

# *Bases moleculares del reconocimiento alogénico*

A. FRANCO, J. LUIS CASTAÑER, A. BOOTELLO

Servicio de Inmunología Clínica  
Hospital Ramón y Cajal. Madrid

## INTRODUCCIÓN

Aunque existen referencias de ensayos con implantes de tejidos humanos para remplazar áreas lesionadas a lo largo de la historia, el impulso del moderno trasplante tuvo lugar en la década de los años 40. En un intento por mejorar la supervivencia de los pacientes que sufrían extensas quemaduras en su cuerpo, algunos cirujanos realizaron implantes de piel procedentes de donantes humanos para cubrir las áreas lesionadas. Sin embargo, los intentos de reemplazar la piel quemada con piel de donantes no relacionados resultaron siempre un fracaso. En unos cuantos días, la piel se necrosaba y se desprendía. Este problema llevó a muchos investigadores a estudiar el trasplante en modelos animales. Los experimentos realizados establecieron que el fracaso del injerto se debía a una reacción inflamatoria que se denominó rechazo, y lo que es más importante, varias características indicaban que el rechazo era una forma de inmunidad específica. Los diferentes resultados obtenidos de los injertos realizados entre animales singénicos (genéticamente idénticos), y entre animales alogénicos (genéticamente diferentes) establecieron que existía una base genética para el reconocimiento del trasplante como extraño. A los genes responsables de que se percibiera un trasplante de tejido como similar a los tejidos propios o como extraño, se les denominó genes de histocompatibilidad, y las diferencias entre lo propio y lo extraño se atribuyeron al polimorfismo genético entre los distintos alelos de histocompatibilidad. Estudios posteriores demostraron que aunque varios genes podrían contribuir al rechazo, una sola región genética era la responsable de la mayor parte del rechazo. Esta región, en la cual se comprobó que comprendía varios genes pero con una fuerte asociación de ligamiento, se llamó Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, «*Major Histocompatibility*

*Complex*). Aunque el papel de las moléculas del MHC como origen del rechazo inmunitario del injerto suscitó un considerable interés, el papel central de los genes del MHC en las respuestas inmunitarias frente antígenos proteicos no fue aclarado hasta finales de la década de los 70, con la demostración de que los linfocitos T específicos para un antígeno no lo reconocían en su forma soluble o libre, si no que precisaban que pequeños fragmentos de este antígeno se presentasen unidos a los productos de los genes del MHC.

## SISTEMAS ANTIGÉNICOS EN LA RESPUESTA ALOGÉNICA

El trasplante presenta un mosaico de antígenos extraños al huésped. La respuesta aloinmune viene determinada por las características de estos antígenos y la forma en que son presentados al sistema. Los principales sistemas antigénicos relacionados con la respuesta al trasplante son:

- 1) Sistema del MHC. Caracterizado por su elevado polimorfismo, los principales *loci* involucrados en la alorrespuesta son: los *loci* de clase I HLA-A, B y C, y los *loci* de clase II que codifican las moléculas HLA-DR, DQ y DP.
- 2) Sistema de grupo sanguíneo ABO. La incompatibilidad en este sistema de polisacáridos genera una respuesta rápida de rechazo del injerto debido a la presencia de anticuerpos naturales (preformados). Si bien esta incompatibilidad no es absoluta: los receptores de grupo O pueden aceptar con menor respuesta los órganos de donantes de grupo A2 (en contraste con el grupo A1), los receptores AB, por la ausencia de anticuerpos anti-A y anti-B pueden aceptar órganos de grupo O, A y B.
- 3) Antígenos menores de Histocompatibilidad. Constituidos por diferentes sistemas de proteínas con variabilidad discreta que requieren de la presentación indirecta (mediada por moléculas del sistema HLA) para generar la respuesta aloinmune.

## COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

### *Introducción*

El conocimiento del Complejo Principal de Histocompatibilidad sigue ampliándose desde que hace 50 años se describió por primera vez un gen responsable del rechazo agudo de trasplantes. Los hitos fundamentales de este conocimiento han sido:

1. La asociación de los genes de histocompatibilidad con antígenos de membrana de los leucocitos.
2. La descripción del polimorfismo y de la complejidad genética del sistema.
3. La vinculación de estos genes y sus productos con los fenómenos de restricción de la respuesta inmune, y el lugar central que ocupa en el control de la respuesta inmune.
4. La asociación de algunos de los alelos con ciertas enfermedades.

El MHC en el hombre se denomina sistema HLA («*Human Leukocyte Antigens*») y está integrado por un conjunto de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6 (entre los marcadores 6p21.31 y 6p21.32), en un segmento de 4000 kb que corresponde únicamente al 1/1000 del genoma humano total<sup>1,2</sup>. Los genes del MHC permiten la clasificación de tres regiones, caracterizadas por codificar tres tipos de proteínas con diferentes funciones, denominadas de clase I, II y III. Las moléculas de clase I y II representan entidades estructurales diferentes, aunque todos los productos de estos genes pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, e intervienen en los procesos de activación linfocitaria y restricción de la respuesta T. La región de clase III está integrada por los genes que codifican moléculas de complemento (C2, C4A, C4B y factor B) y las isoenzimas de la 21-hidroxilasa. Entre la región de clase III y la de clase I existen un grupo de genes que codifican proteínas relacionadas con situaciones de estrés, inflamación o infección, que se consideran como una región diferente atendiendo a su función (región de clase IV). En esta región se encuentran los genes para las proteínas del choque térmico de 70 kDa (hsp70, «*Heat shock protein*»), algunas citoquinas como la linfotóxina a (LTA) también llamada TNF-b («*Tumor Necrosis Factor*»), la linfotóxina b (LTB); y otros.

### *Región de clase I*

La organización genómica de la clase I presenta una compleja amalgama entre genes con distinta repercusión funcional. Existen 8 genes que se expresan, es decir, sus secuencias codifican proteínas reconocibles en la célula, (HLA-A, B, C, E, F, G, MICA y MICB), 4 pseudogenes completos (HLA-H, J, K y L), 4 pseudogenes truncados (HLA-75, 16, 80 y 90), y 3 fragmentos génicos. Intercalados entre los *loci* MHC propiamente dichos, encontramos *loci* de genes no relacionados y sin función inmunológica reconocida (cadena b de la tubulina, proteína de unión a GTP, factor de transcripción de unión a octámeros)<sup>2</sup>.

Los genes que se expresan codifican la cadena a, pesada, de la molécula de clase I, y se distribuyen en genes de clase Ia y clase Ib. Las prote-

inas codificadas por los genes de clase Ia (o antígenos de clase I clásicos) se expresan en la mayoría de las células somáticas, y su función es presentar péptidos a los linfocitos T. Son altamente polimórficos, presentándose múltiples alelos en la población humana. Las proteínas de los genes de clase Ib (no clásicos) no presentan variabilidad alélica, o es muy escasa, y tienen una expresión diferencial según los tejidos. Los antígenos que son capaces de presentar a los linfocitos T parecen ser más restringidos y de naturaleza diferente (péptidos formilados). Los *loci* de clase Ia son HLA-A y B, los de clase Ib son HLA-E, F y G. El *locus* HLA-C quedaría entre las dos categorías: presenta un polimorfismo apreciable, su expresión celular es baja y su capacidad para presentar péptidos en condiciones fisiológicas no está demostrada. Los *loci* MICA y MICB («*MHC class I Chain-related*» A y B) se excluyen de la categoría Ib por considerarse más ancestrales que el resto. La expresión de antígenos de clase Ia del sistema HLA es ubicua, sin embargo presenta importantes diferencias en la intensidad de expresión entre los diferentes tejidos. Tomando la expresión máxima, que ocurre en el bazo, como el 100%, las células de los diferentes tejidos renales expresan por término medio con una intensidad del 14% (Tabla 1)<sup>3</sup>.

TABLA 1. Expresión de Antígenos HLA en el riñón humano

Antígenos del Sistema HLA	VASOS SANGUÍNEOS		INTERSTICIO	CÉLULAS EPITELIALES			
	Endotelio Arterial	Endotelio Capilar	Células Dendríticas	Glomerular	Cápsula de Bowman	Proximales	Distales
Clase I (HLA-A, B, C)	++	++	++	+	+	+	+
Clase II (HLA-DR, DQ)	-	++	+++	-	-	-	-
Inducción de Clase II	+			+		+	

### *Región de Clase II*

Dentro de la estructura génica de la región de clase II nos encontramos con: Once genes MHC de clase II, 4 genes que codifican proteínas relacionadas con el procesamiento del antígeno para la presentación en moléculas de clase I (LMP2, LMP7, TAP1 y TAP2); un pseudogén de clase I (HLA-Z1); y al menos dos genes no relacionados con funciones inmunes, junto a varios pseudogenes<sup>4</sup>.

Los genes de clase II se agrupan en la denominación HLA-D y se distinguen 5 familias o isotipos: DM, DO, DP, DQ y DR. Cada una de estas familias presenta dos tipos de *loci*, A y B, que codifican las cadenas a y b de la molécula de clase II, respectivamente. Cada molécula de clase II se constituye como un heterodímero a/b, donde las dos cadenas son de la misma familia. Tres *loci* (DR, DQ y DP) codifican las moléculas de clase II, aunque se han identificado otros genes adicionales que codifican proteínas de clase II no clásicas. La familia DR comprende un simple gen a (DRA) y más de 9 genes b (DRB1-9) incluidos pseudogenes (DRB2, DRB6, DRB7, DRB8, DRB9). En el caso de la familia DP, se expresa un gen para la cadena a (DPA1) y otro para la cadena b (DPB1); además existen dos pseudogenes (DPB2 y DPA2). Para la familia DQ, se expresa un gen para la cadena a (DQA1) y otro para la cadena b (DQB1), existiendo otros genes que no se expresan (DQB2, DQB3 y DQA2).

La organización y longitud de la región DRB varía en los diferentes haplotipos, y cada uno de ellos expresa un número determinado de genes b. En estos casos, la cadena a (DRA) sigue formando con la cadena b del DRB1 algunas de las moléculas HLA-DR (DR1 a DR18), y forma con las otras cadenas b una segunda molécula que se denomina DR52 (si se asocia al producto de DRB3), DR53 (si se asocia al de DRB4) y DR51 (si se asocia al de DRB5).

Además de los genes que codifican las moléculas de clase II clásicas, existen los llamados genes no clásicos: DOA, DOB, DMA y DMB que pueden ser funcionales, y codifican antígenos de clase II no clásicos HLA-DO y HLA-DM. Las moléculas de HLA-DM están normalmente ausentes de la superficie celular, acumulándose en el compartimento intracelular. Presentan un limitado polimorfismo y últimamente han cobrado gran relevancia, ya que parecen intervenir en la estabilización y expresión de las moléculas HLA de clase II en el interior celular hasta que éstas se unen al péptido que van a presentar a los linfocitos T<sup>5,6</sup>. Los genes DO codifican la molécula de clase II no clásica HLA-DO que está íntimamente asociada con DM en las células B, y podría regular su función<sup>7,8</sup>.

La región de clase II contiene otros genes que también codifican proteínas involucradas en la presentación de antígeno (LMP2, LMP7, TAP-1, TAP-2), y que no son expresadas en la superficie celular<sup>9</sup>. TAP-1 y 2 codifican las subunidades de una proteína heterodimérica que transporta péptidos del citosol al retículo endoplásmico, donde puede asociarse con cadenas pesadas de clase I recién traducidas. Los otros genes de este grupo, LMP2 y LMP7, codifican subunidades de un complejo de proteasas citoplasmáticas (proteasomas), que está implicado en la generación de péptidos a partir de proteínas citosólicas que se incorporan a las moléculas de clase I.

La expresión de antígenos de clase II del sistema HLA está restringida en condiciones fisiológicas a células del sistema inmune y del sistema

retículo-endotelial. En condiciones basales, son expresados en el riñón por células endoteliales de capilares, por algunas células mesangiales derivadas de médula ósea y, sobre todo, por las células dendríticas. Pero su expresión es inducible en otros tipos celulares (Tabla 1).

### *Región de clase III*

Como ya se ha dicho anteriormente, esta región no contiene genes que codifiquen moléculas HLA, aunque presenta varios genes relacionados con la respuesta inmune. Importa destacar: PBX2 («*pre-B cell leukaemia transcription factor 2*»); AGER («*Advanced glycosilation end product-specific receptor*»); CYP21 (citocromo P450); los genes del complemento C4B, C4A, Bf y C2; los genes de proteínas Hsp HSP701L, 1 y 1H; B144 (proteína B144 expresada en células B); y los genes de la superfamilia del TNF: LTB, TNF y LTA<sup>9,10</sup>.

### *Organización de los genes individuales de clase I y de clase II*

Los patrones generales de organización intrón-exón de los genes de clase I y II son similares a los de otros genes. En todos los genes del MHC, la secuencia del primer exón codifica el péptido líder o señal, que dirige las proteínas recién sintetizadas al retículo endoplásmico (luego es escindida y no se expresa en membrana). Cada uno de los segmentos extracelulares de unos 90 amino-acidos (dominios a1, a2 y a3 para clase I; y a1, a2, b1 y b2 para clase II) está codificado por un gran exón separado. Debido a que los polimorfismos se sitúan especialmente en el extremo amino terminal de las proteínas, las regiones polimórficas están contenidas en uno o dos exones por cada gen. Las regiones transmembrana y citoplasmática son codificadas por varios exones pequeños.

### *Características del sistema HLA*

#### Codominancia y fenotipo

Los alelos del sistema HLA se expresan de forma codominante. Esto es, en la membrana celular se presentan los productos de ambos alelos (del alelo materno y del alelo paterno). Por lo tanto, para cada uno de los *loci* encontraremos individuos homocigotos (ambos alelos codifican el mismo producto) o heterocigotos (alelos diferentes). La relación de antígenos expresados por un individuo se denomina fenotipo HLA.

## Haplotipos, segregación y genotipo

La estrecha unión de estos genes hacen que estos se transmitan juntos, en bloque de padres a hijos. Por cada progenitor existen dos series de genes (uno por cromosoma) llamados haplotipos. Un individuo hereda dos haplotipos de los cuatro posibles: 2 del padre (a y b) y 2 de la madre (b y c). De ello resultan 4 posibles combinaciones filiales: a/c, a/d, b/c y b/d, por lo que la probabilidad que dos hermanos sean HLA idénticos es del 25%, de que sean HLA diferentes del 25% y de que sean HLA semiidénticos o haploidénticos del 50%. En ocasiones ocurre una recombinación entre dos haplotipos originando uno nuevo, pero la tasa de recombinaciones es del 1%. Al conjunto de los dos haplotipos, individualizados, que pose un individuo se le denomina genotipo.

## Desequilibrio de ligamiento

Muchas y diferentes especificidades pueden ser detectadas para cada *locus* génico en la población humana. Puesto que virtualmente cualquier antígeno de la región A puede asociarse con cualquiera de la región B, C o D, el número de haplotipos presentes en la población humana es muy elevado. Sin embargo, ciertas combinaciones de especificidades de A y B ocurren con más frecuencia que la esperada si su asociación fuese al azar. Así, la frecuencia de la combinación de A1 y B8 es del 8.8% en la población, mayor que la esperada que es del 1.6% (frecuencias de 16% para A1, y 10 % para B8;  $0.16 \times 0.10 = 0.016$  ó 1.6%). Tales agrupaciones de especificidades se denominan desequilibrio de unión o ligamiento. Este fenómeno no es infrecuente, se puede producir entre los *loci* A y B, B y C, B y DR o DR y DQ. Más infrecuente, pero también ocurre, es el desequilibrio entre más de dos especificidades de *loci* distintos

## Polimorfismo alélico

El polimorfismo se debe a la existencia de un gran número de alelos para cada uno de esos genes. La diversidad genera una gran cantidad de combinaciones en un cromosoma, lo que hace extremadamente difícil hallar dos personas no emparentadas con HLA idéntico. Los genes de histocompatibilidad son los genes más polimórficos encontrados hasta el momento del genoma de todas las especies analizadas. El polimorfismo de los antígenos HLA ocurre, como ya hemos visto a varios niveles: 1) múltiples *loci* relacionados, y 2) múltiples alelos.

## Zonas variables

La mayor parte de la variabilidad se concentra en el exón 2 de los genes de clase II y en los exones 2 y 3 de los genes de clase I. Dentro de estos exones, la variabilidad esta a su vez concentrada en determinadas posiciones, las cuales están implicadas directa ó indirectamente en la región de unión al péptido antigénico. Por otra parte, las variantes alélicas se pueden agrupar en familias de alelos. Estas familias están inmiscuidas entre especies; esto es, una determinado alelo presenta mayor homología con miembros de su familia, aún en especies más ó menos próximas, que con otros alelos de su especie. Esto ha permitido construir los linajes alélicos y seguir el proceso de divergencia filogénica.

## ESTRUCTURA DE LAS MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD

### *Moléculas de clase I*

Las moléculas de clase I están formadas por una cadena pesada glicoproteica a, de 44 kDa en el ser humano, codificada por los genes del cromosoma 6, asociada a una cadena ligera, la b2- microglobulina, codificada por un gen situado en el cromosoma 15.

### Cadena pesada a

La cadena pesada de la molécula de clase I consiste en tres dominios extracelulares, denominados a1 (N-terminal), a2 y a3, una región transmembrana y un tallo citoplasmático. Los tres dominios extracelulares comprenden alrededor de 90 aminoácidos cada uno y pueden ser separados de la superficie por enzimas proteolíticas como la papaína. Los dominios a2 y a3 poseen puentes disulfuro intracatenarios que dejan bucles de 63 y 82 aminoácidos respectivamente. El dominio a3 es homólogo con los dominios constantes de las inmunoglobulinas, y su secuencia de aminoácidos está muy conservada.

La porción extracelular de la cadena a está glicosilada, dependiendo el grado de glicosilación de la especie y del haplotipo. La región transmembrana es hidrofóbica y atraviesa la bicapa lipídica con una conformación en a-hélice. El dominio citoplasmático hidrofílico puede ser fosforilado *in vivo*; la secuencia total de este dominio intracitoplasmático no es igual entre las diferentes moléculas de clase I, aunque se conservan determinadas características específicas, como son los lugares de fosforilación. Se ha visto que deleciones de porciones del extremo carboxiterminal inhi-



ben la internalización de las moléculas de clase I, lo que implica directamente a la región carboxiterminal en el tráfico intracelular<sup>6</sup>.

### b2-microglobulina

La b2-microglobulina no es polimórfica en humanos, aunque es dimórfica en ratón. Tiene una estructura similar al dominio constante de las inmunoglobulinas (tanto el segmento a3 como la b2-microglobulina forman parte de la superfamilia de Igs). La b2-microglobulina también se asocia a otras estructuras relacionadas con los antígenos de clase I, por ejemplo, con CD1 y con los receptores Fc $\gamma$ R. La b2-microglobulina es esencial para la expresión de todas las moléculas de clase I en la superficie celular. Está estabilizada por un puente disulfuro intracatenario, se asocia íntimamente al dominio a3 de la cadena pesada y no tiene fijación directa a la célula.

### Estructura

La estructura terciaria de la molécula de clase I, estudiada por métodos cristalográficos, ha puesto de manifiesto que entre los dominios a1 y a2 se encuentra una hendidura cuyos bordes están constituidos por dos cadenas de configuración en a-hélice (una para a1 y otra para a2) y cuyo fondo está formado por bandas b (ocho en total repartidas entre a1 y a2), formando un plano sostenido por el tercer dominio, a3, a su vez unido a la b2-microglobulina, que refuerza y estabiliza la unión con el péptido<sup>11,12</sup>. Esta hendidura es un lugar de reconocimiento; aquí se sitúa el péptido procesado (de 8 a 10 aminoácidos) que se presenta a los linfocitos T. Las variaciones de aminoácidos dentro de la cavidad suponen la base estructural para las diferencias de afinidad de unión al péptido y por tanto gobiernan la respuesta *versus* no-respuesta del sistema inmune. Los péptidos asociados a las moléculas de clase I son presentados a los linfocitos T CD8+.

### Moléculas de clase II

Los productos clásicos de los genes de clase II son las moléculas HLA-DR, DQ y DP. Son heterodímeros de una cadena pesada a (de 32-34 kDa de peso molecular) y otra ligera b (de 29-32 kDa). Ambas tienen una estructura similar; una porción extracelular con dos dominios (a1 y b1, a2 y b2) unida por una corta porción transmembrana a un dominio citoplás-

mico (carboxi-terminal). Los dominios a2 y b2 son similares al dominio a3 de las moléculas de clase I y a la b2microglobulina, poseyendo por tanto características similares al dominio constante de las inmunoglobulinas (pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas). En las moléculas de clase II ambas cadenas polipeptídicas tienen grupos N-oligosacáridos.

## Estructura

La estructura tridimensional de la molécula de clase II es similar a la de los antígenos de clase I. Las cadenas a y b, a través de sus dominios a1 y b1, forman una hendidura más grande que la de los antígenos de clase I para acomodar a los péptidos que van a ser presentados a los linfocitos T. Para esto, estos dominios se pliegan y forman una lámina de 8 bandas b plegadas antiparalelas (4 de a y 4 de b), que sirve de apoyo a dos hélices a (una de a1 y otra de b1). Esta región de unión al péptido es polimórfica. Los segmentos a2 y b2 contienen puente disulfuro intracatenarios y están plegados en dominios de inmunoglobulinas<sup>13-15</sup>. No son polimórficos entre los distintos alelos de un determinado gen de clase II, pero muestran diferencias entre los distintos *loci* genéticos. Los péptidos asociados a las moléculas de clase II son presentados a los linfocitos T CD4+.

En resumen, en las porciones extracelulares de las moléculas de histocompatibilidad se distinguen dos partes estructural y funcionalmente diferentes. Una parte se dedica a la presentación de péptidos, y es diferente para cada una de las moléculas de histocompatibilidad conocidas o sea es polimórfica. En las moléculas de clase I, el polimorfismo reside en los dominios a1 y a2, mientras que en las de clase II está en a1 y b1. El resto de la molécula constituye la región monomórfica, porque apenas se distingue entre alelos del mismo isotipo. La región monomórfica no se ocupa de presentar péptidos, pero es el sitio que sirve de anclaje para el co-receptor CD4 ó CD8 del linfocito T, mientras que las regiones variables V-D-J del TCR $\alpha$  reconoce la región polimórfica de la molécula de histocompatibilidad.

## ANTÍGENOS MENORES DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Los antígenos de MHC alogénicos son la principal causa de rechazo de un injerto. Sin embargo, existen otras moléculas con capacidad de inducir una respuesta alogénica por parte del organismo que pueden comprometer la viabilidad de un trasplante. Representan diferencias alotípicas más débiles que las moléculas del MHC, y desarrollan funciones aparentemente no relacionadas con el sistema inmunitario, salvo por el hecho de

que pueden ser dianas para el rechazo de los trasplantes<sup>16</sup>. Estos antígenos menores de histocompatibilidad presentan características que los diferencian de los antígenos propios de MHC. En primer lugar, mientras que el MHC es un estímulo potente para el sistema inmunitario durante la respuesta primaria, las diferencias menores de histocompatibilidad parecen inducir respuestas más lentas. Las respuestas de anticuerpos a los antígenos menores de histocompatibilidad son generalmente débiles o nulas, en tanto que las respuestas de las células T citotóxicas CD8+, restringidas a la presentación de péptidos derivados de antígenos menores por las moléculas de péptido propio+MHC, son frecuentes. Por otro lado, los genes que codifican los antígenos de MHC se localizan de forma agrupada en una región concreta del genoma (brazo corto del cromosoma 6), mientras que los genes de los antígenos menores se hallan más diseminados por todo el genoma. De todas formas, la separación entre antígenos principales y menores de histocompatibilidad no depende únicamente de la velocidad con que evoluciona el rechazo frente al injerto. Se ha visto que la progresión del rechazo a injertos cutáneos entre ratones con discrepancias entre antígenos menores es, en ocasiones, más importante que la encontrada en ratones con diferencias entre antígenos MHC de clase I ó clase II. Además, estos antígenos menores de histocompatibilidad son capaces de inducir un rechazo mediado por células careciendo de las características estructurales de los productos del MHC.

Los antígenos menores de histocompatibilidad se describieron originalmente en animales por la respuesta de rechazo *in vivo* frente a injertos cutáneos e intercambio de tumores entre ratones de cepas diferentes<sup>17</sup>, de forma similar a como se realizó el descubrimiento de los antígenos MHC. Hasta la fecha, se han identificado más de 50 *loci* para antígenos menores en el genoma del ratón. La existencia de estos antígenos menores se ha demostrado en el humano a partir de dos hallazgos clínicos: uno relacionado con la respuesta huésped frente a injerto en trasplantes de piel entre parientes HLA idénticos<sup>18</sup>; y por otro lado la enfermedad injerto frente a huésped presente en pacientes trasplantados de médula ósea a partir de familiares HLA idénticos<sup>19</sup>. Más recientemente, se ha postulado que los antígenos menores podrían estar implicados en las complicaciones clínicas del rechazo crónico en trasplantes de órganos sólidos en pacientes con identidad en el MHC<sup>20,21</sup>.

Durante mucho tiempo, los investigadores tendieron a asumir que los antígenos menores de histocompatibilidad eran proteínas alélicas presentes en la superficie celular, a semejanza de los antígenos del MHC. Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que estos antígenos proteicos son procesados por las células del sistema inmune de una manera similar a cualquier péptido/antígeno extraño que se introduce en el organismo. Esto es, que los antígenos menores, como causantes de una respuesta alo-

génica mediada por células T, son fragmentos peptídicos<sup>17</sup> con características alélicas (polimórficas) del donante que son modificadas y presentadas a células T citotóxicas en el contexto de moléculas de clase I y clase II del MHC por las células del receptor<sup>22</sup>. La experiencia acumulada en las últimas décadas ha permitido el aislamiento de algunos de estos péptidos con capacidad antigénica, y en ocasiones, se ha podido identificar cuales son las proteínas de las que derivan. Se han encontrado genes de antígenos menores en autosomas<sup>23</sup>, en el cromosoma sexual Y, e incluso en el DNA mitocondrial<sup>24,25</sup>. Estos genes codifican proteínas muy diversas, como por ejemplo, enzimas metabólicas (ATPasas mitocondriales)<sup>26</sup>, b2-microglobulina<sup>27</sup>, o algunos factores de transcripción nuclear. Otro aspecto derivado del origen intracelular de estas proteínas es que justificaría, al menos en parte, la escasa o nula respuesta humoral (mediada por anticuerpos) que se produce en este tipo de rechazo.

Esta teoría sobre la presentación de antígenos menores abre la posibilidad de que cualquier proteína con variación alélica podría funcionar como antígeno menor de histocompatibilidad si es presentada por antígenos del MHC de una forma inmunogénica, lo que supone una enorme cantidad de posibles candidatos para actuar como antígenos alogénicos. En la práctica esto no sucede así; la respuesta celular T está limitada a un reducido número de epítomos inmunodominantes<sup>28,30</sup>. La explicación de este fenómeno de inmunodominancia no está todavía perfectamente aclarado, pero se han encontrado una serie de hallazgos que los confirman. Se ha visto que la frecuencia con que las células T responden a los péptidos dominantes es mayor que la encontrada para los péptidos no dominantes. Además, los péptidos menores de histocompatibilidad dominantes ocupan más moléculas de MHC que los péptidos subdominantes o crípticos, y confieren una estabilidad más efectiva a la interacción entre el complejo péptido-MHC con el receptor de la célula T.

## ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE TEJIDO

Existen evidencias de que algunos péptidos presentados por las moléculas del MHC se derivan de proteínas con una limitada distribución tisular. Por ejemplo, clones de células T específicos contra un determinado tipo de células alogénicas no siempre reconocen células de un tipo diferentes del mismo individuo. Estos antígenos específicos de tejido se diferencian de los antígenos menores en que no precisan necesariamente de una variedad alélica, debido a que el determinante formado por la molécula de MHC alogénica junto con el antígeno específico puede ser diferente del formado con un antígeno MHC propio. Así, las células T pueden ser tolerantes al antígeno específico expresado en sus propios tejidos,

pero ser reactivas ante el mismo antígeno en el tejido alogénico. El único antígeno específico de tejido bien definido con capacidad de causar en rechazo de un injerto es el antígeno Sk de la piel.

## ANTÍGENOS DE GRUPO SANGUÍNEO

El primer sistema de aloantígenos que se describió fue el de unos antígenos de superficie de los hematíes llamados ABO. Las diferencias en el sistema ABO entre donante y receptores limitan las transfusiones sanguíneas por provocar la lisis de los eritrocitos extraños a través de anticuerpos y de factores del complemento. Los antígenos de grupo sanguíneo no inducen respuestas mediadas por células, por lo que no se clasifican dentro del grupo de los antígenos menores de histocompatibilidad. Estos antígenos son glicoproteínas que se expresan en muchos tipos de células, y forma predominante, están presentes en el endotelio vascular, donde actúan como dianas frente al ataque de una respuesta inmune mediada por anticuerpos. Es importante señalar la presencia de estos antígenos en la región «convoluted» de los túbulos distales. Las disparidades en este sistema están implicadas en formas hiperagudas de rechazo, con excepciones.

Además del locus ABO, existen loci adicionales que determinan otros antígenos sanguíneos en la superficie de los eritrocitos, pero resultan irrelevantes para el trasplante de órganos porque no se expresan en el endotelio vascular. Sin embargo, en las células endoteliales se expresan otras glicoproteínas que podrían servir como dianas ante una respuesta humoral. En algunos casos de trasplante renal entre individuos MHC y ABO idénticos, se ha detectado la presencia de anticuerpos preformados contra estos antígenos que podrían dar lugar a un rechazo hiperagudo del injerto.

## PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DEL ANTÍGENO A LOS LINFOCITOS T

El procesamiento del antígeno supone una degradación del mismo en fragmentos peptídicos. La gran mayoría de epítopos reconocidos por la célula T son fragmentos lineales de una cadena peptídica y son a menudo inaccesibles para el reconocimiento en la proteína intacta. Las células que procesan el antígeno pueden ser células presentadoras de antígeno especializadas (APCs), que son capaces de estimular la división de la célula T, o pueden ser células infectadas por virus que van a convertirse en diana de células T citotóxicas.

Los mecanismos intracelulares que generan péptidos antigénicos para su unión a moléculas MHC de clase I y II son muy diferentes. También el

tamaño de los fragmentos que pueden unirse a ambos tipos de las moléculas es distinto, debido a las diferencias en la estructura del sitio de unión del péptido. Existe además otra diferencia fundamental entre ambos tipos de péptidos; los que se unen a las moléculas de clase I provienen de proteínas sintetizadas *de novo* por la propia célula, son proteínas de origen viral generalmente y son sintetizadas en el citosol celular. Por el contrario, los péptidos que se unen a las moléculas de clase II suelen tener su origen en proteínas exógenas, es decir, que no han sido sintetizadas por la propia célula presentadora. Estos péptidos provienen de proteínas (por ejemplo bacterianas) que han sido internalizadas por la célula a través de la fagocitosis, pinocitosis o endocitosis mediada por receptor. Por último, la asociación péptido-MHC clase I ó clase II ocurre en diferentes sitios dentro de la célula (Tabla 2).

TABLA 2. Características principales de los péptidos presentados en moléculas de clase I y clase II

Características	Clase I	Clase II
Origen del péptido	Citoplásmico	Vesicular
Vía de adquisición	Degradados por proteasomas, TAP	autofagia, endocitosis
Tamaño del péptido	8-11 aa	8-22 aa
Extremos del péptido	atrapados en la hendidura	libres
aa: Aminoácidos		

## PRESENTACIÓN A LINFOCITOS T CD8+

Los mecanismos de respuesta inmune humoral son inefectivos frente a las proteínas virales o parasitarias y frente a las proteínas tumorales específicas generadas por mutación y transformación maligna. Estos antígenos son presentados por las moléculas MHC de clase I en la superficie de todas las células somáticas, y son reconocidos por linfocitos T citotóxicos CD8+<sup>31</sup>. La asociación de los péptidos antigénicos con las moléculas de clase I tiene lugar en el retículo endoplásmico (RE). La degradación de tales proteínas es mediada por proteasas citosólicas y los péptidos antigénicos resultantes deben atravesar la membrana del retículo endoplásmico para unirse entonces a las moléculas de clase I. Los linfocitos T citotóxicos, que continuamente recirculan a través del cuerpo, destruirán directamente células que expresan antígenos endógenos no propios.

### *Procesamiento de los antígenos citosólicos*

Las células degradan las proteínas en los lisosomas y en el citosol. Los lisosomas contienen una colección de enzimas proteolíticas (proteasas), cada una de las cuales está constituida por una simple subunidad estructural con un solo sitio activo catalítico. La degradación de proteínas en el citosol la realizan los proteasomas, complejos enzimáticos formados por un gran número de subunidades y múltiples sitios catalíticos<sup>32</sup>.

### Ubiquitinación y degradación proteasómica

Las proteínas alteradas o dañadas son marcadas para su degradación mediante la unión de múltiples unidades de ubiquitina, una proteína ampliamente distribuida. Tras varios ciclos de esta reacción, la proteína queda comprometida irreversiblemente para su degradación. Los proteasomas son partículas de 26S que están constituidas por dos subpartículas, 19S y 20S, que pueden existir de forma independiente<sup>33</sup>. Las proteínas ubiquitinadas son captadas por la partícula 19S, que se despliega de forma similar a una chaperona e introduce al polipéptido en el canal central de la partícula 20S<sup>34,35</sup>. Esta reacción requiere energía, proporcionada por el ATP. En la cámara central, el polipéptido es escindido en fragmentos de nueve residuos de longitud que por un proceso desconocido terminan por salir de la subunidad 20S. El proteasoma también lleva a cabo una función básica en el control de las células degradando muchas proteínas citoplasmáticas distintas<sup>36</sup>.

### Transportadores asociados al procesamiento de antígeno (TAP)

Los péptidos producidos por los proteasomas son incapaces de atravesar las membranas biológicas de una forma pasiva, no podrían atravesar el retículo endoplásmico sin la ayuda de las proteínas TAP, codificadas por dos genes situados dentro de la región MHC de clase II: TAP1 y TAP2<sup>37</sup>. Las moléculas de esta familia son capaces de transportar moléculas activamente. TAP1 y TAP2 se asocian no covalentemente para formar heterodímeros cuya función consiste en transportar los péptidos generados en el citosol hacia el interior del RE; el transporte ocurre de forma más eficiente cuando el péptido tiene de 8-12 aminoácidos<sup>38</sup>.

Los dímeros TAP se localizan fundamentalmente en el RE y en el cis-Golgi, y aparecen íntimamente unidos a las moléculas de clase I recién sintetizadas. Esto probablemente incrementa la eficacia de la carga del péptido en la célula presentadora.

### *Emsablaje y expresión en superficie de los complejos péptido-MHC clase I*

Después del transporte dentro del RE, el péptido se asocia con las moléculas de clase I. Cuando la b2-microglobulina se une a la cadena  $\alpha$ , el complejo cadena  $\alpha$ -b2-microglobulina se une a la subunidad transportadora TAP-1, en espera del péptido transportado desde el citosol. Este complejo llega a estar físicamente asociado a las caras luminales de las proteínas TAP en el interior del retículo endoplásmico. Al fin, la unión del péptido con la molécula MHC de clase I parcialmente plegada, libera a ésta de la TAP, y permite el total plegamiento de dicha molécula y el abandono del retículo endoplásmico para llegar a la superficie celular vía complejo trans-Golgi. Las moléculas de clase I a las que les falta el péptido son inestables, de esta forma, se asegura que solo complejos funcionalmente útiles interaccionan con TCRs<sup>39,40</sup>.

Los procesos de degradación, transporte y carga de péptidos en las moléculas de clase I se están produciendo de forma constante durante la vida de una célula. Las moléculas de clase I vacías, sin péptido, no salen del RE. Si pese a todo, alguna de estas moléculas aparece en la superficie celular es rápidamente internalizada, de tal forma que todas las moléculas de clase I en la superficie celular tienen un péptido unido. En condiciones normales, estos péptidos provienen de proteínas codificadas por genes celulares, en este caso los linfocitos T reconocerán estos péptidos como propios y no generarán una respuesta citolítica. Sin embargo, en el caso de que algunas moléculas de clase I contengan péptidos de proteínas extrañas, por ejemplo de un virus que se está replicando o de una proteína alterada por un proceso tumoral, los linfocitos T citotóxicos destruirán esta célula con el fin de evitar la propagación del virus o del tumor<sup>31</sup>.

### PRESENTACIÓN A LINFOCITOS T CD4+

Las moléculas HLA de clase II presentan péptidos procedentes de antígenos degradados por vía endosomal/lisosomal a las células T CD4+<sup>31</sup>. La mayoría de los péptidos a presentar se unen a moléculas de clase II sintetizadas *de novo*, más que a moléculas de clase II recicladas de la superficie. Por tanto, la biosíntesis de las moléculas HLA de clase II se entrecruza con la vía endocítica donde están los antígenos procesados<sup>41</sup>.

### *Captación y procesamiento del antígeno*

La endocitosis del antígeno varía para los diferentes tipos de APCs. Por ejemplo, los macrófagos y las células dendríticas inmaduras captan el



antígeno vía fagocitosis, macropinocitosis o endocitosis mediada por receptor, mientras que las células B internalizan los antígenos específicos a través de su inmunoglobulina de superficie.

Los antígenos internalizados acaban por localizarse en vesículas intracelulares unidas por membranas llamadas endosomas. La vía de los endosomas en el tráfico de proteínas se continúa y finaliza a nivel del lisosoma, una organela vesicular más densa. Tanto los endosomas como los lisosomas pueden proporcionar sitios intracelulares para el procesamiento de antígenos internalizados<sup>42,43</sup>.

Los endosomas y lisosomas, donde se lleva a cabo el procesamiento del antígeno, tienen un pH ácido, por tanto las sustancias químicas que elevan el pH de las vesículas ácidas intracelulares, como la cloroquina y el cloruro de amonio, son potentes inhibidores del procesamiento del antígeno. También estos compartimentos celulares contienen proteasas (como la catepsina), cuya función es escindir los antígenos proteicos nativos en péptidos pequeños. Estas enzimas funcionan bien a pH ácido<sup>44</sup>.

El resultado neto del procesamiento de un antígeno proteico es la generación de péptidos, muchos de los cuales tienen una longitud de 10 a 30 aminoácidos y son capaces de fijarse a las hendiduras de unión al péptido de las moléculas MHC de clase II.

### *Biosíntesis de las moléculas MHC de clase II y asociación a los péptidos procesados*

Las moléculas de clase II se sintetizan en el retículo endoplásmico. Aquí, los homodímeros a y b se asocian con una glicoproteína integral de la membrana, denominada cadena invariante (Ii), formando complejos nonaméricos integrados por tres cadenas a, tres cadenas b, y tres cadenas Ii<sup>45</sup>.

La cadena invariante unida de esta manera acompañará a las moléculas de clase II en su recorrido celular con una doble misión: bloquear el sitio de unión del péptido, impidiendo así que se pueda unir a algo durante su recorrido a través del RE y del complejo Golgi; y retener el complejo dentro de la célula desviándolo hacia la ruta endocítica<sup>46,47</sup>. En el Golgi, las subunidades a, b, e Ii son glicosiladas y transportadas hacia la red del trans-Golgi. Del trans-Golgi se desprenden vesículas que más tarde se fusionarán con otras procedentes de la ruta endocítica formando el compartimento denominado endosoma.

El sistema endocítico está formado por vesículas, grandes vacuolas y túbulos, extremadamente pleomórficos e interconectados entre sí y comunicados con el aparato de Golgi-trans y con la membrana plasmática. En el sistema endocítico, los complejos HLA de clase II/cadena Ii apa-

recen en compartimentos especiales denominados en conjunto MIICs (compartimentos MCH de clase II) y que tienen características bioquímicas diferentes de los endosomas convencionales<sup>48,49</sup>. Estas vesículas contienen membranas internas, un pH ácido con alta actividad proteolítica y proteínas e hidrolasas lisosomales<sup>44</sup>. La cadena invariante comienza a ser degradada en el ambiente ácido por una actividad proteolítica moderada y continua a medida que los complejos de clase II se desvían a los MIICs. Aquí la mayoría de la cadena invariante está ya degradada y solamente permanece unido a la molécula de clase II el dominio externo de Ii, denominado dominio CLIP (péptido Ii asociado a clase II), que interacciona con la hendidura de clase II. El CLIP debe de ser extraído de la hendidura para que esta sea ocupada por los antígenos peptídicos que van a ser presentados por la molécula de clase II<sup>50-52</sup>. Para facilitar el intercambio del CLIP por los péptidos a presentar, es de gran importancia la acción de la molécula HLA-DM. HLA-DM es una molécula de clase II, pero que no se expresa en la membrana plasmática ni presenta antígenos a los linfocitos T<sup>5,6</sup>. Su función es facilitar la liberación de CLIP de las moléculas de clase II en el endosoma, actuando como una enzima que cataliza la reacción<sup>53</sup>. Los complejos de clase II forman entonces agregados y están listos para recibir péptidos. Los complejos estables péptido-MHC de clase II son transportados a la superficie de la célula mediante fusión de la membrana con vesículas exocíticas<sup>54</sup>. En la superficie celular, son expuestos a la vigilancia de las células T CD4+. Solo una pequeña fracción de los complejos péptido-MHC de la superficie celular van a contener el mismo péptido. Además, la mayoría de los péptidos unidos van a derivar de proteínas propias, que no deben ser reconocidos por los fenómenos de autotolerancia.

## PRESENTACIÓN CRUZADA

Como hemos comentado anteriormente, los péptidos que se unen a las moléculas de clase II, provienen de la degradación proteolítica de los antígenos en la ruta endosómica. Sin embargo, se sabe, que algunos péptidos generados en el citoplasma pueden unirse a moléculas de clase II en los MIICs; el mecanismo por el que estos péptidos llegan a estos compartimentos es desconocido. A la inversa y de manera excepcional (solo en macrófagos y células dendríticas), los endosomas dejan escapar péptidos al citoplasma, desde donde pueden llegar a la ruta de presentación de la molécula de clase I. De esta manera, las células presentadoras de antígeno (APCs) generan el muestrario más completo de péptidos del patógeno para activar linfocitos Th (clase II) o Tc (clase I).

## *Bases estructurales y bioquímicas de la unión del péptido y las moléculas de MHC*

### Estabilidad de la unión

La asociación de péptidos antigénicos y moléculas del MHC es una interacción saturable y de baja afinidad ( $K_d=10^{-6}$  M), con una velocidad de asociación lenta y una velocidad de disociación muy lenta<sup>55,56</sup>. La afinidad de la interacción péptido-MHC es mucho menor que la unión antígeno-anticuerpo. En solución, la saturación de la unión del péptido a las moléculas de clase II dura de 15 a 30 minutos. Una vez unidos, los péptidos pueden permanecer asociados durante horas o incluso semanas. La disociación de péptidos de las moléculas de clase I es todavía más lenta, ya que habitualmente, requiere la separación de la cadena  $\alpha$  y la  $\beta_2$ microglobulina para que tenga lugar. La gran lentitud de la velocidad de disociación del péptido de las moléculas MHC, permite que los complejos péptido-MHC persistan lo suficiente para interactuar con las células T a pesar de la baja afinidad de la unión.

Cada molécula de clase I o de clase II se une solo con un péptido cada vez. El péptido ocupa la única hendidura de unión de la molécula MHC. Pero, a la misma molécula MHC pueden unirse múltiples péptidos diferentes.

Aunque hay una gran variedad de péptidos con diversas secuencias de aminoácidos capaces de unirse a cada molécula de MHC, existen ciertas limitaciones estructurales que impiden que los péptidos se unan a una molécula individual de MHC de forma indiscriminada.

### Características del péptido

Existen diferencias singulares en la naturaleza de los péptidos que se unen a las moléculas de clase I ó de clase II del MHC. Los péptidos presentados por las moléculas de clase I tienen una longitud de 9 a 11 aminoácidos, mientras que los que presentan las moléculas de clase II pueden oscilar entre 10 y 30 residuos o más. Esto se debe a que los lados de la hendidura formados por la hélice  $\alpha$  de las moléculas de clase I convergen al final de la hendidura, limitando de esta manera el tamaño de los péptidos que se pueden acomodar a la hendidura (no deben sobrepasar los 11 residuos). En contraste, los lados formados por las hélices  $\alpha$  de la hendidura de las moléculas de clase II no convergen, permitiendo así la unión de péptidos que se extienden más allá de los límites de la hendidura. Por tanto, no hay una longitud máxima para los péptidos que se unen a las moléculas de clase II.

## RECONOCIMIENTO POR LAS CÉLULAS T AB

### RESTRICCIÓN MHC

Los linfocitos T ejercen el control administrativo de la respuesta inmune, reconocen la necesidad de actuar, reclamando la ayuda de otros elementos defensivos y actuando por ellos mismos. Para iniciar la respuesta inmune el complejo TCRab de la superficie de la célula T debe unirse a complejos moleculares formados por las moléculas HLA y péptidos extraños o propios. El reconocimiento TCR-HLA-péptido es la base del fenómeno conocido como reconocimiento específico de antígeno y restringido a MHC. La consecuencia de esta restricción MHC es que una célula T específica para un péptido X en un particular alelo del MHC (A), no reconocerá el complejo del péptido X con un alelo diferente (B), ni el complejo de otro antígeno Y con el alelo A. Este proceso controla el rechazo de tejidos genéticamente distintos, la identificación de tejidos infectados por virus o parásitos intracelulares, la respuesta inmune frente a tumores, la discriminación entre lo propio y lo extraño, y por último en los procesos de selección negativa y positiva que ocurren a nivel del timo durante el desarrollo del linfocito T.

### INTERACCIÓN TCR-COMPLEJO PÉPTIDO-MHC

Recientes estudios demuestran que la afinidad de interacción entre el complejo TCR ab y el complejo MHC-péptido antigénico es muy baja, con constantes de disociación del rango de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  M, y tiempos de disociación muy rápidos<sup>56,57</sup>. Sin embargo y paradójicamente, la célula T es capaz de detectar con elevada especificidad un número muy bajo de copias de antígeno en la APC y su activación requiere tiempos de contacto largos con la APC. Distintos mecanismos resuelven tales paradojas:

#### *Co-receptores CD4 y CD8*

Existen dos tipos de receptores para las moléculas MHC de clase I y II, las moléculas CD8 y CD4. Las regiones variables de TCR contactan con el antígeno propiamente dicho y con las superficies flanqueantes del sitio de unión al antígeno de la molécula MHC, que contienen residuos polimórficos. Por otra parte, las moléculas CD4 y CD8 reconocen las moléculas MHC en un sitio de unión distinto, conservado y alejado del lugar de unión al antígeno<sup>58,59</sup>. CD4 y CD8 actúan como correceptores de TCR porque:

- Aumentan la avidéz del TCR/CD3 por el ligando y alargan los tiempos de asociación.
- Se pueden asociar físicamente con el complejo TCR/CD3.
- Los dominios intracelulares de CD4 y CD8 se asocian con la protein-tirosín-kinasa (PTK) p56/lck, que potencia la cascada de transducción de PTK asociadas a los ITAM de las moléculas CD3.

### *Moléculas de adhesión*

La interacción entre la célula T y la APC se inicia por moléculas de adhesión intercelular tales como las parejas CD2/CD58, LFA-1/ICAM-1, que además intervienen en la recirculación linfocitaria. Las moléculas de adhesión mantienen la estabilidad de la interacción celular permitiendo una señalización prolongada a través del TCR/CD3. En caso de que la célula T no reconozca los complejos antígeno-MHC de la APC, la adhesión cesa rápidamente y la célula T se despega para poder unirse a otras células del organismo<sup>60-63</sup>.

### *Coestimuladores (CD28, CTLA-4 y CD45)*

La relación entre adhesión y activación de la célula T es bidireccional. Moléculas como CD28 y CD45 que estabilizan la interacción linfocito T/APC como moléculas de adhesión antígeno inespecíficas, se han definido también como receptores coestimuladores del TCR/CD3. Estos receptores pueden modular por distintas vías la cascada de transducción de señales del receptor de la célula T. Otros coestimuladores como CTLA-4 pueden suprimir la señal de activación. Los ligandos de CD28 y CTLA-4 son CD80 y CD86, y el ligando de CD45 se denomina CD45L. La importancia de dichos circuitos de regulación positiva y negativa nos hace entender como las células T alcanzan una activación plena, o bien se anergizan o suicidan tras el contacto con diferentes APC<sup>60-63</sup>.

### *Fenómeno de estimulación en serie*

Un simple complejo péptido-MHC puede unirse y estimular a muchos TCRs durante la interacción célula T-APC. Lo primero que ocurre es la unión de un TCR con un complejo péptido-MHC durante un tiempo suficiente para que se activen las kinasas, y demás mecanismos responsables de las señales de transducción. El TCR estimulado se disocia, y el péptido-MHC queda libre para unirse y estimular a otro TCR, y así, de forma seria-

da se estimularían muchas moléculas de TCR de un linfocito T. La disociación del complejo TCR-péptido-MHC se ve facilitada por las propias características bioquímicas de la interacción (constante de disociación), y posiblemente, por fuerzas físicas de cizallamiento producidas por la motilidad de la célula T.

La combinación de estos mecanismos explica la estabilidad de la interacción específica entre la célula T y APC pese a la baja afinidad del TCR por su ligando y la baja concentración del antígeno. Los distintos mecanismos de transducción paralela, junto a la activación en serie, aumenta la sensibilidad de las células T para detectar complejos antígeno-MHC específicos.

## RECONOCIMIENTO DE ALOANTÍGENOS POR EL RECEPTOR DE LA CÉLULA T

### *Reconocimiento directo*

El reconocimiento directo es, en sentido estricto, un alorreconocimiento: el receptor de la célula T del huésped (singénico) reconoce de forma no mediada a la molécula completa del HLA del donante (aloténica). El péptido antigénico cargado en la hendidura de aquella puede ser extraño (derivado de antígenos menores o de microorganismos) o no (derivado de proteínas no polimórficas).

El aloantígeno no requiere procesamiento previo. La molécula del aloantígeno se comporta como una molécula del MHC propio, presentando un antígeno extraño. Este tipo de reconocimiento solo se establece sobre antígenos del sistema MHC. Supone una reacción cruzada, en la que para cada célula T el aloantígeno del sistema MHC reproduce (en el área de contacto) el complejo de la molécula singénica de MHC con el péptido específico.

La particularidad de esta reacción cruzada es la elevada proporción de células T (esto es, de receptores) capaces de reaccionar de forma cruzada con una sola molécula HLA aloténica, y se denominan células T alorreactivas. Los factores que contribuyen en este fenómeno son:

- 1) El polimorfismo del sistema HLA se expresa a través de múltiples variaciones en residuos aminoácidos. Muchas de las variantes se concentran en áreas expuestas a la interacción TCR-MHC, de forma que estos pueden producir por sí mismos o en combinación diferentes determinantes y estimular diferentes clones. Las variaciones alélicas en el sistema HLA se comportan, con respecto al receptor de la célula T, como moléculas propias cargadas con antígenos extraños.

- 2) La diversidad de péptidos que puede presentar una determinada molécula del MHC determina, diferencias que se corresponden con la variedad de especificidades del TCR que reconocerán dichas alternativas. En este caso el polimorfismo MHC localizado en la base de la hendidura (oculto al TCR) permite que incluso péptidos propios actúen como antigénicos.

Junto a estas características hay que añadir que la presencia de moléculas del alo-MHC en la superficie de una célula alogénica alcanza densidades mucho mayores que cuando dichas moléculas son procesadas y presentadas por células APC singénicas, en las que sólo un bajo porcentaje de moléculas presentarán un determinado alopéptido. Esta elevada densidad de determinantes alogénicos determinará que células cuyos TCR presenten menor afinidad por el aloantígeno también se activen.

### *Reconocimiento indirecto*

En contraste con la estimulación directa de la célula T, el mecanismo fisiológico supone el reconocimiento de péptidos extraños procesados por las propias células APC y presentados en las moléculas propias de MHC<sup>64</sup>. En la inmunología del trasplante este tipo de respuesta fisiológica se ha referido como presentación indirecta. Esta vía de estimulación se ha propuesto para explicar el rechazo por incompatibilidades en antígenos menores y, de hecho, se ha demostrado que está en la base del fenómeno de sensibilización cruzada (presentación de antígenos menores del donante por las moléculas MHC de clase I del receptor). Durante los últimos años, se han ido acumulando evidencias de la importancia, incluso de la dominancia, de la estimulación indirecta en el rechazo de aloinjertos.

Se trata del reconocimiento convencional que requiere el procesamiento de los aloantígenos, habitualmente tras fagocitosis. Los péptidos derivados son presentados en el contexto de las moléculas de clase II del MHC propio. Las células T, generalmente CD4+, específicas frente a dichos péptidos, reconocerán al antígeno y se activarán.

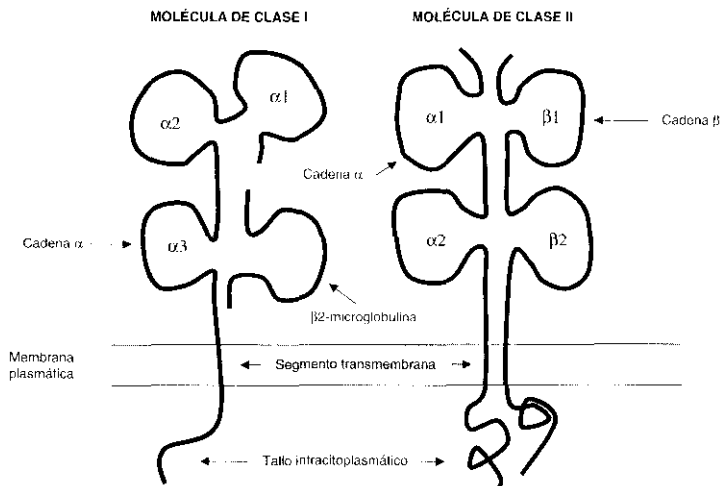
### *Importancia relativa de los reconocimientos directo e indirecto*

El peso relativo de los reconocimientos directo e indirecto en el rechazo del injerto es un tema controvertido. En principio, los estudios señalaron al reconocimiento directo como el factor más importante en el rechazo del injerto. Las primeras evidencias de la importancia de esta respuesta directa derivan de estudios *in vitro*: la elevada frecuencia de células T que

responden a los aloantígenos, y la intensidad de la respuesta del cultivo mixto alogénico primario.

Por otro lado, el tiempo de supervivencia de los injertos de piel en ratones no es muy diferente entre los injertos con incompatibilidades en el sistema MHC, que implica a los dos modos de reconocimiento, y aquellos con incompatibilidades en antígenos menores solamente, donde el reconocimiento es indirecto. Actualmente, los estudios sobre modelos experimentales están concediendo una progresivamente mayor importancia a la respuesta indirecta. El estudio de la implicación de la respuesta indirecta requiere una manipulación más compleja de los modelos experimentales. En humanos se ha demostrado la relación entre la estimulación indirecta de la respuesta T y los episodios de rechazo cardíaco<sup>65</sup>.

De estos estudios se ha derivado también una conclusión, no por asumida previamente menos importante. Los aloantígenos del sistema HLA ejercen el papel de antígenos principales tanto en los modelos directos como indirectos de reconocimiento. Los estudios de supervivencia del injerto con inmunización previa con péptidos alógenicos indican que los péptidos derivados del MHC alógenico son mejores estimuladores indirectos que los péptidos derivados de antígenos menores alógenicos<sup>66</sup>. Es decir, la importancia de la compatibilidad del sistema MHC es similar para los dos modelos de estimulación, directa e indirecta<sup>67</sup>.



**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura de las moléculas de histocompatibilidad de clase I y clase II. Cada uno de los bucles representa un dominio de la proteína ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  para clase I, y  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$  para clase II).



**BIBLIOGRAFÍA**

1. CAMPBELL, R.D., TROWSDALE, J. Map of the human MHC. *Immunol. Today* 1993; 14(7): 349-52.
2. SHIINA, T., TAMIYA, G., OKA, A., TAKISHIMA, N., INOKO, H. Genome sequencing analysis of the 1.8 Mb entire human MHC class I region. *Immunol. Rev.* 1999; 167: 193-9.
3. KELLEY, V.R., SINGER, G.G. The antigen presentation function of renal tubular epithelial cells. *Exp. Nephrol.* 1993; 1(2): 102-11.
4. BECK, S., TROWSDALE, J. Sequence organisation of the class II region of the MHC. *Immunol. Rev.* 1999; 167: 201-10.
5. VOGT, A.B., MOLDENHAUER, G., HAMMERLING, G., J., KROPSHOFER, H. HLA-DM stabilizes empty HLA-DR molecules in a chaperone-like fashion. *Immunol. Lett.* 1997; 57(1-3): 209-11.
6. VAN HAM, S.M., GRUNEBERG, U., MALCHEREK, G., BROKER, I., MELMS, A., TROWSDALE, J. Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM edits peptides presented by HLA-DR according to their ligand binding motifs. *J. Exp. Med.* 1996; 184(5): 2019-24.
7. DENZIN, L.K., SANT'ANGELO, D.B., HAMMOND, C., SURMAN, M.J., CRESSWELL, P. Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing. *Science* 1997; 278(5335): 106-9.
8. LILJEDAHL, M., KUWANA, T., FUNG-LEUNG, W.P., JACKSON, M.R., PETERSON, P. A., KARLSSON, L. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J.* 1996; 15(18): 4817-24.
9. BECK, S., BELICH, M., GRUNEBERG, U., JACKSON, A., KELLY, A., SANSEAU, P., SANDERSON, F., TROWSDALE, J., VAN HAM, M. Organisation and functions of class II genes and molecules. *DNA Seq.* 1996; 7(1): 21-3.
10. BOUMA, G., CRUSIUS, J.B., OUDKERK POOL, M., KOLKMAN, J.J., VON BLOMBERG, B.M., KOSTENSE, P.J., GIPHART, M.J., SCHREUDER, G.M., MEUWISSEN, S.G., PENA, A.S. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand. J. Immunol.* 1996; 43(4): 456-63.
11. HUDRISIER, D., GAIRIN, J.E. Peptide-major histocompatibility complex class I complex: From the structural and molecular basis to pharmacological principles and therapeutic applications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1998; 232: 75-97.
12. KOSIYU, D.D., HANNICK, L.I., TRAWEEK, J.L., GHANAYEM, M., HEILPERN, D., DAWSON, D.V. HLA class I polymorphism: structure and function and still questions. *Hum. Immunol.* 1997; 57(1): 1-18.
13. GORGA, J.C. Structural analysis of class II major histocompatibility complex proteins. *Crit. Rev. Immunol.* 1992; 11(5): 305-35.
14. SADEGH-NASSERI, S., GERMAIN, R.N. A role for peptide in determining MHC class II structure. *Nature* 1991; 353(6340): 167-70.
15. MCCORMACK, J.E., WADE, T., MORALES, H., KAPPLER, J., MARRACK, P. Analysis of class II MHC structure in thymic nurse cells. *Cell. Immunol.* 1991; 138(2): 413-22.
16. GOULMY, E. Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol. Rev.* 1997; 157: 125-40.

17. SIMPSON, E., ROOPENIAN, D. Minor histocompatibility antigens. *Curr. Opin. Immunol* 1997; 9(5): 656-61.
18. CEPPELLINI, R., MATTIUZ, P.L., SCUDELLER, G., VISETTI, M. Experimental allo-transplantation in man I. The role of the HLA system in different genetic combinations. *Transplant. Proc.* 1969; 1:285-9.
19. GOULMY, E., SCHIPPER, R., POOL, J., BLOKLAND, E., FALEKENBURG, J.H., F, VOSSEN, J., GRATWOHL, A., VOGELSLANG, G.B., VAN HOUWELINGEN, H.C., VAN ROOD, J.J. Mismatches of minor histocompatibility antigen between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N. Eng. J. Med.* 1996; 334: 281-5.
20. CANDINAS, D., GUNSON, B.K., NIGHTINGALE, P., HUBSCHER, S., McMASTER, P., NEUBERGER, J.M. Sex mismatch as a risk factor for chronic rejection of liver allografts. *Lancet* 1996; 346: 1117-21.
21. POINDEXTER, N., SHENOY, S., HOWARD, T., FLYE, M.W., MOHANAKUMAR, T. Allo-graft infiltrating cytotoxic T lymphocytes recognize kidney-specific human minor histocompatibility antigens. *Clin. Transplant.* 1997; 11(3): 174-7.
22. THEOBALD, M., BUNJES, D. Pretransplant detection of human minor histocompatibility antigen-specific naive and memory interleukin-2-secreting T cells within class I major histocompatibility complex (MHC)-restricted CD8+ and class II MHC-restricted CD4+ T-cell subsets. *Blood* 1993; 82(1): 298-306.
23. GUBAREV, M.I., JENKIN, J.C., OTTERRUD, B.E., LEPPERT, M.F., SCHALLHEIM, J.M., BEATTY, P.G. Localization to chromosome 11 of a gene encoding a human minor histocompatibility antigen. *Exp. Hematol.* 1998; 26(10): 976-81.
24. LOVELAND, B.E., WANG, C.R., YONEKAWA, H., HERMEL, E., FISHER-LINDAHL, K. Maternally transmitted histocompatibility antigen of mice: A hydrophobic peptide of a mitochondrially encoded protein. *Cell* 1990; 60: 971-80.
25. MORSE, M.C., BLEAU, G., DABHI, V.M., HETU, F., DROBETSKY, E.A. FISHER-LINDAHL, K., PERREAULT, C. The COI mitochondrial gene encodes a minor histocompatibility antigen presented by H2-M3. *J. Immunol.* 1996; 156: 3301-7.
26. BHUYAN, P.K., YOUNG, L.L., FISHER, LINDAHL, J., BUTCHER, G.W. Identification of the rat maternally transmitted minor histocompatibility antigen. *J. Immunol.* 1997; 158: 3753-60.
27. KURTZ, M.E., MARTIN-MORGAN, D., GRAFF, R.J. Recognition of the b2-microglobulin-B molecule by a CTL clone. *J. Immunol.* 1987; 138: 87-90.
28. WETTSTEIN, P.J. Immunodominance in the T cell response to multiple non H-Y histocompatibility antigens. II. Observations of a hierarchy among dominant antigens. *Immunogenetics* 1986; 24: 24-31.
29. YIN, L., POIRIER, G., NETI, O., HSUAN, J.J., TOTTY, N.F., STAUSS, H.J. Few peptides dominate CTL responses to single and multiple minor histocompatibility antigens. *Int. Immunol.* 1993; 5: 1003-9.
30. WOLPERT, E., FRANKSSON, L. KÄRRE, K. Dominant and cryptic antigens in the MHC class I restricted T cell response across a complex minor histocompatibility barrier: Analysis and mapping by elution of cellular peptides. *Int. Immunol.* 1995; 7: 919-28.
31. SWAIN, S. T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol. Rev.* 1983; 74:129-42.

32. TANAKA, K. Molecular biology of proteasomes. *Mol. Biol. Rep.* 1995; 21(1): 21-6.
33. TANAKA, K., TAMURA, T., TANAHASHI, N., TSURUMI, C. Protein and gene structures of 20S and 26S proteasomes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996; 389: 187-95.
34. HOCHSTRASSER, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* 1996; 30: 405-39.
35. EHRING, B., MEYER, T.H., ECKERSKORN, C., LOTTSPEICH, F., TAMPE, R. Effects of major-histocompatibility-complex-encoded subunits on the peptidase and proteolytic activities of human 20S proteasomes. Cleavage of proteins and antigenic peptides. *Eur. J. Biochem.* 1996; 235(1-2): 404-15.
36. TANAKA, K., TAMURA, T., YOSHIIMURA, T., ICHIHARA, A. Proteasomes: protein and gene structures. *New. Biol.* 1992; 4(3): 173-87.
37. BUBLER, B. DANIEL, S., ARAMNDOLA, E., HAMMER, J., CAILLAT-ZUCMAN, S., VAN ENDERT, P.M. Substrate selection by transporters associated with antigen processing occurs during peptide binding to TAP. *Mol. Immunol.* 1998; 35:427-33.
38. DANIEL, S., BRUSIC, V., CAILLAT-ZUCMAN, S., PETROVSKY, N., HARRISON, L., RIGANELLI, D., SINIGAGLIA, F., GALLAZI, F., HAMMER, J., VAN ENDERT, P.M. Relationship between peptide selectivities of human transporters associated with antigen processing and HLA class I molecules. *J. Immunol.* 1998; 161: 617-24.
39. VAN ENDERT, P.M. Genes regulating MHC class I processing of antigen. *Curr. Opin. Immunol.* 1999; 11:82-8.
40. HEEMELS, M.T., PLOEGH, H. Generation, translocation, and antigen presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu. Rev. Biochem.* 1995; 64: 463-91.
41. CHAPMAN, H.A. Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr. Opin. Immunol.* 1998; 10:93-102.
42. GOLDBERG, A.L., ROCK, K.L. Proteolysis, proteasomes, and antigen presentation. *Nature* 1992; 357: 375-379.
43. MONACO-JJ Pathways for the processing and presentation of antigens to T cells. *J-Leukoc-Biol.* 1995; 57(4): 543-7.
44. LEE, J.M., KAY, C.M., WATTS, T.H. Conformational changes in mouse MHC class II proteins at acidic pH. *Int. Immunol.* 1992; 4(8): 889-97.
45. GERMAIN, R.N., HENDRIX, L.R. MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding. *Nature* 1991; 353(6340): 134-9.
46. CASTÉLLINO, F., ZHONG, G., GERMAIN, R.N. Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum. Immunol.* 1997; 54(2): 159-69.
47. BERTOLINO, P., RABOURDIN-COMBE, C. The MHC class II-associated invariant chain: a molecule with multiple roles in MHC class II biosynthesis and antigen presentation to CD4+ T cells. *Crit. Rev. Immunol.* 1996; 16(4): 359-79.
48. KLEIJMEER, M.J., MORKOWSKI, S., GRIFFITH, J.M., RUDENSKY, A.Y., GEUZE, H.J. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J. Cell. Biol.* 1997; 139(3): 639-49.
49. SUGITA, M., JACKMAN, R.M., VAN-DONSELAAR, E., BEHAR, S.M., ROGERS, R.A., PETERS, P.J., BRENNER, M.B., PORCELLI, S.A. Cytoplasmic tail-dependent localization of CD1b antigen-presenting molecules to MIICs. *Science.* 1996; 273(5273): 349-52.

50. STUMPTNER, P., BENAROCH, P. Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region. *EMBO J.* 1997; 16(19): 5807-18.
51. KROPSHOFER, H., VOGT, A.B., HAMMERLING, G.J. Structural features of the invariant chain fragment CLIP controlling rapid release from HLA-DR molecules and inhibition of peptide binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92(18): 8313-7.
52. LEE, C., MCCONNELL, H.M. A general model of invariant chain association with class II major histocompatibility complex proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92(18): 8269-73.
53. DENZIN, L.K., CRESSWELL, P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 1995 Jul 14; 82(1): 155-65.
54. RAPOSO, G., NIJMAN, H.W., STOOBVOGEL, W., LIEJENDEKKER, R., HARDING, C.V., MELIEF, C.J., GEUZE, H.J. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 1996; 183(3): 1161-72.
55. KHIILKO, S.N., JELONEK, M.T., CORR, M., BOYD, L.F., BOTIHWELL, A.L., MARGULIES, D.H. Measuring interactions of MHC class I molecules using surface plasmon resonance. *J. Immunol. Methods* 1995; 183(1): 77-94.
56. MARGULIES, D.H., PLAKSIN, D., KHIILKO, S.N., JELONEK, M.T. Studying interactions involving the T-cell antigen receptor by surface plasmon resonance. *Curr. Opin. Immunol.* 1996; 8(2): 262-70.
57. MATSUI, K., BONIFACE, J.J., REAY, P.A., SCHILD, H., FAZEKAS-DE-ST-GROTH, B., DAVIS, M.M. Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science.* 1991; 254(5039): 1788-91.
58. JULIUS, M., MAROUN, C.R., HAUGHN, L. Distinct roles for CD4 and CD8 as co-receptors in antigen receptor signalling. *Immunol. Today* 1993; 14(4): 177-83.
59. VIGNALI, D.A. The interaction between CD4 and MHC class II molecules and its effect on T cell function. *Behring. Inst. Mitt.* 1994; (94): 133-47.
60. CROFT, M., DUBEY, C. Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. *Crit. Rev. Immunol.* 1997; 17(1): 89-118.
61. DUBEY, C., CROFT, M. Accessory molecule regulation of naive CD4 T cell activation. *Immunol. Res.* 1996; 15(2): 114-25.
62. MONDINO, A., JENKINS, M.K. Surface proteins involved in T cell costimulation. *J. Leukoc. Biol.* 1994; 55(6): 805-15.
63. ALBEROLA-ILA, J., TAKAKI, S., KERNER, J.D., PERLMUTTER, R.M. Differential signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15: 125-54.
64. DAVIS M.M., BONIFACE J.J., REICH Z., LYONS D., HAMPL J., ARDEN B., CHIEN Y-II.: Ligand recognition by alpha-beta T cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16:523-544.
65. REED E.F., HONG B., HO E., HARRIS P.E., WEINBERGER J. SUCIU-FOCA N. : Monitoring of soluble HLA alloantigens and anti-HLA antibodies identifies heart allograft recipients at risk of transplant associated coronary artery disease. *Transplantation* 1996; 61:566-72.
66. BENHAM A.M., SAWYER G.J., FAVRE J.W. : Indirect T cell allorecognition of donor antigens contributes to the rejection of vascularized kidney grafts. *Transplantation* 1995; 59:1028-32.

67. AUCHINCLOSS H. JR., SULTAN H.: Antigen processing and presentation in transplantation. *Curr. Op. Immunol.* 1996; 8:681-687.
68. KELLEY, V.R., SINGER, G.G. The antigen presentation function of renal tubular epithelial cells. *Exp. Nephrol.* 1993; 1(2): 102-11.