a los antígenos de clase I, están en el mapa del MHC. También se han descrito y secuenciado genes nuevos en el MHC, que se concideran candidatos para modificar moléculas transportadoras. (vease fig.20) (55,58).

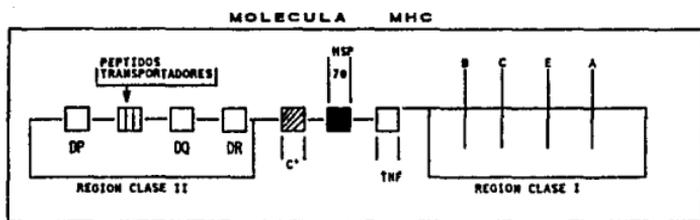


FIG.20. MOLECULA MHC QUE DEMOTA LA PRECISION DE LOS GENES QUE CODIFICAN PEPTIDOS TRANSPORTADORES. (PETER P.,NATURE,348,674,1990)

11.6.1.1. Moléculas transportadoras de péptidos endógenos.

Por más de una década se ha estudiado un complejo proteico intracelular designado LMP-1 y LMP-2 (low-molecular-peptide) al cuál se ha determinado que es un complejo de 16 polipéptidos cada uno, de relativo bajo peso molecular de aproximadamente 15 a 30 KD, indicando que al menos uno de los componentes es polimórfico y codificado por un gen en MHC, al cuál se le atribuye que actúa como molécula transportadora de péptidos. Se ha postulado por otro lado que esos genes localizados en el MHC, codifican proteínas, que funcionan como transportadores, denominándoseles "superfamilia de transportadores, ABC (ATP-binding-Cassete). Las proteínas de ésta superfamilia, acarrea iones, pequeñas moléculas y lo más importante, péptidos del citoplasma a la membrana de enlace es decir al compartimiento que contiene las moléculas clase I recién sintetizadas. (vease fig.21) (5).

Se ha secuenciado el DNA de la molécula MHC, y los genes obtenidos fueron designados mtp-1 y mtp-2 (MHC-transporterprotein) los cuáles son homólogos a los genes HAM-1 y HAM-2 (histocompatibility-antigen-modifier) de rata. Los primeros se han considerado, candidatos atractivos para codificar péptidos transportadores. Pero hasta ahora el postulado sobre la superfamilia de acarreadores ABC, ha sido la más aceptada. (56).

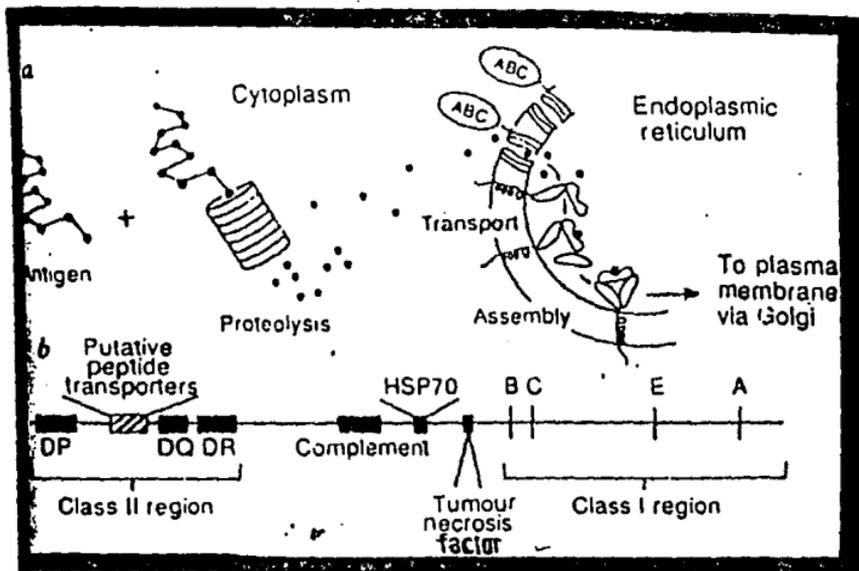


FIG. 21

FIG. 21 DEGRADACION DE UN ANTIGENO PROTEICO CITOPASMATICO Y SU TRANSPORTE DEL CITOPLASMA AL RETICULO ENDOPLASMICO, POR MOLECULAS TRANSPORTADORAS ABC.

Por otra parte se ha identificado un complejo de enzimas proteolíticas con apariencia circular denominada "Proteosomas". Los genes que codifican las glicoproteínas del MHC, los genes transportadores y los genes que codifican proteosomas en el MHC todos son regulados transcripcionalmente por el interferón gama lo anterior es presentado como un intento de conocer los productos de los genes, los cuáles son esenciales para la eficiente presentación de antígeno. Se ha observado que en la ausencia de péptidos antigénicos, las glicoproteínas del MHC clase I no realizan su función. Parece ser que al menos un gen del transportador y un gen de proteosomas son necesarios. (56).

El descubrimiento de genes en el MHC, que codifican para subunidades de proteosomas y transportadores transmembranales conducidos por ATP, ha permitido especular acerca del desarrollo del procesamiento de antígeno y el enlace del péptido a la molécula MHC, clase I. La hipótesis más favorecida es; que los proteosomas digieren proteínas del citosol, generando fragmentos, los cuáles son entonces, translocados a través de la membrana del retículo endoplásmico (RE), por el transportador, siendo éste un paso dependiente de ATP, sin embargo otros autores no están de acuerdo con ésta observación, ya que hay reportes de que el ATP es requerido para el enlace del péptido a moléculas clase I y no para el transporte del péptido hacia el lumen del retículo endoplásmico. (57,58)

11.6.1.2. Modelo del ensamble entre el péptido y la molécula clase I.

Como ya se ha mencionado, la molécula clase I, esta compuesta de dos subunidades; una cadena pesada y una pequeña proteína exoplásmica denominada "B₂-microglobulina" (B_{2m}). La cadena pesada es polimórfica y codificada por genes en el MHC. Momentos después de su síntesis la cadena pesada se ensambla a la B_{2m} de manera no covalente en el r.e.(57)

Estudios biosintéticos han demostrado que la cadena pesada de clase I, puede asociarse en un tiempo de 30 minutos, después de éste tiempo adopta una conformación, de manera que no se pueda asociar la B_{2m}, es decir esto ocurre solamente en ausencia de ATP, debido a éste se inhibe el ensamble de la cadena pesada con la B_{2m} y por lo tanto se inhibe el enlace del péptido, de aquí la importancia del ATP al proceso. Pero se ha descubierto que en la ausencia del ATP, el péptido es enlazado a través de "Chaperonas", también denominadas BIP(es una proteína humana que enlaza inmunoglobulinas), la cual se piensa que tiene la capacidad de catalizar éste proceso. La BIP, es una proteína de choque térmico soluble (hsp70), que controla el desdoblamiento y asociación del complejo, péptido-B_{2m}-cadena pesada. Tal proteína puede ser equivalente a la cadena invariante involucrada en la biosíntesis y exocitosis de la molécula clase II, la cual recientemente se ha demostrado que contribuye a la presentación de antígeno.(57,59)

Como un mecanismo alterno se ha pensado que el péptido es concentrado, enlazándose a la B1P y que se requiere ATP para la liberación del péptido, para que éste sea finalmente enlazado a la molécula MHC clase I y se diriga a la membrana vía Golgi. (57,61) (vease fig. 22)

El enlace de peptidos de nueve odiez residuos de a.a. en promedio, estabiliza la asociación entre cadena pesada y B2m y hace el complejo competente para ser transportado hacia la superficie celular, donde las moléculas clase I activan a linfocitos T citotóxicos al presentarles el complejo. (57,61).

Varias observaciones proporcionan una explicación del por que, solamente péptidos cortos son asociados con la molécula clase I. Primero; por que los péptidos cortos son asociados fácilmente, jugando un papel crítico en el manejo del ensamble post-sintético, entre la cadena pesada y la B2m. Fuera de esto los péptidos disponibles, forman un dímero los cuales son ineficientes y el transporte hacia la superficie celular es impedido y los pocos complejos que llegan a la superficie, rápidamente se desnaturalizan a temperatura fisiológica. La efectividad se dá mediante la estabilidad de la molécula clase I que contiene al péptido, y promueve el desdoblamiento de la cadena pesada y estabilizando la asociación con B2m. Aquellos péptidos recuperados de las moléculas clase I, no se encuentran libres dentro de las células, sino que para ser protegidos los péptidos de una completa degradación por endopeptidasas son unidas a la clase I. (60).

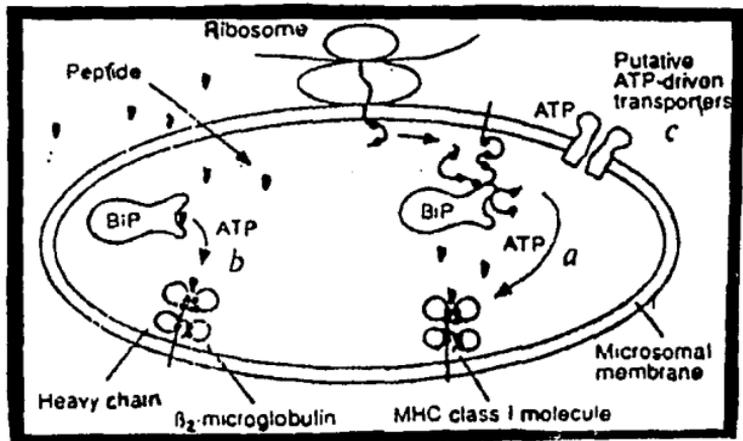


FIG. 22

FIG. 22 MUESTRA QUE EL ATP ES REQUERIDO PARA DESDOBLAMIENTOS Y ENSAMBLE DEL PEPTIDO A LA CADENA PESADA DE MHC CLASE I Y β_2 m. LA CHAPERONA BiP CATALIZA ESTE PROCESO. ALTERNATIVAMENTE, EL PEPTIDO ES CONCENTRADO POR BiP, ENLAZANDOSE A ESTA Y LIBERANDOSE EN PRESENCIA DE ATP. (BERNHARD ET AL NATURE,355:109,1992)

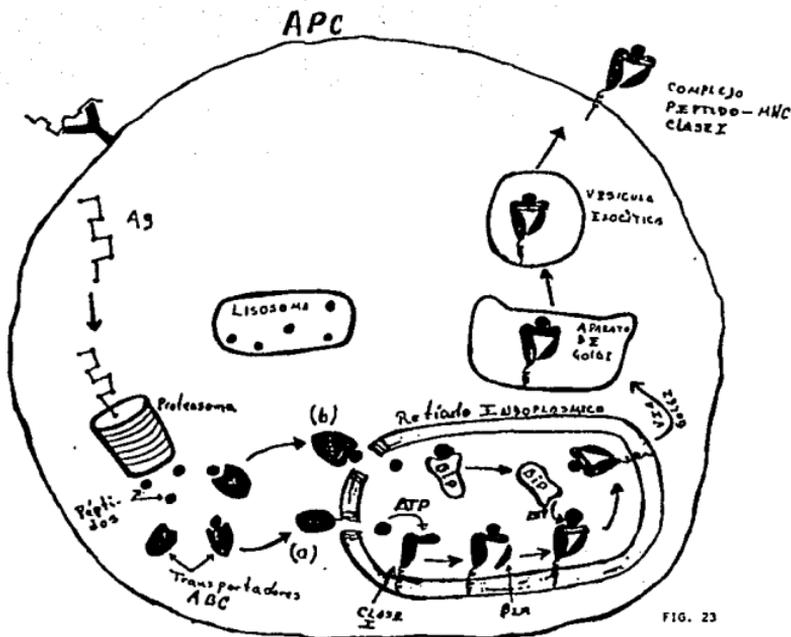


FIG. 23 MODELO DE PROCESAMIENTO, ENSAMBLE Y PRESENTACION DE ANTIGENO ENDOGENO POR MOLECULAS CLASE I .
 LOS PROTEOSOMAS HIDROLIZAN PROTEINAS CITOSOLICAS GENERANDOSE PEPTIDOS, LOS CUALES SON
 TRANSPORTADOS HACIA EL RETICULO ENDOPLASMICO POR LOS TRANSPORTADORES DE PEPTIDOS.

DESPUES DE QUE SE HA SINTETIZADO LA MOLECULA CLASE I Y LA MOLECULA β_{2m} EL ENSAMBLE PUEDE DARSE
 POR VIAS: A) LOS PEPTIDOS QUE SON ENDOCITADOS SE ENSAMBLAN A LA MOLECULA MIC CLASE I SOLAMENTE EN
 PRESENCIA DE ATP. B) LOS PEPTIDOS QUE SON ENDOCITADOS SON CONCENTRADOS POR CHAPERONAS (hps/70) O
 Bip, QUE EN PRESENCIA DE ATP CATALIZA EL ENSAMBLE DEL PEPTIDO A LA MOLECULA CLASE I, SINTETIZADA
 DE NOVO O RECICLADAS. EL COMPLEJO EMIGRA VIA GOLGI Y EN VESICULAS EXOCITICAS HASTA LA MEMBRANA
 CELULAR PARA SER PRESENTADOS A LINFOCITOS T CITOTOXICOS.

11.6.2. Modelo del ensamble entre péptido inmunogénico y la molécula MHC clase

II

El reconocimiento del antígeno extraño por linfocitos T cooperadores, requieren que las proteínas sean procesadas intracelularmente por las APC, hasta formar los fragmentos peptídicos que pueden enlazarse a las moléculas clase II. (62).

El procesamiento de antígeno involucra; la captación de antígeno, introducen, degradación proteolítica de antígeno y finalmente el ensamble de los péptidos a las moléculas MHC clase II. Para el ensamble del péptido a la molécula clase I, como ya se mencionó se requiere de péptidos transportadores, ATP, y chaperonas. Cabe entonces preguntarse ¿ el ensamble de antígeno procesado, a las moléculas MHC clase II ocurre de manera independiente en las APC ? o ¿ el ensamble requiere la función de otras proteínas, ya sea para el transporte de péptidos a la molécula clase II o para la asociación de moléculas clase II con los péptidos ?. Como primera instancia, existen evidencias de que los péptidos sintéticos y las moléculas clase II purificadas incorporadas en capas lipídicas es suficientemente mínimo para activar a los linfocitos T. Por lo tanto, péptidos sintéticos pueden asociarse de manera independiente con moléculas MHC clase II para formar un complejo funcional estimulatorio. Pero no se sabe si esto ocurre en las APC durante el procesamiento, ya que no se conoce mucho sobre éste discreto paso de procesamiento del antígeno. (63).

El mecanismo hipotético del ensamble entre moléculas clase II y el péptido, toma en cuenta condiciones, tales como un pH ácido el cual favorece la formación del complejo, péptido-MHC. (63). Esto es apoyado por otros trabajos, en donde proponen que a pH neutro las moléculas clase II no pueden realmente adquirir el cambio conformacional necesario, para el enlace con el péptido. Es decir han observado que las moléculas clase II es rígida e incapaz, excepto en raras ocasiones, de ensamblar antígeno, mientras que a pH ácido, las moléculas clase II, son más flexibles y hábiles para hacer la transmisión hacia la forma compacta u óptima. El péptido parece conducir a la molécula clase II hacia la conformación requerida y cuando la neutralización ocurre, el péptido unido a la molécula clase II, entran ambos en un estado de precompactamiento, es decir cuando la molécula clase II ha ensamblado al péptido, la molécula parcialmente engloba al péptido. (64).

Algunos estudios indican que es posible establecer condiciones en compartimientos subcelulares que significativamente, favorecen la asociación del antígeno procesado con moléculas clase II. Pero no es claro como en un simple compartimiento, pueden degradarse todos los antígenos. Debido a lo anterior, se piensa que otras proteínas en APC, pueden al menos ser requeridas para transportar péptidos del sitio de rompimiento o hidrólisis al compartimiento de ensamble. (65).

Se descubrió en 1978 que los antígenos clase II se asocian de manera no covalente con una molécula de 31KDa, a la cual denominaron "Cadena invariante" (Ii), debido a que carecía de polimorfismo. La molécula Ii se encontró, que se expresa en todos los tipos de células que expresan clase II, la inducción de clase II por linfocitos, fue generalmente acompañada por inducción de la molécula Ii. Estudios recientes han reforzado que Ii puede ser expresada sobre la superficie celular, pero hay datos de que la mayoría de moléculas clase II y moléculas Ii, no parecen estar asociados en la superficie celular. (65).

Se ha determinado que el gen para Ii, codifica los polipéptidos los cuales son: Ii-31 (como fracción principal) y Ii-41 (el cual se origina del RNA complementario). Poco después de su biosíntesis, Ii y las cadenas alfa y beta de la molécula clase II, se asocian en el retículo endoplásmico (RE). (18, 65).

El complejo Ii/cadenas alfa y beta de clase II, es transportado a través del aparato de Golgi en un compartimiento endosomal, donde se cree que las moléculas clase II se reúnen con el antígeno exógeno endocitado, disociándose la cadena Ii de la molécula clase II y simultáneamente se asocian el antígeno, mientras que la cadena Ii se rompe en fragmentos de 21 y 23 KD. Las moléculas clase II complejadas con los péptidos derivados, se mueven hacia la superficie celular. La coexpresión y la asociación física de moléculas clase II con Ii, han conducido a la hipótesis de que la función de Ii puede estar unida fuertemente a la función de las moléculas clase II. (65) (Vease fig. 24).

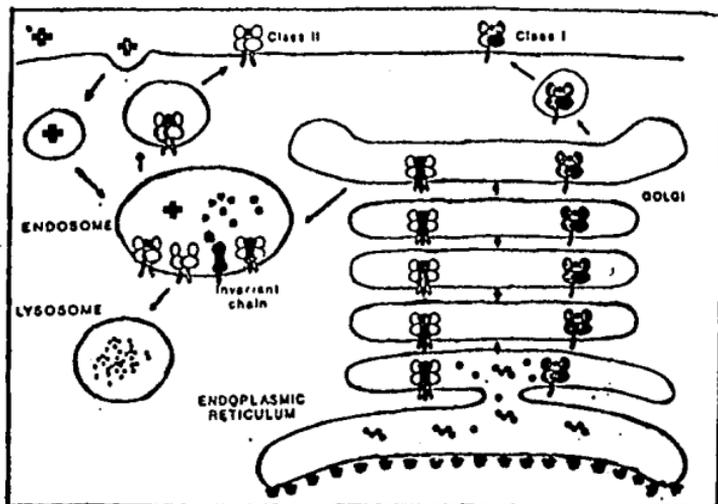


FIG. 24

FIG. 24 EL COMPLEJO MHC CLASE II-LI ES TRANSPORTADO ATRAVÉS DEL APARATO DE GOLGI, EN UN COMPARTIMIENTO ENDOSOMAL, PARA REUNIRSE CON EL ANTIGENO HIDROLIZADO. ENSAMBLÁNDOSE LA MOLECULA CLASE II Y EL PEPTIDO PARA QUE FINALMENTE SEA PRESENTADO AL Ag.

(GUNTER J. ET AL. IMMUNOL. TODAY. 11(10). 1990).

Es posible que las moléculas MHC clase II o la cadena invariante Ii, se asocian con chaperonas durante el proceso de ensamble, ésto es para prevenir la reasociación y permitir que la molécula clase II englobe parcialmente al antígeno y sea finalmente presentado a linfocitos T cooperadores. (18).

Se han demostrado que las APCs, pueden expresar cantidades similares de moléculas MHC clase II, con ó sin la cadena Ii en la superficie celular. Estos datos confirman que las cadenas alfa y beta pueden ensamblar y ser transportados hacia la superficie celular sin la molécula Ii, es decir, la molécula Ii cuya función principal es la de dirigir a las moléculas clase II a un nuevo compartamiento en donde se ensamblará con el péptido. (18).

Recientemente se han proporcionado evidencias en el desarrollo de un nuevo miembro de las chaperonas (hsp/70) en el procesamiento de antígeno. Han postulado que ésta proteína que enlaza péptidos de 72 a 74 KDa (PBP 72/74), juega un papel importante en la asociación del antígeno procesado a la molécula clase II, ya sea facilitando directamente el enlace del antígeno, como acarreador de antígeno o concentrado a los péptidos antigénicos en los sitios subcelulares del ensamble. (63).

La PBP 72/74 fue aislada de APCs y se ha demostrado serológicamente ser de la familia de las chaperonas hsp70. Para PBP 72/74 el enlace de ATP causa liberación del péptido (análogo a BiP). La relación de PBP 72/74 con la hsp70, sugiere una función común, es decir, los miembros de la familia de hsp70, se ha demostrado *in vitro* que participan en el desdoblamiento intracelular y en el transporte de proteínas, al igual que en el ensamble del complejo péptido/MHC clase I. También los miembros de la hsp70 han sido identificados que enlazan la cadena del polipéptido naciente de proteínas mitocondriales en el citoplasma durante la síntesis y transporte de la proteína a la mitocondria. Una vez que esos polipéptidos son transportados a través de la membrana mitocondrial, las hsp70, facilita el desdoblamiento de proteínas, al entrar al retículo endoplásmico. Por analogía a la función de las hsp70, se ha postulado que la PBP 72/74 juega un papel crucial, ya sea, facilitando el enlace del péptido a la molécula clase II o en el transporte de péptidos procesados hacia el sitio o compartimento que contiene a las moléculas MHC clase II competente para enlazar péptidos. Se ha pensado que las hsp70 pueden estar involucrados en el transporte de los péptidos, desde el citoplasma cruzando una membrana dentro del compartimento endosomal, mientras que las PBP72/74 pueden ser las residentes en el lumen del endosoma, quienes se encargan de recibir los péptidos. En realidad poco se sabe sobre este discreto mecanismo del ensamble entre el péptido y la molécula clas II. (63) (ver figs. 25 y 26)

La molécula clase II y la cadena invariante Ii son sintetizados en el retículo endoplásmico, donde ambas se une covalentemente, ésta complejo emigra al aparato de Golgi y en vesícula llega al endosoma (donde se encuentra el antígeno hidrolizado a péptido) y en presencia de ATP se da el desacople entre la molécula clase II y Ii, permitiendo que la molécula PBP 72/74 ensamble el péptido a la molécula clase II de novo síntesis o reciclada, para que finalmente en vesículas exócticas sea transportado el antígeno hasta la superficie celular y se lleve a cabo la presentación a linfocitos T cooperadores.

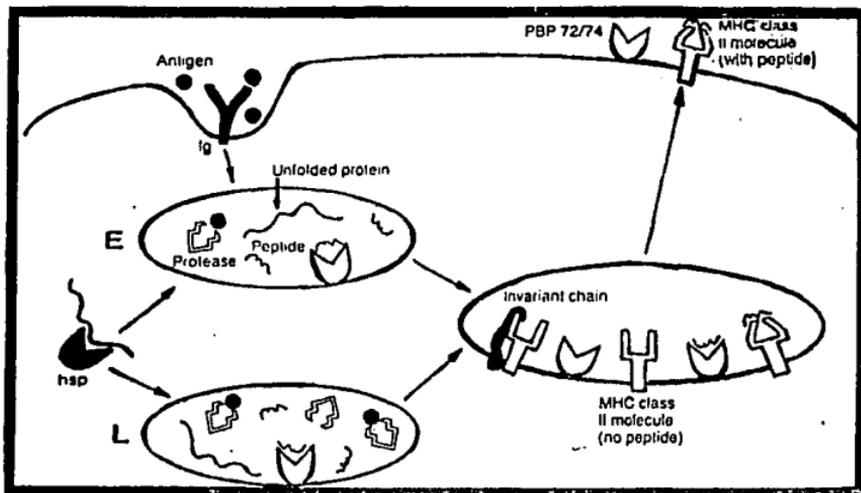


FIG. 25 LAS CHAPERONAS JUEGAN UN PAPEL IMPORTANTE EN EL PROCESAMIENTO DE ANTIGENO, POR EJEMPLO ACARRIEAN ANTIGENO PROCESADO, DE LOS ENDOSOMAS O LISOSOMAS HASTA EL COMPARTIMENTO QUE CONTIENE MHC CLASE II, O TAMBIEN ESTAN INVOLUCRADAS EN EL DESAMBLE DE LA CADENA INVARIANTE DE LAS CADENAS α -Y BETA DE LA MOLECULA CLASE II Y EN LA ASOCIACION DE LAS MOLECULAS CLASE II CON LOS PEPTIDOS. (DIANE C. ET AL, VIEWPOINT, 1992)

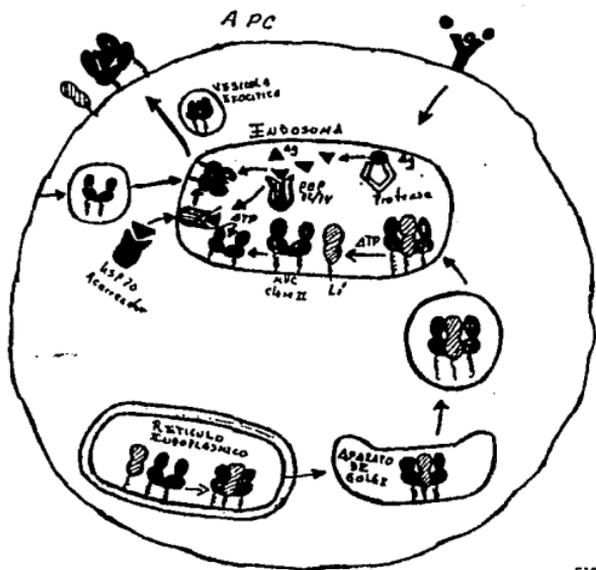


FIG. 26

FIG. 26 MODELO DE PROCESAMIENTO, ENSAMBLE Y PRESENTACION DE ANTIGENO EXOGENO POR MOLECULAS CLASE II.

LA MOLECULA CLASE II Y LA CADENA INVARIANTE II SON SINTETIZADAS EN EL RETICULO ENDOPLASMICO DONDE AMBOS SE UNEN COVALENTEMENTE, ESTE COMPLEJO EMIGRA AL APARATO DE GOLGI Y EN VESICULA LLEGA AL ENDOSOMA (DONDE SE ENCUENTRA EL ANTIGENO HIDROLIZADO A PEPTIDO) Y EN PRESENCIA DE ATP SE DA EL DESACOPLE ENTRE LA MOLECULA CLASE II Y Ii, PERMITIENDO QUE LA MOLECULA PBP 72/74 ENSAMBLE EL PEPTIDO A LA MOLECULA CLASE II DE NOVO SINTESI O RECICLADA, PARA QUE FINALMENTE EN VESICULAS EXCITICAS SEA TRANSPORTADO EL ANTIGENO HASTA LA SUPERFICIE CELULAR Y SE LLEVE A CABO LA PRESENTACION A LINFOCITOS T COOPERADORES.

CAPITULO 12.0

Presentación de antígeno.

Muchos linfocitos T inician la respuesta inmune a través del reconocimiento específico del antígeno, enlazado a las moléculas MHC tanto clase I como clase II, las cuales son altamente polimórficas. (66,67).

El potencial inmune de una célula T de manera individual depende del rango de antígeno derivado, que puede ser efectivamente enlazado a las moléculas MHC individuales y por la capacidad del conjunto de receptores (TCR) alfabeta y gammadelta (α β y γ δ) distribuidos clonalmente sobre los linfocitos T. Otro aspecto importante de los linfocitos T, es el de regular la actividad de otros linfocitos T, B y M ϕ . También se ha pensado que las células T son activadas a través de señales durante el contacto célula-célula, cuya observación ganó aceptación después de que se descubrió que los linfocitos T no reconocen antígeno en forma soluble sino solamente en conjunción con la molécula MHC y además se ha pensado que los linfocitos T, reconocen complejos (péptido-MHC) solamente cuando la molécula MHC es del mismo genotipo que el linfocito T. (68,69).

Existen dos tipos de linfocitos T los cuales pueden ser distinguidos, en base a su función y sus propiedades de reconocimiento. La mayoría de los linfocitos T citotóxicos y sus precursores reconocen antígeno en conjunción con moléculas MHC clase I. (68,69,70)

Los linfocitos T cooperadores reconocen antígeno principalmente en conjunción con moléculas MHC clase II, las cuales se encuentran principalmente sobre linfocitos B, M ϕ , células dendríticas y células cebadas entre otras. (68, 72, 73, 74, 75, 76).

Muchos timocitos inmaduros expresan receptores tales como CD4 y CD8, que al madurar, expresan solamente uno de los dos. Los linfocitos T que expresan CD4, reconocen moléculas clase II, mientras que, aquellos linfocitos que expresan CD8, reconocen moléculas clase I, Las cuales se encuentran en la mayoría de células somáticas. Aunque se cree que los receptores CD4 y CD8 incrementan la afinidad del receptor del linfocito T hacia clase II y clase I respectivamente, existen datos que sugieren que los receptores mencionados juegan un papel importante en cuanto al reconocimiento del MHC. (69, 71)

Se ha demostrado que la interacción específica de linfocitos T citotóxicos con sus células blanco, conducen al linfocito, a una masiva reorganización del citoesqueleto, generándose una rápida y coordinada reorientación del aparato de Golgi (AG) perinuclear, además del centro de microtúbulos organizados (MT-OC). Este movimiento descrito es para conducir vesículas derivadas de GA que contienen componentes de secreción de linfocinas y factores de crecimiento están involucrados en la interacción de linfocitos T y B y si se produce un acoplamiento celular específico ocurre similarmente una reorientación GA/MTOC, que puede también ser observado en la interacción linfocitos T cooperadores y linfocitos R. (68).

Se ha demostrado que el MTOC de los linfocitos T citotóxicos, se orientan hacia la zona de contactos. El MTOC se asocia con el aparato de Golgi el cual generalmente está involucrado en la secreción directa de componentes adociados a Golgi, éstos componentes pueden ser proteínas u otros componentes de membrana. No se conoce ahora si los componentes del linfocito T cototóxico responsable de la lisis, tales como la perforina, son liberados por un proceso de exocitosis granular. La orientacin específica del complejo Golgi, sugiere que tal exocitosis podría ocurrir en una fase polar, tal, que los componentes citotóxicos fueran depositados directamente sobre la superficie de la célula blanco. También se observo que una proteína submembranal denominada "talina" (la cual normalmente se encuentra dispersa en el linfocito T), se acumula por debajo del área de contacto, mientras que otras proteínas suomembranales tales como la vinculina y la alfa-actitina permanecen dispersas. Estos eventos ocurren rápidamente cuando se lleva a cabo la interacción entre linfocitos T citotóxicos y su célula blanco (menos de 30 minutos). se ha observado que la reorientación del MTOC pero no la redistribución de talina es dependiente de Ca^{2+} extracelular. (67,68).

El concepto de secreción polar es un atractivo efecto para considerar que tal efecto va acompañado de otras interacciones celulares. Además se ha pensado que la misma reorientación del aparato de Golgi y el MTOC se puede observar en la célula T cooperadora. La talina pero no otras proteínas del citosqueleto se concentran en el linfocito T cooperador bajo el área donde las células se ponen en contacto. (67,68).

Se ha reportado la formación de un acoplamiento celular 1.1 de tipo no específico, frecuentemente esos acoplamientos, parecen interactuar sobre una área superficial menos extensa, y el MTOC permanece casualmente orientada con respecto al área de enlace célula-célula. (68).

El papel de la célula presentadora de antígeno en la activación de linfocitos T es compleja y poco entendida. Un número de funciones y formas de APCs, han sido descritas en años recientes que contribuyen a la activación de linfocitos T, al igual que moléculas accesorias tales como L3T4, LFA-1, CD2 e ICAM-1 y un segundo grupo de moléculas no específicas importantes para APCs, las cuales son, interleucinas -1, y se sabe que interactúan con receptores sobre linfocitos T. En cuanto a las moléculas accesorias ya descritas se ha sugerido que el puentec se dá entre CD2-LFA3 y LFA-1 - ICAM-1. (18,77,78,79) (ver fig. 27)

Dándose así la presentación de antígeno por APCs y finalmente la generación de anticuerpos simultáneamente proliferación y diferenciación celular. (76)

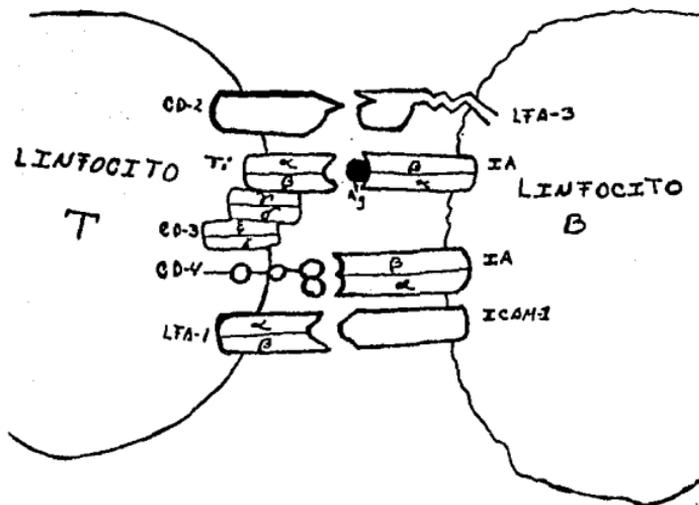


FIG. 27

FIG. 27 MUESTRA EL FENOMENO DE PRESENTACION DE ANTIGENO POR LAS MOLECULAS IA DEL LINFOCITO B A MOLECULA TI Y CD4 DEL LINFOCITO T, Y MOLECULAS ACCESORIAS TALES COMO CD2, LFA-1 EN LT, ICAM Y LFA-3.

CONCLUSIONES

En los últimos años se ha demostrado que el MHC no solamente codifica moléculas que presentan antígenos procesados a linfocitos T, sino que también, en la misma molécula se han encontrado genes que codifican proteosomas, moléculas hsp-70, moléculas transportadoras de los péptidos inmunogénicos, complemento, colágena, factor de necrosis tumoral entre otras, que actúan en el procesamiento, ensamble y presentación de antígeno.

Para que se lleve a cabo el procesamiento de antígeno por APCs es necesario que existan las condiciones óptimas, tales como: temperatura de 37°C, un pH de 5.0, enzimas proteolíticas, y ATP. Dicha degradación se ha demostrado que se lleva a cabo en un tiempo de 45 a 60 minutos, para posteriormente se dé la presentación a linfocitos T, ya sea cooperador en caso de que el antígeno sea exógeno o citotóxico en caso de que el antígeno sea endógeno.

Se ha definido a los proteosomas como candidatos para generar péptidos inmunogénicos, los cuáles son transportados hasta el retículo endoplásmico mediante péptidos transportadores, de éstos, se ha postulado que existen varios, y estos son: los complejos LMP, mtp, moléculas HAM y complejo ABC. De éste último existe información que los definen como el principal acarreador de los péptidos, pero algunos investigadores han encontrado moléculas denominadas chaperonas (Bip) y PBP 72/74, de las cuales piensan que actúan como acarreadoras. De molécula PBP 72/74 se piensa que además de acarreadora cataliza la disociación de la molécula MHC clase II y la cadena invariante Ii.

Además se piensa que ésta molécula estabiliza a la molécula clase II en el retículo endoplásmico e impide la unión de los péptidos endógenos.

Aún existe mucha incertidumbre en cuanto al mecanismo de ensamble entre la molécula MHC clase I y clase II con el péptido inmunogénico.

A través de la información recopilada, he propuesto dos mecanismos de procesamiento, ensamble y presentación de antígeno, uno que denota el procesamiento de un antígeno endógeno y ensamble a moléculas clase I y el otro que denota el procesamiento de un antígeno exógeno y ensamble a moléculas clase II.

En cuanto a la presentación de antígeno por APCs a linfocitos T se da mediante un punteo entre las moléculas CD2 y LFA-1 del linfocito T con las moléculas LFA-3 e ICAM-1 de las APCs, respectivamente. Aunado a lo anterior la acción de interleucinas es importante para que la presentación de antígeno sea más eficiente.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- JAN KLEIN J. Immunology the science of self-nonsel self discrimination, Ed. A. Wiley interscience publication. 3ra edic. pp 270 - 309, 1982.
- 2.- KOURISKY P. y CLAVERIE J.M. MHC-antigen interaction:What does the T cell receptor see?, *Advances in immunology*, 45: 107 - 127, 1989.
- 3.- HUNNKAPILLER T. y HOOD L. Diversity of the immunoglobulin genes superfamily, *Advances in immunology*, 44:14 - 25 1988.
- 4.- RORT I. Essential immunology, Edic. ofices, 7ma. edic. pp 51 - 56, 1990.
- 5.- RASHAM P. A profitable lesson in heresy, *Nature*, 340 426 - 428, 1989.
- 6.- KELLY A.P. MONACO J.J. et. al. A new human HLA class II related locus, DM., *Nature*, 353:571 - 573, 1991.
- 7.- CHO S. ATTAYA M. et. al. New class II-like genes in the murine MHC. *Nature*, 353:573 - 576, 1991.
- 8.- ROCHE P.A., MARKS M. S. et. al. Formation glicoproteins and the invariant chain. *Nature*, 354:392 - 394, 1991.
- 9.- EYLSTRA M. BUX MARK et. al. B1-microglobulin deficient mice lack CD4⁺ cytolytic T cells. *Nature*, 344:742 - 476 1990.
- 10.- FALK K. TORZSCHKE O. et. al. Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*, 348:248 - 251, 1990.

- 11.- ORTIZ. O. L. *Immunologia*, Ed. Interamericana 1a. ed pp. 70 - 76, Méx. D:F. 1987.
- 12.- RASK L., KRISTIN J. A. et. al. The structure of human MHC class II genes, *Autoimmunity*, 8;237 - 244, 1987.
- 13.- HERNANDEZ J.J. et. al. *Bioquímica e Immunología*, Ed fac. med. UNAM 1ª ed. col II, pp 526 - 530, Méx., D:F. 1988.
- 14.- TROWSDALE J. RAGOISSIS J. et. al. Map of the human MHC. *Immunol. today*, 12(12): 443 - 446, 1981.
- 15.- DEVERSON E.V., GOW I.R. et.al. MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporter. *Nature*, 348:738-741, 1990.
- 16.- BROWN M.G., DRISCOLL J. et. al. Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature*, 353:355-571, 1991.
- 17.- WERSS S. y BOGEN BJARNE. MHC class II-restricted presentation of intracellular antigen. *Cell*, 64:767-776, 1991.
- 18.- LOTTEAU V., TEYTON L. et. al. Intracellular transport of class II, MHC molecules directed by invariant chain. *Nature*, 348:600-605, 1990.
- 19.- VITETTA E.S., FDEZ.B.R. et. al. Cellular interaction in the humoral immune response. *Advances in immunology*, 455-25, 1989.

- 20.- GREY H.M. y CHESNUT R. Antigen processing and presentation to cell T.
Immunol. today,6(3):101,1985.
- 21.- KOSCO H.H., SZAKAL A.K. et. al. In vivo obtained antigen presented by
germinal center B cells to cells in vivo.
J.Immunol,140(2):354-360,1988.
- 22.- VENDER POWWK., TEUNISSEN M.B.M. et. al. The selective antige presenting
cell capacity of activated B lymphocytes
in HLA-II Immunol. 68:147-153,1989.
- 23.- CHAIN B.J., KAYET P.M. et. al. The biochemistry and cell biology of
antigen processing. Immunol. reviews,106:33-
35,1988.
- 24.- DALMONTE P. y SZOKA F.C. Effect of liposome encapsulation on antigen
presentation in vivo. J. Immunol.142:1437-
43,1989.
- 25.- COLON S.M., GREY H.M. et. al. Diferent antigen-presenting cel differ in
their capacity to induce lymphokines production
and proliferation of an apo-cytochrome C-specific
T cell clone. J. Immunol.135:984-994,1985.
- 26.- KRIEGER J., JENIS D.M. et. al. Studies on the capacity of cells and
purified Ia from different B cells sources to
function in antigen presentation to T cells.
J. Immunol.140(2):388-394,1988.
- 27.- BLOOM B.R., SALGAME P. et. al. Revisiting and revising suppressor T
cells. Immunol. today,13(4):130-135,1992.

- 28.- CHESNUT R.W., COLON S.M. et. al. Requiriments for the processin of antigens by antigen-presenting cells. J. Immunol 129:2382-87,1982.
- 29.- BANOVAČ. K., NEYLAN A. et. al. Are the mast cells antigen presenting cells?. Immunol. Investigation,18(7):901-906,1989.
- 30.- TEW J.G., KOSCO M.H. et. al. The alternative antigen pathway. Immunol. today,10(7):229-231,1989.
- 31.- LLENO DOUGLAS y ABBAS ABUL K. et. al. Antigenpresentation by haptenspecific B lymphocytes. J. Immunol. 139(8):2562-66,1987.
- 32.- CHESNUT R.W., COLON S.M. et. al. Antigen presentation by normal B cells, B cells tumors and macrophages;functional and biochemical comparison. J. Immunol., 128:1764-1768,1982.
- 33.- ASHWELL J.D. Are B lymphocytes the principal antigen-presenting cells in vivo?. J. Immunol.140(11)3697-3700,1988.
- 34.- STOCKINGER B. Antigen uptake and presentation annual report. Basel institute for immunology 57-58,1990.
- 35.- YOSHIKAWA M., WATANABE M. et. al. Analysis of proteolytic processing during specific antigen presentation. Cell Immunol,110:431-435,1987.
- 36.- MOINGOON P., CHING CH.H. et. al. The structural biology of CD2. Immunol. reviews,111:111-145,1989.

- 37.- DIMENT S. and STAHL P. Macrophages endosomes contain protease which degrade endocytosed protein ligand. J. Biol. Chemistry, 260(28):15311-17, 1985.
- 38.- MC COY K.L. y SCHWARTZ R.H. et. al. The role of intracellular acidification in antigen processing. Immunol. reviews, 106:129-147, 1988.
- 39.- ALLEN P.M. Antigen processing at the molecular level. Immunol. today review, 8(9):270-273, 1987.
- 40.- BERZOFKY J.A., BROTTES.J. et. al. Antigen processing for presentation to T lymphocytes. function, mechanisms and implication for the T-cell repertoire. Immunol. reviews, 106:1-31, 1988.
- 41.- BERZOFKY J.A., CEASE K.B. et. al. protein antigenic structures recognized by T cells: Potential applications to vaccine design. Immunol. reviews, 98:9-21, 1987.
- 42.- GAL S. and GOTTESMAN M.M. The major excreted protein of transformed fibroblast is an activatable acid-protease. J. Biol. Chem, 261:1760-63, 1989.
- 43.- DIMENT S., LEECH M.S. et. al. Characterisation of endosomal cathepsin D. J. Cell biochem, 12b:277, 1988.
- 44.- ORTIZ N.V., SEELIG A. et. al. Subunit of the "20s" proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. Nature, 353:662-664, 1991.

- 45.- KELLY A. POWIS S.H. et. al. Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature*, 353:667-668,1991.
- 46.- GLYNNE R., POWIS S.H. et. al. A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the region of the human MHC. *Nature*, 353:357-360,1991.
- 47.- MARTINEZ C. K. and MONACO J.J. Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. *Nature*, 353:664-666,1991.
- 48.- ROFF C., FUCHS R. et. al. Chinese hamster ovary cell mutants with temperature-sensitive defects in endocytosis. I loss of function on shifting to the non-permissive temperature. *J. Cell. Biol.*, 103:2283,1986.
- 49.- BUUS S. y WERDOLIN O. Large but not small, antigen require time and temperature-depen processing in accessory cells before they can be recognized by T cells. *acta.path. microbiol. immunol. scand sect.* 94:1724,1986.
- 50.- CHESNUT R.W., COLON S.M. al. Requirement for the processing by antigen-presenting B cells. *J. Immunol.*, 129(8):2382-2387,1982.
- 51.- ZIEGLER K. y UNANUE E.R. Identification of a macrophage antigen-processing event required for I-region restricted antigen presentation to T lymphocytes. *J. Immunol.*, 127:1869-75,1981.

- 52.- WALDEN P., NASY Z.A. et. al. Induction of regulatory T-lymphocyte responses by liposomes carrying major histocompatibility complex molecules and foreign antigen. *Nature*, 315:327-333, 1985.
- 53.- BUUS S., SETTE A. et. al. The relation between major histocompatibility complex molecules restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. *Science*, 235:1353-1358, 1987.
- 54.- HEBER-KATZ E., HAUSBURG D. et. al. The Ia molecules of the antigen presenting cell plays a critical role in immune response gene regulation of T cell activation. *J. MOL. cell. immunol.*, 1:3-6, 1983.
- 55.- PARHAM. Transporter of delight. *Nature*, 348:674-675, 1990.
- 56.- ROBERTSON M. Proteosomes in the pathway. *Nature*, 353:300-301, 1991.
- 57.- DOBBERSTEIN B. Who needs peptides transporters? *Nature*, 355:109-110, 1992.
- 58.- FLYNN C. G., POHL J. et. al. peptide-binding specificity of the molecular chaperone Bip, *Nature*, 353:726-730, 1991.
- 59.- LEVY F., GABATHULER R. et. al. ATP is required for in vitro assembly of MHC class I antigens but not for transfer of peptides across the E.R. membrane. *cell*, 67:265-274, 1991.
- 60.- RONALD N.G. The second class story. *Nature*, 353:605-607, 1991.
- 61.- PARHAM P. Some savage cuts in defence. *Nature* 344:709-710, 1990.

- 62.- HARDING C.V., UNANUE E.R. et. al. Functional and ultrastructural evidence for intracellular formation of major histocompatibility complex class II-peptide complex during antigen processing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:5553-57,1990.
- 63.- DENAGEL D.C. y PIERCE S.K. et. al. A case for chaperones in antigen processing. Viewpoint, 1992.
- 64.- SADEGH.N.S. y RONALD N.G. et. al. How MHC class II molecules work:peptide-dependent completion of the protein folding, immunol. today, 13(2):43-46, 1992.
- 65.- HAMMERLING G.J., y MORENO J. et. al. The function of the invariant chain in antigen presentation by MHC class II molecules. immunol. today, 11(10):203-205, 1990.
- 66.- STRECHER H.Z., BERKOWER I.J. et. al. Antigen conformation determines processing requirements for T cell activation. Proc Natl. Acad. Sci.USA, 81: 6831-6835,1984.
- 67.- RONALD N. Making a molecular match. Nature, 344:19-21,1990.
- 68.- KUPFER A., SHEIN S.L. et. al. The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. immunol., 83:6080-6083,1986.
- 69.- JANNEYAY CH.A. Accessories or receptors?. Nature, 325:208-210,1988.

- 70.- VANBLEEK G.M. y NATHENSON S.G. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2K molecules. *Nature*, 348:213-216, 1990.
- 71.- BOTTOMLY K. y JANEWAY CH.A. Antigen presentation by B cells. *Nature*, 337:2-4, 1989.
- 72.- CASSELIN E.J., HAUS P.T. et. al. Characterization of antigen processing and presentation by resting B lymphocytes. *J. Immunol.*, 140:1409-1413, 1988.
- 73.- OZAKI S. y BERZOPSKY J.A. et. al. Antibody conjugates mimic specific B cell presentation of antigen: Relationship between T and B cell specificity. *J. Immunol.*, 138:4133-4142, 1987.
- 74.- MICHALEK M.T., BENACERRET B. et. al. Two genetically identical antigens presenting cell clones display heterogeneity in antigen processing. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 86:3316-20, 1989.
- 75.- MELLINS E., ARF B. et. al. A single amino acid substitution in the human histocompatibility leukocyte antigen DR3 B-chain selective alters antigen presentation. *J. Exp. Med.*, 168:1531-1537, 1988.
- 76.- WHALEN B.J., HAUS P.T. et. al. Characterization of the effector mechanism of help for antigen presenting and bystander resting B cell growth mediated by Ia-restricted th2 helper T cell lines. *J. Immunol.*, 141(7):2230-2239, 1988.

- 77.- SWAIN S. y DUTTON R.W. Consequences of the direct interaction of helper T cells with B cells presenting antigen. Immunol review, 99:263-280,1987.
- 78.- ASHWELL J. D., JENKINS M.R. et. al. Effect of gamma radiation on resting B lymphocytes. J. Immunol., 141(8):2536-44 1988.
- 79.- WEAVER C.T. y UNANUE E.R. T cell induction of membrane IL-1 on macrophages. J. Immunol., 137:3868-73,1986.