

CD28/CD152-B7y CD40-CD40L

Dos vías coestimuladoras de importancia para la respuesta inmune adquirida

**Milena Zuluaga, Claudia Milena Trujillo, Pablo Javier Patiño,
Sara María Robledo · Medellín**

Objetivo: describir las principales características moleculares y de expresión celular de las vías coestimuladoras CD28/CD152 - B7 y CD40 - CD40L, destacando sus propiedades inmunomoduladoras en algunas enfermedades como las causadas por microorganismos intracelulares, el cáncer, las alergias y la autoinmunidad.

Fuente de los datos: artículos recopilados por los autores durante su trayectoria investigativa en el área de moléculas coestimuladoras. Además, se consultó la base de datos Pubmed (1990-2001) introduciendo las palabras clave "moléculas coestimuladoras, CD28, CD80, CD86, CD152, CD40, CD154".

Selección del estudio: se revisaron 100 artículos de los cuales se seleccionaron 42 cuya información estaba relacionada con los tópicos de interés.

Extracción de los datos: los artículos se clasificaron por molécula, subdivididos en revisiones o artículos originales y teniendo en cuenta el modelo experimental utilizado.

Síntesis de los datos: la información seleccionada describe cómo la activación de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno depende de la expresión y función de componentes de la membrana de las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T, algunos de los cuales se denominan "moléculas coestimuladoras". Las interacciones entre dichas moléculas coestimuladoras tales como las de la familia B7 (CD80 y CD86) con CD28 y CD152 o entre las moléculas CD40 y CD40L desempeñan un papel importante en la transmisión de señales intracelulares necesarias para lograr una óptima respuesta inmune a diferentes enfermedades.

Conclusión: el desarrollo de ensayos de manipulación de las moléculas coestimuladoras en modelos de enfermedades humanas representa una alternativa inmunoterapéutica. (*Acta Med Colomb* 2002; 27: 125-133)

Palabras clave: moléculas coestimuladoras, inmunomodulación, CD28, CD 152, CD40, CD40L, CD80, CD86, CD 154.

Introducción

El linfocito T (LT) está capacitado para reconocer el complejo formado por la molécula HLA y el péptido antigénico (complejo HLA-Ag) a través de un receptor específico para ese fragmento antigénico conocido como TCR. Una vez el TCR reconoce su péptido antigénico específico, se desencadena una serie de eventos bioquímicos dentro del LT mediados por la molécula CD3, que colectivamente dan comienzo a su proceso de activación. Sin embargo, se ha demostrado que el complejo HLA-Ag no es capaz, por sí solo, de activar al LT y que por el contrario, induce un estado de anergia en esta célula (1-3). Esto sugiere que la activación del LT necesita de la participación de otros componentes de la membrana celular tanto de

la célula presentadora de Ag (CPA) como del LT, cuya interacción adicionalmente previene a la célula T de un posible estado de anergia (Figura 1). Entre estos componentes se encuentran las proteínas de superficie conocidas como "moléculas coestimuladoras" porque son las encargadas de dar la segunda señal o "señal de coestimulación"

Lic. Milena Zuluaga García: Bacterióloga, Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET); Lic. Claudia Milena Trujillo Vargas: Bacterióloga, MSc. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET), Grupo de Inmunodeficiencias Primarias; Dr. Pablo Javier Patiño Grajales, MSc, PhD: Grupo de Inmunodeficiencias Primarias; Lic. Sara María Robledo Restrepo: Bacterióloga, MSc, PhD. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET). Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín.

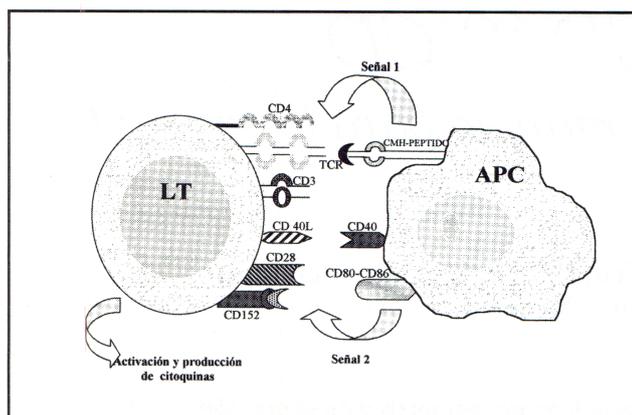


Figura 1. Representación esquemática de la activación de LT por la interacción entre la CPA y el LT mediada por sus moléculas de superficie. Señal 1: interacción entre el TCR y el complejo péptido-CMH asociado al complejo CD3. Señal 2: interacción entre los pares de moléculas coestimuladoras CD80/CD86 - CD28 / CD152 y CD40 - CD40L.

necesaria para mantener la activación del LT ya que tienen la capacidad de desencadenar eventos bioquímicos al interior de las células para su activación y el posterior aumento o disminución de la respuesta inmune. Las moléculas coestimuladoras se agrupan en tres familias estructurales: las pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Igs), las de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) y las de la familia del receptor del TNF (TNF-R).

Las moléculas coestimuladoras están clasificadas además, dentro del extenso grupo de moléculas accesorias expresadas en la superficie de las células de los tejidos hematopoyéticos y que participan activamente en el mantenimiento de la integridad del sistema inmune. El estudio de estas moléculas accesorias se inició al tratar de encontrar agentes serológicos que permitieran identificar las diferentes subpoblaciones de linfocitos; a su vez el concepto de coestimulación fue incorporado en 1991 cuando se evidenció su participación en el proceso de reconocimiento del Ag por el LT y su posterior activación. Desde entonces las publicaciones en este tema se han enfocado en la identificación de moléculas de superficie capaces de proporcionar señales coestimuladoras (4, 5). Hasta el momento se han identificado alrededor de 20 moléculas (incluyendo las integrinas y otras moléculas de adhesión) con capacidad de aumentar la respuesta proliferativa de los LT y de promover o regular su activación frente a estímulos antigénicos específicos (Tabla 1) (6).

Existen diferentes vías a través de las cuales la CPA se comunica con el LT durante el desarrollo de la respuesta inmune. Sin embargo, se considera que las vías de coestimulación más importantes por sus múltiples implicaciones en el curso de la respuesta inmune corresponden a las interacciones ocurridas entre las moléculas de la familia B7 (B7-1 y B7-2) expresadas en las CPAs y las moléculas CD28 y CD152 expresadas en el LT y a las interacciones que suceden entre la molécula CD40 expresada en las CPAs y la molécula CD 154 (CD40L) expresada

Tabla 1. Principales moléculas accesorias y sus funciones.

Molécula	Sinónimo	Función
CD11a	LFA-1a	Adhesión celular por medio de la interacción con CD54
CD43	GpL115	Antiadhesión y adhesión celular leucocitaria por medio de la interacción con CD54
CD40L	CD154	Coestimulación y producción de anticuerpos por la interacción con CD40
CD27	S152	Señal coestimuladora para células B y T por la interacción con CD70
CD45RO	CD45	Activación de linfocitos T y B por la interacción con CD22
CD5	Leu 1	Modula señalización de complejos TCR y BCR al unirse a CD72
CD4	L3T4	Correceptor en la activación de linfocitos T ayudadores por su unión a la molécula HLA-II
CD8	Leu-2	Correceptor en la activación de linfocitos T citotóxicos por su unión a la molécula HLA-I
CD3	T3	Correceptor en la activación de linfocitos T
CD2	LFA-2	Regulación de anergia de las células T al interactuar con CD58
CD28	T44	Coestimulación de linfocitos T y producción de citoquinas por la interacción con CD80 y CD86
CTLA-4	CD152	Regulador negativo de la activación de linfocitos T al interactuar con CD80 y CD86
4-1BB	CDw137	Coestimulación y proliferación de linfocitos T por la unión a 4-1BBL
CD30	Ber-H2	Muerte celular mediada por el receptor para Ag de linfocito T al unirse a CD30L

en el LT. La primera interacción se ha relacionado con la producción de citoquinas como interleuquina 4 (IL-4) y se ha observado una regulación negativa entre CD86 y dicha citoquina la cual está implicada en la respuesta a patógenos extracelulares y en enfermedades alérgicas. A su vez, la segunda vía de coestimulación se ha relacionado con la producción de IL-12, una citoquina importante en el desarrollo de resistencia a infecciones por microorganismos patógenos intracelulares como *Leishmania* y *Toxoplasma*.

Esta revisión estará enfocada en describir las principales características estructurales y funcionales de estas dos vías coestimuladoras y sus implicaciones en algunos modelos de enfermedades infecciosas, el cáncer, los procesos alérgicos y de autoinmunidad. El interés en el estudio de este tema está dado por la importancia que tiene conocer la regulación y funciones de las moléculas coestimuladoras con el fin de plantear alternativas inmunoterapéuticas para aquellas enfermedades cuya fisiopatología esté relacionada con procesos inmunológicos.

Material y métodos

La presente revisión se basa en artículos biomédicos recopilados por los autores durante su trayectoria investigativa en el área de moléculas coestimuladoras y en

los obtenidos a través de la base de datos Pubmed (1990-2001) introduciendo como patrón de búsqueda las palabras "moléculas coestimuladoras, CD28, CD80, CD86, CD152, CD40, CD154". Así mismo, se tuvieron en cuenta algunas consultas sobre patogenia de enfermedades infecciosas, cáncer, alergias y autoinmunidad. Se revisaron 100 artículos de los cuales se seleccionaron 42 con información relacionada con estructura, función o capacidad de las principales moléculas coestimuladoras para regular la respuesta inmune en distintas enfermedades.

Las publicaciones se clasificaron según la molécula a la cual hacían referencia y posteriormente se subdividieron en revisiones o artículos originales y se agruparon según el modelo experimental utilizado. Posteriormente se extrajo la información correspondiente a cada molécula y se elaboró la descripción de las características estructurales, funcionales, así como la regulación de las interacciones entre las moléculas correspondientes a las vías CD28/CD152-B7 y CD40-CD40L; se destacaron también las características inmunorreguladoras basadas en varios modelos de enfermedades y finalmente se elaboró el resumen y las conclusiones.

Características estructurales y funcionales de las moléculas coestimuladoras

Las moléculas coestimuladoras son glicoproteínas cuya estructura proteica puede variar en la cantidad de dominios que atraviesan la membrana plasmática y en la extensión de dichos dominios según la familia de proteínas a la cual pertenecen. Por otro lado, desempeñan diferentes funciones de acuerdo con la célula donde se expresan. En el sistema inmune, se expresan tanto en las células involucradas en funciones de reconocimiento y presentación del Ag como en las células comprometidas en la ejecución de la respuesta inmune efectiva contra el Ag. A continuación se describen las principales propiedades estructurales y funcionales para las moléculas coestimuladoras involucradas en estas dos vías de coestimulación de los LT efectoras.

CD28

El Ag de diferenciación de leucocitos humanos 28 o CD28 es una glicoproteína, que pertenece a la superfamilia de las Igs. Forma un heterodímero de 44 kDa, inicialmente designado como Ag T44 o Tp44. Su cDNA predice una proteína de transmembrana de 202 residuos. Presenta un dominio extracelular de 134 aminoácidos, por medio del cual la molécula se une con su respectivo ligando. Presenta además una región hidrofóbica de 27 aminoácidos que atraviesa la membrana y un extremo citoplasmático de 41 aminoácidos. El gen que codifica para esta proteína se localiza en el brazo largo del cromosoma 2 humano y en el cromosoma 1 murino (7-9).

En el humano, la expresión de CD28 comienza durante la maduración de los LT en el timo. Los timocitos doblemente positivos, es decir, CD4⁺ CD8⁺ expresan CD28 en

muy baja densidad y su expresión aumenta en timocitos maduros, es decir, LT CD3⁺, CD4⁺ o CD3⁺ CD8⁺. Además, el 80% de los LT de sangre periférica expresan CD28, entre los cuales el 95% corresponde a LT CD4⁺ y el 50% a LT CD8⁺ (10). Aunque la expresión de CD28 es constitutiva, dicha expresión es dinámica puesto que aumenta en forma transitoria luego de la activación del LT y disminuye cuando se une a sus ligandos, las proteínas B7-1 y B7-2 (8, 11). Inicialmente se consideró la expresión de CD28 como una propiedad exclusiva de los LT; sin embargo, se ha demostrado que CD28 también se expresa en la membrana de células plasmáticas, lo que sugiere un papel importante de la molécula CD28 no sólo en la respuesta inmune de las células T sino también en la respuesta inmune humoral.

CD152

El Ag de diferenciación de leucocitos humanos 152 o CD 152 es una glicoproteína receptor tipo I, que pertenece también a la superfamilia de las Igs. Posee un peso molecular de 33 a 45 kDa; este rango en el peso puede explicarse por la pérdida de la secuencia señal durante la biosíntesis. La proteína precursora está conformada por 223 aminoácidos la cual consta de un dominio extracelular tipo inmunoglobulina de 124 aminoácidos, una región transmembrana de 26 aminoácidos y un fragmento citoplasmático de 36 aminoácidos. La molécula CD 152 se conoce también como CTLA-4 (Citotoxic T Lymphocyte Antigen 4) por haberse identificado originalmente como el cuarto cDNA de una genoteca murina de células T citotóxicas (12). Su expresión en la membrana celular ocurre en forma de monómero o de homodímero luego de la activación del LT (13,11). El gen que codifica para la proteína CD 152 se localiza en el cromosoma 2 humano y en el cromosoma 1 murino, muy cerca del gen que codifica para la molécula CD28 (12). La molécula CD 152 constituye un ligando alterno para las moléculas CD80 y CD86 con una expresión inducible tanto en los LT CD4⁺ como en los LT CD8⁺, cuyos niveles máximos se alcanzan entre las 48 y las 72 horas después del estímulo antigénico específico.

CD80 y CD86

Estas moléculas son proteínas que pertenecen a la familia B7, la cual se caracteriza por la conservación de los dominios típicos de las inmunoglobulinas. La molécula CD80 se conoce también como B7.1 y la molécula CD86 se conoce como B7.2. Las dos son glicoproteínas monoméricas con un peso de 60 kDa para CD80 y de 86 kDa para CD86. Ambas poseen una región extracelular con dos dominios tipo Ig, una porción de transmembrana y una cola citoplasmática corta de 16 a 31 aminoácidos en el caso de CD80, con tres sitios posibles para ser fosforilados por la proteína quinasa C (PKC), lo que sugiere su participación en la transmisión de señales durante la activación celular (10). Presentan un 25% de homología entre ellas, especialmente en la cola citoplasmática. Tanto CD80 como CD86

constituyen los ligandos específicos para las moléculas CD28 y CD152 presentes en los LT. Los genes que codifican para estas dos moléculas se encuentran en los cromosomas 3 humano y 16 murino en regiones muy cercanas (12).

Las moléculas CD80 y CD86 se expresan en diferentes células. CD80 en linfocitos B (LB) y LT activados, células dendríticas, células de Langerhans, monocitos activados, subpoblaciones de células endoteliales y en algunas células tumorales; por su parte CD86 se expresa en forma constitutiva en las células dendríticas interdigitantes y en bajos niveles por células de Langerhans, monocitos, células endoteliales y algunas clonas de LT. Es importante resaltar que la cinética de expresión y el significado funcional de CD80 es diferente de CD86. Mientras que CD80 se comienza a detectar 24 horas después de la activación alcanzando niveles máximos entre las 48 y las 72 horas, CD86 experimenta una regulación positiva más rápida, detectándose a las seis horas y llegando a una expresión máxima a las 24 (12).

CD40

CD40 es una glicoproteína de membrana integral tipo I perteneciente a la superfamilia de TNF-R que se expresa en la superficie celular en forma de homodímero. Dependiendo de su glicosilación posee un peso molecular entre 44 y 48 kDa con cuatro dominios extracelulares de 45 aminoácidos cada uno, ricos en cisteína, los cuales son característicos de las moléculas de la familia del TNF-R. El gen para esta proteína está ubicado en el brazo largo del cromosoma 20 humano y en el 2 murino (14). La molécula CD40 se expresa constitutivamente en los LB, en las células epiteliales, dendríticas de tipo linfoide, tumorales, endoteliales del músculo liso, macrófagos, monocitos y fibroblastos (15).

CD154

CD 154 es una proteína integral de membrana tipo II con un peso molecular entre 32 y 39 kDa. Posee 261 aminoácidos y pertenece a la familia del TNF. La proteína se expresa como un homotrímero para unirse a la molécula CD40, por lo que se conoce también como CD40L. La molécula CD 154 consta de un dominio extracelular con 215 aminoácidos, una porción de transmembrana con 24 aminoácidos y un dominio intracitoplasmático de 22 aminoácidos (16 17). En el dominio extracelular, en su región más próxima al dominio de transmembrana, se encuentra un sitio para ruptura proteolítica, que puede tener propiedades de señalización. El gen que codifica para esta molécula se localiza en el brazo largo del cromosoma X humano. CD 154 se expresa principalmente en células T CD4+ activadas, pero también se ha descrito en células T CD8+, eosinófilos, mastocitos, basófilos, células asesinas naturales (NK) y dendríticas. Su expresión es rápidamente inducida en los LT luego de cuatro a seis horas de activación, con niveles máximos de expresión a las 24 horas y disminuye posteriormente (18).

Vías de coestimulación y sus implicaciones en la respuesta inmune

Interacción B7 - CD28/CD152

Los detalles moleculares de la interacción de las proteínas B7-1 y B7-2 con sus receptores CD28/CD152 se ilustran en la Figura 2. Sin embargo, es importante mencionar que todos los eventos aún no están completamente claros. Se cree que B7-2 es la molécula coestimuladora primaria, responsable del inicio de la respuesta de los LT y de proporcionar la ayuda a los LB, y que la expresión de estas moléculas en la superficie celular provee importantes señales coestimuladoras necesarias para iniciar una potente respuesta inmune (19).

Luego de la estimulación antigénica ya sea por mitógenos o antígenos específicos, las moléculas B7-1 y B7-2 interactúan con CD28 para participar de esta forma en la transmisión de señales coestimuladoras para la activación adecuada de los LT. La cascada de eventos bioquímicos que se origina tras la estimulación de la molécula CD28 es independiente de la desencadenada luego de la estimulación del TCR o se cruza con la señalización de dicho receptor. Luego de la interacción de las moléculas CD28 con sus ligandos específicos, la enzima fosfatidilinositol 3 quinasa (PI-3K) se une al dominio YMNM (Tyr, Met, Asn, Met) de la cola citoplasmática de la molécula CD28 por medio del dominio SH2 de la subunidad p85a que posee dicha enzima. Posteriormente la secuencia motivo YMNM se fosforila en el residuo de tirosina, fosforilación que ocurre posiblemente por las tirosinas kinasas de la familia Src, p56^{lck} y p59^{lck}. Dicha fosforilación de la secuencia motivo activa la enzima PI-3K, que a su vez fosforila el grupo hidroxilo de la posición 3 de los lípidos que contienen inositol, generando así fosfatidilinositol 3 fosfato, fosfatidilinositol 3,4 bifosfato y fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato. Las numerosas interacciones moleculares de la enzima PI-3K activación las vías de Ras y de la fosfolipasa Cg1 (PLCg1) lo cual resulta en la activación de las proteínas kinasas activadas

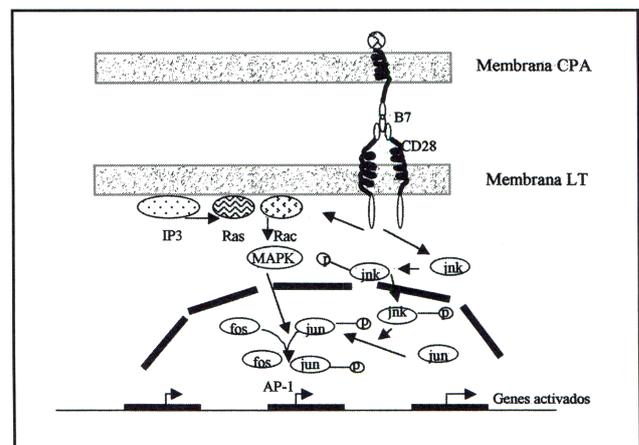


Figura 2. Representación esquemática de las señales intracelulares desencadenadas luego de la interacción entre el receptor CD28, con sus ligandos específicos, las moléculas B7.

por mitógenos (MAPKs), principalmente JNKs y ERKs, a su vez éstas activan los factores de transcripción de la familia API conocidos como Jun y Fos. Estos en colaboración con los factores NFAT y NFκB, promueven la transcripción del gen de la IL-2, una citoquina importante para la proliferación de las células T en respuesta a mitógenos o antígenos (20, 21).

La coestimulación mediada por CD28 influye en múltiples aspectos de la fisiología del LT potenciando así la respuesta mediada por estas células. La activación de esta vía induce la expresión de genes antiapoptóticos como el gen *bcl-xL*, potencia la adhesión celular, facilita la reorganización de la membrana plasmática durante la unión del LT a la CPA, previene la inducción de anergia, mantiene la formación de centros germinales e incrementa la producción de citoquinas principalmente IL-2 y por lo tanto la proliferación de los LT. Es así como por ejemplo, cuando las células son coestimuladas con anticuerpos (Acs) anti-CD28 y anti-CD3, se observa un incremento de cinco a 50 veces en los niveles de citoquinas tipo Th1 que incluyen la IL-2, el IFNγ y el TNFβ, sugiriendo que el receptor CD28 es una molécula que modula la capacidad que tienen los LT activados por Acs para regular otras células y sus productos (8, 19). De igual manera se ha observado que los LT estimulados con anti-CD28 son relativamente resistentes a agentes inmunosupresores como la ciclosporina, prostaglandinas y vitamina D3, en comparación con células que sólo han sido estimuladas a través del TCR, sugiriendo que CD28 participa en las funciones efectoras de los LT en forma independiente del ciclo celular (22).

Por otro lado se ha observado que en las células de tejido bronquial procedentes de pacientes con asma atópica estimuladas con alérgenos, las moléculas CD80 y CD86 son necesarias para la producción de las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13 por parte de los LT (21). Estas moléculas participan además en la respuesta inmune frente a tumores, dado que la inducción de la expresión de CD80 y CD86 en tumores establecidos usando terapia génica mediada por virus induce una respuesta inmune activa que resulta en la eliminación del tumor (23).

El papel de la unión alternativa de CD80 y CD86 con CD152 es controvertida, ya que a esta molécula inicialmente se le atribuyó un papel semejante al de CD28 y de hecho son moléculas de superficie estructuralmente relacionadas. Sin embargo, los hallazgos experimentales más recientes le han adjudicado un papel como molécula reguladora negativa de la respuesta inmune. Se ha observado por ejemplo que los ratones deficientes en CD152 desarrollan un desorden linfoproliferativo fatal, lo que confirma la hipótesis acerca de la regulación negativa que ejerce esta molécula dentro de la proliferación clonal de los LT. Existe un gran número de mecanismos propuestos para explicar la función de la molécula CD152 entre los cuales se incluyen la competición con CD28 por el ligando, la inducción de secreción de citoquinas inmunosupresoras, el secuestro de proteínas involucradas en

la transmisión de señales para la activación de los LT y la reducción de los niveles de fosforilación del motivo citoplásmico YXXM (Tyr, 2 aminoácidos variables, Met) de los LT (24). Sin embargo, estudios más detallados han propuesto que el mecanismo responsable de la función de CD152 parece estar relacionado con la asociación de esta molécula a la fosfatasa SHP2, a la competencia por moléculas intracelulares como PI3-K y a la inhibición de la unión del CD28 con sus ligandos dado que CD152 posee 15 veces mayor afinidad por ellos (8, 24). Cabe mencionar además que a la molécula CD152 se le han atribuido otras funciones como el aumento de la respuesta inmune contra tumores y parásitos y su participación en los procesos autoinmunes y en rechazo a injertos (24).

Interacción CD40 - CD40L

La vía de coestimulación CD40 - CD40L se estudió inicialmente al tratar de describir las señales de los LT ayudadores involucrados en la diferenciación de los LB en pacientes con síndrome de hiperinmunoglobulinemia M (HiperIgM). Los estudios en humanos con este síndrome aportaron pruebas concluyentes acerca de la importancia de la interacción CD40 - CD40L en la respuesta inmune humoral dependiente de los LT. Se demostró que los LT ayudadores de estos pacientes eran incapaces de activar a los LB y de inducir el cambio de isotipo de Igs en estas células explicando, por lo tanto, el aumento de la IgM en el suero y la marcada disminución de las otras Igs. Al buscar los factores solubles o de la membrana del LT que inducían este fenómeno y que estaban alterados en los pacientes con HiperIgM, se descubrió que en esta enfermedad se presenta una mutación en el gen que codifica para la molécula CD40L que conduce a un defecto en esta proteína lo que impide que se una a CD40. De esta forma se conoció que los LT ayudadores activados expresaban CD40L, que a su vez se unía a CD40 presente en las diferentes CPAs y que esta interacción era esencial para la activación efectiva del LB y para el cambio de isotipo de Igs (25).

Además de su papel en la modulación de la respuesta de los LB, se ha observado que la interacción CD40 - CD40L también es importante en la inducción de la actividad coestimuladora en otros tipos de CPAs como son las células dendríticas y los macrófagos, de manera que también interviene en la respuesta inmune mediada por células. Los pacientes con HiperIgM presentan mayor susceptibilidad a infecciones por agentes oportunistas intracelulares tales como *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus* e *Histoplasma*, lo cual indica la existencia de un defecto en la activación y función de las células fagocíticas y citotóxicas encargadas de destruir estos microorganismos. En este sentido se conoce que la vía de coestimulación CD40 - CD40L regula la respuesta inmune mediada por células usando dos mecanismos importantes: la regulación positiva de la expresión de moléculas como CD58, CD80 y CD86 en las CPAs y el estímulo para la producción de IL-12 (26, 27).

Adicionalmente, se ha demostrado que la transmisión de señales por medio de CD40 protege al LB de sufrir apoptosis. La porción citoplasmática de la molécula CD40 se asocia a segundos mensajeros de la familia (factor asociado al receptor del TNF) (TRAF). Estos transmiten señales que activan los factores NFκB, AP-1 y NFAT con la consiguiente expresión de genes que modulan la actividad de kinasas y fosfatasa las cuales a su vez afectan el ciclo celular y regulan positivamente factores antiapoptóticos como bcl-2 y bcl-xL (28).

Regulación de la interacción B7 - CD28/CD152 y CD40 - CD40L

La regulación de la vía de coestimulación B7 - CD28/CD 152 ocurre básicamente por la regulación de la expresión de CD80 y CD86 la cual se ejerce de manera diferencial por diversos factores. Es así como, el entrecruzamiento del receptor para Ag de los LB (BCR) y la interacción entre CD40 - CD40L inducen la expresión de ambas moléculas, mientras que la unión del receptor Fc en monocitos las regula negativamente. Por otro lado se ha demostrado que la IL-4 es un potente inductor de la expresión de B7-2 y en menor grado de B7-1, mientras que la IL-10 bloquea la expresión de las dos moléculas, en macrófagos peritoneales y regula negativamente la expresión de B7-2 pero no de B7-1 en las células dendríticas humanas. A su vez, el IFNγ también muestra efectos complejos sobre las moléculas B7-1 y B7-2 pues se ha descrito que aumenta su expresión en monocitos de sangre periférica, pero disminuye la expresión de B7-1 en macrófagos peritoneales murinos(18).

Las evidencias acerca del papel de la interacción CD40 - CD40L en la regulación de la expresión de otras moléculas coestimuladoras fueron proporcionadas por la estimulación *in vitro* de esta vía utilizando Acs anti-CD40L lo cual conduce a una regulación positiva de las moléculas CD80 y CD86 en las CPAs. Este aumento en las moléculas B7-1 y B7-2 también se evidencia en las CPAs al adicionar CD 154 en forma recombinante o al utilizar células transfectadas con CD 154. Estos experimentos ponen en evidencia una de las características más importantes de estas vías de coestimulación como son su capacidad de interactuar en forma cruzada inhibiendo o estimulando la expresión de sus moléculas en forma mutua, como es el caso de CD 154 y las moléculas B7-1 y B7-2, logrando así, en forma directa o indirecta, efectos en los LT que dirigen la respuesta inmune específica (29).

Papel de las interacciones B7 - CD28/CD152 y CD40 - CD40L en algunas enfermedades

Debido al papel fundamental que cumplen las vías coestimuladoras en eventos críticos para una respuesta inmune específica óptima como lo son la presentación antigénica, la transmisión de señales intracelulares y la activación de LT, se ha intentado manipular estas interacciones inhibiendo con Acs o alterando la expresión

de los genes que codifican para estas moléculas. Esto con el fin de inducir una respuesta inmune adecuada a infecciones por microorganismos intracelulares o para evitar el desarrollo de afecciones tales como las alergias, el cáncer y las enfermedades autoinmunes, como se detalla a continuación.

Infecciones intracelulares

La respuesta inmune efectiva ante la infección por un microorganismo intracelular está determinada en gran parte por la activación de una respuesta inmune específica mediada por citoquinas del subgrupo Th1. Existen varias evidencias acerca de cómo las moléculas coestimuladoras pueden inducir diferentes patrones de citoquinas en varios modelos de infección por microorganismos intracelulares. Es así como en la infección por *Toxoplasma gondii*, ratones genéticamente normales son resistentes cuando se les reata por segunda vez con una cepa virulenta de éste, pero aquéllos que presentan una mutación en el gen que codifica por la molécula CD28 (CD28^{-/-}) son susceptibles al segundo reto con la misma cepa de este protozoo. Esta deficiencia en la respuesta de memoria se correlaciona con la disminución en la producción de IL-2 e IFNγ y con una disminución en el número de células T CD4⁺ con fenotipo de memoria (29). Así mismo, en la infección murina por *Leishmania (Leishmania) major*, la diferenciación de las células T hacia subpoblaciones Th2, asociadas con susceptibilidad a este microorganismo, depende de la interacción del LT con la CPA mediada por la molécula coestimuladora CD86. El tratamiento de cepas de ratones, tanto susceptibles como resistentes a la infección por *L. major*, con Acs contra CD28, que impiden la interacción con su ligando, disminuye sustancialmente la carga parasitaria y los niveles de citoquinas de tipo Th2 (30, 31).

La interacción CD40 - CD40L también tiene importancia en la respuesta inmune contra microorganismos intracelulares ya que a estas moléculas se les ha involucrado en la regulación de la producción de IL-12 por macrófagos y de IFNγ por los LT. Se ha observado que en cepas de ratones resistentes a la infección con *T. gondii*, la molécula CD40 se regula positivamente en las poblaciones de células accesorias al sitio de infección, al igual que en las células del tejido linfóide. Por otro lado, cuando los ratones carentes de CD40 (CD40^{-/-}) son infectados con este parásito se observa una disminución en la producción de IL-12 y niveles de IFNγ similares a los producidos por los ratones normales. Sin embargo, los ratones deficientes de CD40 sucumben a la encefalitis toxoplásmica rápidamente después de la infección, lo cual indica que además de IFN-γ, la IL-12 puede ser crítica en este tipo de infecciones y que su producción está directamente relacionada con la expresión de CD40 (32). Esta incapacidad de los ratones -CD40^{-/-} para controlar la replicación del parásito en el cerebro en el modelo de toxoplasmosis, es consistente con la habilidad que muestra la molécula CD40L soluble en combinación

con el IFN γ para activar el macrófago y controlar la multiplicación del parásito *in vitro*.

Un comportamiento similar se observa durante la infección por *Leishmania* en la cual los ratones CD40^{-/-} infectados con *L. amazonensis*, desarrollan lesiones ulcerativas progresivas y mantienen una carga parasitaria tisular mucho más alta que los ratones normales (33, 34). En ambos modelos la progresión de la infección se asocia con defectos en la activación de LT y macrófagos y con una respuesta inflamatoria caracterizada por bajos niveles de producción de IFN γ , TNF y óxido nítrico. También puede decirse que en este tipo de infecciones la molécula CD86 es un factor clave para la diferenciación de los LT hacia subpoblaciones Th2 relacionadas con mayor susceptibilidad a la infección y el desarrollo de enfermedad por estos microorganismos (35, 36).

Enfermedades autoinmunes

Los mecanismos precisos por los cuales se rompe la tolerancia a autoantígenos y se activan las células T autoactivas aún no se entienden por completo; sin embargo, se acepta que las fallas en la regulación del proceso de coestimulación contribuyen a la iniciación y a la conservación de la autoinmunidad por la activación de células T autorreactivas. Estudios *in vivo* utilizando Acs específicos para moléculas coestimuladoras, proteínas de fusión y animales manipulados genéticamente han permitido entender el papel de estas moléculas coestimuladoras en procesos celulares asociados con autoinmunidad (37-39).

Algunos trabajos realizados en modelos de enfermedad autoinmune, tanto espontánea como inducida, han demostrado la participación de las moléculas CD80 y CD86 al interactuar con su receptor, la molécula CD28. Es así como al utilizar la molécula CTLA-4 como proteína de fusión que compite por los ligandos CD80 y CD86 se mejora o revierte el proceso autoinmune (37). Otros estudios realizados en el modelo murino han demostrado que al bloquear las moléculas CD80 y CD86 con Acs monoclonales específicos se evita la liberación de las señales proporcionadas por CD28, lo cual altera la respuesta inmune contra autoantígenos y previene el desarrollo de la enfermedad autoinmune. Estos mecanismos de manipulación de las señales coestimuladoras podrían ser una alternativa para el tratamiento de enfermedades autoinmunes en el humano que cursan de forma similar a los modelos experimentales murinos, como por ejemplo la esclerosis múltiple (37, 38).

Cáncer

Actualmente se están estudiando los mecanismos por los cuales las moléculas coestimuladoras pueden modular la actividad de los linfocitos T CD8⁺ y así desarrollar una respuesta citotóxica capaz de eliminar tumores. En este sentido se ha observado que la administración en ratones de péptidos antigénicos encapsulados en vehículos lipídicos multilaminares en asociación con Acs anti-CD40 y/o anti-

CD152, hace que las células T CD8⁺ de estos animales aumenten la citotoxicidad contra células transformadas con el péptido antigénico. Por otra parte cuando se administraron simultáneamente CD40 y CD152 se potenció aún más esta respuesta. Una respuesta citotóxica similar podría generarse en ratones inmunizados con Acs asociados a tumores usando el mismo procedimiento, abriendo la posibilidad que Acs anti-CD40 y anti-CD152 puedan funcionar como moléculas reguladoras de la respuesta citotóxica y ser aplicables en terapias inmunológicas específicas de cáncer como vacunas de péptidos antitumorales (40).

Alergias

El principal proceso alérgico en el que se ha estudiado el papel de las moléculas coestimuladoras es el asma. La respuesta inmune a esta entidad está mediada por LT CD4⁺ productores de citoquinas asociadas con una respuesta de tipo Th2 tales como IL-4 e IL-5. Recientemente las moléculas B7-1 y B7-2 se han identificado como capaces de influir en el desarrollo de una respuesta de tipo Th1 o Th2 y posiblemente desencadenar la patogénesis de respuesta inmune exagerada mediada por LT CD4⁺ Th2 inducida por alérgenos aéreos (41). En el pulmón del paciente con asma la expresión alterada de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en los macrófagos alveolares contribuye a la activación del LT y la expansión clonal. Algunos investigadores sugieren que la expresión de CD80 y CD86 en el macrófago alveolar podría sostener diferencialmente la inflamación alérgica en el paciente adulto. Dicha hipótesis es apoyada por datos que indican que, en efecto, el macrófago alveolar participa con las señales de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 que sostienen la producción de citoquinas tipo Th2 por células T específicas de alérgenos. También se observó que CD86 *in vivo* podía ser regulada positivamente luego de 24 horas de exposición a alérgenos y que esta modulación era funcionalmente relevante (42).

Conclusiones

Durante el transcurso de esta revisión hemos tratado de abordar de una manera detallada los aspectos sobre la estructura y función de las vías coestimuladoras CD28/CD152 - B7 y CD40/CD40L enfatizando finalmente su repercusión en el desarrollo de algunos procesos patológicos. Es importante anotar cómo estas proteínas de membrana participan en la activación e incluso en el desarrollo del LT en el timo por medio de tres mecanismos fundamentales: 1) induciendo diferencialmente la producción de citoquinas, 2) regulando el proceso apoptótico y 3) estimulando la expresión de superficie de otras moléculas accesorias.

Entre los muchos factores que afectan la diferenciación del linfocito T CD4⁺ hacia subpoblaciones Th1/Th2 se deben considerar adicionalmente el papel que desempeñan las moléculas coestimuladoras. Podríamos definir a la vía de coestimulación B7/CD28 como una vía importante para el desarrollo de células Th2 y a la vía CD40/CD40L como

esencial para la generación de células Th1. Sin embargo, considerando que estas vías son interdependientes y que la generación de subpoblaciones Th1 o Th2 es un proceso multifactorial, se deben evitar las generalizaciones. No obstante, a pesar de todos los informes contradictorios cuando se trata de relacionar moléculas coestimuladoras y subpoblaciones Th1/Th2 queda claro que existe un mecanismo de retroalimentación en el que las vías coestimuladoras inducen la secreción diferencial de citoquinas y a su vez estas modulan la expresión de las moléculas coestimuladoras. Este proceso no se debe observar aisladamente sino que se debe tener en cuenta que es afectado por el tipo y la cantidad de Ag, la afinidad de ese Ag por el TCR, el tipo de CPA donde se expresen las moléculas coestimuladoras y el sitio donde se desarrolle la respuesta inmune, entre otros muchos factores. Por otra parte, no se debe ignorar el hecho de que la señalización a través de las vías coestimuladoras descritas en esta revisión, no sólo afecta al LT sino que es incluso importante en el desarrollo y función de las CPAs y otras células incluyendo la diferenciación de los queratinocitos. Por lo tanto, conocer y describir detalladamente las proteínas implicadas en el proceso de coestimulación de la respuesta inmune adquirida, es ampliar las alternativas inmunoterapéuticas para muchas enfermedades en las cuales se ha establecido claramente al sistema inmune como inductor de daño tisular. Hasta el momento sólo se cuentan con resultados *in vitro* y en modelos animales donde se ha demostrado que la manipulación de la expresión de estas moléculas puede evitar el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, estos resultados abren la posibilidad de pensar en un futuro próximo en la realización de ensayos terapéuticos en pacientes utilizando AcMo o también, los genes específicos de estas proteínas. Todo esto sin olvidar la analogía entre el sistema inmune y un edificio construido con fichas de dominó, donde el movimiento de cada componente afecta inevitablemente toda la estructura.

Agradecimientos

A Katherine Gilchrist R. por su colaboración en el diseño de las figuras, al Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales - PECET y al Grupo de Inmunodeficiencias Primarias de la Universidad de Antioquia.

Summary

Objective: to describe the main molecular characteristics and cellular expression of the costimulatory pathways B7 - CD28/CD152 and CD40 - CD40L, emphasizing their immunomodulatory properties in infectious diseases caused by intracellular microorganisms, cancer, allergic and autoimmune processes.

Data source: papers selected by the authors during its research in costimulatory molecules. Additionally, Pubmed data base was consulted (1990-2001) introducing as a key words: costimulatory molecules, CD28, CD80, CD86, CD 152, CD40, CD 154.

Study selection: a group of 100 papers were reviewed and 42 were selected on the basis of its pertinence to the topic.

Data extraction: the papers were classified according to the molecule, the experimental model used and whether it was an original paper or a review.

Data synthesis: the information selected describes how the activation of antigen specific T CD4 + lymphocytes depends of the expression and function of membrane components in the antigen presenting cells (APC) and T lymphocytes, some of which are "costimulatory molecules". Interactions between these molecules, such as B7 family (CD80 and CD86) with CD28/ CD 152 or CD40 with CD40L, have an important role in intracellular signals transduction necessary for an adequate immune response in an extensive range of pathologies.

Conclusion: the manipulation of these proteins could be considered as a immunotherapeutic opportunity to control human diseases.

Key words: *costimulatory molecules, immunomodulation, CD28, CD152, CD40, CD40L, CD80, CD86, CTLA-4, CD 154.*

Referencias

1. **Harding CV, Song R.** Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol* 1994;**153**:4925-4933.
2. **Wulfing C, Sumen C, Sjaastad MD, Wu LC, Dustin ML, Davis MM.** Related Articles Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nat Immunol* 2001: 3 [in press]
3. **Tao X, Constant S, Jorritsma P, Bottomly K.** Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for th1 and th2 CD4+ T cells differentiation. *J Immunol* 1997; **159**:5956-5963.
4. **Morton PA, Fu X-T, Stewart JA, Giacometto KS, White SL, Leysath CE, et al.** Differential effects of CTLA-4 substitutions on the binding of human CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2). *J Immunol* 1996;**156**:1047-1054.
5. **Bluestone JA, Khattri R A.** VSG. Accessory Molecules. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1999: 449-478.
6. **June CH, Ledbetter JA, Linsley PS, Thompson CB.** Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 1990; **11**:211-6.
7. **Linsley PS, Ledbetter JA.** The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 1993;**11**:191-212.
8. **Martínez AM, Montoya CJ.** Moléculas accesorias. *Rev Asoc Colomb Alerg Asma e Inmunol* 2000; **9**:124-132.
9. **Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP.** CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992; **16**: 607-9.
10. **Turka LA, Ledbetter JA, Lee K, June CH, Thompson CB.** CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3+ mature thymocytes. *J Immunol* 1990; **144**:1646-53.
11. **Kuiper HM, Brouwer M, Linsley PS, van Lier RAW.** Activated T cells can induce high levels of CTLA-4 expression on B cells. *J Immunol* 1995; **155**:1776-1783.
12. **Fernandez-Ruiz E, Somoza C, Sanchez-Madrid F, Lanier LL.** CD28/CTLA-4 ligands: the gene encoding CD86 (B70/B7.2) maps to the same regions as CD80 (B7/B7.1) gene in human chromosome 3q13-q23. *Eur J Immunol* 1996; **25**:1453-1456.
13. **Lindsten T, Lee KP, Harris ES, Petryniak B, Craighead N, Reynolds PJ, Lombard DB, Freeman GJ, Nadler LM, Gray GS.** Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J Immunol* 1993; **151**:3489-3499.
14. **Kuiper HM, Brouwer M, Linsley PS, van Lier RAW.** Activated T cells can induce high levels of CTLA-4 expression on B cells. *J Immunol* 1995; **155**:1776-1783.
15. **Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ.** Comparative analysis

- of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med* 1994; **180**: 631-640.
16. Lafage-Pochitaloff M, Herman P, Birg F, Galizzi JP, Simonetti J, Mannoni P, Banchemereau J. Localization of the human CD40 gene to chromosome 20, bands q12-q13.2. *Leukemia* 1994; **8**: 1172-1175.
 17. Grewal IS, Flavell RA. CD40 and Cd154 In Cell-Mediated Immunity. *Ann Rev Immunol* 1998; **16**: 111-135.
 18. Roy M, Waldschmidt T, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells. *J Immunol* 1993; **151**: 2497-2510.
 19. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 System of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**: 233-258.
 20. August A, Dupont B. Activation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK/MAP Kinase) following CD28 cross-linking: activation in cell lacking p56lck. *Tissue-Antigens* 1995; **46**: 155-162.
 21. Martinez A, Montoya CJ. Transducción de señales generadas a partir del receptor antigénico de los linfocitos T. *Latreia* 1999; **12**:168-177.
 22. Jaffar ZH, Stanciu L, Pandit A, Lordan J, Holgate ST, Roberts K. Essential role for both CD80 and CD86 costimulation, but not CD40 interactions, in allergen-induced Th2 cytokine production from asthmatic bronchial tissue: role for alphabeta, but not gammadelta, T cells. *J Immunol* 1999; **163**:6283-6291.
 23. Vonderheide RH, Butler MO, Liu JF, Battle TE, Hirano N, Gribben JG, Frank DA, Schultze JL, Nadler LM. CD40 activation of carcinoma cells increases expression of adhesion and major histocompatibility molecules but fails to induce either CD80/CD86 expression or T cell alloreactivity. *Int J Oncol* 2001; **19**:791-798.
 24. Chambers CA. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol* 2001; **22**:217-223.
 25. Buckley RH. Primary Immunodeficiency Diseases. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1994: 1427-1453.
 26. Chu NR, DeBenedette MA, Stiernholm BJN, Barber BH, Watts TH. Role of IL-12 and 4-1BB Ligand in Cytokine Production by CD28+ and CD28- T cells. *The Journal of Immunology* 1997; **158**:3081-3089.
 27. Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: The alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997; **15**:297-322.
 28. Foy TM, Aruffo A, Bajorath J, Buhlmann JE, Noelle RJ. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**:591-617.
 29. Mc Dyer JF, Wu CY, Seder RA. The regulation of IL-12: Its role in infectious, autoimmune, and allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1998; **102**:11-15.
 30. Villegas EN, Elloso MM, Reichmann G, Peach R, Hunter C. Role of CD28 in the generation of effector and memory responses required for resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1999; **163**:3344-3353.
 31. Brown JA, Titus RG, Nabavi N, Glimcher LH. Blockade of CD86 Ameliorates Leishmania major Infection by Down-Regulating the Th2 Response. *The Journal of Infectious Diseases* 1996; **174**:1303-1308.
 32. Reichmann G, Walker W, Villegas EN, Craig L, Cai G, Alexander J, et al. The CD40/CD40 ligand interaction is required for resistance to toxoplasmic encephalitis. *Infect Immun* 2000; **68**:1312-1318.
 33. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *The Lancet* 1999; **354**:1191-1199.
 34. Soong L, Xu J, Grewal IS, Kima P, Sun J, Longley BJ, et al. Disruption of CD40-CD40 Ligand Interactions Results in an Enhanced Susceptibility to Leishmania amazonensis Infection. *Immunity* 1996; **4**:263-273.
 35. Corry DB, Reiner SL, Linsley PS, Locksley RM. Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 1994; **153**:4142-4148.
 36. Elloso MM, Scott P. Expression and contribution of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in the early immune response to Leishmania major infection. *J Immunol* 1999; **162**: 6708-6715.
 37. Martinez EM, Montalban X. Cuestiones sobre la patogenia de la esclerosis múltiple. *Inmunología* 2000; **19**:81-89.
 38. Daikh D, Wofsy D, Imboden JB. The CD28-B7 costimulatory pathway and its role in autoimmune disease. *J Leukoc Biol* 1997; **62**:156-162.
 39. Zoller M. Costimulatory molecules and their ligands as therapeutic targets in autoimmune disease. *Eur J Dermatol* 2001; **11**: 335-342.
 40. Ito D, Ogasawara K, Iwabuchi K, Inuyama Y, Onoe K. Induction of CTL response by simultaneous administration of liposomal peptide vaccine with anti-CD40 and anti-CTLA-4 mAb. *J Immunol* 2000; **164**:1230-1235.
 41. Keane-Myers AM, Gause WC, Finkelman FD, Xhou XD, Wills-Karp M. Development of murine allergic asthma is dependent upon B7-2 costimulation. *J Immunol* 1998; **160**:1036-1043.
 42. Balbo P, Silvestri M, Rossi GA, Crimi E, Burastero SE. Differential role of CD80 and CD86 on alveolar macrophages in the presentation of allergen to T lymphocytes in asthma. *Clin Exp Allergy* 2001; **31**:625-636.