

7
2j

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

**INTERACCION DE CD28-B7 Y MOLECULAS ASOCIADAS
EN LA ACTIVACION DE LINFOCITOS T**

**TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICO BIOLOGA
P R E S E N T A
LYDIA EVA ALVARADO RODRIGUEZ**

MEXICO D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**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 esta 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.

Jurado Asignado:

Presidente Prof. HOMERO HERNANDEZ MONTES

Vocal Prof. FERNANDO GARCIA TAMAYO

Secretario Prof. JORGE FERNANDO PANIAGUA SOLIS

1er. suplente Prof. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

2do. suplente Prof. ROSANA PELAYO CAMACHO

Síto donde se desarrolló el tema: Diversas bibliotecas.

Asesor: Dr. Jorge Fernando Paniagua Solís



Sustentante: Alvarado Rodríguez Lydia Eva



**Este trabajo se lo dedico especialmente a mis padres,
a mi Mashi
y a todos aquellos para quienes es importante este logro.**

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	1
I. ESTRUCTURA Y EXPRESIÓN	7
Familia de receptores CD28	7
Familia B7	13
II. MECANISMOS DE SEÑALIZACION	20
III. FUNCION	37
Proliferación, producción de citocinas y otros	37
Diferenciación de subtipos Th1/Th2	43
Función de CTLA-4	55
IV. CONSECUENCIAS INMUNOLOGICAS	60
Anergia	60
Inmunidad tumoral específica	78

V.RELACION TERAPIA/ENFERMEDAD	88
 Inmunosupresión	88
 Inmunoestimulación	95
REFERENCIAS	101
ABREVIATURAS	122
VOCABULARIO	125

INTRODUCCIÓN

Una vez que los linfocitos T del timo son competentes para responder a un antígeno específico y entran en la circulación periférica y en los tejidos linfoides, son capaces de participar tanto en eventos antígeno-específicos como no específicos. (1-3). La activación antígeno-específica de linfocitos T requiere de la interacción de los linfocitos T con células especializadas presentadoras de antígeno (APC) (4-9). Dependiendo del microambiente en el cual la respuesta inmune es iniciada, distintas poblaciones celulares sirven como APC. En la sangre periférica, por ejemplo, las células dendríticas, los linfocitos B activados y los monocitos pueden presentar antígenos, mientras que en la piel, los queratinocitos y las células de Langerhans tienen esta función. Ya que la función principal tanto de las células dendríticas de la sangre periférica, como de los linfocitos B activados, y de los macrófagos activados es la de procesar y presentar el antígeno, estas células se denominan APC profesionales.(4,6,7,10,11). Otras células como las del endotelio pueden presentar antígenos bajo ciertas condiciones, denominándose APC no profesionales. (12-14).

Se requieren de tres etapas distintas en la interacción célula-célula entre las APC y los linfocitos T para inducir la respuesta inmune antígeno-específica. (Fig 1). En el proceso denominado **adhesión** las APC y los linfocitos T interaccionan de manera aleatoria en la circulación y en los tejidos linfoides a través de los ligandos expresados en la superficie celular y sus receptores. (15-18).

Estos ligandos y sus receptores, denominados moléculas de adhesión, pueden estar restringidos a ciertos tipos celulares (ej. LFA-3 en APC y su receptor CD2 en los linfocitos T) o, de manera alternativa, pueden presentarse de forma bidireccional (ej. ICAM-1 en APC puede unirse a su receptor LFA-1 en linfocitos T e ICAM-1 en linfocitos T puede unirse a LFA-1 en APC). (16,17). La progresión a la siguiente etapa, denominada **reconocimiento**, ocurre solo si las APC pueden procesar, transportar, y presentar la cantidad suficiente del antígeno peptídico específico en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). (8,19-23) El complejo MHC-antígeno podrá entonces ser reconocido por el linfocito T a través del complejo receptor del linfocito T (TCR) (20,23,24). Dependiendo de la naturaleza y de la fuente del antígeno peptídico, los péptidos endógenos (ej. derivados de las proteínas intracelulares) son generalmente presentados a los linfocitos T unidos a las moléculas de superficie clase I del MHC (HLA-A, B, o C), mientras que los péptidos antigénicos exógenos procesados (ej. derivados de proteínas circulantes) son generalmente presentados cuando están unidos a las moléculas de superficie celular clase II del MHC (HLA-DR, DP, o DQ). (8,19-31) Aunque hay un complejo común TCR/CD3, son necesarias ciertas estructuras específicas para su reconocimiento por los linfocitos T que les permitan interactuar con las APC clase I o con las clase II MHC. Los antígenos asociados con las moléculas clase I MHC son reconocidos por el complejo TCR/CD3 asociado a la molécula CD8, mientras que el reconocimiento de antígenos asociados a clase II requiere de la presencia de CD4. (32,33). Esta interacción antígeno-específica restringida por el MHC inicia los eventos de transducción de señales intracelulares complejas. (24,34-38).

Después de la unión (ej. unión y entrecruzamiento) del TCR con el complejo MHC-antígeno, los linfocitos T son capaces de responder a señales secundarias potenciales, denominadas coestimuladoras. (4,5,39,40,57,58,60). Las moléculas coestimuladoras aportan a los linfocitos T señales adicionales que inician y conservan la proliferación (5,39). La coestimulación por algunos ligandos produce citocinas que pueden ser detectadas solamente a nivel de mRNA, mientras que otros ligandos coestimuladores son capaces de inducir una secreción significativa e incluso la acumulación de la citocina. (41-46) (Fig 1). Algunas moléculas coestimuladoras parecen estar expresadas en todas las APC profesionales, mientras que otras están restringidas a ciertas líneas celulares. Existe cada vez mayor evidencia que muestra que algunas moléculas consideradas anteriormente dentro de las moléculas de adhesión son también capaces de dar señales coestimuladoras (ej. LFA-3, LFA-1, e ICAM-1). (5,17,18,47-52)

La transducción de señales a través del TCR es necesaria pero no suficiente para inducir la activación antígeno-específica de los linfocitos T y la secreción de citocinas (53,54). Tanto en los sistemas murinos como en humanos, la transducción de señales antígeno-específica a través del TCR induce un estado parcialmente activado que es insuficiente para inducir la proliferación y la función efectora. (4,59,53,54). Esta primera señal se denomina señal 1, y es, tanto antígeno-específica como restringida por el MHC. La señal 2, no es antígeno-específica ni restringida por MHC, pero es necesaria tanto para la inducción de la secreción de las citocinas, como para la proliferación celular, y la función efectora. (4,5,39).

La característica crítica de esta segunda señal coestimuladora fue propuesta originalmente por Bretscher y Cohn. (40). El modelo de las dos señales, y fué ampliado por Jenkins y Schwartz, (53-55), sugiriendo que tanto la señal a través del TCR como la coestimuladora son esenciales para la expansión clonal, la secreción de linfocinas, y la función efectora de los linfocitos T. Si la señal 2 no se da, los linfocitos T caen en un estado de no respuesta antígeno-específica a largo plazo, denominado anergia. (4,53-55,59). Una característica de este estado es la incapacidad de los linfocitos T anérgicos para secretar interleucina-2 (IL-2), aunque retienen su capacidad para proliferar en la presencia de IL-2 exógena. (5,53,54,56,59). (Fig.2).

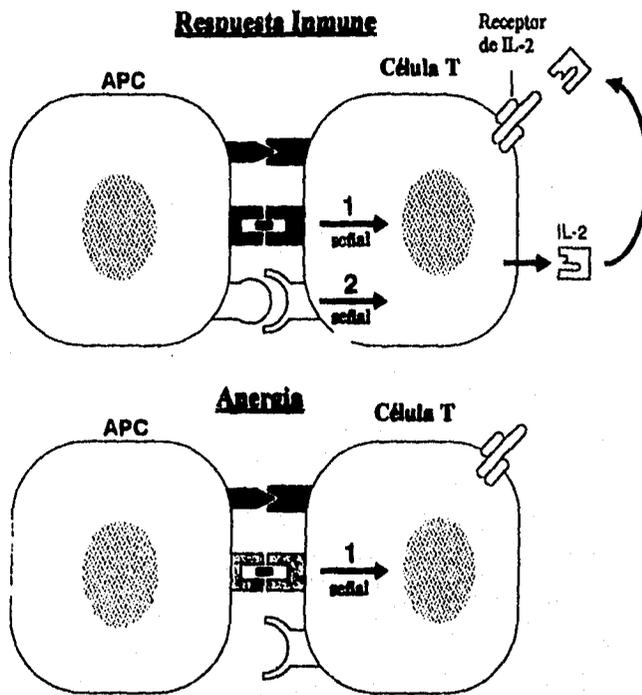


Fig. 2 La mitad superior de la figura muestra la presentación del antígeno por una APC profesional al linfocito T. Una vez que la señal 1 así como la señal 2 se han dado, ocurre la secreción de IL-2 y la sobre-regulación de la transducción de señales a través del RIL-2. La mitad inferior de la figura muestra la presentación del mismo antígeno por una APC que carece de ligandos de costimulación. Como únicamente se da la señal 1, hay una acumulación significativa de IL-2; así como la sobre-regulación y no ocurre la transducción de señales a través del RIL-2, generando anergia antígeno-específica. (Tomado de Guinan, E.C. 1994. *Blood* 84:3261.)

I. ESTRUCTURA Y EXPRESIÓN

Familia de receptores CD28

Hasta la fecha se han descrito dos miembros de la familia del gen CD28, estos son CD28 y CTLA-4. Estos muestran una semejanza de 31% a nivel de su secuencia de aminoácidos (Tabla 1), y ambos contienen un dominio extracelular relacionado con IgV, un dominio transmembranal y un dominio intracelular corto pero altamente conservado (Fig. 3). Los dominios citoplásmicos codificados por ambos genes están formados por un sitio de consenso de unión a la cinasa de fosoinositol 3 (PI 3-cinasa). Los dos genes tienen cuatro estructuras exón/intrón similares, organizadas por dominios funcionales (61) y colocalizan en la banda q33-q34 (62) del cromosoma humano 2, y en la banda C del cromosoma 1 de ratón, sugiriendo que estos receptores surgieron por duplicación genética.(63,64)

El receptor CD28 es una glucoproteína homodimérica de 90 kDa expresada en el 95% de la superficie de CD4⁺ y en el 50% de los linfocitos T humanos de la sangre periférica, así como en todos los linfocitos T murinos. Aún más, su expresión puede ser aumentada entre cuatro y ocho veces con tratamiento con activadores policlonales como el acetato de forbol miristato (PMA), o con anticuerpos anti-CD3. En cuanto a la expresión de CD28 en las células del timo murino se sabe que es compleja.

TABLA 1
Conservación entre los miembros de las familias de receptores B7 y CD28

Receptor	Conservación (% de semejanza en su estructura primaria)					
	Total	Señal	Ig-V	Ig-C	Dt	Citoplásmico
hCD28						
mCD28	69	72	66		67	80
rCD28	70	67	68		67	83
cCD28	50	44	52		48	61
hCTLA-4						
mCTLA-4	74	65	67		83	100
hCD28	31	16	30		42	34
mCD28	27	16	27		42	26
hB7-1						
mB7-1	45	24	46	59	20	23
hB7-2	25	17	24	34	23	6
mB7-2	23	9	30	24	21	8
hB7-2						
mB7-2	50	56	66	59	17	10

h, humano; m, ratón; r, rata; c, pollo; Ig-V, dominio variable; Ig-C, dominio constante; Dt, dominio transmembranal. (Tomado de June, C.H. 1994. *Immunol. Today* 15:321.)

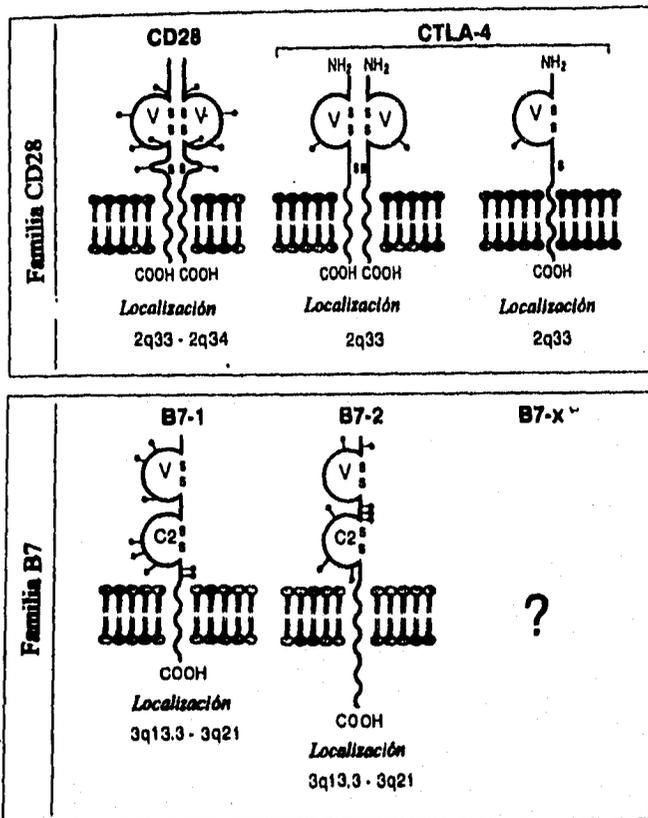


Fig. 3. La figura superior muestra esquemas para la predicción de las estructuras de CD28 y CTLA-4. Mientras que CD28 es un homodímero, el CTLA-4 aparece como homodímero y como monómero. En la figura inferior se muestran las predicciones para las estructuras de los miembros de la familia B7. Existe evidencia que sugiere que existen receptores adicionales (B7-x) para CD28/CTLA-4. Sin embargo, se omiten porque sus genes no han sido aún clonados. (Tomado de Quinan, E.C. 1994, *Blood* 84:326.)

Aún así se sabe que los niveles más altos son expresados en los timocitos $CD4^+CD8^+$ inmaduros, mientras que las células $CD4^+CD8^-$ más inmaduras y los timocitos aún más inmaduros $CD4^+CD8^-$ y $CD4^-CD8^+$ la expresan menos. El CD28 no se requiere para la maduración tímica de los linfocitos T, ya que el desarrollo de los linfocitos T es normal en los ratones CD28-deficientes (65). Originalmente se pensaba que este era un receptor específico de ciertas líneas celulares, pero ahora se sabe que está presente tanto en células plasmáticas como en algunas células NK. Una molécula genética y funcionalmente homóloga a CD28 está expresada en la superficie de los linfocitos de primate, ratón, rata y aves (60). El CD28 de pollo fue clonado recientemente y su secuencia de cDNA muestra una homología de 50% con el CD28 humano, y una identidad completa con el dominio extracelular, asociada a su función de ligando, así como la conservación completa de los *motifs* citoplasmáticos que se creen son importantes para la transducción de señales intracelulares (66)

La molécula CTLA-4 fue originalmente identificada como el cuarto cDNA más abundante durante una búsqueda de genes que se expresan específicamente en linfocitos T (CTLA-4 es una abreviación de "cytolytic T-lymphocyte-associated antigen"). De manera similar a CD28, CTLA-4 ha sido altamente conservado durante la evolución con una homología total mayor al 70% entre las proteínas humana y del ratón, y una conservación completa de los dominios citoplásmicos. El receptor CTLA-4 se expresa como monómeros o bien como dímeros unidos por puentes disulfuro, en los linfocitos de ratones (60) y en los humanos (60). No hay evidencia de receptores heterodiméricos entre CD28 y CTLA-4.

La expresión de CTLA-4 parece estar restringida a los linfocitos T activados, tanto CD4⁺ como CD8⁺ en muy bajos niveles. El mRNA de CD28 y CTLA-4 está coexpresado en células CD4⁺ y CD8⁺ activadas, y en casi todas las clonas de linfocitos T. En el humano la expresión del mRNA de CTLA-4 parece estar restringida al grupo de células CD28⁺ (67). En el ratón, el mRNA de CTLA-4 es detectado en linfocitos T activados, incluyendo a los linfocitos T CD8⁺ (68) y las clonas de T CD4⁺, de ambos subtipos Th1 y Th2. Existe información limitada de la expresión de CTLA-4 y actualmente se sugiere que la expresión de CTLA-4 en la superficie muestra un máximo después de tres días de activación. La coestimulación de CD28 incrementa la expresión del mRNA de CTLA-4 en los linfocitos activados por los anticuerpos anti-CD3, sugiriendo que las señales generadas por el antígeno y la coestimulación pueden regular la expresión genética de CTLA-4.(8) Los linfocitos T de ratones CD28^{-/-} expresan a la molécula CTLA-4 luego de ser estimulados con anti-CD3 combinado con IL-2 (69), aunque esta expresión no es de la misma magnitud que la observada en los controles de tipo silvestre.

El dominio citoplásmico evolutivamente conservado pero distinto de CTLA-4 y de CD28 sugiere funciones diferentes en la transducción de las señales. Aunque CTLA-4 tiene una organización genómica similar a CD28 y mapea para la misma banda cromosómica, se encontró que una proteína de fusión CTLA-4 que consta del dominio extracelular de CTLA-4 y el dominio Fc de IgG1 (CTLA-4Ig) se une con el correceptor CD28/CTLA-4, con una afinidad 20 veces mayor que una proteína similar formada por el dominio extracelular de CD28. Para aclarar la diferencia de afinidad hacia B7-1 entre ambas moléculas se identificaron regiones en CTLA4Ig por mutagénesis región-específica y homóloga (70).

Un *motif* constituido por el hexapéptido (MYPPPY) en la región determinante complementaria 3 (CDR-3) está altamente conservado tanto en CD28 como en CTLA-4, a pesar de que este *motif* es muy importante para su unión con B7-1, la mayor afinidad de CTLA4Ig está mediada por residuos no conservados en las regiones CDR-1 y CDR-3

Familia B7

En 1990 Linsley et al. identificaron a B7 como el receptor heterotípico de adhesión para CD28. Poco después estos mismos investigadores encontraron que B7 era el contrareceptor para ambos CTLA-4 y CD28. De manera análoga a los miembros de la familia de receptores CD28, existen múltiples ligandos. Más aún el B7 originalmente caracterizado y clonado (ahora llamado B7-1 y recientemente designado como CD80 en el Quinto Taller de Antígenos Leucocitarios de Diferenciación) puede no ser siquiera el ligando primario para CD28. B7-1 es una glucoproteína de 55-60 kDa que está conformada por seis exones y se localiza en la región q13.3-q21 del cromosoma 3 humano (71). Su homólogo murino fue clonado por Gross et al. 1990, este tiene una homología secuencial del 68%. Posteriormente la evidencia, aportada por Sharpe et al. quienes encontraron que los ratones genéticamente deficientes para el gene de B7-1 retenían la capacidad de unión de CTLA-4Ig (72,73), lo cual fue el principio de la identificación y caracterización de un segundo miembro de la familia B7.

Este miembro de la familia B7 ha sido identificado por varios grupos (74,75). Mediante secuenciación de nucleótidos se definió que B7-2 es una glucoproteína de 70kD (72,74), con 323 aminoácidos, compuesta de una señal N-terminal, un dominio extracelular de 223 aminoácidos, un dominio transmembranal de 23 aminoácidos, y un dominio citoplásmico de 61 aminoácidos. El dominio extracelular contiene ocho sitios para N-glicosilación y la región intracelular tiene tres sitios potenciales para la fosforilación de proteínas cinasas calcio-dependientes.

Este ligando se denominó B7-2 y posteriormente CD86. La evidencia actual basada en la unión diferencial de varios anticuerpos monoclonales anti-B7 y CTLA-4Ig, sugiere que existen miembros adicionales de la familia de B7 (B7-3) (76).

B7-1 y B7-2 son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF), y comprenden un dominio extracelular IgV (menos de 16% de homología) y un dominio Ig C1 (menos de 22% de homología). Utilizando la metodología de plegamiento inverso Bajorath et al.(77) intentaron comprobar la compatibilidad de la región extracelular con IgSF utilizando secuencias de estructuras tridimensionales accesibles. En estos cálculos, las secuencias del dominio N-terminal (V) en B7-1 y B7-2 no fueron compatibles con las estructuras conocidas, incluyendo el grupo de IgSFV. Por el contrario, las secuencias de los dominios C fueron compatibles con las estructuras del grupo IgSFC y fueron reconocidas por amplio margen como dominios de la β 2-microglobulina del clase I MHC .

En estudios recientes (78) se ha demostrado que el exon 3 que codifica para el dominio IgC es esencial para la unión CD28/CTLA-4. El análisis mutacional de B7 demostró el papel crítico de algunos aminoácidos cerca de las asas B-C, y, D-E, para la unión de CTLA-4/CD28. Esos aminoácidos están agrupados formando un sitio de unión exclusivo centrado en Y201. Una comparación de los efectos de algunas mutaciones en la unión de CD28 y CTLA-4 revelaron que ambos se unen a B7 en el mismo sitio. La tirosina de esta región está conservada entre los B7-1 y B7-2 humanos, y ha sido remplazada por fenilalanina en sus homólogos murinos. La comparación de la predicción de las secuencias de aminoácidos revelan que B7-1 está poco relacionado con B7-2 (homología menor al 25%), aunque se observan algunas similitudes estructurales (79).

Una búsqueda en la base de datos de la secuenciación de proteínas SWISS-PROT usando el programa FASTA indica que B7-2 es un miembro de una subfamilia de la IgSF. Las regiones del dominio extracelular de B7-2 son homólogas con una gran cantidad de moléculas, incluyendo: GAL-3 (lymphocyte activation gene 3); MAG (myelin-associated glycoprotein); TAG-1 (transient axonal glycoprotein), la cual es una molécula de adhesión que promueve el crecimiento de las neuritas; y la proteína axl/UFO, la cual tiene actividad de tirosin-cinasa. Se ha aislado el cDNA B7-2 de ratón, y se ha mostrado que está altamente relacionado a su homólogo humano. Esta homología está concentrada en los dominios Ig extracelulares, con poca similitud en los dominios citoplásmicos, sugiriendo que las proteínas B7 no tienen una función importante en la transducción de señales, y que su función primaria es como ligandos.

Originalmente se pensaba que B7-1 era un receptor expresado primordialmente en linfocitos B activados y que expresión era inducida por una variedad de estímulos entre los que se incluyen, el lipopolisacárido (80,81), el AMP cíclico (82), y por el entrecruzamiento de inmunoglobulinas de superficie (83), CD40 (74), o por moléculas MHC clase II (83,84). Estudios recientes indican que B7-1 y B7-2 también son expresados tanto en monocitos estimulados con IFN- γ , como en células dendríticas, células T, NK, (74) y timocitos (85,86). La inducción de B7-1 en los linfocitos B es relativamente lenta con un pico de inducción de entre 48-72 h después de la estimulación (83,87).

Algunas citocinas también tienen un papel importante en la expresión de B7. IL-2 e IL-4 aumentan la inducción de la expresión de B7-1 en linfocitos B de amígdalas estimulados con mitógenos, y recientemente se ha demostrado que el tratamiento de linfocitos T con IL-7 origina la inducción de la expresión de B7-1.

En contraste a B7-1, B7-2, es inducida rápidamente en linfocitos B no activados por el lipopolisacárido (72,81,88), por el AMP cíclico (81), la concavalina A (87), ó CD40 (74), o bien por entrecruzamiento de las inmunoglobulinas de superficie con un pico de expresión de 24 h. La rapidez de inducción de la expresión superficial de B7-2 puede ser explicada por el hecho de que el mRNA se expresa constitutivamente en los linfocitos B no activados. Esto puede permitir una expresión rápida de la proteína B7-2 en la superficie del linfocito B después de su activación, a partir del mRNA almacenado y que no es traducido en células no activadas, lo cual es fundamental, ya que los linfocitos T deben recibir señales de coestimulación de las células presentadoras de antígenos dentro de las primeras 12 h a partir de la estimulación del TCR para tener una producción máxima de IL-2 .

La rápida aparición de B7-2 en linfocitos B después de la activación sugiere que ésta es una molécula coestimuladora crítica usada por los linfocitos B para iniciar la producción de IL-2. Algunos aspectos de la función y expresión superficial de B7-2 permanecen sin ser aclarados. B7-1 y B7-2 también se inducen en linfocitos T estimulados por períodos prolongados con anti-CD3 más IL-2, aunque el nivel de expresión alcanzado es bajo (74).

Por lo que es posible que bajo ciertas condiciones, como lo son los pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) (89), los linfocitos T activados puedan ser capaces de coestimularse. Como B7-1, la expresión de B7-3 es inducida lentamente en linfocitos B después de la activación (83).

Aunque B7-1 y B7-2 son coexpresadas por linfocitos T y B normales, su expresión difiere en las células mieloides. Los monocitos de sangre periférica recientemente aislados expresan constitutivamente niveles significativos de B7-2, con pequeñas cantidades de B7-1 (74). El ligando más importante para CTLA-4 en linfocitos B es B7-2 (72,90)

Ahora se sabe que la familia B7 así como la CD28 se coexpresan tanto en los linfocitos T como en los linfocitos B, algunos casos que corroboran este hallazgo son, el reporte de que los linfocitos T transformados con el HTLV-1 expresan CD28, y ambos B7-1 y CTLA-4 (91,92). De manera similar las células tumorales de pacientes con micosis fungoide, un linfoma dermatotrófico de linfocitos T , coexpresan B7-1 y CD28 (93).

Recientemente algunos investigadores demostraron que los linfocitos T activados de manera crónica (94,95,96) y las células de mieloma (97) también expresan B7 y CD28. Adicionalmente, la coexpresión de B7-1 y B7-2 ha sido observada en linfocitos T activados (74). Mientras que la relevancia funcional de la coexpresión de la familia de receptores CD28 y B7 no ha sido descrita, existen varias explicaciones posibles para estos descubrimientos.

Es posible que la coexpresión CD28/B7 represente una forma de retroalimentación positiva para mantener la producción autocrina de linfocinas. De ser así, la coexpresión de estos receptores puede tener un papel de transformación celular. Alternativamente, los linfocitos T activados que expresan B7 pueden volverse, bajo ciertas circunstancias, células presentadoras de antígenos para otros linfocitos T. También es posible que la expresión de B7 en linfocitos T pueda representar una forma de retroalimentación negativa, funcionando como una señal de apagado en la respuesta inmune tardía.

Otro tema importante es la relevancia de la expresión de la familia del gen CD28 en timocitos. CD28 se expresa en timocitos humanos y de ratón, aunque existen algunas diferencias en el patrón de expresión (98,99). Hasta la fecha, la expresión tímica de CTLA-4 no ha sido estudiada. Las células reactivas B7-1 han sido observadas en secciones del timo humano (100), particularmente en timo neonatal (101). En el ratón, la expresión de B7 se detecta en la médula tímica tan tempranamente como desde el día 14 de la ontogenia (102) y está confinada al subgrupo de células epiteliales de la médula, las cuales no derivan de la médula ósea pero expresan moléculas clase II del MHC (103).

La función de CD28 de timocitos inmaduros permanece sin aclarar ya que la estimulación con anti-CD28 no resulta en producción de IL-2. Esto sugiere que el receptor CD28 de timocitos inmaduros no es funcional, o bien su vía de transducción de señales intracelulares difiere de la de los linfocitos T maduros.

Dado que ambas familias de receptores son expresadas en el timo, se ha propuesto un papel en la selección de los linfocitos T (104). Sin embargo, estudios *in vitro* usando CTLA4Ig para estudiar la selección tímica negativa en el ratón, no han sido consistentes con este papel para CD28/B7 (105,106,107). Además, la selección negativa, dada por la eliminación de linfocitos T autoreactivos que presentan determinantes *Mls* particulares, procede normalmente en ratones *knockout* de CD28 (65). Aún más, los ratones transgénicos que expresan B7-1 bajo el control del promotor proximal *lck* en timocitos presentan un desarrollo de timocitos normal. Este hecho ha sido retomado mediante estudios *in vitro* indicando, que consistentemente con la localización de la expresión medular de B7, CD28 puede tener un papel de selección negativa (103,108).

De hecho otros experimentos indican que el tratamiento con IL-7, la cual induce la expresión de B7-1 en linfocitos T (109) es abundantemente expresada en el timo donde *dirige* el rearreglo de los genes V(D)J en los linfocitos T (110), algunos otros apoyan un papel en la vía de coestimulación en el timo. El papel de la familia CD28 en la selección positiva todavía no ha sido comprobada experimentalmente. Por lo que si CD28 y/o CTLA-4 son integrales en el desarrollo tímico *in vivo* debe de ser aclarado.

II. MECANISMOS DE SEÑALIZACION

La unión del TCR con el complejo MHC-péptido, con anticuerpos polivalentes o con lectinas desencadena una cascada de eventos de transducción de señales intracelulares, que inicia la activación de factores nucleares y citoplásmicos, que son necesarios pero no suficientes para la transcripción del gen de IL-2 (Fig.4). Las cadenas variables α y β del TCR están asociadas en la membrana celular con las cadenas invariantes γ , δ y ϵ de CD3. También están asociadas con el complejo TCR-CD3 los homodímeros individuales compuestos de dos cadenas ζ o los heterodímeros compuestos de cadenas ζ y η . Otras proteínas incluyendo los correceptores CD4 y CD8 y la fosfatasa de tirosina unida al antígeno CD45, pueden asociarse con el complejo TCR-CD3 después de la activación. La unión del TCR estimula a las cinasas de tirosina citoplásmicas como, p59 ^{*lyn*} y p56 ^{*lck*}, las cuales están fuertemente asociadas a diferentes componentes del complejo TCR (CD3,CD4,CD8 y cadena ζ). Esta asociación se piensa que está mediada por una secuencia conservada, la cual corresponde al *motif* de activación de tirosina (111,112), el cual se repite tres veces en la cadena ζ y de manera única en las cadenas CD3 γ , δ y ϵ . La activación de las cinasas de tirosina citoplásmicas que pertenecen al grupo *src* (p56 ^{*lck*}, p59 ^{*lyn*}), inicia la fosforilación de un gran número de proteínas citoplásmicas incluyendo la cadena ζ (113), la fosfolipasa C- γ 1 (114), y la proteína vav (115). La fosforilación de residuos específicos de tirosina en la cadena ζ induce a la asociación de otra cinasa de tirosina llamada ZAP-70 encontrada tanto en linfocitos T como en células NK (111).

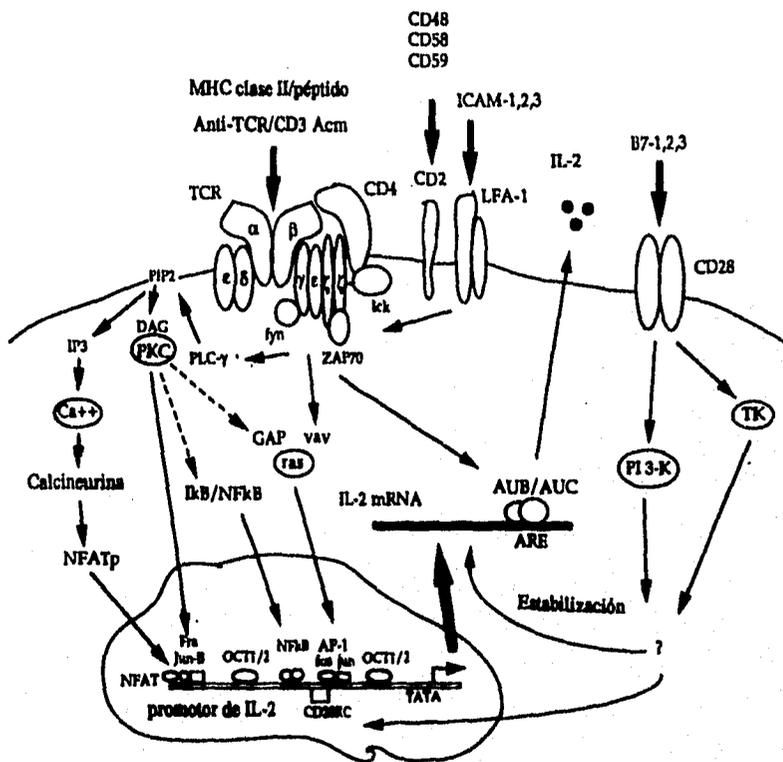


Fig. 4 Representación diagramática de la transducción de señales a través de TCR y CD28. Las flechas indican estimulación, las flechas entrecortadas indican inhibición. (Tomado de Mondino, A. 1994, *J. Lau. Bio.* 53:865.)

Se ha demostrado que la actividad de ZAP-70 contribuye a la transducción de señales del TCR. La fosforilación de la fosfolipasa C- γ 1 aumenta su actividad y causa la ruptura del fosfatidil-inositol difosfato (PIP₂), resultando en la generación de segundos mensajeros activos como el inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DGA) (39). El primero induce un aumento sustancial en el calcio intracelular, y el segundo activa a la proteína cinasa C (PKC). Estas dos señales de manera sinérgica inducen y activan la unión de factores al DNA requeridos para la transcripción del gen de IL-2 (39). El aumento del calcio intracelular activa a la calcineurina, una fosfatasa de serina/treonina, dependiente de calcio (116). Después de estos eventos, y a los 30 minutos después de la unión del complejo TCR/CD3 al MHC-péptido, aumentan los niveles del mRNA que codifican para cierto número de genes involucrados en la respuesta primaria de linfocitos T activados. Los productos de los genes de la respuesta primaria (117) son de vida corta, y algunos de ellos sirven como factores clave en la transcripción (118). En los linfocitos T, estos factores de transcripción se unen a los promotores de genes de linfocinas críticas, ej. IL-2, y modulan los eventos funcionales como la secreción de citocinas, la expresión de receptores de citocinas, y eventualmente, la proliferación celular (119,120). El grupo de factores de transcripción AP-1, el cual juega un papel fundamental en la activación del linfocito T (121,122), es una mezcla compleja de moléculas homodiméricas y heterodiméricas conformadas por productos de proteínas de las familias *fos* y *jun* (122,123,124). Hasta la fecha se conocen cuatro miembros de la familia *fos* (*c-fos*, *fosB*, *fra1*, y *fra2*) y tres miembros de la familia *jun* (*c-jun*, *junB*, y *junD*) (122,125).

En los linfocitos T los miembros de la familia AP-1 son críticos para la regulación de la expresión de IL-2 (119). Además de la unión de otros dos sitios de AP-1 con el promotor de IL-2, es necesaria la formación de las proteínas Jun y Fos para la formación del factor de transcripción específico para linfocitos T, NF-AT (factor nuclear de células T activadas (126,127).

Más aún, la unión disminuida de los dímeros Jun/Fos al promotor de IL-2 ha sido implicado en las bases moleculares de la anergia (128); y recientemente (129), la fosforilación de c-Jun por dos miembros de la familia de cinasas de proteína activadas por mitógeno, JNK1 y JNK2, han sido reportadas como la clave en la integración de señalización antes de la activación completa de los linfocitos T. Los inmunosupresores ciclosporina A (CsA) y FK506 se unen a proteínas citoplásmicas llamadas ciclofilina y FKBP, respectivamente (116). Estos complejos después se unen a la calcineurina inhibiendo su función, de esta manera previenen la formación del NF-AT y en consecuencia la expresión del gen de IL-2 (116).

En lo que respecta a la fosforilación de la tirosina de vav, ésta, activa la vía de transducción a través de la señal ras (p21), la cual se ha demostrado juega un papel fundamental en la diferenciación y proliferación de un gran número de sistemas, el mecanismo mediante el cual la superficie celular de T se une a la vía de p21^{ras}, ha sido materia de investigaciones recientes, se sabe que la unión del complejo antígeno-receptor con anticuerpos provoca la activación de p21^{ras} a través de su unión con GTP (130). La fosforilación de tirosina y la activación de el factor hematopoyético de intercambio de nucleótido de guanina (GEF) p95^{vav} es un paso posible (131).

Sin embargo, no se sabe si *vav* actúa como una forma GEF de $p21^{ras}$ (132), o como un miembro no identificado de la familia Rho (133,134). *Vav* comparte una similitud significativa en su secuencia (30%) con un *motif* de 250 aminoácidos de Dbl (dominio de homología Dbl[DH]) (131). Otra unión posible involucra la unión de la cadena ζ del TCR con SHC (135). En varios sistemas se conoce que SHC une a GRB-2 (136,137). Es probable que mediante este mecanismo se desencadene la inducción de proteínas codificadas por *c-fos* y *c-jun* (138), que se unen al DNA. La expresión de una forma activada de *ras* potencia la actividad del promotor para IL-2, mientras que la forma dominante negativa de *ras* inhibe en gran medida la actividad del promotor de IL-2 (139), demostrándose así la importancia de la vía *ras* ($p21$) para la expresión del gen IL-2 y por lo tanto para el control del crecimiento celular. La activación de *ras* puede ser inducida por esteres de forbol (PMA), sugiriendo un papel importante de la PKC.

Se ha sugerido que la fosforilación de la proteína activadora de GTP (GAP), o de las proteínas que regulan GAP, directamente por la PKC o por otra cinasa involucrada en la vía independiente de la PKC disminuyen la actividad de GAP, iniciando un incremento en el nivel de la actividad de la forma de *ras* asociada a GTP. (138). Finalmente, se ha demostrado que la señal de transducción mediada por el TCR causa la disociación del factor de transcripción NF- κ B del factor de inhibición I κ B, probablemente a través de la fosforilación dependiente de la PKC del I κ B. La activación-disociación inducida permite la translocación del NF- κ B al núcleo, donde se une a la secuencia blanco en el promotor del gen de IL-2. (39).

Otras secuencias críticas en el promotor se unen con un complejo formado por proteínas octaméricas (Oct-1, Oct-2, y OAP), muchas de las cuales parecen estar expresadas constitutivamente. Además de la regulación transcripcional por este complejo, las señales derivadas del TCR regulan la estabilidad del mRNA de diversas linfocinas. Este efecto parece ser mediado por factores inducibles que se unen al RNA y que se producen en el citoplasma de los linfocitos T después de la unión del TCR y cuya aparición correlaciona con una degradación rápida del RNA (140,141).

En contraste con la señalización mediada por el TCR, poco se conoce a cerca de la transducción de señales a través de CD28. Parece ser que CD28 activa un grupo muy diferente de segundos mensajeros que complementan a los activados por el TCR (Fig.4, Tabla 2). El hecho de que el TCR y CD28 activen segundos mensajeros distintos probablemente ocasionan la enorme sinergia funcional que existe entre estos receptores. La unión de CD28 a sus correspondientes anticuerpos anti-CD28, por sí solos, son incapaces de originar la proliferación de los linfocitos T purificados y no tiene efecto en la producción de linfocinas, a menos que simultáneamente el TCR esté asociado al complejo MHC-péptido(142-145). Por lo tanto, CD28 es un receptor coestimulador obligado. Los anticuerpos monoclonales anti-CD28 incrementan la síntesis de IL-2 y la proliferación de linfocitos T estimulados con anti-TCR o mitógenos, pero no incrementan la hidrólisis del fosfolípido de inositol ni sus consecuencias a menos que se usen en dosis en ordenes de magnitud mucho mayores a las requeridas para la coestimulación (144,146).

TABLA 2

Efectos de la unión del receptor CD28 en los eventos tempranos de transducción de señales

Respuesta	Estímulo	Observaciones
Fosforilación de tirosina	B7-1-CHO o Acm CD28	Incremento de la fosforilación de tirosina de substratos celulares en linfocitos T activados.
PLC γ 1	B7-1-CHO o Acm CD28	Fosforilación de la PLC γ 1 en linfocitos T activados.
Ca ²⁺	Acm CD28	No hay respuesta mediada por Ca ²⁺ en linfocitos T no activados. Aumento de niveles en células Jurkat. No hay sinergismo con la unión de TCR.
PI3	Acm CD28	Aparición de metabolitos de fosfatidilinositol bifosfato en células Jurkat o en linfocitos T activados.
PI 3-kinasa	B7-1-CHO o Acm CD28	Aparición de metabolitos de fosfatidilinositol trifosfato en células Jurkat. Asociación de CD28 con la subunidad p85 α de PI 3-kinasa en células Jurkat.
raf-1 cinasa	Acm CD28	Activación de la actividad de raf-1 cinasa en linfocitos T no activados.
cGMP	Acm CD28	Elevación de la concentración de cGMP en células Jurkat.
Canal de K ⁺	Acm CD28	Generación de una señal resistente a la caribdotoxina.
IL-2	Acm CD28	La señal generada es sinérgica con el pervandato en la inducción de la secreción de IL-2 por linfocitos T.

(Tomado de June, C.H. 1994. *Immunol. Today* 15:321.)

Curiosamente, la adición de PMA y anticuerpos anti-CD28 al medio de cultivo donde están suspendidos los linfocitos T en ausencia de la estimulación a través de TCR-MHC-péptido, induce la producción de IL-2 que es completamente resistente a la inhibición por CsA y ocurre sin incrementos detectables del calcio intracelular (144,145). Por lo tanto, de manera contraria a la señalización por el TCR, la señalización a través de CD28 es independiente de los incrementos de calcio intracelular o de la activación de calcineurina, cuando menos a cierto nivel. Ha sido demostrado que el entrecruzamiento de moléculas CD28 con anticuerpos, induce un patrón de fosforilación de tirosina que es distinto del patrón de fosforilación de tirosina mediado por el TCR. (147). La fosforilación de tirosina es necesaria probablemente para los efectos biológicos de CD28, porque la herbamicina A, un potente inhibidor de la cinasa de tirosina, previene la producción de IL-2 inducida por CD28 en los linfocitos T normales (147). Una vía alterna se ha encontrado al reportarse que la unión de CD28 con B7 induce la unión y actividad de la cinasa de 3-fosfoinositol (PI-3cinasa) en linfocitos T independientemente de la activación de TCR (148,149).

La PI-3cinasa está conformada por una subunidad de 85-kDa, la cual presenta dos isoformas (p85 α y p85 β), ambas están presentes en linfocitos T y una subunidad catalítica de 110-kDa que fosforila la posición 3' del anillo de inositol de los fosfolípidos del inositol (150), mientras que adiciones de fosfatos en D-1, D-4 y D-5 ocurren mediante la vía clásica. A diferencia de la vía clásica, en la cual el fosfatidilinositol 4,5-difosfato es escindido por la PLC, los productos de la PI 3-cinasa no son hidrolizados por ninguna fosfolipasa conocida.

De ahí, que es improbable que los productos de la PI 3-kinasa que contienen un fosfato en posición 3 tengan funciones de precursores de segundos mensajeros solubles en agua durante la transducción, y se cree que estos lípidos funcionan como lípidos *per se*. Por lo tanto las funciones de los productos del fosfoinositol D-3, de esta reacción, ej., fosfatidilinositol-(3,4,5)-fosfato, no son bien conocidas. Sin embargo, el hecho de que se producen después de su unión a varios receptores de factores de crecimiento (receptor de IL-2, PDGF-R, EGF-R, receptor de insulina) sugiere que son importantes para la proliferación celular. La unidad p85 de la PI 3-kinasa tiene dos dominios SH2 (región 2 de homología *scr*) se ha demostrado su papel de mediadores en la unión de PI 3-kinasa a las proteínas que contienen fosfotirosina, ya que presentan un *motif* consenso, YXXM. Esta asociación parece que es requerida para la activación de la PI 3-kinasa. Ha sido recientemente demostrado que los dominios SH2 de p85 reconocen el *motif* YMNM, de el dominio citoplásmico de CD28 (151) a través de Y191 (151). La estequiometría de asociación es alta ya que más del 25% de las moléculas de la PI 3-kinasa pueden ser encontradas en asociación con CD28 en diversas líneas celulares. Por lo tanto, aunque la fosforilación de tirosina de CD28 no ha sido demostrada, parece que ocurre a niveles bajos y es importante para la interacción entre CD28 y la PI 3-kinasa. La regulación de la PI 3-kinasa es compleja, y puede involucrar la fosforilación de serina en linfocitos T después de la estimulación del TCR (152) y la fosforilación de tirosina después de la unión de IL-2. Otra posible función es la de su unión con p21^{ras} (153,154), lo cual puede implicar la función de la PI 3-kinasa en la regulación de Ras. El papel de la PI 3-kinasa en la activación celular aún no está bien definido.

Sin embargo, el consenso derivado de múltiples estudios indica que la PI 3-quinasa puede activar un sistema esencial de segundos mensajeros que es independiente de la vía clásica que es iniciada por PLC. Hay evidencia que indica la importancia de la PI 3-quinasa en la señalización por TCR, la cual incluye la demostración de que la actividad transformante del virus del poliovirus mediante el antígeno de T es dependiente de la unión de PI 3-quinasa a p60 *c-src*. En células normales, la inducción del crecimiento a través de PDGFR requiere de la activación de PKC ζ no sensible a PMA (155). Por otra parte la evidencia de su importancia en la vía de transducción de señales mediada por CD28 está dada por los estudios de Ward et al. en los que se empleó un metabolito fúngico, wortmanina, el cual funciona como un inhibidor de la PI 3-quinasa, y se obtuvo la inhibición de la proliferación en linfocitos T, así como la producción de IL-2 (149). Las vías clásica y alternativa del metabolismo de los fosfolípidos de inositol generados por la acción de la PI 3-quinasa se muestran a continuación (Fig.5)

En estudios de Schneider et al. se encontró que el *motif* YMNM de CD28 involucrado en su unión con la PI 3-quinasa también es empleado en el reconocimiento de una proteína intracelular secundaria GRB-2, la cual es una proteína adaptadora que contiene un dominio SH2 y dos dominios SH3, los cuales se unen a residuos autofosforilados de receptores de cinasas (156-158), como en el caso de la PI 3-quinasa el entrecruzamiento inducido por anticuerpos de CD28 induce la unión dependiente del tiempo de GRB-2. De manera similar la mutación del residuo Y191 dentro del *motif* YMNM reduce la unión de GRB-2 en un 80% en células COS; sin embargo la inhibición no es completa, lo cual nos lleva a pensar que existen otras regiones en GRB-2, como el dominio SH3, que pueden mediar la unión.

$\text{PtdIns} \Leftrightarrow \text{PtdIns}4\text{P} \Leftrightarrow \text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2 \Leftrightarrow \text{DAG} + \text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$

↓ PI 3-cinasa ↓ PI 3-cinasa ↓ PI 3-cinasa

$\text{PtdIns}3\text{P} \Leftrightarrow \text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2 \Leftrightarrow \text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3 \Leftrightarrow ? \text{PKC}\zeta \text{ activa}$

Fig. 5. Abreviaturas: PI 3-cinasa, cinasa de 3-fosfoinositol; PtdIns, fosfatidilinositol; PLC, fosfolipasa C; DAG, diacilglicerol; Ins(1,4,5)P₃ inositol (1,4,5)-trifosfato.

(Tomado de June, C.H. 1994. *Immunol. Today* 15:321.)

Dos motivos de prolina en CD28 (residuos 197-200; 209-213) pueden servir como posibles sitios de unión con SH3, además se ha observado que esta unión es favorecida por la presencia de una asparagina (N) en la posición 2 del *motif* que contiene la fosfotirosina (159). Estudios de unión de péptidos muestran que el dominio SH2 de GRB-2 se une con el *motif* YMNM con una afinidad comparable a GRB-2/SHC, pero de 10 a 100 veces menos que CD28/PI 3-quinasa. A pesar de esto se ha demostrado que tanto el complejo GRB-2/CD28 como el PI 3-quinasa /CD28 coexisten en los linfocitos T periféricos. Finalmente se demostró a través de inmunoensayos (immunoblotting) que CD28 también se asocia con el producto del gen de humano homólogo del gen de *Drosophila son of sevenless* (SOS), el cual es un factor responsable de la conversión de p21^{ras} a su estado activo al intercambiar una molécula de GDP por una de GTP, para lo cual dicho factor forma un complejo de intercambio de nucleótido de guanina a través del dominio SH3 de GRB-2.

La asociación de CD28 con GRB/SOS, parece servir como una unión importante entre la superficie del linfocito T y p21^{ras} y por lo tanto juega un papel muy importante en su regulación y en la expresión de linfocinas mediadas por CD28 (160). p21^{ras} actúa como un eslabón central en la cascada que activa varios blancos como son la quinasa MAP-2 (ERK1,2) y la quinasa Jun (JNK). La unión de CD28 con GRB-2/SOS podría anclar a GRB-2/SOS a la membrana plasmática, de esta forma permitiendo su interacción con p21^{ras}, la cual está asociada a la membrana. Es más, la unión de CD28 puede activar p21^{ras} (161), la quinasa MAP (161,162), y JNK (129). La unión CD28/GRB-2/SOS puede iniciar una cascada que lleva a la secreción de IL-2. La activación de p21^{ras} por SOS se esperaría que iniciara la unión de Raf-1/p21^{ras}, la activación de la MEK, y la JNK.

Se ha demostrado que la fosforilación de *c-jun* por la JNK incrementa la actividad transcripcional del AP-1 (Jun/Jun y Jun/Fos). En el núcleo, Jun/Jun y Jun/Fos forman complejos trinéricos con el NF-AT, facilitando la unión y regulación de las secuencias regulatoras del gen de IL-2 (126,163). Consistentemente con esta interpretación está el hallazgo de que *p21^{ras}* es constitutivamente activa, activa la cinasa Jun e induce la secreción de IL-2 (139). Aunado al posible papel de *p21^{ras}* está el hecho de que el entrecruzamiento de CD28 lleva a un aumento en la expresión del mRNA de *c-jun*, con una activación mínima de la activación de *c-fos*. La inducción dependiente de CD28 de *c-jun* requiere la actividad de una proteína cinasa de tirosina, pero no depende de la activación a través de la proteína cinasa C que responde a ésteres de forbol o a la elevación del calcio citosólico. Más aún, el aumento del mRNA de *c-jun* dependiente de CD28 no parece estar mediado por la estabilización del mRNA. La anergia del linfocito T (y la ausencia de unión de CD28) está acompañada también por la pérdida de la unión del AP-1 (128). La producción de la IL-4 y del GM-CSF, puede estar desregulada por la unión de CD28, lo cual también involucra la unión por el NF-AT y/o por los complejos Jun/Fos (119,126,163).

Se ha propuesto que la sinergia entre el TCR y CD28 es a dos niveles, transcripcional y postranscripcional. El entrecruzamiento de CD28 con anticuerpos en linfocitos T de linfoma activados mediante el TCR o por el PMA incrementan la actividad del promotor del gen de IL-2 aproximadamente en cinco veces. (120). El efecto es mediado por un factor nuclear llamado CD28RC que se une a la región localizada en el promotor de IL-2 cerca del sitio AP-1. Las mutaciones en este elemento resultan en la pérdida de la actividad inducida por CD28.

Más aún, la unión de CD28RC con su secuencia blanco puede ser inhibida por un oligonucleótido con un consenso del NF- κ B. Esta idea está apoyada por el hallazgo de que otras linfocinas, como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IL-3 y el IFN- γ , tienen un sitio para el NF- κ B en sus promotores y responde a la coestimulación de CD28 (120). Basados en diferentes hallazgos se ha propuesto que existen dos vías de transducción de señales intracelulares acopladas con CD28, una es dominante en linfocitos T activados y otra en linfocitos T no activados. En la ausencia de ocupación del TCR, el dominio citoplásmico de CD28 permanece sin fosforilar al sitio de unión de la PI 3-cinasa. La identidad de la cinasa que fosforila a CD28 después de la estimulación con el antígeno permanece desconocida, aunque recientemente se ha reportado la unión de CD28 a la cinasa de tirosina itk (tsk/EMT) (164).

Por otra parte en otros estudios se encontró que p56^{lck} es activada después del entrecruzamiento de CD28, mientras que otro laboratorio encontró que la fosforilación de tirosina de CD28 inducida por el sustrato puede ocurrir en células Jurkat que no expresan p56^{lck} (60). Lo que indica que son necesarios más experimentos para la identificación de esta cinasa o bien que puede existir una vía alternativa que no requiere de p56^{lck}.

En blastos de linfocitos T o en células Jurkat, una PTK es capaz de activar el receptor CD28 mediante la fosforilación del un residuo de Y191. Estos linfocitos T pre-activados entran un estado completamente activado cuando el antígeno se une al TCR en el contexto del receptor CD28 ya ocupado. En blastos, la unión y activación de CD28 a través de la PI 3-cinasa inicia una señal diferente (2b).

La fosforilación de la PLC γ 1 y la elevación del calcio son observadas después de la estimulación de los linfocitos T activados, generando un componente sensible a la CsA. Se presume que esto involucra la activación de una cinasa de tirosina, aunque es igualmente plausible que este tipo de señal de transducción sea iniciada por la inhibición de una fosfatasa de tirosina. La PTK asociada a CD28 podría asociarse vía los dominios de la región 2 de homología src (SH2) o SH3 de la PI 3-cinasa, aunque, parece improbable que sea cualquiera de las PTK asociadas al TCR, ya que la unión de CD28 por su ligando natural B7 puede inducir fosforilación de tirosina en linfocitos T activados de sangre periférica, mientras que la fosforilación de tirosina inducida por CD28 fue casi inexistente en los linfocitos T no activados.

Se ha propuesto que en linfocitos T no activados la señal de transducción a través de CD28 pertenezca a otra clase (2a), a través de un mensajero sensible a CsA. Ya que la fosforilación de tirosina del dominio citosólico del CD28 humano no ha sido demostrado en linfocitos T no activados (60), y si la PI 3-cinasa está involucrada en la señal 2a, significa que esta ocurre vía un mecanismo independiente de una cinasa de tirosina. Se ha propuesto que la cascada de señales de transducción en los linfocitos T no activados involucra cinasas de serina/treonina y o fosfatasas. Sin embargo, la PKC ζ , la cual es una variante de PKC que es insensible a los ésteres de forbol (165). Dado que la activación de la PI 3-cinasa puede llevar a la activación de la PKC ζ , este modelo podría explicar la observación de que ni PMA ni la estimulación por CD28 por si solos activan a los linfocitos T *naive*, mientras que el tratamiento con PMA más anticuerpos anti-CD28 es capaz de activar a los linfocitos T humanos.

La parte central de este modelo es que CD28 transmite dos señales distintas: La señal 2a ocurre en linfocitos T *naive* antes de la estimulación de linfocitos T con niveles bajos de unión *in vitro* de CD28, dado por cantidades sub-saturantes de anticuerpos anti-CD28 bivalentes, y tal vez *in vivo* por células presentadoras de antígeno que expresan una familia de ligandos B7 de baja afinidad. Por otra parte, la señal 2b se transmite en blástos de linfocitos T y requiere cantidades saturantes de unión de anticuerpo anti-CD28 e *in vivo*, se puede requerir de ligandos de la familia B7 de alta afinidad o múltiples. Basados en estudios previos (166), es posible que las señales asociadas con la producción de citocinas y la estabilización del mRNA estén asociadas con la señal 2a y, por lo tanto, que este sea el equivalente bioquímico de la señal coestimuladora descrita por Bretcher y Colm. Es particularmente relevante para esto, el que existan estudios recientes del uso de pervanadato, un medio farmacológico de simular los efectos de la señal de transducción mediada por PTK/fosfatasa. Se ha demostrado que la activación mediada por pervanadato de las PTK en linfocitos T no activados no da como resultado la expresión del gen que codifica para IL-2 a menos de que exista coestimulación a través de CD28 (167). Por el contrario, en células Jurkat, el tratamiento con pervanadato únicamente, fue suficiente para la producción de IL-2 (168). Estos resultados contrastantes señalan la dificultad de usar células Jurkat como un modelo de transducción de señales costimulatorias pero, sugiere que la señal 2a es independiente de las fosfatasas de tirosina y la PTK sensibles a pervanadato.

Como ya se mencionó la herbamicina A, un inhibidor de la PTK, puede prevenir la fosforilación de tirosina inducida por la unión de CD28 y la producción de IL-2 inducida por la unión de CD28 en linfocitos T normales (164,147). En blastos de linfocitos T humanos, el paso(s) sensible a la herbamicina pueden estar a nivel de la fosforilación de la Y191 del dominio citosólico de CD28, y/o a nivel de la PTK que contribuye a la señal 2b. El entrecruzamiento de anticuerpos anti-CD28 puede activar la cinasa raf-1 de serina/treonina (170) en linfocitos T normales, y todavía no se sabe si este fenómeno es parte de la señal 2a o 2b. Raf-1 parece ser necesario para la producción de IL-2 por células Jurkat (171). Juntos estos resultados sugieren que los eventos proximales en la transducción de señales en CD28 pueden involucrar múltiples cinasas de proteínas, así como cinasas de lípidos.

Muchos estudios se han realizado acerca del mecanismo a través del cual CD28 ejerce su función celular, recientemente se ha encontrado que CTLA-4, el homólogo estructural de CD28, también puede asociarse con la PI 3-cinasa, este hecho se detectó mediante análisis de cinasa de lípidos e inmunoensayos (immunoblotting) empleando antisueros anti-p85. Estudios de unión de péptidos revelaron que los dominios SH2 de la unidad p85 se une al *motif* pYVKM del dominio citoplásmico de CTLA-4 con una afinidad similar con la que se une a CD28.(172)

III. FUNCIÓN

Proliferación, producción de citocinas y otros

Para poder inducir una respuesta inmune antígeno-específica, los linfocitos T deben recibir señales de las células presentadoras de antígeno. Las interacciones APC-linfocito T pueden dividirse en tres estadios: adhesión celular, reconocimiento del antígeno a través del receptor del linfocito T, y coestimulación.(Fig. 6). La adhesión parece ser crítica para la iniciación de la activación del linfocito T, porque el bloqueo de uno o más de las parejas ligando-receptor de adhesión, inhibe completamente la respuesta inmune primaria (173). Si el reconocimiento del antígeno por el TCR es bloqueado, se tiene como resultado la falta de respuesta inmune. Aunque las señales coestimuladoras no son específicas para el antígeno o restringidas por el MHC, determinan los resultados de la transducción de señales a través del TCR, ya que cumplen un papel importante en el control de la secreción de citocinas, la proliferación de linfocitos T y la función efectora. (57,174). La ocupación del TCR en ausencia de coestimulación, también provoca un fallo en la inducción de la respuesta inmune, pero en contraste, resulta en anergia (53). Este término se otorga al tipo de tolerancia que se obtiene de la interacción de linfocitos T autorreactivos, en las que su reactividad es regulada negativamente en los órganos periféricos.

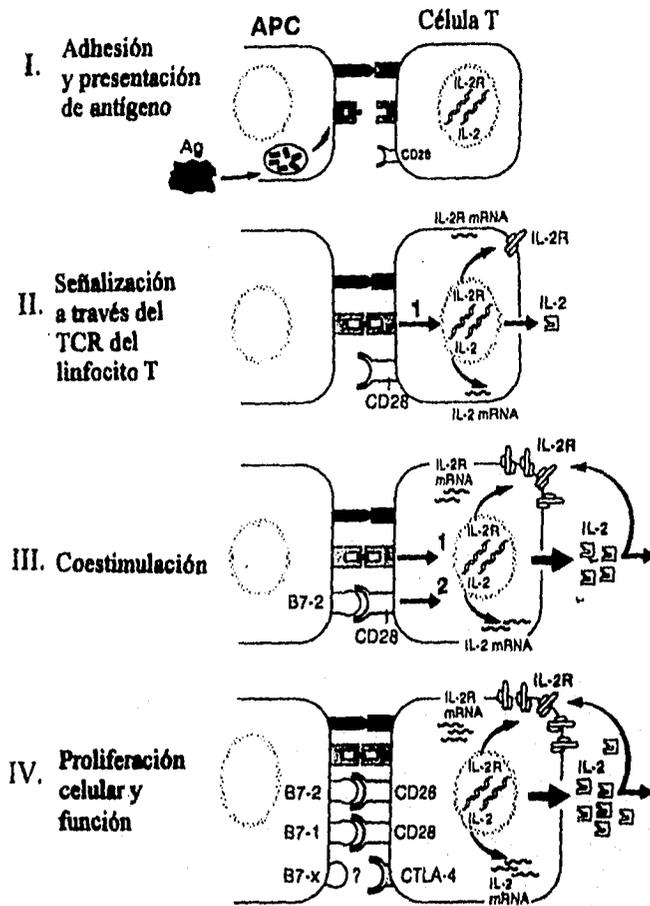


Fig. 6 Modelo hipotético de distintas etapas de la activación antígeno-específica de los linfocitos T a través de APC. En la etapa I se muestran las interacciones de adhesión receptor-ligando que unen a las APC y a los linfocitos T. El antígeno (Ag) es digerido, procesado y presentado por APC, en el contexto de MHC. En la etapa II, la APC da la señal 1 al linfocito T a través del complejo TCR iniciando la transcripción y la expresión de niveles bajos de IL-2 y del RIL-2. Durante la etapa III, la coestimulación mediada por B7-2:CD28 da la señal 2, con lo que se origina la sobre-regulación significativa en la producción de IL-2 y en la expresión de RIL-2. La etapa IV se refiere a las interacciones generadas por el contacto entre linfocitos T y APC, la mayoría de las cuales no están aún bien comprendidas, algunas de las moléculas presentes están involucradas en la amplificación de la respuesta inmune, otras en la regulación negativa de la respuesta proliferativa de los linfocitos T y de la respuesta inmune en general. Algunas moléculas (B7-x) de unión adicionales para CD28/CTLA-4 pueden participar en estas interacciones.

(Tomado de Guinan, E.C. 1994. *Blood* 84:3261.)

Aunque CD28 y CTLA-4 se unen a receptores idénticos, el resultado de la transducción de señales no parece ser funcionalmente redundante. Después de una señal mediada por el TCR, la unión de CD28 resulta en la sobrerregulación de IL-2R- α (44) y el IL-2R- γ (GJ Freeman et al., sin publicar), un incremento en la transcripción del mRNA de IL-2 (175), secreción de citocinas (Tabla 3), proliferación de linfocitos T (73,174), sobrerregulación del ligando CD40 (176), regulación positiva del mRNA de CTLA-4 (67), generación de linfocitos T citotóxicos (LTC) (177), y en la regulación de la síntesis *in vitro* de IgE (178)

La transducción de señales a través de CD28 aumenta de gran manera la estabilidad del mRNA de linfocinas (179). Este efecto es específico para el mRNA de linfocinas, por que la estabilidad de otros transcritos que se han inducido durante la activación de linfocitos T como *c-myc* y *c-fos* no es afectada (179). Varios estudios han demostrado que la presencia de una secuencia rica en AU (AUUUA) en la región 3' no traducida, correlaciona con un recambio rápido de mRNA. Se ha sugerido que el papel del elemento rico en AU (ARE) es el de marcar el mRNA para una degradación rápida (revisado en 180). La secuencia rica en AU está presente en la región 3' no traducida de varias linfocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IFN- α , β , γ , GM-CSF, TNF- α) y oncogenes. Muchos factores de unión ARE han sido recientemente descritos. En particular, las actividades de unión, de cuando menos dos proteínas de unión específicas para mRNA citoplásmico de linfocitos T (AU-B, AU-C) son desreguladas después de la unión del TCR (140,141).

Estos factores se unen específicamente a los RNA de linfocinas (no se unen a transcritos sintéticos a partir del RNA de *c-myc*) y presentan cinéticas paralelas a la expresión de genes de linfocinas.

TABLA 3
Citocinas inducidas por la unión de CD28

Citocina	Funcion(es)
IL-1 α	Múltiples efectos proinflamatorios, pirógenos endógenos.
IL-2	Factor de crecimiento de linfocitos T y B, activación de macrófagos, activación de células NK (LAK).
IL-3	Mielopoyesis temprana, proliferación de mastocitos.
IL-4	Activación de linfocitos B, "cambio de isotipo" a IgE, IgG1, diferenciación de linfocitos T a TH2, maduración de mastocitos.
IL-5	Diferenciación de eosinófilos y basófilos, factor de crecimiento de linfocitos B.
IL-6	Inducción de reactantes de fase aguda, pirógeno, proliferación de linfocitos B, mielopoyesis.
IL-8	Quimiotaxis de neutrófilos, linfocitos y basófilos, activación de neutrófilos.
IL-10	Inhibe activación de linfocitos TH1 y macrófagos, cambio de isotipo a IgG a IgA (con TGF- β), maduración de mastocitos.
IL-13	Cambio de isotipo de IgG4 a IgE, proliferación de linfocitos B.
TNF- α	Lisis tumoral, efectos proinflamatorios, inducción de MHC clase I, caquexia
GM-CSF	Activación de macrófagos, mielopoyesis en fases tempranas.
IFN- γ	Activación de macrófagos, inducción de moléculas del MHC, antiviral, cambio de isotipo a IgG2 (ratón).
LT	Lisis tumoral, efectos proinflamatorios, inducción de MHC clase I, caquexia

(Tomado de Moreno, J. *Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad*. 1996, Ed Limusa. Méx.)

La inhibición de la síntesis de nuevas proteínas previene la aparición de AU-B y AU-C mediada por el TCR e incrementa la estabilidad del mRNA de IL-2. Más aún, la estabilización de los mRNA de linfocinas inducida por la coestimulación con PMA correlaciona de manera inversa con la unión de AU-B. Por lo tanto, estas proteínas inducibles de unión ARE están probablemente involucradas en el marcaje del mRNA de linfocinas que contienen AUUUA, para su degradación. Es posible que estas proteínas u otras relacionadas, resulten en un incremento de la estabilidad del mRNA de linfocinas.

Aunque se ha establecido el papel de CD28/B7 en cuanto a la estimulación con antígenos convencionales, se tienen reportes conflictivos en lo que respecta al requerimiento de la coestimulación mediada por CD28 en la respuesta inmune a superantígenos bacterianos. Aunque muchos estudios han indicado que la transducción de señales a través de CD28 aumenta las respuestas de los linfocitos T a los superantígenos (81,181-183), no es claro todavía si las interacciones CD28/B7 representan un papel obligatorio para la activación de linfocitos T mediadas por superantígenos. Estudios recientes indican, por ejemplo que CTLA-4Ig (184,185) o anticuerpos anti-B7-1 (186) tienen poco o ningún efecto en la activación de linfocitos *naive* mediada por superantígenos. Se han hecho estudios (187) empleando sistemas *in vitro* de linfocitos T *naive* murinos y observando su respuesta hacia superantígenos bacterianos usando anticuerpos anti-B7-1 y B7-2, en ellos se demostró que la activación de linfocitos T *in vitro* por superantígenos es estrictamente dependiente de señales coestimuladoras dadas por las moléculas B7-1 o B7-2.

Como se demostró para antígenos convencionales, las respuestas de células hacia superantígenos bacterianos requiere de señales mediadas por el TCR y por CD28.

Finalmente, la administración *in vivo* de superantígenos bacterianos lleva a la activación policlonal de linfocitos T y a la producción de linfocinas (incluyendo IL-2), seguido por anergia y reducción en el número de linfocitos T que presentan segmentos V_{β} TCR específicos. De ahí, que los estudios *in vitro* indican un requerimiento estricto para la coestimulación mediada por B7 en respuesta a exotoxinas bacterianas (187). De estos hechos se podría derivar una terapia anti-B7 para el tratamiento del síndrome de choque séptico que involucra la acción de superantígenos.

En cuanto a la generación de CTL se ha demostrado mediante experimentos murinos *in vitro* que la interacción CD28-B7-1 es necesaria y suficiente para la generación de CTL específica del MHC clase I (188). Experimentos *in vivo* en ratones, también demostraron que la coestimulación de B7-1 basta para la activación de linfocitos T $CD8^+$ (189). Por lo tanto es evidente que los CTL $CD8^+$ pueden ser activados directamente sin la ayuda de linfocitos $CD4^+$, si existen señales coestimuladoras apropiadas (B7-1). Una vez activados, los linfocitos $CD8^+$ secretan IL-2 y pueden funcionar como células inductoras para otros linfocitos $CD8^+$ (190). Por otra parte se han hecho experimentos que demuestran que en la generación de CTL a través de B7-1 están involucradas dos vías de transducción de señales, una dependiente y la otra independiente de IL-2 (191).

Diferenciación de subtipos Th1/Th2

Existe evidencia que sugiere que las señales coestimuladoras mediadas por CD28 son importantes en diversos estadios de la diferenciación de los linfocitos T. Para iniciar el primer ciclo proliferativo, los linfocitos T *naive* requieren de una señal a través de TCR y una segunda señal, que puede ser dada por CD28, lo cual resulta en la secreción de IL-2 (192,193,194). La exposición subsecuente de los linfocitos T secretores de IL-2 a la transducción de señales de TCR y de CD28 los diferencia en linfocitos T CD4⁺ Th0 capaces de secretar múltiples citocinas. La evolución de una respuesta inmune es regulada por citocinas específicas presentes en el microambiente (195).

Estas citocinas dirigen la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ a subtipos capaces de secretar distintos patrones de linfocinas (196). Hay evidencia que demuestra que la citocina IL-12 (197,198) y, en menor medida el IFN γ , dirigen la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ a linfocitos Th1, los cuales secretan linfocinas (IL-2, IFN γ , TNF- β) críticas para la generación de la respuesta inmune celular y, en ratones, para el anticuerpo IgG2a. En contraste, el contacto con IL-4 es necesario para dirigir la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ a linfocitos Th2, los cuales secretan IL-4, IL-5, e IL-10, las cuales, en ratones, son críticas para la producción de anticuerpos IgG1 e IgE y para la inmunidad contra parásitos de tipo helmíntico (196,199,200). La IL-4 y la IL-10 también inhiben la activación de macrófagos y la presentación de antígenos, por lo tanto regulan negativamente la respuesta inmune celular (200,201,202,203).

Cuando son adicionadas tanto la IL-4 como la IL-12 a cultivos *in vitro*, la IL-4 domina sobre la IL-12, dirigiendo a los linfocitos T CD4⁺ hacia su diferenciación a linfocitos Th2 (204); sin embargo, la administración *in vivo* de IL-12 inhibe el desarrollo de Th2 (205). Todas estas observaciones sugieren que la transducción de señales tanto por la vía CD28 como por los receptores para citocinas específicas es crítica para la dirección de la polarización de los linfocitos T hacia los subtipos Th de CD4⁺.

Diversos estudios murinos recientes demuestran que la vía CD28 es crítica para el desarrollo de linfocitos T productores de IL-4. Usando un modelo *in vivo* de infección helmíntica, (206) se demostró que CTLA-4 bloquea la producción de IL-4 por linfocitos T con lo cual se inhibió tanto la activación de linfocitos B como la secreción de IgE. La infección de ratones BALB/c con *Leishmania* dió como resultado una enfermedad fatal asociada con la generación de linfocitos Th2, la cual inhibe la diferenciación de linfocitos Th1 protectores. En ratones infectados con *Leishmania*, el bloqueo temprano y a corto plazo con CTLA-4Ig inhibe la producción de IL-4 y protege contra la enfermedad letal, sugiriendo que el *priming* de Th2 es dependiente de la vía CD28 (207). De manera similar, en un modelo transgénico de producción de autoanticuerpos (de isotipo primario IgG1 dependientes de IL-4), el bloqueo temprano y a corto plazo con CTLA-4 inhibió la producción de autoanticuerpos (208). Estos estudios dan evidencia indirecta, pero *in vivo*, de que la vía CD28 está involucrada en la producción de IL-4.

Estos estudios, junto con las diferencias en la estructura, expresión y unión de los ligandos B7-1 y B7-2, sugieren la posibilidad de que B7-1 y B7-2 puedan dar señales distintas. El estudio realizado por Freeman et al., 1995 (209) confirma esta suposición, ya que aunque la coestimulación mediante B7-1 y B7-2 fué idéntica en la inducción de la producción de IL-2 y de IFN- γ y en la expresión de las cadenas IL-2R α e IL-2R γ , B7-2 coestimula más eficientemente la producción de IL-4 y de TNF- β , mientras que B7-1 coestimula más eficientemente la producción de GM-CSF. La diferencia funcional más significativa entre B7-1 y B7-2 fue que B7-2 es más efectivo al coestimular par la producción de IL-4, lo cual ha sido consistentemente observado en diferentes poblaciones de linfocitos T. La magnitud de la diferencia en la inducción de IL-4 es dependiente del estado de diferenciación de los linfocitos T. En linfocitos CD4⁺CD45RA⁺ *naive* (210), la inducción por B7-2 es 10 veces mayor que en la mediada por B7-1. En linfocitos T previamente estimulados o en linfocitos T CD4⁺CD45RO⁺, la inducción de IL-4 por B7-2 es entre 3 a 11 veces mayor que la mediada por B7-1. Estos datos apoyan la conclusión de que las diferencias entre la coestimulación mediada por B7-2 o B7-1 son mayores al inicio de la respuesta inmune y menos pronunciadas después. Debe hacerse énfasis en que los niveles de IL-4 inducidos por la coestimulación con B7-2 son bajos y probablemente no son suficientes para inducir todos los efectos biológicos mediados por niveles altos de IL-4. Previamente algunos investigadores han demostrado que la IL-4 es una citocina dominante y que el contacto con IL-4 dirige la diferenciación hacia el subtipo Th2. Las señales que inician la producción de IL-4 así como las poblaciones celulares que inician la secreción de IL-4 no están bien identificadas (211,212,213).

Se ha propuesto en sistemas murinos, ya sea que, las células mastoides o una subpoblación de células NK puedan dar la fuente inicial de IL-4 (213). Alternativamente en un sistema humano *in vitro* se ha demostrado que B7-2 puede coestimular linfocitos T *naive* para la producción de niveles bajos de IL-4, y esta cantidad de IL-4 parece ser suficiente para iniciar a estas células en la producción posterior de IL-4. Otros estudios han demostrado que existe una diferencia entre los resultados de la coestimulación mediada por B7-1 y B7-2 y es la habilidad de B7-2 para iniciar y amplificar la secreción de IL-4 por linfocitos T *naive*.

Aunque la coestimulación repetitiva con B7-2 lleva al incremento progresivo, aunque bajo, de los niveles de IL-4, la IL-12 continuó siendo producida, demostrándose que la coestimulación por B7-2 no es suficiente para llevar a la población completa a su diferenciación a Th2. Estos resultados son consistentes con estudios previos, en los cuales se ha demostrado que la IL-4 exógena dirige la diferenciación de linfocitos T hacia Th2 de manera dependiente a la cantidad de IL-4 y que los niveles bajos de IL-4 exógena llevan a una población mixta de linfocitos T que secretan tanto IL-2 como IL-4 (199). Sin duda se requieren de otras señales para la producción de niveles mayores de IL-4 y la diferenciación terminal de Th2. Un papel para B7-2 en la iniciación de la respuesta inmune por linfocitos T *naive* puede ser el coestimular un nivel bajo inicial de IL-4 que da a los linfocitos T la opción de responder a señales de diferenciación posteriores. Ya que B7-2 se expresa constitutivamente en monocitos y en células dendríticas pero no así B7-1 (71,214,215,216), la coestimulación inicial de una respuesta inmune sería usualmente a través de B7-2, tal vez esto explique por que la respuesta del sistema inmune es por *default* del tipo Th0/Th2 (200).

En contraste, B7-1 no induce la producción de IL-4 en los ciclos iniciales de estimulación y es por lo tanto una señal de diferenciación más neutral, lo que tal vez deje particularmente sensibles a los linfocitos T hacia las señales de diferenciación Th1 como IL-12.

Trabajos adicionales recientes apoyan la idea de que B7-1 y B7-2 no son equivalentes en su función biológica *in vivo* y que la transducción de señales a través de CD28 así como la consecuente producción de IL-2 (217) es crítica para la producción de IL-4. Los isotipos de anticuerpos inducidos por la transferencia adoptiva de APC *pulsadas* con antígeno (218) es consistente con la hipótesis de que B7-2 coestimula la secreción de IL-4 y da una señal moderada hacia la diferenciación Th2. En esos estudios, los monocitos murinos B7-2⁺ y B7-1⁻ inducen preferencialmente la secreción de IgG1 y de IgE (isotipos dependientes de Th2), mientras que las células dendríticas murinas B7-2⁺, B7-1⁺ inducen ambos anticuerpos IgG2a e IgG1 (isotipos dependientes de Th2 y Th1).

Estudios sobre el desarrollo de los subtipos de los linfocitos T inductores en un sistema transgénico para TCR $\alpha\beta$ demostraron que las células adherentes de bazo estimulan el desarrollo de una población mixta de Th0 pero que la línea de linfocitos B TA3 B7-1⁻ y B7-2⁺ (81) estimula el desarrollo de Th2 (200).

En un modelo murino de encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), la administración *in vivo* de anticuerpos monoclonales anti-B7-1 (permitiendo el dominio de B7-2) redujo la severidad de la enfermedad y llevó a un incremento en la producción de IL-4 (219).

Las clonas de linfocitos T derivadas de un ratón tratado con anticuerpos monoclonales anti-B7-1 con EAE fueron en un inicio del fenotipo Th2, en vez de las clonas Th1 primarias derivadas de animales sin tratar. En contraste, la administración *in vivo* de anticuerpos monoclonales anti-B7-2 (permitiendo el dominio de B7-1) incrementó la severidad de EAE. Trabajos anteriores han demostrado que para la generación de linfocitos T productores de IL-4, es necesaria la estimulación de linfocitos T no comprometidos por IL-2 e IL-4. La IL-2 previene la señal necesaria para la producción de IL-4 o suplementa la viabilidad de la señal (193,196,199,220,221). Los resultados del bloqueo *in vivo* con anti-B7-2 en un modelo de EAE, por lo tanto, pueden deberse al bloqueo directo de la señal para la producción de IL-4 o al efecto indirecto del bloqueo de la coestimulación que genera la producción de IL-2. Así todos estos estudios sugieren que B7-1 y B7-2 no son equivalentes y que la señal de CD28 mediada por B7-2 tiene un papel en la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ capaces de secretar IL-4.

En un principio, sería sorprendente que B7-1 y B7-2 puedan unirse al mismo receptor pero llevando a la producción diferencial de algunas linfocinas. Sin embargo, se ha demostrado que muchos receptores inmunológicos transmiten señales que llevan a diferentes resultados dependiendo del ligando al cual se unen. Por ejemplo, la unión de MHC-péptido al TCR normalmente es una señal para la activación de linfocitos T pero algunas combinaciones *alteradas* de MHC-péptido pueden dar señales para la anergización de los linfocitos T (222) y esto puede diferir de manera crítica con sus tasas de encendido-apagado (223).

Linsley et al. (224) han demostrado recientemente que B7-1 y B7-2 tienen afinidades bajas similares por CD28 y afinidades altas por CTLA-4, pero sus cinéticas de unión son muy diferentes. B7-2 se une más rápido pero decae también rápidamente. Además, los determinantes de unión en CTLA-4 para su unión con B7-1 y B7-2 difieren (224). Estas diferencias en el sitio de unión y en las tasas de encendido-apagado pueden permitir a B7-1 y B7-2 el empleo de diferentes vías de transducción de señales intracelulares. Nunes et al. (161) identificaron un cierto número de señales intracelulares inducidas por el entrecruzamiento con anticuerpos monoclonales anti-CD28 pero solo algunas de estas fueron duplicadas por la unión de CD28 con B7-1. Por lo tanto se cree que las señales no inducidas por B7-1 pueden ser inducidas por B7-2.

Sin embargo, hay muchas observaciones que no son compatibles con la interpretación de los resultados anteriores. Los anticuerpos monoclonales anti-B7-2 son muy eficientes en el bloqueo de la hipersensibilidad retardada y de respuestas humorales; los anticuerpos monoclonales anti-B7-2 bloquean el desarrollo de diabetes en ratones NOD (una enfermedad autoinmune dependiente de Th1); y bajo algunas circunstancias, las transfecciones de tanto B7-1 como B7-2 inducen respuestas antitumorales potentes *in vivo* (225,226). Estos resultados sugieren un papel potencial para la activación de las respuestas Th1.

Más aún, Lanier et al. (227) reportaron que la estimulación de los linfocitos T humanos con transfectantes de B7-2 puede inducir niveles similares de citocinas tipo Th1 y Th2. Por tanto, parece que existen factores, además de la actividad intrínseca por la unión con B7-1 y B7-2 con CD28, que pueden influenciar los resultados *in vitro* e *in vivo* observados.

Una explicación para los papeles paradójicos de B7-1 y B7-2 pueden relacionarse con la variabilidad significativa en la fuerza de las señales mediadas por TCR subsecuentes a la exposición al antígeno en sistemas diferentes. Por ejemplo, las diferencias relativas de B7-1 y B7-2 en la potencia en un sistema de tranfección tumoral puede depender de la antigenicidad del tumor. La presencia de la molécula coestimuladora potente B7-2 puede dar una señal distinta para los linfocitos T, hiperestimular a la respuesta inmune para disminuir a los linfocitos T ya sea directamente, tal vez a través de su interacción con CTLA-4, o mediante un incremento en la potencia de las señales de los linfocitos T para promover una respuesta Th2 que inhiba la inmunidad tumoral.

Existe un modelo (228) que trata de integrar muchas de las observaciones relacionadas con la unión de TCR, la coestimulación por CD28, y la biología Th1/Th2 (Fig.7). Liew y Parish (229) en un principio sugirieron que la fuerza de la unión del antígeno al TCR podría regular las respuestas inmunes. En estos primeros estudios, el tratamiento de animales con dosis elevadas de antígeno llevaban a una respuesta de anticuerpos muy fuerte, mientras que dosis bajas de antígeno promovían respuestas de hipersensibilidad retardada. Más recientemente, ratones transgénicos de TCR, han sido usados para demostrar que altas dosis de péptidos promueven la producción de citocinas del tipo Th2 (IL-4), mientras que dosis bajas de antígenos promueven citocinas de tipo Th1 incluyendo IFN- γ . Así, la fuerza de la transducción de señales por linfocitos T puede afectar dramáticamente el balance de subtipos Th1/Th2. Esta hipótesis de la fuerza de la señal puede explicar algunas de las observaciones en el sistema CD28-B7.

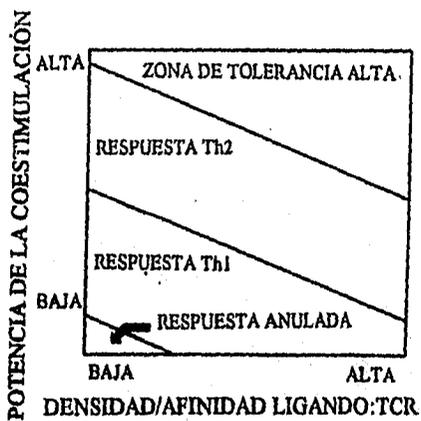


Fig. 7. Modelo de avidez para la coestimulación de linfocitos T
 Se representa un modelo para explicar las observaciones esenciales en la inmunobiología de la interacción CD28:B7. La respuesta inmune se divide en cuatro partes dependiendo del grado de coestimulación y de unión del TCR. El modelo predice que la variación de los niveles CD28/CTLA-4 presentes durante la respuesta inmune alteran la diferenciación, la progresión del ciclo celular y la expansión clonal de los linfocitos que responden. (Tomado de Bluestone, J.A. 1995, *Immunity* 2:555.)

Ya que es evidente que una variedad de factores, incluyendo la naturaleza de las APC que expresan las moléculas B7, la afinidad de las moléculas B7 por CD28 o CTLA-4, y el nivel de expresión de B7-1 y de B7-2, pueden dar como resultado señales significativamente diferentes dadas por los linfocitos T. Así, los efectos combinados de la coestimulación de CD28 con la unión de el complejo TCR-MCH-péptido puede dar distintos resultados dependiendo de la cantidad del antígeno, la función de la APC, el medio de citocinas, y el nivel de coestimulación. Los siguientes escenarios serían predichos por el siguiente modelo.

Bajo condiciones de una baja densidad de antígeno, la unión de CD28 es esencial, ya que la terapia con anticuerpos monoclonales anti-B7 y CTLA-4Ig o la interrupción genética en la expresión de CD28 dan como resultado la disminución de la capacidad para generar una respuesta primaria productiva de linfocitos T y la supresión severa de las respuestas humorales dependientes de T. Bajo estas probables condiciones fisiológicas, la estimulación de las respuestas primarias de linfocitos T es dependiente en gran medida de la coestimulación mediada por B7-2. En etapas primarias de la respuesta inmune B7-2 se expresa constitutivamente en células dendríticas y funciona para regular tanto la respuesta Th1 como la Th2.

Mientras la respuesta inmune progresa, B7-1 y B7-2 se regulan positivamente en distintas APC, resultando en un incremento de las señales de coestimulación y en un incremento en la fuerza de la señal que promueve la expansión de linfocitos T y de la producción de citocinas y puede virar la respuesta inmune hacia el fenotipo Th2.

Cualquier sustancia o situación que reduzca la coestimulación durante el transcurso de esta respuesta (como el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-B7) reduce la fuerza de la señal, promoviendo las respuestas Th1.

Por ejemplo, el bloqueo de las señales coestimuladoras dadas por B7-2 en el modelo de EAE puede exacerbar la enfermedad a través de la reducción de la coestimulación; apoyando la estimulación del fenotipo *default* Th1. Baja densidad máxima de antígeno, como puede ocurrir durante una infección muy virulenta o una respuesta de rechazo a un trasplante, se pueden observar diferentes efectos, dependiendo del grado de coestimulación. Bajo algunas circunstancias, la transducción de señales a través de CD28 puede ser sobrepasada totalmente debido a la alta ocupación del TCR. De hecho, *in vivo*, los ratones deficientes en CD28 pueden rechazar normalmente piel alogénica e implantes de islotes xenogénicos, responder a dosis altas de KLH como antígeno en un ensayo de respuestas secundarias de linfocitos T y mediar potentes respuestas antivirales. Así, la transducción de señales aumentada de TCR lleva a un aumento en la fuerza de la señal en general que puede sobrepasar el requerimiento de la coestimulación mediada por CD28. Sin embargo, la respuesta resultante es principalmente inflamatoria, consistente con la relativamente reducida dependencia de CD28 de la respuesta Th1. Consistentemente con esta idea esta la observación de que la inmunización de ratones deficientes en CD28 tiene como resultado la activación de los linfocitos T pero no la de los linfocitos relacionados con la producción de anticuerpos.

La falta de un componente humoral puede reflejar ya sea la transducción de señales insuficiente en las respuestas Th2 o la falta de cooperación entre los linfocitos T y los linfocitos B debido a las interacciones célula-célula ineficientes. La adición de coestimulación no mediada por CD28 puede entonces promover respuestas Th2.

Finalmente, los altos niveles de coestimulación junto con la alta ocupación del TCR puede, de hecho, regular negativamente las respuestas inmunes. Este efecto puede ocurrir debido a la extensa transducción de señales vía el TCR y CD28 como se ha sugerido como una explicación para la tolerancia de zona o el agotamiento clonal. Alternativamente, la hiperestimulación puede regular positivamente CTLA-4 en linfocitos T activados. Se ha demostrado que la unión de CTLA-4 regula negativamente la respuesta inmune. Así, las interacciones CTLA/B7 pueden amplificar la supresión observada bajo estas condiciones.

En resumen, la hipótesis de la fuerza de la señal puede aplicarse a muchos de los resultados observados tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* de coestimulación mediada por CD28. Sin embargo, permanece un gran número de cuestiones por resolver, incluyendo la necesidad de un mejor entendimiento del papel de B7-1 y B7-2 en la regulación de las respuestas Th1/Th2; a la contribución relativa de estos ligandos coestimuladores directamente contra las APC donde son expresadas; y el papel regulatorio potencial en los eventos de transducción de señales que pueden ser mediados por B7-1 o B7-2 en las APC o en los mismos linfocitos T activados.

Función de CTLA-4

En contraste a la transducción de señales mediada por CD28, poco se sabe sobre la función de CTLA-4. Cuando el dominio citoplásmico de CD28 o de CTLA-4 se fusionó con CD8 y se introdujo en linfocitos T, el entrecruzamiento del híbrido CD8/CD28 dió una señal coestimuladora, pero el entrecruzamiento de CD8/CTLA-4 no (230). Sin embargo, se ha reportado que CTLA-4 puede mediar una señal coestimuladora sinérgica con CD28 (177). Por el contrario, hay evidencia de que CTLA-4 puede mediar una señal antígeno-específica sub-regulatoria. En un sistema murino *in vitro*, tanto anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 como sus fragmentos Fab aumentan las respuestas proliferativas del linfocito T en una reacción alógena mixta de linfocitos (MLR). Sin embargo, cuando se utilizó coestimulación óptima o entrecruzamiento por Fc, los anticuerpos anti-CTLA-4 inhibieron la proliferación de linfocitos T.

Estos resultados sugieren que CTLA-4 da una señal negativa que es bloqueada en la presencia de anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 o que los anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 directamente regulan de manera negativa la respuesta de linfocitos T (231). Consistentemente con estos resultados, los estudios realizados por Gribben et al. (232) han demostrado que CTLA-4 no tiene una función redundante a la señal generada por CD28. En contraste, el entrecruzamiento de CTLA-4 en linfocitos T previamente activados da como resultado la apoptosis antígeno específica.

Por lo tanto se cree que CTLA-4 tiene una vía de transducción de señales distinta capaz de la eliminación clonal de linfocitos T previamente activados cuando la transducción de señales a través de TCR no está acompañada de una acumulación significativa de IL-2. Además en estos mismos experimentos se encontró que la apoptosis mediada por CTLA-4 no está asociada a su unión ni con B7-1 ni con B7-2 y se propone a B7-3 como un posible ligando que coestimula sin inducir la acumulación de IL-2 (83). Sin embargo los anticuerpos monoclonales anti-B7-3 no bloquean la apoptosis mediada por CTLA-4.

Durante el progreso de la respuesta inmune, existe un balance entre las señales que median la activación y la amplificación y aquellas que subsecuentemente, inducen la eliminación celular antígeno-específica. Ya sea que el entrecruzamiento de CD28 o de la región de unión común con CTLA-4 por anticuerpos monoclonales o por sus ligandos naturales B7-1 o B7-2 de una señal coestimuladora positiva que origina como resultado la acumulación de IL-2. Los resultados de algunos experimentos (232) sugieren que la acumulación de IL-2 es dominante, ya que amplifican la respuesta inmune y protegen el progreso de la respuesta inmune de la apoptosis mediada por CTLA-4. Ya que B7-1 y B7-2 son ligandos tanto para CD28 como para CTLA-4, su función debería de mediar la amplificación más que la eliminación celular. Durante este intervalo de amplificación, el entrecruzamiento de CTLA-4 no provoca la apoptosis, por el contrario da una señal coestimuladora sinérgica a CD28. Después de la activación de los linfocitos T, la unión de CD28 por B7-1 regula negativamente la síntesis de CD28 y la función así como la expresión de CTLA-4 se incrementa (233) (Fig. 8).

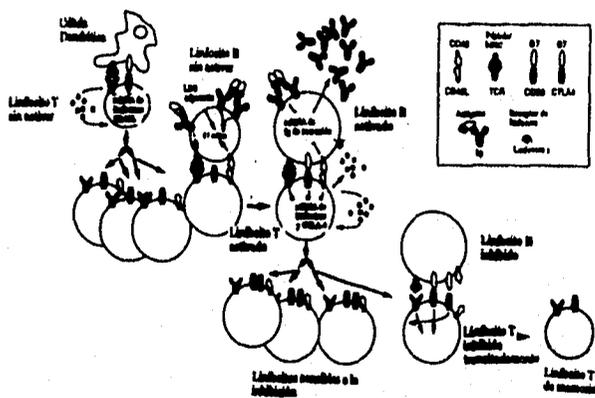


Fig. 8. Un modelo para ilustrar las interacciones potenciales de la costimulación mediada por CD28 y la inhibición mediada por CTLA-4. Las flechas gruesas indican divisiones celulares; las flechas delgadas indican señales intracelulares; las líneas punteadas indican el procesamiento de antígeno. (Tomado de Jenkins, M.K. 1994. *Immunity* 1:443.)

Bajo condiciones donde la respuesta proliferativa está abatida, el entrecruzamiento de CTLA-4 en la ausencia de la coestimulación mediada por CD28 puede inducir la eliminación de células previamente activadas. La capacidad funcional ya sea de coestimular o inducir apoptosis dependiendo en el estado de activación de la célula es una reminiscencia del repertorio funcional de los miembros de la familia de receptores para el TNF (234). Sin embargo, de manera opuesta a la apoptosis inducida por miembros de la familia del receptor de TNF, el entrecruzamiento de CTLA-4 parece mediar la eliminación clonal antígeno-específica, ya que requiere una señal concomitante a través de TCR. El mecanismo mediante el cual la transducción de señales a través de CD28 previene la apoptosis es desconocida, pero ya que la apoptosis puede también ser prevenida por la adición de IL-2 exógeno, se sugiere que la viabilidad de la señal es mediada de la transducción de señales a través del receptor para IL-2.

El fenotipo de los ratones *knockout* para CTLA-4 (333) apoya claramente el papel inhibitorio en la transducción de señales mediada por la molécula CTLA-4. Los ratones presentaron linfadenopatía de gran magnitud. Los órganos linfoides periféricos contenían de 5 a 10 veces el número normal de linfocitos, de los cuales la gran mayoría eran linfoblastos de T que expresaban marcadores de activación indicativos de que una respuesta inmune estaba ocurriendo. *In vitro*, los linfocitos T proliferan espontáneamente y tienen una respuesta aumentada a la estimulación del TCR. Las concentraciones séricas de inmunoglobulina en los ratones están elevadas en varios ordenes de magnitud en comparación con los niveles normales, y los linfocitos B presentan marcadores de activación.

Hay infiltrado extenso de linfocitos en la médula ósea, los pulmones, el hígado, el páncreas, y el corazón, y los ratones mueren a los 3 o 4 semanas de edad.

Los ratones *knockout* para CTLA-4 mueren a una corta edad debido al fallo del miocardio originado por lesiones causadas por el infiltrado de linfocitos T. La vía Fas está intacta en este tipo de ratones, debido a que los linfocitos T mueren cuando se exponen a anticuerpos contra Fas, y la molécula CTLA-4 actúa mediante la inhibición o la finalización de la activación más que por muerte celular. Por lo que Fas y CTLA-4 dan dos mecanismos distintos para evitar un exceso de linfocitos T.

La interacción entre CD28 y CTLA-4 y su ligando es compleja. Ya que CTLA-4 se tiene un pico de expresión transitorio de aproximadamente 2 días después de la activación, la señal de inhibición generada por la unión con las moléculas B7 en la APC finaliza la producción de linfocinas y la proliferación de linfocitos T activados (60,335). Esta regulación negativa puede rescatar algunos linfocitos T de la muerte celular inducida por la activación, facilitando la generación de células de memoria las cuales están listas para una respuesta rápida cuando se encuentran nuevamente con el antígeno después de la disminución en la expresión de CTLA-4. En los ratones *knockout*, la ausencia de CTLA-4 podría prevenir la finalización de la respuesta de linfocitos T en curso. Sin embargo, otra posibilidad (no excluyente) es que CTLA-4 también regula la iniciación de la respuesta de los linfocitos T. Cantidades bajas de B7 son insuficientes para apoyar la activación del linfocito T, más como resultado de las señales de inhibición mediadas por CTLA-4 que como falta de coestimulación por CD28 (334)

IV. CONSECUENCIAS INMUNOLOGICAS

Anergia

Las anomalías funcionales resultantes de la eliminación o de la sobre expresión de los miembros de la vía B7-CD28/CTLA-4 pueden dar luz sobre la importancia de esta vía en la inducción de la inmunidad, así también como en la prevención y reversión de la tolerancia. Así como algunos estudios *in vitro* han demostrado que todas las señales coestimuladoras provenientes de la familia B7 están mediadas a través de la molécula CD28, se podría predecir que la ausencia de CD28 produciría un defecto profundo en la función de los linfocitos T (Fig.9)

Aunque los ratones deficientes en CD28 (65) tienen un desarrollo normal de linfocitos T, se encontró una reducción significativa de la actividad de los linfocitos T inductores, con títulos bajos de IgG1 e IgG2 β pero incrementados los de IgG2 α y normales los de IgM e IgG3, la secreción de anticuerpos y el cambio en el isotipo de las inmunoglobulinas después de estimulación con antígenos virales estuvo significativamente disminuida. Más aún, la sobre-regulación de IL-2R- α estuvo disminuida significativamente, así como la proliferación y la secreción de IL-2 en respuesta a mitógenos. Sin embargo, los linfocitos T de estos ratones parecían tener actividad citolítica normal.

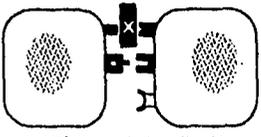
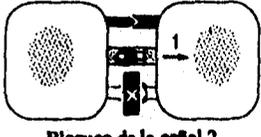
Sitio de bloqueo APC Célula T	Resultado			Agentes potencialmente terapéuticos
	Reconocimiento Antigénico	Proliferación	Proliferación al reto	
 <p>Bloqueo de la adhesión</p>	-	-	+	αICAM-1 αLFA-1 αLFA-3 CD2-Ig
 <p>Bloqueo de la señal 1</p>	-	-	+	αTCR αHLA-DR/DP/DQ αHLA-A/B/C
 <p>Bloqueo de la señal 2</p>	+	-	-	αB7-1 αB7-2 αCD28 Fab CTLA4-Ig CD28-Ig CTLA-4 Soluble

Fig. 9 Se muestran tres sitios de bloqueo de la interacción APC:linfocito T junto con los reactivos disponibles capaces de bloquear cada sitio. Los agentes bloqueadores ya sea de la adhesión o de la transducción de señales a través de TCR (señal 1) previenen el reconocimiento de los linfocitos T que permanecen *naïve*. Por el contrario, los agentes bloqueadores de la señal 2 no afectan el reconocimiento del antígeno, pero previenen tanto la respuesta proliferativa primaria como la proliferación antígeno-específica subsiguiente dando como resultado la inducción de la anergia. (Tomado de Guinan, E.C. 1994. *Blood* 84:3261.)

La retención de la inmunidad mediada por células en ratones deficientes en CD28 sugiere que una vía coestimuladora alternativa podría inducir la producción de citocinas. Así como los ratones deficientes en CD28 no produjeron niveles detectables de IL-2, el análisis de los ratones deficientes en IL-2 pueden dar apoyo a la existencia de una vía funcional redundante a CD28 que sea capaz de la inducción de la inmunidad mediada por células. Más aún, así como la IL-2 parece ser una citocina importante involucrada en la prevención de la anergia el análisis de los ratones deficientes en IL-2 puede dar la información sobre las condiciones que regulan la inducción de la anergia. Los ratones deficientes en IL-2 (235) también presentan clonas normales de timocitos y linfocitos T periféricos, respuesta policlonal de linfocitos T reducida pero inducible, y niveles reducidos de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Como los ratones *knockout* de CD28, también tienen una respuesta inmune mediada por células relativamente normal. Estos datos sugieren que la función preponderante de CD28 y de la IL-2 es la inducción de la inmunidad normal mediada por los linfocitos T inductores, pero que su expresión no es irremplazable en la inducción de inmunidad mediada por células. Más aún, los linfocitos T de cualquiera de las cepas de ratones deficientes descritas anteriormente, no son anérgicas, un hallazgo consistente con la hipótesis de que en la ausencia de IL-2 o de CD28, una señal alterativa (potencialmente ejercida por IL-4 o por IL-5) puede reemplazar aquellas señales que previenen la anergia. (235)

Aunque la ausencia de los genes de IL-2 y de CD28 en sistemas murinos no resulta en un defecto inmune que amenace la vida, la observación reciente de que un subtipo de inmunodeficiencia severa combinada ligada al X (SCID) en humanos es un resultado de la mutación de la cadena γ común para los receptores de IL-2, IL-4 e IL-7, es de llamar la atención (236) Todos juntos estos argumentos basados en el *knockout* humano para una redundancia funcional en la transducción de señales de los receptores IL-2, IL-4 e IL-7, y más importante aún, demuestra que la ausencia de esta señal resulta en una eliminación de virtualmente todos los linfocitos T, B y células NK. El desarrollo de un ratón deficiente en la cadena γ común puede ser útil para definir la naturaleza de este defecto.

Tres modelos de sistemas han sido diseñados para describir el papel funcional de los receptores de CTLA-4/CD28. Primero, los ratones deficientes en B7-1 dieron evidencia para la existencia de más de un receptor para CD28/CTLA-4 (81,88). Aunque induciendo una respuesta alogénica significativamente menor, los linfocitos B activados expresaron el receptor alternativo para CD28/CTLA-4, B7-2, y por lo tanto la vía B7/CD28 permaneció funcional. Segundo, los ratones transgénicos para B7-1 (237), que expresan constitutivamente el gen para B7-1 en linfocitos B maduros, redujeron en gran medida los niveles de inmunoglobulinas séricas. Además, los ratones transgénicos para B7-1 demostraron respuestas de anticuerpos reducidas hacia conjugados hapteno-proteína dependientes de T. Esto no es debido a un defecto intrínseco de los linfocitos B porque las respuestas de anticuerpos hacia conjugados de haptenos independientes de T fueron normales.

El tratamiento de ratones transgénicos de B7-1 con anticuerpos monoclonales anti-B7-1 restablece la capacidad de estos ratones para producir anticuerpos contra conjugados hapteno-proteína. Estos resultados sugieren que la expresión normal temporalmente regulada de B7-1 puede contribuir, ya sea para la iniciación o la desregulación de una respuesta en linfocitos B dependiente de T, mientras que la función inhibitoria es dominante en ratones expresando B7-1 a través de todo el desarrollo de linfocitos B. Finalmente, los linfocitos T de ratones transgénicos para CTLA-4Ig pueden no cooperar con linfocitos B como se midió por la producción disminuida de anticuerpos (238). La respuesta de anticuerpos disminuida se define por un cambio defectuoso de isotipo, Ig total baja y hay ausencia de formación del centro germinal en el bazo, ganglios linfáticos y tejido linfoide asociado al intestino. Sin embargo, los linfocitos T inductores aislados a partir de estos ratones transgénicos no eran anérgicos, desde que podían cooperar con los linfocitos B cuando eran transferidos adoptivamente en los huéspedes desnudos. Más aún estos linfocitos T CD4⁺ pudieran generar una respuesta primaria normal cuando fueron inmunizados *in vivo* con DNP-KHL y respuestas secundarias y terciarias después de inmunizaciones repetitivas (239). Este resultado sugiere que CTLA-4Ig puede prevenir la liberación de una señal negativa o da una señal positiva.

De las numerosas moléculas coestimuladoras expresadas en células presentadoras de aloantígenos, estudios semejantes demostraron que la coestimulación mediada por B7 parece ser crítica en la prevención de la inducción de la anergia. La primera evidencia de la importancia de la coestimulación mediada por CD28 en la prevención de la anergia fue dada por clones de linfocitos T murinos (143).

El cultivo de clones de linfocitos T en la presencia de dosis submitogénicas de anti-CD3 sin APC competentes resultó en anergia, la cual pudo ser prevenida si se adicionaba también anticuerpos monoclonales anti-CD28. Alternativamente, los fragmentos anti-CD28 Fab en la presencia de anti-CD3 y con APC competentes inhibieron su función coestimuladora y resultaron en la inducción de anergia clonal. En sistemas humanos se han utilizado APC artificiales transfectadas con MHC clase II con o sin B7-1, para estudiar la función de B7-1 en ausencia de otras moléculas coestimuladoras.

Estas APC artificialmente positivas para B7-1 pueden presentar eficientemente péptidos como antígenos o como aloantígenos, e inducir respuestas proliferativas antígeno específicas acompañadas de acumulación de IL-2 tanto en clones de linfocitos T humanos normales como en linfocitos T humanos aloreactivos *unprimed* (46,240,241). El reto a los linfocitos T que respondieron con APC profesionales dieron como resultado una respuesta secundaria significativa. Un cultivo primario con APC artificiales B7-1 negativas (transfectadas solo con MHC clase II) resultó en anergia (ej. secreción de IL-2 no detectable y falta de proliferación a retos consecutivos). La anergia pudo también ser inducida por la inhibición de la coestimulación de B7-1 a APC artificiales B7-1+ usando anti-B7-1, fragmentos Fab de anti-CD28 o CTLA-4Ig. Otro sistema experimental humano *in vitro* usando células mononucleares de sangre periférica de individuos incompatibles (242) demostró el papel de la interacción B7-CD28 en la prevención de la inducción de la anergia aloantígeno-específica en MLR. Este sistema demostró que el reactivo más efectivo para bloquear la vía B7-CD28 es CTLA-4Ig.

Experimentos más recientes han demostrado que la adición de CTLA-4Ig en RML entre pares donador-receptor compatibles e incompatibles, resulta en una disminución sustancial de la frecuencia de precursores de células T secretoras de IL-2 donador-específicos (250)

Usando clonas específicas de células T HLA-DR7 aloreactivas y líneas de células linfoblastoides transformadas con el virus de Epstein-Barr que expresaban de igual manera B7-1 y B7-2 como estimulador, se observó que los anticuerpos monoclonales anti-B7-1 y anti-B7-2 tenían efectos de inhibición equivalentes en RML e inhibían la respuesta primaria en un 25% y la respuesta secundaria en un 50%. Aunque B7-1 y B7-2 parecen tener una importancia semejante en un sistema donde se coexpresan comparativamente en la población estimuladora (240), este no parece ser el caso cuando una RML se realiza usando células mononucleares de sangre periférica de individuos no compatibles. Por que B7-2 se expresa constitutivamente en monocitos y es desregulado de manera temprana a B7-1 después de la activación, parece que es el miembro de la familia B7 que mayormente regula la iniciación de la respuesta inmune (250,74). Como contraste, B7-1 parece que amplifica la respuesta inmune en periodos más prolongados de tiempo. El significado fisiológico único de B7-1 y B7-2 en la respuesta inmune ha sido demostrado por otros investigadores (202), quienes demostraron que la IL-10 previene la expresión de los miembros de la familia B7 en macrófagos lo cual resulta en anergia.

Diversos experimentos murinos recientes corroboraron el significado aparente de B7-CD28 como una vía coestimuladora *in vivo*. El siguiente modelo demostró que el bloqueo de la vía B7-CD28/CTLA-4 resulta en tolerancia a largo plazo a xenoantígenos humanos en ratones (243). Para ello se emplearon células de los islotes pancreáticos humanas, las cuales fueron transplantadas bajo la cápsula renal de ratones diabéticos cuya enfermedad fué inducida artificialmente. Los animales fueron tratados con CTLA-4Ig o con Ig control, y su comportamiento funcional fue seguido mediante la determinación de los niveles de glucosa en sangre. La administración de CTLA-4Ig resultó en la función normal de las células de islotes de páncreas humanas transplantadas sin evidencia histológica de rechazo de injerto. El retransplante de células de islotes pancreáticos de un donador inicial relacionado, resultó en sobrevivencia prolongada del injerto en todos los animales que habían sido inicialmente tratados con CTLA-4Ig pero no en aquellos tratados con la Ig control, demostrándose que la tolerancia donador-específica había sido desarrollada solo en la presencia de CTLA-4Ig.

Un efecto menos dramático de el bloqueo de la vía B7-CD28/CTLA-4 en la inmunidad humoral se reportó por otros investigadores, quienes demostraron que aunque el tratamiento *in vivo* con CTLA-4Ig inhibía completamente las respuestas primarias de anticuerpos hacia glóbulos rojos de carnero y KLH, las respuestas secundarias de anticuerpos no fueron afectadas (244).

Otro experimento *in vivo* demostró que CTLA-4Ig prolonga la sobrevivencia del injerto en un modelo de alotransplante cardiaco no compatible en rata (245).

Como contraste al sistema de xenoinjerto de islotes pancreáticos, CTLA-4Ig resultó en la prolongación de la supervivencia del injerto, pero finalmente todos los aloinjertos fueron rechazados. El efecto limitado de CTLA-4Ig en este modelo experimental de aloinjerto cardíaco puede deberse a la presencia de otras moléculas coestimuladoras; esto puede prevenir la inducción de la tolerancia, o revertir un estado ya establecido de tolerancia. De manera alternativa, el fallo en la inducción de la tolerancia puede deberse a la falta del reconocimiento del antígeno por una estimulación inadecuada antígeno-específica de las células del huésped, debido a la pobre función de la APC del tejido cardíaco. Para probar esta hipótesis, Lin et al. (246), modificaron el protocolo del tratamiento y se administraron transfusiones donador-específicas de células mononucleares de sangre periférica a animales huéspedes antes del trasplante cardíaco.

La administración subsecuente de CTLA-4Ig al mismo tiempo del trasplante, no solo resulta en una supervivencia prolongada (muchas veces indefinida) del aloinjerto cardíaco, pero también en respuestas suprimidas o tardías de injertos de piel donador-específico, pero sólo se han encontrado en trasplantes parciales de piel. Empleando otro modelo murino *in vivo* se investigó el efecto de CTLA-4Ig en trasplantes de médula ósea (BMT) de animales no compatibles (247). Los donadores y receptores del BMT no compatibles tanto en MHC clase I como II fueron comprometidos con y sin la administración *in vivo* de CTLA-4Ig. El tratamiento con CTLA-4Ig disminuyó consistentemente la incidencia de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) en los individuos receptores, aunque la mayoría de los animales presentaron evidencia de enfermedad subclínica.

La reconstitución hematopoyética no estuvo afectada en animales bajo tratamiento comparados con los controles.

Un mecanismo propuesto para la tolerancia periférica es que los linfocitos T permanecen sin responder a los antígenos tisulares porque las células del tejido no dan las señales coestimuladoras para su activación. Si la tolerancia periférica es debida simplemente a la falta de coestimulación, una célula que expresa de manera aberrante una molécula coestimuladora debería activar los linfocitos T autoreactivos y tener como resultado la autoinmunidad. Un estudio reciente el cual establece estos hechos demostró que además de la coestimulación, el nivel de expresión del antígeno MHC juega un papel crítico en la inducción de la autoinmunidad (248). Los ratones dobles transgénicos que coexpresan B7-1 y niveles altos de MHC clase II en las células epiteliales de los islotes pancreáticos desarrollaron destrucción autoinmune de las células beta del páncreas. Como contraste, la expresión del antígeno MHC clase II por las células pancreáticas sin B7-1, ocasionó tolerancia específica. El injerto de células de islotes de ratones dobles transgénicos que expresan tanto MHC clase II como B7-1 bajo la cápsula del riñón de los animales tolerantes, no fué rechazado, demostrando que una vez que la tolerancia ha sido establecida no puede ser revertida por la coestimulación con B7-1. Consistentemente con estos resultados, otro estudio (249) demostró que ratones transgénicos expresando B7-1 y la una glicoproteína viral en células beta del páncreas junto con linfocitos T transgénicos específicas para el antígeno desarrollaron diabetes debido a la aparición de respuesta de los linfocitos T.

Aunque el bloqueo de la familia coestimuladora B7 parece ser esencial para la inducción de la anergia, una preocupación significativa es si la anergia es un estado permanente o puede ser revertido por factores solubles o bien por moléculas coestimuladoras expresadas en células presentadoras de aloantígenos. Se han realizado diversos estudios sobre la permanencia del estado de anergia.

Algunos investigadores (250) han observado que los linfocitos T anergizados pueden proliferar en respuesta a IL-2 exógena (46,241,251,252). Más aún, la anergia clonal murina de linfocitos T antígeno-específicos puede ser revertida mediante el cultivo prolongado de las células anergizadas con IL-2 después de la presentación del antígeno por APC profesionales (252). La habilidad de la IL-2 y potencialmente de otras citocinas de revertir el estado establecido de anergia puede ser un obstáculo serio para la aplicación clínica de esta observación, ya que la tolerancia al aloantígeno puede ser superada si se encuentran citocinas liberadas por algún fenómeno en el microambiente. De hecho el rechazo de órganos y la aparición o recurrencia de GVHD son frecuentemente precedidos por infecciones y liberación de citocinas.

Para determinar el papel de las citocinas y/o de las moléculas coestimuladoras en la reversión de la anergia, se emplearon experimentos detallados usando un sistema clonal humano *in vitro* aloantígeno-específico (240). Estos estudios demostraron que, después de un cultivo prolongado con IL-2 (durante 7 ó más días), los linfocitos T anergizados readquirieron la habilidad de responder al aloantígeno específico, pero ni B7-1 ni B7-2 pudieron dar la coestimulación adecuada para esta reactivación. En contraste, LFA-3 parece tener una función coestimuladora significativa en la reversión de la anergia.

Más aún, la inducción del estado de anergia es asociado con la regulación negativa de el epítipo CD2R en linfocitos T anérgicos y el epítipo CD2R es reexpresado cuando las células anérgicas adquieren la capacidad de ser reactivadas después de un cultivo prolongado con IL-2. Estos resultados son consistentes con aquellos a partir de un estudio murino (253) en el cual se emplearon linfocitos T $\alpha\beta^+CD3^+CD2^-CD4^+CD8^-$ de ratones con linfoproliferación autoinmune homocigota (lpr/lpr) a partir de la cepa de una MLR. Cuando esos linfocitos T con una respuesta por debajo de lo normal se cultivaron con IL-2, ésteres de forbol y ionomicina por al menos una semana, ellos reexpresaron CD2 en su superficie y se obtuvo nuevamente respuesta a la estimulación antigénica. Estos resultados indican que la anergia es un estado temporal, y su reversión está asociada con la expresión en la superficie de moléculas funcionales CD2. El mantenimiento de un estado donde no hay respuesta puede, tal vez requerir presentación continua del antígeno específico a los linfocitos T. Cuando los linfocitos T anérgicos se trasladan de un ambiente donde existe el antígeno propio mediante transferencia adoptiva a una cepa de ratones que carece del antígeno específico o mediante cultivo *in vitro*, el estado donde no hay respuesta es revertido y las células en un principio anérgicas readquieren su función normal (254).

Un estudio reciente *in vitro* demostró que los linfocitos T humanos anérgicos pueden causar la falta de respuesta a péptidos o hacia aloantígenos específicos en linfocitos no anérgicos (255). Un mecanismo propuesto es la competencia entre los linfocitos anérgicos y no anérgicos por la superficie de la APC y por la IL-2 producida localmente.

Otro mecanismo sugiere que la habilidad de los linfocitos anérgicos para provocar la supresión de las respuestas antígeno/específicas de linfocitos no anérgicos es el fenómeno denominado *tolerancia infecciosa* (256). En este modelo murino *in vivo*, los linfocitos T se hacen tolerantes a los injertos de piel de donadores con histocompatibilidad menor no compatibles mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8. Cuando estos linfocitos T tolerantes se mezclan con células potencialmente reactivas de un ratón *naive* y son transferidas junto con los injertos de piel del donador original de piel, el injerto de piel puede ser retenido sin intervención terapéutica posterior.

De acuerdo con el mecanismo propuesto, los linfocitos *naive* anérgicos puede transferir exitosamente la tolerancia a los otros linfocitos *naive*. Estos dos modelos sugieren que después de una inducción de tolerancia exitosa, no se necesita inmunosupresión posterior para mantener la tolerancia por un tiempo prolongado. Una pregunta importante es la tasa de linfocitos T anérgicos *in vivo*, y que tan rápidamente mueren.

En cuanto al mecanismo intracelular que se desencadena para generar el estado de anergia se sabe que hay un incremento en el calcio intracelular y que la síntesis *de novo* de proteínas es crítica para su inducción (257,258). La anergia puede mantenerse por un defecto en la acumulación de mRNA de IL-2 mediado por TCR y no por TCR y CD4, o la modulación del receptor de IL-2. La falta de respuesta a la IL-2 exógena se mantiene. Kang et al. (128) ha demostrado que las células T anérgicas no pueden iniciar la transcripción de un promotor heterólogo controlado por el extremo 5' del promotor del gen para la IL-2 o por un multímero de la secuencia AP-1 presente en el promotor.

Además, el complejo de proteínas que se une a la secuencia AP-1, un heterodímero *c-fos/c-jun*, se induce lentamente en los linfocitos T anérgicos después de la reestimulación. Por lo tanto, la explicación más simple que toma en cuenta todos estos resultados, incluyendo el requerimiento para la síntesis *de novo* de proteínas, es que se genera un represor para la unión AP-1 bajo condiciones que resultan en la anergia. Los linfocitos Th1 anérgicos parece que contienen niveles reducidos de las cinasas de tirosina $p56^{lck}$ y $p59^{fn}$, sugiriéndose que estas células también pueden tener defectos de señalización proximal (259). En algunos casos, las clonas Th1 que reciben señales a través de TCR en la ausencia de la coestimulación mueren mediante un mecanismo apoptótico (260). Por lo tanto, la anergia o la apoptosis se induce en clonas de linfocitos T no transformados estimulados a través de TCR únicamente.

Trabajos recientes sugieren que la relación antagónica entre la coestimulación y la inducción de la anergia por CD28 es indirecta. Las clonas de linfocitos T preincubados con APC viables, antígeno, y anticuerpos anti-IL-2 y anti-receptor de IL-2, condiciones bajo las cuales hay coestimulación y se produce IL-2 pero la proliferación es bloqueada, no responden a la reestimulación subsecuente con antígeno (261). Resultados similares se obtienen con el butirato de sodio, el cual bloquea a las células en la fase G1 del ciclo celular (262). Otra situación en la cual la coestimulación se da pero la división celular subsecuente está inhibida por la señalización crónica del TCR (261), es cuando las clonas de linfocitos T se vuelven anérgicas después de la estimulación crónica con anticuerpos anti-CD3 más APC B7⁺

Juntos estos resultados, con los resultados iniciales de la inducción de la anergia, sugieren que la no respuesta se induce como consecuencia de la transducción de señales del TCR en ausencia de división celular. Esto puede ocurrir cuando la coestimulación no se da y la IL-2 no se produce, o cuando la coestimulación se da y la IL-2 se produce pero no se produce la subsecuente división celular. Por lo tanto la capacidad de células accesorias viables para prevenir la anergia vía la interacción de CD28-B7 se explica probablemente por el hecho de que la coestimulación que dan aumenta la cantidad de IL-2 que producen los linfocitos T, promoviendo múltiples ciclos de división celular, permitiendo a los linfocitos T que inactiven o diluyan a la proteína represora responsable de la anergia. La observación de que sometiendo los linfocitos T anérgicos a ciclos en presencia de IL-2 exógena da como resultado la recuperación de la capacidad de respuesta a antígenos, es consistente con esta idea (128,261). La única molécula además de CD28 o de B7 cuyo bloqueo induce anergia *in vitro* en linfocitos T murinos estimuladas a través del TCR es CD24 (263).

Otro ejemplo de como se puede inducir la anergia a través de la transducción de señales de TCR y en la ausencia de división celular fue reportado por Sloan-Lancaster et al. (227). Ellos encontraron que algunos péptidos que diferían del péptido inmunogénico silvestre en algunos aminoácidos no solo fallaba al estimular la proliferación de los linfocitos T cuando era presentado por APC vivas y funcionales sino que dejaban a los linfocitos T en un estado de no respuesta a estimulación subsecuente con el péptido nativo.

Estos autores propusieron que algunos complejos péptido-MHC se unen de manera débil con el TCR en los linfocitos T que responden, generando la transducción de señales suficiente para la inducción del represor pero no para la inducción de los reguladores positivos de la expresión del gen de la IL-2.

Ahora bien gracias a algunos experimentos se sabe que la anergia es un estado de los linfocitos T en el cual la producción de IL-2 así como la capacidad de respuesta hacia IL-4 están disminuidas (264,265). Además se sabe que las clonas Th1 productoras de IL-2 son fácilmente anergizadas mientras que las clonas Th2 no lo son. Por lo que se ha especulado que algunas moléculas involucradas en la producción de IL-2 o en la capacidad para la respuesta a IL-4, pero no en la producción de IL-4, pueden ser un blanco molecular de la anergia.

Varias moléculas han sido propuestas como blanco molecular para la anergia, ej. AP-1 (128), proteína cinasa C (PKC) (266) o Fyn (267). Los papeles de estas moléculas en la producción de IL-4 y en la capacidad de respuesta a IL-4 no están claras. Sin embargo, la modulación negativa de estas moléculas en las células anérgicas no fue apoyada por Go y Miller (268). Ellos reportaron que la estimulación mediante antígeno induce factores transcripcionales NF-AT, AP-1, NF- κ B y NFIL-2A en el núcleo sin una producción cuantificable de IL-2 en clonas Th1 anérgicas. Esto indica que la anergia suprime la producción de IL-2 sin afectar las vías de transducción de señales de TCR que llevan a la activación de estos factores de transcripción. Aunque la vía coestimuladora mediada por CD28 es indispensable para la producción de IL-2, Go y Miller no la investigaron en clonas Th1 anérgicas. Además, permanece abierta la pregunta si un regulador negativo de la transcripción del gen de IL-2 se induce en células anérgicas.

Suzuki et al., (269) reportaron que la coestimulación de CD28 está bloqueada en linfocitos T CD4 anergicos así que la regulación de la regulación postranscripcional del mRNA de IL-2, ej. la estabilización del gen, está afectada en estas células.

Observando que existen diferentes blancos moleculares en la anergia dependiendo del reporte citado (128,266,267), debe de considerarse que el grado de anergia difiere con las condiciones experimentales (270). Es plausible que existan varios blancos moleculares en la anergia. Ya que, recientemente, se encontró que la coestimulación de CD28 regula positivamente la respuesta a IL-4 de las clonas de linfocitos T mediante la estabilización del mRNA de IL-1 α en las células (271). Por lo tanto, un defecto en la coestimulación a través de CD28 por si mismo puede causar tres consecuencias de la anergia, bloqueo en la producción de IL-2 y falta de respuesta a IL-4 pero producción normal de IL-4. De acuerdo con esto, la adición de rIL-1 α mejoró significativamente la respuesta de los linfocitos T CD4 anergicos hacia SEB (269) .

A pesar de que se tiene una expresión disminuída del gen de IL-2, los niveles de mRNA de IL-4 están significativamente aumentados en linfocitos T CD4 anérgicos comparados con los encontrados en linfocitos T *naive*. No es claro si los niveles incrementados de mRNA de IL-4 se deban a un incremento en la frecuencia del precursor de las células productoras de IL-4, como en el caso de ratones infectados con helmintos e inoculados con SEB (272), o por el aumento de expresión del gen de IL-4. De cualquier modo, se sabe que ocurre algún tipo de respuesta inmune, incluso en ratones que carecen de CD28 (65). La producción de IL-4 no está inhibida por CTLA-4Ig soluble que bloquea la unión de CD28 con su ligando en la APC (242).

Estos reportes son consistentes con la observación de que a pesar de la coestimulación deficiente de CD28 los linfocitos T anérgicos son capaces de expresar incluso niveles superiores de mRNA de IL-4 que los que presentan los linfocitos T *naive* después del entrecruzamiento de TCR.

Ya que los linfocitos T anérgicos son capaces de producir IL-4 después de la estimulación con antígeno, puede favorecer a los linfocitos T *naive* específicos para el antígeno, para que se diferencien en linfocitos Th2. Cuando la fuente inductora de tolerancia es retirada o algunas otras formas de coestimulación como la IL-1 se dan por la infección puede ocurrir una respuesta Th2 hacia el tolerígeno.

Esto es consistente con los últimos reportes de algunos autores en los que la infección por *Nippostrongylus brasiliensis* rompe la anergia de linfocitos T del subtipo Th2 pero no de los linfocitos Th1 de ratón (272) y que CTLA-4 induce la tolerancia de linfocitos T en el rechazo a trasplantes donde los linfocitos Th1 juegan un papel (243) pero no induce tolerancia de linfocitos T que controlan la respuesta por anticuerpos (244).

Inmunidad Tumoral Específica

Una función descrita de los miembros de la familia B7, es su papel en la inducción de la inmunidad tumoral específica. Aunque los inmunólogos han identificado, y bajo ciertas circunstancias expandido, números reducidos de linfocitos T antígeno-específicos capaces de inducir citólisis de células neoplásicas humanas, hay poca evidencia de que estos linfocitos sean importantes para la vigilancia de tumores autólogos o bien para el rechazo de tumores (273-279). Aún no es claro porque existen fallos cuando se intenta desarrollar una respuesta inmune mediada por linfocitos T antígeno-específicos contra células malignas y, si se desarrolla, por que fracasa. Claro, que la hipótesis de que un huésped puede generar una respuesta de linfocitos T citotóxicos significativa dirigida contra el neoplasma autólogo presume la existencia de un número suficiente de precursores de linfocitos T citotóxicos e inductores antígeno-específicos (279,280).

En el caso específico de leucemias y linfomas, las células malignas son frecuentemente la contraparte neoplásica de APC profesionales, lo que sugiere que estas células pueden tener el repertorio necesario para presentar efectivamente antígenos tumorales endógenos a los linfocitos T (274,281-289). Sin embargo, el fracaso de cualquier tumor para provocar una respuesta adecuada de linfocitos T específicos para el tumor puede ser el resultado de (1) expresión ausente o inadecuada de moléculas de adhesión;

(2) incapacidad de presentar efectivamente el antígeno como consecuencia de la ausencia del antígeno del tumor, falta de inmunogenicidad del antígeno, y/o procesamiento inadecuado o transporte del antígeno; (3) ausencia o un número limitado de MHC en la superficie celular; y (4) ausencia o un número limitado de moléculas coestimuladoras en la superficie celular, específicamente de B7. Estos defectos podrían dar como resultado secuelas diferentes y discretas y pueden ser responsables de una gran variedad de manipulaciones terapéuticas, dependiendo del sitio del defecto. (276-278,280,290). Algunos defectos potenciales en la presentación de células neoplásicas se muestran en la Fig 10a. Si las células tumorales no tienen cantidades suficientes de receptores de adhesión, moléculas MHC, o antígeno, la señal 1 no se genera. Por lo tanto, no se induce una respuesta inmune mediada por linfocitos T. En contraste, si tanto los mecanismos de adhesión como los que generan la señal 1 están intactos, la ausencia de la señal 2 trae como resultado la tolerancia específica del tumor.

La capacidad de las células neoplásicas para dar las señales coestimuladoras necesarias puede determinar si se genera una respuesta inmune específica para el tumor o, si de manera alternativa, si se induce anergia específica para el antígeno tumoral.

Pocos, tumores sólidos expresan constitutivamente ya sea moléculas coestimuladoras de la familia B7 o algunas otras moléculas coestimuladoras como LFA-3 y CD40. En contraste, mediante el uso de inmunohistoquímica, se ha encontrado B7 en varios si no en todas las células B NHL o en células Reed-Sternberg en secciones de tejido y en líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin (281,291,283,284,286,287).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

A) Células Tumorales como APC: Defectos comunes

Descripción	Respuesta de linfocitos T			
	Reconocimiento Antigénico	Proliferación	Fusión Celular	Anergia
 Célula Tumorale Sin presentación de antígeno	-	-	-	-
 Célula Tumorale MHC bajo o ausente Sin B7	-	-	-	-
 Célula Tumorale Sin B7	+	+/-	-	+

B) Células tumorales como APC: Alternativas para la reparación de defectos

 Célula Tumorale Citoquinas que regulan positivamente la expresión de MHC y/o B7	+	+	+	-
 Célula Tumorale Con transfectado de B7 Inducción de B7 (y/o otras moléculas)	+	+	+/-	-
 Célula Tumorale/APC Fusión Celular	+	+	+	-

C) APC Normales: Antígenos Tumorales

 APC Antígenos tumorales	+	+	+	-
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---	---	---	---

Fig. 10 Esta figura muestra los defectos potenciales que pudieran limitar la capacidad de las células neoplásicas para funcionar como APC. También sugiere las consecuencias funcionales de las interacciones célula tumoral-linfocito T con respecto al potencial que tiene la célula tumoral para iniciar una respuesta de linfocitos T antígeno-específica. En (A), el fallo en la presentación del antígeno o la ausencia de las estructuras de superficie celular necesarias, como el MHC y B7, lleva a un fallo del reconocimiento antigénico; por lo tanto, no hay respuesta de linfocitos T al antígeno. Por el contrario, la ausencia de la coestimulación mediada por B7 resulta en la anergia tumor-específica. (B) Ilustra los mecanismos potenciales mediante los cuales las células tumorales pueden ser modificadas para mejorar su capacidad de funcionar como APC. Estas modificaciones incluyen la modulación tanto de la superficie celular del tumor como su función a través de tratamiento con citocinas, transfección o fusión celular. Finalmente, (C) ilustra la estrategia alternativa que incluye el uso de APC profesionales que presenten los antígenos tumorales. (Tomado de Guinan, E.C. 1994. *Blood* 84:3261.)

Los linfocitos T NHL y los tumores de linfocitos B circulantes raramente expresan cantidades medibles de B7 (281,282,291). La inducción potencial *in vivo* de la expresión de B7 en neoplasmas secundarios a estados inflamatorios sistémicos o a infiltración local de linfocitos no ha sido estudiada.

Se han intentado algunos acercamientos que permitan reconstituir la capacidad de generar una respuesta inmune contra los tumores. Por ejemplo la transfección de MHC en células neoplásicas es un mecanismo potencial que permite a los tumores el despertar respuestas de linfocitos T mejores y de presentarse ellos mismo como blancos para los linfocitos citotóxicos efectores. Aunque no está completamente claro por qué algunos tumores parecen presentar antígenos en el contexto de MHC clase I mientras otros presentan antígenos en el contexto de clase II, existe evidencia experimental que la ausencia de antígenos MHC puede limitar la capacidad de la célula para funcionar como una APC efectiva para los antígenos tumorales. (292,293,294,295). Por ejemplo el sarcoma SaI murino no expresa MHC clase II o B7. (296). La transfección de clase II no da las MHC necesarias para presentar al antígeno pero si da una vía de transducción de señales que resulta en la expresión de B7, después de la interacción del tumor transfectado con los linfocitos T antígeno-específicos. Por lo tanto, los animales *naive* a los cuales se les introduce un tumor que ha sido transfectado con MHC clase II singénica rechazan el tumor modificado mientras que el tumor no modificado crece y es fatal. La inmunización de animales *naive* con tumores modificados también da protección contra un reto subsecuente con el sarcoma original deficiente en clase II, mientras que la inmunización con tumores irradiados, pero no manipulados, no dan el efecto protector.

Resultados similares se han observado después de la transfección de clase I singénica en melanoma negativo para clase I (189,226,297).

Aunque se sabe poco actualmente sobre la expresión de los miembros de la familia B7 en tumores diferentes a las neoplasias de linfocitos B, muchos modelos animales apoyan la relevancia de la vía B7/CD28 en la generación de respuesta inmune tumor-específica. El melanoma murino o las líneas de sarcoma que no expresan B7 fueron identificadas y transfectadas con el gen de B7 y se demostró la expresión de B7 en la superficie celular. En diferentes modelos murinos, la inoculación de animales con los linfocitos tumorales B7⁺ transfectados, dió como resultado el rechazo de las células tumorales restringido por MHC antígeno-específico en huéspedes *naive* en contraste con el crecimiento tumoral fatal en los animales control que recibieron células no modificadas (B7 negativas). (189,226,296,297,298)

Estos modelos también apoyan a las hipótesis de la doble señal con respecto a la generación de una respuesta inmune adecuada. En algunos casos, los linfocitos T CD8⁺ mediaban el rechazo de células tumorales, mientras que los linfocitos T CD4⁺ no hacían lo mismo. En el modelo mediado por linfocitos T CD4⁺, la transfección de B7 en células tumorales negativas para MHC clase II no tuvieron un aumento en su habilidad para estimular una respuesta inmune y, consecuentemente, el crecimiento tumoral no fue impedido (296). Sin embargo, la administración de células tumorales tanto MHC clase II como B7⁺ en el mismo modelo resultó su incapacidad para inducir un efecto antitumoral vigoroso.

Por lo tanto, si las células tumorales funcionan como APC y generan una respuesta de linfocitos T tumor-específica eficiente, necesitan ser capaces de dar tanto la señal 1 como la señal 2.

Se encontró apoyo adicional para esta idea en experimentos similares en los cuales los tumores (derivados de 2 linfocitos T NHL, un mastocitoma y un melanoma) fueron rechazados después de la transfección con B7 aunque otros tumores (3 sarcomas y un melanoma) continuaron su crecimiento de manera agresiva aún después de la transfección con B7 y su expresión en la superficie celular (297). Aunque ocho de los tumores no modificados crecieron en huéspedes *naive*, solo los tumores con evidencia de inmunogenicidad antes de la transfección con B7 (como se encontró en los experimentos de inmunización y reto posterior descritos con anterioridad) fueron capaces de provocar una respuesta inmune antígeno-específica después de haber resultado B7⁺ en la superficie celular. Nuevamente, la explicación más viable de estos resultados es que los tumores inmunogénicos fueron capaces de dar la señal 1 a los linfocitos T.

La transfección con B7 les otorga la capacidad de dar la señal 2, permitiendo que los linfocitos B funcionen como APC competentes para generar respuesta inmune antígeno-específica completa.(Fig.10b) El que la expresión de B7 no aumente la habilidad de tumores no inmunogénicos para provocar una respuesta de linfocitos T, puede reflejar defectos en la señal 1. De manera interesante, en estos últimos experimentos (en los cuales el efecto antitumoral parece estar mediado por los linfocitos T CD8⁺), 3 o 4 tumores no inmunogénicos estudiados que no presentaban antígenos de superficie clase I sugieren al menos una razón para el fallo del paso de presentación/reconocimiento.

Otros mecanismos, como la falta de antígenos tumorales reconocibles o deficiencias en el procesamiento y transportación de antígenos, pueden ser usados para explicar el fallo de estas células tumorales para estimular una respuesta inmune a pesar de la transfección con B7. De manera global, estos experimentos de transfección de B7 dan un apoyo significativo para las hipótesis de que (1) las células tumorales pueden tener una capacidad limitada para funcionar como APC; (2) este fallo puede desencadenar no solo respuestas inmune abortivas sino también tolerancia tumoral antígeno-específica; y (3) la inducción de moléculas de superficie apropiadas, incluyendo el ligando coestimulador B7, en células tumorales puede llevar a respuestas inmunes antígeno-específicas (rechazo del tumor) en huéspedes *naive*.

Otros diseños experimentales también mostraron la habilidad de la transfección de B7 para alterar la capacidad de células neoplásica para provocar inmunidad protectora contra tumores. En algunos experimentos, animales *naive* fueron inoculados (ej. inmunizados) con las células tumorales transfectadas con B7. (189,226,296,297) Esta inoculación originó no solo el rechazo primario de las células tumorales modificadas, como en los experimentos descritos anteriormente, sino que también llevó a un grado significativo de protección contra inoculaciones subsecuentes con células tumorales no modificadas B7 negativas. En estos sistemas, se puede demostrar que la inducción de inmunidad sistémica es antígeno específica y no se observa cuando las células tumorales transfectadas provienen de tumores no inmunogénicos (297). Esquemas de inmunización equivalentes en números equivalentes de células tumorales no modificadas, muertas o irradiadas otorgan un efecto protector pobre.

Sin embargo, la inmunización repetitiva con estas células tumorales no transfectadas pero inmunogénicas fue capaz de dar una protección considerable al reto subsecuente con tumores no irradiados. Nuevamente, estos experimentos apoyaron la hipótesis de que la inmunidad antígeno-específica efectiva requiere tanto la señal 1 como la señal 2. Más aún, se sugiere que esta meta puede posiblemente llevarse a cabo, aunque de una manera menos efectiva, mediante la presentación de antígenos tumorales fagocitados por APC profesionales no neoplásicas. (Fig.10c). La identificación, aislamiento, y la administración de antígenos tumor-específicos comunes pueden dar una estrategia alternativa para la inmunización del huésped, ya que la inoculación con tumores no viables o irradiados pueden facilitar la presentación de antígenos tumorales fagocitados por las APC profesionales residentes.

Existe otro mecanismo sugerido por los experimentos de Guo et al. (299) para la generación de una respuesta específica protectora contra tumores, en este experimento los elementos requeridos permiten a la célula tumoral el funcionar como una APC establecida por fusión de la célula tumoral con células B purificadas, singénicas y activadas (Fig.10b). En los experimentos reportados, la célula tumoral, un hepatocarcinoma, que expresa cantidades limitadas de MHC clase I y II y cantidades limitadas (ICAM-1) o ausencia (LFA-1 y B7) de moléculas de adhesión y coestimuladoras. En contraste, estas moléculas fueron altamente expresadas tanto por células B como por el híbrido, el producto de fusión de ambas células. La inoculación de ratones desnudos (deficientes en linfocitos T e inmunoincompetentes) con las células híbridos resultaron en la formación de tumores que retenían el potencial neoplásico de las células fusionadas.

Sin embargo, los animales inmunológicamente normales inoculados con el híbrido hepatoma-linfocito B fueron capaces de rechazar las células y permanecer libres de tumores. Además la exposición previa de animales a las células híbridas los volvió resistentes a retos subsecuentes con hepatoma no modificado, ej. las células híbridas fueron capaces de inmunizar animales *naive*. En estos experimentos, tanto los linfocitos T citotóxicos como los inductores son esenciales para la generación de la respuesta celular antitumoral antígeno-específica. Por lo tanto, si se deja a las células neoplásicas con la capacidad de dar tanto la señal 1 como la señal 2 a linfocitos T antígeno-específicos (ya sea por transfección de moléculas relevantes o por fusión celular con APC profesionales que expresan las moléculas requeridas), el experimento puede dar como resultado la generación de inmunidad tumor -específica efectiva después de la inmunización primaria.

Una gran limitante de los sistemas modelo anteriores es que las células tumorales modificadas son rechazadas por los huéspedes *naive*, pero no por los que presentan el tumor. Para experimentación clínica, un modelo más relevante examinaría la capacidad de las células tumorales modificadas para influir en el crecimiento de un tumor establecido o de la enfermedad residual mínima. En un modelo de melanoma en el cual la inoculación tumoral desencadena metástasis y muerte, la administración intravenosa de células transfectadas con B7 cuatro días después de la inoculación con tumores B7 negativos dieron como resultado la supervivencia prolongada de todos los animales y una supervivencia a largo plazo de casi la mitad. (226)

De manera similar, en el modelo del híbrido linfocito B-hepatoma, ya sea la administración intrahepática o la implantación intrahepática del tumor seguida por la administración subcutánea de células híbridas 10 días después, se asoció con la supervivencia de entre un 80% a un 100% libre de tumor. (299). Aunque estos estudios están muy lejos de ser usados en el tratamiento de pacientes con enfermedades malignas, si son prueba de la posibilidad de inducir la inmunidad tumor-específica en algunos huéspedes que presentan tumores.

V. RELACION TERAPIA/ENFERMEDAD

Los agentes terapéuticos que intentan modular la vía coestimuladora B7/CD28 aún no han entrado al ámbito clínico, aún así se proponen diversos usos para esta interacción en la cura de enfermedades (Tabla 4).

Inmunosupresión

El potencial terapéutico que se deriva de la modulación de la vía B7/CD28 reside, entre otros, en la inducción de la inmunosupresión. Los agentes que bloquean completamente la vía B7/CD28 serán los más eficientes en la inducción de una inmunosupresión significativa (Fig.9). Virtualmente todos los estudios preclínicos *in vivo* han usado CTLA-4Ig, el cual ha sido extremadamente efectivo en el bloqueo de la coestimulación mediada por la familia B7 (243,245-247). Los anticuerpos monoclonales anti-CD28Fab también bloquean completamente la coestimulación originada por los miembros de la familia B7, lo que les da un potencial equivalente para ser agentes inmunosupresivos eficientes. (106,300). El bloqueo de uno o más miembros de la familia B7 con anticuerpos monoclonales específicos puede potencialmente suprimir la coestimulación mediada por B7, aunque algunos estudios preclínicos que apoyan esta hipótesis no han sido aún reportados.

TABLA 4
Usos clínicos potenciales de B7 y CD28 en inmunoterapia

Función	Función/Enfermedad
Inmunosupresión	<p>Transplantes de órganos: inducción de tolerancia antígeno-específica</p> <p>Transplantes de médula ósea: prevención de GVHD.</p> <p>Enfermedades autoinmunes: prevención o restitución de tolerancia de lo propio.</p>
IgE	<p>Infecciones por helmintos: modulación de la respuesta por sépsis; prevención de inmunopatologías mediadas por la secreción de citocinas.</p>
Inmunostimulación	<p>Neoplasias</p> <p>Infección por HIV-1</p> <p>Transplantes de médula ósea</p> <p>Pacientes sometidos a hemodiálisis</p> <p>Inmunodeficiencias congénitas</p>

(Tomado de Harlan, D.M. 1995. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 75:99.)

Por otra parte, la administración de citocinas como IL-10 la cual regula negativamente la expresión de B7, o el bloqueo de la transducción de señales mediada por citocinas como IL-7 o estructuras de la superficie celular como CD40 las cuales regulan positivamente la expresión de B7 pueden también ser útiles (109,202,301). Sin embargo, los estudios clínicos utilizan preferentemente el bloqueo de B7/CD28 a través de CTLA-4Ig o, de un potencial CTLA-4 soluble.

En el caso de los padecimientos hematológicos, la capacidad de inducir inmunosupresión antígeno específica podría facilitar el tratamiento de un amplio intervalo de enfermedades en las cuales se produce una disfunción hematológica, ya sea por respuestas autoinmunes o aloinmunes. Existe evidencia que sugiere que un gran número de enfermedades autoinmunes pueden ser prevenidas o suprimidas mediante la modulación de la vía B7/CD28 (249,302-304). Por ejemplo, los experimentos realizados en ratones transgénicos en los que se expresan constitutivamente genes susceptibles para la diabetes y la presencia del gen para B7 en células de islotes pancreáticos sugiere que la expresión inapropiada de la coestimulación de B7-1 puede estar involucrada en la patogénesis de esta enfermedad (249)

En un segundo modelo murino transgénico, únicamente con la coexpresión de los antígenos B7-1 y MHC clase II se obtuvo la destrucción autoinmune de las células de islotes, mientras que la expresión de cada molécula por separado fue insuficiente para superar la tolerancia *in vivo* (248).

Se podría postular que tanto los genes susceptibles o el incremento de expresión de MHC resulta en la presentación de un antígeno, el cual puede ser reconocido por linfocitos T autólogos como extraña (señal 1), mientras que la expresión de B7-1 permite la liberación de la señal 2 y la evocación de la respuesta anti-islole por parte de los linfocitos T.

Estudios recientes en ratones también muestran que el bloqueo de la vía B7/CD28 *in vivo* ya sea con anticuerpos monoclonales antimurinos B7-2 o CTLA-4Ig puede prevenir el desarrollo de la encefalitis alérgica experimental, la cual es empleada como un modelo murino para la esclerosis múltiple (305). Además, estos estudios implican a la vía B7/CD28 en la patogénesis de enfermedades autoinmunes y tal vez también den evidencia razonable de que la modulación de la vía puede tener efectos benéficos.

Una área fértil para la investigación es el BMT alogénico en el cual el rechazo del injerto, la GVHD, la toxicidad relacionada con el tratamiento, las infecciones oportunistas, y la enfermedad linfoproliferativa de linfocitos B permanecen como problemas significativos. Intentos recientes para incrementar el tamaño del *pool* del donador mediante el uso de familiares no compatibles o de donadores no relacionados de médula ósea sirve para incrementar tanto la incidencia como la severidad de estas complicaciones (308-318). En estas situaciones, la inducción de la tolerancia del huésped hacia aloantígenos donador-específicos puede facilitar el injerto y reducir la incidencia del rechazo, mientras que la inducción de la tolerancia del donador hacia aloantígenos específicos del huésped pueden dar un nuevo acercamiento, para el tratamiento y/o prevención de GVHD. (319,320).

La modulación de la vía B7/CD28 es más eficiente en la prevención de respuestas inmunes tanto por células *naive* como por células previamente sensibilizadas y es menos marcada la evidencia de su habilidad para apagar la función efectora establecida. Por ejemplo, la vía B7/CD28 está involucrada en la generación de citólisis pero no en la función citotóxica efectora (188,321,322). Estos hallazgos sugieren que es improbable que pueda ser demostrada una eficacia clínica significativa.

Un potencial considerable se encuentra en la prevención de GVHD. Una estrategia podría consistir en los intentos de anergizar específicamente linfocitos T aloreactivos en la médula ósea del donador hacia aloantígenos del huésped. El tolerar a los linfocitos T maduros del donador podría reproducir el mismo fenotipo funcional que la eliminación de linfocitos T maduros de la médula ósea del donador con respecto a la inhabilidad inmediata o a la capacidad limitada del injerto para inducir GVHD. Sin embargo, los linfocitos T tolerantes a aloantígenos específicos podrían mantener su función contra infecciones virales y oportunistas, mientras que este beneficio se pierde con la eliminación global de T. (318). Además, la incidencia aumentada tanto de rechazo del injerto como de fallo, recalda, y enfermedad linfoproliferativa de linfocitos B observadas después del trasplante de la médula ósea a la cual se le eliminaron los linfocitos T pueden ser disminuidos (307-309,312-318,323). Las ventajas de este tratamiento en comparación con las terapias inmunosupresivas surgen del hecho que los medicamentos inmunosupresivos son, por definición, generales en sus efectos, contribuyendo a muchos de los problemas citados con anterioridad.

Estos fármacos pueden tener toxicidades orgánicas significativas. Las limitantes de estos tratamientos incluyen la selección de los tejidos apropiados del huésped que presenten los antígenos necesarios para generar tolerancia a los blancos clásicos de GVHD de piel, vesícula, e hígado (319,320). Una preocupación relacionada es si la anergia inducida *in vitro* puede ser por un periodo prolongado o revertida *in vivo*. Sin embargo, inclusive un periodo limitado de tolerancia puede tener ventajas significativas sobre tecnologías y aproximaciones disponibles.

Otro punto de vista puede ser el involucrar la administración *in vivo* de agentes que bloqueen la vía B7/CD28. Como se demostró en el modelo murino de trasplante alogénico cardíaco, la administración intravenosa de CTLA-4Ig puede dar como resultado la inmunosupresión o incluso la inducción de la tolerancia al aloantígeno (245,246). Es importante en estos estudios el tiempo de administración intravenosa de CTLA-4Ig relativa a la exposición al antígeno y al mecanismo (tiempo, dosis y sitio) por el cual los antígenos externos son introducidos en el huésped, ya que tienen un impacto significativo en el éxito de la intervención.

Estudios preliminares en ratones sugieren que la administración intravenosa de CTLA-4Ig puede reducir significativamente pero no eliminar la GVHD letal en ratones no MHC compatibles (247). Como en el modelo de trasplante cardíaco, las modificaciones al protocolo experimental pueden mejorar estos resultados.

De manera alternativa, una combinación de terapia *in vitro* e *in vivo* puede ser más efectiva o alguna clase de combinación de bloqueo de B7/CD28 e inhibición de la función celular efectora (ej. anticuerpos anticitocinas) puede ser necesario.

La preocupación por el mantenimiento de la anergia sugiere que las técnicas que resultan en la eliminación clonal de los linfocitos T aloreactivos del donador puede dar un acercamiento más efectivo y potencialmente menos reversible.

La diferenciación de los linfocitos T precursores Th0 en linfocitos Th1 y Th2 tiene implicaciones biológicas importantes en términos de susceptibilidad o resistencia hacia una enfermedad particular. En las infecciones por *Leishmania*, hay una expresión recíproca de IFN γ e IL-4 en ratones con antecedentes diferentes que correlacionan con la resolución o progresión de la enfermedad (324). Más aún los individuos infectados con el virus humano de la inmunodeficiencia cambian de un fenotipo Th1 a uno Th2 al tiempo que los síntomas empeoran (325), mientras que los pacientes con artritis reumatoide tienen linfocitos Th1 predominantemente en tejido sinovial (326). Diversas enfermedades autoinmunes órgano-específicas, incluyendo la EAE, se inducen por linfocitos Th1 autorreactivos (327,328). Más aún, los linfocitos T inductores que suprimen el desarrollo de EAE producen citocinas Th2 (329), y el reestablecimiento de EAE en ratones y ratas se asocia con un incremento en los linfocitos Th2 y citocinas en el sistema nervioso central (330). Estos hallazgos, en conjunto con la observación de que las citocinas Th2 pueden inhibir los efectos de las citocinas Th1, sugiere que las modalidades que inducen y activan a los linfocitos Th2 y a sus citocinas pueden prevenir EAE y otras enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos Th1.

Inmunoestimulación

Aunque la modulación de la vía B7/CD28 da un mecanismo potencial para la inducción de la inmunidad tumor-específica, se pueden anticipar muchos obstáculos para la implementación de este acercamiento. Además de las cuestiones específicas de la antigenicidad tumoral ya mencionada, algunas preocupaciones incluyen (1) la existencia de un número suficiente de precursores de linfocitos T antígeno-específicos, (2) las cuestiones estocásticas relacionadas a la cantidad de células tumorales, (3) la capacidad de moléculas clase I y clase II específicas para presentar cada uno de los antígenos peptídicos, y (4) la heterogeneidad de las células tumorales en una enfermedad dada. Con lo que respecta a los linfocitos T, no solo puede haber una limitación inherente en el número de precursores de linfocitos T citotóxicos e inductores capaces de reconocer y responder a un tumor específico, más aún la quimioradioterapia convencional puede limitar el repertorio de linfocitos T mediante la eliminación de poblaciones específicas y no específicas de linfocitos T. Claro que la carga tumoral total y la fracción de crecimiento puede exceder incluso la respuesta antitumoral de linfocitos T citotóxicos más potente.

Además, algunos antígenos peptídicos de algunos tumores pueden no ser eficientemente presentados a los precursores de linfocitos T antígeno-específicos por las moléculas MHC del paciente (31,279,280). Por lo tanto, el fallo para generar una respuesta antitumor mediada por linfocitos T puede ser inherente al repertorio inmunológico genético del paciente.

Con respecto a la enfermedad *per se*, la heterogenicidad de las células tumorales tiene implicaciones obvias para la generación de una respuesta antitumoral antígeno-específica. No se sabe aún si la heterogenicidad morfológica, fenotípica, y/o genética tiene impacto en la antigenicidad de un tumor. (293). Se tiene preocupación sobre la aplicabilidad de estos acercamiento debido a la observación de que aunque algunas enfermedades hematológicas son la contraparte neoplásica de las APC y algunas expresan a miembros de la familia B7, estos tumores no son rechazados. La solución de esta paradoja aparente puede estar en la consideración de la evolución de la clona maligna. Por ejemplo, los rearrreglos del gen Ig y las translocaciones *bcl-2* pueden ser encontradas en los linfocitos pre-B tempranas en este estadio tanto los linfocitos pre-B normales como las neoplásicas expresan MHC clase I y clase II pero no B7 (284,286,289). Aunque las células Reed-Stemberg de la enfermedad de Hodgkin son fuertemente positivas para B7, la célula que origina las clonas es desconocida en la enfermedad de Hodgkin (291,283). Por lo tanto, en los padecimientos linfohematopoyéticos, algunos autores han propuesto que la tolerancia tumor-específica puede ser generada tempranamente por tumores capaces de dar la señal 1 pero no la señal 2. (331). Es crítica para la eficacia clínica de estos intentos, la atención que se le preste a los mecanismos mediante los cuales la tolerancia a células tumorales antígeno-específica es revertida.

Una historia larga e infructuosa ha acompañado a los intentos para desarrollar vacunas contra células tumorales para el tratamiento de huéspedes que presentan tumores. (276,278-280,332). Las vacunas para células tumorales consisten, ya sea, en células tumorales completas modificadas o alternativamente extractos derivados de células tumorales.

El éxito de la vacunación profiláctica dependería de la generación de la cantidad suficiente de linfocitos T citotóxicos de vida prolongada que den vigilancia inmunológica. Si se descubriera un antígeno común para las enfermedades tumorales, se podrían implementar estrategias de transferencia genética que capitalizaría en la función de moléculas coestimuladoras. En el caso de que ocurriera esa posibilidad, los genes de los antígenos tumorales así como los genes para las moléculas de adhesión y coestimulación podrían ser transfectadas simultáneamente en los tejidos del huésped seleccionados. Por ejemplo, el virus de la vacuna podría ser empleado para infectar piel con antígenos tumorales y B7. Alternativamente DNA desnudo que codifique para antígenos tumorales y moléculas coestimuladoras podría ser inyectado en el músculo llevando a la expresión de las proteínas codificadas por las células musculares *infectadas*. Estos métodos han sido prometedores en sistemas murinos. El fallo de cualquiera de estos métodos puede deberse a cualquiera de las preocupaciones generales mencionadas con anterioridad así como al fallo del sistema inmune para mantener memoria suficiente a largo plazo.

Para el huésped que presenta el tumor, existen dos estrategias de tratamiento que pueden ser consideradas, aunque hay variaciones posibles. El primer acercamiento, denominado transferencia adoptiva, podría ocasionar el aislamiento y la expansión *in vitro* de los linfocitos T citotóxicos tumor-específicos (273-275,332).

Ahora bien, el aislamiento, expansión y administración de linfocitos T a tumores infiltrados por linfocitos está limitada a los tumores donde existe un infiltrado de linfocitos T suficiente para que así el aislamiento de células sea práctico. Esta limitación es particularmente pertinente para tumores del sistema linfohematopoyético.

La estrategia propuesta difiere en que no dependería en la expansión de los linfocitos T previamente sensibilizados *in vivo* pero podría también generar y expandir linfocitos T citotóxicos específicas adicionales a partir de precursores antígeno-específicos. Las células de leucemia o linfoma aisladas y purificadas podrían ser utilizadas como APC para estimular a esta población. Las células tumorales podrían ser modificadas en modelos animales preclínicos para facilitar la adhesión, el reconocimiento del antígeno, y la coestimulación y mejorar la capacidad de las células malignas para funcionar como inmunógenos. Alternativamente, los antígenos peptídicos tumor-específicos pueden ser presentados a los linfocitos T por APC profesionales que puedan generar una respuesta antitumoral más eficiente y efectiva. El éxito de ambos métodos es dependiente de la capacidad de los linfocitos T para responder al antígeno; por lo tanto, el repertorio de linfocitos T debe estar intacto. Si los linfocitos T han sido tolerizados para el tumor *in vivo*, la tolerancia debe ser revertida *in vitro* para permitir la inducción y expansión de linfocitos T anti-tumor específicos. La manipulación de la vía B7/CD28 y otras vías dan un camino potencial para la reversión de la anergia.

Todos estos experimentos sugieren que es posible la manipulación de la respuesta de linfocitos T del huésped hacia células malignas para inmunizar o tratar tumores. Si algunos antígenos fueran comunes para un espectro amplio de tumores malignos, la vacunación rutinaria de, ya sea el híbrido tumor-APC o de la célula tumoral transfectada podría ser posible.

Posiblemente podría ser usada una vacuna polivalente contra los antígenos de los tumores malignos que ocurren con mayor frecuencia entre personas de edad y sexo determinado. De manera alternativa, los pacientes identificados como de alto riesgo para un tumor en particular (ej. mujeres con mutaciones en p53 e historias familiares de cáncer de mama) podrían ser inmunizadas selectivamente. La eficacia de cualquier método está basada en la capacidad para superar la posible tolerancia preexistente mediada por linfocitos T hacia el tumor. En otras palabras, la terapia *in vivo* con células tumorales que son deficientes como APC reparadas *in vitro* mediante fusión celular o transfección pueden ser eficaces únicamente si no existe la tolerancia preexistente o puede ser eliminada. La terapia *in vivo* con citocinas capaces de inducir la expresión, en neoplasmas, de moléculas importantes en la inmunogenicidad puede también ser eficaz de forma independiente o como una terapia adicional. Los acercamientos teóricos que encierran a la tolerancia preexistente en el huésped que presenta algún tumor incluye expansión *in vitro* de linfocitos T *naive* del huésped con tumores transfectados o hibridomas así como la administración de células derivadas del donador HLA-compatible o potencialmente de un donador alternativo seleccionadas y expandidas de manera similar.

La terapia *in vivo* dirigida contra linfocitos T maduros y tolerantes seguida por la administración de grandes números de células tumorales inmunogénicas puede generar actividad específica suficiente para las células *naive* recién generadas.

La finalidad en la identificación y caracterización de las moléculas que juegan un papel importante dentro del sistema inmune, no es únicamente la satisfacción de la curiosidad inherente a la naturaleza humana, pues más allá existe la posibilidad de su utilización como herramientas en la cura de múltiples enfermedades. Una gran dificultad es el hecho de que los métodos que se utilizan para su estudio nos impide analizarlas dentro de su microambiente real, por lo que se hace una necesidad la generación de modelos *in vivo* que permitan describir de una manera objetiva su comportamiento. Aún así se han logrado grandes avances que hacen válida la continuación de las investigaciones en este campo.

Referencias

1. Haynes, B.F., Denning, S.M., Le, P.T., Singer, K.H. 1990. *Semin. Immunol.* **2:67.**
2. Rothenber, E. 1992. *Adv. Immunol.* **51:85.**
3. Sprent, J., Lo, D., Gao, E., Ron, Y. 1988. *Immunol. Rev.* **111:173.**
4. Weaver, C.T., Unanue, E.R. 1990. *Immunol. Today* **11:49.**
5. Steinman, R.M., Young, J.W. 1991. *Curr Opin. Immunol.* **3:361.**
6. Steinman, R.M. 1991. *Annu. Rev. Immunol.* **9:271.**
7. Metlay, J., Pure, E., Steinman, R. 1989. *Adv. Immunol.* **47:45.**
8. Germain, R.N., Margulies, D.H. 1993. *Annu. Rev. Immunol.* **11:403.**
9. Braciale, T., Braciale, V. 1991. *Immunol. Today* **12:124.**
10. Pierce, S., Morris, J., Grusby, M., et. al. 1988. *Immunol. Rev.* **106:149.**
11. Hauser, C., Katz, S. 1990. *Immunol. Rev.* **117:67.**
12. Pober, J.S., Cotran, R.S. 1991. *Adv. Immunol.* **50:261.**
13. Hughes, C., Savage, C., Pober, J. 1990. *Immunol. Rev.* **117:85.**
14. Shimizu, Y., Newman, W., Tanaka, Y., Shaw, S. 1992. *Immunol. Today* **13:106.**
15. Hemler, M. 1990. *Annu. Rev. Immunol.* **8:365**
16. Kishimoto, T., Larson, R., Corbi, A., et al. 1993. *Adv. Immunol.* **46:149.**

17. Mackay, C.R., Imhof, B.A. 1993. *Immunol. Today* 14:99.
18. Fougerolles, A.R., Springer, T.A. 1992. *J. Exp. Med.* 175:185.
19. Rothbard, J.B. Gefer, M.L. 1991. *Annu. Rev. Immunol.* 9:527.
20. Yewdell, J., Bennink, J. 1992. *Adv. Immunol.* 52:125.
21. Townsend, A., Bodmer, H. 1989. *Annu. Rev. Immunol.* 7:601.
22. Harding, C., Leyva-Cobian, F., Unanue, E.R. 1988. *Immunol. Rev.* 106:77.
23. Berzofsky, J., Brett, S., Streicher, H.Z., Takahashi, H. 1988. *Immunol Rev.* 106:5.
24. Janeway, C. 1992. *Annu. Rev. Immunol.* 10:645.
25. Brodsky, F.M., Guagliardi, L.E. 1991. *Annu Rev. Immunol.* 9:707.
26. Rammensee, H. G., Falk, K., Rotzschke, O. 1993. *Annu. Rev. Immunol.* 11:213.
27. Lorenz, R., Allen, P. 1988. *Immunol. Rev.* 106:115.
28. Sadegh-Nasseri, S., Germain, R.N. 1992. *Immunol Today* 13:43.
29. Monaco, J. 1992. *Immunol Today* 13:173.
30. Neefjes, J., Ploegh, H. 1992. *Immunol Today* 13:179.
31. Elliot, T. 1991. *Immunol Today* 12:386.
32. Miceli, M.C., Parnes, J.R. 1993. *Adv. Immunol.* 53:59.
33. Julius, M., Maroun, C.R., Haughin, L. 1993. *Immunol. Today* 14:177.

34. Jorgensen, J., Reay, P., Ehrlich, E., Davis, M. 1992. *Annu. Rev. Immunol.* **10:835.**
35. Leiden, E. 1993. *Annu. Rev. Immunol.* **11:539.**
36. Ullman, K., Northrup, J.P., Verweij, C.L., Crabtree, G.C. 1990. *Annu. Rev. Immunol.* **8:421.**
37. Altman, A., Coggeshall, K.M., Mustelin, T. 1990. *Adv. Immunol.* **48:227.**
38. Bierer, B., Burakoff, S. 1989. *Immunol. Rev.* **111:267.**
39. Fraser, J.D., Straus, D., Weiss, A. 1993. *Immunol. Today* **14:357.**
40. Bretscher, P., Colm, M. 1970. *Science* **169:1042.**
41. June, C.H., Jackson, K.M., Ledbetter, J.A., et al. 1989. *J. Autoimmunity* **2:55.**
42. Bjorndahl, J.M., Sung, S.S., Hansen, J.A., Fu, S.M. 1989. *Eur. J. Immunol.* **19:881.**
43. Cerdan, C., Martin, Y., Brailly, H., et al. 1991. *J. Immunol.* **146:560.**
44. Cerdan, C., Martin, U., Courcoul, M., et al. 1992. *J. Immunol.* **149:2255.**
45. Cerdan, C., Razanajaona, D., Martin, Y., et al. 1992. *J. Immunol.* **149:373.**
46. Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Gray, G.S., et al. 1993. *J. Exp. Med.* **178:1753.**
47. Damle, N.K., Klussman, K., L., et al. 1993. *Cell. Immunol.* **148:144.**
48. Damle, N.K., Klussman, K., Linsley, P.S., Aruffo, A. 1992. *J. Immunol.* **148:1985.**
49. Damle, N.K., Klussman, K., Linsley, P.S., et al. 1992. *J. Immunol.* **149:2541.**

50. van Seventer, G., Shimizu, Y., Horgan, K., Shaw, S. 1990. *J. Immunol.* **144:4579.**
51. van Seventer, G., Shimizu, Y., Horgan, K., et al. 1991. *Eur. J. Immunol.* **21:1711.**
52. Koyasu, S., Lawton, T., Novick, D., et al. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87:2603.**
53. Schwartz, R.H. 1990. *Science* **248:1349.**
54. Jenkins, M.K. 1992. *Immunol. Today* **13:69.**
55. Schwartz, R.H., Mueller, D.L., Jenkins, M.K., Quill, H. 1989. *Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.* **54:605.**
56. Charton, B., Auchincloss, H., Fathman, C.G. 1994. *Annu. Rev. Immunol.* **12:707.**
57. Jenkins, M.K., Johnson, J.G. 1993. *Curr. Opin. Immunol.* **5:361.**
58. Geppert, T., Dvis, L., Gur, H., Wacholtz, M., Lipsky, P. 1990. *Immunol. Rev.* **117:5.**
59. Bretscher, P. 1992. *Immunol. Today* **13:74.**
60. June, C.H., Bluestone, J.A., Nadler, L.M., Thompson, C.B. 1994. *Immunol. Today* **15:321.**
61. Lee, K.P., Taylor, C., Petryniak, B., et al. 1990. *J. Immunol.* **145:344.**
62. Lafage-Pochitaloff, M., Costello, R., Couez, D., et al. 1990. *Immunogenetics.* **31:198.**
63. Harper, K., Balzano, C., Rouvier, E., et al. 1991. *J. Exp. Med.* **174: 561.**
64. Buonavista, N., Balzano, C., Pontarotti, P., et al. 1992. *Genomics.* **13:856.**

65. Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K.P., et al. 1993. *Science*. **261:609**.
66. Dariavach, P., Mattei, M., Golstein, P., Lefranc, M. 1988. *Eur. J. Immunol.* **18:1901**.
67. Lindsten, T., Lee, K.P., Harris, E.S. et al. 1993. *J. Immunol.* **151:3489**.
68. Brunet, J.F., Denizot, F., Luciani, M.F. et al. 1987. *Nature*. **328:267**.
69. Green, J.M., Noel, P.J., Sperling, A.I., et al. 1994. *Immunity*. **1:501**.
70. Peach, R.J., Bajorath, J., Brady, W., et al 1994. *J. Exp. Med.* **180:2049**.
71. Freeman, G.J., Disteché, C.M., Gribben, J.G., et al. 1992. *Blood*. **79:489**.
72. Hathcock, K.s., Laszlo, G., Dickler, H.B., et al. 1993. *Science* **262:905**.
73. Freeman, G.J., Gribben, J.G., Boussiotis, B.A., et al. 1993. *Science* **262:909**.
74. Azuma, M., Ito, D., Yagita, et al. 1993. *Nature*. **366:76**.
75. Chen, Ch., Gault, A., Sheit, L., Nabavi, N. 1994. *J.Immunol.* **152:4929**.
76. Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., et al. 1991. *J. Exp. Med.* **174:561**.
77. Bajorath, J., Peach, R.J., Linsley, P.S. 1994. *Protein-Sci.* **3:2148**.
78. Guo, Y., Wu, Y., Zhao, M., Kong, X.P., Liu, Y. 1995. *J. Exp. Med.* **181:1345**.
79. Young, J.R., Davison, T.F., Tregaskes, C.A., et al. 1994. *J. Immunol.* **152:3848**.
80. Yokochi, T.R., Holly, d., Clark, E.A. 1982. *J. Immunol.* **128: 823**.
81. Freeman, G.J., Borriello, F., Hodes, R.J., et al. 1993. *J. Exp. Med.* **178:2185**.
82. Nabavi, N., Freeman, G.J., Gault, A., et al. 1992. *Nature* **360:266**.

83. Boussiotis, B.A., Freeman, G.J., Gribben, et al. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11059.
84. Koulova, L., Clark, E.A., Shu, G., Dupont, B. 1991. *J. Exp. Med.* 173: 759.
85. Hansen, J.A., Martin, P.J., Nowinski, R.C. 1980. *Immunogenetics.* 10:247.
86. Hara, T., Fu, S.M., Hansen, J. A. 1985. *J. Exp. Med.* 161: 1513.
87. Lenschow, D.J., Huei-Ting Su, G., Zuckerman, L.A., et al. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11054
88. Freeman, G.J., Borriello, F., Hodes, R.J., et al. 1993. *Science* 262:907.
89. Damle, N.K., Klussman, K., Leytze, G., et al. 1993. *J. Immunol.* 151:2368.
90. Wu, Y., Guo, Y., Liu, Y. 1993. *J. Exp. Med.* 178:1789.
91. Freeman, G.J., Lombard, D.B., Gimmi, C.D., et al. 1992. *J. Immunol.* 149:3795.
92. Vallé, A., Garrone, P., Yssel, H., et al. 1990. *Immunology* 69:531.
93. Nickoloff, B.J., Bestle, F.O., Zheng, X.G., Turka, L.A. 1994. *Blood* 83:2580.
94. Sansom, D.M. Hall, N.D. 1993. *Eur. J.Immunol.* 23:295.
95. Haffar, O.K., Smithgall, M.D., Bradshaw, J., et al. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11094.
96. Azuma, M., Yssel, H., Phillips, J.H., et al. 1993. *J. Exp. Med.* 177:845.
97. Zhang, X.G., Gaillard, J.P., Robillard, N., et al. 1994. *Blood* 83:3654.
98. Gross, J.A., Callas, E., Allison, J.P. 1992. *J. Immunol.* 149:380.
99. Yang, S.Y., Denning, S.M., Mizuno, S., et al. 1988. *J. Exp. Med.* 168:1457.

100. Turka, L.A., Ledbetter, J.A., Lee, K., et al. 1990. *J. Immunol.* **144**:1646.
101. Vandenberghe, P., Delabie, J., de Boer, M., et al. 1993. *Int. Immunol.* **5**:317.
102. Nelson, A.J., Hosier, S., Brady, W., et al. 1993. *J. Immunol.* **151**:2453.
103. Degermann, S., Surft, C.D., Glincher, L.H., et al. 1994. *J. Immunol.* **152**:3254.
104. Turka, L.A., Linsley, P.S., Paine, R., et al. 1991. **146**:1428.
105. Jones, L.A., Izon, D.J., Nieland, J.D., et al. 1993. *Int. Immunol.* **5**:503.
106. Tan, R., Teh, S.J., Ledbetter, J.A., et al. 1992. *J. Immunol.* **149**:3217.
107. Page, D.M., Kane, L.P., Allison, J.P., Hedrick, S.M. 1993. *J. Immunol.* **151**:1868.
108. Punt, J.A., Osborne, B.A., Takahama, Y., et al. 1994. *J. Exp. Med.* **179**:709.
109. Yssel, H., Schneider, P.V., Lanier, L.L. 1993. *Int. Immunol.* **5**:753.
110. Muegge, K., Vila, M.P., Durum, S.K. 1993. *Science* **261**:93.
111. Weiss, A. 1993. *Annu. Rev. Immunol.* **11**:451.
112. Irving, B.A., Chan, A.C., Weiss, A. 1993. *J. Exp. Med.* **177**:1093.
113. Samelson, L.E., Patel, M.C., Weissman, A.M., et al. 1986. *Cell* **46**:1083.
114. Weiss, A., Koretzky, G., Scatzman, R., Kadelecek, T. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:5484.
115. Margolis, B., Hu, P., Katzav, S., et al. 1992. *Nature* **356**:71.
116. Liu, J., Farmer, J.J., Lane, W.S., et al. 1991. *Cell* **66**:807.

117. Herschman, H.R. 1991. *Annu. Rev. Biochem.* **60:281**.
118. Mitchell, P.J., Tijan, R. 1989. *Science* **245:371**.
119. Crabtree, G.R. 1989. *Science* **243:355**.
120. Fraser, J.D., Irving, B.A., Crabtree, G.R., Weiss, A. 1991. *Science* **251:313**.
121. Angel, P., Karin, M. 1991. *Biochim. Biophys. Acta* **1072:129**.
122. Curran, T., Franza, B.R. 1988. *Cell* **55:395**.
123. Angel, P., Hattori, K., Smeal, T., Karin, M. 1988. *Cell* **55:875**
124. Chiu, R., Angel, P., Karin, M. 1989. *Cell* **59:979**.
125. Cohen, D.R., Ferreira, P.C., Gentz, R., Franza, B.R. 1989. *Genes Dev.* **3:173**.
126. Jain, J., McCaffrey, P.G., Valge-Archer, V.E., Rao, A. 1992. *Nature* **356:801**.
127. Northrop, J.P., Ullman, K.S., Crabtree, G.R. 1993. *J. Biol. Chem.* **268:2917**.
128. Kang, S.M., Beverly, B., Tran, A.C., et al. 1992. *Science* **257:1134**.
129. Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., et al. 1994. *Cell* **77:727**.
130. Downward, J., Graves, J.D., Warne, P.H., et al. 1990. *Nature.* **346:719**.
131. Katzav, S., Martin-Zanca, D., Barbacid, M. 1989. *EMBOJ.* **8:2283**.
132. Gulbins, E., Coggeshall, K.M., Langlet, C., et al. 1994. *Mol. Cell. Biol.* **14:906**.
133. Khosravi-Far, R., Chrzanowska-Wodnicka, M., et al. 1994. *Mol. Cell. Biol.* **14:6848**.
134. Bustelo, X. R., Suen, K.L., Leftheris, K., et al. 1994. *Oncogene* **9:2405**.

135. Ravichandran, K.S., Lee, K.K., Songyang, Z., et al. 1993. *Science* **262:902**.
136. Pelicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., et al. 1992. *Cell* **70:93**.
137. Gotoh, N., Tojo, A., Muroya, K., et al. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91:167**.
138. Downward, J., Gaves, J., Cantrell, D. 1992. *Immunol. Today* **13:1911**.
139. Rayter, S.I., Woodrow, M., Lucas, S.C., et al. 1992. *EMBO J.* **11:4549**.
140. Bohjanen, P.R., Petryniak, B., June, C.H., et al. 1991. *Mol. Cell. Biol.* **11:3288**.
141. Bohjanen, P.R., Petryniak, B., June, C.H., et al. 1992. *J. Biol. Chem.* **25:6302**.
142. Jenkins, M.D., Taylor, P.S., Norton, S.D., Urdahl, K.B. 1991. *J. Immunol.* **147:2461**.
143. Harding, F.A., McArthur, J.G., Gross, J.A., et al. 1992. *Nature* **365:607**.
144. Ledbetter, J.A., Parsons, M., Martin, P.J., et al. 1986. *J. Immunol.* **137:3299**.
145. June, C.H., Ledbetter, A., Gillespie, M.M., et al. 1987. *Mol. Cell. Biol.* **7:4472**.
146. Weiss, A., Manger, B., Imboden, J. 1986. *J. Immunol.* **137:819**.
147. Vanderberg, P., Freeman, G.J., Nadler, J.M., et al. 1992. *J. Exp. Med.* **175:951**.
148. Ward, S.G., Hall, N.D., Sansom, D.M. 1993. *Eur. J. Immunol.* **23:2572**.
149. Ward, S.F., Wilson, A., Turner, L., et al. 1995. *Eur. J. Immunol.* **25:526**.
150. Panayotou, G., Waterfield, M.D. 1991. *Trends Biochem. Sci.* **2:358**.

151. Prasad, K.V.S., Cai, Y.C., Raab, M., et al. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91:2834**.
152. Reif, K., Gout, Y., Waterfield, M.D., Cantrell, D.A. 1993. *J. Biol. Chem.* **268:10780**.
153. Sjolander, A., Yamamoto, K., Huber, B.E., et al. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88:7908**.
154. Rodríguez-Viciana, P., Warne, P.H., Dhand, R., et al. 1994. *Nature* **370:527**.
155. Nakanishi, H., Brewer, K.A., Exton, J.H. 1993. *J. Biol. Chem.* **268:13**.
156. Rozakis-Adcock, M., Fernley, R., Wade, J., et al. 1993. *Nature* **363:83**.
157. Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., et al. 1992. *Cell* **70:431**.
158. Skolnik, E.Y., Le, C.H., Batzer, A., et al. 1993. *EMBO J.* **12:1929**.
159. Songyang, Z., Shelson, S.E., McGlade, J., et al. 1994. *Cell. Biol.* **14:2777**.
160. Schneider, H., Cai, Y.C., Prasad, K.V.S., et al. 1995. *Eur. J. Immunol.* **25:1044**.
161. Nunes, J.A., Collette, Y., Trunch, A., et al. 1994. *J. Exp. Med.* **180:1067**.
162. August, A., DuPont, B., 1994. *Int. Immunology* **6:769**.
163. Boise, L.H., Petryniak, B., Mao, X., et al. 1993. *Mol. Cell. Biol.* **11:1911**.
164. August, A., Gibson, S., Kawakami, Y., et al. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91:9347**.
165. Ways, D.K., Cook, P.P., Webster, C., Parker, P.J. 1992. *J. Biol. Chem.* **267:4799**.

166. June, C.H., Ledbetter, J.A., Linsley, P.S., Thompson, C.B. 1990. *Immunol. Today* **11:211**.
167. O'Shea, J.J., McVicar, D.W., Bailey, T.L., et al. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89:10306**.
168. Secrist, J.P., Burns, L.A., Carnitz, L., et al. 1993. *J. Immunol.* **151:4116**.
169. Lu, Y., Granelli-Piperno, A., Bjorn Dahl, J.M., et al. 1992. *J. Immunol.* **149:24**.
170. Siegel, J.N., June, C.H., Yamada, H., et al. 1993. *J. Immunol.* **151:4146**.
171. Owaki, H., Varama, R., Gillis, B. et al. 1993. *EMBO J.* **12:4367**.
172. Schneider, H., Prasad, K.V.S., Shoelson, S.E., Rudd, C.E. 1995. *J. Exp. Med.* **181:351**.
173. Springer, T.A. 1990. *Nature* **346:425**.
174. Linsley, P., Ledbetter, J. 1993. *Annu. Rev. Immunol.* **11:191**.
175. Fraser, J.C., Weiss, A. 1992. *Mol. Cell Biol.* **12:4357**.
176. de Boer, M., Kasran, A., Kwekkeboom, J., et al. 1993. *Eur. J. Immunol.* **23:3120**.
177. Linsley, P.S., Greene, J.L., Tan, P., et al. 1992. *J. Exp. Med.* **176:1595**.
178. Life, P., Aubry, J.P., Estoppey, S., et al. 1995. *Eur. J. Immunol.* **25:333**.
179. Lindsten, T., June, C.H., Ledbetter, J.A., et al. 1989. *Science* **144:339**.
180. Cleveland, C.W., Yen, T.J. 1989. *New Biol.* **1:121**.
181. Bhardwaj, N., Young, J.W., Nisanian, A.J., et al. 1993. *J. Exp. Med.* **178:633**.
182. Fraser, J.D., Newton, M.E., Weiss, A. 1992. *J. Exp. Med.* **175:1131**.

183. Goldbach-Mansky, R., King, P.D., Taylor, A.P., Dupont, B. 1992. *Int. Immunol.* **4:1351**.
184. Damle, N.K., Klussman, K., Leytze, G., Linsley, P.L. 1993. *J. Immunol.* **150:726**.
185. Stohl, S., Elliot, J.E., Linsley, P.S. 1994. *J. Immunol.* **153:17**.
186. Nickoloff, B.J., Mitra, R.S., Green, J., et al. 1993. *J. Immunol.* **150:2148**.
187. Muraille, E., De Smedt, T., Thielemans, K., et al. 1995. *Cell. Immunol.* **162:315**.
188. Harding, F.A., Allison, J.P. 1993. *J. Exp. Med.* **177:1791**.
189. Townsend S.E., Allison, J.P. 1993. *Science* **259:368**.
190. Carabasi, M.H., DiSanto, J.P., Yang, S.Y., Dupont, B. 1991. *Tissue Antigens* **37:26**.
191. Van Gool, S.W., Kasran, A., Wallays, G., et al. 1995. *Scand. J. Immunol.* **41:23**.
192. Ehlers, S., Smith, L.A. 1991. *J. Exp. Med.* **173:25**.
193. McKnight, A.J., Perez, V.L., Shea, C.M., et al. 1994. *J. Immunol.* **152:5220**.
194. Sagestrom, C.G., Kerr, E.M., Allison, J.P., et al. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90:8987**.
195. Mosmann, T.R., Coffman, R.L. 1989. *Annu. Rev. Immunol.* **7:145**.
196. Seder, R.A., Paul, W.E., Davis, M.M., St Groth, B.F. 1992. *J. Exp. Med.* **176:1091**.
197. Kubin, M., Kamoun, M., Trinchieri, G. 1994. *J. Exp. Med.* **180:211**.

198. Murphy, E.E., Terres, G., Macatonia, S.E., et al. 1994. *J. Exp. Med.* **180:223.**
199. Swain, S.L., Winberg, A.D., English, M., Huston, G. 1990. *J. Immunol.* **145:3895.**
200. Hsieh, C.S., Heimberger, A.B., Gold, J.S., et al. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89:6065.**
201. Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., et al. 1991. *J. Immunol.* **146:3444.**
202. Ding, Y., Linsley, P.S., Huang, L.Y., et al. 1993. *J. Immunol.* **151:1224.**
203. Powrie, F., Menon, S., Coffinan, R.L. 1993. *Eur. J. Immunol.* **23:3043.**
204. Hsieh, C.Y., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., et al. 1993. *Science* **260:547.**
205. Oswald, I.P., Caspar, P., Jankovic, D., et al. 1994. *J. Immunol.* **153:1707.**
206. Lu, P., Zhou, X. D., Chen, S.J., et al. 1994. *J. Exp. Med.* **180:693.**
207. Corry, D.B., Reiner, S.L., Linsley, P.S., Loxksley, R.M. 1994. *J. Immunol.* **153:4142.**
208. Milich, D., Linsley, P., Hughes, J., Jones, J. 1994. *J. Immunol.* **153:429.**
209. Freeman, G.J., Boussiotis, V.A., Anumanthan, A., et al. 1995. *Immunity.* **2:523.**
210. Morimoto, C., Schlossman, S.F. 1993. *Clin. Exp. Rheumatol.* **11:241.**
211. van der Pouw-Kraan, T., Van Kooten, C. Renisink, Y., Aarden, L. 1992. *Eur. J. Immunol.* **22:1237.**
212. van der Pouw-Kraan T., de Jong, R., Aarden, L. 1993. *J. Immunol.* **23:1.**
213. Seder, R. A., Paul, W.E. 1994. *Annu. Rev. Immunol.* **12:635.**

214. Freedman, A. S., Freeman, G.J., Rhunhart, K., et al. 1991. *Cell. Immunol.* **137:429.**
215. Hart, D.M., Starling, G.C., Calder, V.L., Fernando, N.S. 1993. *Immunology* **79:616.**
216. Caux, C., Vanbervliet, B., Massactier, C., et al. 1994. *J. Exp. Med.* **180:1841.**
217. Seder, R.A., Germain, R.N., Linsley, P.S., Paul, W.E. 1994. *J. Exp. Med.* **179:299.**
218. De Becker, G., Somasse, T., Nabavi, N., et al. 1994. *Eur. J. Immunol.* **24:1523.**
219. Kuchroo, V.K., Das, M. P., Brown, J. A., et al. 1995. *Cell.* **80:707.**
220. Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Seder, R., et al. 1990. *J. Exp. Med.* **172:921.**
221. DeKruyff, R.H., Fang, Y., Umetsu, D.T. 1992. *J. Immunol.* **149:3468.**
222. Sloan-Lancaster, J., Evavold, B.D., Allen, P.M. 1993. *Nature* **363:156.**
223. Matsui, K., Boniface, J.J., Reay, P. A., et al. 1991. *Science* **254:1788.**
224. Linsley, P.S., Greene, J.L., Brady, W., et al. 1994. *Immunity* **1:793.**
225. Chen, C., Faherty, D., Gault, A., et al. 1994. *J. Immunol.* **152:2105.**
226. Chen, L., Asche, S., Brady, W.A., et al. 1992. *Cell* **71:1093.**
227. Lanier, L.L., O'Fallon, S., Somoza, C., et al. 1995. *J. Immunol.* **154:97.**
228. Bluestone, J.A., 1995. *Immunity.* **2:555.**
229. Liew, F.Y., Parish, C.R. 1974. *J. Exp. Med.* **139:779.**
230. Stein, P., Fraser, J., Weiss, A. 1994. *Mol. Cell. Biol.* **14:3392.**

231. Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., et al. 1994. *Immunity* 1:405.
232. Gribben, J.G., Freeman, G.J., Boussiotis, V.A., et al. 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:811.
233. Linsley, P.S., Bradshaw, J., Urnes, M., et al. 1993. *J. Immunol.* 150:3161.
234. Smith, C.A., Farrah, T., Goodwin, R.G. 1994. *Cell* 76:959.
235. Schorle, H., Holschke, T., Hunig, T., et al. 1991. *Nature* 352:621.
236. Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H., et al. 1993. *Cell* 73:147.
237. Sethua, M.P., van Parijs, L., Sharpe, A.H., et al. 1994. *Immunity* 1:415.
238. Lane, P., Burdet, C., Hubele, S., et al. 1994. *J. Exp. Med.* 179:819.
239. Ronchese, F., Hausmann, B., Hubele, S., Lane, P. 1994. *J. Exp. Med.* 179:809.
240. Boussiotis, V.A., Freeman, J.G., Griffin, J.D., et al. 1994. *J. Exp. Med.*
241. Gimmi, C.D., Freeman, G.J., Gribben, J.G., et al. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6586.
242. Tan, P., Anasetti, C., Hansen, J.A., et al. 1993. *J. Exp. Med.* 177:165.
243. Lenschow, D.J., Zeng, Y., Thistlethwaite J.R., et al. 1992. *Science* 257:789.
244. Linsley, P.S., Wallace, P.M., Johnson, J., et al. 1992. *Science* 257:792.
245. Turka, L.A., Linsley, P.S., Lin, H., et al. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11102.
246. Lin, H., Bollin, S.F., Linsley, P., Wei, R.Q., et al. 1993. *J. Exp. Med.* 178:1801.

247. Blazar, B.R., Taylor, P.A., Linsley, P.S., Vallera, P.A. 1994. *Blood*. **83:3815.**
248. Guerder, S., Meyerhoff, J., Flavell, R. 1994. *Immunity* **1:155.**
249. Harlan, D.M., Hengartner, H., Huang, M.L., et al. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91:3137.**
250. Boussiotis, V.A., Gribben, J.G., Freeman, G.J., Nadler, L. M. 1994. *Curr. Opin. Immunol.* **6:797.**
251. Jenkins, M.K., Ashwell, J.D., Schwartz, R.H. 1988. *J. Immunol.* **140:3324.**
252. Beverly, B., Kang, S.M., Lenardo, M.J., Schwartz, R.H. 1992. *Int. Immunol.* **4:661.**
253. Clements, J.L., Wolfe, J., Cooper, S.M., Budd, R.C. 1994. *Eur. J. Immunol.* **24:588.**
254. Ramsdell, F., Fowlkes, B.J. 1992. *Science*. **257:1130.**
255. Lombardi, G., Sidhu, S., Batchelor, R., Lechler, R. 1994. *Science* **264:1587.**
256. Quin, S., Cobbold, S.P., Pope, H., et al. 1993. *Science* **259:974.**
257. Quill, H., Schwartz, R.H. 1987. *J. Immunol.* **138:3704.**
258. Jenkins, M.K., Schwartz, R.H. 1987. *J. Exp. Med.* **165:302.**
259. Quill, H., Riley, M.P., Cho, E.A., et al. 1992. *J. Immunol.* **149:2887.**
260. Liu, Y., Janeway, C.A., Jr. 1990. *J. Exp. Med.* **172:1737.**
261. DeSilva, D.R., Urdahal, K.B., Jenkins, M.K. 1991. *J. Immunol.* **147:3261.**
262. Gilbert, K.M., Wigle, W.O. 1993. *J. Immunol.* **151:1245.**

263. Liu, Y., Jones, B., Aruffo, A., Sullivan, K.M., et al. 1992. *J. Exp. Med.* **175:437.**
264. Schwartz, R.H. 1992. *Cell* **71:1065.**
265. Chiodetti, L., Schwartz, R.H. 1992. *J. Immunol.* **149:887.**
266. Rapoport, M.J., Lazarus, A.H., Jaramillo, A., et al. 1993. *J. Exp. Med.* **177:1221.**
267. Ochi, A., Migita, K. 1993. *Jpn. Soc. Immunol.* **23:114.**
268. Go, C., Miller, J. 1992. *J. Exp. Med.* **175:1327.**
269. Suzuki, D., Nomura, M., Uzawa, A., Akashi, M., Nakata, Y. 1995. *Int. Immunol.* **7:37.**
270. Schonrich, G., Momburg, F., Malissen, M., et al. 1992. *Int. Immunol.* **4:581.**
271. McArthur, J.G., Raulet, D.H. 1993. *J. Exp. Med.* **178: 1645.**
272. Rocken, M., Urban, J.F., Shevach, E.M. 1992. *Nature* **359:79.**
273. Rosenberg, S. 1992. Philadelphia, P.A., Lippincott.
274. Russell, S.J. 1990. *Immunol. Today* **11:196.**
275. Topalian, S.L., Rosenberg, S.A. 1990. *Imp. Adv. Oncol.* Philadelphia, P.A. Lippincott, p. 19.
276. Lanzavecchia, A. 1993. *Science* **260:937.**
277. Urban, J., Schreiber, H. 1992. *Annu. Rev. Immunol.* **10:617.**
278. Pardoll, D.M. 1993. *Immunol. Today* **14:310.**

279. Boon, T., Coulie, P., Marchand, M., et al. 1994. *Imp. Adv. Oncol.* Philadelphia, P.A., Lippincott. p. 53.
280. Boon, T., Cerottini, J.C., Wynde, B., et al. 1994. *Annu. Rev. Immunol.* **12:337.**
281. Freedman, A.S., Freeman, G., Horowitz, J.C., et al. 1987. *J. Immunol.* **139:3260.**
282. Freeman, G.J., Freedman, A.S., Segil, J.M., et al. 1989. *J. Immunol.* **143:2714.**
283. Delabie, J., Ceuppens, J.L., Vandenberghe, P., et al. 1993. *Blood* **82:2845.**
284. Freedman, A.S., Nadler, L.M. 1987. *Semin. Oncol.* **14:193.**
285. Freedman, A.S., Boyd, A.W., Berrebi, A., et al. 1986. *Leukemia* **1:9.**
286. Freedman, A.S., Griffin, J.D., Nadler, L.M. 1995.
287. Freedman, A.S. 1993. *Semin. Hematol.* **30:318.**
288. Griffin, J.D., Ritz, J., Nadler, L.M., Schlossman, S.F. 1981. *J. Clin. Invest.* **68:932.**
289. Anderson, K.C., Slaughenhoupt, B., Bates, M.P., et al. 1984. *Blood.* **63:1424.**
290. Chen, L., Linsley, P.S., Hellstrom, K.E. 1993. *Immunol. Today* **14:483.**
291. Munro, J.M., Freedman, A.S., Aster, J.C., et al. 1994. *Blood* **83:793.**
292. Elliot, B.E., Carlow, D.A., Rodricks, A.M., Wade, A. 1989. *Adv. Cancer Res.* **53:181.**
293. Garrido, F., Cabrera, T., Concha, A., et al. 1993. *Immunol. Today* **14:491.**

294. Watanabe, Y., Kuribayashi, K., Miyatake, S., et al. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86:9456**.
295. Levy, R., Miller, R.A. 1990. *Monogr. Natrl. Cancer Inst.* **10:61**.
296. Baskar, S., Ostrand-Rosenberg, S., Nabavi, N., et al. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90:5687**.
297. Chen, L., McGowan, P., Ashe, S., Johnston, J., et al. 1994. *J. Exp. Med.* **179:523**.
298. Matulonis, U., Dosiou, D., Mauch, P., Freeman, G., Lamont, C., Nadler, L. (propuesto).
299. Guo, Y., Wu, M., Chen, H., et al. 1994. *Science* **263:518**.
300. Gribben, J.G., Guinai, W.C., Boussiotis, V.A., Barber, M., Gray, G., Greeman, G., Nadler, L.M. (propuesto).
301. Ranheim, E.A., Kipps, T.J. 1993. *J. Exp. Med.* **177:925**.
302. Romano, M.F., Turco, M.C., Stanziola, A., et al. 1993. *Cell Immunol.* **148:455**.
303. Silverman, E.D., Somma, C., Khan, M.M., et al. 1990. *Arthritis Rheum.* **33:205**.
304. Wyss-Coray, T., Mauri-Hellweg, D., Baumann, K., et al. 1993. *Eur. J. Immunol.* **23:2175**.
305. Zamvil, S., Steinman, L. 1990. *Annu. Rev. Immunol.* **8:579**.
306. Anasetti, C., Beatty, P.G., Strob, R., et al. 1990. *Hum. Immunol.* **29:79**.
307. Antin, J., Bierer, N., Smith, B., et al. 1991. *Blood*. **78:1464**.

308. Ash, R.C., Casper, J.T., Chitambar, C.R., et al. 1990. *N. Engl. J. Med.* **322:485.**
309. Bacigalupo, A., Hows, J., Gordon-Smith, E.C., et al. 1988. *Bone Marrow Transplant* **3:531.**
310. Beatty, P.G., Clift, R.A., Mickelson, E.M., et al. 1985. *N. Engl. J. Med.* **313:765.**
311. Beatty, P.G., Anasetti, C., Hansen, J.A., et al. 1993. *Blood* **81:249.**
312. Goldman, J.M., Gale, R.P., Horowitz, M.M., et al. 1988. *Ann. Intern. Med.* **108:806.**
313. Herve, P., Cahen, J.Y., Flesch, M., et al. 1987. *Blood* **69:388.**
314. Kernan, N.A., Bartsch, G., Ash, R.C., et al. 1993. *N. Engl. J. Med.* **328:593.**
315. Maranichi, D., Gluckman, E., Blaise, D., et al. 1987. *Lancet* **2:175.**
316. Marmont, A.M., Horowitz, M.M., Gale, R.P., et al. 1991. *Blood* **78:2120.**
317. McGlave, P., Bartsch, G., Anasetti, C., et al. 1993. *Blood* **81:543.**
318. Pirsch, J.D., Maki, D.G. 1986. *Ann. Intern. Med.* **104:619.**
319. Ferrara, J.L.M., Deeg, H.J. 1991. *N. Engl. J. Med.* **324:667.**
320. van Bekkum, S.W., Lowenberg, B. 1985. *Bone Marrow Transplantation: Biological Mechanisms and Clinical Practice.* New York, N.Y., Dekker, p. 147
321. Azuma, M., Cayabyab, M., Phillips, J.H., Lanier, L.L. 1993. *J. Immunol.* **150:2091.**
322. de Waal Malefyt R., Verma, S., Bejarano, M.T., et al. 1993. *Eur. J. Immunol.* **23:418.**

323. Mitsuyasu, R.T., Champlin, R.E., Gale, R.P., et al. 1986. *Ann. Intern. Med.* **105:20.**
324. Heinzl, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., et al. 1989. *J. Exp. Med.* **169:59.**
325. Cohen, J. 1993. *Science* **262:175.**
326. Simon, A.K., Seipelt, E., Sieper, J. 1994. *Annu. Rev. Immunol.* **12:635.**
327. Baron, J.L., Mardi, J.A., Ruddle, N.H., et al. 1993. *J. Exp. Med.* **177:57.**
328. Kuchroo, V.K., Martin, C.A., Greer, J.M., et al. 1993. *J. Immunol.* **151:4371.**
329. Chen, Y., Kuchroo, V., Inobe, J.I., et al. 1994. *Science* **265:1237.**
330. Khoury, S.J., Hancock, W.W., Weiner, H.L. 1992. *J. Exp. Med.* **176:1355.**
331. Parmiani, G., 1993. *Immunol. Today* **14:536.**
332. Greenberg, P. 1991. *Adv. Immunol.* **49:281.**
333. Waterhouse, P., et al. 1995. *Science* **270:985.**
334. Krummel, M.F., Allison, J.P., 1995. *J. Exp. Med.* **182:459.**
335. Jenkins, M.K. 1994. *Immunity* **1:443.**

Abreviaturas

APC	Antigen Presenting Cell.
LFA	Lymphocyte Function-Associated Antigen.
CD	Cluster of differentiation.
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
MHC	Major Histocompatibility Complex.
TCR	T Cell Receptor.
HLA	Human Leukocyte Antigen.
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
IL	Interleukin.
CTLA-4	Cytolytic Lymphocyte-Associated Antigen.
PI 3-kinase	Phosphoinositide 3-kinase
PMA	Phorbol Myristate Acetate
NK	Natural Killer
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CDR	Complementarity Determining Region
IgSF	Immunoglobulin Superfamily
GAL-3	Lymphocyte Activation Gene
MAG	Myelin-Associated Glycoprotein
TAG	Transient Axonal Glycoprotein
AMP	Adenosin Mono Phosphate
IFN	Interferon
HIV	Human Immunodeficiency Virus

Abreviaturas

HTLV	Human T Lymphotropic Virus
MIs	Minor lymphocyte stimulation
PKC	Protein Kinase C
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5- biphosphate
PI ₃	Inositol 1,4,5- triphosphate
DGA	Diacylglycerol
NF-AT	Nuclear Factor of Activated T Cells
CsA	Cyclosporine
HLA-A,B,C	MHC clase I
HLA-DR,DP,DQ	MHC clase II
IgV	Immunoglobulin variable region
q13.3	Localización cromosómica del gen al que se hace referencia
Y201	Posición del aminiácido
GEF	Guanine nucleotide-exchange factor
DH	Homology Domain
SH	src-Homology Region
GAP	GTPase-activating protein
PLC	Phospholipase C
PDGF-R	Platlet-Derived Growth Factor Receptor
EGF-R	Epidermal Growth Factor Receptor
COS	Linea celular proveniente de células de riñón de mono verde
GDP	Guanidin diphosphate

Abreviaturas

GTP	Guanidin triphosphate
MAP-2	Microtubule-associated protein
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
MEK	Acrónimo de MAP y ERK
NF-kB	Nuclear Factor-kB
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage colony-Stimulating factor
VβTCR	Región variable de TCR
CTL	Cytolytic T Lymphocyte
TNF	Tumor Necrosis Factor
EAE	Experimental Allergic Encephalomyelitis
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
BMT	Bone Marrow Transplant
GVHD	Graft vs. Host Disease
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SEB	Staphylococcal Enterotoxin B

Vocabulario

CTLA-4Ig el dominio	Proteína de fusión integrada por el dominio extracelular de CTLA-4 y Fc de IgG1.
Default	Estado que se tiene en ausencia de estímulo
Knockout	Supresión artificial de algún gen.
Motif	Elemento estructural o patrón repetitivo en diferentes contextos; específicamente, un dominio estructural pequeño que puede ser reconocido en diferentes proteínas
Naive	Linfocito que no ha entrado en contacto con el antígeno.
Pool	Conjunto al azar de distintas muestras.
Priming	Contacto inicial con el antígeno
Pulsar	Contacto con el antígeno de manera restringida