

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN INTRATÍMICA  
DE ANTÍGENOS INVOLUCRADOS  
EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS AUTOINMUNITARIAS

Memoria de la tesis presentada para obtener el título de Doctor en Inmunología  
por la Universidad Autónoma de Barcelona

Bellaterra, Febrero 2002

Roxana Bruno

<b>INDICE GENERAL</b> .....	I
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	V
<b>INDICE DE GRAFICOS</b> .....	VI
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	VI
<b>ABREVIATURAS</b> .....	VII

## INDICE GENERAL

### **INTRODUCCION**

1. Tolerancia Central .....	1
2. Tolerancia Periférica .....	3
2.1 <i>Delección clonal</i> .....	3
2.2 <i>Inducción de anergia</i> .....	4
2.3 <i>Ignorancia</i> .....	4
2.4 <i>Células T regulatorias</i> .....	5
3. Enfermedades Neuroinmunológicas abordadas en esta tesis .....	6
3.1 <i>Miastenia Gravis</i> .....	6
3.1.1 Modelos animales de Miastenia Gravis .....	9
3.1.2 El papel del timo en la Miastenia Gravis .....	10
3.2 <i>Esclerosis Múltiple</i> .....	13
3.2.1 Modelos animales de Esclerosis Múltiple .....	15
3.2.2 El papel del timo en la Esclerosis Múltiple .....	16
4. Antígenos Prostáticos: autoantígenos relacionados con la madurez sexual .....	18

<b>OBJETIVOS</b> .....	21
------------------------	----

<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	23
-----------------------------------	----

1. Muestras de tejido tímico y tejido control .....	23
2. Preparación de las muestras y obtención de bloques congelados .....	23
3. Obtención de las diferentes fracciones celulares tímicas .....	24
4. Obtención de células mononucleadas sanguíneas .....	25
5. Tinción para Inmunofluorescencia .....	26
5. 1 <i>Secciones</i> .....	26
5. 2 <i>Anticuerpos</i> .....	26
5. 3 <i>Controles</i> .....	26
5. 4 <i>Anticuerpos secundarios</i> .....	26
5. 5 <i>Procedimiento de tinción</i> .....	26
5. 6 <i>Análisis de la Tinción</i> .....	27
6. Microdissección por láser .....	27
6. 1 <i>Secciones</i> .....	27
6. 2 <i>Tinción</i> .....	27
6. 3 <i>Microdissección por láser</i> .....	28
7. Obtención de RNA y Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	28
7. 1 <i>Extracción del RNA total</i> .....	28
7. 2 <i>Extracción de RNA a partir de las microdissecciones</i> .....	29
7. 3 <i>Concentración e Integridad del RNA</i> .....	29
7. 4 <i>Digestión con DNAsal</i> .....	29
7. 5 <i>Retrotranscripción</i> .....	29
7. 6 <i>Retrotranscripción del RNA obtenido de las microdissecciones</i> .....	29
7. 7 <i>Cebadores y sondas oligonucleotídicas</i> .....	29

7. 8 Normalización	30
7. 9 Condiciones de la PCR	30
7. 10 PCR radioactiva	32
7. 11 Electroforesis	32
7. 12 Electroforesis de los geles radioactivos	32
7. 13 Purificación y cuantificación de los productos amplificados	32
7. 14 Transferencia a membranas de nylon	33
7. 15 Preparación de las oligosondas	33
7. 16 Hibridación	33
7. 17 Lavados y exposición	33
8. Secuenciación de amplímeros	34
8. 1 Preparación de las muestras	34
8. 2 Secuenciación del DNA	34

**PRIMERA PARTE:**

**AUTOANTIGENOS INVOLUCRADOS EN LA MIASTENIA GRAVIS**

<b>RESULTADOS</b>	37
1. Precauciones	37
2. El diseño de los cebadores	38
2.1 Cebadores para detectar la subunidad alfa del AChR	38
3. Titulación de la sensibilidad de los cebadores y curvas de reacción de PCR	40
4. Las cinco subunidades del AChR se expresan en el timo humano	46
5. Las cinco subunidades del AChR se expresan en los timos patológicos	48
6. El patrón de expresión tímica del AChR es cortical y medular	51
7. Las células mioides se localizan exclusivamente en las médulas tímicas	51
<b>DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE LA PRIMERA PARTE</b>	55

**SEGUNDA PARTE:**

**AUTOANTIGENOS INVOLUCRADOS EN ESCLEROSIS MULTIPLE**

<b>RESULTADOS</b>	61
1. Precauciones	61
2. Diseño de cebadores para detectar transcritos de MOG	61
3. Titulación de la sensibilidad de los cebadores y curvas de reacción de PCR	62
4. Los autoantígenos del SNC, excepto MOG, se expresan en el timo humano	66
5. Transcripción de los antígenos del SNC en las fracciones celulares tímicas	68
6. Transcripción de los antígenos del SNC en las microdisecciones tímicas	72
<b>DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE LA SEGUNDA PARTE</b>	73

**TERCERA PARTE:**

**ANTIGENOS PROSTATICOS**

<b>RESULTADOS</b>	77
1. Precauciones	77
2. Titulación y curvas de reacción de PCR	77
3. Los autoantígenos prostáticos se expresan en el timo humano	81
4. Transcripción de PSA y PSM en las fracciones celulares tímicas	83
<b>DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE LA TERCERA PARTE</b>	85
<b>DISCUSION GENERAL</b>	87
<b>CONCLUSIONES</b>	93

---

<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	95
<b>ANEXO I: Antígenos del Sistema Nervioso Central</b> .....	117
<b>ANEXO II: Antígenos Prostáticos</b> .....	123
<b>PUBLICACIONES</b> .....	125



**INDICE DE FIGURAS**

**PRIMERA PARTE**

Figura 1.1 *Titulación de la sensibilidad de los cebadores* ..... 42  
     1.1 A *Bromuro de Etidio*  
     1.1 B *Hibridación con sondas específicas marcadas con <sup>32</sup>P*  
     1.1 C *Cuantificación*

Figura 1.2 *Curvas de reacción de PCR* ..... 43  
     1.2 A *Curvas de reacción de PCR para alfa, gamma y epsilon*  
     1.2 B *Curvas de reacción de PCR para beta y delta*

Figura 1.3 *Amplificación de las subunidades del AChR en tejidos controles* ..... 45  
     1.3 A *Bromuro de Etidio*  
     1.3 B *Hibridación con sondas específicas marcadas con <sup>32</sup>P*

Figura 1.4 *Expresión del AChR en el panel de timos normales* ..... 47  
     1.4 A *Bromuro de Etidio*  
     1.4 B *Hibridación con sondas específicas marcadas con <sup>32</sup>P*

Figura 1.5 *Expresión del AChR en el panel de timos patológicos* ..... 50  
     1.5 A *Bromuro de Etidio*  
     1.5 B *Hibridación con sondas específicas*

Figura 1.6 *Microdissección tímica por láser* ..... 52  
     1.6 A *Microdissección por láser de cortezas y médulas tímicas*  
     1.6 B *PCR del AChR en las microdissecciones*

Figura 1.7 *Tinción de secciones tímicas para inmunofluorescencia* ..... 53

**SEGUNDA PARTE**

Figura 2.1 *Titulación de la sensibilidad de los cebadores* ..... 63  
     2.1 A *Bromuro de Etidio*  
     2.1 B *Hibridación con sondas específicas marcadas con <sup>32</sup>P*  
     2.1 C *Cuantificación*

Figura 2.2 *Curvas de reacción de PCR para los antígenos del SNC* ..... 64

Figura 2.3 *Amplificación de los antígenos del SNC en tejidos controles* ..... 67  
     2.3 A *Bromuro de Etidio*  
     2.3 B *Hibridación con sondas específicas marcadas con <sup>32</sup>P*

Figura 2.4 *Expresión de los antígenos del SNC en el panel de timos* ..... 69  
     2.4 A *Bromuro de Etidio*  
     2.4 B *PCR Radioactiva*

Figura 2.5 *Expresión de los antígenos del SNC en las subpoblaciones tímicas* ..... 71

Figura 2.6 *PCR en las microdissecciones de cortezas y médulas tímicas* ..... 72

**TERCERA PARTE**

Figura 3.1 <i>Titulación de la sensibilidad de los cebadores</i> .....	78
3.1 A <i>Bromuro de Etidio</i>	
3.1 B <i>Hibridación con sondas específicas marcadas con <sup>32</sup>P</i>	
3.1 C <i>Cuantificación</i>	
Figura 3.2 <i>Amplificación de las subunidades del AChR en tejidos controles</i> .....	80
Figura 3.3 <i>Expresión del AChR en el panel de timos</i> .....	82
Figura 3.4 <i>Expresión del AChR en las subpoblaciones tímicas</i> .....	84

**INDICE DE GRAFICOS**

Gráfico 1: <i>Esquema de la estructura tímica</i> .....	2
Gráfico 2: <i>Esquema del AChR</i> .....	6
Gráfico 3: <i>Esquema de la unión neuromuscular de la placa motora</i> .....	7
Gráfico 4: <i>Esquema de la estructura genómica de las subunidades del AChR</i> .....	39
Gráfico 5: <i>Esquema de la transcripción del AChR en los tejidos control</i> .....	41
Gráfico 6: <i>Esquema de la transcripción del AChR en los timos normales</i> .....	48
Gráfico 7: <i>Esquema de la transcripción del AChR en los timos patológicos</i> .....	49
Gráfico 8: <i>Esquema de la estructura genómica del MOG</i> .....	62
Gráfico 9: <i>Transcripción de los antígenos del SNC en los tejidos control</i> .....	65
Gráfico 10: <i>Transcripción de los antígenos del SNC en los timos</i> .....	68
Gráfico 11: <i>Transcripción de los antígenos prostáticos en los tejidos control</i> .....	79
Gráfico 12: <i>Transcripción de los antígenos prostáticos en los timos</i> .....	81
Gráfico 13: <i>Representación de los tipos celulares en el sistema nervioso central</i> .....	117
Gráfico 14: <i>Componentes de la vaina de mielina del sistema nervioso central</i> .....	118
Gráfico 15: <i>Representación de la estructura secundaria de PLP</i> .....	119
Gráfico 16: <i>Representación de la estructura secundaria de MOG</i> .....	121

**INDICE DE TABLAS**

Tabla I <i>Panel de tejidos control y de muestras tímicas normales utilizadas</i> .....	24
Tabla II <i>Panel de muestras tímicas patológicas</i> .....	25
Tabla III <i>Cebadores</i> .....	31
Tabla IV <i>Resumen de la expresión del AChR en las muestras de timos</i> .....	49

## INTRODUCCIÓN

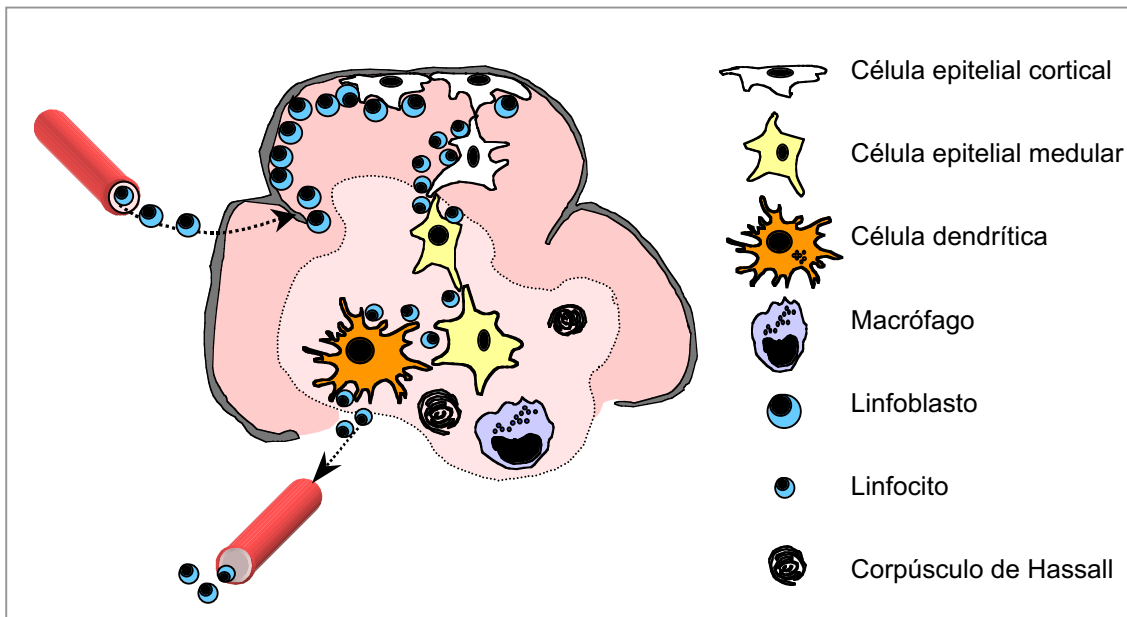
La tolerancia a los antígenos propios es una característica esencial del sistema inmunológico. La generación y el mantenimiento de un repertorio de células T funcionales, capaces de discriminar antígenos propios y extraños presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) se lleva a cabo en el timo (tolerancia central) y en órganos linfoides y no linfoides (tolerancia periférica).

### 1. Tolerancia Central

El timo, un órgano primordial en el desarrollo y el mantenimiento de la tolerancia central, se desarrolla a partir de la tercera bolsa faringea del embrión como un rudimento epitelial de origen endodérmico. Durante la octava y la novena semana de vida fetal, la región tímica subcapsular es infiltrada por linfoblastos y otras células derivadas de la médula ósea. La migración de las células precursoras de la médula ósea hacia el timo se produce por la acción de factores quimiotácticos liberados por el rudimento tímico. Bajo la influencia de los factores tímicos y del microambiente epitelial, los linfoblastos comienzan a ser diferenciados en *timocitos*. Los timocitos inmaduros se localizan histológicamente en la región cortical, mientras que los timocitos con mayor grado de diferenciación junto con la mayoría de los macrófagos y de las células presentadoras de antígenos derivadas de la médula ósea se localizan en la región medular (*gráfico 1*).

Durante el proceso de maduración, los precursores expresan diversas moléculas de superficie y ordenan su DNA genómico para generar una gran variedad de TCRs de diferente secuencia y especificidad. Cuando alcanzan el estado de timocitos CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (timocitos doble positivos) expresan en la superficie celular un TCR  $\alpha\beta$  con capacidad de reaccionar con complejos de MHC propios y están listos para ser positivamente y negativamente seleccionados. La *selección positiva* es un proceso que asegura que todos los timocitos son capaces de reconocer el MHC propio. Una unión de baja afinidad del TCR a complejos de péptido/MHC-clase I propios expresados en las células epiteliales corticales, genera una señal que inicia el proceso de selección positiva hacia el linaje CD8. Del mismo modo, los timocitos que expresan TCRs restringidos al MHC de clase II, se seleccionan hacia el linaje CD4 (Sebzda et al., 1999). El resultado de este proceso es un repertorio de células T que reconoce complejos de MHC/péptido propios, pero que también incluye células T autorreactivas (Laufer et al., 1996). Antes de que este repertorio salga a la periferia, los linfocitos autorreactivos deben ser negativamente seleccionados. La *selección negativa* elimina por apoptosis las células T cuyos TCRs son capaces de unir con alta afinidad complejos de MHC/péptido propios (Kappler et al., 1987; Kisielow et al., 1988).





**Gráfico 1:** Esquema de la estructura del timo

Aunque ambos procesos de selección, positiva y negativa, requieren de la interacción del TCR con los complejos de MHC/péptido propios, existen datos que indican que durante el proceso de diferenciación de las células T en el timo, una interacción débil del TCR conduce a selección positiva, mientras que una interacción fuerte conduce a selección negativa (Alam et al., 1996; Williams et al., 1999).

Datos recientes señalan que durante el curso del desarrollo intratímico la selección negativa remueve el 50% de las células T seleccionadas positivamente (van Meerwijk et al., 1997). Esto sugiere que la tolerancia central representa el principal mecanismo de tolerancia e implica el encuentro de las células T inmaduras con los antígenos cortados proteolíticamente y unidos a moléculas del MHC. Por lo tanto, requiere que un antígeno dado se encuentre expresado en el timo o acceda al estroma tímico a través de la circulación sanguínea o linfática (Klein et al., 1998; Zal et al., 1994).

Actualmente, el timo es considerado el lugar principal de inducción de tolerancia a proteínas ubicuas y antígenos circulantes abundantes. Por el contrario, el establecimiento de la tolerancia frente a antígenos que están secuestrados, expresados en tejidos específicos o que son regulados con el desarrollo aún no está claro, y se atribuyó a mecanismos que actúan en las células T periféricas.

## **2. Tolerancia Periférica**

La presencia de células T potencialmente autorreactivas en personas sanas (Hafler and Weiner, 1995) sumado a la frecuencia de enfermedades autoinmunitarias, indica que la selección tímica no elimina completamente las células autorreactivas del repertorio de normal. Células T específicas de varios autoantígenos pueden ser aisladas de individuos sanos y también de animales. Normalmente, esas células persisten el repertorio de células T naive y son inofensivas. En el ser humano, por factores desconocidos, o tal vez virus, (Wekerle, 1998) y en los animales por la inducción experimental de autoinmunidad, estas células se vuelven peligrosas y provocan patología autoinmune, tal como se ha podido demostrar para las células autorreactivas frente a antígenos del SNC (Wekerle et al., 1996).

El estudio de diversos modelos animales con ratones transgénicos que co-expresan un antígeno dado y el TCR específico para ese antígeno ha permitido llegar a la conclusión de que la salida de células potencialmente autorreactivas del timo no necesariamente conduce a autoinmunidad, debido a que existen mecanismos periféricos que protegen la tolerancia de células T autorreactivas. Se han descrito tres mecanismos de tolerancia periférica que actúan por eliminación o inactivación de las células específicas: delección clonal, inducción de anergia e ignorancia. Recientemente, se ha propuesto un cuarto mecanismo que implica la generación de un repertorio de células T regulatorias.

### **2.1 Delección clonal**

Mediante este mecanismo de tolerancia periférica, de manera similar a lo que ocurre en la selección negativa en el timo, las células T autorreactivas pueden ser eliminadas después de encontrar el autoantígeno en la periferia.

Se ha observado que cuando se transfieren células T naive específicas para un antígeno a ratones que expresan el antígeno, las células T proliferan extensamente en ausencia de daño tisular y luego son eliminadas por muerte celular dependiente de activación (Rocha and von Boehmer, 1991; Webb et al., 1990). Además, la delección periférica es igualmente efectiva aún para antígenos que son expresados en una manera mas restringida ya que el antígeno es liberado desde el tejido de origen y presentado a las células T en el nódulo linfático que lo drena (Foerster, 1998). Esta vía de presentación de antígenos tisulares, contraria al dogma clásico de presentación y procesamiento antigénico por clase I, se aplica para epitopes restringidos por clase II y también por clase I (Kurts et al., 1997) y se denomina cross-presentación (Bevan, 1976; Carbone et al., 1998; Miller et al., 1998).

Se ha observado, por otra parte, que la cantidad y la distribución de la expresión de un autoantígeno son dos factores que determinan el tipo de mecanismo de tolerancia que se establece.

Así, la disponibilidad de abundantes cantidades del antígeno favorecen la delección, mientras que bajas cantidades favorecen los mecanismos de anergia o de ignorancia (Hammerling et al., 1993; Klein and Kyewski, 2000; Kurts et al., 1999)

## **2.2 Inducción de anergia**

Para activar completamente a las células T naive, además de la señal del TCR se necesita una segunda señal co-estimuladora, dada por el receptor de CD28 y su ligando B7. In vitro, la activación del TCR en ausencia de co-estimulación resulta en la inactivación funcional de las células T, estado que se ha denominado anergia de células T (Schwartz, 1990). En condiciones fisiológicas, solo un grupo de células hematopoiéticas especializadas, las células dendríticas o APCs profesionales, son capaces de dar la primera y la segunda señal de forma simultánea. Las células dendríticas, activadas y cargadas con el antígeno a través de señales del sistema inmune innato en los sitios de exposición a los agentes patógenos, se trasladan hacia los nódulos linfáticos, donde tiene lugar el contacto con las células T (Bell et al., 1999). En cambio, cuando el antígeno se contacta en cualquier tejido, sin señales co-estimuladoras, tal como se observa in vitro, las células T no se activan, pero sí se debilitan funcionalmente tal como se ha descrito en numerosos modelos de ratones con TCRs transgénicos que expresan el antígeno exclusivamente en tejidos no linfoides, como la piel o el hígado (Ferber et al., 1994; Schonrich et al., 1991). El concepto de tolerancia por inducción de anergia postula el encuentro de las células T con el antígeno en tejidos no linfoides. Sin embargo, las células T naive circulan por la sangre y los nódulos linfáticos, pero no pueden acceder a la mayoría de los tejidos periféricos, como la piel, los músculos y el cerebro. Por otra parte, se ha descrito en ratones, que durante el periodo neonatal las células T naive tienen capacidad de circular a través de los tejidos periféricos y por lo tanto pueden encontrar a los antígenos y hacerse tolerantes a ellos. Las células T anergizadas en la etapa neonatal, bajo la forma de emigrantes tímicos recientes, se mantienen tolerantes durante toda la vida adulta, en la que son impedidos de penetrar a los tejidos periféricos (Alferink et al., 1999; Le Douarin et al., 1996).

Salida de células T anérgicas también ha sido observado durante la estimulación crónica con el antígeno. La muerte inducida por activación puede ser incompleta, dejando una pequeña proporción de células T que no proliferan bajo estimulación apropiada (Lanoue et al., 1997; Rocha and von Boehmer, 1991).

## **2.3 Ignorancia**

El concepto de ignorancia postula la existencia simultánea e inofensiva de las células T autorreactivas y su antígeno específico en los tejidos periféricos (Miller and Heath, 1993).

Las células autorreactivas ignorantes persisten en el repertorio de células naive sin contactar con sus antígenos debido a una separación espacial, ya que éstas recirculan entre la sangre y los nódulos linfáticos pero no acceden a los tejidos (Ohashi et al., 1991). Pero durante la inmunización o una infección viral, las células T ignorantes, potencialmente autorreactivas, pueden ser rápidamente activadas (por ejemplo por patógenos cross-reactivos) si encuentran el antígeno en condiciones apropiadas. Un vez activadas, las células T son capaces de penetrar en tejidos no-linfoides y producir patología autoinmune. Este es el modelo de “molecular mimicry” para explicar la iniciación de autoinmunidad (Albert and Inman, 1999; Oldstone et al., 1991; Wucherpfennig and Strominger, 1995).

#### **2.4 Células T regulatorias**

Las células T regulatorias forman parte del repertorio normal de células T y pueden ser generadas tanto en el timo como en la periferia (Seddon and Mason, 2000). La generación y la selección de las células T regulatorias en el timo depende de las células epiteliales tímicas, aunque los mecanismos involucrados aun no se han caracterizado. Los experimentos de inducción de tolerancia en aves y ratones, a través del trasplante de epitelio tímico extraño, demuestran que el epitelio tímico es capaz de inducir tolerancia frente a los antígenos del injerto y que dicha tolerancia no se induce como consecuencia de la delección clonal de las células T, sino a través de la generación de células regulatorias (Le Douarin et al., 1996) Las células T dependientes del timo son, además, capaces de modular la función de las células T efectoras y de controlar la autoinmunidad in vivo (Mason and Powrie, 1998; Seddon and Mason, 2000). Sin embargo, el desarrollo de células regulatorias funcionales en la periferia a partir de precursores intratímicos, requiere una fase extra-tímica, que depende de la presencia del autoantígeno en la periferia: la maduración y la supervivencia de las células regulatorias requiere del contacto con el autoantígeno en la periferia, presentado por las células presentadoras de antígeno, en el estado de emigrante tímico reciente, es decir, tan pronto como salen del timo (Modigliani et al., 1996). El fenotipo de las células regulatorias en el ratón es  $CD4^+ TCR\alpha\beta^+ CD25^+$ , mientras que en rata es similar,  $CD4^+ TCR\alpha\beta^+ CD45RC^- RT6^+ Thy1^-$  (Fowell and Mason, 1993).

No se sabe exactamente si la maduración de las células regulatorias en la periferia implica expansión clonal y/o el reclutamiento. No obstante, las células regulatorias maduras son funcionales y ejercen su control sobre otras células T a través de dos mecanismos: el contacto célula - célula y la secreción de citocinas inhibitorias (Seddon and Mason, 1999).

Por otra parte, las células regulatorias pueden originarse también en la periferia, mediante procedimientos experimentales tales como la administración intranasal o oral de un antígeno. El efecto regulatorio de las células generadas de este modo parece ser, al menos

en parte, debido a la secreción de la citocina anti-inflamatoria transforming growth factor  $\beta$  (Chen et al., 1994; Miller et al., 1992). La posibilidad de inducir tolerancia específica de antígenos en adultos, es un procedimiento que guarda una gran expectativa entre los inmunólogos clínicos.

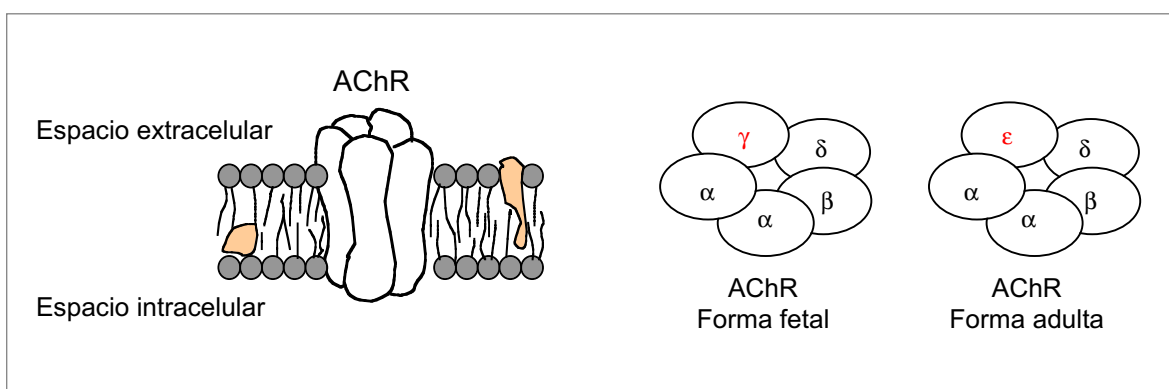
### 3. Enfermedades Neuroinmunológicas abordadas en esta tesis

#### 3.1 *Miastenia Gravis*

La Miastenia Gravis (MG) es una enfermedad autoinmunitaria mediada por anticuerpos que están dirigidos contra el receptor post-sináptico de acetilcolina de la placa motora. La unión de los anticuerpos de alta afinidad a los receptores de acetilcolina (AChR), provocan la disfunción de los mismos y son la causa de la debilidad muscular que presentan los pacientes con MG (Lindstrom, 2000).

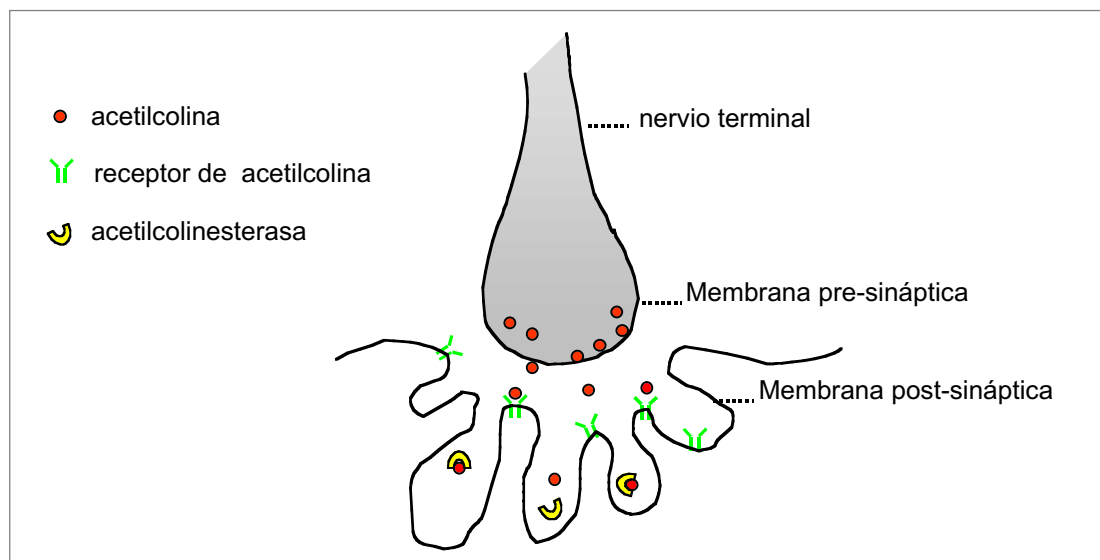
En los mamíferos, el receptor nicotínico de acetilcolina de la unión neuromuscular es una proteína pentamérica de transmembrana de 270 KD, que constituye un canal de iones y que existe en dos isoformas: la forma *fetal* y la forma *adulto*. La forma *fetal* del receptor está constituida por las subunidades alfa, beta, gamma y delta, en estequiometría  $\alpha_2\beta\gamma\delta$ . Durante la primera semana de vida postnatal, la subunidad gamma es reemplazada por la subunidad épsilon, dando origen a la forma *adulto* del receptor, constituida por las subunidades alfa, beta, épsilon y delta con estequiometría  $\alpha_2\beta\epsilon\delta$  (Mishina et al., 1986; Missias et al., 1996) (Gráfico 2).

Sin embargo, el cambio de la subunidad gamma por la subunidad épsilon para originar la forma adulta del receptor no es completa: los músculos extraoculares en el adulto conservan la expresión de la forma fetal del receptor de acetilcolina (Horton et al., 1993).



**Gráfico 2:** Esquema de la estructura del receptor de acetilcolina

Tras un impulso nervioso, la acetilcolina se libera de las vesículas presinápticas unidas a la membrana del nervio terminal, se vuelca al espacio sináptico y allí se une a los receptores presentes en la membrana postsináptica. Los receptores responden a la unión de su ligando con la apertura y la entrada de iones sodio. El flujo de iones al interior provoca la despolarización de la membrana plasmática, la generación de un potencial de acción y la contracción muscular. Posteriormente, el complejo neurotransmisor-receptor es dissociado y la acetilcolina es hidrolizada por la enzima acetilcolinesterasa, presente en el espacio sináptico (Gráfico 3).



**Gráfico 3:** Esquema de la unión neuromuscular de la placa motora

La cantidad de AChRs presentes en la unión neuromuscular de los mamíferos es muy baja, lo que dificulta su utilización en sistemas experimentales. Sin embargo, existen fuentes de AChRs idénticos a los de mamíferos en varias especies del pez *Torpedo*, en los que la concentración de AChRs en el órgano eléctrico es unas mil veces más alta que en el músculo de los mamíferos. Por otra parte, las  $\alpha$ -bungarotoxinas ( $\alpha$ -toxinas de venenos de ciertas especies de cobras) se unen con alta especificidad al AChR y se utilizan para la purificación de receptores y también para la determinación de autoanticuerpos en el suero de pacientes con MG.

En la patogénesis de la MG existe una reducción en el número de receptores efectivos para acetilcolina en la placa motora. Esta reducción se debe a tres mecanismos: bloqueo directo por los autoanticuerpos de la función del receptor, acelerada degradación, y lisis de los

mismos mediada por complemento. Los anticuerpos anti-AChR, son generalmente de isotipo IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> y su síntesis requiere la intervención de linfocitos T cooperadores o helper (Th) (Link et al., 1991).

La mayoría de los anticuerpos anti-AChR en los pacientes con MG están dirigidos contra la principal región inmunogénica (MIR *main immunogenic region*). Esta región está localizada en el dominio extracelular de la subunidad alfa, pero es una región diferente del sitio de unión del ligando y de las  $\alpha$ -bungarotoxinas (Tzartos et al., 1982). En general, en el suero de pacientes con MG se han detectado muy pequeñas cantidades de anticuerpos dirigidos contra la fracción citoplásmica del receptor (Tzartos and Remoundos, 1999). Sin embargo, en el modelo animal de Miastenia Gravis autoinmune experimental, se observa que cuando los animales se inmunizan con AChR desnaturalizado o con fragmentos del receptor, los anticuerpos dirigidos contra la fracción citoplásmica del receptor son predominantes, pero no cuando se inmunizan con el AChR nativo. La presencia de pequeñas cantidades de anticuerpos anti-fracción citoplásmica en los pacientes con MG sugieren que probablemente tanto el receptor intacto como las moléculas desnaturalizadas del AChR constituyen el inmunógeno (Tzartos and Remoundos, 1999). La respuesta inmune en los pacientes podría comenzar contra la fracción extracelular del receptor y luego podría extenderse a fracciones citoplasmáticas a través del mecanismo de *epitope spreading*.

En los pacientes con MG es posible observar linfocitos B (Leprince et al., 1990; Padberg et al., 1999) y linfocitos T (Hawke et al., 1996) reactivos circulantes contra AChR, los cuales presentan además una aumentada proliferación *in-vitro*, en respuesta a las subunidades del receptor (Reinhardt and Melms, 1999). Las células T reconocen secuencias desnaturalizadas de las subunidades del AChR. Utilizando secuencias sintéticas del AChR, muchos trabajos han intentado caracterizar los epitopes de las células T (Melms et al., 1989). Se han descrito regiones inmunodominantes en todas las subunidades del receptor, que intervienen en la formación de epitopes de las células CD4<sup>+</sup> (Manfredi et al., 1993; Moiola et al., 1994; Protti et al., 1991a; Protti et al., 1991b; Sommer et al., 1991; Tzartos et al., 1982). Las células involucradas en la patogenia de la MG son una subpoblación de células Th1 (Tzartos et al., 1982). A pesar de que se han encontrado células Th1 y Th2 específicas contra el AChR en los pacientes con MG (Leprince et al., 1990) después de la exposición *in-vitro* al AChR, las células CD4<sup>+</sup> expresan citocinas de células Th1 (Link et al., 1994) y las líneas celulares obtenidas a partir de pacientes con MG son células de tipo Th1 (Moiola et al., 1994). (Link et al., 1994). Por otra parte, se ha observado que las líneas celulares T CD4<sup>+</sup> específicas contra AChR que presentan un perfil de citocinas Th2 promueven *in-vitro* la diferenciación de las células B en células plasmáticas productoras de anticuerpos (Padberg et al., 1999). Por todo esto, aún no está claro el papel de las células

Th1 (productoras de INF- $\gamma$ ) y de las Th2 (productoras de IL4) en la producción de anticuerpos y en la progresión de la enfermedad (Balasa et al., 1998).

### 3.1.1 Modelos animales de Miastenia Gravis

La Miastenia Gravis Experimental Autoinmune (EAMG) se indujo por primera vez en conejos mediante inmunización con el AChR en el adyuvante completo de Freund (Patrick and Lindstrom, 1973), y posteriormente en ratas (Lennon et al., 1975) y en ratones, donde se observaron diferencias en el desarrollo de la enfermedad en distintas cepas (Fuchs et al., 1976). En ratones se puede inducir una enfermedad similar a la MG no solo mediante inmunización con el AChR, sino también mediante otras estrategias, como por ejemplo:

- por la transferencia pasiva de suero de pacientes con MG (Richman et al., 1980)
- por injerto de tejido tímico (Schonbeck et al., 1992), o de linfocitos de sangre periférica de pacientes con MG (Wang et al., 1999)
- o por producción local de IFN- $\gamma$  en la unión neuromuscular, en ratones transgénicos que expresan conjuntamente la subunidad épsilon con IFN- $\gamma$  (Gu et al., 1995)

El modelo de EAMG en ratas es un modelo poco atractivo para el estudio de la inmunopatogénesis de la MG debido a que la fase aguda de la enfermedad no guarda similitud con la MG humana. La patogénesis de la EAMG en ratones, sin embargo, es similar a la MG humana en muchos aspectos, y por ello actualmente representa el modelo animal ideal para el análisis inmunoterapéutico de la MG. Existen numerosas similitudes clínicas e inmunopatológicas entre el modelo en ratón y la MG humana, como es la marcada debilidad muscular en la mitad superior del cuerpo, la presencia de autoanticuerpos, el depósito de Ig y complemento en la unión neuromuscular, la pérdida progresiva de AChRs musculares, la asociación de la enfermedad con alelos de MHC de clase II y la colaboración de las células T con las células B para la producción de los autoanticuerpos.

Los autoanticuerpos anti-AChR del tipo IgG son detectables en el suero de los pacientes con MG. En los modelos animales, también se encuentran presentes anticuerpos de isotipo IgG1, IgG2a e IgG2b, que fijan complemento y que posiblemente tienen un papel muy importante en la patogénesis de la enfermedad. La inmunización de ratones que tienen inactivado el gen del  $\gamma$ -interferón (*IFN - $\gamma$  knout out*) presentan una marcada supresión de la respuesta de anticuerpos del tipo IgG1 e IgG2a. Luego de múltiples inmunizaciones con el AChR, estos ratones no desarrollan MG experimental autoinmune (Balasa et al., 1997; Gu et al., 1995). Además, en otro modelo, cuando se inmunizan ratones deficientes en IL-12 con el AChR, las células del tipo Th1 y los autoanticuerpos del tipo IgG2b son bajos en comparación con ratones normales B6 (Moiola et al., 1998).



Los genes de MHC de clase II influyen en la respuesta inmune humoral y celular contra el AChR, y están involucrados en el desarrollo de la EAMG. Después de la inmunización con el AChR, los péptidos dominantes son presentados en el contexto de las moléculas de MHC de clase II para el reconocimiento de las células T CD4+. Los ratones que son deficientes en MHC clase II, son completamente resistentes a la inducción de EAMG (Kaul et al., 1994). Por otra parte, los ratones que mantienen intactos sus genes de MHC de clase II, pero en los que se inactiva el CD4, tampoco desarrollan EAMG (Zhang et al., 1996).

En los ratones B6, susceptibles a la EAMG, los linfocitos T responden *in vitro* a un epítipo dominante de la subunidad alfa del AChR ( $\alpha$  146-162). Este epítipo activa a las células T CD4 y está involucrado en la producción de anticuerpos por parte de las células B (Bellone et al., 1991). La inducción de tolerancia neonatal contra este epítipo, mediante la administración del péptido soluble, puede prevenir la EAMG cuando en la vida adulta los animales se inmunizan con el AChR en el adyuvante completo de Freund (Shenoy et al., 1993). Los linfocitos T derivados de pacientes con MG también responden *in vitro* a una serie de epítipos contenidos en las subunidades del AChR, inclusive a las secuencias  $\alpha$  146-162 y  $\alpha$  182-198 (Oshima et al., 1990).

Sin embargo, a pesar de la estrecha correlación entre el modelo animal y la MG humana, ambas difieren en la implicación del timo en la enfermedad. La hipertrofia tímica es común en los pacientes con MG. El timo de los pacientes con MG presenta además centros germinales, mientras que en los modelos animales el timo no se encuentra afectado (Meinl et al., 1991). Se piensa que en la MG humana, el timo es el lugar principal de autosensibilización debido a la expresión del AChR en las células epiteliales y/o células mioideas y a la presencia de centros germinales. En el modelo murino, en contraste, la autosensibilización se produce en los ganglios linfáticos.

### **3.1.2 El papel de timo en la Miastenia Gravis**

El timo es un órgano importante en la diferenciación y en la selección del repertorio de linfocitos T. Debido a que este órgano se encuentra con frecuencia alterado en los pacientes con MG, se le atribuye un papel importante en la patogenia de esta enfermedad. El 60-70% de los pacientes con MG presentan hiperplasia linfoide tímica, habitualmente denominada *timitis* (Kirchner et al., 1986). Entre un 10-15% presentan una neoplasia epitelial (Marx et al., 1997) y la timectomía mejora el curso clínico de la MG en muchos pacientes (Buckingham et al., 1976). Además, el 30-50% de los pacientes con timomas presentan MG (Muller-Hermelink and Marx, 2000). Sin embargo, la MG no es la única enfermedad autoinmunitaria asociada a hiperplasia linfoide tímica. Otras enfermedades, como por ejemplo la enfermedad

de Graves, la enfermedad de Addison y el lupus sistémico eritematoso muestran a menudo algunos cambios en la arquitectura tímica (Murakami et al., 1996). Estos datos clínicos han permitido el planteamiento de diversas hipótesis para explicar las posibles conexiones entre la MG y el timo. Una de estas hipótesis es que el timoma provoca un fallo en la función tímica y se produce la liberación de un gran número de células T autorreactivas, pero el hecho de que dichos tumores estén asociados solo a MG, y muy excepcionalmente a neuromiotonía y a aplasia de médula ósea, hacen improbable esta explicación. Además, la MG asociada al timoma suele presentarse a edad avanzada, cuando la timopoiesis es baja, sumado al hecho de que en los pacientes con MG la timopoiesis es aún más baja que en los individuos normales (Sempowski et al., 2001). Otros autores sostienen que los timomas contribuyen a la patogénesis de la MG mediante la presentación inmunológica de formas incompletas del AChR (Kirchner et al., 1988; Nagvekar et al., 1998). En los timomas, se han detectado por RT-PCR, RNAm de todas las subunidades del receptor de acetilcolina (Hara et al., 1991).

Para el caso del timo hiperplásico, se han postulado otros mecanismos. Por ejemplo, en la MG, el timo presenta infiltración perivascular y formación de centros germinales por linfocitos extratímicos. Esta es una característica de los tejidos que están bajo intenso ataque autoinmune, y no de la hiperfunción tímica, tal como ha sido demostrado en la enfermedad autoinmune del tiroides (Armengol et al., 2001).

Por otra parte, en MG, el timo no es el único órgano que presenta lesiones histológicas: en un pequeño porcentaje de pacientes el músculo esquelético también puede presentar infiltración por macrófagos y células T, llamada linforragia, pero las células inflamatorias no se encuentran relacionadas con la placa motora (Nakano and Engel, 1993).

La demostración de la producción intratímica de anticuerpos contra el AChR (Katzberg et al., 2001) y los experimentos en ratones SCID en los cuales se reproduce la MG mediante el injerto de tejido tímico confirman el papel del timo en esta enfermedad (Spuler et al., 1996).

Curiosamente, en los modelos animales de MG, la estructura y la función tímica no se encuentran alteradas. Esto sugiere que en el ser humano el timo es donde probablemente se inicia y se mantiene la respuesta autoinmune, tal vez en respuesta a la expresión intratímica del AChR (Melms et al., 1988).

La presencia intratímica del receptor ha sido previamente demostrada bajo la forma de una proteína similar al AChR denominada *AChR-like*. La expresión esta proteína se ha demostrado mediante inmunohistoquímica, en las células epiteliales tímicas (Kirchner et al., 1988) tanto en los timos normales (Marx et al., 1989) como en los timomas de pacientes con MG (Liyanage et al., 1998).

Otra hipótesis sostiene que las *células mioides* expresan el receptor de acetilcolina en el timo (Wakkach et al., 1999), debido a que es posible la diferenciación en cultivo de fibras musculares estriadas, o células mioides, a partir de células reticulares tímicas. Las células mioides se encuentran normalmente distribuidas en la médula tímica, en íntima asociación con las células reticulares interdigitantes, ambas rodeadas de linfocitos T CD3<sup>+</sup> (Melms et al., 1988). A partir de estas observaciones, se ha postulado la posible participación de estas células en patogenia de la MG. Las células presentadoras de antígeno en el timo, captarían el antígeno liberado por las células mioides (tal vez por muerte celular) y presentarían el AChR a los linfocitos en diferenciación por razones no conocidas. Mientras que normalmente esta presentación induciría tolerancia, en ciertas circunstancias podría provocar inmunidad, con el desarrollo de anticuerpos contra el AChR.

Muchos trabajos previos han demostrado la expresión intratímica de las subunidades alfa y beta del receptor en timos normales (Mihovilovic et al., 1998; Wheatley et al., 1992; Wilisch et al., 1999) y en timos de pacientes con MG (MacLennan et al., 1998; Mihovilovic et al., 1993; Mihovilovic and Roses, 1993; Navaneetham et al., 1997; Zheng et al., 1998) sin embargo, la expresión intratímica del receptor *a nivel molecular*, ha dado lugar a controversias. La discrepancia en los trabajos previos reside en que algunos autores han encontrado expresión tímica de la forma *adult* del AChR, es decir, las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ , (Kaminski et al., 1993; Wakkach et al., 1996) mientras que otros han demostrado RNAm de la forma *fetal* del AChR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) (Geuder et al., 1992; Horton et al., 1993; Nelson and Conti-Tronconi, 1990).

También existen controversias en la expresión intratímica de la subunidad alfa. La subunidad alfa del receptor humano de acetilcolina, existe en dos isoformas, derivadas de splicing alternativo de un exón, denominado 3A, que codifica para 25 aminoácidos y se encuentra localizado entre los exones 3 y 4 del gen de esta subunidad. Algunos autores han encontrado expresada en el timo solo la isoforma que contiene al exón 3A, llamada 3A<sup>+</sup> (Talib et al., 1993), mientras que otros han encontrado ambas isoformas la 3A<sup>+</sup> y la 3A<sup>-</sup> (Hara et al., 1993). Debido a estas controversias, esclarecer la expresión intratímica de las subunidades del receptor de acetilcolina en el timo humano, así como los tipos celulares responsables de la síntesis y de la expresión de este antígeno, podrían ayudar a comprender la activa participación del timo en la Miastenia Gravis.

### 3.2 Esclerosis Múltiple

La Esclerosis Múltiple (MS) es una enfermedad inflamatoria crónica del sistema nervioso central, caracterizada por áreas focales de desmielinización y disfunción neurológica progresiva (Noseworthy et al., 2000). La etiología de la enfermedad es aún desconocida, pero un gran número de evidencias experimentales apoyan el origen autoinmunitario de la MS (Martin et al., 1992) que incluye además susceptibilidad genética y factores ambientales que predisponen a padecer la enfermedad (Ebers et al., 1995).

El origen autoinmunitario de la MS se basa en la inflamación observada en las placas de esclerosis (Lucchinetti et al., 2000) y en la respuesta favorable de algunos pacientes al tratamiento inmunosupresor e inmunomodulador (Martin et al., 2001b) así como también en la marcada asociación con genes de HLA, especialmente HLA-DRB1\*1501, DRB5\*0101 y DQB1\*0602 que han sido identificados como genes de susceptibilidad a la MS (Martin, 1997; Martin et al., 1992).

Otra evidencia convincente de que la MS es una enfermedad autoinmunitaria procede de los modelos animales como la *Encefalitis Alérgica Experimental* (EAE), o la encefalitis provocada por virus (Zamvil and Steinman, 1990), donde se observa que las células T autorreactivas frente a antígenos mielínicos inducen enfermedad autoinmunitaria desmielinizante. Los modelos animales de MS han ayudado a definir un gran número de autoantígenos involucrados en el ataque autoinmune de las células T. En la MS, las células T CD4+ de tipo Th1, secretoras de IFN- $\gamma$  son importantes en la iniciación y en la perpetuación de la enfermedad. En los pacientes con MS se han encontrado células T reactivas contra la mayoría de los autoantígenos del SNC, incluyendo la MBP (Martin et al., 1991; Martino and Hartung, 1999; Ota et al., 1990), la PLP (Markovic-Plese et al., 1995; Pelfrey et al., 1994; Sun et al., 1991b; Trotter et al., 1991), MOG (Kerlero de Rosbo et al., 1997; Sun et al., 1991a), MOBP (Holz et al., 2000), la S100 $\beta$ , (Schmidt et al., 1997) y la  $\alpha$  B-Cristalina (van Noort et al., 1995).

La presencia de células T capaces de reconocer antígenos de la mielina en la periferia indicaría que no han sido completamente eliminadas durante la selección negativa en el timo, y que por lo tanto, bajo ciertas circunstancias podrían ser activadas, por ejemplo durante una infección viral. El mecanismo propuesto para explicar la iniciación de la enfermedad implica que en una primera etapa, los antígenos virales podrían activar directamente a las células T autorreactivas mediante reacción cruzada (*molecular mimicry*) o indirectamente a través de citocinas inflamatorias (Martin et al., 2001a; Mokhtarian et al., 1999). Posteriormente, las células T activadas en la periferia serían capaces de atravesar la barrera hemato-encefálica (Karpuz et al., 1997) y de ser reactivadas *in situ* por los antígenos mielínicos presentados en el contexto de las moléculas de MHC. Dentro del sistema

nervioso central, estas células T serían capaces de iniciar una reacción inflamatoria local además de activar a los macrófagos y a las células presentadoras de antígeno, como la microglia. La reacción inflamatoria provocarían el daño a los oligodendrocitos, a través de diferentes mecanismos efectores como por ejemplo mediante la producción local de citocinas inflamatorias, de moléculas mediadoras de apoptosis, de citotoxicidad mediada por anticuerpos y de radicales libres de oxígeno y nitrógeno.

La lesión histológica se caracteriza por la presencia de macrófagos y células T, gliosis, desmielinización, diferentes grados de daño axonal, y una reacción inflamatoria de tipo Th1 (Cannella and Raine, 1995).

Aunque la desmielinización observada en los pacientes con MS se atribuyó inicialmente a la acción de mediadores inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral (TNF) (Liu et al., 1998), recientemente se ha demostrado que la respuesta inmune humoral desempeña un papel importante en la patogénesis de la desmielinización (Archelos et al., 2000; Genain et al., 1999; O'Connor et al., 2001; Raine et al., 1999; Storch et al., 1998a). Los anticuerpos participan en el proceso de destrucción de la mielina mediante diferentes mecanismos, como son la opsonización de la mielina, facilitando la fagocitosis de los macrófagos, y la unión del complemento (Bernard and Kerlero de Rosbo, 1992).

Por otra parte, el análisis anatómo-patológico de las lesiones de los pacientes con MS indica que los mecanismos efectores de las lesiones puede ser diferente entre distintos grupos de pacientes (Lucchinetti et al., 2000). Lucchinetti et al. ha descrito cuatro patrones diferentes de desmielinización en los pacientes con MS, en función de la destrucción de los oligodendrocitos, de la localización y de la extensión de las placas, y de las evidencias de la activación del complemento. En un grupo de pacientes, los autoanticuerpos específicos contra antígenos de la mielina (Genain et al., 1999), inclusive anticuerpos específicos contra MOG (Haase et al., 2001; Reindl et al., 1999; Xiao et al., 1991), producirían el daño tisular mediante citotoxicidad mediada por anticuerpos y activación del complemento (Lucchinetti et al., 2000). En otro grupo de pacientes, la desmielinización estaría asociada a una gran inestabilidad de las células formadoras de la mielina, los oligodendrocitos, en los cuales se ha demostrado la pérdida de la glicoproteína asociada a mielina (MAG), cambios degenerativos y muerte por apoptosis (Lucchinetti et al., 2000; Werner et al., 2001). Además, otros factores podrían contribuir en la inflamación tisular, como por ejemplo la persistencia de infecciones virales (Marten et al., 1999; von Herrath et al., 1996) o la reactivación de ciertos virus en el sistema nervioso central, como el virus del herpes humano HHV-6 (Soldan et al., 1997).

De todo lo expuesto anteriormente se concluye que la respuesta autoinmunitaria humoral y celular observada en la MS es heterogénea y está afectada por factores ambientales y por el

background genético individual, lo cual condicionaría que diversos aspectos de la función del sistema inmunológico pudiesen estar alterados. Así, por ejemplo, la secreción de citocinas pro-inflamatorias podría estar aumentada en algunos pacientes, mientras que la apoptosis o la regulación de la respuesta inmune podría encontrarse alterada en otros (Martin et al., 2001b).

### 3.2.1 Modelos animales de Esclerosis Múltiple

La *Encefalitis Alérgica Experimental* (EAE), un modelo animal de MS, se describió en el año 1933, cuando Tomas Rivers intentaba establecer el origen de la reacción inflamatoria que ocurría en el cerebro después de ciertas infecciones virales o luego de la vacunación contra la rabia (Rivers et al., 1933). Años más tarde, en 1947, se demostró que podía inducirse EAE inoculando tejido cerebral junto al adyuvante de Freud, y desde la década de los años 80 la EAE se convirtió en *Encefalitis Autoinmune Experimental* (EAE) como el arquetipo de modelo de enfermedad autoinmune mediada por células de tipo Th1.

Existen dos tipos de EAE: la que se induce mediante inmunización con tejido del sistema nervioso central o con sus componentes purificados, conocida como inducción activa de EAE, y la que se induce mediante inyección intravenosa de células T sensibilizadas y activadas *in-vitro*, conocida como transferencia adoptiva de EAE. Los principales mediadores del desarrollo de la enfermedad y de la inflamación del cerebro en este modelo son las células T CD4+ reactivas frente a antígenos mielínicos y las citocinas pro-inflamatorias del tipo Th1, tales como el IFN- $\gamma$ , la IL2 y el TNF- $\beta$  (Kuchroo et al., 1993).

Ningún modelo animal reproduce exactamente las características de la MS humana, pero los diferentes modelos generados en cepas diversas de ratas y ratones han ayudado a definir gran una cantidad de autoantígenos y a relacionarlos con la localización histopatológica de las lesiones desmielinizantes.

El modelo de EAE en ratas Lewis, a diferencia de la MS, no presenta recurrencia espontánea ni tampoco lesiones primarias desmielinizantes. Además, al contrario de lo que se observa en MS, mediante la inmunización con MBP o por transferencia de células T específicas, se produce inflamación y daño axonal en la médula espinal. Solo se observa desmielinización importante si junto con las células T autorreactivas se transfieren anticuerpos específicos contra MOG. Esto refleja la participación de los anticuerpos, y el depósito de complemento en la desmielinización que se observa en MS (Storch et al., 1998b). Sin embargo, el modelo de EAE en ratas ha permitido definir nuevos autoantígenos, como por ejemplo la S100 $\beta$ , una proteína expresada por los astrocitos que se encuentra también presente en el timo y en nervios periféricos. La inmunización con S100 $\beta$  provoca

una forma de EAE con inflamación por células T y con patología en el nervio óptico, siendo ésta última una característica de la MS temprana (Kojima et al., 1994).

Los modelos de EAE en ratones, comparten algunas características con la MS en humanos, ya que pueden presentar un curso remitente-recurrente y también se pueden observar evidencias histopatológicas de desmielinización. Las cepas más susceptibles, como las SJL/J o PL/J presentan además un alto grado de heterogeneidad durante el curso de la enfermedad.

Por otra parte, el desarrollo de modelos de ratones transgénicos que expresan genes de un TCR específico de MBP o de PLP han permitido esclarecer los mecanismos de tolerancia, ya que han permitido distinguir entre ignorancia de antígeno y tolerancia incompleta frente a los componentes de mielina. Por ejemplo, los ratones *shiverer* son mutantes espontáneos, que han perdido la expresión de la MBP. Si la ignorancia fuese el mecanismo para la tolerancia a la MBP, el repertorio de células T específicas no deberían ser diferentes en el mutante y en la cepa salvaje. Sin embargo, la MBP endógena tiene una gran importancia en el desarrollo del repertorio de las células T. Los ratones de la cepa salvaje, que expresan MBP, presentan un ámbito más estrecho de reactividades contra MBP que los ratones *Shiverer*, deficientes en MBP. Estos resultados permiten concluir que las células T específicas de MBP en los ratones sanos representan un pequeño repertorio de células T que ha estado sometido a inducción parcial de tolerancia (Harrington et al., 1998; Targoni and Lehmann, 1998). Del mismo modo, se observa algo similar cuando se compara el repertorio de células T de los ratones en que se ha inactivado el gen de la PLP con el de la cepa salvaje: en los ratones de la cepa salvaje se induce tolerancia específica de epítopo en el repertorio de células T, sin eliminar completamente la reactividad contra PLP (Klein et al., 2000).

En este tipo de estudios en ratones transgénicos se ha podido observar que el balance entre mecanismos regulatorios y efectores es crítico para el desarrollo de la enfermedad: la aparición de la enfermedad no depende solo de la existencia de células T autorreactivas, sino también de la presencia de un número adecuado de células T regulatorias funcionales (Lafaille et al., 1994).

### **3.2.2 El papel de timo en la Esclerosis Múltiple**

Los componentes del sistema nervioso central constituyen el ejemplo principal de autoantígenos que están anatómicamente secuestrados del sistema inmune por la barrera hemato-encefálica. Sin embargo, el sistema inmune del ratón y también el humano, son tolerantes a los componentes del SNC. Esta aparente contradicción ha sido resuelta por el hallazgo de que la expresión de componentes de mielina no están restringidos solamente a

los oligodendrocitos del sistema nervioso central, sino que también se encuentran en tejidos linfoides (Fritz and Zhao, 1996; Kojima et al., 1997; Pribyl et al., 1996; Smith et al., 1997; Voskuhl, 1998). La importancia funcional de la expresión tímica de los antígenos del sistema nervioso central ha sido demostrada en ratones, en los cuales la expresión de ciertos epitopes de PLP en el epitelio tímico es una condición necesaria para inducir tolerancia central (Anderson et al., 2000; Klein et al., 2000). La tolerancia frente a PLP que se observa en ratones de cepa BL/6 puede reproducirse con la re-expresión del gen de PLP en el timo de ratones deficientes de PLP, debido a que la tolerancia a la PLP se lleva a cabo en el timo durante el desarrollo del repertorio de las células T.

Sin embargo, no debe asumirse necesariamente una estricta correlación entre expresión intratímica de un autoantígeno y tolerancia a su proteína, sino que es necesario estudiar cada antígeno en particular. Es importante notar que la tolerancia frente a dos antígenos, como por ejemplo la PLP y el componente amiloide sérico P, que es la principal proteína hepática de fase aguda en el ratón, en ambos casos la expresión en el epitelio tímico es suficiente para inducir tolerancia (Klein et al., 2000; Klein et al., 2001).

Curiosamente, esto mismo no se observa para el caso de la MBP. Aunque la MBP clásica no se encuentra expresada en el timo, se establece tolerancia central frente a ciertos epitopes de MBP aún en ausencia de dichos epitopes en el timo (Huseby et al., 2001).

Existen dos isoformas de MBP, derivadas de *splicing* alternativo del mRNA: una isoforma clásica que se encuentra exclusivamente representada en el SNC, y una forma denominada golli-MBP que se encuentra expresada en timo y en tejidos linfoides periféricos. Los epitopes presentes en la golli-MBP al encontrarse expresados en el timo, podrían inducir tolerancia central, mientras que los epitopes específicos de la MBP clásica no estarían disponibles para inducir tolerancia central. Esto se cumple para ratones C3H (Huseby et al., 1999; Targoni and Lehmann, 1998) pero no se observa en ratones B10.PL (Harrington et al., 1998). Las células T específicas contra los epitopes de MBP<sub>121-150</sub> (que son los epitopes contenidos en la MBP clásica y no se han detectado en el timo), sufren inducción de tolerancia, mientras que los epitopes contenidos en la MBP<sub>1-11</sub> (que forman parte de la golli-MBP y se encuentran expresados en el timo), no son tolerizadas. Esto indica que la tolerancia frente a epitopes de MBP no se correlaciona con la expresión de esos epitopes en el timo. La causa de esta diferencia podría deberse a la estabilidad de los complejos entre MHC y los péptidos de MBP. Los epitopes de MBP<sub>1-11</sub> forman complejos muy inestables con MHC, aparentemente no efectivos en la inducción de tolerancia, mientras que los epitopes de MBP<sub>121-150</sub> forman complejos extremadamente estables (Fairchild et al., 1993; Harrington et al., 1998). Estos datos podrían indicar que la tolerancia central a epitopes de MBP podría ocurrir en ausencia de síntesis de estos epitopes en el timo, y que la alta estabilidad de los



complejos de MCH y los epitopes MBP<sub>121-150</sub> permita a las células derivadas de la médula ósea transportar suficientes cantidades de esos complejos hacia el timo para inducir tolerancia central.

Los mecanismos de delección clonal de las células T autorreactivas en el timo requieren de la expresión intratímica de los autoantígenos o bien de la entrada de los mismos desde la circulación sanguínea, en cantidades suficientes. Recientes estudios indican que las células presentadoras de antígenos en la médula tímida, las células hemopoiéticas y las células epiteliales, se complementan en su función de la presentación de antígenos: las células hemopoiéticas (dendríticas, macrófagos y otras linfoides) derivadas de la médula ósea podrían representar antígenos hemopoiéticos, extracelulares y captados en la periferia, mientras que las epiteliales podrían representar los antígenos propios no-hemopoiéticos, optimizando así el proceso de la presentación de los antígenos propios dentro del timo (Klein and Kyewski, 2000)

Debido a los hallazgos de expresión intratímica de antígenos específicos de tejidos (Sospedra et al., 1998), se debe revisar el idea previa de que la tolerancia central estaba limitada a un grupo restringido de proteínas abundantes. Es por ello que decidimos investigar si los antígenos del sistema nervioso central, principalmente aquellos antígenos considerados secuestrados e involucrados en la respuesta autoinmune de la MS, se encuentran expresados en el timo humano.

#### **4. Antígenos Prostáticos: autoantígenos relacionados con la madurez sexual**

La próstata es un órgano retroperitoneal que se desarrolla en el embrión como múltiples excrescencias sólidas del epitelio uretral, por encima y por debajo de la entrada del conducto mesonéfrico. Mas tarde estas excrescencias se fusionan y dan origen a tres lóbulos definidos que rodean al cuello de la vejiga urinaria y a la uretra posterior.

Histológicamente es una glándula túbulo-alveolar compuesta. Presenta un estroma fibromuscular de tejido conjuntivo, fibras elásticas y musculares y espacios glandulares revestidos por epitelio cilíndrico mucosecretor. Estas glándulas se abren a conductos excretores que desembocan en el piso de la uretra prostática.

Las células epiteliales, y en menor medida las células estromales, presentan receptores de andrógenos que tienen importancia en el desarrollo de la glándula, ya que la castración o el bloqueo de los mismos con antiandrógenos origina atrofia de la próstata.

Las enfermedades prostáticas mas comunes en hombres jóvenes y de edad avanzada, son la *prostatitis*, la *hiperplasia prostática benigna* (HPB) y el *cáncer de próstata* (Roberts et al., 1997).

Mientras que el cáncer de próstata es la forma de malignidad mas común en varones, la HPB se desarrolla con frecuencia en hombres de 50 años y se caracteriza por la formación de nódulos periuretrales que comprimen la uretra. A nivel histológico, se observa proliferación glandular y del estroma fibromuscular y una reacción inflamatoria caracterizada por abundantes leucocitos, macrófagos y linfocitos.

El término *prostatitis* literalmente significa inflamación de la glándula, pero clínicamente puede no estar asociado a inflamación. Histológicamente, el 5-10% de las prostatitis son bacterianas, pero el 90% de las mismas son de etiología no bacteriana. Los estudios en modelos animales sugieren como agentes etiológicos factores genéticos, exposición neonatal a estrógenos, desbalance hormonal, envejecimiento, presencia de un agente inflamatorio no infeccioso, y actualmente se acepta una posible etiología autoinmune de la enfermedad (Roberts et al., 1997).

Se ha observado que los pacientes con prostatitis crónica presentan células T CD4+ periféricas reactivas contra antígenos prostáticos, como ejemplo contra el antígeno prostático específico (PSA) (Alexander et al., 1997; Ponniah et al., 2000). La respuesta autoinmune contra antígenos prostáticos en estos pacientes puede ser debida a un repertorio de linfocitos T autorreactivos que no fueron eliminados durante la maduración tímica, y que persisten en el repertorio normal de células T.

En 1994, Taguchi et al. demostró que la cepa de ratones B6A desarrollaban prostatitis autoinmune espontánea si se los timectomizaba tres días después del nacimiento (Taguchi et al., 1994). Sin embargo, la prostatitis podía revertirse si se les inyectaban células CD4+ del bazo de machos adultos normales, o de ratones castrados tratados con andrógenos, pero no se revertía cuando las células procedían de hembras, o de ratones recién nacidos castrados. Estos experimentos demostraron que la tolerancia frente a antígenos prostáticos de encuentra regulada por clones de células T CD4+ regulatorios supresores, los cuales son activados por los antígenos prostáticos en los órganos linfoides periféricos (Taguchi et al., 1994).

La presencia de clones de células T regulatorias específicas contra antígenos prostáticos en ratones, y la presencia de células T autorreactivas en pacientes con prostatitis crónica, nos llevó a cuestionarnos si acaso el timo humano expresa transcritos de los principales antígenos prostáticos, como son el PSA y el antígeno prostático específico de membrana (PSM), dos antígenos cuya expresión depende de los andrógenos y que por lo tanto su aparición en la próstata y en la circulación sanguínea depende de los andrógenos y están relacionados con la madurez sexual del individuo.



### **OBJETIVO PRINCIPAL**

Elucidar si el timo humano expresa a nivel molecular transcritos de autoantígenos periféricos que presentan diferentes grados de restricción tisular.

### **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

**Objetivo I:** Relacionar la expresión tímica de los autoantígenos con la edad

**Objetivo II:** Investigar si existen diferencias entre las formas de mRNA de los autoantígenos presentes en el timo y en el órgano diana

**Objetivo III:** Identificar la población celular responsable de la expresión de los autoantígenos en el timo