

Figura 6 Esquema de la via de processament d'antigen per MHC de classe II. Les cadenes α i β sintetitzades *de novo* i translocades a l'ER s'associen a tres molècules d'I α I β formant un nonàmer que serà dirigit cap a la via endocítica (MIIC). Arribats als MIIC, la I α I β serà degradada seqüencialment fins que amb l'ajut d' HLA-DM s'intercanviarà el CLIP per algun pèptid antigènic que confereixi prou estabilitat al complex per ser exportat cap a la superfície.

Encara no està clar si la generació dels pèptids antigènics precedeix sempre la seva unió a les MHC II, o bé si és la molècula MHC II la que selecciona determinades zones antigèniques accessibles en polipèptids parcialment desnaturalitzats, inserint-los en el solc d'unió a antigen i permetent que les proteases n'eliminin les regions sobresortints (Werdelin O i col., 1986; Mouritsen S i col., 1992). Aquest mecanisme de captura antigènica pot ser particularment important en els EE per a la presentació de pèptids, massa sensibles a la proteòlisi, per arribar als compartiments més tardans de la via endocítica. Segurament, la col.lecció final de pèptids presentats és generada per la combinació d'ambdós processos: guiat per proteases i guiat per MHCII (Villadangos i Ploegh, 2000).

1.2.2.3. Generació de lligands peptídics per les MHC de classe II

Els antigens exògens poden accedir a la via endocítica mitjançant diversos mecanismes que difereixen en importància depenent de l'APC: pinocitosi, fagocitosi, endocitosi facilitada per receptor o bé autofagocitosi (Watts C i col., 1997). Els antigens internalitzats progressen per l'eix endosomes primerencs-endosomes tardans-lisosomes i són exposats de manera creixent a condicions desnaturalitzants i proteolítiques. Dos tipus de factors defineixen la capacitat proteolítica de cada compartiment de la via endocítica: (i) factors físico-químics (ii) proteases i els seus inhibidors.

(i) Molts substrats antigènics són internalitzats per l'APC amb una conformació nativa que protegeix alguns dels possibles lloc de tall i els fa inaccesibles a les proteases. Les característiques físico-químiques del lumen dels compartiments endocítics, facilita el desplegament de l'antigen i l'acció de les proteases. L'acidificació és un dels factors més importants en el procés de desplegament de la proteïna (Jensen PE i col., 1993). A més, el pH afecta l'activitat de les proteases i el tràfic de proteïnes (Forgac M i col., 1998). Els mecanismes que mantenen l'ambient reductor en la via endocítica també afavoreixen un pas clau en el desplegament de l'antigen, com és la hidròlisi dels ponts di-sofre. En molts casos, el desplegament d'una proteïna és assistit per les reductases de grups tiol, que hidrolitzen els ponts di-sofre.

(ii) En les vesícules fagocítiques portadores del material internalitzat, o fagosomes, i en els endosomes, els components proteolítics s'adquireixen seqüencialment (Garin J i col., 2001), per tant, es dona una presència diferencial de proteases en cada compartiment. Si es considera l'activitat de cada proteasa l'escenari esdevé més complicat ja que les proteases endosomals se sintetitzen com a precursors inactius (zymogens) que maduren per autoproteòlisi o per l'acció d'altres proteases (Boehley i Seglen, 1992). Com que l'activitat i

l'estabilitat de cada proteasa depen del pH, i aquest varia al llarg de la via endocítica, cada enzim s'activa i presenta una activitat màxima en un compartiment determinat. Aquest mecanisme auto-regulador de l'activitat proteolítica és, a més, influenciat per les altres proteases presents en cada compartiment, que poden afectar l'activitat i el turn-over dels enzims involucrats en el processament antigènic (Driessen C i col., 2001; Honey K i col., 2001). L'activitat proteolítica dels compartiments endocítics de l'APC també pot ser regulada per inhibidors naturals com els membres de la família cistatina i serpina (Gresser O i col., 2001).

Les proteases es classifiquen en famílies en funció del residu aminoacídic que usen per a tallar l'estructura peptídica i les seves relacions evolutives (estructurals). La majoria de les proteases lisosomals es coneixen com catepsines (Cat) seguides d'una lletra (A, B, C, etc..) tot i que altres tenen noms particulars. Els estudis d'expressió d'aquestes proteases s'han fet en molts casos per Northern Blot de llibreries de RNA derivades d'òrgans sencers, fet que limita la informació sobre el tipus cel.lular que expressa cada proteasa. Per exemple, la Cat F no sembla abundant en la melsa ja que les cèl.lules B no l'expressen, però s'expressa amb nivells elevats en els macròfags esplènics, on podria tenir un paper important en la presentació d'antigen (Shi GP i col., 2000). Algunes proteases considerades d'expressió ubiqua tenen un paper específic en la presentació d'antigen només en determinats tipus d' APCs, com la Cat L en les cèl.lules epitelials tímiques (Nakagawa T i col., 1998). A més, algunes proteases s'expressen només quan l'APC rep algun estímul exogen o endogen com les citoquines. Aquest seria el cas de les Cat S, B i L l'expressió de les quals augmenta amb l'estimulació amb IFN γ .

Mentre algunes proteases com la Cat D, són capaces de generar els lligands reconeguts per les cèl.lules T, altres activitats com la de la Cat S o Cat L poden destruir el mateix epítot (van Noort JM i col., 1994; Rodríguez GM, 1995). Així doncs, durant el pas de l'antigen per la via endocítica es produeix un balanç entre dues tendències: la proteòlisi "productiva" que generarà fragments peptídics capaços d'unir-se a MHC II, i la proteòlisi "destructiva" que pot eliminar aquests pèptids antigènics. L'existència d'una elevada redundància en les vies endosomals generadores de pèptids s'ha demostrat amb l'estudi de les APCs de ratolins KO per Cat B, Cat D i Cat L, ja que totes poden presentar correctament múltiples antigens (Deussing J i col., 1998; Nakagawa T i col., 1998).

Un altre factor addicional que condiona la susceptibilitat d'un antigen a ser degradat per proteases és la presència de grups carbohidrat que oculten o protegeixen els llocs potencials de tall de les proteases (Surman S i col., 2001). La vida mitja de la chaperona li disminueix quan són eliminats els dos llocs de glicosilació, suggerint que aquests grups carbohidrat confereixen protecció a la molècula normal en front de la proteòlisi prematura (Neumann J i col., 2001).

La identificació dels lligands naturals associats a les MHC II de línies B limfoblastoids (LCL) va mostrar la presència de grups de pèptids retallats (nested peptide sets) amb una seqüència core comú però amb diferents longituds en els extrems N-i C-ter. Aquest fet indicava que, tot i que les endoproteases són els enzims que probablement determinen com es

fragmenta un antigen, els pèptids generats han de ser retallats posteriorment i en grau variable per amino- o carboxi-peptidases (Engelhard VH i col., 1994).

En resum, amb l'objectiu de presentar el major nombre possible de pèptids antigènics a la superfície cel·lular, la millor estratègia per la cèl·lula presentadora és degradar els antigens seqüencialment a mesura que avancen per l'eix endocític, assegurant al mateix temps, la presència de MHC II "receptives" en tots els compartiments. Recol·zant aquesta hipòtesi, quan s'ha alterat el tràfic intracel·lular de les MHC II mitjançant mutants, els pèptids associats a MHC II derivats de l'antigen exògen HEL que eren presentats per la línia cel·lular mutada eren diferents que els presentats per la línia parenteral sense mutar. Aquests resultats suggereixen que cada pèptid derivat de HEL es genera (o bé sobreviu més temps) en un compartiment diferent (Zhong G i col., 1997).

1.2.2.4. Un rol especial per la captació d'antigen mitjançant un receptor específic. Cèl·lules presentadores d'antigen professionals.

L'efectivitat de la presentació d'un antigen per MHC II depen de la quantitat i conformació de l'antigen transportat als endosomes. Per aquest fet, les cèl·lules presentadores d'antigen professionals, han desenvolupat diferents vies per augmentar la captació i transport de l'antigen cap al compartiment d'unió a MHC II. Per antigens particulats, la fagocitosi permet la captació de grans quantitats d'antigen per la cèl·lula presentadora. Pels antigens no particulats s'ha desenvolupat la captació mitjançada per receptors, entre les quals cal destacar l'habilitat de determinades cèl·lules per usar anticossos per facilitar la captació d'antigen. La captació de l'antigen mitjançant un receptor específic permet augmentar-ne la concentració abans de ser internalitzat. Cèl·lules com els macròfags i les cèl·lules dendrítiques expressen receptors per la fracció constant dels anticossos (FcR) que permeten la captació de conjugats antigen-anticòs de l'exterior, i, més específicament, els limfòcits B capten l'antigen mitjançant el seu propi receptor d'antigen, la immunoglobulina de superfície o BCR (Lanzavecchia A, 1985). La interacció del BCR o dels FcR amb l'antigen específic induïx una senyalització intracel·lular que modula el trànsit del material endocitat i augmenta l'eficiència de la presentació (Watts C i col., 1993; Amigorena S i col., 1998; Zimmermann VS i col., 1999).

A més, el patró de degradació d'un antigen pot ser també influenciat per l'associació amb els receptors que capturen l'antigen, ja que la interacció establerta pot protegir certes regions de l'antigen i prevenir-ne la seva degradació. Un exemple ben estudiat, és el processament de la toxina del tetanus (TT) per diferents cèl·lules B (Griffin GP i col., 1997; Watts C i col., 1998; Fernandes DM i col., 2000).

1.3. HLA-DM/H2-M i Tapasina: el control de qualitat del repertori peptídic associat a les MHC

Tot i que les diferències estructurals entre HLA-DM i la tapasina són molt importants, recentment s'ha comprovat que les funcions exercides per ambdues molècules en les seves

vies respectives són similars: ambdues actuen com a chaperones de les molècules del MHC, estabilitzant-les i facilitant el carregament del repertori peptídic adequat. L'absència de les dues molècules induïx una disminució important de les capacitats presentadores de la cèl.lula hoste que mostra a la superfície un nombre de complexos MHC-pèptid reduït i inestable.

Les molècules HLA-DM (DM) en humans i H2-M en ratolins són heterodímers no polimòrfics, formats per una cadena α de 33-35 kDa i una cadena β de 30-31 kDa, codificades dins de la regió de classe II del MHC (Kelly AP i col., 1991). L'elevada semblança estructural que presenten amb les molècules MHC I i MHC II ha fet que se les anomenés molècules MHC-like (Cho SG i col., 1991; Denzin LK i col., 1994). La diferència més notable entre els dímers DM i les MHC, és que els primers presenten un solc molt estret que no permet l'associació de pèptids antigènics (Mosyak L i col., 1998; Fremont DH i col., 1998). La cua citoplasmàtica de DM β conté un motiu basat en Tyr que les dirigeix als endosomes tardans, mitjançant vesícules de clatrina (Marks M i col., 1995; Copier J i col., 1996; Liu SH i col., 1998).



Figura 7. Comparació de l'estructura d'HLA-DM i HLA-DR1 (A) DM (groc), DR1 (vermell). (B) Sobreposició dels solcs d'unió a antigen de DR1 i de la regió homòloga d'HLA-DM. Figura de Mosyak, 1998, Immunity.

El paper de DM com a molècula editora dels pèptids associats a MHC II es va destacar amb l'estudi de línies mutades que tot i expressar nivells normals de DR3 a la superfície cel.lular, eren deficientes per la presentació d' antigen a les cèl.lules T CD4⁺. Aquestes cèl.lules presentaven una deleció dels gens DMA i DMB, codificants pel dímer DM, i expressaven molècules MHC II a la superfície cel.lular associades a CLIP (Mellins E i col., 1990; Riberdy JM i col., 1992; Fling SP i col., 1994; Morris P i col., 1994). Estudis posteriors han confirmat el rol de DM com a chaperona que facilita l'alliberació de CLIP del solc d'unió a l'antigen, i accelera la interacció de les MHC II amb un pèptid adequat (Denzin LK i col., 1995; Sherman MA i col., 1995), descartant aquells pèptids incapaços de conferir estabilitat suficient al complex trimèric (Sloan VS i col., 1995). L'intercanvi peptídic induït per DM segueix la cinètica de Michaelis-Menten, fet que suggereix que DM actua com a catalitzadora de la interacció entre el pèptid i

les MHC II, recol.zant el ratio DM:HLA-DR subestequiomètric detectat en els compartiments endocítics tardans (1:5) (Vogt AB i col., 1996; Zarutskie J i col., 2001).

DM catalitza l'intecanvi peptídic establint interaccions hidrofòbiques amb el dímer MHC II i estabilitzant-lo mentre està "buit" de pèptid (Kropshofer H i col., 1997; Doebele CR i col., 2000). Al pH dels endosomes tardans i en absència de CLIP o d'altres pèptids capaços d'estabilitzar el complex, les MHC II es desnaturalitzen i agreguen abans de ser degradades als lisosomes (Denzin LK i col., 1996). Així doncs, DM actua com a chaperona en la maduració de les MHC II, permetent que aproximadament el 20-25% de les MHC II en els compartiments endocítics de les cèl.lules B en repòs es trobin buides i receptives per unir un pèptid (Kropshofer H i col., 1997).

Les MHC II pateixen alguns canvis conformacionals durant la seva maduració que són controlats per DM (Verreck FA i col., 2001). El solc d'unió a pèptid de les MHC II presenta un equilibri entre dos estats conformacionals: un estat "obert" del solc, i un estat "tancat". DM presenta una afinitat superior pels dímers DR que presenten una conformació "oberta", o sia, aquells que es troben buits o associats amb pèptids de baixa estabilitat (Kropshofer H i col., 1996). S'ha suggerit que la interacció de DM amb MHC II indueix la conformació oberta del dímer, mitjançant el trencament d'algun dels ponts d'hidrogen establerts entre el pèptid i les MHC II, accelerant d'aquesta manera l'alliberació de CLIP i d'altres pèptids de baixa afinitat (McFarland BJ i col., 1999; Jensen PE i col., 1999). Segons aquest model, la unió estable d'un pèptid a les MHC II induiria un canvi conformacional al complex, assolint-se la conformació "tancada" del solc i la conseqüent alliberació de DM. L'efecte final de l'expressió d'HLA-DM, és que exerceix un control sobre els pèptids, determinant el repertori final que serà presentat a la superfície de l'APC. Aquest model del control de qualitat exercit per DM és recol.zat tant pels resultats obtinguts en la cinètica d'aparició dels intermediaris MHC II receptius a la unió peptídica en els endosomes tardans, com pel fet que els complexos formats pels pèptids associats a MHC II en presència de DM, presenten una conformació estable (Rabinowitz JD i col., 1998; Chou CL i col., 2000).

La funció d'HLA-DM és modulada principalment per HLA-DO però també podria ser influenciada per algunes molècules de la família tetraspan, com el CD82 i el CD63, que s'han descrit associades a MHC II i DM formant microdominis als endosomes i a la superfície cel.lular (Rubinstein E i col., 1996; Hammond C i col., 1998; Kropshofer H i col., 2002).

Pel que fa a les MHC I, l'associació amb els pèptids antigènics adequats requereix l'acció coordinada de diferents chaperones i proteïnes accessòries de l'ER, que es coneixen com "el complexe carregador de pèptid" (Cresswell P i col., 1999). La Tapasina (Tpn) és una glicoproteïna resident en l'ER que actua de pont entre el complex transportador de pèptids (TAP) i els dímers MHC I. La Tpn estabilitza l'heterodímer TAP-1/TAP-2, i conjuntament amb Erp57 i la calreticulina intervé en l'estabilització del complexe cadena pesada- β 2m (Lehner PJ i col., 1998; Ortmann B i col., 1997). De manera semblant a HLA-DM, el rol principal de la tapasina és el d'augmentar l'eficiència de la interacció pèptid-MHC I (Garbi N i col., 2000; Grandea AG i col., 2000), seleccionant la unió de MHC I a pèptids d'elevada estabilitat

(Barnden J i col., 2000; Purcell AU i col., 2001). Es coneix poc sobre el mecanisme molecular que permet a la tapasina seleccionar el repertori de pèptids associats a MHC I. S'ha proposat un model en el qual la tapasina podria induir una conformació oberta dels dimers MHC I en l'ER, facilitant l'associació i el control de qualitat del repertori de pèptids presentats, de manera similar a HLA-DM. Recentment, el rang d'acció de la tapasina s'ha ampliat amb la demostració de que aquesta molècula també és necessària per l'associació a pèptid i l'expressió a superfície de la molècula MHC de classe I no clàssica, H2-M3 (LybargerL i col., 2001)

1.3.1. El modulador de l'activitat d'HLA-DM: HLA-DO/H2-O

Les molècules HLA-DO (DO, humana) i H2-O (murina) són heterodímers MHC-like, codificats en el MHC. Igual que HLA-DM, els dímers DO presenten un polimorfisme limitat i no s'associen a pèptids. La molècula HLA-DO s'expressa principalment en cèl.lules B i en algunes cèl.lules epitelials tímiques, però es troba absent en altres tipus cel.lulars i s'ha descrit una expressió molt baixa de DO en cèl.lules dendrítiques (Karlsson L i col., 1991; Douek DC i col., 1997). En les cèl.lules B, DO es troba formant un complex estable amb DM durant el transport intracel.lular des de l'ER fins als endosomes tardans, i recicla juntament amb DM entre els compartiments endosomals i la superfície cel.lular (Liljedahl M i col., 1998; van Lith M i col., 2001).

Diferents treballs indiquen que DO actua reduïnt la presentació d'alguns determinants antigènics mentre que afavoreix la presentació d'altres (van Ham SM i col., 2000). L'expressió de DO indueix una disminució en la presentació d'antigens captats per endocitosi de fluid per la cèl.lula B, mentre que afavoreix la presentació d'alguns antigens internalitzats via el receptor de la cèl.lula B (BCR), però no de tots (Liljedahl M i col., 1998; Alfonso C i col., 1999). A més, DO afavoreix la interacció amb pèptids a pH 4.5-5 però redueix les interaccions a PH 6-6.5, indicant que DO podria facilitar la presentació de pèptids presents en els endosomes tardans i reduir l'associació en els endosomes primerencs. Aquesta hipòtesis és recol.zada pel fet que el complex DM/DO interacciona estretament amb els dimers MHC II, augmentant-ne l'estabilitat (Kropshofer H i col., 1998). El resultat de l'expressió d'HLA-DO és una alteració del repertori de pèptids presentats a la superfície de la cèl.lula B, com a conseqüència d'un control de qualitat més astringent.

També s'ha descrit un altre efecte de DO que, mitjançant una senyal codificada en la cua citoplasmàtica de la cadena β , facilita la localització dels complexos DM/DO a la membrana perifèrica dels endosomes tardans, augmentant l'eficiència de la interacció amb MHC II (Kleijmeer M i col., 2001; van Lith M i col., 2001).

Recentment s'ha proposat un model per explicar la necessitat de l'expressió restringida d'HLA-DO en les cèl.lules B (Brocke P i col., 2002). In vivo, les cèl.lules B capten l'antigen mitjançant l'associació d'aquest amb el BCR i l'internalització del complex per l'eix EE-ET-L. El model hipotitza que l'expressió de DO podria esbiaixar la resposta humoral cap a la secreció d'anticossos d'elevada afinitat. Segons el model, un BCR que reconegés l'antigen amb

elevada afinitat romandria unit a aquest, fins l'arribada a compartiments tardans de la via endocítica on el complex DM/DO afavoriria l'associació dels pèptids a MHC II. D'altra banda els BCR de baixa afinitat alliberarien l'antigen unit en els endosomes primerencs, on sembla que DO redueix l'associació a MHC II. Com a conseqüència, només les cèl·lules B d'elevada afinitat per l'antigen presentarien eficientment pèptids d'aquest associats a MHC II per estimular les cèl·lules T CD4⁺ que, al mateix temps, permetrien la secreció d'anticossos d'elevada afinitat per l'antigen

1.4. Influència del polimorfisme en la biosíntesi de les MHC

El polimorfisme de les MHC també té efectes en la seva via de biosíntesi. Tot i que cada producte al·lèlic difereix dels altres només per un número petit d'AA, l'efecte combinat d'aquests canvis pot alterar dràsticament la manera en que aquests al·lèls interaccionen amb ells mateixos, amb altres molècules i la seva estabilitat a diferents pHs. Pel que fa a les MHC II, la primera característica dependent del polimorfisme és la necessitat d'Ii per al correcte plegament i sortida de l'ER. Per exemple, en absència d'Ii els dimers A^kA^b poden arribar a la superfície cel·lular seguint la via secretora constitutiva, mentre que els dimers A^bA^b, en les mateixes condicions, agreguen i queden retinguts en el lumen de l'ER (Bikoff EK i col., 1995). Els polimorfismes que es localitzen en el solc d'unió a l'antigen de les MHC II influeixen en l'afinitat de la interacció entre CLIP i els diferents al·lèls de MHC II i per tant, l'afinitat variable també té conseqüències importants pel rol jugat per HLA-DM/DO. En absència d'H2-DM alguns al·lèls (I-A^b o HLA-DR1) no uneixen pèptids antigènics i permaneixen units a CLIP, mentre d'altres (I-A^k o HLA-DR5) poden intercanviar CLIP per pèptids antigènics (Avva RR i Cresswell 1994; Stebbins CC i col., 1995; Wolf PR i col., 1998; Alfonso C i col., 1999; Kropshofer H i col., 1999).

També s'ha descrit una dependència variable per la tapasina en determinats al·lèls de MHC I (Neisig A i col., 1996; Turnquist MR i col., 2000).

1.5. Reconeixement del complex MHC pèptid per la cèl·lula T

Els limfòcits T reconeixen específicament els pèptids associats a les MHC mitjançant el complex receptor, format per l'ensamblatge del receptor de la cèl·lula T (TCR) i les diferents glicoproteïnes del CD3 a la superfície de la cèl·lula T (Punt JA i col., 1994). El TCR, format per dues cadenes, α i β , unides per un pont di-sofre intercatenari, presenta regions variables específiques de cada cèl·lula T, que li confereixen l'especificitat. L'heterodímer es troba associat a un conjunt de polipèptids invariants anomenat CD3 responsable de la transducció de senyals a l'interior cel·lular quan el TCR interacciona amb un lligand (Chan AC i col., 1992; Janeway CA Jr, 1994). L'organització dels gens que codifiquen per les cadenes α i β del TCR, és homòloga a la de les immunoglobulines. Les cadenes α estan formades pel reordenament de segments gènics V (variables), J (Joining, unió) i C (constants), mentre que les cadenes β

estan formades per l'ensamblatge de segments V, D (diversitat), J i C. El reordenament aleatori d'aquests segments, conjuntament amb altres mecanismes que tenen lloc durant la maduració de les cèl.lules T, genera un nombre enorme de receptors diferents, estimat en 10^{16} . Una gran part de la variabilitat de seqüència de cada TCR es troba localitzada en els dominis variables (CDR1, CDR2) i en la regió d'unió dels segments V,D (en el cas de les cadenes β) i J (CDR3) (Chothia C i col., 1988).

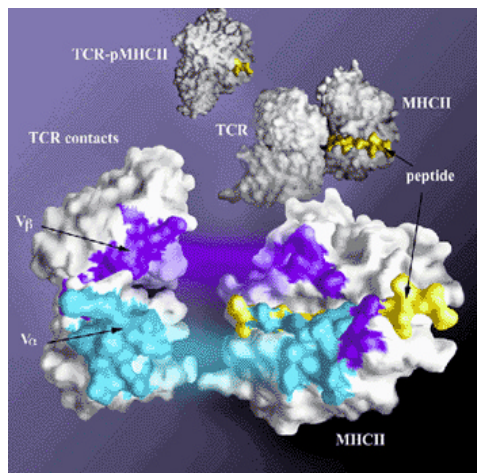


Figura 8 Reconeixement del complex MHC II-peptid pel TCR. El TCR es disposa amb orientació diagonal sobre l'eix MHC II-peptid, amb els loops formats per les regions hipervariables de les cadenes α i β CDR1 i CDR3 interaccionant amb la part central del peptid, mentre que les CDR2 interaccionen amb les MHC.

L'estructura cristal·logràfica del complex format per un TCR humà interaccionant amb un peptid de l'antigen tax del HTLV-I associat a HLA-A2 mostrà com el TCR presenta una orientació diagonal sobre l'eix del complex MHC-peptid, amb els loops formats per les regions hipervariables de les cadenes α i β CDR1 i CDR3 interaccionant amb la part central del peptid (Garboczi DN i col., 1996), mentre que les CDR2 interaccionen amb les MHC. La resolució d'altres complexos TCR-peptid-MHC tant de classe I com de classe II, han confirmat l'orientació descrita, indicant que aquest podria ser el mode d'unió més general (Garcia KC i col., 1996; 1998). La superfície del TCR que interacciona amb el complex peptid-MHC és relativament plana i interacciona amb 5-7 AA dels peptids associats a les MHC I, i amb 6-7 residus dels peptids de 9 AA associats a les MHC II.

Les PFRs dels peptids associats a les MHC II, a més de contribuir a l'estabilitat del complex trimolecular, tenen un rol específic en el reconeixement. S'ha proposat que la regió CDR1 de la $V\alpha$ del TCR reconeix els PFRs N-terminals mentre que la regió CDR1 de $V\beta$ reconeix els PFRs C-terminals (Carson RT i col., 1997). S'ha demostrat que la composició dels PFRs C-terminals influeix en l'activació de les cèl.lules T específiques, seleccionant determinades famílies de TCR $V\beta$ (Godkin J i col., 1998; 2001).

1.6. Activació de la cèl.lula T

El model d'activació de les cèl.lules T es basa en la necessitat de rebre dues senyals per assolir l'activació completa (Bretscher P i Cohn N., 1970). El limfòcit necessita una senyal

generada pel reconeixement del complex MHC-pèptid per part del TCR (primera senyal), i l'altra, generada per les molècules coestimuladores de les APCs. Lafferty i Cunningham van estendre aquest concepte, amb l'argument que la segona senyal es podia lliurar també per factors solubles alliberats per APCs properes, sense necessitat de contacte cel·lular (Lafferty KJ i Cunningham, 1975). A perifèria, el resultat del reconeixement d'antigen per la cèl.lula T en presència de coestimulació és l'expansió clonal i el desenvolupament de les funcions efectores, mentre que en absència de coestimulació, s'aborta la resposta, i s'indueix un estat d'inactivació funcional o anèrgia de la cèl.lula T (Matzinger P i col., 1994; Allison JP i col., 1994; Schwartz RH i col., 1996).

La decisió d'una cèl.lula T entre activació i tolerància depen de: i) l'estat de diferenciació de la cèl.lula T, ii) el tipus cel·lular que presenta l'antigen, i iii) l'estat d'activació de la cèl.lula presentadora d'antigen.

Les cèl.lules T es poden trobar en quatre estats de diferenciació que van des de cèl.lules T no activades (en repòs), cèl.lules T memòria no activades (en repòs), cèl.lules T activades i cèl.lules T efectores. Els requeriments de coestimulació disminueixen progressivament amb l'estat de maduració de les cèl.lules T.

La seqüència antigènica presentada també influeix en el tipus de resposta iniciada. Canvis en un únic residu del pèptid associat a MHC, ja sigui en els residus del *core* com en les PFRs poden influir en el reconeixement per la cèl.lula T condicionant la resposta. Diferències en el metabolisme específic del tipus cel·lular que presenta l'antigen i l'estat d'activació i diferenciació d'aquest, pot donar lloc a l'aparició de pèptids anàlegs o APLs (altered peptide ligand) amb capacitat per a inhibir (antagonista), mimetitzar (agonista), anergitzar o activar parcialment (agonista parcial) les cèl.lules T (Nicholson LB i col., 1995; Wucherpfenning KW i col., 1995).

2. AUTOIMMUNITAT

El sistema immunològic ha desenvolupat mecanismes molt diversos per defensar l'organisme hoste d'agents patògens i situacions anormals, minimitzant el dany causat per les respostes de defensa. Aquesta capacitat comporta l'educació dels elements cel·lulars del sistema immunitari, mitjançant la generació de tolerància als antigens propis durant l'ontogènia dels limfòcits T i B, i la necessitat del manteniment d'aquesta tolerància una vegada els limfòcits madurs arriben a perifèria i als òrgans limfàtics secundaris.

L'eliminació dels limfòcits T autorreactius durant la seva ontogènia en el timus és el mecanisme central en l'establiment de la tolerància als antigens propis. Pel que fa als antigens d'expressió ubiqüa, poden ser presentats per MHC de classe I seleccionant limfòcits T CD8⁺ (Townsend A i col., 1989), o bé units a les MHC II i seleccionant cèl.lules T CD4⁺ (Brodsky FM i col., 1991). La detecció de l'expressió d'antigens perifèrics (circulants, teixit-específics o segrestats) en el timus (Wakkach A i col., 1996; Sospedra M i col., 1998; Spitzweg C i col., 1999; Bruno R i col., 2002) recol·za el rol de l'educació tímica com el principal mecanisme per

establir tolerància per aquesta categoria d'antigens, tot i que l'expressió en el timus de molts dels antigens perifèrics és temporal, disminueix amb l'edat, i sembla ser menor per aquells antigens més inacessibles i major per als més abundants o de major distribució (Sospedra M i col., 1998). El resultat del procés d'educació tímica és que les cèl·lules T madures que arriben a la perifèria són cèl·lules T autorreactives d'afinitat baixa pels autoantigens però que poden presentar una afinitat elevada pels antigens foranis (Fairchild PJ i col., 1996; Mason D i col., 1992), per això és freqüent trobar anticossos i cèl·lules T circulants amb la capacitat de reconèixer antigens propis perifèrics com la peroxidasa tiroidea (TPO) (Dayan C i col.; 1991), el col·àgen (Lacour M i col., 1990, Londei M i col., 1989) i inclús contra antigens segregats com la MBP (Martin R i col., 1990; Wekerle H i col., 1996). Aquesta sortida a perifèria de cèl·lules T madures que reconeixen pèptids propis amb baixa afinitat, posa de manifest la necessitat d'altres mecanismes responsables del manteniment de la tolerància a perifèria, per evitar les respostes autorreactives que es podrien donar quan els antigens propis són presentats a les cèl·lules T en processos inflamatoris derivats de la resposta contra patògens.

La ignorància immunològica, la inducció d'anèrgia i la desviació o regulació de la resposta immunitària són part dels mecanismes que sinèrgicament mantenen l'equilibri entre tolerància i immunitat a la perifèria. Actualment, es tendeix a pensar que els mecanismes de tolerància a antigens tissulars presenten diferents nivells de control i que quan el balanç entre tolerància i immunitat s'altera en individus susceptibles, es produeixen les malalties autoimmunitàries. El resultat del trencament de l'autotolerància pot induir una alteració clínicament detectable en el teixit diana.

Les malalties autoimmunitàries es poden classificar en dos grans grups: (i) Malalties autoimmunitàries específiques d'òrgan: són aquelles en les que la resposta va dirigida contra un escàs nombre d'antigens localitzats en un únic teixit que a la vegada està confinat en un òrgan determinat. Aquestes malalties s'associen a la producció d'autoanticossos específics i a la presència de cèl·lules T reactives davant d'antigens de l'òrgan diana; (ii) Malalties autoimmunitàries sistèmiques: són aquelles en les que els antigens contra els quals es dirigeix la resposta es troben àmpliament distribuïts en diferents teixits. Aquestes malalties, normalment s'associen a l'hiperreactivitat dels limfòcits B i a una elevada producció d'anticossos.

La majoria de malalties autoimmunitàries són malalties multifactorials d'origen desconegut o idiopàtiques. L'herència d'aquestes malalties no és mendeliana i són generalment malalties complexes en les que es fa difícil separar les influències ambientals de la susceptibilitat genètica. S'ha observat una tendència a l'augment de la incidència d'algunes d'aquestes malalties amb l'edat i sovint són més comuns en les dones que en els homes, indicant l'influència de factors hormonals. La incidència de les malalties autoimmunitàries també és diferent entre els diferents grups ètnics i varia amb factors ambientals com la localització geogràfica o determinats factors de la dieta. Tot i que moltes de les observacions anteriors són suggerents, encara no es coneixen molts dels mecanismes moleculars, a través

dels quals els factors ambientals poden influir en el desencadenament de les malalties autoimmunitàries.

2.1. Autoimmunitat Endocrina

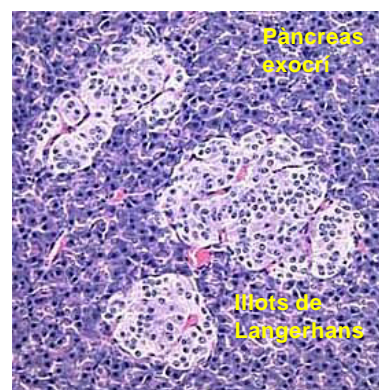
Dins de les malalties autoimmunitàries específiques d'òrgan hi ha un subgrup que inclou aquelles malalties que afecten específicament a les cèl·lules endocrines. El sistema endocrí coordina la fisiologia del cos i intervé en respostes davant d'estímuls interns o externs. Les cèl·lules endocrines són de llinatge epitelial i estan altament especialitzades per la producció d'hormones, que se secreten al flux sanguini i actuen en diferents llocs arreu del cos. Normalment les cèl·lules endocrines es localitzen agrupades en glàndules (pituitària, tiroïdal, pàncreas, adrenals, ovaris) i en alguns casos resideixen en altres òrgans (ex: les cèl·lules gàstriques en l'estómag). Les malalties autoimmunitàries endocrines es donen com a conseqüència del trencament de la tolerància cap a les cèl·lules endocrines i algunes de les molècules sintetitzades exclusivament per aquests tipus cel·lulars.

Les característiques d'algunes de les principals malalties autoimmunitàries endocrines es resumeixen a continuació.

2.1.1. Diabetis de tipus 1: DM-1

La porció endocrina del pàncreas s'organitza en en petits grups cel·lulars anomenats illots de Langerhans que es localitzen enmig del teixit exocrí majoritari (Figura 10). Els illots pancreàtics estan constituïts per tres tipus cel·lulars: les cèl·lules alfa que secreten el glucagó, les cèl·lules delta que secreten la somatostatina, i les majoritàries, les cèl·lules beta que produeixen la insulina i són les cèl·lules diana de la resposta autoimmunitària en la diabetis de tipus 1. Les cèl·lules beta ocupen la porció central de l'illot i es troben envoltades per un anell de cèl·lules alfa i delta. Tot i que els illots de Langerhans només representen entre l'1-2% de la massa pancreàtica, reben sobre el 10-15% del flux sanguini pancreàtic i estan inervats pel sistema nerviós simpàtic i parasimpàtic.

Figura 9 Histologia dels illots de Langerhans del pàncreas. Tinció amb hematoxilina-eosina d'una secció de pàncreas humà en la que s'observen tres illots de langerhans formats per les cèl·lules endocrines α , β i δ ; immersos enmig del component exocrí.



La diabetis de tipus 1 (DM1) es produeix com a conseqüència de la destrucció selectiva de les cèl·lules beta, que es tradueix en una deficiència d'insulina i l'hiperglicèmia.

La DM1 representa entre el 5 i el 10% de les diferents diabetis, i presenta una freqüència semblant entre homes i dones. Sovint, es desenvolupa en nens i adults joves. La resposta autoimmunitària en la DM1 és tant de naturalesa humoral com cel.lular. S'han descrit autoanticossos anomenats ICA (islet cell antibodies) que reaccionen contra molècules citoplasmàtiques dels illots. Dins de les reactivitats ICA s'han definit anticossos contra la insulina, contra la descarboxilasa de l'àcid glutàmic (GAD65), contra una tirosin fosfatasa anomenada ICA-512, i contra la carboxipeptidasa H (CPH) (Botazzo GF i col., 1986). El 80% de la reactivitat dels ICAs va dirigida contra GAD i ICA-512. Els ICAs apareixen abans del debut clínic però no presenten una correlació clara amb la progressió de la malaltia. Aquest fet, juntament amb la incapacitat de transferir la malaltia mitjançant sèrums ICA⁺, suggereix que el component humoral no intervé directament en els mecanismes patogènics de la resposta autoimmunitària. El component cel.lular de la diabetis, anomenat insulitis, es caracteritza per un infiltrat limfocitari (CD8⁺> CD4⁺) (Hanninen A i col., 1992, Somoza N i col., 1994) que envolta els illots de Langerhans. La manca d'accés a pàncreas de pacients diabètics ha dificultat els estudis immunològics en humans i en gran part els estudis sobre aquesta afectació s'han desenvolupat en dos models animals d'una malaltia espontània amb característiques molt semblants a la DM1: el ratolí NOD (non-obese diabetic mice) i la rata BB (bio-breeding rat).

La diabetis autoimmunitària humana està associada a DR3 i DR4 i en menor grau a DR1 i DR8. DR3 i DR4 per separat confereixen un risc relatiu però són els individus heterozigots DR3/DR4 els que presenten un risc major. DQ3.2 és un determinant de susceptibilitat important dins de l'haplotip DR4. D'altra banda DR2 i en menor grau DR5 es troben negativament associats a la malaltia. També s'han descrit associacions importants entre polimorfismes de TNF β i la DM1 (Badenhoop K i col., 1989). En humans hi ha cinc regions cromosòmiques, inclòs el MHC, que mostren associació amb la DM1: la regió HLA en el cromosoma 6p21 (IDDM1) i la regió del gen de la insulina en el cromosoma 11p15 (IDDM2); dues regions als cromosomes 11q (IDDM4) i 6q (IDDM5) (Davies M i Day J, 1994). Tot i així la concordança en desenvolupar DM1 en bessons monozigots és només del 50%.

2.1.2. Autoimmunitat tiroïdal: AITDS

La glàndula tiroïdal produeix les hormones T3 i T4 que regulen funcions metabòliques cooperant amb altres factors en diferents teixits del cos. La síntesi de les hormones tiroïdals requereix la captació de iode de la sang per a incorporar-lo a la pro-hormona tiroglobulina, precursora de la T3 i la T4. La glàndula tiroidea humana és bilobular i les cèl.lules epitelials tiroïdals, s'organitzen en fol.licles a l'interior dels quals es troba el col.loïd, magatzem de la pro-hormona tiroglobulina (Figura 10 i 11).

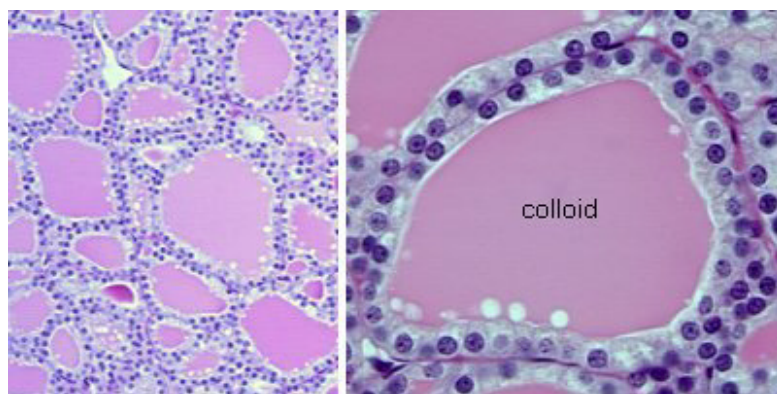


Figura 10 i 11 Histologia dels fol·licles tiroïdals. Les cèl·lules endocrines de la tiroïdes s'organitzen en fol·licles a l'interior dels quals hi ha el col·loïd on se secreten les hormones tiroïdals.

2.1.2.1. Tiroïditis de Hashimoto (HT): És una malaltia autoimmunitària que dona lloc a un hipotiroidisme com a resultat de la destrucció del teixit tiroïdal. Té una incidència de 0.3-1.5 per 1000 casos l'any i afecta de manera desigual homes i dones (1:20), generalment entre els 30 i 50 anys. Immunològicament es caracteritza per la presència d'un infiltrat limfocitari important de cèl·lules T ($CD8^+ > CD4^+$), cèl·lules B plasmàtiques i macròfags, que envaeix àmpliament la tiroïde. També es detecten nivells alts d'anticossos dirigits sobretot contra la peroxidasa tiroïdal, proteïna localitzada a la membrana apical de les cèl·lules fol·liculars, i en un nivell més baix contra la tiroglobulina, pro-hormona secretada al col·loïd. L'activitat citotòxica dels anticossos anti-peroxidasa tiroïdal detectada en estudis *in vitro* i la important infiltració limfocitària indiquen que tant la resposta humoral com la cel·lular estarien implicades en la patogènesis de la tiroïditis de Hashimoto.

2.1.2.2. Graves-Basedow (GD): És la tiroïdopatia més freqüent i les dones d'entre 30 i 40 anys presenten una incidència 5 i 10 vegades superior als homes. Es caracteritza per una hiperplasia i hiperfunció de la glàndula. A nivell immunològic destaca la presència d'infiltració difusa de grau molt variable, formada majoritàriament per cèl·lules T ($CD4^+ > CD8^+$), cèl·lules B i cèl·lules plasmàtiques. Aquesta afectació es caracteritza sobretot per la presència d'anticossos anti-TSH-R estimulants i bloquejants de la funció tiroïdal que donen lloc a tirotoxicosis. Un percentatge elevat de pacients també tenen anticossos anti-Tg i anti-TPO.

En les malalties autoimmunitàries de la tiroïdes (AITDs) les associacions amb factors genètics són menys fortes. La concordança per AITD en germans amb HLA idèntic només és del 7% (Stenszky V i col., 1985). Estudis més recents han demostrat la transmissió preferent de l'haplotip DR3, DQ2 i DQ5 entre pares i fills amb Graves, però no en fills no afectats. Altres estudis han demostrat que l'al·lel DQA1*0501, tot i que presenta desequilibri de lligament amb DR3, per sí sol també confereix susceptibilitat a GD en pacients que no expressen DR3 (Yanagawa T i col., 1993). Associacions importants també s'han descrit per polimorfismes del

TNF β amb la malaltia de Graves (Badenhoop K i col., 1992), i entre aquesta i les proteïnes C4 del complement i hsp70 (Ratanachaiyavong S i col., 1993). Tots aquest gens estan localitzats a la regió de classe II del MHC.

2.1.3. Malaltia d'Addison

La glàndula adrenal es troba encapsulada per teixit connectiu que exten septes cap a l'interior de la glàndula. Es troba concèntricament dividida en dues zones endocrines: el córtex i la medulla, que produeixen hormones esteroids i catecolamines, respectivament. El córtex es troba dividit en tres subregions histològicament diferenciades (i) zona glomerulosa formada per cèl·lules que secreten mineralocorticoids (aldosterona); (ii) zona fasciculata que conté cèl·lules secretores de glucocorticoids (cortisol); i (iii) zona reticularis formada per cèl·lules productores d'esteroids sexuals (androgens) (Figura 12).

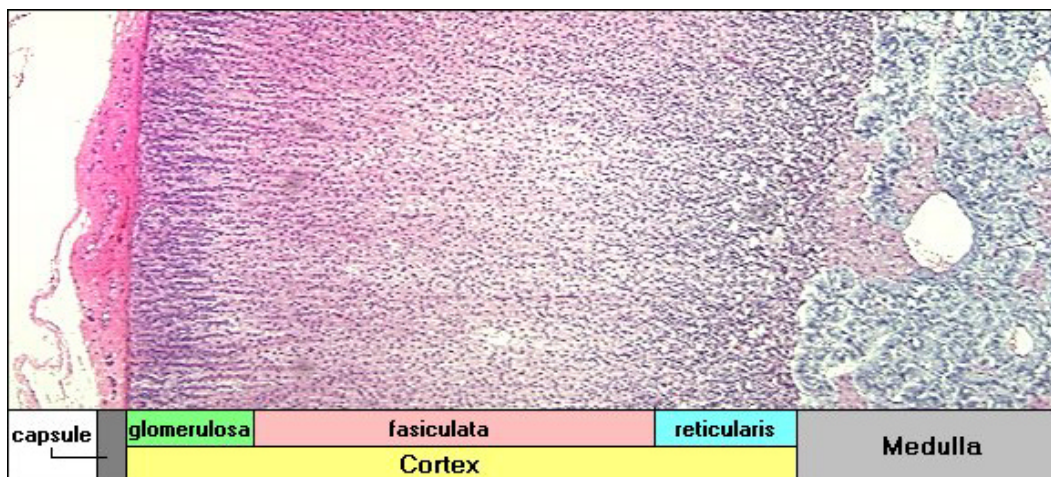


Figura 12. Histologia de la glàndula adrenal

La malaltia d'Addison és una insuficiència adrenal que es produeix com a conseqüència de la destrucció de les cèl·lules productores de mineralo i glucocorticoids del córtex adrenal. Es caracteritza per nivells alterats de cortisol (hipocortisolisme) i de vegades, també d'aldosterona que produeixen hipotensió i hiperpotasèmia. Presenta una incidència baixa d'1/20.000 individus i es dona en igual proporció en homes i dones. Sovint es presenta associada a d'altres afectacions autoimmunitàries i aleshores s'anomenen malalties autoimmunitàries poliglandulars (PGAD). A nivell immunològic el 87% dels malalts presenten autoanticossos específics pel córtex adrenal (ACA) tot i que la seva presència és força variable. El principals components de la reactivitat ACA, són anticossos que reconeixen l'autoantigen 21-hidroxilasa (Döderbergh WO i col., 1996). Probablement, els autoanticossos tenen un paper negligible en la destrucció del córtex adrenal. L'adrenalitis o infiltrat limfocitari que s'observa en les glàndules afectes d'Addison, presenta un aspecte difús i es dona en grau variable. Majoritàriament està format per cèl·lules T, cèl·lules plasmàtiques i macròfags. La malaltia d'Addison presenta una associació amb els al·lels d'HLA-DRB1*0301, DQA1*0501, DQB1*0201.

2.2. Característiques de les MHC de classe II que confereixen susceptibilitat a l'autoimmunitat endocrina

L'existència d'un component genètic de predisposició a l'autoimmunitat endocrina és evident des del punt de vista clínic, ja que no és estrany observar diferents casos d'aquestes malalties en la mateixa família i/o individu. L'observació que les molècules de classe II podien tenir una associació positiva, neutral o negativa amb determinades malalties autoimmunitàries (Nepom GT i col., 1990), va centrar part dels estudis sobre els mecanismes que mediarien la predisposició a l'autoimmunitat per aquestes molècules. Les evidències funcionals més clares de la importància de les MHC II en l'autoimmunitat patològica arribaren de mans dels ratolins NOD, model de diabetis espontània. Els ratolins NOD no expressen molècules I-E i expressen una única forma de la cadena β d'I-A (β^{g7}). Al generar ratolins transgènics NOD que expressaven una forma mutant I-A β^{g7} , o bé altres molècules de classe II no diabetogèniques, es prevenia la malaltia (Lund T i col., 1990; Miyazaki T i col., 1990), tot i l'expressió de la resta de gens de predisposició.

Tot i les evidències clíniques, el mecanisme que relaciona els polimorfismes de les MHC II i la susceptibilitat a l'autoimmunitat endocrina no està clar. Diversos al·lels de les MHC II positivament associats a l'autoimmunitat endocrina en humans (HLA-DQA1*0301 i DQB1*0302) i en models d'autoimmunitat murina (I-A^{g7}), presenten una inestabilitat intrínseca elevada (Tisch R i col., 1996; Nepom GT i col., 1998) que ha permès suggerir la possibilitat que en el timus d'aquests individus es produeixi una selecció negativa alterada (Zipris D i col., 1991). L'ineficiència que presenten les MHC II associades a malalties autoimmunitàries per unir-se establement a determinats pèptids propis permetria que més cèl·lules T CD4⁺ autorreactives escapessin de la selecció negativa (Ridgway WM i col., 1998). L'inestabilitat dels complexos MHC-pèptid en el timus donaria lloc a una disminució de la vida mitjana de les MHC II a la superfície cel·lular i a una reducció de la concentració d'antigen presentada que afavoriria l'augment de l'afinitat de les cèl·lules T seleccionades que arribarien a perifèria (Carrasco-Marin E i col., 1996; 1999). S'ha demostrat que en els ratolins NOD el repertori de cèl·lules T seleccionat que arriba a perifèria és capaç d'induir diabetis per transferència adoptiva en altres soques normals (Thomas-Vaslin V i col., 1997), suggerint que la selecció tímica en aquests animals permet la maduració d'una proporció més elevada de cèl·lules T autorreactives. En animals NOD transgènics que coexpressen I-A^b amb I-A^{g7}, la selecció tímica dona lloc a un repertori T a perifèria que té reduïda la capacitat diabetogènica (Lund T i col., 1990; Miyazaki T i col., 1990), suggerint que l'efecte de les MHC II associades a AI sobre el repertori de cèl·lules T madures a perifèria queda diluïda per la coexpressió d'altres al·lels de MHC II. Per això, les característiques intrínseques del model NOD amb l'expressió homozigota de la molècula I-A^{g7} i la consegüent oligoclonalitat del repertori T seleccionat, dificulta l'extrapolació de la importància d'aquest efecte en els processos autoimmunitàris humans on l'expressió normalment heterozigota de DR, DP i DQ, influeix en els processos de selecció tímica donant lloc a un

repertori T molt més ampli. D'altra banda, aquest model ofereix una explicació per l'augment de la incidència en la diabetis autoimmunitària humana i en el model murí de diabetis espontànea NOD per l'homozigositat en el MHC o pel fet d'expressar simultàniament 2 al·lels inestables.

Una segona hipòtesi per explicar l'associació entre MHC II i autoimmunitat suggereix que els polimorfismes específics dels al·lels de MHC II que predisposen a l'AI condicionarien l'associació amb determinants antigènics concrets, que no s'associarien als al·lels relacionats amb la protecció a aquestes malalties (Acha-Orbea H i McDevitt HO, 1987; Todd JA i col., 1987; Morel P i col., 1988). Pel que fa a HLA-DR, s'ha demostrat que dos polimorfismes de la cadena HLA-DR β (posicions β 71 i β 57) condicionen els residus P4 i P9 dels pèptids associats. S'ha suggerit que el residu β 71 que en els al·lels associats a malaltia (ex: DRB1*0401,0404,0101) presenta un residu positivament carregat (Arg), afavoreix l'associació amb pèptids que presentin un residu negativament carregat en P4. L'efecte contrari s'observa en els al·lels associats amb resistència a AI (ex: DRB1*0403) que presenten un residu negativament carregat en β 71 (Glu) i seleccionen seqüències amb residus positivament carregats en P4 (Hammer J i col., 1993; 1995). A favor d'aquesta hipòtesi, s'han descrit diferents seqüències dels principals autoantigenes de cèl·lules T amb elevada afinitat pels al·lels de les MHC II associades amb l'AI endocrina. Mitjançant ratolins transgènics per DRB1*0401 s'identificaren els epítops de l'autoantigen GAD65 naturalment associats a DR4 (Patel SD i col., 1997). Paral·lelament un estudi mitjançant clons T derivats d'individus diabètics permeté la identificació d'epítops del GAD65 preferentment associats a DR i de l'autoantigen pancreàtic IA-2 (Peakman N i col., 1999).

Tot i les diferents possibilitats esmentades, les característiques estructurals dels al·lels de MHC II associats a les respostes autoimmunitàries endocrines són iguals per les molècules expressades tant a nivell tímic com a nivell perifèric, per tant, s'han de donar altres factors que permetin alteracions en la presentació d'antigen amb la capacitat de desencadenar el trencament de la tolerància a perifèria.

2.3. Paper de les cèl·lules epitelials endocrines en les malalties autoimmunitàries

Un factor comú de totes les malalties autoimmunitàries endocrines és que la diana de la resposta són les cèl·lules epitelials endocrines. Aquestes cèl·lules es caracteritzen pel seu elevat grau de diferenciació i per l'expressió de moltes molècules específiques del teixit, que són els autoantigenes contra els quals es desenvolupa la resposta immunitària.

2.3.1. L'alteració i la mort de la cèl·lula endocrina, inici i final de la resposta autoimmunitària.

El fet que les cèl·lules T verges convencionals no entrin als teixits (Zinkernagel RM i col., 1997), suggereix que el primer contacte entre l'autoantigen endocrí i la cèl·lula T ha de tenir lloc en el gangli limfàtic regional mitjançant APCs professionals. Com que els autoantigenes

descrits fins al moment, es troben presents a molt baixa concentració en el flux sanguini, aquesta hipòtesi implica que és en el teixit endocrí on les APCs professionals captarien els autoantigens, activant-se i migrant fins als òrgans limfàtics secundaris per presentar-los a les cèl.lules T. Per tant, s'hauria de produir una alteració desencadenada per lesions locals que permetés el pas d'autoantigens a les cèl.lules APCs professionals i iniciés un procés inflamatori. Unanue i col.laboradors van demostrar en ratolins NOD/SCID l'existència d'un trànsit lent però continu de cèl.lules APCs (macròfags i cèl.lules dendrítiques) des dels illots pancreàtics cap als teixits limfoides secundaris més propers. En aquests animals, la incidència de diabetis era proporcional al nombre d'APCs presents als illots (Shimizu J i col., 1995). Posteriorment, ambdós tipus cel.lulars s'han descrit com les cèl.lules presentadores implicades en l'inici de les respostes autoimmunitàries en altres models (Arnush M i col., 1998; Steinman R i col., 2000). En humans no hi ha la possibilitat d'estudiar l'inici de les respostes autorreactives ja que majoritàriament són assintomàtiques fins que la destrucció de les cèl.lules endocrines és suficientment alta, però s'ha detectat un augment de cèl.lules dendrítiques en els infiltrats de pacients amb tiroïditis, comparat amb les glàndules control (Kabel PJ i col., 1988).

Avui en dia, encara no es coneixen els agents responsables de l'inici de les malalties autoimmunitàries i es tendeix a acceptar que existeixen una sèrie de factors ambientals que incideixen sobre un sistema predisposat (Weetman AP i col., 1994). En models experimentals s'han descrit diversos factors que permetrien l'alliberació inicial d'autoantigens i l'inici de la resposta autorreactiva:

2.3.1.1. Variacions o mancances en la dieta: Els resultats obtinguts amb el model de rates Wistar demostraren com una deficiència de iode en la ingesta, produïa alteracions en la glàndula tiroïdal induïnt una acumulació de cèl.lules dendrítiques a la tiroide prèvia a l'inici de la resposta autoimmunitària (Simons PJ i col., 2000).

2.3.1.2. Mort fisiològica: En el model de diabetis NOD, la infiltració del pàncreas ja s'observa en ratolins de 3-4 setmanes en forma de peri-insulitis, però la diabetis provocada per la destrucció de les cèl.lules beta no es dona fins a les 12 setmanes de vida. S'ha descrit que en edats prèvies al desenvolupament de la insulitis (14-17 dies post-naixement) es produeix una mort fisiològica de cèl.lules β dins del seu turn-over normal (Finegood DT i col., 1995; Trudeau JD i col., 2000). Aquesta onada de mort cel.lular s'ha observat en ratolins susceptibles i resistent a la diabetis espontànea, però podria iniciar l'arribada d'autoantigens a les APCs professionals i iniciar la resposta autorreactiva en els individus susceptibles.

2.3.1.3. Estrés cel.lular: En estudis in vitro, s'ha observat que les cèl.lules β presenten una major vulnerabilitat en front a diverses citocines (IL-1, IFN γ), òxids nítrics i radicals d'oxigen (Thomas HE i col., 2002). Aquests resultats suggereixen que les cèl.lules β en front d'aquests agents es destruirien permetent la captació dels seus restes per les APCs professionals presents en el teixit. Tot i així, aquesta major susceptibilitat també és compartida per la resta de cèl.lules formadores de l'illot de Langerhans i la resposta només es desenvolupa contra les cèl.lules productores d'insulina (Pipeleers D i col., 1986; Kröncke KD i col., 1991).

2.3.1.4. Mimetisme molecular: Existeixen dades experimentals que suggereixen que els virus i altres agents infecciosos poden estar implicats en l'inici de l'autoimmunitat específica d'òrgan (Challoner PB i col., 1995; Perron H i col., 1997) ja que poden presentar estructures proteiques molt semblants a components propis de l'hoste al que infecten. Una resposta immunitària contra aquestes proteïnes del patògen podria donar lloc a una cross-reacció amb els elements propis, per un mecanisme anomenat mimetisme molecular, i activar cèl·lules T autorreactives de perifèria que es dirigirien a l'òrgan diana on podrien iniciar la resposta. Hi ha moltes evidències de reactivitat creuada entre antigens vírics o bacterians i components propis de l'hoste. En el cas de la DM1 humana s'ha detectat reacció creuada entre proteïnes del virus Coxsackie B4 (P2-C) i el GAD65 (Atkinson MA i col., 1994). També s'ha descrit una reacció creuada entre antigens de determinades soques de *Y. Enterocolitica* i el TSH-R, encara que en treballs posteriors no s'han pogut confirmar associacions clares entre els agents infecciosos i l'autoimmunitat endocrina (Yanagawa T i col., 1995).

Les respostes autoimmunitàries es caracteritzen per ser processos lents que assoleixen la cronificació. Durant el desenvolupament d'aquestes respostes es produeix una diversificació de l'especificitat i el ventall de determinants reconeguts per les cèl·lules T autorreactives augmenta i canvia amb el temps. Aquesta extensió de la resposta inicial cap a nous epítops endògens s'anomena expansió d'epítops i s'ha observat dins d'un mateix autoantigen (intramolecular) o bé cap a nous autoantigens (intermolecular). En el model de diabetis espontània NOD, inicialment s'observa resposta contra GAD65, però en etapes posteriors de la malaltia la resposta es diversifica a altres antigens com ara la insulina i la carboxipeptidasa H (CPH) (Kaufman DL i col., 1993; Tisch R i col., 1993). La cronicitat i la diagnòsi tardana ha dificultat l'estudi de les respostes T dominants en les diferents etapes d'aquestes malalties que es troben altament regulades i en continu balanç entre la tolerància i la immunitat vers els antigens diana. L'heterogeneïtat cel·lular dels infiltrats de les glàndules afectades per l'autoimmunitat endocrina i el caràcter crònic dels processos autoimmunitaris suggereix una regulació complexa de la resposta (Roura-Mir C, tesis doctoral, 2000). Les cèl·lules T autorreactives només representen una petita part de les cèl·lules infiltrants, tot i que s'ha suggerit que podrien regular l'enorme quantitat de cèl·lules no específiques de l'infiltrat (Steinman L i col., 1999). Pel que fa a les respostes T i com a conseqüència de la accessibilitat del material, les respostes més caracteritzades són les que afecten a la glàndula tiroïdal. En les AITDs, una elevada proporció de les cèl·lules T aïllades dels infiltrats amb fenotip activat (determinat per l'expressió del receptor de la IL-2) mostren reactivitat en front de les cèl·lules endocrines tiroïdals autòlogues en absència d'altres APCs (Londei M i col., 1985; Weetman AP i col., 1986; Dayan C i col., 1991; Catálfamo M, tesis doctoral, 1999). Es coneix que en molts casos el reconeixement de les cèl·lules endocrines està restringit per les MHC II però no s'han definit els antigens involucrats.

La complexitat de la resposta ha donat lloc a molts resultats contradictoris o complementaris en models experimentals que descriuen diversos mecanismes directes i indirectes que permetrien a les cèl·lules T específiques provocar la mort de les cèl·lules β . A

més de la citotoxicitat mediada per perforina, l'expressió de Fas, TNFR11, o la presència de citoquines (IL-1, TNF α) i molècules com iNOS, són diferents vies que condueixen a la mort de la cèl.lula β i, al eliminar-se la font d'antigen, al final de l'autorreactivitat (Mueller C i col., 1995; Thomas HE i col., 1999; 2000; Herrera PL i col., 2000).

2.3.2. La cèl.lula endocrina com a cèl.lula presentadora d'antigen. Estudis fenotípics.

La resposta inflamatòria en l'òrgan diana, permet per una banda un reclutament extensiu i no específic de cèl.lules T cap al teixit, i d'altra banda induïx l'expressió de molècules relacionades amb la presentació d'antigen en les cèl.lules endocrines, dotant-les de capacitats presentadores.

El reconeixement de les cèl.lules β per les cèl.lules T efectores depen primerament de que es doni una interacció eficient entre els dos tipus cel.lulars. Les molècules d'adhesió contribueixen a allargar el temps d'interacció entre l'APC i la cèl.lula T, facilitant la interacció dels receptors i coreceptors, i el manteniment de la resposta. S'ha demostrat que les cèl.lules epitelials endocrines de pacients de GD i DM-1 expressen ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) amb un patró d'expressió concentrat en les zones de tiroiditis (Vives M i col., 1991; Tolosa E i col., 1992). A més les cèl.lules fol.liculars de GD i HT hiperexpressen β 1-integrines (VLA- α_6), LFA-3 (Tandon N i col., 1992) i també s'hi ha detectat l'expressió de N-CAM (neural cell adhesion molecule) (Vargas F i col., 1994) sobretot en aquells tiròcits que es localitzen aprop dels nuclis d'infiltració (Marazuela M i col., 1997).

Un cop establerta la interacció entre els dos tipus cel.lulars, el reconeixement específic s'ha de produir via el TCR. L'expressió de molècules de classe I i de les molècules necessàries pel processament i presentació de pèptids per aquesta via, és constitutiva en totes les cèl.lules nucleades. En humans, el IFN γ induïx la substitució de tres de les subunitats catalítiques del proteasoma constitutiu per les tres subunitats induïbles (LMP-2, LMP-7 i MECL-1) i també la síntesi del regulador PA28 que s'afegeix al complex per formar l'anomenat immunoproteasoma. No està clar si l'immunoproteasoma presenta una especificitat de tall alterada que permetria la generació de fragments antigènics diferents, o bé si les noves subunitats actuen augmentant l'eficiència de tall sense modificar-ne l'especificitat. Estudis realitzats en el nostre laboratori, han demostrat que les cèl.lules endocrines dianes de l'autoimmunitat en pacients amb GD i HT i DM-1 hiperexpressen MHC I i el transportador de pèptids TAP-1 mentre que aquest fet no s'observa en tiròcits de glàndules control (Vives-Pi M i col., 1996; Sospedra M i col., 1997). A més les cèl.lules endocrines de les glàndules tiroïdals amb autoimmunitat també hiperexpressen les dues subunitats induïbles del proteasoma: LMP-2, LMP-7 (Vives-Pi M i col., 1997). S'ha postulat que la hiperexpressió d'aquestes proteïnes implicades en la via de processament d'antigen per a les molècules MHC de classe I podria donar lloc a una densitat superior de complexes MHC I-pèptid o bé a un repertori de pèptids alterat a la superfície de les cèl.lules endocrines, facilitant la presentació d'autoantigens a

cèl.lules T CD8⁺ autorreactives. La hiperexpressió de les subunitats de l'immunoproteasoma però no es va detectar en les cèl.lules β d'un pàncreas diabètic humà (Vives-Pi M i col., 1997).

En moltes situacions d'autoimmunitat com en la malaltia de Graves-Basedow i en les cèl.lules β d'un pàncreas diabètic de debut s'ha observat l'expressió induïda de molècules de MHC II en la superfície de les cèl.lules endocrines, probablement com a conseqüència de l'alliberament local de citoquines (Hanafusa T i col., 1983; Somoza N i col., 1994; Brookes SM i col., 1995). Les cèl.lules endocrines més estudiades degut a la seva major accessibilitat, han estat les cèl.lules foliculars tiroïdals. D'altra banda, la manca d'expressió de MHC II en els illots dels ratolins NOD ha dificultat l'estudi del paper de les cèl.lules endocrines com a cèl.lules presentadores per MHC II en aquest model.

Els estudis realitzats en glàndules tiroïdals de pacients amb GD han demostrat l'expressió de molècules MHC de classe II en els tiròcits, així com l'expressió de la cadena invariant i d'HLA-DM. L'expressió d'ambdues chaperones donava lloc a la presència de complexos MHC-pèptid amb conformació estable a la superfície d'aquestes cèl.lules i la seva expressió augmentava amb l'addició d'IFN γ . En aquest estudi, el nivell de DM detectat en les cèl.lules foliculars tiroïdals era menor que el detectat en APCs (Catálfamo M i col., 1999).

Recentment, s'ha demostrat que els gens del MHC II tenen una regulació diferent en les APCs d'origen limfoid i altres llinatges cel.lulars (Waldburger JM i col., 2001) pel que fa als promotors usats durant la transcripció. L'expressió dels gens de MHC II es troba altament regulada a nivell de transcripció per una sèrie d'elements reguladors en cis (Ting JP i col., 1993; 2002) amb els quals interaccionen diferents factors de transcripció que formen un complex multiproteic amb el trans-activador CIITA (Ting JP i col., 1993; Mach B i col., 1996). L'interès sobre la regulació de l'expressió dels gens MHC II augmentà amb la descripció de l'expressió discordant d'aquestes molècules *in vivo*, particularment en tumors i en algunes malalties autoimmunitàries (Catálfamo M i col., 1999; Louis-Plence P i col., 2000; Qi L i col., 2001). La regulació diferencial d'aquests gens podria explicar les diferències d'expressió observades en les cèl.lules endocrines de les glàndules afectades per respostes autoimmunitàries i condicionar la resposta T autorreactiva modificant el ventall d'autoantigen presentats per aquestes cèl.lules.

El rol de l'expressió de MHC II per part de les cèl.lules endocrines com a factor desencadenant de les respostes autoimmunitàries és qüestionat pel fet que aquestes cèl.lules no expressen molècules coestimuladores com ara B7, necessàries per l'activació completa de les cèl.lules T en repòs. D'altra banda, el fet que l'expressió de MHC II no sigui una característica intrínseca de les cèl.lules endocrines i que depengui de les citoquines presents en el teixit, recolza la idea que la presentació d'antigen per MHC II en aquest tipus cel.lular és un fenomen secundari a la resposta autoimmunitària i que participa en la perpetuació d'aquesta més que no en l'inici.

2.3.3. La cèl.lula endocrina com a presentadora d'autoantigens. Estudis funcionals

Quan l'expressió de MHC II va ser observada per primera vegada en cèl.lules endocrines afectades d'una malaltia autoimmunitària es va proposar que aquesta expressió ectòpica podia ser la responsable de l'activació dels limfòcits T autorreactius (Botazzo GF i col., 1983). Els estudis funcionals *in vitro*, mostraven com el reconeixement de cèl.lules parenquimals per cèl.lules T, induïa per mecanismes diferents, un estat de no resposta tant en les cèl.lules T verges com en les cèl.lules T memòria (Marelli-Berg FM i col., 1997). Els resultats es van ampliar a l'estudiar cèl.lules T activades. Mentre alguns treballs describien respostes proliferatives de clons i línies de cèl.lules T vers els antigens presentats per cèl.lules epitelials MHC II⁺ (Londei M i col., 1984; 1985; Weetman AP i col., 1986; Dayan C i col., 1991; Catálfamo M, tesis doctoral, 1999); altres observacions suggerien que la presentació antigènica per cèl.lules negatives per la senyal coestimuladora, com les cèl.lules β -pancreàtiques i els tiròcits, afavoria la inducció de la no-resposta T o la desviació immunològica també en cèl.lules T activades (Markman J i col., 1988; Lombardi G i col., 1997). Tot i la confusió dels resultats, és important notar que més de la meitat dels clons de cèl.lules T analitzats en aquests estudis proliferaven, a l'antigen presentat per les cèl.lules epitelials.

La impossibilitat de descoordinar l'expressió de les molècules MHC entre les cèl.lules endocrines i les APCs professionals en models experimentals, no ha permès discernir el rol de cada tipus cel.lular en la regulació i el manteniment de la resposta autoimmunitària. En el context de les malalties autoimmunitàries, s'ha proposat que les cèl.lules endocrines MHC II⁺ actuarien en conjunció amb les APCs professionals presents en els infiltrats, siguent responsables del tipus de resposta que s'assoleix. Els limfòcits T no activats, que reconeguessin l'antigen expressat per les MHC II de les cèl.lules endocrines podrien rebre les senyals coestimuladores de les APCs professionals presents en l'infiltrat inflamatori (trans-coestimulació) (Lombardi G i col., 1997). Si els pèptids presentats per les cèl.lules endocrines actuessin com agonistes dels TCR específics, es produiria una resposta Th1 i la lesió autorreactiva. En canvi, si els pèptids presentats per les cèl.lules endocrines es comportessin com agonistes parcials podrien donar lloc a una resposta reguladora Th2. En absència de la trans-coestimulació, la presentació incompleta d'antigen per les cèl.lules endocrines podria induïr un fenotip regulador en les cèl.lules T no activades (desviació immunològica) o l'estat d'anèrgia. Una altra possibilitat seria que altres APCs dels infiltrats presentessin l'antigen a les cèl.lules T autorreactives, que s'activarien i podrien reconèixer l'antigen sobre cèl.lules endocrines en absència de la segona senyal (Markmann J i col., 1988). El balanç entre aquestes possibilitats estarà determinat per les capacitats dels diferents tipus cel.lulars de l'infiltrat glandular implicats en la presentació d'Ag per MHC II, per presentar autoantigens iguals, APLs o epítops críptics.