

SELECCIÓN DE ESCRITOS SOBRE HISTOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA E  
INMUNOLOGÍA

*Dr. Ángel Alonso*  
*Académico Titular*

SERIE CONTRIBUCIONES COMPILADAS N°7



ANCBA 2023

Alonso, Angel

Selección de escritos sobre histología, microbiología e inmunología / Angel Alonso ; compilación de Angel Alonso. - 1a ed compendiada. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires : Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires, 2023.

Libro digital, DXReader - (Contribuciones compiladas ; 7)

Archivo Digital: descarga y online  
ISBN 978-987-537-176-7

1. Medicina. I. Título.  
CDD 611.018

Fecha de catalogación: 05/2023

Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires

Av. Alvear 1711, 3º piso – 1014 Ciudad de Buenos Aires – Argentina

El presente trabajo se encuentra disponible sólo en versión electrónica

[www.ciencias.org.ar](http://www.ciencias.org.ar)

correo-e: [info@ciencias.org.ar](mailto:info@ciencias.org.ar)

La publicación de los trabajos de los Académicos y disertantes invitados se realiza bajo el principio de libertad académica y no implica ningún grado de adhesión por parte de otros miembros de la Academia, ni de ésta como entidad colectiva, a las ideas o puntos de vista de los autores.

ISBN 978-987-537-176-7

## INDICE DE LOS ARTÍCULOS DEL VOLUMEN

1. *Inmunidad, Electromagnetismo Y Envejecimiento*..... 4  
Dres. Angel Alonso y Jorge Norberto Cornejo
2. *¿Qué hacemos con los priones ?* ..... 104  
Dr. Ángel Alonso

## INMUNIDAD, ELECTROMAGNETISMO y ENVEJECIMIENTO

Angel Alonso y Jorge Norberto Cornejo

Div. Alergia e Inmunología.-Hospital de Clínicas.-Facultad de Ingeniería.-UBA.-

Sociedad Científica Argentina.-Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires.

### INTRODUCCION

1.- El fenómeno inmuno-alérgico y sus orígenes en el mundo.

La alergia es un estado particular que afecta a determinados individuos y ha motivado a muchos investigadores de las ciencias básicas y aplicadas a desenmascarar su naturaleza y el por que de los cuadros clínicos que engendra. Son innumerables los estudios orientados con tal fin que han revelado hallazgos convincentes acerca de su origen y características y aunque discutidos en el pasado se aceptan hoy sin dilaciones por su rigor científico.

Los aspectos inmunológicos de las enfermedades alérgicas han constituido el pilar fundamental para sostener lo antedicho y condenar a sus detractores a un ostracismo intelectual.

En los últimos decenios del siglo XX, los logros adquiridos, algunos de ellos cercanos a la ciencia-ficción (anticuerpos monoclonales) posibilitaron la definitiva incorporación de la especialidad a la práctica médica.

La existencia de muchas enfermedades, en especial, las pestilenciales, ha corrido pareja con la del hombre. También la alergia ha existido desde tiempos remotos, más su condición de no contagiosa, ergo no epidémica, siendo un mal individual más que grupal, hace que su historia sea menos bulliciosa que la de otras enfermedades. Primitivamente es conocida sólo por algunas observaciones casuales desperdigadas en los escritos de los que, se supone, fueron los primeros observadores. <sup>(1-2-3-4-5-6-7-8-9)</sup>

Así, Hipócrates (460-377 AC), el primer escritor médico ilustre y acreditado, escribió sobre muchos temas y entre ellos, sobre el queso y sus efectos sobre el hombre. Decía: "Me parece...que nadie se hubiera esforzado en buscar los medicamentos, si la misma dieta hubiera convenido a los que gozan de buena salud y a los enfermos...El queso no resulta igualmente dañino a todos los hombres; algunos lo pueden comer a saciedad sin que les ocasionen ningún mal, y en ese caso les da una fuerza asombrosa; pero otros no lo soportan bien, sus constituciones son distintas, y difieren a este respecto, que aquello que en sus cuerpos es incompatible con el queso, se subleva y conmueve por esto; y los que tienen en su organismo este humor en mayor cantidad e intensidad sufrirán probablemente más por ello. Pero si el queso fuera nocivo a toda la naturaleza humana, hubiera hecho daño a todos." Notable observación de quien viviera en el siglo de oro de Pericles. <sup>(10-11-12-13-14-15-16-17).</sup>

Otro célebre, Tito Caro Lucrecio (109? 98? - 55 AC), poeta latino, fue autor de un solo escrito, pero que es la contribución más famosa de la Roma de su generación. En su obra, un poema filosófico titulado De Rerum Natura (De la Naturaleza de las Cosas), exposición

didáctica y lírica del sistema de Epicuro, dada a conocer después de su muerte por su amigo Cicerón (ningún escritor coetáneo, a excepción de Cicerón, parece haber tenido conocimiento de la existencia de Lucrecio). (18-19-20-21-22-23).

No hace mucho tiempo algún investigador muy crítico sugirió la idea de que quizá Lucrecio y Cicerón fueran la misma persona. Se insinuó que como Cicerón tenía muchas cosas que decir que podían ser demasiado liberales, atribuyó sus propios ensayos a su amigo, sabiendo que no se puede vituperar a un muerto. (24-25-26-27-28).

Desde entonces los sabios han convenido que Lucrecio revelaba en sus escritos tener más conocimientos que Cicerón; luego, (es probable que existiera realmente) dijo algo sobre la alergia, aunque sin emplear un término técnico particular. Basándose en su sutil observación de la naturaleza escribió: "lo que es alimento para algunos, puede ser para otros un veneno violento", por lo que demostró ser un buen observador y hasta un mejor conocedor de la alergia, que los que desde entonces traducen erróneamente su dicho. Hoy se aprecia que Hipócrates y Lucrecio, no en vano egregios, hace más de 2000 años descubrieron una reacción anormal al ingerir ciertos alimentos inofensivos. En este caso, no hicieron otra cosa que describir la "idiosincrasia", que hoy integra el gran grupo de reacciones adversas por alimentos. (29-30-31-32-33-34-35-36).

### 1.1. Idiosincrasia.

Palabra griega que proviene de los vocablos "idios": propio, "sun": son y "krisis": temperamento, o sea, el temperamento propio por el cual se distingue uno de los demás. Este concepto, derivado de la filosofía natural de los griegos, es empleado en medicina para designar "una disposición reactiva particular e individual".

Pedanio Dioscórides fue el primero en relacionar esta manera de reaccionar, denominada por él "idiosynkristia", con los alimentos: "Con más frecuencia sufren (los sensibles) en su cuerpo una "idiosynkristia", en particular respecto de ciertos alimentos y bebidas". (37-38-39).

Tras él, varios establecieron en la antigüedad el concepto de idiosincrasia, entre los que corresponde citar a Claudio Ptolomeo (s. II dC), a Sorano (s. II dC), a Claudio Galeno (130-200, que era conocedor de un trastorno identificable con la alergia a la leche de vaca), al Talmud Babilónico (s. II dC, que daba instrucciones precisas para combatir una hipersensibilidad intestinal al huevo), a Sexto Empírico (s. III) y a Oribasio (325-403). (40-41-42-43).

En la Edad Media, se encontraron descripciones de algunos fenómenos, donde se destacan los síntomas asmáticos, de urticaria o equivalentes al edema de Quincke e incluso los propios del choque alérgico. La fiebre de la rosa o del heno era considerada como una enfermedad particular.

Los médicos del Humanismo y Renacimiento eligieron el término "antipatía" (del griego "anti": contra y "pathos": afección) al de idiosincrasia, pero mezclaron ejemplos unívocos de alergias a alimentos y medicamentos con descripciones fantásticas de cuadros clínicos y fenómenos neuropáticos muy extensos.

Sin embargo, idiosincrasia y antipatía, eran más bien rótulos y no una explicación de lo que sucedía con ciertos fenómenos.

El escaso número de descripciones primitivas de casos que presentaban signos y síntomas de alergia podría deberse a:

- a): los primeros médicos consagraron sus escrituras a las enfermedades epidémicas;
- b): la imprenta no se utilizó sino alrededor del siglo XV;
- c): hasta ese momento, pocos eran los que escribían;
- d): se confeccionaban pocos ejemplares de las obras y la mayor parte de estos se perdieron;
- e): los temas predominantes versaban sobre generalidades, más bien que sobre casos específicos o aislados, o acerca de algún mal peculiar que podía ser interpretado como de orden puramente nervioso o imaginario, y,
- f): no existían historias clínicas de los casos sino descripciones de episodios aislados interesantes al revés de lo que sucede actualmente. <sup>(44-45-46-47-48-49)</sup>

Afortunadamente, algunos médicos mencionaron los signos y síntomas de episodios alérgicos, hallándose anotaciones que datan desde los tiempos lejanos de Hipócrates. El acreditado Padre de la Medicina, natural de la isla de Cos, ya empleaba el vocablo asma (del griego "asthma": jadeo) aunque sólo para indicar una dificultad respiratoria. Desde entonces, cualquiera que estuviera "jadeante" tenía asma.

Recién en 1607, Johann Baptista van Helmont, médico y químico belga, describió un tipo de respiración dificultosa que acontece en los ataques espasmódicos, con períodos de calma cuando desaparecen los síntomas, estado que se diagnostica actualmente como asma bronquial. <sup>(50-51-52-53-54-55)</sup>.

Thomas Wither, en 1787, describió el asma típico provocado por un colchón de plumas: "Conozco muy bien ciertos enfermos que sufren muy pronto un ataque convulsivo de ahogo así que se acuestan en una cama que les es extraña, cuyo colchón ha sido rehecho con nuevas plumas, las cuales desprenden un olor que les es, de un modo raro, extremadamente molesto, aun cuando otros apenas lo adviertan."

También Hipócrates describió las ronchas urticarianas causadas por picaduras de insectos acompañadas de descomposturas del estómago.

El dermatólogo inglés, Thomas Masterman Winterbottom (1766-1859), no toleraba las almendras dulces que le producían urticaria, pero a veces también ataques peligrosos de edema de Quincke. Se lo comunicó así a su amigo Robert William (1757-1812), quien el año 1798 publicó: "La primera vez, aun después de no haber comido una cantidad excesiva de almendras, sufrió náuseas, molestia y presión en el estómago e intestinos (pero sin ningún dolor fijo), gran desasosiego y una sensación progresiva de calor. Estos ataques fueron seguidos pronto de una hinchazón edematosa de la cara, sobre todo de los labios y nariz ... Experimentó, además, una comezón desagradable en el cuello, que provocó una tos molesta y la contracción de las fauces, con la amenaza de asfixia. También la lengua se hinchó y se volvió más rígida, lo que sólo le permitía hablar despacio y balbuceando."

En 1841, Conrad Heinrich Fuchs (1803-1855), citó ciertos estimulantes o condimentos como causantes de la urticaria: "hay empero, individuos que presentan esta forma de urticaria cuando comen manjares, fresas, frambuesas, miel, almendras dulces, totalmente inocuos para otra gente..."

Existen relatos cuyas descripciones se orientan hacia el choque alérgico. Así, Johann Christian Bautzman, observó, en 1869, un cuadro clínico impactante después de comer mariscos, y lo testimonió así: "Muchos comen con avidez mariscos sin sufrir daño alguno. He visto, no obstante, a mujeres, a jóvenes y a niños, los cuales, cada vez que comen mariscos se sienten mal; sufren dolores en el corazón, su sudor es frío, tienen tendencia a

desmayarse y se quejan de hinchazón en el vientre, cara y extremidades, lo que hace temer por su vida."

Respecto de la fiebre de la rosa (luego llamada fiebre del heno y actualmente polinosis), Dioscórides, el médico y naturalista griego (llamado también el "príncipe de los farmacólogos"), y Plinio "El Viejo" (Cayo Plinio Segundo, 23-79), naturalista romano y autor de una pintoresca y famosa "Naturalis Historia", describieron la acción dañina de los plátanos sobre la salud del hombre atribuyendo dicho perjuicio a los pelos que crecen sobre sus hojas.

En 1565, Leonardo Botallo, médico paduano, escribía: "Conozco a individuos, en lo demás sanos, que sienten repugnancia justificada por el aroma de las rosas, pues éste provoca en ellos dolor de cabeza, los estimula a estornudar y origina comezón muy intensa en la nariz."

## 1.2. Anafilaxia.

Aunque los jeroglíficos egipcios sugieren casos de muerte por choque anafiláctico debido a la picadura de insectos (Hymenópteros) hace 4000 años, la más acabada comprensión del íntimo mecanismo de dicho fenómeno biológico adquirió trascendencia en el siglo XX.

Se sabía ya en la antigüedad que la ingestión de materia patógena, en dosis o forma de administración adecuada, podía proteger al organismo contra la misma sustancia.

Se explican así las experiencias en las cuales, a consecuencia de la ingestión paulatina de cantidades mínimas de venenos, el organismo se habituaba a ellos (Mitridatismo); adquiría una resistencia contra el veneno, concepto que pasó a formar parte de la idiosincrasia, de antiguo cuño. De esta mezcla de empirismo y realidad nacieron los ensayos sobre venenos y anti-venenos, así como toxinas vs. anti-toxinas, que desde la química hasta la inmunología, atrajeron la atención durante las edades Media, Moderna y Contemporánea.

La referencia más remota de la que se tiene conocimiento data del siglo I aC; tal era el efecto logrado por la toma metódica de la "tríaca magna" promulgada por Mitridates y sostenida por Andrómaco. La "tríaca" o "teriaca", envuelta en la leyenda, contenía como ingrediente principal carne de víbora; fue el agente profiláctico más célebre de la Antigüedad y del Medioevo. Sólo después del descubrimiento de la vacunación antivariólica en 1798 por Edward Jenner (1749-1822), este concepto fue desvirtuado y excluido del patrimonio de la medicina científica.

En 1667, el francés Jean Denis observó durante sus primeras experiencias de transfusión de sangre, practicadas reiteradamente en un sirviente parisiense, síntomas similares a los del choque anafiláctico.

Más sistemáticas y concretas resultaron las experiencias de Francois Magendie (1783-1855), que en 1824, después de repetidas inyecciones de suero humano a conejos, advirtió fenómenos patológicos intensos, con graves trastornos convulsivos, pérdida del conocimiento y derrames articulares.

Más adelante, en 1832, siguiendo la misma línea experimental, reemplazó el suero humano por la albúmina del huevo, sustancia que inyectó rápidamente a conejos y perros. En todos los casos obtuvo respuestas similares y en muchos de ellos se produjo la muerte repentina con asfixia.

El germano Theodor Ludwing Bischoff (1807-1882), observó, en 1835, convulsiones en un gallo, semejantes a las pruebas realizadas por Magendie.

En 1841, Alfred Donné (1801-1878), usó en sus experimentos inyecciones de leche y describió casos mortales tras repetidas administraciones: "Veintiocho de marzo de 1841: inyección de 26 gr. de leche en la vena femoral de un conejo negro... el animal parece estar algo alterado; sin embargo, se restablece pronto y no sufre ningún trastorno. Dieciséis de abril: repetición de la inyección de 26 gr. de leche en la vena femoral del mismo conejo... el animal apenas puede mantenerse erguido; muere poco después de la operación."

También Ludolf von Krehl (1861-1937), comprobó en 1895, que los enfermos reaccionaban más intensamente a la segunda inyección parenteral de leche que a la primera dosis. En las postrimerías del siglo XIX, se realizaron variadas experiencias empleando la peptona de Witte, muy en boga entonces, como producto de degradación de la albúmina; resultando llamativos los fenómenos anafilácticos observados, tales como descenso de la presión arterial, trastornos diarreicos, ataques convulsivos, trastornos de la coagulación y descenso de la temperatura, que se manifestaron después de la administración de dosis repetidas. Se orientan a este respecto los trabajos de Adolf Schmidt Mülheim (1841-1926), Giulio Fano (1856-1930) y Richard Neumeister (1854-1905).

Max Matther (1865-1930), en 1894, atribuyó los síntomas anafilácticos a la inyección reiterada de sustancias proteicas, responsables de que el organismo adquiriera otra manera de reaccionar. Ese mismo año, Simon Flexner (1863-1946), confirmó las experiencias iniciales de Magendie asegurando que los animales que resistían sin inconveniente una dosis de suero de perro, dejaban de existir luego de recibir una segunda inyección, administrada algún tiempo después. Charles Richet (1850-1935), profesor de Fisiología de la Universidad de París en colaboración con su discípulo J. Héricourt, realizó trabajos de inmunización en el perro inyectando suero tóxico de anguila; pero, en 1898, pudo comprobar que la segunda y, en forma más marcada aún, la tercera inyección, enfermaban gravemente al perro ocasionándole la muerte. <sup>(56-57-58)</sup>.

En 1901, Richet, esta vez junto a Paul Portier, (1866-1962), inició una nueva serie de experimentos inmunológicos como confirmación de la línea originalmente trazada. Los hallazgos de ambos investigadores fueron proporcionados por el relato de Richet: "Durante un crucero, en el yate (Princesse Alice II) del príncipe Alberto de Mónaco (Alberto I, 1848-1922, oceanógrafo), éste sugirió (quizás porque sus actividades como bañista habían sido estorbadas por la medusa; el viaje, alentado por el príncipe, tuvo como objetivo estudiar el principio activo de la medusa productor de urticaria, a la vez que si era debida a toxinas), a Portier y a mí, un estudio sobre la toxina producida por la Physalia (medusa conocida con el nombre de "guerrero o acorazado portugués"), que se encuentra en los mares del sur. Se llevaron a cabo experimentos a bordo del yate, los cuales probaron que un extracto acuoso glicerinado de filamentos de Physalia era en extremo tóxico para los patos y conejos. De retorno a Francia, no pude obtener Physalia y decidimos estudiar por métodos comparativos los tentáculos de la Actinaria (anémona de mar). Mientras nos esforzábamos en determinar la dosis tóxica de los extractos, pronto descubrimos de debían transcurrir varios días antes de poder determinarla, ya que la muerte de los perros, a los que había sido administrada, no ocurría hasta el cabo de cuatro o cinco días después y, a veces, aún más. Conservamos aquellos perros que no habían recibido dosis suficiente para morir, con el fin de experimentar en ellos una segunda investigación, una vez curados. En este punto ocurrió

un suceso imprevisto. Los perros que se habían recuperado, se mostraron extraordinariamente sensibles a las pequeñas dosis administradas luego, y murieron pocos minutos después de haberlas recibido. El experimento más típico, en el que el resultado fue indiscutible, lo llevamos a cabo en un perro particularmente sano (llamado "Neptuno"). Le fue administrado primero 0,1 ml del extracto glicerinado sin que llegara a enfermar; veintidós días más tarde, ya que se encontraba perfectamente sano, le di una segunda inyección con igual dosis. En pocos minutos enfermó gravemente; su respiración se volvió angustiosa y jadeante; apenas si podía arrastrarse, se tendió de lado, fue presa de diarrea, vomitó sangre y murió en veinticinco minutos." Esto pasó el 10 de Febrero de 1902.

La profilaxis esperada había fracasado. El hecho fue luego comprobado y recibió de sus descubridores, por oposición a los términos "profilaxia" o "profilaxis" entonces en uso, los nombres técnicos de "*anafilaxia*" o "*anafilaxis*" (del griego, aná: sin, contra, y phylaxis: protección), esto es, "anti-defensa" o pérdida de la protección.

El término anafilaxia fue aceptado por todos. Este fenómeno atrayente pronto ocupó la atención del mundo científico. La primera publicación, de sólo dos páginas y media, es hoy uno de los trabajos clásicos de medicina. Su descubrimiento le valió a Charles Richet el Premio Nobel de Medicina en 1913. También los trabajos de Richet y Portier abrieron camino a algo totalmente nuevo, la *hipersensibilidad adquirida*, cimiento de la nueva doctrina de la alergia.

### 1.3.- Alergia.

En los albores del siglo XX, además de Richet, Portier y Hericourt, investigadores de la talla de von Behring, Arthus, Smith, Rosenau, Anderson, Otto, Gay, Wolf Eisner, Besredka y Schick, entre muchos otros, recurrieron a la experimentación animal para aclarar los numerosos problemas surgidos en los fenómenos de la hipersensibilidad.

Sin embargo, Clemens von Pirquet (1874-1929), pediatra vienés, fue quién, basándose en las observaciones y experiencias clínicas sobre seres humanos, sentó ingeniosamente los principios que desde entonces han constituido la base de la moderna "alergia", vocablo que ideó en 1906 (del griego, állos: otro, y érgon: trabajo, actividad, reacción). Así dijo: "Después de la inyección del antígeno, el organismo adquiere la facultad de reaccionar de modo distinto contra aquél. Este trastorno de la reacción comienza en el mismo momento en que aparecen los anticuerpos; le atribuimos una reacción del organismo del tipo anticuerpo ... El vacunado se conduce respecto de la linfa de la vacuna, el luético respecto del virus sifilítico, el tuberculoso respecto de la tuberculina y el inyectado con suero respecto de éste último, de modo distinto como lo hace un individuo que nunca ha estado en contacto con el respectivo agente; se halla muy lejos, por ello, de ser insensible. Todo lo que podemos decir es que su facultad de reaccionar se ha alterado. Para este concepto general de la facultad alterada de reaccionar, propongo la expresión *alergia*." (59-60).

El término, que sigue vigente hasta nuestros días, implica la descripción fenomenológica de un hecho biológico, siendo la base fisiopatológica del choque antígeno-anticuerpo o de la actividad linfocitaria.

Sin duda, el valor inventivo de la palabra "*alergia*" radicó en el ordenamiento global de todos los fenómenos de hipersensibilidad específica. En 1923, Arthur Fernández Coca (1875-1959), inmunólogo estadounidense con el asesoramiento de su amigo, el filólogo

Edward D. Perry (1856-1938), acuñó el término "atopía" (del vocablo griego *átopos*: no en el mismo lugar, inhabitual, raro, paradójico) para designar únicamente los fenómenos de hipersensibilidad de reacción inmediata.

Podríamos bautizar así a la alergia atópica como a aquellos cuadros clínicos del tipo I de Gell & Coombs mediados por la IgE y, por cierto, diferentes a los del tipo IV o linfocito-dependiente, que también son otra expresión alérgica.

Dentro del primer grupo, el asma y la polinosis, son las entidades mejor estudiadas y de larga trayectoria, por lo que merecen ser desarrolladas históricamente en forma especial.

#### 1.4.- Asma bronquial.

El término *asma* (del griego, *asthma*: sofocación, jadeo) ha sido utilizado no sólo en la literatura médica sino también a través de la pluma de los poetas, filósofos e historiadores desde la era precristiana.

Homero (s. IX aC) lo menciona en algunos de sus célebres pasajes griegos dándole un significado de cierta forma de respiración "ruidosa" tanto que se torna audible para quién la observa. Horacio (Quinto Horacio Flaco, 65-8 aC) asegura que sufría de asma en Roma, pero no en su morada campestre lejos de aquélla.

Séneca "el Joven" (Lucio Anneo, 4-65 dC) considera el asma como uno de los más penosos sufrimientos que, por otra parte, también él lo padecía.

Acaso basten estos 3 ejemplos entre muchos otros más cercanos en el tiempo, para dar una idea, salvando las distancias conceptuales entre médicos y literatos, de lo remoto y vasto que resulta el historial de esta afección.

Entre las más antiguas referencias médicas sobre ciertos síntomas que recuerdan a los del asma, figuran, sobre todo, las descripciones de los médicos griegos del siglo V aC, no obstante que hayan confundido al asma con otros tipos de disneas.

Hipócrates empleaba la palabra asma, documentada en el Corpus Hippocraticum, sólo para indicar una dificultad respiratoria. Ponía énfasis en los factores climáticos (el frío y la humedad) como desencadenantes del asma sobre un terreno intrínseco determinado de dichos enfermos. Este terreno estaba referido a los tipos fisiológicos constitucionales según el dominio de uno de los temperamentos, el sanguíneo, el flemático, el bilioso y el melancólico. Cabe aquí recordar la teoría hipocrática de que la función de las partes del cuerpo se debía a la actividad de los 4 humores: sangre, flema, bilis amarilla y bilis negra, procedentes del corazón, del cerebro, del hígado y del bazo, respectivamente, según la escuela de Cos. La armonía de los humores, debida a la acción del "calor congénito" y al mantenimiento de los alimentos, hacía que un individuo fuera sano.

Retomando los factores extrínsecos, en un opúsculo titulado "Sobre los aires, las aguas y los lugares", trata el clima griego y su influencia sobre los habitantes de cada región, aventurando la opinión de que los inviernos poco bonancibles del sur helénico propenderán al asma, entre otros padecimientos, especialmente en los niños.

Con la marcha del tiempo se agrega otro término al vocabulario médico: *disnea* (del griego *dýs*: dificultad y *pnoía*: respiración, y luego del latín, *dispneae*: respirar mal) complicando los conceptos posteriores tendientes a interpretar las afecciones respiratorias ligadas con la dificultad respiratoria.

De tal manera, Celso (Aulo Cornelio, 25 aC-45 dC), un notable enciclopedista-compilador, seguidor de la doctrina hipocrática, y que con probabilidad no practicó la medicina, colocaba al asma entre la disnea y la ortopnea, utilizando el término sólo en el sentido de fatiga por dificultad respiratoria, pero sin sospechar el claro distingo existente entre este síndrome y las otras disneas. Así, intentó una clasificación, a la que se ajustaron durante siglos varios médicos, entendiéndolo por disnea a la dificultad respiratoria ligera y sostenida, por asma a la forma aguda e intensa, y por ortopnea a la afección máxima.

Areteo de Capadocia (s. I-II dC), máximo nosógrafo de su época y cultor de la escuela ecléctica, derivación de la neumática, fue el primero que describió el acceso de asma. En su magistral obra "Sobre las causas y los signos de las enfermedades agudas o crónicas," hizo una gráfica y no menos patética descripción de la crisis asmática, parangonando la angustiosa situación del paciente con la de aquellos que mueren ahorcados.

Estableció, a su modo, la separación entre el asma y las otras disneas, pero sin distinguir las de origen bronquial y cardíaco entre sí, por lo que no prosperó entre sus coetáneos. Areteo, siguiendo a Hipócrates, aseguró que la causa del asma radica en el frío y la humedad, al igual que en los esfuerzos físicos, y refiriéndose a la secreción bronquial, que el material es un humor grueso y viscoso.

Hasta aquí imperaba la mentalidad de la medicina helenística con todo su desarrollo y diversificación en el seno del Imperio Romano, siendo su genio inicial Hipócrates y su figura final Galeno.

Galeno sostenía que el asma era motivado por la presencia de humores espesos y deslizables que ocupaban las vías aéreas y dicha afección se podía asemejar con la disnea, la que pudo producir experimentalmente en perros haciéndoles una sección medular alta.

Así nació la teoría que dominó el pensamiento médico hasta después del Renacimiento, en el sentido de que sería una alteración de la inervación la causa del mal. Con la muerte del pergamino pareció extinguirse la capacidad creadora de la medicina helénico-romana.

Entre las escasas figuras posgalénicas de relieve cabe destacar al nómada-bizantino Celio Aureliano (350-400 dC), expositor de la escuela metódica de Asclepiades y Sorano. En su obra "De morbis autis et chronicis" trató entre muchos otros males el tema del asma, al que distinguió entre otras disneas como la neumonía, la ortopnea y otros padecimientos, aconsejando medidas terapéuticas y profilácticas interesantes."

De los escritos médicos de la Alta Edad Media, vale la pena mencionar el testimonio por Musa ben Maimun (Maimónides, 1135-1204), médico-filósofo-talmudista nacido en Córdoba-España.

Escribió un tratado de medicina compuesto por 10 volúmenes, siendo el primero de ellos dedicado al asma, abordando, más que su sintomatología, su tratamiento. Prestó sus jerarquizados servicios médicos al Sultán Saladino de Egipto, quien padecía de rinitis y de asma alérgicas. El Tratado de Asma contiene las cartas que Maimónides dirigió a Su Alteza, escritas en árabe, realizando sus advertencias y recomendaciones para tratar la enfermedad que le aquejaba. Su mérito radica en haber hecho hincapié en: el efecto del clima, la necesidad de respirar el aire más puro posible, la dieta, la regulación de los esfuerzos físicos, la prudencia en el uso de medicamentos, una vida de hábitos sanos y el control de las emociones. Sentó la pluralidad etiológica, destacando la existencia de alérgenos inhalantes, ingestantes y contactantes, anticipando el camino de la profilaxis de exposición. (61-62-63).

Al margen de los conceptos expresados por Maimónides, no hubo registro de nuevos aportes que modificaran sustancialmente las ideas existentes en torno al asma.

La ciencia médica despertó de su prolongado letargo recién en los siglos XVI y XVII. Su adalid, el suizo Theophrastus Bombast von Hohenheim (Paracelso, 1493-1541), comenzó a rebelarse contra el dogmatismo galénico y rechazó la patología humoral. Su pensamiento organístico o panvitalista tuvo otro precursor en el belga Johann Baptista van Helmont (1577-1644). En la "Opúscula medica inaudita" describió la disnea "nerviosa" o espasmódica como una entidad independiente; dividió el asma en seco y húmedo (con secreción), y sospechó que el trastorno residía en los bronquiolos terminales.

En pleno siglo XVII, la nueva concepción paracelsista y helmontiana influyó en los médicos posteriores. Al final de la misma centuria, Thomas Willis (1622-1675), anatomista inglés y asmático, aclaró el concepto galénico y sin descartar la existencia de un tipo de asma ocasionado por el tapón mucoso y el edema de las paredes bronquiales, insistió de un modo concreto sobre un segundo tipo de naturaleza espasmódica, estableciendo que las alteraciones nerviosas traducidas en calambres o contracciones originan este asma "convulsivum." <sup>(64-65).</sup>

Por lo tanto, a van Helmont y a Willis, les cupo el mérito de la diferenciación definitiva entre el asma "espasmódica o convulsiva" y las restantes formas de disnea. John Floyer (1649-1734), inglés y asmático al igual que Willis, adhirió a la tesis de éste, al tiempo que entrevió no muy claras alteraciones humorales. En su clásica obra "A treatise of the asthma" atribuyó por primera vez el asma espasmódica a una contractura de las fibras musculares de los bronquios.

Merced al gran anatomista alemán Franz Daniel Reisseisen (1773-1828), la esplacnología se enriqueció con el descubrimiento de la musculatura bronquial, lo cual determinó un importante avance en el conocimiento del asma.

El célebre francés inventor del estetoscopio, René Théophile Hyacinthe Laënnec (1781-1826), uno de los protagonistas del origen del método anatomoclínico, retomó las ideas existentes y arribó a la conclusión de que el asma es una afección neurógena, puesto que no halló lesiones anatómicas en los asmáticos autopsiados. Tras él, varios son los que con sus experiencias reforzaron dicho concepto; Ch. J. B. William (1805-1889) obtuvo la contracción bronquial por medio de la corriente galvánica; Fr. A. Longet (1811-1871) provocó el broncoespasmo excitando el neumogástrico con una corriente eléctrica, mientras que Paul Bert (1830-1886) logró la dilatación bronquial tras la sección del vago; por su parte, Ch. E. Francois Franck demostró el carácter sensitivo del nervio aludido y la existencia de modificaciones respiratorias por excitación del cabo central del X° par.

A esta teoría del broncoespasmo le valió la objeción de por qué la disnea es respiratoria, siendo que el espasmo bronquial no cede durante la inspiración. Antón Biermer (1827-1892) respondió a esto diciendo que, la misma espiración presionando al pulmón, sumaba sus efectos a los del espasmo bronquial, razón ésta de la disnea espiratoria. El autor, dejó valiosas descripciones clínicas de la crisis asmática en las que puso de manifiesto las alteraciones auscultatorias del ataque asmático, tildándolas de fluxionarias. Armand Trousseau (1801-1867), el memorable clínico francés enfermo de asma, se plegó a esta opinión. En sus escritos admitió que él tenía ataques de asma ante la presencia de flores violetas, anotó el hecho, que hoy explicamos con nuestros conocimientos sobre la alergia polínica. Sin embargo, relacionó el asma con la dermatosis y la gota, relatando casos

clínicos en los cuales había alternancia sindromática. La teoría de la "diátesis artrítica" afirmada por Trousseau, ganó más adeptos, entre ellos J.I.J. Döllinger (1770-1841) y L. Waldenburg (1837-1881); Así fueron aumentando los observadores que hallaron eccematosos, litíasicos, reumáticos, etc., que a la par padecían de asma y, a la inversa, asmáticos en quienes la desaparición de sus ataques era sucedida por la aparición de algunas de las afecciones señaladas.

A.Wintrich (1812-1882) y H. Von Bamberger (1822-1888), dudaron del broncoespasmo como causal de la disnea respiratoria, disconformes con la explicación de Biermer, de que la misma espiración, al comprimir el pulmón, sumaba sus efectos a los de la contracción bronquial. Crearon así la teoría del calambre diafragmático, basada en que durante el ataque de asma se observa descenso del borde inferior pulmonar y aumento del volumen del pulmón. Según Wintrich, el diafragma, por acción de un reflejo neumobulbar, entraría en contractura, siendo su consecuencia la disnea espiratoria. Los estudios realizados por Beer en 1892, demostraron que las suposiciones de Wintrich eran inexactas, ya que el descenso diafragmático es motivado por el aumento volumétrico del pulmón.

Uno de los aspectos del mecanismo del asma quedaba confirmado para siempre: el espasmo bronquial. Pero, si bien explicaba la disnea, no dilucidaba el problema de la secreción que acompaña a los ataques de asma y como manifestación ulterior de los mismos. <sup>(66-67).</sup>

P.Bretonneau (1778-1862), E.H.Weber (1795-1878) y L.Traube (1818-1876) sostuvieron que el asma era una neurosis de tipo exudativo. Weber explicó esta exudación como una consecuencia de la vasodilatación bronquial que acompaña al ataque de asma.

A esta altura, los autores ya no se conformaban con tratar de dilucidar el mecanismo del asma, sino que comenzaban a indagar sobre su etiología. Por ello, cobró gran importancia la obra escrita en 1864 por Henry Hyde Salter bajo el título "On asthma, its pathology and treatment", para muchos el tratado de asma más acabado de cuantos vieron la luz en el siglo XIX. En él, se enumeran varias causas que originan la enfermedad como consecuencia de la susceptibilidad o sensibilidad del organismo frente a determinados elementos o sustancias. Sus sólidos fundamentos clínicos y el fruto de sus numerosas observaciones se vieron reflejados en la minuciosa y precisa publicación, arribando a conclusiones tales que, muchas de ellas, necesitaron más de medio siglo para su comprobación.

En relación con la patogenia del asma, Salter dijo que el acceso se origina por la contracción espástica de los músculos circulares existentes alrededor de los bronquios finos, contracción debida a la acción excitomotora o refleja. A la vez, sostuvo que determinados alimentos, inofensivos para la mayoría de los sujetos, pueden resultar agentes asmógenos por excitación del sistema nervioso sensitivo pulmonar. Comentó: "Creo que si la introducción de un alimento en el tracto digestivo es capaz de dar lugar a un espasmo bronquial, se debe a la presencia en el interior de los vasos pulmonares de las sustancias absorbidas en el estómago y en los intestinos."

Entre los factores etiológicos, hizo hincapié en la herencia, cuya importancia consiguió evidenciar en el 40% de sus casos atendidos. Como desencadenantes mencionó al frío, al viento, a la niebla, al calor, a los cambios climáticos bruscos, a la risa, a los esfuerzos físicos, a los alimentos de difícil digestión y a las indigestiones en general. Del mismo modo, reconoció que las emanaciones o efluvios de ciertos animales podrían ser responsables del mal.

Realizó una fina descripción de su propio asma, producto de la sensibilización al gato y demostró que la fricción de un punto cualquiera de su epidermis con una piel de gato determinaba la aparición local de una verdadera urticaria. En otras palabras, ensayó una genuina prueba cutánea, adelantándose a lo consabido en su época. Este tipo de provocación le permitió saber que asimismo era sensible al conejo. Ulteriormente observó que otros asmáticos también registraban sensibilidad a otros animales, entre los que enumeró al caballo, al perro, a la oveja, al cobayo, a la vaca, a la liebre y hasta en raros casos al ciervo. Volviendo a los alimentos específicos, citó a los guisantes y a las habas, y dio un ejemplo evidente de asma infantil atribuible a la leche de vaca.

Entre otras recomendaciones terapéuticas, criticó severamente el uso del opio y sus derivados en los accesos asmáticos, ya que "... por el letargo que produce, baja la sensibilidad del paciente e impide que sienta en forma rápida la percepción de su dificultad respiratoria que es el estímulo natural para producir un esfuerzo respiratorio extra que le es necesario para restaurar el balance."

No más que hasta aquí se ha querido recordar los sucesos más importantes de la historia del asma dejando atrás la evolución del pensamiento médico a lo largo de 2500 años.

El siglo XX abrió una nueva etapa con el nacimiento de las especialidades noveles como la inmunología, la alergia, la genética y la biología molecular. Estas, a la par de la ingeniería médica, delinean rumbos precisos con la ayuda de modernas y revolucionarias metodologías, poniendo debida luz a muchos aspectos controvertidos del asma, resaltando la importancia del fenómeno inflamatorio crónico de la mucosa bronquial.

### 1.5. Polinosis

Entre las enfermedades atópicas inducidas por aero-alergenos, la polinosis aparece histórica y clínicamente como un paradigma. Las primeras sospechas a propósito de que ciertas especies vegetales pueden alterar la salud del hombre se remontan al siglo I de la era cristiana. En aquel entonces, Dioscórides y Plinio sentaron la opinión de que los plátanos podían ejercer cierto daño sobre sus congéneres. Al respecto, en las obras "Historiarum mundi" y "Discorsi nelli sei libri de Dioscóride", publicadas en 1562 y 1568, respectivamente, pueden leerse descripciones que ameritan la capacidad de observación de ambos naturalistas.

Transcurrieron 15 siglos sin que escrituras concretas delataren la existencia del mal, que hasta ahí se conocía como "Fiebre de la rosa". Sin embargo, los médicos de la Edad Media no ignoraban que ciertos individuos padecían de graves accesos de estornudos o de disnea ante la presencia de determinadas flores, arbustos o árboles.

El interés renacentista por los fenómenos naturales y su capacidad de reflexión quedó reflejado en textos posteriores. De tal forma, en 1565, Leonardo Botallo (Botallus, 1519-1587), cirujano de Pavia, documentó los trastornos clínicos originados por el aroma de la rosa, consistentes en dolor de cabeza, estornudos, comezón y secreción muy intensa de la nariz ("Commentarioli duo alter de medici, alter de aegroti munere." Lyon, p. 25, 1565). Tras él, en 1607, el flamenco van Helmont citó el caso de un asma estacional recurrente sólo en verano, llamando su atención la presencia de la misma enfermedad en otros familiares del paciente estudiado ("Opera Omnii". Nov. Francofurti, p. 346, 1607). A esta altura se hallaron 11 casos descritos de "Fiebre de la rosa" periódica o acompañada de asma.

Konrad Víctor Schneider hizo sus aportes al estudio de todas las formas de rinitis con la demostración de que el catarro nasal era debido a una exudación de la mucosa, y no a una secreción del cerebro ("De catarrhorum et de speciebus catarrhorum". Libri V, Wittebergae, 1662).

A lo largo del siglo XVII aparecieron, testimonios de catarros estacionales, atribuyéndosele al perfume de las rosas la causa de los síntomas. Dichas descripciones pertenecieron a Joannes Nicolaus Benningerus ("Observationes et Curationum Medicuaium." Centuriae V, Montisbeliard, 1673), Valeriano (1678), Samuel Ledelius ("Odor rosarum visui nocivus miscellanea curios." Decurinae II, Norimbergae, 1684 y 1691), Hunerwolff (1686), entre otros.

Jacob Constant de Rebecque (1645-1732), médico suizo que sufría de catarro estacional, observó, en 1691, que si bien la enfermedad podía ser realmente provocada por el aroma de las rosas, no era su verdadera causa una "antipatía" que actuara de modo regular durante todo el año, y afirmó: "creo más bien que las rosas emiten algo que irrita mi nariz sensible y, de forma incesante, pero no advertida, de agujijones, provoca una secreción del color del agua ..." ("Observationes rarissimae et curationes insignes." Atrium medicinae Helvetiorum, Obs. 92, p. 150, de Tournes, Genf 1691).

Viet Riedlin (1656-1724), médico alemán, hizo 2 aportes relacionados con el tema ("Linearum Medicarum anni Augustae Vindellicorum." 1695 e "Ites medicum." Augsburg, p. 25, 1702).

En la segunda publicación apuntó una especie de prueba del polen: para verificar lo declarado por un enfermo, le entregó durante el camino, sin advertirle su contenido, una bolsa de rosas; pronto se manifestaron las molestias descritas.

Hasta fines del siglo XVIII dominó el período de las descripciones casuísticas de esta "curiosa enfermedad" relacionada con las estaciones del año, en la cual llamó más la atención, como causa provocante, el intenso aroma de la rosa que las hierbas menos vistosas de los prados.

El paso siguiente correspondió a la descripción clínica exacta, y comenzó con la publicación del primer trabajo de Bostock en 1819 ("Case of a periodical affection of the eyes and chest." Médico-Chirurgical Transactions, London, 10, p. 161, 1819).

John Bostock (1773-1846), célebre médico londinense, profesor de fisiología y catedrático de las universidades de Liverpool y de Londres, escribió mucho y con reconocida autoridad, y hasta llegó a traducir las obras de Plinio. Fue un polínico por más de 30 años llegando a describir detalladamente y con sutilezas las peculiaridades de su enfermedad.

Hasta entonces, toda clase de estados nasales agudos y crónicos se conocían por el término general de "catarro" (aún empleado en el lenguaje cotidiano). Fue Bostock quien logró reconocer un grupo diferenciado cuyos síntomas aparecían con regularidad y sólo en verano; sosteniendo que se trataba de una enfermedad nueva y rara a la vez, la denominó "catarro nasal periódico", que muy pronto se conocería como "catarrhus aestivus" (catarro estival de Bostock).

Nueve años más tarde, en un segundo trabajo donde refirió 28 casos observados de esta nueva enfermedad ("Of the catarrhus aestivus or summer catarrh" Med. Chir. Transact., 14: 437, 1828), le dio el nombre definitivo de "hay fever" o "fiebre del heno" y sugirió que la enfermedad se dividía en 4 variedades según fuera la nariz, los ojos, las fauces o los pulmones, el órgano más inmediatamente afectado. Atribuyó sus causas al efluvio del heno,

al calor y a la acción de los rayos solares. Sin embargo, aún cuando como término técnico no concuerda con los hechos reales, es decir que, a pesar de no ser una fiebre, ni el heno su única causa, el mismo tuvo la consagración del uso y todavía se lo emplea, especialmente en la literatura anglosajona. Como sea, pertenece a Bostock el privilegio de haber elevado esta afección a la categoría de entidad médica definida.

A estos primeros trabajos le sucedieron otros en Inglaterra, Francia, Suiza e Italia.

En 1828, John Mac Culloch sostuvo que la fiebre del heno era producida por los invernaderos, y por los campos de heno, según la creencia popular (“*Essay on the Remittent and Intermittent Diseases*”. London, 1, p. 394, 1828).

Pero, W. Gordon, en 1829, fue de la opinión de que el asma que se producía no era por el heno, sino más bien por el aroma de las hierbas en floración, particularmente de la gramínea *Anthoxanthum odoratum* (grama de olor). Propuso, por lo tanto, la denominación de “grass asthma” (asma de hierbas o gramíneas) como más apropiada (“*Observations on the Nature, Cause and Treatment of Hay Asthma*.” London Med. Gaz., 4, p. 266, 1829).

En 1831, el inglés John Elliotson (1791-1868), fue el primero en insinuar que el catarro estacional no depende del heno, sino que tiene su origen en las flores frescas de las praderas, y con probabilidad la causa sería el polen, pero no dio ninguna prueba para confirmar su presunción (“*Hay fever*.” *Lancet*, ii, p. 370, 1830. “*Catarrhus aestivus or hay fever*”. Lond. Med. Gaz., 12, p. 164, 1833).

En América del Norte, G.B. Wood describió un caso de bronquitis periódica que se reproducía cada año en agosto (“*Practice of Medicine*.” Philadelphia, p. 753, 1849).

Mientras tanto, Swell fue el primero, según Koessler, en hacer la descripción distintiva de 2 tipos de fiebre de heno: la estival y la otoñal (“*Diseases of the Chest*.” New York, 1852).

Promediando el siglo XIX, cobró impulso una nueva modalidad de estudio que consistía en la recopilación estadística de los informes disponibles de series numerosas de casos, resumidos y archivados por medio de cuestionarios. Su precursor fue el farmacólogo y profesor de la Universidad de Giessen-Alemania, Philipp Phoebus (1804-1880), quien, valiéndose de esta novel metodología, envió un modelo de cuestionarios a sus colegas solicitándoles datos sobre la frecuencia, incidencia, factores hereditarios, etc., del catarro estival. Basándose en el estudio ulterior de dichos cuestionarios, fue el primero en publicar una monografía sobre la enfermedad, donde si bien trató científicamente todas las causas posibles, no se creyó en situación de dar una opinión definitiva. (“*Der typische Fühsummerkatarrh oder das sogenannte Heufieber, Heuasthma*.” Rieker, Giessen, 1862). Sin embargo, asignó un papel preponderante en la etiología a factores meteorológicos y al ozono, formulando una teoría muy compleja denominada “meteorológica”. Creyó que el calor estival, el polvo, la luz, los cambios de temperatura y el desarrollo exuberante de la vegetación durante las primeras elevaciones térmicas al iniciarse el verano estaban relacionados con la producción de los ataques del catarro del heno.

En los Estados Unidos, el neurólogo George Millar Beard (1839-1883) emprendió un estudio similar de datos recogidos en cuestionarios y publicó sus resultados en una monografía (“*Hay Fever of Summer Catarrh: Its Nature and Treatment*.” Harper, New York, 1876).

Fiel a su doctrina de la neurastenia, formuló la llamada “teoría neurótica” y aseveró que la fiebre del heno es, esencialmente, una neurosis ... “ya que la enfermedad no es debida a

ninguna causa específica animal ni vegetal, como se ha supuesto, nada específico se puede encontrar en ella.”

Atribuyó, por ende, la producción del catarro, particularmente, al clima excitante de las grandes ciudades que entonces se levantaban, a la vida opulenta y al ajeteo diario, creyendo que los estratos sociales elevados, con un sistema nervioso especialmente irritable, son presa fácil para el desarrollo de la enfermedad.

Lamentablemente, esta insólita interpretación sobrevivió muchas décadas y documenta la soberbia académica de algunos.

En plena etapa de investigación de las causas determinantes surgieron nuevas teorías que, entre controvertidas y erróneas, se agregaron a las ya descriptas.

Así, la escuela de París consideró a la “diátesis artrítica” como la causa de la enfermedad. Algunos autores, estimulados por los deslumbrantes descubrimientos de Pasteur y de Koch, sospecharon que la fiebre del heno podría ser de naturaleza microbiana. De hecho, el fisiólogo y físico alemán Hermann von Helmholtz (1821-1894), víctima de esta afección, creyó hallar en su secreción nasal infusorios (o vibriones), y los supuso causa de su enfermedad; como en aquellos tiempos se investigaba la acción de la quinina sobre tales organismos, la ensayó en sí mismo aplicándosela en la mucosa nasal con aparente resultado satisfactorio, ya que los gérmenes desaparecieron y su catarro mejoró. Merced a esto, fundó la “teoría bacteriológica” o “infecciosa” que pronto encontró apoyo en Kart Binz (1832-1912), farmacólogo de Bonn. Este describió microorganismos similares y obtuvo buenos resultados mediante el tratamiento con quinina (“Virchow’s Arch.”, 16, 101, 1869). En 1995, un autor norteamericano reverdeció esta teoría involucrando a los virus como responsables de las enfermedades atópicas.

No obstante los hallazgos que posteriormente se operaron en contraposición a la teoría bacteriológica, pudo ésta afirmarse por un tiempo, especialmente en Alemania. En 1901, todavía se incriminaba a otros microorganismos como productores de este morbo; así lo testimoniaron, B. Herman y T. Matzuschita (“Zur Aetiologie des Heufiebers.” Ztsch. F. Hyg., 1901).

Cabe también agregar que en ese ínterin, el descubrimiento de las toxinas introdujo una nueva moda: la búsqueda de dichas proteínas que, se presumía, eran la causa de aquellas enfermedades que no se podían atribuir a las bacterias. Nuevamente la fiebre del heno, también aquí, fue objeto de esas sospechas y de estudios interesados.

En las últimas décadas del siglo pasado surgió la “teoría refleja”, que tuvo como cultores a W.H.Daly, de Pittsburg, y a Wilhelm Hack, de Friburgo. En forma simultánea hicieron avanzar la idea de que la fiebre del heno se debía a condiciones patológicas de la mucosa nasal; ciertas áreas hiperirritativas de ella eran las responsables de la iniciación del cuadro, y el tratamiento tenía que ser dirigido localmente a la región afectada, consistente en la cirugía del tabique, la resección del etmoides, la galvanocaustia, la cirugía radical de las fosas nasales, y, más modernamente, la sección o neurectomía del nervio vidiano. (Que preconizó entre nosotros el Prof.Dr.A.Terzián).

Ninguna de estas hipótesis pudo ser finalmente confirmada. La fiebre del heno, en el último cuarto de siglo, fue considerada como un serio problema y el número de enfermos crecía notablemente. A partir de septiembre de 1874, comenzó a actuar en Bethlehem (New Hampshire) la “U.S. Hay Fever Association”, organismo nacional para la lucha contra el mencionado mal. Esta Sociedad estaba integrada por enfermos de dicho proceso y se

constituyó con el propósito de difundir entre sus miembros los medios de aliviarse. Tiene notorio interés el párrafo siguiente que pertenece al artículo 5º de su Constitución: “Es un deber de todos los socios referir, para que sea registrado en secretaría, el hallazgo de cualquier remedio, sistema de alivio o localidad exenta que llegue a su conocimiento.”

Una nueva etapa se precipitó con la figura más descollante en la historia de la polinosis, como fue sin duda, el escocés Charles Harrison Blackley (1820-1900), quién a semejanza de otros investigadores de la fiebre del heno sufrió largamente esta enfermedad.

Sus experiencias minuciosas, basadas en la recusación de todas las posibles teorías enunciadas y de las sustancias consideradas como responsables, tales como el ácido benzoico, la parafina, el trébol, la menta o hiedrabuena, el aceite de amapola, el espliego, el ozono y el polvo de la calle, determinaron que fuera el polen la verdadera causa de la enfermedad estacional. Sus conclusiones surgieron en virtud de una larga serie de laboriosas investigaciones desarrolladas durante más de 20 años, a partir de 1856. La mayoría de sus hallazgos fueron publicados en su libro “Experimental Researches on the Cause and Nature of Catarrhus Aestivus (Hay Fever or Hay Asthma).” Ed. Bailliere, Tindall & Cox., London 1873).

Su primera sospecha tuvo un origen casual cuando, al sacudir unas flores en su cuarto, estas soltaron una nube de polen que pocos minutos después lo hicieron estornudar violentamente. A partir de esto inventó toda clase de pruebas ingeniosas para verificar su importancia, y a pesar de la cooperación de sus pacientes, realizó la mayor parte de sus experimentos en su persona. Así, se depositó polen en la nariz, desencadenándose un acceso; hizo una prueba en una época alejada de la polinación de los campos de hierba, y logró producirse igualmente el acceso; practicó la primera prueba cutánea con polen logrando desencadenar una típica roncha urticariana “in situ”. Documentó su experimento de este modo: “En el verano de 1865, sufriendo aún mi habitual ataque de fiebre del heno, me apliqué sobre el centro de la cara anterior del antebrazo todo el polen que se obtuvo de 2 anteras de *Lolium italicum*; dicho punto había sido escarificado previamente de la manera habitual en que esto se realiza para practicar la vacunación. Se cubrió la región con un trozo de guatapercha fina y se mantuvo fijo todo ello mediante una tira de emplasto adhesivo. El centro del otro antebrazo fue tratado de idéntica manera, salvo que no se puso polen. La escarificación con la lanceta levantó un habón semejante a los de urticaria o a los producidos por el contacto de ortigas. Pocos minutos después de la aplicación del polen comenzó a picar intensamente toda la región; los bordes de las escarificaciones y las partes más próximas comenzaron a hincharse, pero todo ello daba la impresión de que no era debido a ninguna acción sobre el cutis vero.”

Exponiendo a la atmósfera portaobjetos cubiertos con glicerina, y contando luego en el microscopio el número de granos de polen, hizo importantes observaciones. Pudo demostrar que la intensidad de los síntomas de su propio catarro, así como de otros enfermos, dependía enteramente del número de granos de polen vistos en el portaobjetos. Probó que el polen abundaba más en el campo que en la ciudad, y más en las afueras de ésta que en el interior. En los días tranquilos, fríos y nublados encontró menos polen que en los calurosos, de sol brillante e intenso viento.

Los flemáticos habitantes de Manchester, donde ejerció Blackley, se asombraron de ver a un circunspecto médico remontar barriletes con vidriecitos pegados a la cola. Así, utilizando una cometa, logró elevar los portas vaselinados a alturas de más de 500 metros, y halló en

ellas gran cantidad de polen, lo que sin duda era debido a las fuertes corrientes de aire que lo transportaban. Trazó curvas estacionales, mostrando las variaciones halladas día por día y los cambios durante cada estación.

Recogió polen de toda clase de hierbas y de numerosas plantas, probando la eficacia de cada una de ellas aplicándola sobre la mucosa nasal y conjuntival. En gran número de enfermos de fiebre del heno obtuvo siempre el mismo resultado y sólo los individuos que no la sufrían, toleraron sin presentar ningún síntoma, la aplicación del polen.

La ineficacia de las otras causas sospechadas quedó demostrada en cuidadosas experiencias de control.

Con todo derecho introdujo Blackley el concepto de “catarro del polen”, para no emplear el inadecuado fiebre del heno.

Su obra, en realidad casi completa, necesitó tan sólo algunos refinamientos diagnósticos y de tratamiento específico.

Al mismo tiempo, en otras latitudes, Morrill Wyman, en 1872, sientro profesor de Harvard, realizó experiencias concluyentes demostrando que los pólenes de la Ambrosia y de la Artemisa eran la causa más importante de la variedad otoñal de la fiebre del heno, hecho que documentó en su libro “Autumnal Catarrh (Hay Fever).” New York, Ed. Hurd & Houghton, 1872.

Wyman, durante años sufrió de polinosis en agosto y septiembre, al igual que su hijo y su hermano. Cada año, los 3 habían encontrado cierto alivio en Bethlehem, en las Montañas Blancas. No se supo exactamente por qué razón sospechó del polen de la Ambrosia y de la Artemisa. Posiblemente observó que, mientras abundaban en su tierra, eran escasas en Bethlehem. Un día caluroso de agosto de 1870 llenó una pequeña caja de dichas plantas, antes de dejar su casa en Boston. Después que él y sus familiares pasaron en las montañas una temporada suficientemente larga para sentirse aliviados, cada uno aspiró un poco del contenido de la caja. Volvieron a aparecer los síntomas y lo mismo les ocurrió a otros voluntarios. Pareció una prueba asaz terminante contra los pólenes.

Pero Wyman fue lo suficientemente cauto como para admitir que el catarro puede ser debido a otras influencias, tales como otras plantas, polvo, emanaciones animales, alimentos y gérmenes. Además, demostró la predisposición familiar a esta enfermedad.

La publicación de Wyman, en 1872, obligó a Blackley a salir de su existencia enclaustrada, ya que hasta entonces no se le había ocurrido escribir respecto de sus notables hallazgos. Para él, Wyman era un advenedizo que; con mucho menos y en breve tiempo, había llegado a conclusiones que, el propio escocés, había consagrado 20 años de su vida a demostrar. Por fin, hizo valer sus esfuerzos y publicó su importante obra en 1873.

No obstante, esta “teoría del polen” fue objeto, durante los 30 años siguientes, de una controversia encarnizada, principalmente por parte de los defensores de las teorías anteriores que habían perdido vigencia.

“Vanitas vanitatum, et omnia vanitas.” (Eclesiastés, I, 2).

La discusión sobre la etiología fue situada finalmente, a satisfacción de casi todos, por la obra de William Philipps Dunbar (1863-1922), con su monografía de 1903 (“Zur Ursache und Spezifischen des Heufiebers.” Oldenbourg, Munich, 1903). Junto con Carl Prausnitz, ambos polínicos, practicaron gran número de experiencias, a partir de 1902, en si mismos y en otros enfermos, con polen de distintas plantas. De acuerdo con las experiencias de Blackley, produjeron por la aplicación conjuntival o nasal de ciertos tipos de polen, de modo

regular y aun en épocas que no correspondían a esta enfermedad, el catarro típico. La ingestión del polen fue ineficaz, pero las fricciones de la piel intacta con emulsiones de polen, o su aplicación sobre las mucosas, provocaron un intenso prurito y eritema. La inhalación de pólenes fue seguida de ataques asmáticos. La inyección subcutánea de soluciones de polen produjo a los pocos minutos un eritema con formación de pápulas, urticaria generalizada, edema de Quincke y hasta un asma grave y persistente. El propio Dunbar sufrió después, durante varias horas, un asma alarmante con síntomas de choque. El último período de la historia de la polinosis, en el que nos hallamos todavía, comenzó en 1911 con L. Noon y J. Freeman por un lado, y Kart Koesler por el otro, quienes iniciaron tratamientos con extractos acuosos de polen mediante inyecciones subcutáneas. Correspondió a Warren T. Vaughan la designación del vocablo “polinosis” para indicar aquellas afecciones alérgicas en las que el polen es el agente sensibilizante y desencadenante de la crisis. La Biología Molecular ha abierto nuevos caminos para la investigación básica y aplicada de los pólenes y de los mecanismos fisiopatogénicos de su accionar en el ser humano atópico, y, posibilitó que el Dr.K.Mouchián aislara los péptidos 33 y 38 del polen de la gramínea *Lolium perenne* y lograra el mismo éxito inmunoterapéutico que con el extracto del polen total. (68-69-70).

#### 1.6- La Inmuno-alergia en la Argentina.

Como bien decía Guido Ruiz Moreno en su artículo de la Prensa Médica Argentina, no es fácil establecer quien fue en nuestro país el primero que pensó o asoció claramente los fenómenos alérgicos e inmunológicos con la clínica humana. En este período de la Historia de la Medicina Argentina, las incursiones médicas, tanto diagnósticas como terapéuticas, constaban esencialmente de observaciones prolijas, muchas de ellas ampulosas, abundantes en relatos más anecdóticos que científicos, pero que aún mantienen el valor de una observación clínica (cuya interpretación puede discutirse) realizada con toda dedicación y con los buenos deseos de aportar datos positivos para la mejoría del enfermo.

En este período que Ruiz Moreno llamó de “pre-alergia”, de destacaron las colaboraciones de Castex y de Vitón sobre el asma, aunque fuera considerada como de etiología infecciosa bacteriana para el primero y tuberculosa para el segundo.

Luis Ayerza (1894-1961) fue el primero que describió en 1921 en los Archivos de las Efemérides del Hospital Ramos Mejía, algunas consideraciones sobre el asma causada por la inhalación del polvillo del cuero, señalando que podría encuadrarse dentro del concepto de “anafilaxis humana o alérgica”.

Este autor escribió en 1923 sobre la Fisiopatología y la Farmacoterapia del asma bronquial; en 1924, sobre “La tensión venosa periférica: sus modificaciones patológicas y su valor pronóstico”; en 1926, enfatizó sus inquietudes sobre la función pulmonar, con su “Estudio anatomoclínico de la esclerosis del pulmón”.

En 1921, V. Barbagelata, precozmente desaparecido en 1940, tal como lo señala La Semana Médica en su obituario de la página 240 de ese año, aseveró las opiniones de Luis Ayerza en su Tesis de Doctorado.

Florencio Bazán (1890-1969), pediatra por vocación e infatigable trabajador, publicó entre sus numerosos trabajos en La Semana Médica, tomo II, página 1184, del año 1922, “Las

relaciones del asma con la anafilaxia,” y en 1923, “La anafilaxia en la clínica infantil” y “Los trastornos digestivos y nutritivos en la alimentación del lactante”.

Sus incursiones en lo que llamamos Inmunología Clínica, se ven reflejadas en sus vastas publicaciones sobre infectopatías microbianas, encefalitis postvaccinal y urliana, “El tratamiento seroterápico de la difteria en el niño” y “La reacción de Dick en el curso de la escarlatina”, estos últimos en 1941. En 1942, empleó exitosamente la sulfamida en la meningitis a meningococo.

Caupolicán Castilla (1887-1971) también aportó su colaboración al desarrollo de la especialidad desde su óptica de pediatra experimentado. En 1918, publicó en la Revista de Ciencias Médicas, I, n° 5, su trabajo sobre “Diátesis espasmofílica y su tratamiento con el sulfato de magnesio por la vía subcutánea”, que, simbólicamente preanunciaba su inclinación hacia los cuadros de alergia clínica que luego desarrolló más exhaustivamente.

En 1935 publicó en la Revista Médica Latinoamericana, vol. XX; pág. 1204, “Enfermedades alérgicas, asma, rinitis y polinosis”, y en ese mismo volumen, pero en la página 1331, “Asma, síndrome alérgico: consideraciones sobre su etiología”, juntamente con O. R: Montanaro.

En 1937, su trabajo sobre “Consideraciones sobre los tests diagnósticos con alergenos” apareció en La Prensa Médica Argentina, vol. XXIV, pág. 2407 y en La Semana Médica, vol. I, pág 1370. Dos años más tarde, La Revista Médica Latinoamericana, en su vol. XXV, pág. 171, publicó su “Organización de un servicio de enfermedades alérgicas en la infancia”. En 1940, en los Anales del Hospital de Niños e Instituto de Puericultura de Rosario, pág. 165, presentó su “Asma infantil: clínica y alergia”. “Clínica y alergia” apareció publicado en la Revista Médica Latinoamericana, vol. XXVII, pág. 858 del año 1942.

En 1945, el “Problema social del asma”, vio la luz en las páginas de La Semana Médica, vol. II, 429 y en El Día Médico, XVII, 1110, concluyendo sus aportes más destacados ese año, con “El ejercicio en el asma”, publicado en Kinesiología, VII, 209.

En 1946, presentó su trabajo sobre “El asma, causa de invalidez” en la Segunda Conferencia para el Bienestar del Lisiado, en Buenos Aires (pág. 113) y de alguna manera culmina sus aportes a la especialidad con la “Sensibilización a las soluciones de estreptomina” y “Alergia en la Infancia” aparecidos en Alergia, II, pág. 32 y 70, del año 1948.

Juan Carlos Tassart, fallecido en 1973, fue un tisioneumonólogo, con breves incursiones en la Alergología Clínica de la década de 1920. Entre sus muchas publicaciones sobre la tuberculosis y otros temas de Medicina Interna, Tassart expuso sus opiniones acerca de la etiopatogenia y el tratamiento del asma bronquial en la Revista Médica Latinoamericana, XII, 144, 1927, y en La Semana Médica del mismo año.

José María Macera y Maria Teresa Vallino, ambos pediatras, publicaron numerosos trabajos sobre su especialidad, pero merecen destacarse “Las cutirreacciones proteínicas en el asma infantil” en 1928, y el “Shock anafiláctico mortal por inyección de suero antidiftérico” en los Archivos Argentinos de Pediatría en 1931.

En 1924, Macera publicó con mucha anticipación para su época “La esclerodermia generalizada en forma progresiva” y Vallino, por su parte, describió en 1934 en La Semana Médica, tomo II, pág. 1073, “Las características radiológicas de la hipertrofia del timo”.

Mariano J. Barilari, que escribió numerosos artículos sobre medicina interna (semiología y biotipos), parasitología, farmacología, (clásica y biológica empleando extractos de tejidos) y

psicología, publicó en 1920 en La Semana Médica, “Algunas contribuciones sobre la etiopatogenia del asma y su tratamiento”.

Domingo Fossati y David Barilari publicaron en la Revista Médica de Córdoba en 1931, la “Influencia de la combinación efetonina-hipofisina en el shock asmático”. Fossati e Italo Basso expusieron en 1934 y 1935 en las Actas de las Reuniones Científicas del Hospital Italiano, y en La Semana Médica, respectivamente, la utilidad del “Absceso de fijación en el asma”.

Diego J. J. Martínez publicó en 1938 en La Semana Médica el “Tratamiento del asma por las instilaciones bronquiales del lipiodol”. Este autor juntamente con Joaquín D.A. Martínez, describieron exhaustivamente en La Semana Médica, en 1946, las características del “Infiltrado de Löeffler”. Francisco Martínez elaboró con Isaac Berconsky su clásico libro de “Semiología del aparato respiratorio”, en 1939, mientras que el primero juntamente con P. Cossio y C. Donovan se adelantaron en el tiempo al hacer conocer en 1933 su “Cinerradiograma de la danza bronquial”.

Quedan por analizar los aportes realizados por Mariano Rafael Castex (1886-1968) a esta especialidad, que, como era previsible, no escapó a su pujante personalidad y ciclópea obra. Destacamos solamente sus trabajos con Ruiz Moreno y Solari sobre “La Flora Alergógica Polínica,” y sobre la “Toxemia alérgica” publicados en los Anales del Instituto de Investigaciones Físicas aplicadas a la Patología Humana (I, 167, 1940) de la Academia Nacional de Medicina y en la Sociedad para el Estudio de la Alergia (1940); L’asthme bronchique (1932) en el Iº Congreso Internacional del Asma, en Le-Mont-Dore París y La insuficiencia respiratoria en La Prensa Médica Argentina (1935) y en El Día Médico (VII, 307, 1934); Las manifestaciones alérgicas del aparato urinario (1939); La seroterapia de la escarlatina juntamente con H. D. Gonzalez aparecido en La Prensa Médica Argentina de 1927 (XIV, 649); Las glomerulonefritis en sus aspectos etiológicos y clínicos, que presentó en 1922 en el IIº Congreso Nacional de Medicina; La importancia de la determinación del índice opsónico en la inmunización terapéutica publicado en La Semana Médica de 1908 (II, 1667), sin olvidar su Estudio de la Semiología del aparato respiratorio que vio la luz en 1914 (XIV, 413) en la Revista del Círculo Médico Argentino y del Centro de Estudiantes de Medicina.

Contemporáneamente, J. J. Vitón y J. A. Cruciani publicaron en La Semana Médica (I, 765, 1932) el tratamiento del asma tuberculosa, y Cruciani solo en 1933 la radiografía del tórax en los asmáticos (Ibid., 306).

En 1940, y en la misma revista, E. López Lacarrere y A. Viale del Carril, dieron luz a sus primeros trabajos sobre la llamada alergia bacteriana en otorrinolaringología.

José A. Bózzola (1897-1967) publicó en La Semana Médica en 1935 (I, 845) su trabajo sobre Polinosis y el asma bronquial desde el punto de vista alérgico (II, 330, 695, 1215) para culminar con su obra princeps “Alergia polínica”, Tesis de Doctorado, de 1940.

Este profesional fue el que indujo a la creación en el municipio de Vicente López del Primer Centro Sudamericano Especializado en el Estudio y Tratamiento de las Enfermedades Alérgicas en junio de 1937. Además de ser su jefe natural, su vasta experiencia clínica trascendió prontamente y los profesores de la Facultad de Medicina Manuel Luis Pérez, Bernardo Houssay y José Arce, se interesaron en extrapolar dicha experiencia al ámbito del Hospital Universitario. De tal manera, el 15 de Junio de 1938 se creó el Centro de Alergia del Hospital de Clínicas, que empezó a funcionar el 12 de Mayo de 1939.

En este caso también J. A. Bózzola fue su primer jefe al renunciar al cargo de Vicente López. En este Centro, lo sucedió su hijo César José (1924-1982) quien inició con Victor R. Miatello, el estudio conjunto de las nefropatías inmunológicas.

Por otro lado, Guido Ruiz Moreno (1910-1979); Alois E. Bachmann (1914-1981) y Pablo Negroni, realizaron invalorable aportes a esta naciente especialidad. El primero, desde su consultorio de Alergia en la Primera Cátedra de Clínica Médica del Profesor Castex, y los otros 2, desde la Academia Nacional de Medicina contribuyeron decididamente a ampliar el horizonte alergológico. Los trabajos sobre la importancia de los hongos en la etiología de las enfermedades alérgicas tienen un hito en la obra “Dermatomicosis” (1942) de Pablo Negroni. Veinte años después, Carlos Baena-Cagnani publicó su libro “Alergia a hongos”, en Córdoba, de gran repercusión para la época.

Ulteriores contribuciones de Negroni y Daglio, de Negroni y Fischer y de Negroni y Ruiz Moreno, así como, la de Giscafré y Schiel, en los años 1941, 1942, 1943 y 1944, fueron pioneras en la especialidad.

En septiembre de 1938 se creó la Sección Alergia del Instituto de Investigaciones Físicas aplicadas a la Patología Humana de la Academia Nacional de Medicina, por iniciativa de su Director el Profesor Castex, quien designó a Ruiz Moreno como Jefe de dicha sección.

En 1939, Castex y Ruiz Moreno, publicaron el primer trabajo nacional sobre el polen aéreo de la Capital Federal, y comenzaron a preparar extractos con pólenes recogidos en la provincia de Buenos Aires.

En 1940, Castex, Quirno y Ruiz Moreno, dieron a luz el primer caso existente en la bibliografía nacional de la acción de la alergia por alimentos en la evolución de la glomerulonefritis difusa aguda; Castex y Ruiz Moreno (1910-1979) habían precedido este hallazgo con sus publicaciones sobre el tema de la inmunopatología de las reacciones a los alimentos.

En 1940 también se produjo otro acontecimiento: la fundación de la primera Sociedad Médica relacionada con la especialidad. El 9 de enero, un grupo de profesionales creó la Sociedad para el Estudio de la Alergia, y se reunían en forma provisional en la calle Parera 119 de esta Capital.

Su primer presidente fue Mariano Castex y recién el 3 de octubre de 1941, se incorporó a la Asociación Médica Argentina, (Avda. Santa Fé 1171) con el nombre de Sociedad Argentina de Alergia. El 23 de junio de 1972, se rebautizó como Sociedad Argentina de Alergia e Inmunopatología, (SAAI) que es su actual denominación.

Entre sus miembros fundadores merecen citarse a los doctores Araoz Alfaro, Argañaraz, Bachmann, Baliña, Bonorino Udaondo, Bullrich, Cabanne, Castex, Castilla, Curtis, Cruciani, de Elizalde, Escudero, Errecart, Finochietto, Goñalons, Houssay, Lascalea, Mazzei, Peralta Ramos, Quirno, Raimondi, Romano, Ruiz Moreno, Segura, Solari, Spangenberg y Viale del Carril, y, entre aquellos que le dieron impulso y notoriedad en las últimas décadas del siglo XX, no debemos olvidar a R.O. Tracchia, J. R. Vaccarezza, E. A. Rossi, R. Tedesco, y E. Gómez del Intento .

En 1949, un grupo de socios disidentes se separó de la Sociedad y fundó la Asociación Argentina de Alergia e Inmunología (AAAI), siendo su primer Presidente el Dr. Benigno Garat. Logró su personería jurídica recién en 1975, al recibir como donación el inmueble de la calle Moreno 909 de esta Capital, del Dr. Pedro A. Colombi, trágicamente desaparecido ese mismo año.

En 1941, H. Walter y R. F. Carron observaron una elevada concentración del polen del árbol *Celtis tala* en el aire de la ciudad de Córdoba; Ruiz Moreno y Molfino publicaron 2 trabajos sobre la flora alergológica argentina resaltando el aspecto endemo-epidémico de la polinosis y las variedades fenotípicas regionales.

La Asociación Argentina de Alergia e Inmunología (AAAI) donde descollaban profesionales tales como E. Mathov (1914-1991), M. Asrilant, E. Bacigaluppi y sus 2 hijos Jorge y Eduardo, A. Máspero e hijo, R. Paurici, W. Sánchez de la Vega, L. Greiding, H. Neffen y E. Fabiani, realizaba sus reuniones científicas en la Biblioteca del Hospital Rivadavia, y, en la sede del desaparecido Instituto Nacional de las Enfermedades Alérgicas (año 1966) de la calle Cangallo (hoy Tte. Gral. J. D. Perón) al 1435, en la sede que ocupó la Unión Obrera Metalúrgica Argentina, y ahora FOETRA.

Otro hecho destacado del año 1941 fue la adecuada oficialización del servicio de Alergia del Hospital Ramos Mejía con el Dr. Julio A. Cruciani como jefe; el nombre de este profesional fue conferido a un premio de la Sociedad Argentina de Alergia (AMA), poco tiempo después de su deceso. Así, en 1958, el jurado confirió a David Kahn y a Mario Freís, éste último ingeniero agrónomo, el galardón por su trabajo titulado “Nuevos datos sobre hongos anemófilos y factores meteorológicos”. Este premio pasó luego a la A.M.A., la cual lo otorgó en 1978 y 1980, luego de un largo receso y aún sigue en vigencia.

La Sociedad Argentina de Alergia e Inmunopatología creó en 1978, un premio bienal con el nombre Guido Ruiz Moreno en su homenaje, que fue entregado en 1981, y en 1985; luego fue dejado sin efecto, prevaleciendo el de Cruciani.

En 1942, se organizó el servicio de Alergia del Instituto Nacional de la Nutrición dirigido por el profesor Escudero. Su primer jefe fue el Dr. Leopoldo Herraiz Ballesteros quien fue reemplazado luego por el Dr. Miguel Agustín Solari (1908-1993).

En su capítulo “Los últimos 50 años de la Inmunología Argentina” del tomo II del libro de Historia General de la Medicina Argentina, publicado por el Instituto y Cátedra de Historia de la Medicina de la Universidad de Córdoba, en 1980 (pág. 83), el recordado maestro y Profesor Doctor Alois E. Bachmann se refiere a destacados médicos que propulsaron la especialidad en el interior del país. Así, recuerda los nombres de C. Baena-Cagnani, E. P. Aznárez, D. Kahn, G. Bustos, J. Martorell, L. Vanella, N. Gallino, L. Giscafré, L. Bentolila y J. F. Dumm.

Otras sociedades dignas de mención son las de Alergia e Inmunología de Córdoba, de Mendoza, del Sur con sede en Bahía Blanca, del Litoral (donde se destacaron L. Bentolila, J. Pecoraro, R. Murillo, R. Cavagnero y H. Morra), y, de La Plata (donde J. F. Dumm padre e hijo y Zelma Coronel realizaron aportes de significación). Así, en Córdoba, en el Hospital Italiano se creó un Centro de Alergia bajo la dirección del Prof. Dr. Carlos Baena Cagnani, quien a posteriori ocupó la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Medicina; en el Hospital Tránsito Cáceres de Allende, el Dr. Enrique P. Aznárez estudió la alergia respiratoria y el Dr. David Kahn estudió los hongos anemófilos. Debe destacarse también la actividad del Prof. Dr. Guillermo Bustos de especial dedicación a la alergia infantil; en Río Cuarto, desde las épocas del Dr. José Martorelli en el Hospital Provincial hasta el laborioso grupo dirigido por el Prof. Dr. Leonardo Vanella en el Instituto de Investigaciones Inmunológicas.

El entusiasmo del Dr. Norberto Gallino también debe destacarse, de activa participación en la Sociedad de Alergia e Inmunología de Córdoba.

El Dr. Lorenzo Giscafré, que fuera Miembro Consultor de la Sociedad de Alergia de la AMA., en reconocimiento a su proficua labor en Santa Fé, también fue otro representante de la escuela de Guido Ruiz Moreno. El Prof. Dr. León Bentolila propulsor de la alergia en Rosario, y creador de la Asociación de Alergia e Inmunología del Litoral, se desempeñó primero en el Instituto de Medicina Experimental de Fisherton, y después en la IV° Cátedra de Clínica Médica y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad del Litoral. Sus aportes siempre lúcidos e inteligentes marcaron un sendero en la especialidad del país, y no obstante su avanzada edad siempre mantuvo fresco el entusiasmo hacia las jóvenes generaciones de alergistas.

La Sociedad de Mendoza se creó el 23 de agosto de 1972, siendo su primera Comisión Directiva la integrada por los Dres. Moisés Dik como Presidente, Marcos Hugo Victoria como Vice, Ruth S. De Mercado como Tesorera y Salomón Boueri como vocal. Se reunían en la calle Olegario V. Andrade 496 de la capital mendocina. Por su parte, La Sociedad del Sur creada el 21 de noviembre de 1975, fue presidida por el Dr. Manuel Franciulli (padre), Omar Silva como Vice, Carlos Gregorio Ramón como Secretario, Jorge Ochoa como Tesorero y 7 vocales que fueron Elena Zilberberg, Campusano Méndez, Cándido Rodolfo Cordo, Néstor Daniel Beistegui, Jaime Novodovretz, Mario Gee y Horacio Sansosti. Se reunían en la calle Roca 27 de Bahía Blanca y tenía una amplia zona de influencia en la Patagonia, La Pampa y Neuquén. Estas Sociedades desarrollaron desde su creación una intensa y positiva actividad, en pos de la difusión de los conocimientos de la Alergia, no siempre transmitidos en forma ética, veraz y desinteresada. Como ocurre en todas las especialidades, ésta no podía escapar a los grandes fraudes. Ello ocurrió en los Estados Unidos de Norte América, a expensas de un supuesto especialista argentino. El Journal of Allergy & Clinical Immunology, vol. 64, nº5, pág.352, de noviembre de 1979, publicó un hecho promovido por el “Profesor Dr. Raimondo Orsetti”, autotitulado Jefe del Servicio de Alergia del Hospital de Gallardo de Buenos Aires. El nombrado se presentó como disertante de alto nivel en una reunión de la Sociedad Norteamericana para el Estudio del Asma y condiciones anexas, el 30 de abril de 1938, a las 19 horas, en el salón Rosado del Hotel Traymore de Atlantic City, para desarrollar el tema “Las peculiaridades de la Fiebre del Heno y del Asma de las Pampas Sudamericanas”. El “Dr.Orsetti”, que en realidad era un consumado actor de la ciudad de Boston había sido contratado por el entonces Presidente de dicha Sociedad Dr. Aarón Brown y por el organizador del evento Dr. Leo H. Crip, para vituperiar a los Dres. Coca y Cooke, por sus importantes contribuciones al terreno de la alergia, como expresión de rencillas y envidias internas.

En 1993, se constituyó la Asociación de Alergia e Inmunología de Buenos Aires (AAIBA) como un desprendimiento de la AAAI, debido a desinteligencias entre sus asociados; estableció su sede en la avenida Pueyrredón 538 en el edificio que motivara a Baldomero Fernández Moreno su conocido “Setenta balcones y ninguna flor”.

Se esbozaron los acontecimientos fundamentales de la historia de la Inmuno-alergia en nuestro país; por ser una especialidad joven y por estar vivos y en plena producción muchos de sus más conspicuos representantes, resulta imprudente emitir un juicio de valor, que, de seguro sería poco objetivo. No obstante, merecen citarse los hallazgos inmunoquímicos e inmunopatológicos con los insectos Periplaneta americana y Blatella germánica, entre las cucarachas, el Triatoma infestans o vinchuca entre los reduvídeos, el Dermatophagoides farinae entre los ácaros, las proteínas 33 y 38 del polen de Lolium perenne, el aislamiento y

caracterización de numerosos péptidos antigénicos a partir de hongos anemófilos (v.g. *Alternaria alternata*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium notatum*, *Bipolaris australiensis*, *Aspergillus fumigatus*, *Curvularia*) y patógenos conocidos como *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Trichophyton rubrum*, *Malassezia furfur*, *Mucor mucedo* y *Amanita phalloides*, al igual que de los venenos de Hymenópteros (abejas, hormigas como la *Pseudomyrmex* y el camoatí), y de serpientes (*Bothrops jararaca* y *Crotalus terrificus*), la complicidad de las proteínas de las heces de los murciélagos de los taparrollos domiciliarios en el asma bronquial, y de las heces de las palomas en aquellos colomófilos con enfermedad pulmonar crónica, así como, de los anticuerpos incompletos o asimétricos y su papel en la inmunoterapia convencional, estudiados por el grupo de investigadores de la División Alergia e Inmunología del Hospital de Clínicas de la UBA, en los últimos 50 años, que, impulsaron el desarrollo de Carreras Universitarias para Médicos Especialistas en Alergia e Inmunología Clínica, en 3 diferentes Unidades Académicas, (Hospitales de Clínicas, Durand y Alemán), habida cuenta del interés suscitado en el ambiente médico sobre los alcances de esta vieja especialidad rejuvenecida por la investigación y los innumerables avances tecnológicos aplicados en ella. (71-72-73-74).

## 2. – Introducción a las Bases Genéticas.

Desde épocas remotas, las diferentes descripciones del fenómeno inmuno-alérgico involucraron a una “constitución o diátesis,” que podría o no estar presente en algún otro integrante de la misma familia. Así se generó el concepto de “predisposición alérgica”, aunque, a veces, el registro de dichas descripciones evidenciara fallas importantes en su recolección.

Siguiendo a los autores clásicos como Erlich, Heubner, Martius, Bauer, His y Kämmerer, esta predisposición o tendencia a estados morbosos era vinculada a algo permanente, estrechamente unido a la contextura global del organismo.

Como se aprecia, se admitía un “algo” poco definido que estaba presente, y que se podía heredar en forma más o menos marcada, para unos en forma dominante y para otros en forma recesiva. Al surgir más adelante relatos que imbricaban diferentes patologías, y, que, de alguna manera poco ortodoxa eran asociadas y atribuidas a una diátesis “común” a todas ellas, creó confusas interpretaciones cuyos resabios aún existen en la valoración de este fenómeno.

Un hito fundamental lo constituyó el descubrimiento por parte del grupo de Peter Gorer en el Instituto Lister de Medicina Preventiva de Londres, en 1937, de los antígenos del transplante. Numerosos investigadores se abocaron, a partir de entonces, al estudio de los problemas de la histocompatibilidad, relacionados con el desarrollo de las diferentes técnicas para efectivizar los injertos de los órganos.

Snell y su grupo del laboratorio Jackson de Ben Harbour, EE.UU., estudiaron los potentes antígenos del transplante del ratón llamados H2, cuyo equivalente en el humano es el sistema HLA o CMH o complejo mayor de histocompatibilidad, descrito en la superficie de los leucocitos en la década del 50. Jean Dausset del Hospital San Luis de París fue el primero en demostrar la localización de tales antígenos sobre células humanas uniéndose al suyo otros 2 grupos orientados en la misma línea de investigación: el de Jon Van Rood, de Leyden, Holanda, y el de Rose Payne y William y Julia Bodmer en Stanford, EE.UU.

Estos descubrimientos que fueron llevados a su culminación en los últimos tiempos por Snell, Benacerraf y Dausset, por los cuales estos investigadores recibieron el Premio Nóbel de Medicina y Fisiología de 1980, permitieron conocer con exactitud la composición del CMH, y atisbar la intimidad de sus funciones vitales, permitiendo la clarificación de procesos hasta ahora incomprensibles y llevando la especulación casi hasta los límites de la ciencia ficción.

Al decir de Jean Dausset “el mecanismo de la relojería inmunológica, con sus múltiples y sutiles engranajes, comienza a ser comprendido”. Las actuales investigaciones sobre las bases genéticas de la inmuno-alergia fueron impulsadas por 2 hallazgos en particular: Ishizaka demostró el papel que la IgE juega en la atopía humana, y, Mc Devitt probó que el control de la respuesta inmune específica depende de los genes Ir, pertenecientes al complejo H2 de histocompatibilidad del ratón. La detección de los mismos en varias especies animales, en base a los estudios de Levine y de Vaz sobre el control genético de las respuestas mediadas por la IgE, y dirigidas a bajas dosis de complejos proteicos con capacidad antigénica, proveen la base racional para los estudios centrados en la interrelación entre el CMH y la respuesta alérgica.

### 2.1.- Antecedentes de Investigación.

Como el sistema nervioso, el inmunitario basa su funcionamiento en una serie de mecanismos adaptativos dotados de memoria. Por estar distribuido ampliamente en las distintas especies animales asegura la integridad de sus organismos, “patrullándolos” permanentemente y previniéndolos así de toda agresión de agentes exógenos y/o modificación endógena indeseable. El CMH juega un papel primordial en el determinismo genético de tales funciones, y su importancia ha ido creciendo a medida que se conocen más detalles de su estructura y funcionalismo.

Estos estudios comenzaron con ratones en el año 1936, y desde entonces hasta la fecha se ha obtenido un conocimiento tan detallado sobre el tema, que puede afirmarse que la región que codifica los antígenos de histocompatibilidad de esta especie es el segmento cromosómico de animal superior mejor conocido. En efecto, el estudio de las diferentes regiones cromosómicas y sus funciones, o sea, lo que suele denominarse “el mapeo cromosómico”, se efectúa en animales congéneos. Estos son ejemplares obtenidos de cepas endocriadas y constituyen los frutos de un apareamiento primigenio de animales genéticamente distintos que son retrocruzados, o lo que es lo mismo, son unidos con sus progenitores en forma sucesiva, por medio de un proceso de endocría que lleva a la obtención de individuos idénticos en todos o en la mayoría de los genes pasibles de ser estimulados, pero que difieren en parte o en todo el CMH, convirtiéndose así, en los elementos fundamentales para el estudio de la estructura y funciones de los mismos.

Los primeros estudios se realizaron en 1933 bajo la dirección de Haldane, quien predijo que, los tejidos tenían diferencias antigénicas comparables a las de los grupos sanguíneos. Explorando esta posibilidad, Gorer, (1936) pudo detectar 4 antígenos de este tipo en el ratón. Trabajó con un suero de conejo anti glóbulos rojos de ratón de la cepa A, absorbido sobre otras cepas, y definió un antígeno (Ag II), presente en aquella y en la cepa CBA, pero ausente en la C57B1. Buscó luego relacionar los genes de este grupo sanguíneo con aquellos hipotéticos genes Haldane. Trabajó en las cepas A y C57B1, con sus híbridos y retrocruzas, y halló una correlación entre la presencia del Ag II y la susceptibilidad a un tumor

preveniente de la cepa A. Gorer propuso que dicha susceptibilidad estaba determinada por 2 ó 3 genes, uno de los cuales era idéntico al que codificaba para el Ag II. Se demostró así que éste era un aloantígeno. Luego, Snell designó como genes y antígenos de histocompatibilidad a los responsables del rechazo de tejidos, y llamó H2 al gene que codifica para el Ag II. Produjo, por medio de retrocruzadas seleccionadas, líneas de cepas murinas que se diferenciaron sólo en sus antígenos de histocompatibilidad (líneas coisogénicas o congénicas), para poder separar e identificar mejor a dichos "loci". Luego se comprobó que el gene H2 estaba compuesto por varios elementos ubicados en loci muy cercanos, y se designó al conjunto Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) denominación con la cual se lo conoce actualmente. (74-75-76-77).

## 2.2.- Complejos H2 del ratón y CMH humano o HLA.

El primero se halla ubicado en el grupo de ligamento IX del cromosoma 17 del ratón a 16 centiMorgans del centrómetro. Su tamaño de 0,5 centiMorgans indica que podría codificar hasta 2000 cadenas polipeptídicas. Además del CMH propiamente dicho se hallan en el mismo cromosoma otros loci relacionados funcional y/o químicamente con él. Así, entre el centrómetro y el CMH está situada la región T/t cuyos genes intervienen en la diferenciación embrionaria. A la derecha del CMH se describe la llamada región T/a donde "mapean" genes que originan otros antígenos de diferenciación expresados también sobre los linfocitos. Las regiones más significativas de este complejo H2 son: K - A $\alpha$  - A $\beta$  - E $\beta$  - J - E $\alpha$  - Ss - S1p - D - L - Qa2 - Qa3 - Qa1 - Tla.

Si bien este complejo sirvió de *primum movens* para el estudio del CMH humano, parece más relevante describir este último, y relacionarlo con los fenómenos inmuno-alérgicos. Las funciones del CMH son: a) Establecer un acúmulo de LT como consecuencia de las selecciones positiva y negativa cuando sus precursores interactuaron con las moléculas del CMH de las células dendríticas epiteliales del timo, y, b) activar a los LT maduros habida cuenta de la interacción del receptor-T (RcT-CD3) con el antígeno presentado por las células presentadoras (CPA) "profesionales" o no en el contexto del CMH.

Este es un grupo de genes colindantes que se halla en todos los vertebrados; se heredan como unidad (ligamento), y si bien, en un principio, se los involucró en los trasplantes de órganos, en la actualidad su función esencial es unirse a epitopes antigénicos y presentarlos adecuadamente al LT (RcT-CD3). Son el 3° elemento para el reconocimiento antigénico siendo el 1° el LT-antígeno específico, y el 2° el receptor del LB.

El CMH humano se ubica en el cromosoma 6, brazo corto, y se subdivide en 4 locus primordiales, que se bautizaron convencionalmente, con las letras A, B, C y D. Las moléculas de clase I comprenden 3 loci: el A, el B y el C. Cada una de ellas es un polipéptido transmembranoso de 43 kDa con 3 dominios ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3) asociados no covalentemente a una  $\beta$ 2-microglobulina de 12 kDa, en la membrana celular de todas las células nucleadas excepto los eritrocitos y el sinciotrofoblasto. Estas moléculas están expresadas codominantemente, o sea, representan proteínas de los CMH paterno y materno; cada célula presenta 6 moléculas: 2 del tipo HLA-A, 2 del tipo HLA-B y 2 del tipo HLA-C. Poseen gran polimorfismo, es decir, muchos alelos o sean múltiples formas estables de un gene. Este polimorfismo es la base de la antigenicidad de las diferentes moléculas del CMH en diferentes individuos conduciendo a un rápido rechazo entre ellos. Se detectaron, hasta

ahora, 40 alelos para HLA-A, 80 para HLA-B y 30 para HLA-C -(este número va en aumento)- identificados por serología (aloanticuerpos de los sueros de mujeres múltiparas e individuos politransfundidos). La cristalografía reveló una estructura tridimensional para las de clase I semejante a una fosa, canal, bolsillo o cuna.

Las moléculas de clase II son glucoproteínas compuestas por un heterodimero alfa/beta unidos no covalentemente. La región genética que codifica para estas moléculas se llama D y está subdividida en DP, DQ y DR. La cadena alfa pesa 34 kDa y la beta 28 kDa. Las células expresan 3 tipos de moléculas de clase II: DP $\alpha$ / $\beta$ , DQ $\alpha$ / $\beta$  y DR $\alpha$ / $\beta$ . Estas moléculas al igual que las de clase I son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Al revés de las de clase I, la distribución de las de clase II está muy restringida; así, se hallan presentes en forma constitutiva en los LB, células dentríticas y epiteliales tímicas, LT y macrófagos. El interferón-gamma puede inducir su expresión en células que habitualmente no las expresan (v.g. epitelio tiroideo). Estas moléculas son también muy polimórficas, ya que por serología se identificaron 6 alelos para DP, 7 para DQ y 14 para DR (este número va en aumento aunque siempre es menor que el de las moléculas de clase I). También se exponen en forma codominante (paternos y maternos) por lo que suman al final 6 productos distintos.

Por su parte, las moléculas de clase III no están relacionadas con el control de la respuesta inmune; son más bien proteínas halladas en el suero que en las superficies celulares. Codifican para el sistema complemento (C2, C4 y Bf), para el factor de necrosis tumoral (alfa y beta), para la 21-hidroxilasa que participa en la síntesis de esteroides suprarrenales y para la proteína del estrés térmico (HSP) 70.

La unión de los epitopes antigénicos a las moléculas del CMH es selectiva siendo su afinidad similar a aquella del antígeno con el anticuerpo. Los péptidos que no se unen a ciertos alelos del CMH son incapaces de activar a los LT mientras que si lo hacen la activación se produce. Por el contrario, a veces, péptidos que se unen a moléculas de clase II no activan a LT porque esta combinación puede "recordar" a los LT (RcT-CD3) una "imagen" parecida a un auto-antígeno. El epitope se "deposita" en el canal o surco de la molécula del CMH, y una vez ocupado dicho lugar, el RcT-CD3 interactúa con el binomio CMH-péptido conduciendo a la respuesta linfocitaria o activación. (78-79-80-81).

El estado de no-respuesta puede deberse a: 1) selectividad en la unión péptido-CMH, la cual es muy limitada (selección determinante); 2) ausencia de LT con receptor específico delecionado en el timo durante la ontogenia si el binomio remeda a un auto-antígeno; y 3) ausencia de genes de la región V para sintetizar un receptor T apropiado para el antígeno ("agujero" en el repertorio genético T). El LT- CD4 reconoce un epitope antigénico sólo si es acompañado por una molécula de clase II en la célula presentadora. Esta molécula de clase II debe ser el mismo alelo de clase II que el precursor del LT "aprendió" en el timo durante su selección positiva; este sello es un auto-CMH (self o propio) mientras que el no-propio (non self) es otro alelo que ese LT no "vio" en el timo, y por ende, luego no se activa en el futuro. Este es el fenómeno de restricción o sujeción o sometimiento al CMH. La respuesta de los LTCD8 (supresores/citotóxicos) también está restringida, pero por moléculas de clase I del CMH (v.g. antígenos virales).

La importancia biológica de las moléculas del CMH reside en la presentación de epitopes antigénicos para activar a los LT actuando como moléculas accesorias estabilizando la interacción celular y enviando señales importantes al interior del LT.

### 2.3. Receptor T-CD3 para el antígeno.

El acontecimiento más importante en la vida y maduración del LT en el timo es la adquisición de un receptor específico para el antígeno. Este receptor tiene una estructura compuesta por 2 cadenas polipeptídicas cuyos pesos moleculares oscilan entre 30 y 45 kDa. Dichas cadenas se llaman alfa/beta y gamma/delta para los 2 modelos diferentes que se han detectado hasta ahora. El receptor se halla en estrecha relación con el CD3 que es un complejo de 5 cadenas polipeptídicas que actúa como traductor de señales al interior del linfocito. Las 2 cadenas del receptor están unidas por puentes disulfuro y presentan una estructura muy parecida a la de las inmunoglobulinas, por lo cual, se admite que, tanto aquel como éstas podrían tener un gene ancestral común, y por ello, se lo considera perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobinas.

El receptor alfa/beta es el más común, y, sólo una de las dos variantes se expresa en el LT. La cadena alfa y beta tiene un dominio variable de 120 aminoácidos exteriores (V-alfa y V-beta) y uno constante (C-alfa y C-beta), éste último más cercano a la membrana celular. La unión del RcT con el CD3 es no-covalente; este complejo molecular asociado a la membrana necesario para el transporte a la superficie del receptor se halla en todas las células T diferenciadas.

Considerando la disposición anatómica de las partes mencionadas y la funcionalidad del CD3 (y sus polipéptidos gamma, delta, épsilon y 2 zetas) se considera como receptor a la unidad de ambos elementos.

La organización de los genes humanos que codifican para las cadenas alfa, beta, gamma y delta siguen los siguientes patrones generales: 1) hay muchos más genes V-alfa y V-beta (50-100) que V-gamma y V-delta (5-10) en la línea germinal; 2) los genes que codifican para la cadena delta están flanqueados por ambos lados (5'-3') por genes que codifican para la cadena alfa; 3) los genes para beta y gamma están localizados en el cromosoma 7 mientras que para alfa y delta están en el cromosoma 14; 4) los genes beta y delta usan segmentos V, D y J como los de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas; y 5) los genes alfa y gamma emplean segmentos V y J como los de las cadenas livianas de las inmunoglobulinas. (79-80-81-82).

Los principios fundamentales del reordenamiento genético para las inmunoglobulinas se pueden aplicar exactamente para los del receptor-T para el antígeno. La actividad de las recombinasas y de las secuencias para la unidad se emplean para unir a los VJ o a los VDJ para fijar la especificidad definida de una particular cadena polipeptídica. También estos genes pueden sufrir una exclusión alélica similar a la de las inmunoglobulinas, o sea, que la generación de diversidad es idéntica a la del LB (los LT reacomodan y ensamblan bloques de genes aparentemente al azar).

Por el contrario, los RcT al revés de las inmunoglobulinas no sufren mutación genética después de la estimulación antigénica.

El reordenamiento de los genes para el RcT está altamente regulado. La célula T más primitiva que llega al timo presenta sus genes de la línea germinal no reordenados, tanto los de las cadenas gamma como beta comienzan dicho reordenamiento en forma casi simultánea. Si los primeros lo hacen satisfactoriamente entonces los delta inician el suyo, y, luego de cumplirse los pasos de la transcripción en polipéptidos, esa célula permanecerá

como gamma/delta. Por eso, los LT-RcT- $\gamma\delta$  aparecen mucho antes que los alfa/beta. Sin embargo, si los gamma no resultan funcionantes los beta continúan el reordenamiento por el alfa, que, a la postre se concretará en un alfa/beta. Si todos los genes del RcT no funcionan, la célula muere (apoptosis).

La ontogenia del RcT-alfa/beta es tímica tardía y muy improbablemente extratímica, mientras que, la gamma/delta es tímica temprana y muy probablemente extratímica.

Las cadenas CD3 delta, épsilon y gamma, se elaboran desde muy tempranos estadios tímicos, pero aguardan en el citoplasma celular al receptor para migrar juntos a la superficie.

De lo expuesto, se aprecia que, los RcT podrían atrapar alérgenos por sus regiones V $\alpha$  + V $\beta$  ó V $\gamma$  + V $\delta$ ; no hay pruebas que estas glucoproteínas heterólogas exógenas puedan actuar como superantígenos, por fuera de las regiones convencionales del RcT. (84-85-86-87-88).

#### 2.4.- Genética de la respuesta inmuno-alérgica humana.

En general, se puede afirmar que las respuestas de carácter alérgico mediadas por la IgE, representan para el hombre más un inconveniente que una ventaja. Sin embargo, es altamente probable que tales respuestas hayan jugado un papel importante en la protección de nuestros más primitivos ancestros contra las infestaciones reiteradas de exoparásitos agresivos, y es seguro que, aún hoy en día, representan un significativo mecanismo defensivo para los habitantes de las zonas subdesarrolladas del planeta, carentes de las adecuadas condiciones de control sanitario.

Como demostración del papel protector jugado por la IgE en este tipo de enfermedades infecciosas, cabe apuntar un ejemplo, casi anecdótico, pero bien demostrativo: en un "experimento humano" un desequilibrado alumno secundario infestó a sus compañeros de estudio con *Ascaris suum*. Se observó que aquellos estudiantes que eran poseedores de los más altos niveles de IgE sérica fueron los que mejor resistieron la invasión de los helmintos. Por ello, debe interpretarse la relativamente alta prevalencia de las enfermedades atópicas en el mundo occidental como el inesperado vestigio de una función inmunológica previamente útil. Aparentemente, ésta fue ejercida con su máxima eficacia en la época Neolítica, y a partir de entonces, a medida que las enfermedades parasitarias fueron dejando de constituir un grave problema para la Humanidad, la hiperrespuesta tipo IgE entonces desarrollada, se fue convirtiendo en una desventaja, desde el punto de vista de la selección natural, que el tiempo aún no ha terminado de mitigar. En el hombre moderno, las grandes presiones selectivas, en lo referente a la inmunidad específica se han ido ejerciendo, casi exclusivamente, en relación con las enfermedades infecto-contagiosas propias de la infancia que solían exhibir en el pasado, una elevada tasa de mortalidad.

Se ha argumentado que tales enfermedades han evolucionado muy probablemente sólo en los últimos 5.000 - 6.000 años, cuando el hombre primitivo dejó el nomadismo, desarrolló la agricultura y creó las primeras comunidades urbanas, permitiendo así que se dieran las condiciones necesarias para el desarrollo y supervivencia de aquellas.

De la misma manera, y a lo largo de 200 generaciones, la presión selectiva, representada por epidemias sucesivas y devastadoras de viruela, peste, sarampión e influenza, han de haber inducido los cambios genéticos pertinentes para producir una alta capacidad de respuesta ante dichas enfermedades.

Como consecuencia de lo expuesto, se admite que la capacidad para montar una respuesta inmune específica mediada por la IgE depende de una combinación de presiones selectivas que se expresan por varios mecanismos, a saber: 1): dentro del CMH; 2): por fuera del CMH y 3): en un hipotético y generalizado "estado de hiperreactividad" asociado también al sistema HLA, y que podría actuar como un factor genético accesorio de los anteriores.

Dentro del CMH, merecen citarse las publicaciones de Hamburger y de Marsh. Desde entonces quedó bien determinado que existe un mecanismo genético en el que se fundamenta el control del nivel de IgE total. El primero sugirió que el 59% de las variantes de dichos niveles, en adultos, y el 79% en niños, están influenciados por factores genéticos. Postularon, en su momento, 2 tipos alélicos en relación a dichos factores; uno **r**, caracterizado por un alto tenor de IgE circulante, se comporta como autosómico recesivo, y el otro **R**, con bajos niveles de IgE, como autosómico dominante. La combinación de ambos caracteres dan como resultado varios fenotipos, de los cuales **RR** y **Rr** se distinguen por producir bajos tenores de IgE mientras que en el homocigota **rr** se manifiesta un nivel de IgE elevado.

A punto de partida de los trabajos de Marsh se comienzan a determinar los niveles de IgE sérica total, confiriéndole importancia a los valores superiores a 120 KU/L ó 250 ng/ml en sangre, tan constantes en los atópicos.

Dentro del C.M.H., los lugares genéticos detectados hasta ahora son: el HLA-B7; HLA-DR2; HLA-Dw2; HLA-DQ2 y HLA-DQ5 (cromosoma 6), y su relación con la hipersensibilidad a pólenes (Ambrosia y Lolium). Por su parte, HLA-DR4 y HLA-DQ3 protegerían el desarrollo de una respuesta de IgE a los mismos antígenos.

Fuera del CMH se citan: cromosoma 5 sector q.23-31 (genes para IL-3, IL-4, IL-5 y GM-CSF); cromosoma 11q para la cadena beta del receptor épsilon (IgE) y el 14 para las cadenas alfa/delta del R<sub>c</sub>T. El cromosoma 11 (11q.13) parece encerrar -autosómicamente- importante información relacionada con el asma ("gen del asma") merced a las investigaciones del grupo de Cookson. Este autor sostiene que del lado materno se hereda un gen operacional, y, que del lado paterno el mismo sería anulado; si el estado atópico fuera heredado del padre no lo sería por el cromosoma 11.

Además de las influencias genéticas dentro y fuera del CMH, se describen ingerencias de genes poco definidos que se han bautizado como de "hiperreactividad". Se barrunta que estos genes podrían tener que ver con esos fenómenos poco conocidos aún y relacionados con "hipersensibilidades", "bajos umbrales" o "mayores respuestas" ante estímulos físicos, químicos, farmacológicos, microbianos, etc., que nada tienen que ver con los anticuerpos ni con la respuesta inmune. Estas especulaciones se basan en la significativa susceptibilidad a ciertas enfermedades autoinmunes en portadores del HLA-B8 (conformando, por lo general, los fenotipos A1B8 o B8Dw3, en sujetos de raza blanca). Estas entidades se caracterizan por un alto grado de reactividad hacia proteínas humanas nativas o modificadas.

Por otro lado, la predisposición para sufrir problemas neoplásicos (quizás asociada a una reducida capacidad de respuesta del sistema inmune), se correspondería con una prevalencia disminuida del haplotipo A1B8, estudios realizados en transplantados renales demuestran que los portadores de los antígenos A1B8 tienden a rechazar el órgano con mayor rapidez que aquellos que no lo poseen.

O sea que en la raza blanca, la "hiperreactividad" a una amplia gama de antígenos se asocia con el HLA-B8 y/o con otro antígeno que se halle en desequilibrio de ligamento con B8.

Los sujetos alérgicos, que se caracterizan por reaccionar exageradamente a cantidades mínimas de variados antígenos ambientales, no escaparían a esa regla general, pues según lo expuesto, también presentan con frecuencia las especificidades B8, y, menos quizás, A1 y/o Dw3.

Es necesario hacer notar que diversos estudios han demostrado una correlación estadísticamente significativa entre los niveles logarítmicos de los anticuerpos IgE e IgG producidos en ciertas condiciones. Similar correlación logró también establecerse entre los log. IgE y log. IgA. Ello corroboraría que la hiperproductividad de la IgE se vería reflejada en otros isotipos de anticuerpos que juegan un papel más crucial en la protección inmunológica. Así, se infiere que los portadores de los haplotipos antes citados tienen que haber presentado un cierto grado de ventaja selectiva por la vinculación que ellos manifiestan con el ya descrito estado de hiperproducción generalizada de anticuerpos. Esta circunstancia puede haberlos protegido contra los numerosos organismos patógenos con los que la especie humana hubo de luchar a lo largo de su evolución, y, en especial, contra los efectos devastadores de las enfermedades infecciosas que predominaron en los últimos 5000 años. No obstante, la posesión de dicho haplotipo llevó a presentar una predisposición incrementada para sufrir enfermedades alérgicas, lo que se traduce como una desventaja evolutiva que las generaciones no han logrado minimizar. Los mecanismos moleculares que regulan la expresión del gene de IL-4 en los LT humanos que mapean en el cromosoma 5 banda q 23-31 están relacionados con las citoquinas Th2. La transcripción de dicho gene está regulada por promotores múltiples que actúan en conjunto. Ellos son: el elemento (P) positivo o factor nuclear (NF) que es específico de los LT; el PRE-I o elemento regulador positivo (POS-1 y POS-2) que son ubícuos y no específicos de célula que actúan como activadores y los NRE (I y II) o elementos reguladores negativos en LT específicos. El Neg I reprime la actividad del PRE-I y el Neg-II de gran ubicuidad también reprime al PRE-I sin especificidad celular. Esta secuencia nuclear P se localiza entre las bases 69 y 79, y es el elemento regulador más importante en la expresión de la IL-4. En los ratones, hay 4 sitios P para regular a IL-4 por lo cual es más compleja su síntesis. Como se señaló, el modelo murino para IL-4 exhibe una corta secuencia entre -77 y -87, así como otras 2 secuencias llamadas "secuencias de consenso" (CS) 1 y 2 siendo CS2 de mayor importancia que CS1. Presentan homología (5'-ATTTTCNNTG-3') y los 5 elementos P (PO, P1, P2, P3 y P4) se localizan entre -250 y -40 del promotor del gene de IL-4. Estos NF (P) son el objetivo para la calcineurina, la ciclosporina-A, y el FK-506 o tacrolimus en su efecto terapéutico inmunosupresor. El llamado elemento CLEO (Consensus Lymphokine Element O) es parte de los promotores de los genes de GM-CSF, IL-3, IL-4 e IL-5. PO está relacionado con CLEO y parece jugar un papel importante en coordinar la inducción de los genes de IL-3, 4, 5 y de GM-CSF. El CLE1 es el objetivo de las señales no sólo del RcT sino de la molécula accesoria CD28. Esta señal coestimuladora incrementa la síntesis de citoquinas. Otros 3 elementos regulatorios son ubícuos y activos (Y y 2 OAP) para estimular al promotor del gene de IL-4. El elemento Y se une al NF-Y. Los OAP (40 kDa) influyen a c-jun y Jun-D y residen junto a NF (P), P1 y P4. Es posible que los genes de IL-4 estén "desregulados" en los atópicos y que esta línea de investigación sea trascendente en el futuro. Sin embargo, en los casos de asma no atópica la "desregulación" o defecto podría residir en la activación de los genes de IL-2 e IL-5 y no de IL-4. <sup>(89-90).</sup>

## 2.5.- Asociaciones de haplotipos con significación.

La década del 90 quedará marcada como aquella en la cual se establecieron estrechas relaciones entre haplotipos DR y ciertos péptidos antigénicos provenientes de pólenes. Así, los homólogos de Ambrosia V obtenidos como proteínas recombinantes y analizados por espectroscopia y resonancia nuclear magnética, como ser, Amb a V de Ambrosia artemisifolia, Amb t V de Ambrosia trifida y Amb p V de Ambrosia psilostachya exhiben estrechas asociaciones con DR ( $\alpha\beta$ , 1\* 1504), DR ( $\alpha\beta$ , 1\* 1101) y DR ( $\alpha\beta$ , 1\* 1501) respectivamente. La producción de anticuerpos específicos para cualquiera de ellas, tanto IgE como IgG, pre y post-inmunoterapia, corrobora esas asociaciones. Recientemente, se agregan datos que vinculan a DR2.2. con esta respuesta.

El análisis del polimorfismo de 4 regiones alélicas del segundo exón de los genes DRB, DQA y DQB no reveló una secuencia especial en los respondedores de Amb a V; sin embargo, todos los atópicos que producen IgE anti-Amb a V poseen DRB1, DRB5 y DR2.2.

Para aclarar esto, se empleó un monoclonal contra las cadenas  $\alpha/\beta$ 1, pero no contra  $\alpha\beta$ 5 y así se inhibió la presentación antigénica de DR2.2 y DR2.12 (o de DR  $\alpha\beta$  1\*1502) lo que aboga a favor de las moléculas de clase II-DR  $\alpha\beta$ 1 en la presentación de Amb a V. También lo hace DR  $\beta$  1\*1501, pero no lo hacen DR  $\beta$  1\* 1601 y 1602 al diferir en los residuos de aminoácidos 67, 70 y 71 con la primera.

La respuesta inmune a Lolium perenne y sus péptidos Lol p I, Lol p II y Lol p III está asociada con HLA-DR ( $\alpha\beta$  1\* 0301) o DR3 (w17). Las asociaciones más significativas fueron con DR ( $\alpha\beta$  1\* 1101) y DR ( $\alpha\beta$  1\* 1301) para el péptido Lol p. III. Por su parte, DQw1 está asociado con respuestas al polen del cedro japonés en una población atópica nipona mientras que HLA-DR4 y DQw3 están negativamente relacionados con la producción de IgE frente al polen del cedro y el veneno de abeja (melitina), respectivamente.

En el pasado, la tipificación de los diferentes alelos de clase II se realizaron por serología con anticuerpos específicos y complemento o por cultivo mixto linfocitario. En la actualidad, las tecnologías del ADN recombinante, la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), y los análisis de hibridación del tipo "dot-blot" empleando sondas de oligonucleótidos posibilitan el análisis detallado de secuencias genéticas polimórficas allanando así el camino para la investigación de los genes involucrados en los fenómenos de hipersensibilidad, y en especial, en aquellos responsables de la alergia atópica. En la última década, los estudios genéticos sobre el asma y la atopía, avanzaron mucho gracias a los pequeños tándems de polimorfismos repetidos (STRP) del ADN, que permitieron identificar 5 regiones de gran interés: **1)**: en el cromosoma 5q vinculado a un grupo de citoquinas ; **2)**: en el CMH (HLA) del cromosoma 6p relacionado con la polinosis; **3)**: en el cromosoma 11q para la subunidad  $\beta$  del RFc $\epsilon$  de la IgE, que, en años anteriores, Cookson diera en llamar "el gen del asma" ; **4)**: en el cromosoma 12q que contiene el gen que codifica para el interferón- $\gamma$ , y, **5)**: en el 14q el locus  $\alpha\delta$  para el receptor del LT. Daniels en 1996 y el CSGA (Estudio Colaborativo sobre la Genética del Asma) en 1997, agregaron los siguientes datos : **1)**: el cromosoma 4q 34-35 y la eosinofilia ( $p < 0,0001$ ); **2)**: el 6p 21 (región HLA) y la eosinofilia ( $p < 0,0001$ ); **3)**: el 7p 13 y la hiperreactividad bronquial ( $p < 0,0005$ ); **4)**: el 11q13 y las pruebas cutáneas positivas ( $p < 0,00005$ ); **5)**: el 13q-14.1-14.2 y la atopía ( $p < 0,005$ ), y **6)**: el 16q 21-24 y los niveles de la IgE sérica total ( $p < 0,005$ ). Al analizar las influencias étnicas, el CSGA demostró el ligamento entre el 5q 31-33 o grupo de las citoquinas en los caucásicos

( $p=0,0187$ ); entre el 6p 21 en igual grupo humano ( $p=0,0129$ ); entre el 12q 15-24.1 y los caucásicos e hispanos ( $p=0,0042$ ) y entre el RcT  $\alpha\delta$  en el 14q 11.2 y los caucásicos ( $p=0,0062$ ).

Otras 7 nuevas regiones muestran ligamentos en el asma bronquial: en el 5p 15 y en el 17p 11.1 y 11.2 en afro-americanos ( $p=0,0008$  y  $p=0,0015$ , respectivamente); en el 11p 15, 13q 21.3-qter y 19q 13 en caucásicos ( $p=0,0089$ ,  $0,0014$  y  $0,0013$ , respectivamente), y en el 2q 13 y en el 21q 12 en hispanos ( $p=0,0005$  y  $p=0,004$ , respectivamente).

Hizawa en 1998, halló 2 nuevas regiones que controlan la respuesta de la IgE contra el ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* en el cromosoma 2q 21q-23 y el 8p 23-p21 ( $p=0,0033$  y  $p=0,0011$ , respectivamente), en caucásicos y afro-americanos. Con anterioridad, esas regiones eran la 6p 21 y 13q 32-q34 ( $p=0,0064$  para ambas) para los caucásicos y el 5q 23-q33 ( $p=0,0071$ ) para los afro-americanos. Los aspectos genéticos de la polinosis también fueron exhaustivamente estudiados. Los pólenes de las variedades de *Ambrosia* y de *Lolium* atrajeron la atención de los investigadores. Con respecto a estos últimos que serán motivo de uno de los proyectos a presentar, los Lol p I, Lol p II y Lol p III, están estrechamente vinculados con el HLA-DR ( $\alpha\beta-1^* 0301$ ) o el DR3 (w17). Es posible que exista un sitio de unión en la molécula del CMH para los 3 alérgenos que permita una concordancia entre esos 3 epitopes y el DR3. La respuesta al Lol p III está relacionada con el DR ( $\alpha\beta-1^* 1101$ ) y con el DR ( $\alpha\beta-1^* 1301$ ) con una secuencia de 5 aminoácidos en el primer dominio de la primera región hipervariable. El análisis molecular de los genes DRB1, DRB3, DQA y DQB sugiere que esta secuencia es imprescindible para la presentación de Lol p I, Lol p II y Lol p III. Niños alemanes con altos niveles de IgE sérica total tienen estrecha relación con el cromosoma 12q15-q24.1. En los últimos años, se han detectado aspectos de la genética del asma bronquial, que señalan 1): la desmetilación de secuencias que unen el GATA al promotor del gen de la IL-4 con la hiper-producción de la misma, y, 2): la acetilación de las histonas H3-K9 y H3-K4 con efecto sobre los LTCD4-Th2, y sobre los genes de las IL-5 e IL-13 con su hiper-producción, y las consecuencias en el cuadro clínico de los pacientes. (91-92).

### 3. Una molécula efectora, la inmunoglobulina E (IgE).

Fue aislada y caracterizada separadamente por Bennich y Johansson en Suecia, y por el matrimonio Ishisaka en los EE.UU., en los tramos finales de la década del 60 (1966-1967). Durante los años anteriores, las propiedades "reagínicas" de los sueros de los atópicos fueron atribuidas a la IgG y a la IgA, en el mejor de los casos, y a factores casi esotéricos en su mayoría. Este hallazgo se transformó en un hito para el estudio responsable de la hipersensibilidad anafiláctica y del estado atópico del 15% de la población mundial.

La molécula glucoproteica de IgE existe en todos los seres humanos siendo escasos en la literatura los casos de deficiencia. Se halla notablemente aumentada en el suero sanguíneo y en las secreciones de los atópicos constituyendo un marcador genético de tal condición. Sin embargo, las parasitosis a nematodos también inducen su síntesis, posiblemente, porque los epitopes antigénicos de estos helmintos estimulan la producción y liberación de IL-4, citoquina crucial para el switch isotópico a IgE.

La IgE, con sus 190 kDa, no posee bisagra y presenta un dominio más (5) en la cadena pesada al igual que la IgM. Se sintetiza y segrega intensamente por los plasmocitos de la intimidad de las mucosas respiratoria, digestiva y genitourinaria, y escasamente, por

aquellos del bazo, sangre periférica y ganglios regionales. Sus niveles séricos normales no exceden las 100 KU/L ó 250 ng/ml, pudiendo alcanzar hasta 10 ó 15 veces esos valores en los atópicos. En los niños prepuberales y adolescentes, estos valores sufren influencias tímicas notables y exponen una curva en dromedario, por lo cual, los desvíos estándares escapan a los valores señalados más arriba propios del adulto inmunológicamente estable. Los valores séricos elevados sólo aseveran que se está en presencia de un cuadro clínico cuya génesis atópica es altamente probable, más aún, si se han descartado los falsos positivos del incremento de la IgE (v.g. parasitosis; virosis agudas; enfermedades autoinmunes órgano-específicas). La historia clínica al analizar los antecedentes personales y familiares del sujeto hará el resto. No se deben sacar conclusiones precipitadas ni tampoco sentenciar que, a niveles más elevados de IgE, peor cuadro clínico y pronóstico, si bien está razonablemente probado que los logaritmos de los niveles séricos de la IgE se correlacionan estrechamente con los de la severidad de la enfermedad pulmonar. (93-94-95).

### 3.1.- Sus receptores específicos.

Hasta no hace muchos años poco era lo que se sabía de la ligazón de la IgE a sus receptores específicos épsilon (RFcε). El efecto de la reagina se concebía de muy diversas maneras, y por ello, durante una década se pensó que la hiperproducción de la IgE condicionaba la gravedad del cuadro. El descubrimiento de los receptores para esta inmunoglobulina permitió entender que los niveles séricos sólo expresaban la condición de atopia; que eran independientes de la gravedad del padecimiento; que no eran proféticos en cuánto al pronóstico, y que, sólo se modificaban en forma estable aunque no permanente durante la inmunoterapia específica de largo tratamiento.

Más bien, la intensidad del cuadro clínico dependería del número de receptores ocupados por una determinada IgE, y de las probabilidades más o menos cercanas y certeras de que dicho alérgeno ocupe los Fab respectivos, sin minimizar la actividad linfocitaria y sus citoquinas.

Los receptores para el Fc de la IgE (cadena épsilon) se dividen en 2 grupos muy importantes: los de alta y los de baja afinidad. Los primeros se hallan en los mastocitos y en los granulocitos basófilos y su estructura general corresponde a la de los integrantes de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Consta de 3 subunidades: la alfa, la beta y la gamma. La alfa atrapa a la IgE; la beta posee 4 tramos transmembránicos y la gamma es un dímero covalente.

La cadena alfa es distinta de aquella que se encuentra en el receptor Fcγ3 (los receptores para la IgG son el Fcγ1 (CD64), el Fcγ2 (CD32) y el Fcγ3 (CD16) siendo el primero el de mayor afinidad para la IgG, y frecuente en monocitos/macrófagos.

Por su parte, los de baja afinidad (CD23) están compuestos por una alfa-helicoides de 45 kDa que, a diferencia del anterior, es una asialoglicoproteína que reconoce secuencias no glicosiladas, y que se hallan en los LB (Fcε 2a) y en los macrófagos, plaquetas, eosinófilos, y LB estimulados por la IL-4 (Fcε 2b).

La reacción entre el alérgeno y la IgE unida a sus receptores FcεI precipita la degranulación de mastocitos y de basófilos con liberación de sustancias vasoactivas como la histamina y los leucotrienes. La actividad de éstos sobre los vasos sanguíneos capilares, arteriolas y venulares; sobre las células musculares lisas; sobre las glándulas mucíparas

de los epitelios con hipercrinia y discrinia; la producción de edema de las mucosas y la generación de péptidos quimiotácticos para células inflamatorias son los responsables de las manifestaciones clínicas que caracterizan a los fenómenos de hipersensibilidad del tipo I (alergia atópica).

La biología molecular aplicada a la genética posibilitó estudiar y conocer más estrechamente las relaciones entre la molécula glucoproteica de la IgE y los receptores de alta y de baja afinidad.

Así, el clonado del gene épsilon y varios fragmentos recombinantes obtenidos en *Escherichia coli* permitieron detectar las secuencias aminoacídicas del Fc de la IgE que se unen a ambos receptores, por medio de una clásica prueba como la Prausnitz-Küstner, cuya inhibición diagnosticó con certeza al fragmento involucrado estrechamente con el receptor.

De tal manera, los fragmentos obtenidos se inocularon en la piel sana de un sujeto no atópico posibilitando que se unieran (o no) a los receptores mastocitarios de alta afinidad de dicha piel.

Una hora después, se inoculó en la misma zona suero humano atópico, críticamente seleccionado y libre de agentes infecciosos, muy sensible al polen de Ambrosia; al día siguiente, se desencadenó la reacción inyectando en la misma región el antígeno específico, o sea, el polen de Ambrosia en las dosis y concentraciones convencionalmente empleadas.

Una reacción positiva a los 20 minutos, se valoró por la producción de eritema y pápula en la zona de las inoculaciones, señalando que el antígeno se unió a su anticuerpo específico, pero el fragmento recombinante NO. Por el contrario, un resultado negativo ratifica que dicho fragmento se unió al receptor e impidió que la IgE anti-Ambrosia del atópico se adsorbiera al receptor porque éste estaba ocupado competitivamente con antelación.

Los fragmentos recombinantes del Fc-épsilon obtenidos son: el rE 2-4 del CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>-CH<sub>4</sub>; el rE 2'-4 de la porción C00H terminal del anterior; el rE 2-3 del CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>; el rE 2'-3' del segmento de unión entre CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>; el rE 4 del CH<sub>4</sub>; el rR2 del CH<sub>2</sub> y el rE 3-4 del CH<sub>3</sub> y CH<sub>4</sub>.

Luego de practicar la Prausnitz-Küstner compuesta por fragmentos de la IgE más suero atópico más alergeno (o atopeno), se pudo concluir que, el fragmento rE 2'-3', que corresponde al segmento de unión entre los dominios CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> de 67 aminoácidos (301/367) es el péptido de la molécula de IgE que se une a la cadena alfa del receptor de alta afinidad o de tipo I.

El dominio CH<sub>3</sub> de 9 aminoácido (362/370) se une a los receptores de baja afinidad o tipo 2 o II o CD23 en las pruebas realizadas con los LB. Este CD23 es una glucoproteína de 45 kDa que además de comportarse como receptor, presenta una importancia trascendente en la regulación de la síntesis de la IgE. Hasta cierto punto, parece ser idéntico a los llamados "factores reguladores o de unión" (binding-factors) de la IgE. El CD23 presenta 2 isoformas: la A existente sólo en los LB, y la B en monocitos/macrófagos, plaquetas, eosinófilos, y LB estimulados por la IL-4. Está constituido por un simple dominio intramembranoso y una alfa-hélice que muestra en sus extremos 2 dominios homólogos de lectinas.

Las lectinas se unen al fragmento CH<sub>3</sub> de la IgE. El CD23 de 45 kDa se autocliva en proteínas de menor peso molecular (37 kDa; 33 kDa; 29 kDa y 25 kDa) que están relacionados con la regulación de la síntesis de la IgE.

Se postula un modelo en el que el CD23 se constituya en un punto de retroalimentación en la regulación de la producción de IgE pudiendo ser éste negativo o positivo, según que la

IgE se halle libre (o en exceso) o unida al antígeno. El CD23 expresado en la membrana del LB determina la dirección de la respuesta a favor o en contra de la síntesis de la IgE estimulada por la presencia del antígeno; la producción intermedia y transitoria de IgE como consecuencia del clivaje del CD23 de la membrana no promueve estrictamente la producción de IgE en forma directa, pero sí modifica sustancialmente el resultado de la respuesta.

La participación de otras moléculas, tales como, el CD40 y el CD72 en la producción de IgE en relación con la expresión y liberación del CD23 parece ser importante. En suma, el CD23 es una molécula que traduce señales al interior del LB y su enganche al LT por una estructura complementaria contribuye a programar a LB vírgenes para la síntesis de la IgE. La interrupción de esta serie de interacciones celulares y moleculares podría ser de gran utilidad para interferir la producción de IgE.

Adsorbida a receptores específicos de alta afinidad en la membrana celular de mastocitos y de basófilos, la llegada del antígeno específico forma un “puente” entre 2 moléculas cercanas o contiguas, que, al igual que colocar los 2 dedos en un enchufe, provoca una serie de perturbaciones físicas en la membrana plasmática que obran como una señal de activación para el interior del citoplasma celular.

No sólo el antígeno específico puede provocar ligazones entre moléculas de IgE anidadas en sus receptores específicos; así, una IgG-anti-IgE de novedoso estudio en el presente; un anticuerpo anti-idiotipo; un anticuerpo antirreceptor; una IgE mielomatosa y hasta una lectina pueden activar y desgranular al mastocito. Polipéptidos derivados de fragmentos del complemento (v.g. C3a y C5a); fármacos como la codeína, la morfina, el ACTH, la polimixina, los medios de contraste yodado; varias citoquinas; los llamados factores liberadores de histamina (HRF); agentes físicos y químicos variados, y ciertos neuropéptidos (v.g. sustancia P y neurotaquikinas son capaces de desgranular a mastocitos y basófilos).

Se deduce que la clínica resultante de esta activación **puede o no** tener un origen inmunológico: este concepto prínceps se olvida muchas veces.

Estos cambios físicos y químicos tempranos llevan a la formación de canales que permiten la entrada del  $Ca^{++}$  que es necesario para amplificar los pasos de esta activación inicial. El incremento del calcio intracelular es el principal estímulo para la fosfolipasa  $A_2$ . Esta poderosa enzima liberará de los fosfolípidos de la membrana, importantes cantidades de ácido araquidónico, el que a su vez, generará leucotrienos y prostaglandinas por la actividad de sistemas enzimáticos como el de la ciclooxigenasa y el de la lipooxigenasa, respectivamente. Las modificaciones de los lípidos de la membrana producen también la activación de la adenilatociclasa, la que a su vez, produce el desdoblamiento del ATP (adenosina-trifosfato) en ADP (adenosina-difosfato), y en AMPc (adenosina-mono-fosfato-cíclico). El incremento de éste es rápido, pero transitorio como un pico máximo a los 15 seg. y una vuelta a la normalidad a los 60.

Este AMPc activa a proteinquinatas que son muy importantes para fosforilar a los residuos de serina y de treonina de todas las proteínas adsorbidas a las membranas que componen los sacos y vesículas intracitoplasmáticas, así como, a las membranas de los gránulos que contienen a los mediadores químicos conocidos.

Esta activación produce cambios en las membranas de los gránulos haciéndolas más permeables al medio circundante –siempre dentro de la célula- y por ello ganan en agua y

electrolitos y aumentan levemente de tamaño y adquieren la tendencia a fusionarse posiblemente por disminución de la tensión superficial y la carga iónica entre las superficies en contacto.

Así, los gránulos se aproximan entre sí y comienzan muy lentamente a moverse y desplazarse hacia la periferia. Pero este fenómeno no es un hecho pasivo; muy por el contrario es un activo proceso en el cual están involucradas proteínas, tales como; la actina y la miosina, que, de igual forma que en el tejido muscular, promueven la formación de microfilamentos y de microtúbulos, que llevan “de la mano” a los gránulos fusionados o no a la periferia citoplasmática. La entrada del  $\text{Ca}^{++}$  es acompañado por un desplazamiento de los orgánulos citoplasmáticos, lo que lleva en algunos lugares a una fusión de las membranas. Este proceso es complementado por la acción de microfilamentos que promueven la exocitosis del material granular, entero en la rata, parcialmente disuelto en el hombre, y totalmente disuelto en el cobayo y en el perro.

Todos estos procesos requieren un suplemento energético importante, ya que pueden ser bloqueados por todos aquellos agentes que interfieren el metabolismo glucosídico (2-deoxiglucosa, yodo acetato, antimicina, etc.)

El empleo del ionóforo A 23.187 permitió demostrar fehacientemente la participación del  $\text{Ca}^{++}$  en la liberación de mediadores. Este antibiótico soluble en lípidos que transporta  $\text{Ca}^{++}$  a través de las membranas ha demostrado ser útil en el movimiento del ión de fuera a adentro, y viceversa, en cualquier célula. En los mastocitos, el ionóforo causa liberación de histamina y cambios ultraestructurales similares a aquellos producidos por la interacción antígeno-anticuerpo.

En la prueba de dosis-respuesta, una concentración similar del ionóforo A 23.187 en presencia de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$   $10^{-3}$  M produce una liberación de histamina del orden de  $1 \times 10^{-7}$  a partir de los mastocitos de la rata, del cobayo y del hombre.

Los gránulos de los basófilos son grandes, escasos, con una matriz homogénea y densa y envueltos en una sola membrana, mientras que los de los mastocitos aparecen con una estructura cristalina, menos densa, a veces dispuesta en anillo o en espiral. De tal manera, se produce la exocitosis de los gránulos enteros y/o parcialmente alterados en su estructura con filtraciones de sus contenidos al exterior; por ello es que no debe pensarse que el mastocito estalla sino que sólo evacua su contenido (tampoco en forma completa), y adopta una actitud quiescente hasta tanto recupere su estado anterior funcionalmente pleno, y con gránulos maduros (recuérdese que la histamina deriva del aminoácido histidina por acción de una histidin-decarboxilasa, y que es almacenada en estructuras saculares).

### 3.2. Factores liberadores de histamina (FLH: HRF: Histamine releasing factors).

Los LT juegan un papel crucial en las reacciones alérgicas del tipo I, considerando su ascendiente sobre la regulación de la síntesis de la IgE (molécula efectora por excelencia en este tipo de hipersensibilidad) por parte de los plasmocitos (cooperación T-B), así como, su acción sobre la maduración y diferenciación de mastocitos y basófilos. En 1974, Dvorak fue el primero que postuló que estos linfocitos activaban directamente a los mastocitos y a los basófilos en aquellas reacciones de hipersensibilidad tardía que él estaba estudiando. A posteriori, en 1979, Thueson señaló la existencia de un factor o de factores en los sobrenadantes de mononucleares estimulados por la estreptoquinasa, que a su vez,

inducían a los basófilos a liberar histamina y bautizó a esos factores como liberadores de histamina o con actividad liberadora de histamina. (FLH). Esta actividad fue demostrada también en los LB, LT, macrófagos alveolares, neutrófilos, plaquetas, células endoteliales, lavado nasal y broncoalveolar de asmáticos atópicos.

Las células mononucleadas producen FLH espontáneamente o por la estimulación con antígenos bacterianos, mitógenos convencionales y alérgenos específicos. La producción de FLH comienza 4 horas después del estímulo inicial y cesa a las 36 horas. Sus pesos moleculares varían entre 13 y 90 kDa, sin embargo, la mayoría de los estudios sitúan la mayor actividad a menor peso (entre 10-18 kDa; 25-45 kDa y 45-75 kDa).

Baeza en 1990, purificó y caracterizó a los FLH en 3 picos con pesos de 10-12 kDa, 15-17 kDa y 41 kDa, respectivamente, y, con una estructura química muy parecida al péptido III activador del tejido conectivo derivado de las plaquetas.

En 1992, Alam caracterizó a una nueva citoquina a la que designó factor activador y quimiotáctico para los monocitos (FAQM), que posee también una gran actividad sobre los basófilos como los FLH. El FAQM purificado tiene un peso molecular de 8 kDa mientras que, en estado nativo pesa 12-14 kDa, lo cual lleva a pensar que representa una forma menor de FLH. El número de receptores para el FAQM en los basófilos se estima en 130 por célula.

Otros experimentos demostraron que las IL-3; IL-6; IL-7; el FNT-alfa y el FSC-GM inducían separadamente el 10% de la liberación de histamina de los basófilos, y que todas las citoquinas juntas tan sólo alcanzaban el 20%. Por lo tanto, si bien se admite que estas citoquinas tienen un leve efecto histaminoliberador, los FLH tienen características propias e individuales, y, son otras citoquinas diferentes a las conocidas. El mecanismo por el cual los FLH ejercen su acción permanece oscuro y es fruto de atrayentes investigaciones; por otro lado, la dexametasona inhibe totalmente la producción de FLH mientras que la teofilina lo hace parcialmente. Ni la epinefrina ni los antihistamínicos anti-H<sub>1</sub> y anti-H<sub>2</sub> afectan la producción de los FLH.

Recientemente, el cuantificar la producción de y la respuesta a los FLH en los pacientes asmáticos fue de particular interés e importancia para establecer la severidad del asma bronquial y la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos. Está probado que los asmáticos atópicos producen y liberan más cantidad de FLH que los asmáticos no-atópicos, y que, este desnivel se corrige, por lo menos, transitoriamente, con dicha inmunoterapia. De tal manera, que la medición de los FLH puede ser útil para documentar la eficacia de esa terapéutica planeando su continuación y/o finalización.

Otro hecho de significación registrado es aquel que certifica que, en el estudio de la alergia a los medicamentos, y en el eccema atópico, la instauración de una dieta de exclusión, conduce a una disminución en la producción de los FLH. No está demostrado que estos factores tengan relación directa con el ingreso de Ca<sup>++</sup> a la célula ni con la actividad de la calcio-calmodulina, que a su vez, activa las enzimas dependientes de ella, mencionadas con antelación.

#### 4.- Los mastocitos en la hipersensibilidad.

Son células conectivas receptoras/secretoras de monoaminas y fueron sospechadas como "paraneuronas" (Fujita, 1977 y Kitamura 1979). Se asocian con las fibras nerviosas en los

tejidos normales y con las células de Schwann. En los urodeles (*Triturus pyrogaster*) poseen dendritas, que son abundantes en el sistema nervioso central humano cerca de los capilares, las meninges y los ventrículos, donde se detectan ambos tipos de mastocitos (Tc y MTc) con gránulos unidos a los sacos membranosos del Golgi. Se acepta su origen mesenquimático a partir de la célula stem o hemocitoblasto o célula reticular primitiva (CD34+) siendo su factor de crecimiento (SCF) o factor stem-cell producido por fibroblastos y células endoteliales. El kit-ligando o factor steel es el receptor para el SCF, y es una tirosina-kinasa c-kit (CD117) que lo expresa durante toda su vida a diferencia del basófilo que lo pierde al diferenciarse. La circulación y acumulación de mastocitos depende de su interacción con el endotelio por moléculas de adhesión (integrina  $\alpha 4\beta 7$ , la adreína MadCAM-1, la VCAM-1 y receptores de la familia del supergene de las inmunoglobulinas). La serotonina es quimiotáctica para los mastocitos lo que aconseja el empleo de fármacos antiserotoninicos (ciproheptadina). Nobleza obliga citar los trabajos pioneros de la década de 1970 de Pedro A. Colombi (1909-1975) y Angel Alonso, con difenilhidramina, ciproheptadina, el maleato de methylpiperidylidene-thioxantene (HS592) y el “antamínico” clemastine (BP400) como inhibidores de la histamina, la serotonina, la bradiquinina y la SRS-A (sustancia de reacción lenta) o leucotrienes. Está demostrada la acción de la IL-3, el RANTES, la MCP-1, las C-X-C, el PF-4, la laminina, la vitronectina y la fibronectina sobre los mastocitos. Participan en la **RIC** (respuesta inmune connatural), pues pueden fagocitar bacterias (*Salmonella typhi*) estimulados por el LPS a través de los receptores Toll, activan el complemento por la vía alterna, e incorporan virus y parásitos, que quedan a merced de sus proteasas, prostanoïdes, citoquinas y catelicidinas líticas para Gram-positivos y negativos. También deterioran toxinas de los venenos de Hymenópteros y de ofidios. Activan la síntesis del colágeno y contribuyen a la tolerancia de los aloinjertos. Son muy sensibles al NGF (nerve growth factor) que es importante en el estrés humano. El nivel sérico del NGF está  **aumentado** en la queratoconjuntivitis vernal, en el asma bronquial y en la urticaria aguda. Se correlaciona con el infiltrado celular de mastocitos, eosinófilos y linfocitos, y, también con alteraciones psicológicas como la ansiedad, la agresividad, el alcoholismo y la abstinencia a drogas. El NGF desgranula violentamente al mastocito, aumenta su supervivencia y estimula su proliferación y su síntesis en un feed-back positivo para ejercer efectos más distantes sobre los LB de memoria, y otras células hematopoyéticas. Los valores del NGF **descienden** en el estrés crónico pues se sintetizan auto-anticuerpos que lo anulan por un mecanismo aún desconocido. Similares efectos se constataron con la SP, lo que refuerza el efecto de los **neuropéptidos** (NPO) sobre los mastocitos sin mediar un anticuerpo específico, lo cual explicaría las desgranulaciones explosivas ante agentes “inespecíficos” (cuadros anafilactoïdes por medios de contraste yodado, ciertos fármacos, aditivos alimentarios, algunos cosméticos y elementos industriales). Se podría señalar que el estrés **agudo** jugaría un papel destacado en la **RIC** mientras que el crónico no, y, por el contrario, en la **RIA** (respuesta inmune adaptativa) sería preponderante el estrés **crónico** y no el agudo. Quizás el tiempo necesario para producir cambios bioquímicos sea la clave para el diferente impacto del estrés sobre el sistema inmune. Por otro lado, el estrés **crónico** podría tener algún efecto sobre el estado atópico habida cuenta de la actividad sostenida de numerosos NPO sobre los mastocitos y otras células involucradas. De ahí la preferencia de fármacos con acción central que minimizan a los NPO mientras que los que no la tienen inhiben sólo a IL-4, IL-6, IL-8, IL-13 y P-selectina y no a los

NPO. Estas grandes células metacromáticas constituyen un grupo heterogéneo y multifuncional, que participa en las enfermedades alérgicas, parasitarias, en la angiogénesis y en remodelación tisular. Estos mastzellen de Erlich (1878) presentan gránulos citoplasmáticos con heparina e histamina (no hay serotonina en los mastocitos humanos), poderosas enzimas que facilitan su diagnóstico, y proveen una fuente importante de activos principios proinflamatorios como los sulfolípidos o leucotrienos.

Se acepta la existencia de 2 tipos o subpoblaciones de mastocitos de acuerdo al contenido enzimático; así, se bautiza MCt al mastocito que contiene sólo triptasa (10 pg/célula), que se asocia estrechamente al sistema inmune ("inmunodependencia" o "LT-dependencia"), geográficamente ubicado en las mucosas, en los sitios de activación de LTCD4-Th2, con notable incremento en las afecciones alérgicas y parasitarias y llamativa ausencia en el SIDA, y en las enfermedades crónicas que cursan con diversos grados de inmunodeficiencia (¿falta de niveles adecuados de citoquinas?), y, como MCtc al que contiene triptasa (35 pg/célula), quimasa (5 pg/célula), carboxipeptidasa (15 pg/célula) y catepsina-G (12 pg/célula), muy predominante en el tejido conectivo profundo, y en las enfermedades ricas en fibrosis con escasa participación en la alergia, las parasitosis e inmunodeficiencias primarias o secundarias (mastocito plétórico e indiferente).

Estas células ricas en receptores de alta afinidad para la IgE (RfC-épsilon-I) también poseen receptores para el factor stem o receptor c-kit, para el elemento madurador proveniente de la célula totipotencial de la médula ósea. El factor stem es sinónimo del factor Steel. Si bien la preponderancia de un subtipo sobre el otro demuestra una distribución tisular diferente, en todos los casos, coexisten armoniosamente ambas subpoblaciones de mastocitos en un mismo lugar.

Los mastocitos de la piel expresan CD88 que es el receptor para la anafilotoxina II o C5a, lo cual establece una conexión inexorable entre activación del sistema complemento y de estos mastocitos. Además, son sensibles a influencias no inmunológicas como la morfina, codeína y relajantes musculares, que inducen su rápida y peligrosa desgranulación. Con muchos otros fármacos y neuropéptidos endógenos se constituye un gran grupo de elementos inespecíficos que desgranulan al mastocito y generan las reacciones anafilactoideas.

No quedan dudas de que los mastocitos son el pivote de los fenómenos de hipersensibilidad inmediata o reagínica o IgE dependiente (tipo I de Gell & Coombs). Sin embargo, su ubicua distribución en todo el organismo y su predilección por disponerse alrededor de los vasos sanguíneos, convierte a dichas células en verdaderas "farmacopeas" ambulantes, por su importante contenido en aminos biógenos, enzimas, leucotrienos y citoquinas.

Además de su destacada participación en la rinitis atópica, en el asma bronquial y en la urticaria crónica, intervienen en condiciones inflamatorias tales como, la artritis reumatoidea, la cistitis intersticial, el "colon irritable", la sarcoidosis, la asbestosis, el espasmo coronario, los queloides, la enfermedad injerto vs. huésped crónica, la esclerodermia y la fibrosis pulmonar y hepática.

Se sospecha una interrelación estrecha entre los mastocitos y los fibroblastos; la histamina incrementa la proliferación de estos últimos con activa síntesis de colágeno mientras que la triptasa y la quimasa digieren a los componentes de la matriz extracelular. El factor de necrosis tumoral alfa, la IL-4 y el factor de crecimiento para fibroblastos contribuyen a sintetizar colágeno; el propio mastocito elabora su tipo VIII de colágeno no fibrilar de cadena corta que forma un parapeto en la matriz extracelular.

Se asume que el mastocito de la mucosa respiratoria al ser degranulado por activación inmunológica y no inmunológica libera histamina, leucotrienos, enzimas y citoquinas, que van a generar cambios a nivel vascular (vasodilatación), gran secreción de mucus, constricción del músculo liso bronquial y estimulación nerviosa (fibras C). De tal manera, la activación de numerosos grupos celulares es la regla; así, los leucocitos se mueven desde los vasos hacia el conectivo por medio de un proceso activo donde las moléculas de adhesión del endotelio vascular, por un lado, y de la matriz extracelular de la célula, por el otro, juegan un papel trascendental en la adhesión, transmigración y activación de los fagocitos. Del compartimiento intravascular las células inflamatorias se trasladan al sector extravascular para acudir en respuesta al estímulo infeccioso, inmunológico y no inmunológico.

Los efectos de la histamina son de corta duración (1-2 min.) por ser metabolizada rápidamente por una N-metiltransferasa, y por la histaminasa (diamino-oxidasa).

La heparina, que estabiliza la forma tetramérica de la triptasa, ejerce efectos anticoagulantes e indirectamente anticomplemento, antikalikreína, secuestra a la proteína básica del eosinófilo, estimula la unión a la fibronectina y las actividades de varios factores de crecimiento.

La triptasa presenta 2 formas, una alfa asociada a la mastocitosis, y otra beta propia de las enfermedades alérgicas (dosable por RIA en la actualidad). Esta enzima facilita el clivaje de péptidos broncodilatadores (el VIP y el péptido histidina-metionina), vasodilatadores (péptido relacionado con el gene de la calcitonina), pero no broncoconstrictores como la sustancia P, lo cual, da lugar a la hipótesis del desbalance entre neuropéptidos que llevaría a la hiperreactividad bronquial. También posibilita la sensibilización del músculo bronquial a los agentes que lo contraen; expone una actividad kalikreína-simil con clivaje de la matriz extracelular a nivel de los tipos IV y VI del colágeno y de la fibronectina, incita la actividad mitogénica de los fibroblastos y de las células epiteliales; estimula la liberación de IL-8 de los polinucleares neutrófilos, y, por último, induce una marcada expresión de ICAM-1 por parte de las células epiteliales. En ausencia de heparina, esta triptasa se desdobra prontamente en sus monómeros inactivos.

La quimasa (codificada en el cromosoma 14) es una proteasa monomérica que degrada a la neurotensina, pero no al VIP ni a la sustancia P. Cliva a la angiotensina I en II muy rápida y eficientemente lo cual justifica su papel en el control de la circulación coronaria. Rompe la unión dermoepidérmica y remodela el colágeno. Degrada a la IL-4.

La carboxipeptidasa y la catepsina-G codifican en el cromosoma 14q11.2 y actúan sinérgicamente con las otras enzimas degradando proteínas y los residuos carboxilo terminales de péptidos tales como la angiotensina, la leu-encefalina, la kinetensina, la neuromedina-N y la neurotensina.

Las citoquinas mastocitarias son las IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF, factor de necrosis tumoral alfa, IL-8, RANTES e IL-13, según el orden de importancia, que, promueven notables cambios en la funcionalidad de otras células de la mucosa respiratoria.

Estas citoquinas son muy rápidamente generadas y segregadas luego de la estimulación del receptor de alta afinidad para el Fc de la cadena pesada épsilon (IgE). Algunas de ellas son responsables de la activación de los factores nucleares de transcripción (NF-kB) que se unen a los promotores de los genes de otras citoquinas, que regulados por elementos cis-proximales y cis-distales inducen la síntesis final. El receptor épsilon-I posee unidades alfa, beta y gamma, donde las 2 últimas contienen un ITAM (o ARAM o motivo asociado al

antígeno) que los une a las tirosina-quinasa Lyn y Syk, produciendo su fosforilación, la hidrólisis del fosfatidilinositol y la activación de la proteinquinasa-C. (93-94-95-96).

Otras proteínas también son fosforiladas por Syk, como Vav, HS1, NcK, FAK, FAP y Paxilin, que regulan la ulterior secreción de gránulos y activación de la fosfolipasa A2, que, con el aumento del calcio, genera leucotrienes, tromboxanos y prostaglandinas. Queda cerrado así, el círculo que une a células y a moléculas efectoras en una inflamación de origen inmunológico, como lo son las generadas en los atópicos por la IgE. Todas aquellas medidas que tiendan a minimizar este mecanismo de cronificación perversa serán bienvenidos (v.g. antagonistas o reguladores farmacológicos, inmunoterapia específica, etc.).

#### 4.1.- Receptores para la histamina.

Las acciones de esta amina biógena son mediadas por 3 diferentes receptores que poseen actividades bien definidas. Los más importantes efectos en las enfermedades alérgicas son a través del receptor H1. Ellos incluyen la contracción del músculo liso; el aumento de la permeabilidad capilar; el prurito; la generación de prostaglandinas; la disminución del tiempo de conducción atrioventricular con producción de taquicardia; la activación de los reflejos vagales e incremento del monofosfato de guanosina-cíclico (GMPc).

El receptor H2 se relaciona con la secreción del jugo gástrico; con el incremento de la secreción del mucus bronquial ya que el nasal está bajo control muscarínico y H1; con el aumento del AMPc; con la contracción esofágica; con la inhibición de la liberación de histamina por los basófilos, pero no por los mastocitos; con la anulación de la activación de los neutrófilos y con la inducción de LT supresores.

El tercer receptor que se encuentra en el tejido nervioso podría actuar como un retroalimentador negativo en la síntesis de la histamina. La estimulación combinada de los H1 y H2 conduce a la hipotensión, el enrojecimiento cutáneo y la intensa cefalea.

En la rinitis alérgica atópica los mediadores que actúan son: en la obstrucción nasal (edema de la mucosa) la histamina (H1), los leucotrienes C4, D4 y E4 y las kininas; en el prurito (estimulación nerviosa sensorial) la histamina (H1) y las prostaglandinas; en los estornudos (estimulación nerviosa sensorial), la histamina (H1) y los leucotrienes C4, D4 y E4; sobre la rinohidrorrea (hipercrinia y discrinia), la histamina indirectamente por una descarga muscarínica y los leucotrienes C4, D4 y E4; sobre la congestión e hiperirritabilidad (fase tardía), los factores quimiotácticos para los eosinófilos y neutrófilos y los eicosanoides. Está demostrado que la histamina es el principal mediador de esta patología, pero no el único. Por su parte, en la urticaria participan: en la roncha o pápula (aumento de la permeabilidad vascular), la histamina (H1), la prostaglandina D2, la bradiquinina, el PAF y los leucotrienes C4, D4 y E4; en el eritema o enrojecimiento cutáneo (vasodilatación), los mismos que antes, pero todas las prostaglandinas; en el prurito (estimulación sensorial nerviosa) es patrimonio de la histamina (H1). Finalmente, en la anafilaxia, son responsables la histamina y los eicosanoides de la permeabilidad vascular, la vasodilatación, la hipersecreción mucosa, la taquicardia y las arritmias, la hipotensión, y hasta el edema laríngeo o intestinal. De no tratarse el colapso con adrenalina 1% el óbito es una posibilidad segura.

#### 4.2.- Neuropeptidos, inflamación inmuno-alérgica y mastocitos.

En el último decenio, la EAACI (European Academy of Allergy & Clinical Immunology), analizó la nomenclatura de la fenomenología alérgica distinguiendo la **alergia-atópica** (IgE-dependiente o hipersensibilidad del tipo I de Gell & Coombs) y la **alergia-no atópica** no vinculada con una inmunoglobulina en particular ni tampoco con un mecanismo biomolecular o celular puntualmente descrito y relacionado con una serie de hallazgos inflamatorios que producen el cuadro clínico del paciente. Por ello, pareció de interés reconsiderar todos los factores que están involucrados en el paciente atópico y en el no-atópico más allá de los clásicamente aceptados.

Numerosa información documentó las conexiones **neuroinmunes**. Esta intercomunicación bidireccional (“daily cross-talk”) se desarrolla por las hormonas, las señales paracrinas y el contacto directo entre las fibras nerviosas y las células inmunes.

Las pruebas de esta neurotransmisión provienen de los estudios de la inervación postganglionar noradrenérgica (NA) de los órganos linfáticos secundarios.

Se demostró: 1): la presencia de fibras nerviosas de NA en órganos linfáticos primarios y secundarios; 2): la liberación de norepinefrina (NE) para la interacción con los adrenoreceptores en las células blanco; 3): adrenoreceptores en LB, LT, macrófagos y granulocitos, y, 4): el papel de la NE modulando las respuestas inmunes.

También, los neuropeptidos inducen cambios en las funciones inmunes y la inervación peptidérgica de los órganos linfáticos fue demostrada. Receptores para el VIP (péptido intestinal vasoactivo) se detectaron en los monocitos y LT humanos y en los LB y LT murinos. En todos una protein-kinasa dependiente del AMPc resultó activada. El **VIP** (28 aminoácidos) es un miembro de la familia del liberador hormonal de la secretina- glucagón-corticotrofina con localización en el sistema nervioso central, periférico y entérico. Las terminaciones que lo liberan están presentes en tejidos de los mamíferos y en contacto con células neuronales, epiteliales, endocrinas, vasculares, musculares e inmunes lo que sugiere un papel trascendente en la fisiopatología de los sistemas neuroendocrinos e inmune. El gene humano para el prepro-VIP que se codifica como precursor para el **VIP** y para el **PHM** o el péptido de 27-amino-histidina-metionina consiste en 9000 pares de bases distribuidas en 7 exones del cromosoma 6p21→6qter, y es sometido a regulación transcripcional por el AMPc. Inhibe la proliferación mitogénica de los LT, la actividad de las NKC (células asesinas naturales), modifica la síntesis de anticuerpos e influye sobre la migración de los LT al GALT o tejido linfoideo asociado al intestino y a los ganglios linfáticos mesentéricos. Juega un papel en la vasodilatación que acompaña a los procesos inflamatorios, especialmente los del tipo I de Gell & Coombs. Los receptores para la **substancia P (SP)** se detectaron en linfocitos murinos y humanos, en los mastocitos de la rata y en los macrófagos de los cobayos. La **SP** activa los mecanismos del fosfatidil-inositol, de la proteín-kinasa-C y de la movilización del calcio. Los receptores de los LT para la **SP** son diferentes de aquellos de los mastocitos por su porción carboxilo-terminal mientras que la porción aminoácido-terminal es la necesaria para activar a los receptores mastocitarios. La **SP** estimula la mitogénesis de los LT y la liberación de los mediadores químicos de los mastocitos y basófilos aumentando la vasodilatación local que se previene por la **neurotensina (NT)** y la **somatostatina (SOM)**. Los receptores de ésta se detectaron en los monocitos, LT, LB y basófilos humanos. La **SOM** inhibe la proliferación mitogénica de los

LT humanos y de los esplenocitos de la rata, la quimiotaxis de los granulocitos y monocitos, la fagocitosis de los neutrófilos y la liberación de histamina y de los leucotrienos desde los mastocitos y los basófilos.

Los receptores para los **neuropéptidos-opioides (NPO)** se dividen en 2 clases, según se unan a la morfina y a la naloxona ( $\mu$  y  $\delta$ ), y aquellos que no lo hacen -llamados atípicos- ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). Los primeros se hallan en los granulocitos, monocitos y plaquetas humanos mientras que los atípicos se detectan en los linfocitos humanos y en las células del timoma. El AMPc unido al receptor para opioides es dependiente de cada péptido específico y del tipo de receptor celular. Los **NPO** alteran la producción de anticuerpos, la mitogénesis de LT, la expresión de los receptores CD21 y CD25, la producción de IFN- $\gamma$ , la citotoxicidad de los LTCD8+ y las funciones fagocíticas.

Investigaciones de los últimos años han establecido que ciertos neurotransmisores y neuropéptidos liberados en el sistema nervioso autónomo ejercen notables actividades regulatorias sobre la mucosa respiratoria. Históricamente, las influencias colinérgicas y adrenérgicas fueron bien documentadas, y su predominancia en este terreno no deja muchas dudas. Sin embargo, el sistema no-adrenérgico, no-colinérgico (NANC) despliega un efecto más sutil, leve, pero más sostenido en el tiempo. Péptidos provenientes de nervios sensoriales tales como, el péptido relacionado con el gene de la calcitonina, la sustancia P y la neurokinina A, pueden participar en la respuesta axónica mediando vasodilatación y exudación plasmática.

La sustancia P y el péptido liberador de gastrina inducen secreción abundante de las glándulas mucosas. Las respuestas defensivas en la injuria a la mucosa pueden ser amplificadas por una respuesta axonal que promueve gran reactividad vascular y glandular.

La actividad colinérgica es la responsable de los reflejos parasimpáticos, pero el VIP (péptido intestinal vasoactivo) al regular la liberación de la acetilcolina, incrementa la secreción glandular y tiene un efecto vasodilatador.

Las influencias simpáticas son potenciadas largamente en el tiempo por el neuropéptido Y o neuropéptido-tirosina que se desempeña como vasoconstrictor de acción sostenida.

Estos péptidos “parasimpático-like” como la sustancia-P, el VIP, el péptido relacionado al gene de la calcitonina y la neurokinina-A incentivan la vasodilatación mientras que los “simpático-like” como el neuropéptido Y la disminuyen. Estos datos parecen sugerir que los reflejos nasales y tráqueobronquiales hiperreactivos participan activamente en los síndromes de hiperreactividad nasal y bronquial. La etiología de la rinitis vasosecretomotora (inespecífica y no inmunológica) podría radicar en un desequilibrio de todas estas sustancias neurogénicas. Estos péptidos incrementarían la patogénesis de las enfermedades virales del aparato respiratorio. Así, la bradiquinina es generada activamente durante las infecciones a rinovirus, y, puede estimular las reacciones vasculares a través de reflejos parasimpáticos. Las infecciones rinosinuales crónicas, especialmente bacterianas, se asocian con anormalidades en la secreción de proteínas desde los vasos lo cual facilita ulteriores injurias inflamatorias por estar la mucosa modificada sustancialmente.

Diversos irritantes químicos, el aire frío o el recalentamiento del mismo después de una exposición al frío, olores penetrantes y partículas en aerosol estimulan a los nervios sensoriales e inducen obstrucción y rinorrea. Estas respuestas son particularmente exageradas en aquellos portadores de rinopatías crónicas no alérgicas no pudiéndose

explicar muy bien el porqué habida cuenta que los experimentos desarrollados hasta ahora no evidenciaron lesión histopatológica subyacente.

Por otro lado, sí producen daño epitelial manifiesto con desgranulación mastocitaria evidente y despolarización de las fibras nerviosas adyacentes, el humo del cigarrillo, el ozono, el formol, los solventes orgánicos y el dióxido de azufre. El reflejo parasimpático es la regla. La aplicación tópica de serotonina, capsaicina y nicotina induce rinohidrorrea, estornudos y dolor quemante, que son bloqueados por la atropina lo que refuerza el mecanismo vagal involucrado.

Se advierte que en la rinitis vasosecretomotora y en síndrome de hiperrreactividad bronquial ciertos péptidos neurogénicos juegan un papel muy importante; ellos forman parte de una serie de mecanismos básicos de “defensa” de dicha mucosa frente a agresores del medio ambiente, que, evidentemente se exaltan en determinadas circunstancias generando ciertos cuadros clínicos. El porqué sucede esto es de muy pobre conocimiento; no existe hasta la fecha un estudio serio que demuestre que estas condiciones clínicas se deban a “conflictos emocionales”.

El mastocito segrega por exocitosis muchas sustancias y éste fenómeno está regulado por una synaptotagmina que es una proteína homóloga de aquella que constituye las membranas de las vesículas sinápticas implicadas en el control de la liberación de neurotransmisores  $Ca^{++}$  dependiente. Los derivados del Ginseng Rb1 y Rb2 inhiben todo incremento del diacetil-glicerol producido en la activación mastocitaria por reacciones antígeno-anticuerpo, por superantígenos como las toxinas estafilocócicas A, B y TSST-1, por haptenos involucrados en las reacciones de hipersensibilidad retardada y por la adenosina que potencia fisiológicamente la liberación de histamina. Por otro lado, la seriglicina segregada como glucoproteína de fase temprana de activación mastocitaria, la síntesis y liberación de IL-13, la expresión del CD28 ante productos bacterianos como los LPS, y los escasos aportes de factor de necrosis tumoral alfa, no se ven afectados por aquel inhibidor.

Por inmunohistoquímica se reveló la presencia de **NPO** en los órganos linfáticos primarios y secundarios. La **SP**, el **VIP**, el **neuropéptido Y (NPY)**, la **SOM**, las **encefalinas (ENK)**, las **endorfinas (END)**, la **colecistoquinina (CCK)**, la **vasopresina**, el **péptido relacionado con el gene de la calcitonina (CGRP)** y el **polipéptido pancreático** se destacan entre los hallazgos. Al igual que la inervación simpática, fibras peptidérgicas están presentes a lo largo de la vascularización de los parénquimas. El **factor de crecimiento neural (NGF)** está distribuido en el sistema nervioso central y periférico y actúa en el desarrollo y el mantenimiento de las neuronas sensoriales y simpáticas y de las neuronas colinérgicas de los núcleos basales. Las respuestas neuronales al **NGF** se inician a través de la interacción con su receptor específico de membrana (**NGFR**). Es una citoquina inmuno-estimuladora que incrementa a otros factores autocrinos y paracrinos. Sus valores están elevados en la inflamación aguda y crónica y de respuesta inmune activa. Un papel para el **NGF** en las interacciones psicoinmunes se ha detectado en los eventos estresantes donde sus valores se incrementan en la sangre y en los tejidos con desgranulación mastocitaria masiva.

**Timo y médula ósea** : el primero es el más estudiado dado que la médula ósea presenta dificultades para identificar con precisión el o los péptidos activos in situ por métodos inmunocitoquímicos aunque aquellos estén vinculados estrechamente con los vasos sanguíneos. En el timo humano, fibras nerviosas liberadoras de **TH (tirosina hidroxilasa)**,

**DBH (dopamina β-hidroxilasa), NPY, SP, neuroquininas A y B, CGRP, VIP y NA** fueron halladas siendo la última la más abundante. El **NPY** se localiza junto a las fibras de **NE** que entran al timo por la cápsula o con las arteriolas superficiales. Las fibras de **SP, CGRP** y de **VIP** se ubican cerca de los mastocitos.

**Bazo:** El **NPY**, la **met-ENK**, la **CCK**, la **neurotensin (NT)**, la **SP** y el **VIP** se ubican a lo largo de la arteria central de la pulpa blanca y de sus pequeñas arteriolas. Fibras con la **TH** y el **NPY** se distribuyen por la cápsula, sus trabéculas y venas tanto de la pulpa blanca como de la roja.

**Ganglios linfáticos:** Fibras nerviosas de **NPY, VIP, SP, CGRP, dinorfina A** y **CCK** se hallaron en varias especies de mamíferos. En los humanos, el **NPY** y el **VIP** se relacionan con los vasos mientras que la **SP** y el **CGRP** se hallan en el hilio, la cápsula, la unión córticomédular y las regiones interfoliculares en contacto con los linfocitos.

**GALT:** La presencia de **SP, SOM, VIP** y **CGRP** está documentada aunque en el **BALT** es más dudosa, pero no descartada considerando el papel de la **SP** en la infección por el virus respiratorio sincicial. La **SP** y el **CGRP** están relacionados con los mastocitos en la mucosa yeyunal.

La presencia de transmisores colocalizados en una misma terminal nerviosa y la liberación de neurotransmisores en un microambiente donde citoquinas y hormonas están presentes permiten la interacción entre ellos en un “diálogo” con respecto a los diversos receptores celulares.

Los mecanismos podrían ser:

1): unión físicoquímica de 2 neurotransmisores;

2): competición por el mismo sitio de unión como se vio para la **SP** y la **NT** en la inflamación local;

3): la unión de un neurotransmisor a su receptor específico alterando las señales generadas por la unión de otro neurotransmisor;

4): verdaderos efectos neuromoduladores (**CGRP** y **NPY** pueden ejercer sus efectos sobre **SP** y **NE** respectivamente), y,

5): la modulación presináptica de la liberación de un neurotransmisor por otro neurotransmisor.

Se asume que la influencia de los neuropéptidos sobre las células inflamatorias in vivo sería progresiva, simple o única en un principio, y luego compleja o en combinación. El **NPY** está involucrado en el estrés como un “ansiolítico” neuromodulador y como un nervio simpático y un vasoconstrictor derivado de las plaquetas. Se comporta como mitógeno vascular por la vía de los receptores **Y1/Y5** y es angiogénico por la vía **Y2/Y5** con hipertrofia de la media y neoformación de la íntima.

El **NPY** exógeno (dipeptidil peptidasa IV = DPPIV que es un agonista selectivo de los Y2/Y5) y el estrés crónico incrementan estos efectos y ocluyen vasos con lesiones similares ateroscleróticas con trombos y macrófagos cargados de lípidos.

Los antagonistas de Y1 bloquean el estrés inducido por la vasoconstricción y las oclusiones post-angioplastia y pueden ser terapéuticos en el angor pectoris y en las reestenosis ateroscleróticas. Además, la isquemia tisular activa a las neuronas y a la angiogénesis y arteriogénesis.

Los agonistas del NPY-Y2-DPPIV son útiles para la revascularización isquémica y la cicatrización de las heridas mientras que los antagonistas son benéficos en las retinopatías, tumores y obesidad. El estrés está subvalorado en estas condiciones clínicas como un factor de riesgo, y los fármacos que se basen en las acciones del **NPY** pueden ofrecer interesantes adelantos.

La OMS tomando como suyas las palabras de Hans Selye definió al estrés como “**toda aquella respuesta inespecífica del organismo ante cualquier presión del exterior**”, estableciendo una clara diferencia con la respuesta inmune adaptativa que es fundamentalmente específica. Si un individuo es sometido en forma breve o prolongada a agentes físicos, químicos, biológicos o sociales, intenta adaptarse a dichas demandas en forma paulatina y progresiva. Ante la persistencia de la noxa (o noxas concurrentes) la capacidad de respuesta disminuye debido a la fatiga que se produce en los sistemas vinculados con la adaptación (neuroendocrino, inmunológico y circulatorio) especialmente del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (**HHS**) cuya importancia es notable en ambas formas de estrés, pues se lo relaciona con enfermedades con una base genética poco conocida aún (gastritis y úlcera gastroduodenal, hipertensión arterial e infarto del miocardio, neurosis post-traumática, ansiedad, insomnio, depresión, entre otras). El factor liberador de corticotrofina (**CRF**) es un neurotransmisor que participa en la activación de los sistemas simpático y serotoninérgico. Su actividad se ejerce por receptores específicos (**CRF1** y **CRF2**) que son antagonísticos y que se hallan distribuidos en el sistema límbico, en el hipotálamo y en las células inmunes.

Mc Ewen y Wingfield en 2003 y 2005, introdujeron el concepto de **alostasis** como una medida del esfuerzo fisiológico acumulativo impuesto al organismo al intentar responder a las exigencias diarias de la adaptación. “**Es el precio que paga el organismo para adaptarse**”. La **alostasis** está vinculada con los niveles de cortisol, adrenalina, prolactina, neuropéptidos y citoquinas séricos que se miden por RIA. El estrés crónico activa los núcleos dorsales del rafe y el **CRF** modifica el sistema serotoninérgico incrementando la funcionalidad del receptor 5HT2A y disminuyendo la actividad del receptor 5HT1A apareciendo la ansiedad y la depresión.

Se agrega la hipersecreción de glucocorticoides que desensibiliza a los receptores centrales ante la inhibición del eje **HHS** y las citoquinas proinflamatorias que acompañan al estrés crónico también estimulan al eje **HHS** intensificando la respuesta estresante. Bonet en 2003, analizó las respuestas a estresores dentro del concepto de **alostasis** de Mc Ewen (1998). Así, señaló que el ser humano debe invertir energía y recursos para alcanzar la homeostasis, mantener la estabilidad y adaptarse a las tensiones. Describió 4 tipos de carga alostática: **1)** : cuando el estrés produce una respuesta física inmediata, cesando prontamente y recuperando la normalidad sin consecuencias; **2)**: cuando la respuesta normal se mantiene en el tiempo por la exposición prolongada del estresor y cesa abruptamente y recupera los niveles basales sin otras

consecuencias; **3**): cuando la respuesta se prolonga demasiado y el organismo debe buscar otros niveles de homeostasis y mantenerse allí sin poder volver a los niveles basales, y, **4**): como cronificación del anterior, la aparición de alguna alteración morfológica y funcional orgánica atribuida, razonablemente, al estrés crónico.

Además del papel que juega el **CRF**, todos los cambios en los sistemas serotoninérgico y adrenérgico sumados a la activación de los macrófagos de sangre periférica y del sistema nervioso central liberando citoquinas en el cerebro y en la sangre predisponen a la ansiedad y a la depresión. Cambios neurodegenerativos del cerebro en la edad proveya en depresivos crónicos resultan en la activación de la enzima indolaminodioxigenasa (IDO) que convierte al triptofano a través del metabolismo de las quininas en el neurotóxico ácido quinolínico.

Los glucocorticoides y las catecolaminas inhiben a la IL-12, al TNF- $\alpha$  y al IFN- $\gamma$ , pero estimulan la síntesis de IL-10, IL-4 y de TGF- $\beta$ . Así, el estrés induce una activación Th2 que protege al organismo de una sobreactuación de las citoquinas proinflamatorias derivadas de los LTCD4+ Th1.

Las hormonas del estrés pueden facilitar la inflamación a través de la actividad de las IL-1, IL-6, IL-8, IL-18 y TNF- $\alpha$ , la producción de **CRF** y la síntesis de la **SP**.

Una evaluación del estrés agudo fue llevada a cabo en 100 estudiantes de medicina (19-23 años; 58 varones y 42 mujeres), sanos, atópicos (70) y no atópicos (30), valorando sus inmunoglobulinas, complemento, LTCD4+ y LTCD8+, neutrófilos y monocitos séricos, además de pruebas intradérmicas de lectura inmediata con 3 aeroalergenos ubicuos del hábitat (ácaros Dermatophagoides, Blattaria y Alternaria) y controles negativo y positivo. Idénticos parámetros se repitieron en los mismos estudiantes durante las vacaciones. En los no-atópicos ninguna diferencia pudo advertirse entre ambas situaciones, sus pruebas cutáneas siempre fueron negativas y los valores séricos se hallaron dentro del 5% de significación estadística.

En los atópicos pudo observarse un descenso de la IgE sérica total hasta de un 15% del valor basal, con pruebas positivas inmodificables. Se descartó la influencia ambiental (polinosis) y la ingesta de medicamentos que pudieran inducir el cambio. Se supone que neuropéptidos en el estrés agudo de los atópicos podrían estimular a LB-IgE+  $\rightarrow$  plasmocitos para una activa síntesis de la IgE.

Autores argentinos indujeron en ratones un estrés crónico y probaron la reducción linfocitaria del Ca<sup>2+</sup>, la disminución de la proteinkinasa-C, la activación del NF- $\kappa$ B e incremento del inhibidor del AMPc en el metabolismo de la proteinkinasa A comparados con ratones no estresados.

Ello justificaría la menor citotoxicidad de los LTCD8+ humanos en el estrés crónico. La convivencia con familiares enfermos crónicos y con evidente dolor moral reveló caída en la citotoxicidad de los LTCD8+ y de las citoquinas Th1. Adolescentes con asma bronquial con elevados niveles de citoquinas Th2, valor normal de IFN- $\gamma$  y bajo nivel de cortisol matinal se asociaban a importante estrés con pobre autoestima. Productos del sistema inmune ejercen poderosos efectos sobre el HHS y la astrogliá, que, por su similitud con las células epiteliales

tímicas, elaboran péptidos, neurotransmisores, hormonas y citoquinas que son reguladores autocrinos/paracrinos. El timo, la quimioquina TARC, la citoquina tímica TSLP del estroma linfopoyético y la quimioquina CTACK son las responsables del tránsito de LTCD4-Th2 en la piel alérgica y son marcadores del estrés cutáneo. <sup>(96-97)</sup>.

#### 4.3.- Importancia de la interleuquina 15.

Las comunicaciones intra e intercelulares en la respuesta inmune son mediadas por diversas citoquinas que poseen un alto grado de redundancia y pleotropía. La redundancia está parcialmente explicada por el hecho de que los receptores para las distintas citoquinas exhiben subunidades comunes en su estructura; así, en el caso de la IL-2, su receptor IL-2R tiene como subunidades a alfa (IL-2R $\alpha$ ), a beta (IL-2R $\beta$ ) y a gamma-c, que a su vez, es expresada por IL-4R, IL-7R e IL-9R. Últimamente, se caracterizó a la IL-15 que utiliza también la subunidad gamma-c, y que, en un principio, se pensó que ciertas actividades se debían a la IL-2.

Ambas citoquinas pertenecen a la estructura de las 4-alfa-hélices, y eso contribuyó a la confusión académica, que tan sólo se aclaró al detectar la utilización de un segundo receptor por medio de IL-15, justamente, en un modelo experimental que empleó mastocitos, donde la IL-2 es inactiva.

El gene de la IL-15 humana mapea en el cromosoma 4q31 mientras que la murina lo hace en el 8. tiene 14-15 kDa de peso molecular, y no hay mayor significación entre la secuencia aminoacídica de IL-15 e IL-2.

Esta última es elaborada por los LT y su expresión está controlada predominantemente a nivel transcripcional; el ARNm de la IL-15 no puede ser demostrado en los LT normales o activados, pero sí se lo detecta por Northern-blot en placenta, músculo esquelético, riñón, pulmón, corazón, fibroblastos, monocitos y células epiteliales.

Si bien la expresión está controlada en parte a nivel transcripcional, lo hace mayoritariamente a nivel posttranscripcional en la translación y tráfico intracelular. Todo ello explicaría el pleotropismo aunque las cantidades de IL-15 en los sobrenadantes celulares serán menores que las de la IL-2, sospechándose otros mecanismos reguladores responsables de este fenómeno.

Para justificar las similitudes entre las IL-15 e IL-2, la primera deberá utilizar alguna subunidad del IL-2R para unirse y para enviar señales al interior. Mientras la subunidad alfa no parece estar involucrada, sí lo hacen la beta y la gamma-c, como se comprueba en los LT y NKC activados. Existe una proteína IL-15R $\alpha$  en comparación con aquella de la IL-2R $\alpha$  aunque su homología es muy baja; pero ambos receptores muestran un motivo similar conservado llamado GP-1 o dominio SUSHI. Los receptores para IL-15R $\alpha$  e IL-2R $\alpha$  mapean sus genes en el cromosoma 10.q14-15 humano. El ARNm del IL-15R $\alpha$  también presenta una amplia distribución celular que incluye a los LT, LB, macrófagos, células de los estromas tímico y de la médula ósea, hígado, corazón, bazo, pulmón, músculo esquelético y células endoteliales activadas. Esta amplia distribución es la que genera su pleotropismo y multifuncionalidad.

El IL-15R no posee dominios proteicos del tipo proteína-kinasa, activa a los sistemas enzimáticos JAK-1 y JAK-3, produciendo éste último la fosforilación y translocación nuclear

de STAT-3 y STAT-5 que generan la activación nuclear necesaria para la síntesis de las citoquinas y sus receptores específicos.

El tipo 2 del IL-15R fue estudiado en los mastocitos habida cuenta que estas células no poseen receptor para la IL-2 y por lo tanto todo efecto de la IL-15 se ejercería a través de un receptor diferente. El mastocito expresa una proteína de unión de 60-65 kDa, bautizada IL-15RX ya que su composición química difiere de las subunidades alfa, beta y gamma-c conocidas. Esta proteína induce la fosforilación de la tirosina del JAK-2, pero no de JAK-1, JAK-3 o TYK-2; de allí se transcribe a STAT-5 y la activación ulterior.

La IL-15 exhibe numerosas funciones, que se podrían resumir así: proliferación de LT y de NKC; sinergia con IL-12 en la síntesis de interferón-gamma y factor de necrosis tumoral; inducción de la síntesis de inmunoglobulinas por plasmocitos al facilitar la unión del CD40 con su ligando; hipertrofiar a las fibras musculares esqueléticas como si fuese un anabólico; colaborar con la IL-3 y el factor stem-cell o Steel en la diferenciación de los mastocitos.

Esta citoquina se expresaría en forma anormal en la artritis reumatoidea y en las enfermedades crónicas del colon como la de Crohn o colitis ulcerosa, en las cuales se detectaría un nivel anormal del factor de necrosis tumoral alfa.

##### 5.- Los linfocitos T y el síndrome atópico.

La población linfocitaria TCD4 es un grupo fascinante y heterogéneo de células inmunocompetentes, que puede ser subdividido, por lo menos, en 2 subtipos llamados Th1 y Th2, aunque ahora debemos agregar a los T-reguladores (T-reg.) Los primeros son importantes en la activación de los macrófagos y en la inducción de los fenómenos de hipersensibilidad retardada. Los segundos son relevantes en la inmunidad humoral (síntesis de anticuerpos) y en las enfermedades alérgicas. Ambos subtipos derivan de un precursor común bautizado Th0 que segrega sólo IL-2 ante la exposición al antígeno; si la estimulación antigénica continúa de una manera crónica e intensa, esos LT-CD4 se diferencian en forma polar hacia Th1 o Th2. Los T-reg son unos linfocitos que controlan las respuestas de los Th1 y Th2 y desempeñan una función central en evitar las enfermedades autoinmunes y las alérgicas. Se reconocen 2 tipos de T-reg: los naturales y los adaptativos. Los primeros derivan de los LTCD4-CD25 del timo y bloquean a las células autorreactivas por contacto físico directo, mientras que, los segundos, se generan en la periferia y ejercen su actividad sobre los autorreactivos por medio de sus citoquinas. Las enfermedades alérgicas podrían ser el resultado de un desequilibrio entre la activación de los LT-reg por el alérgeno y los LTCD4-Th2 efectores en un proceso donde las células dendríticas juegan un papel trascendental. Varias citoquinas como las IL-6, IL-21, IL-25 (o IL-17E) y la linfopoyetina tímica estromal (TSLP) parecen contribuir de manera importante en esta inflamación. La IL-25 producida por los Th2 es una inductora potente de la síntesis de IL-4, IL-5 e IL-13. Por experimentos in vitro se observó que las células que responden a la IL-25 liberando citoquinas Th2 expresan moléculas de clase II del CMH, y también CD11c características de células accesorias no-T/no-B. Los LT-reg carecen de marcadores moleculares específicos de linaje, y tanto pueden ser CD4 como CD8, con CD25, CTLA-4, TGF- $\beta$  y GITR (receptor para el factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides); segregan IL-10 y TGF- $\beta$ , expresan el factor de transcripción nuclear FOXP3 (forkhead box P3), y suprimen respuesta inmune por contacto célula a célula o a través de sus citoquinas.

Una observación que discute la asociación entre una deficiencia de T-reg y el establecimiento de las enfermedades alérgicas es la mutación del gene que codifica para FOXP3, que seriamente compromete función T y resulta en el IPEX (inmunodisregulación, poliendocrinopatía y enteropatía ligada al X) caracterizado por endocrinopatías autoinmunes con atopía, eosinofilia, eccema severo y alergia por alimentos. La generación de células supresoras durante la inmunoterapia puede ser una llave importante en la eficacia del tratamiento. Los T-reg inhiben a los mastocitos, basófilos y eosinófilos y causan remodelación tisular. La IL-6 puede determinar un balance entre T-reg y CD4-Th2. La IL-6 se une al IL-6R e induce proliferación de Th2 en la mucosa respiratoria. El bloqueo de la citoquina reduce a los Th2 en la mucosa bronquial. Este hecho puede tener implicancias terapéuticas.

Las células dendríticas (DC) pueden ser 1 y 2 (DC1 y DC2) Las DC1 producen IL-12 y expresan niveles elevados de moléculas coestimuladoras induciendo Th1 con síntesis de IFN- $\gamma$  e IL-2. Las DC2 inducen respuestas Th2 con IL-4, IL-5 e IL-13. Las DC reguladoras segregan IL-10 e inducen células T-reg. La alergia podría surgir de un mecanismo aberrante DC2 $\rightarrow$ Th2 como lo proponen algunos investigadores. La citoquina TSLP ejerce un efecto sobre DC para promover diferenciación específica hacia TH2; está aumentada en las vías respiratorias de asmáticos correlacionándose con la severidad de la enfermedad, y en el eccema atópico altamente expresada en los keratinocitos. Los leucotrienes, la PGE2, la PGD2 y la histamina aumentan la actividad de las DC2 proalérgicas; se contraponen la IL-10, el triptofano y sus metabolitos y la vitamina D3 que las hacen tolerogénicas. Una caída en los T-reg resulta de su falta de contacto con microorganismos originando un fracaso en la inhibición de una respuesta específica T contra el antígeno inoculado como alérgenos o autoantígenos. Así, *Mycobacterium bovis* induce incremento de T-reg alérgeno-específicos que confieren protección contra la inflamación de la vía aérea.

La atractiva plasticidad de los LT-CD4 ha comenzado a ser aceptada ya que permite comprender la relación inversa entre las vertientes humoral y celular de la respuesta inmune, tal como se comprueba en la inmensa mayoría de las enfermedades infecciosas, es decir, en la reacción contra los patógenos al igual que en algunas enfermedades autoinmunes.

Mientras que los Th1 respondedores a la IL-12 producen IL-2, IFN- $\gamma$  y factor transformante beta, los Th2, no responden a la IL-12 y producen IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Las enfermedades alérgicas serían, por lo tanto, el resultado de la hiperactividad de los Th2 y la gran elaboración de sus citoquinas las promotoras de una inflamación crónica y amplificada que genera una fase tardía, como se constata en la rinitis atópica y en el asma bronquial.

Esta predisposición por los Th2 depende de factores genéticos poco conocidos aún, una exposición muy temprana y sostenida al alérgeno, la fisicoquímica de éste, las cantidades, el tipo de célula presentadora, las señales coestimuladoras recibidas por el LT y las citoquinas presentes en el hábitat celular. Por lo tanto, los LT-CD4 no están predeterminados inexorablemente sino que los elementos señalados son los que generan el viraje funcional del mismo, convirtiéndolo en un linfocito efector de una calidad de respuesta.

Cuando se analiza el comportamiento de los LT de memoria inducido por los factores acotados, tienden a producir el mismo patrón de citoquinas si son reestimulados. Pero ello no ocurre si se trata de LT de memoria en reposo; éstos evidencian una notable “maleabilidad” y pueden ser “reprogramados” lo cual se disfruta como un beneficio

terapéutico para las alergias y las autoinmunes. Todo parece depender de la intensidad con la que IL-12 actúa sobre el LT de memoria en reposo; así, los Th2 pueden producir citoquinas del tipo Th1 en bajas concentraciones de la citada citoquina, pero en altas dosis vuelven a elaborar IL-4 y además pierden su receptor para IL-12 fijando su subtipo (Th2) definitivamente.

Diferentes estudios han demostrado que las cantidades de citoquinas producidas por los Th2 varían notablemente según las muestras obtenidas, y de esa forma, pueden incrementar la síntesis de IgE o de IgG4, o por el contrario de IgA o de IgG2.

También pueden suprimir respuestas inflamatorias autoinmunes como en la encefalitis y en la diabetes. Así se ha visto que la concentración del factor transformante beta estaría en directa relación con el desarrollo de una funcionalidad Th2- colaboradora, muy involucrada en la síntesis de anticuerpos, de otra Th2- reguladora/supresora, a la que algunos autores bautizan como Th3.

La rinitis alérgica y el asma bronquial representarían una aberración patológica de la tolerancia de las mucosas en las que los LT normalmente deberían dar lugar a Th1 o a reguladores/supresores Th2, pero que dan origen a Th2-colaboradores que inician e intensifican la inmunidad humoral y la inflamación alérgica.

La administración oral de bajas dosis de un antígeno induce poblaciones LTCD4 productoras de IL-4 y de factor transformante beta mientras que las altas dosis producen tolerancia, delección o no-respuesta.

En modelos de esclerosis múltiple en primates, la inmunoterapia oral con antígenos induce Th2-colaboradores más que Th2-supresores con agravamiento de las lesiones y la producción de autoanticuerpos.

Si se admite que las enfermedades alérgicas son el resultado de la hiperproducción de citoquinas-Th2, el convertir a estas células en Th-1 sería un objetivo más que deseable. Estos linfocitos al producir IFN- $\gamma$  inhiben la síntesis de la IgE con el efecto benéfico que ello significa; por otra parte, sujetos no alérgicos presentan LTCD4-Th1 específicos para un antígeno en ausencia de síntomas clínicos. Una respuesta Th1 muy vigorosa, por su parte, puede causar considerable daño tisular a nivel de las mucosas respiratoria o digestiva, ello puede o no ser banal en un atópico. Surge así, el análisis de los beneficios de la inmunoterapia con alérgenos tan cuestionada en el pasado; en la actualidad, existen numerosas pruebas irrefutables que tal procedimiento modifica la funcionalidad linfocitaria y el patrón de citoquinas preponderante. Así, en el atópico, disminuyen los LTCD4-Th2, y se incrementan los LTCD4-Th1 al utilizar dosis elevadas del antígeno que es procesado por el monocito/macrófago más que por el LB. La presentación antigénica por éste último favorece la síntesis de IL-4 más que del IFN- $\gamma$  presumiblemente por incrementar la coestimulación de los LT a través del ligando para el CD40.

También es posible que la inmunoterapia induzca la expansión clonal de los Th1 y no la disminución cuantitativa de los Th2. La inmunoterapia convencional (por la vía parenteral es la única con probada eficacia) puede ser mejorada con el agregado del ADN complementario (ADNc) para las proteínas del alérgeno. Este ADNc es tomado por las células somáticas y lentamente convertido en proteínas, induciendo en ratones, una respuesta Th1 al igual que la remota probabilidad de la anafilaxia.

La utilidad de este ADNc se debe a la presencia de motivos de citosina/guanosina no metilados en ese ADN, que serían adyuvantes inductores de la síntesis de IL-12 e IL-18 con exaltación de la producción de IFN- $\gamma$ .

Otra metodología para minimizar el deletéreo efecto de las citoquinas-Th2 incluye a la tolerización o la apoptosis de los LT alérgeno-específicos. Podría lograrse por la administración oral de altas dosis del antígeno sin adyuvantes o de péptidos derivados de ellos. Ambas estrategias están siendo actualmente ensayadas en enfermedades inflamatorias autoinmunes, tales como, la artritis reumatoidea (con diversos tipos de colágeno), la esclerosis múltiple (con proteína básica de la mielina), la diabetes (con insulina) y las alergias (con alérgenos o péptidos inmunodominantes).

Así, el Der p 1 del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* y el Fel d 1 del "epitelio" del gato demostraron su eficacia en modelos experimentales y en humanos reduciendo sus síntomas clínicos de alergia respiratoria.

Estos péptidos inmunodominantes no demuestran igual reactividad en todos los pacientes; este hecho se asocia a diferentes haplotipos del CMH de los enfermos y resulta una limitante para la generalización del tratamiento.

La IL-12, por su parte, también parece ser una posibilidad terapéutica; sola o en combinación con la IL-18 y/o con el alérgeno, evidenció cambios en la funcionalidad linfocitaria disminuyendo la producción de IL-4 e IL-5 y aumentando la del IFN- $\gamma$ . La presencia del antígeno o de su(s) péptido(s) inmunodominante(s) brinda especificidad al cambio Th2  $\rightarrow$  Th1. Existen numerosas pruebas de este fenómeno en el modelo experimental que estudia la respuesta inmune a *Leishmania* mayor.

Parece oportuno señalar que los atópicos no sólo son capaces de elaborar una respuesta Th2 ante alérgenos ambientales sino también contra agentes infecciosos y hasta auto-antígenos. La preponderancia de estas citoquinas favorecería la no-respuesta autoinmunitaria (Th1), pero sí una baja reacción contra patógenos intracelulares (v.g. *Mycobacterium tuberculosis*). Esta asociación inversa entre atopía y PPD se documentó, recientemente, en una gran población infantil; sin embargo, no puede sostenerse que favorezca la infección en sí misma aunque sí que modifique su evolución.

La atención está focalizada en la producción reducida de IL-12 y en el incremento de IL-10, que, al actuar como una especie de "anti-IFN- $\gamma$  natural" permite la síntesis imprudente de IL-4.

## 6.- La IL-4 y su receptor (IL-4R).

La IL-4 es esencial en el desarrollo de las enfermedades alérgicas atópicas por su notable y peculiar influencia sobre los LTCD4-Th0 y su conversión en LTCD4-Th2. Esta glucoproteína de 18-20 kDa y 153 aminoácidos presenta un 50% de homología con su similar del ratón. Ambas citoquinas actúan de manera específica de especie. Es producida por los LTCD4, los mastocitos y los basófilos en respuesta a la activación del RcT en el primer caso, y del receptor épsilon de alta afinidad en el segundo. La producción de la IL-4 es rápida, y transitoria después de una a cinco horas de la activación y se pierde luego de 24 a 48 hs. de la misma.

Esta citoquina posee efectos fisiológicos pleotrópicos, es decir, es una citoquina de "amplio espectro". No obstante, su especialización recae en la diferenciación de las poblaciones

LTCD4-Th0 hacia LTCD4-Th2. También evidencia fuertes acciones contra la IL-12, que, naturalmente induce un desarrollo LTCD4-Th1.

Presiona al LB para la producción de IgE e IgG4, al igual que, regula positivamente al CD23, a las clase II del CMH, al IL-4R e IL-2beta, al CD40 y para Thy-1. Esta acción sobre la síntesis de la IgE es crucial para el desarrollo de las enfermedades alérgicas-atópicas.

Los macrófagos muestran una incrementada expresión del CD23, de la presentación antigénica y de la citotoxicidad contra las células tumorales, mientras que, las producciones de IL-1, IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral, peróxido de nitrógeno, óxido nítrico y prostaglandina E2 disminuyen. Las células endoteliales responden a la IL-4 con un aumento de la expresión de moléculas de adhesión tales como VCAM-1 y una disminución de ICAM-1 y de ELAM-1, lo cual llevaría a un egreso selectivo de eosinófilos del compartimiento intravascular al tejido conectivo circundante extravascular que alberga al proceso inflamatorio infeccioso o no.

Estas propiedades son exageradas por los mediadores mastocitarios, que, a su vez, son estimulados por la IL-4. El gene de la IL-4 se encuentra ubicado en un bloque con genes de otras citoquinas en el cromosoma humano 5q23-31 de la mano de IL-3, IL-5, IL-9, IL-13 y GM-CSF. Un hecho importante para el desarrollo de Th2 es la producción inicial de IL-4 que es responsabilidad de una subpoblación de LTCD4-NK1.1, que libera rápidamente IL-4 ante diversos estímulos, como los anti-CD3 en experimentos in vivo e in vitro. La citoquina llevaría a la activación del receptor específico con la consecuente cadena de señales intracelulares que promueven la generación de factores nucleares de transcripción.

El IL-4R humano se halla en células T, B, mastocitos, basófilos, macrófagos, fibroblastos, endoteliales, hepatocitos, keratinocitos, del estroma medular y en neuronas. Es una glucoproteína de 825 aminoácidos de los cuales 560 son intracelulares. Exhibe propiedades similares al grupo I de receptores hematopoyéticos con 2 dominios de fibronectina tipo III, 4 pares de cisteínas y un motivo conservado WSXWS en la región extracelular. El IL-4R forma un complejo con una proteína gamma-c que es conocida por formar parte de los receptores para IL-2, IL-7, IL-9 e IL-15. Ni IL-4R ni gamma-c presentan actividad de kinasa endógena.

La transducción de señales a punto de partida del IL-4R emplea varios dominios de la región intracelular; las regiones más próximas a la membrana llamadas Box 1 y Box 2 se unen a la familia Janus de tirosina-quinasa JAK-1 (unida al IL-4R) y JAK-3 (unida al gamma-c).

Distalmente a estas estructuras se halla el motivo I4R que es una región de notable homología con la insulina y su factor de crecimiento-1; este motivo y su tirosina central son esenciales para la fosforilación de la tirosina de los sustratos 1 y 2 del receptor para la insulina (IRS-1 e IRS-2). Hay proteínas adaptadoras responsables del crecimiento del receptor al que unen a varios caminos de activación, como el fosfoinositol-3-quinasa y mitógeno-quinasa. Más lejanamente, hay una región llamada dominio de expresión genética, con 3 residuos de tirosina, que median la activación y traducción de señales (STAT) y la expresión de genes. Se aprecia así, que el IL-4R, al igual que muchos receptores hematopoyéticos, utilizan el camino JAK-STAT para la transcripción final.

Se relacionó a la atopía con la IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 y GM-CSF y desde éstas a sus respectivos receptores, y por ende, a los fenómenos de activación celular particulares para cada uno de ellos, podría asumirse que la atopía sería un **síndrome de**

**inmunodisregulación funcional de los LTCD4-Th2 con hiperproducción de citoquinas**, (en especial IL-4, que perpetúa el switch isotípico épsilon con síntesis permanente de IgE), como consecuencia de una exaltada transcripción de genes con gran "inestabilidad" de los factores de transcripción y modificaciones estructurales de las histonas y de la metilación del ADN. La vecindad de exones en el cromosoma 5 humano aboga esta presunción, al igual que la preponderancia de STAT-6 en los LTCD4-Th2 en contraposición al STAT-1 más frecuente en los LTCD4-Th1 (influencia de factores epigenéticos).

Recientemente se demostró que el factor de transcripción GATA-3 sería suficiente para la expresión de citoquinas-Th2 en los LTCD4. Este factor también se expresa en LT vírgenes, y su regulación negativa es responsable, en parte, de la elaboración de citoquinas-Th1. En el ratón transgénico, los niveles de GATA-3 se correlacionan con la síntesis de varias citoquinas, tales como, IL-13, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-5, de menor a mayor.

En el hombre, además de GATA-3 y de STAT-6, estarían involucrados c-Maf, NF-IL-6, NF-AT y AP-1, como los 6 factores de transcripción inductores de citoquinas-Th2. Una secuencia de ADN de 11 pares de bases llamada P fue identificada en el promotor humano de la IL-4. Se halla localizada entre la 69-79 pares de bases y es el más importante elemento regulador positivo.

La secuencia P es el sitio de unión del NF-AT; también AP-1 (fos+jun) puede unirse a la misma secuencia y actuar sinérgicamente. El NF-AT contribuye también a la expresión de IL-2 e IL-5. El NF- $\kappa$ B, que está conformado por 2 subunidades (p50 y p65) interactúa con la secuencia P en forma excluyente con el NF-AT.

Un elemento regulador positivo llamado PRE-I se encuentra en el extremo opuesto al sitio original de transcripción o STT entre los nucleótidos 224 y 239; posee una gran actividad estimuladora. Otros 2 factores de transcripción llamados POS-1 y POS-2 fueron hallados en el ratón, pero POS-1 no se detectó en extractos nucleares de Th1 humanos.

Por otro lado, hay también factores regulatorios negativos (Neg 1 y Neg 2) estrechamente unidos al NRE, localizados entre 288-300 y 303-311, respectivamente. NF-IL-6 interactúa con PRE-I con gran afinidad e incrementa la transcripción del gene de IL-4. Un exón entre 172 y 195 llamado ISRE o elemento responsable de la estimulación por el interferón al ser destruido experimentalmente da como resultado un incremento significativo de la actividad de la IL-4.

Podría concluirse aseverando que en las enfermedades atópicas respiratorias, y en especial, en el asma bronquial, la conjunción de las vertientes humorales (IgE) y celulares (LTCD4-Th2) de la respuesta inmune son un hecho difícilmente refutable. Los anticuerpos del isotipo IgE no sólo están involucrados en la fase aguda de la respuesta sino también en la llamada fase tardía; por otro lado, la unión de la IgE a los receptores épsilon II (R<sub>Fc</sub> II) de las LB amplifica la respuesta de los LT a los antígenos facilitando la presentación por las CPA, y generando así la retroalimentación positiva aumentando la síntesis de la IgE. La coparticipación de otras células, tales como, los mastocitos, los basófilos y los eosinófilos, desencadenan un infiltrado inflamatorio crónico responsable de los diferentes signos y síntomas de los cuadros clínicos en estudio. Estos hallazgos permitirían explicar la mayor respuesta de anticuerpos al inmunizar sostenidamente en el tiempo a humanos atópicos con péptidos purificados de los alérgenos del habitat. Los genes de "hiperreactividad" que codifican fuera del CMH, posiblemente, se comportan como marcadores nucleares de la condición atópica aunque para la expresión clínica sean necesarios otros factores que restan

por determinarse. Se presume así, un patrón diferente de respuesta del sistema inmune ante estímulos del habitat; proteínas heterólogas de mayor o menor complejidad estructural y fisicoquímica con ingreso preferente por las mucosas digestiva y respiratoria son procesadas, presentadas e inician la activación linfocitaria. Se generarán señales desde la membrana al citoplasma y de éste al núcleo por diversos sistemas enzimáticos y de factores de transcripción que inducirán a los exones respectivos a codificar las proteínas funcionalmente activas (citoquinas, receptores, etc). Los atópicos parecen poseer una línea germinal muy “inestable” en especial a nivel del cromosoma 5 donde se codifica la información para varias citoquinas proinflamatorias del proceso alérgico. A su vez, todas estas activaciones se perpetúan aún en ausencia del gatillo inicial (el alérgeno) habida cuenta de la propiedad de autorregulación (autocrinia) que poseen estas citoquinas. Sería digno de destacar que “la imagen interna del antígeno” según la Teoría de Jerne de los idiotipos-anti-idiotipos también podría facilitar o posibilitar una perpetuación o por lo menos prolongación en el tiempo de exposición o sensibilización a ese antígeno generando un incentivo más para la cristalización de la inflamación alérgica. Dado que la persistencia del antígeno es de singular importancia, y, por eso la primera medida terapéutica inexcusable es tratar de aislar al enfermo de dicho contacto (desalergenización), lo cual no siempre es posible, y entonces se deberán implementar las terapias farmacológicas e inmunológicas consagradas. La administración persistente del alérgeno por la vía *parenteral (subcutánea)* induce la producción de anticuerpos específicos de otros isotipos diferentes al de la IgE, que, al poseer mayor avidéz y afinidad por el antígeno promueven una mayor captación ante su ingreso (competitividad funcional). Estos anticuerpos (IgG) no están sujetos a receptores mastocitarios, y ello evita la activación de estas células. Otros autores enfatizan el valor de la subclase IgG4, pero la discusión académica favorece aún a la IgG1. La inmunoterapia o vacunoterapia (OMS) o tratamiento desensibilizante también induce cambios en el patrón o balance de citoquinas proinflamatorias, disminuyendo los valores de la IL-4, IL-3, IL-10 e IL-13 e incrementando los del IFN- $\gamma$  e IL-12. A diferencia de la administración por la vía oral/digestiva, la inoculación en la piel permite la participación de los ganglios linfáticos regionales y de células presentadoras muy especializadas. Ello facilita el estacionamiento del antígeno en esos órganos linfáticos secundarios, y posibilita así, el “shopping” linfocitario de las células que transitan a través de ellos, y el encuentro entre sus receptores (RcT), y los epitopes antigénicos apropiados. La generación de LTCD4-Th1 por esta vía es más notable que por la vía digestiva más proclive a engendrar LTCD4-Th2, y, por lo menos, en teoría, a encender el proceso alérgico. El mastocito, a su vez, como poseedor de gránulos con contenido vasoactivo da lugar a la sintomatología del paciente por modificar cuali-cuantitativamente los fenómenos vasculares, la expresión de moléculas de adhesión endoteliales y celulares, por activar los mecanismos de hipercrinia y discrinia, y por inducir la activación de las fibras musculares lisas. Los leucotrienes y el PAF acentuarán los signos inflamatorios y promoverán la liberación de IgE acumulada en las plaquetas de los atópicos como reservorios dependientes del CD23. Algunos neuropéptidos no son ajenos a la exacerbación y perpetuación de los aspectos vasculares y celulares de la inflamación atópica. Todos estos elementos coadyuvan a la cronificación de la sintomatología y a modificaciones histológicas estructurales después de décadas con irreversibilidad funcional, por lo cual, el tratamiento precoz de la condición atópica redundará en beneficios concretos para el paciente.

## 7.- Los eosinófilos y la inmuno-alergia.

La relación entre las enfermedades alérgicas y la eosinofilia sanguínea y tisular es un hecho histórico. No obstante, las parasitosis por nematodos y los síndromes de hipereosinofilia, muchos de causa desconocida, constituyen cuadros comunes en la práctica diaria. Los granulocitos eosinófilos o leucocitos bilobulados con gránulos que se tiñen acidófilamente con el May Grünwald-Giemsa son células terminales y efectoras con importantes funciones en el infiltrado inflamatorio que integran. Su desarrollo y diferenciación en la médula ósea se halla influenciado por 3 citoquinas: las IL-3 e IL-5 y el GM-CSF. De las 3, la IL-5 sobresale pues además induce la liberación de células maduras desde la médula ósea a la periferia.

Los eosinófilos humanos exhiben numerosos receptores en su membrana, a saber: para el C3a, el C5a o CD88, el CR1 o CD35, para el C3b, el CR3 o Mac-1 o CD11b/CD18 para el C3bi y para el ICAM-1; la p150,95 o CD11c/CD18 para el C3bi; el CD89 o RFc $\alpha$  para la IgA; los RFc $\gamma$  I (CD16), II (CD32) y III (CD64) para la IgG; los RFc $\epsilon$  I y II (CD23) y la  $\epsilon$ BP o Mac-2 para la IgE; el CDw128 para la IL-8; el CCR-1 para RANTES, MCP-2 y MIP-1; el CCR-3 para RANTES, MCP-3, 4 y 5 y para la eotaxina; el CD121a para la IL-1; el CD25 para la IL-2; el CD123 para la IL-3; el CD124 para la IL-4; la cadena alfa del receptor para la IL-5 precisamente por la IL-5; el CD116 para el GM-CSF; una cadena beta para recibir a la IL-3/IL-5/GM-CSF; el CD4 para la IL-16; los receptores para los IFN-alfa y gamma; el receptor para el factor de necrosis tumoral-alfa; y otras moléculas tales como, el CD9, CD40, CD69, CD95 o FAS o sintetasa para ácidos grasos, el CD52 y las moléculas de clases I y II del complejo mayor de histocompatibilidad. La adhesión del eosinófilo al endotelio vascular y su subsecuente transmigración gracias a la expresión de 2 alfa-integrinas no expuestas por los neutrófilos; así, la  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-integrina o VLA-4 se une a la VCAM-1 y a algunos dominios de la fibronectina tisular mientras que la  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 se une a MAdCAM-1 o adresina de las vénulas de endotelio alto de las placas de Peyer, de los ganglios linfáticos mesentéricos y de los sinusoides hepáticos. Estas moléculas de adhesión facilitan la localización de los eosinófilos en los tejidos linfáticos.

Experimentos que usaron anticuerpos contra el componente alfa de la integrina bloqueó muy significativamente el flujo de eosinófilos en los tejidos pulmonares y cutáneos, tal como sucede en algunas enfermedades alérgicas y en los síndromes de hipereosinofilia.

Amerita recordar que entre los atractantes químicos para los eosinófilos se citan a los lípidos, las fracciones del complemento, algunas citoquinas, tales como las quimioquinas entre las cuales se destaca la eotaxina.

De lo expuesto, se puede valorar la amplia gama de influencias a las que el eosinófilo está sometido, así como, a las múltiples interrelaciones con citoquinas, inmunoglobinas, fragmentos del complemento y moléculas de histocompatibilidad.

Los gránulos citoplasmáticos presentan 2 partes: el core y la matriz. El primero es el reservorio de la proteína básica mayor mientras que en la matriz se guardan la proteína catiónica, la neurotoxina y la peroxidasa. Los cuerpos lipídicos del citoplasma contienen leucotrienes C4, 15-oxo-HETE, prostaglandina E2, tromboxano B2, PAF y lipoxinas. Estos eicosanoides promueven la inflamación con actividad sobre el músculo liso, los epitelios glandulares y los vasos sanguíneos.

Algunas citoquinas son sintetizadas de novo y almacenadas en gránulos citoplasmáticos, de tal manera, que los eosinófilos se transforman en una fuente permanente para la síntesis y liberación de citoquinas. No es sencillo pretender explicar si el eosinófilo es activado como el macrófago y el linfocito o bien si su existencia es en realidad un devenir entre activaciones menores o mayores. Solamente en los últimos años, se detectó que en el estadio de activación estaba incrementada la expresión del RFc $\epsilon$  I y del CD40, en especial, en los eosinófilos de los sujetos atópicos. También resulta de interés revisar el papel de estas células en las infecciones parasitarias, en particular, de nematodos o larvas migrantes, donde hay eosinofilia con elevada producción de IL-5. El empleo experimental de anti-IL-5 demostró que las parasitaciones no se incrementaban con el bloqueo de la IL-5 de los animales parasitados. Por ello, parece que los “beneficios” de los eosinófilos en estas condiciones ameritan un análisis más exhaustivo y prudente.

Estudios histopatológicos de tejido pulmonar resecaado de asmáticos y no asmáticos por medio de la hibridización in situ demostraron que la preponderancia de la IL-5 era notable en los primeros con relación a los segundos; ello podría explicar la persistencia de la inflamación de la pequeña vía aérea y del parénquima y del papel de los eosinófilos en la misma. Estas células y la IL-5 serían patognomónicos de la llamada “asma intrínseca” mientras que ambas más la IgE y la IL-4 constituirían el espectro del “asma extrínseca”.

#### 8.- El aporte de la filogenia.

La inmunidad a las enfermedades infecciosas y a la dependencia a los cambios de temperatura fue claramente demostrada por Metchnikoff en los reptiles a comienzos del siglo XX. Halló que la administración de toxina tetánica a los caimanes inducía la síntesis de anticuerpos sólo a elevadas temperaturas. Veinte años después, May (1923), demostró el rechazo del injerto de piel alogeneica, pero la aceptación de la piel autogeneica del camaleón *Anolis carolinensis* con una descripción detallada de la reacción inflamatoria y del infiltrado de células mononucleadas asociadas al rechazo y no a la aceptación de la piel. Estos 2 trabajos fueron fundacionales para la llamada Inmunología Comparada de nuestra época. Aunque hay unos pocos estudios serológicos que refuerzan la dependencia natural de la temperatura sobre la inmunidad humoral de los vertebrados ectotérmicos, la Inmunología Comparada se estableció como una subdisciplina con impactantes avances en la inmunología de los mamíferos, particularmente, en el transplante de órganos y la inmunidad celular. Los trabajos iniciales de Hildemann (1970) sobre la histocompatibilidad en el pez de colores *Carassius auratus* mostró que los ectotermos eran capaces de rechazar en forma aguda un transplante alogeneico. Estos hallazgos impulsaron una sucesión catalítica de investigaciones en el tema, y constituyeron los pasos iniciales de la filogenia de la inmunidad. Merecen citarse los trabajos en la especie *Agnatha* con el *Eptatretus stoutii* (pez bruja) de Finstad y Good (1966), que no poseía respuesta inmune adaptativa y presentaba rechazos acelerados; con la lamprea (*Petromyzon marinus*) que hace rechazos alogeneicos crónicos (Perey, 1968), mientras que los tunicados, los equinodermos, los moluscos, los anélidos y los celenterados se caracterizan por rechazos alogeneicos y xenogeneicos crónicos (Freeman, 1970; Ghiradella, 1965; Dix, 1972; Cheng, 1970; Cooper, 1970; Campbell, 1970). Los principios básicos de estas incompatibilidades entre los invertebrados inferiores posiblemente

dependa del reconocimiento interespecies de moléculas glicoproteicas de las superficies celulares. Si ello significa un proceso inmunológico en sí mismo, es materia de controversia. En los invertebrados más evolucionados aparece la inmunidad celular en forma primitiva con unos celomacitos y hemocitos descritos en anélidos (Cooper, 1970), y en equinodermos (Dix, 1972). Roch (1975) demostró respuestas T proliferativas a mitógenos y a la presencia de antígenos del transplante. <sup>(97-98-99-100)</sup>.

Desde la humilde ameba buscando su alimento hasta los mamíferos más evolucionados con un sistema inmune complejo que posee respuestas humorales y celulares, el proceso de reconocimiento de “lo propio y lo no propio” evidencia un desarrollo paralelo a la necesidad de los animales de mantener su integridad en un ambiente hostil. La decisión sobre en que punto aparece el concepto de “inmunidad” es tan sólo semántico. Teniendo en cuenta que los LT se ocupan del reconocimiento de “lo propio alterado” o de lo “no propio” parece razonable especular que sus raíces estarán evolutivamente antes que la de los anticuerpos habitualmente restringidas a los vertebrados. En los vertebrados más primitivos (los agnataus) se ha visto infiltración linfocitaria, hemorragia capilar y destrucción de melanòforos lo que caracteriza en los vertebrados superiores al rechazo de injertos. En el caso del tiburón *Heterodontis francisci* se demostró un tipo de respuesta inmune que culmina en un rechazo agudo de transplante, tal como lo señaló Borisenko en 1970, postulando un débil sistema de histocompatibilidad con una disposición parecida al H2 del ratón. Los osteichthyes o peces con esqueleto exhiben una transición evolutiva en la inmunidad de los transplantes mientras que los peces *Xiphophorus* revelan la existencia de 10 a 15 loci de histocompatibilidad. Otro salto importante en lo evolutivo es característico de la clase anfibia: los apodanes y los urodeles poseen sistema de histocompatibilidad elementales que posibilitan rechazos crónicos. Un efecto ambiental de trascendencia en la afectación de las diferentes fases de los mecanismos inmunes es la temperatura ambiente.

En los mamíferos, se pueden distinguir 3 sistemas de reconocimiento basados en moléculas expresadas en los LB (anticuerpos), en los LT (RcT), y en una gran variedad de células, las derivadas del CMH todas ellas presumiblemente emparentadas y descendiendo de un gen ancestral común. Además, los vertebrados poseen con los insectos, y a lo mejor con otros invertebrados, sistemas de reconocimiento que responden a patrones moleculares comunes que se hallan en las paredes microbianas (ejem. lipopolisacáridos). Tampoco se debe descartar la existencia de receptores a nivel de los macrófagos cuyas moléculas y genes no se han identificado aún y que no pertenecen a los conocidos. Los linfocitos, con sus propiedades de especificidad y memoria parecen haber aparecido en los vertebrados más temprano, lo que lleva a pensar que la respuesta adaptativa apareció con ellos. Porqué ocurrió esto, nunca fue satisfactoriamente explicado, pero se puede concebir que los vertebrados tendrían unas demandas ambientales muy intensas, y, que por tanto debieron desarrollar una respuesta más compleja contra la infección. Las técnicas de Biología Molecular y estudio del ADN aplicadas a los primitivos animales, y aún a fósiles, contribuirá a develar muchas incógnitas. Por fin, el estudio de un sistema inmune en los vegetales también ha sido encarado. Desde la descripción de Metchnikoff de las células fagocíticas en la estrella de mar, el estudio de la inmunidad de los invertebrados quedó relegado con relación al de los vertebrados. Sin embargo, en los últimos tiempos dichas investigaciones han retomado jerarquía habida cuenta de la información que

podían aportar sobre la inmunidad innata de los vertebrados, y, además porque algunos invertebrados son vectores de enfermedades humanas (ejem. mosquito *Anopheles* en el paludismo). Los *protozoos* son animales unicelulares carentes de clorofila que se alimentan por fagocitosis, y aunque poco se sabe acerca del reconocimiento del alimento, las proteínas de su membrana están bajo estricto control genético. Las *bacterias*, son células procariotas que pueden sufrir infecciones por virus (bacteriófagos). Las endonucleasas de restricción, tan atractivas para la ingeniería genética, serían las responsables de la destrucción del ADN viral y no del propio. Los bacteriófagos resistentes ejemplifican las limitaciones de la inmunidad innata o natural. Las células de las *esponjas* pueden vivir libremente o en grupos, pero poseen glucoproteínas específicas de especie que posibilitan el reconocimiento de “lo propio” y evitan así la formación de híbridos, que, provocados experimentalmente, inducen una zona de necrosis en el contacto entre ellos; en un segundo injerto esta necrosis se expresa en forma acelerada. Los *corales* aceptan trasplantes genéticamente idénticos (singeneicos), pero rechazan muy lentamente a aquellos no idénticos (alogeneicos), con daño para ambos animales (reconocimiento de lo no-propio). Se sospecha alguna evidencia de memoria específica (¿adaptativa?). Los *gusanos* o helmintos poseen celoma que es una especialización celular y poseen, por lo menos 4 tipos celulares diferentes involucrados en el rechazo de injertos, en la fagocitosis y en la elaboración de productos antibacterianos (lisinas, opsoninas, aglutininas, células especializadas). Por su parte, los *moluscos* y los *artrópodos* no presentan rechazo de injertos debido a la falta de heterogeneidad del complejo mayor de histocompatibilidad más que a la ausencia de un sistema de rechazo. Sin embargo, están presentes las inmunidades humoral y celular. La primera involucra a la enzima profeniloxidasas que participa en la producción de radicales tóxicos del oxígeno y de la melanina, jugando un papel destacado contra patógenos potenciales. Una respuesta celular frecuente es la encapsulación donde los patógenos son rodeados por las células sanguíneas y anulados evitando la diseminación de la infección. En los artrópodos aparece la vía alternativa del complemento. Los estudios en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, revelaron la síntesis de numerosos péptidos antimicrobianos. Dos señales parecen ser importantes para gatillar dicha síntesis: los receptores Toll que juegan un papel importante en la inmunidad innata de los vertebrados y los Imd que poseen notable parecido con el factor de necrosis tumoral de los mismos. La respuesta inmune innata produce péptidos (defensinas de 3-5 kDa), que dañan a los patógenos actuando sobre las cargas de las membranas microbianas impidiendo el desarrollo de resistencias. Estos péptidos se han descrito en insectos, anfibios y mamíferos. La *Drosophila* genera 6 péptidos diferentes (Drosomicina, Metchnikowina, Dipterocina, Atacina, Drosocina y Cecropina), con actividad fungicida y contra bacterias Gram positivas y negativas. Los PAMP (patrón molecular asociado al patógeno) son un conjunto de receptores solubles y/o de membrana que discriminan entre moléculas propias y extrañas. Reconocen carbohidratos asociados a las paredes de bacterias, hongos y protozoos y son esenciales para la vida del patógeno (LPS, manosa y ARNs virales de doble cadena). Los receptores PRR son capaces de reconocer a los PAMP, y se observan en la *Drosophila* y en el hombre. Los más importantes tienen un dominio lectina-C y otros con dominios de cisteína y de leucina (LRR); ejemplo son los Toll en *Drosophila* y los TLR en mamíferos. El dominio Toll/IL-1R (TIR) interactúa con proteínas intracitoplasmáticas relacionadas con la apoptosis y la activación celular. Los *equinodermos* como la estrella de mar que acaparó la atención en 1882,

cuando Metchnikoff demostró en ellas la existencia de las células fagocíticas especializadas. Los injertos alogeneicos son rechazados con un infiltrado celular y con respuesta de memoria específica intensa. Fueron identificadas moléculas similares a la IL-1, al FNT- $\alpha$  y a las aglutininas. Finalmente, los *tunicados* (ascidia, Amphioxus) como prevertebrados muestran interesantes avances: células hematopoyéticas que se autorrenuevan, células cuasi-linfoideas y un CMH simple que controla el rechazo de trasplantes extraños. Muchos de los más importantes componentes del sistema complemento comienzan a aparecer en estos animales, no obstante, ninguno de los más conspicuos elementos de la inmunidad adaptativa han sido hallados en los invertebrados.

En los vertebrados, hallamos a los *ciclóstomos* (lamprea, peces sin mandíbula) son los más tempranos que sobreviven con células linfoideas organizadas en focos en la faringe y la primera inmunoglobulina anticuerpo bien definida en una molécula de 4 cadenas producidas en respuesta específica. Se destaca que otras moléculas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, como las moléculas de adhesión, están presentes en otros invertebrados como los artrópodos. En los *peces cartilagosos* (tiburones) aparece el timo, el bazo y el CMH, la respuesta inmune secundaria y los plasmocitos con alta y rápida producción de anticuerpos (IgM-7S-18S). Las cadenas de las inmunoglobulinas poseen puentes disulfuro y las formas con bajo y alto peso molecular posiblemente resultan de la polimerización más que de clases diferentes. Hacen su aparición moléculas de la vía clásica del complemento. Por su parte, los *peces óseos* expresan diversas respuestas a mitógenos y hay evidencias de cooperación T-B. También hay indicios de NKC y de elaboración de IL-2 e IFN. Se producen reacciones mixtas linfocitarias y los peces Zebra poseen un CMH polimórfico similar a aquel de los mamíferos. Los *anfibios* poseen otra clase de inmunoglobulina -IgG- y antígenos del CMH en forma clara. Durante la morfogénesis de renacuajo a rana se desarrolla tolerancia específica a los antígenos del nuevo estadio. Aparecen por primera vez nódulos linfáticos ganglionares y el tejido linfático asociado al intestino (GALT) al igual que la hematopoyesis en la médula ósea. En los *reptiles* se creía que portaban en su timo células con inmunoglobulinas similares a las del suero, pero es probable que esto sea sólo un antecedente del RcT, y que los antisueros detecten una reactividad cruzada con las inmunoglobulinas. Todas las *aves* producen sus LB en un órgano cercano a la cloaca llamado bolsa o bursa de Fabricius. Los mecanismos para generar anticuerpos son muy diferentes desarrollando un proceso conocido como conversión génica. Poseen un timo grande y multilobular sin nódulos convencionales y su sistema complemento es muy diferente al de los mamíferos, donde el factor B toma el lugar de C2 y de C4. En los *mamíferos*, las características sobresalientes son una mayor diversidad de clases y subclases de inmunoglobulinas (IgA, -IgA1 e IgA2, IgG, -IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, -IgM, IgD e IgE), y de antígenos del CMH (locus A, B, C, DP, DQ, DR, E, F, G), más que por la adquisición de otras funciones efectoras. Hay aspectos curiosos: las ratas poseen una inmunidad innata muy fuerte y otros, como la ballena y el hámster, tienen escaso polimorfismo del CMH. Por último, los hombres y ratones son inmunológicamente muy similares (por fortuna para los hombres). De lo expuesto, se advierte que la aparición de la IgE (en los mamíferos en general y en el hombre en particular), es tardía en la evolución y quizás se deba a la necesidad de poseer un mecanismo antiparasitario eficiente habida cuenta de las condiciones ambientales en las que vivía el hombre primitivo.

Corresponde hacer una mención a las *plantas*. Como los mamíferos poseen sofisticados mecanismos para defenderse de los microbios patógenos. Tienen receptores que reconocen componentes moleculares de bacterias, hongos y virus. Estas defensas comprenden la secreción de sustancias antimicrobianas (ejem. óxido nítrico) que también se detectan en los vertebrados, y, el silenciamiento del ARN donde pequeñas secuencias del ARN de doble cadena gatillan la degradación de secuencias específicas del ARNm, y por ello silencian genes virales activos. La respuesta de las plantas se basa en un mecanismo llamado HR (hiperrespuesta) de rápida realización que consiste en la muerte celular (apoptosis) en el lugar de la infección. Esto impide el acceso de los patógenos a las fuentes nutricionales y limitar su proliferación. Por la infección se producen cambios fisiológicos con la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno), cambios en el pH intracelular con flujo de iones, endurecimiento de la pared celular en los lugares cercanos a la infección y liberación de NO y PR (proteínas antimicrobianas). Estas glucanasas y quitinasas son antibacterianas y antifúngicas. El SAR (sistema de resistencia adquirida) induce la liberación de PR y la acumulación de ácido salicílico. Los virus interactúan con las plantas por los genes de virulencia (*avr*) y alelos de plantas correspondientes a los genes de resistencia-R. Los productos R reconocen señales dependientes de *avr* y traducen señales para la defensa. Los genes R son polimórficos y el *avr* depende de la variabilidad genética de la planta. Si el patógeno o planta carecen de los genes *avr* o R la interacción lleva a enfermedad. Los genes R usan receptores LRR similares a los receptores Toll o TLRs.

## 9.- Nomenclatura.

La Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI) estableció en 2001 una nueva clasificación para los fenómenos alérgicos luego de una prolongada deliberación del grupo de especialistas creado para tal fin en 1990. Tanto la Academia como la Organización Mundial de Alergia (WAO) poseen gran prestigio y su página web exhibe estas conclusiones en 24 idiomas. Con respecto a las dificultades semánticas relativas a la nomenclatura del eccema atópico o dermatitis atópica, recién en mayo de 2004, la WAO produjo su informe definitivo basado en aquel de la EAACI con algunos pequeños cambios. El vocablo *alergia* ha sido empleado en el pasado de manera muy discrecional, y poco crítica para describir todo tipo de reacciones de la piel y de las mucosas; más cercanamente muchas reacciones debidas a alimentos y a aditivos de los mismos, así como, reacciones por medicamentos integraron el vasto campo de las “alergias” hasta llegar al colmo de admitir alergia a la electricidad en una paciente con alteraciones verdaderamente psicológicas. Aparece entonces el vocablo ***hipersensibilidad*** como un paraguas protector para tantos desatinos. La EAACI la define como “los síntomas y signos objetivos iniciados por la exposición a un estímulo definido en una dosis o intensidad que es bien tolerada por los sujetos normales.” De esto se deduce que el fenómeno puede o no ser alérgico, y puede o no haber mecanismos inmunológicos involucrados en él. Por todo ello, podríamos decir que “alergia es un fenómeno de hipersensibilidad que involucra a un mecanismo inmunológico pudiendo ser éste humoral o celular (IgE y/o linfocitos).” El vocablo ***atopía*** fue empleado como sinónimo de *alergia*, y a veces en forma poco consistente. En la década del 70, Pepys emprendió una especie de cruzada con el objeto de restringir el alcance del término *atopía* a las reacciones clásicas a inhalantes y mediadas por la IgE. De tal manera que en 2005 la WAO y la EAACI

definen como *atopía* “ a aquella tendencia familiar o personal de aparición habitual en la infancia o en la adolescencia, con la síntesis de una IgE específica a aero-alergenos del habitat (usualmente proteínas) con la producción de rinoconjuntivitis, asma bronquial y eccema”. De tal manera, tendremos rinitis y asma atópicas y no atópicas y se deberá ser muy cuidadoso en la definición ya que las estrategias terapéuticas no son similares. La *atopía* es una condición genética, y la IgE podría ser un marcador genético tal como lo son los grupos sanguíneos humanos. Un aspecto de las enfermedades alérgicas que más confusión provocó en su momento fue el de la interpretación de la “dermatitis” que en general se asoció con la alergia, y más aún con la atopía, generalizándose el empleo de la definición “dermatitis atópica”. Hanifin y Rajka establecieron criterios para asegurar una adecuada definición de dicha patología. Deberían asociarse 3 de los 4 ítems sugeridos para considerar atópica a una dermatitis. Pero la cosa se complicó semánticamente pues había pacientes que no evidenciaban ningún antecedente heredofamiliar de atopía, historia personal de la misma en otras edades y órganos o sistemas, y que eran rotulados como eccemas atópicos. Tan confusión llegó a la insensatez de definir como eccema atópico-atópico en un verdadero atópico y eccema atópico-no-atópico en un individuo no atópico. Ante este caos la EAACI y la WAO decidieron –sensata y simplemente– llamar *eccema atópico* a la dermatitis sufrida en un sujeto verdaderamente atópico y *eccema no atópico* en aquel que no lo sufre. Como colofón, se podría admitir que las patologías de los 4 tipos clásicos de la clasificación de Gell & Coombs, y el tipo 5° de Irvine fuesen rotulados como “alérgicas” en un sentido general reservando la denominación de “atópicas” para aquellas que tan sólo involucran al tipo I de Gell & Coombs (algunos autores definieron en el pasado a ciertas condiciones autoinmunes como alérgicas v.g. encefalomiелitis, orquitis, tiroiditis, uveítis, artritis, etc., lo cual condujo a confusiones idiomáticas que se pretenden superar a la luz de los actuales conocimientos de la Inmunología).

#### 10.- Reflexiones finales.

El síndrome atópico o génesis atópica o diátesis atópica es un fenómeno natural que involucra a un gran número de seres humanos (18-20 % de la población mundial).

No obstante, en la actualidad, no podemos limitar más el campo de este modelo biológico habida cuenta de la comprobación de su existencia a nivel de otros mamíferos, generalmente, cercanos al hombre. Cómo se originó esta peculiaridad biológica en la evolución del ser humano mereció muchas especulaciones. Entre ellas, la más atrayente es la que acaparó la atención sobre el genépsilon del ADN germinal del LB, que, como se sabe, codifica para la síntesis de la IgE, glucoproteína responsable de los fenómenos de hipersensibilidad inmediata. Esta inmunoglobulina participa también en los mecanismos efectores de la respuesta antiparasitaria contra los nematodos, en especial, aquellos que presentan en algún momento de su ciclo estadíos larvarios migrantes por diversos tejidos del organismo.

La IgE produce una peculiar activación de los eosinófilos a través de receptores específicos, los que, por sus potentes enzimas y “toxinas” desarrollan un intento no totalmente exitoso de su eliminación definitiva.

Estos hallazgos condujeron a profundizar las investigaciones genéticas, y así se revelaron influencias relacionadas con el CMH y otras no; posiblemente las primeras estén vinculadas con una más precisa presentación de los alérgenos o de sus epitopes o

determinantes antigénicos moleculares más conspicuos al LT, tal como se demostró para algunos pólenes y para los derivados de los ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* y *farinae* y de *Blomia tropicalis* y de las cucarachas *Periplaneta americana* y *Blattella germanica*. La ingerencia del medio ambiente es definitiva; el binomio genética + hábitat es definitivo, tanto es así, que hasta podría especularse con una “**teoría medio ambiental de la alergia con mayor incidencia en la atopía**”.

Queda aún mucho por aclarar en el mecanismo del tipo I de Gell & Coombs donde se agrega la participación de otras moléculas activas como varias citoquinas y quimioquinas y ciertos péptidos opioides de origen neuronal cuya relevancia en la patología involucrada permanece aún poco conocida.- (101-102-103).

#### 11.- Anticuerpos monoclonales.

Si un antígeno se inyecta en un ser humano, los LB de su sistema inmune se transformarán en células plasmáticas, y producirán anticuerpos que se unirán a ese antígeno. Cada LB produce un solo tipo de anticuerpo; así, diferentes LB producirán anticuerpos diferentes que se unirán a distintas partes del antígeno. Esta mezcla fisiológica natural de anticuerpos es conocida como **antisuero policlonal**. Para producir anticuerpos monoclonales, primero se obtienen LB del bazo de un animal que ha sido expuesto al antígeno. Estos LB se fusionan en presencia de PEG (polietilenglicol) con células tumorales de mieloma múltiple (un tipo de cáncer), que crecen indefinidamente en un cultivo celular. Esta fusión hace a las membranas celulares más permeables, y constituyen un **hibridoma**, pudiendo multiplicarse rápida e indefinidamente (ya que son células tumorales), y producen gran cantidad de anticuerpos. Los hibridomas se diluyen y se cultivan un gran número de veces para obtener muchas colonias, las cuales producen sólo un tipo de anticuerpo. Los anticuerpos son analizados para conocer su capacidad de unirse a un antígeno determinado, por ejemplo con un tipo de test radioinmunológico llamado ELISA. La producción de anticuerpos monoclonales es compleja. Primero se disgrega el bazo del ratón inmunizado, donde se acumulan los LB, que tienen una escasa viabilidad en cultivo, y se fusionan con células de mieloma deficientes en enzimas implicados en la síntesis del nuevo ADN, como la timidina quinasa (TK) o la hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT). Los productos de la fusión celular (hibridomas) son cultivados en medio HAT (de hipoxantina, aminopterina y timidina), donde las células mielómicas son eliminadas. Sólo crecen en el medio de cultivo HAT las células que nacieron de la fusión entre un LB y una célula de mieloma. Estas células híbridas contienen un número elevado de cromosomas (72 del mieloma y 40 del LB), que, en las sucesivas divisiones se irán perdiendo hasta oscilar entre los 70 y los 80 cromosomas. Por ello, algunas células pierden la capacidad de secreción de anticuerpos, o bien, funciones básicas para la viabilidad celular. Si se identifica como positivo un pocillo se somete a un proceso de clonación, para evitar el crecimiento de células no productoras, que, al ser metabólicamente más eficientes acabarían por dominar el cultivo.

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse en cultivos celulares o en animales. Si las células de un hibridoma se inyectan en tejidos como el peritoneo (cavidad peritoneal), producen tumores que sintetizan un fluido rico en anticuerpos, llamado líquido ascítico. Se conoce la tecnología necesaria para la producción de anticuerpos en ausencia de inmunización del animal. Es la denominada tecnología de los anticuerpos recombinantes.

Los avances en la tecnología génica han facilitado en gran medida la manipulación genética, producción, identificación y conjugación de fragmentos de anticuerpos recombinantes, obteniéndose nuevos anticuerpos multivalentes y multiespecíficos.

Estas tecnologías han permitido desarrollar estrategias de *screening* de anticuerpos monoclonales fuera del cuerpo humano. Para ello es necesario disponer de enormes librerías de genes de anticuerpos, mediante amplificación PCR de cADN de linfocitos, o, alternativamente, mediante síntesis *in vitro* de genes usando cebadores aleatorizados (*randomized wobble*). El método de 'screening' de estas librerías debe tener una eficiencia comparable a la del sistema inmune, lo que se puede conseguir exponiendo en la superficie de microorganismos los anticuerpos producidos.

Los microorganismos empleados son los fagos filamentosos como M13 o bacterias. Se establece un enlace físico entre la función de unión al antígeno y el gen del anticuerpo, así la afinidad al antígeno permite aislar el microorganismo portador del gen del anticuerpo entre millones de otros. Una vez aislado el clon específico se amplifica para la producción del anticuerpo de interés, por ejemplo, en *E. coli*.

Qué mejor respuesta que recurrir a las palabras del Dr. Milstein:

“Imaginemos una gran mezcla de sustancias químicas entre las cuales nos interesa sólo una de ellas. Una sustancia entre millones y millones. Es como una aguja en un pajar. Si tenemos un anticuerpo específico contra una sustancia, ese anticuerpo puede funcionar como un imán capaz de ignorar la existencia del pajar y reconocer exclusivamente la aguja. A los ojos de un anticuerpo, el pajar no existe. Este simple concepto dio lugar a lo que se dio en llamar “Inmunoensayos”, que permitieron la medición precisa de hormonas y otras muchas sustancias no sólo en medicina sino en química analítica en general. Los inmunoensayos introdujeron los anticuerpos para su uso como herramienta analítica de importancia fundamental en áreas que nada tenían que ver con la inmunología. El problema era que para preparar un anticuerpo específico era necesario utilizar agujas puras”.

Los anticuerpos monoclonales (AcM) humanos son superiores a los de origen murino para terapia *in vivo* en humanos. Los avances han sido lentos en llegar debido a dificultades técnicas relacionadas con su preparación, las cuales incluyen la fuente de LB, técnicas de inmunización y de immortalización. Una óptima utilización clínica de los AcM humanos requerirá un mejor entendimiento de los factores envueltos en la inmunización *in vitro* y en la habilidad de formular “cócteles” de estos reactivos.

Los AcM son, altamente específicos y reaccionan únicamente con un epitopo del antígeno. Por ende, la principal diferencia entre anticuerpos policlonales y monoclonales es el grado de especificidad. La disponibilidad de AcM ha revolucionado enormemente el campo de las biociencias, y el uso de estos reactivos ha facilitado el desarrollo y creación de nuevas áreas en la investigación biomédica.

El primer trabajo que detalla la producción de AcM de origen murino apareció en 1975, y durante los siguientes 30 años hubo tanto progreso en el campo, que todos los laboratorios modernos utilizan los AcM de ratón para diversos propósitos. La utilidad de los AcM para diagnóstico, profilaxis y terapia ha sido intensamente estudiada durante los últimos años. Los AcM son, debido a su selectividad y especificidad, muy útiles para la terapia de enfermedades infecciosas, tanto virales como bacterianas, y principalmente para la terapia del cáncer.

La quimioterapia “clásica” no siempre es eficaz, sobre todo en casos de cáncer avanzado (metastásico) o en la aparición de resistencias frente a las terapias utilizadas. Por ello, se han buscado nuevas alternativas como son los AcM con el fin de mejorar el margen de seguridad y efectividad de los tratamientos aplicados.

Una de sus características es la rápida multiplicación de las células anormales, pudiendo propagarse a otros órganos, mediante el proceso conocido como metástasis. La relación del ser humano con el cáncer es tan antigua como nuestra propia existencia, así, se ha encontrado un cráneo humano fosilizado, el llamado “hombre de Steinheim” que data del pleistoceno medio (hace 365.000 años) con una importante deformación derivada de un proceso tumoral benigno.

En uno de los primeros documentos médicos de la historia “el papiro de Ebers” (1500 aC), se describe exhaustivamente un caso de un carcinoma mamario, para el cual no se propone una solución. Aunque se trata de una patología conocida desde la antigüedad, no ha sido hasta finales del siglo XX, y principios del XXI, cuando se han podido desarrollar e investigar la etiología y el desarrollo de esta patología.

Se considera que el cáncer es una de las enfermedades humanas más difíciles de explicar, debido a su enorme complejidad. El proceso tumoral se genera cuando se producen mutaciones en el ADN de una célula. En condiciones fisiológicas estas mutaciones son reparadas por una compleja maquinaria celular, compuesta por enzimas (polimerasas, ligasas, nucleasas...), pero si estos sistemas no reparan el ADN, se activa un mecanismo de muerte celular programada (apoptosis) donde interviene la proteína p53, y la activación de las caspasas, cuyo resultado es la muerte celular. Si, estas mutaciones se producen en zonas del genoma responsables de la regulación de los sistemas de control del ciclo celular o de la reparación del mismo genoma (inestabilidad genómica), es probable que la célula, sufra una ruptura en la homeostasis del ciclo celular, y, además de no entrar en apoptosis, se immortalice, y adquiera una capacidad replicativa ilimitada. Se ha demostrado que la capacidad de immortalizarse, está relacionada, con la reactivación de la telomerasa (enzima capaz de regenerar los extremos de los telómeros, cuya longitud está relacionada con la longevidad de la célula). Otra causa de la malignización de las células, es debida a la presencia desmedida de señales proliferativas, como consecuencia de una sobre-expresión de receptores de crecimiento, como HER2 (receptor de factores de crecimiento epidérmico humano) en el cáncer de mama. Las células tumorales, con el tiempo, son capaces de invadir el tejido en el que se encuentran, e incluso romper la barrera tisular con metaloproteasas, y expandirse a otros tejidos. La presencia de factores angiogénicos (como los VEGFs o factores de crecimiento del endotelio vascular), que estimulan la aparición y crecimiento de vasos sanguíneos, permiten que células tumorales se transporten a través de la circulación general, y colonicen nuevos tejidos, generando tumores secundarios (metástasis). El cáncer es una enfermedad multifactorial, por lo que su aparición y desarrollo no se puede atribuir a un único factor en particular, si no que se desarrolla como consecuencia de una acumulación de desencadenantes que interaccionan de manera muy compleja. Existe una predisposición genética al desarrollo tumoral, así como innumerables factores externos tanto físicos (radiaciones), como químicos (hidrocarburos, metales...) e incluso agentes biológicos (virus del papiloma humano, virus de la hepatitis, *Helicobacter pylori*, etc).

Los anticuerpos son proteínas solubles, que forman parte de la inmunidad específica con poseen pesos moleculares entre 160 kDa y 970 kDa. Tienen 2 cadenas ligeras y 2 cadenas pesadas unidas por puentes disulfuro. La zona del anticuerpo que se une al antígeno se denomina Fab y el fragmento restante se denomina Fc que se une al receptor celular. El Fab se une específicamente al antígeno porque los aminoácidos presentes, hacen que se fije el antígeno (por interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals), lo que provoca una unión rápida y fuerte entre ambos.

Los anticuerpos generados, reconocerán antígenos presentes en el patógeno, por lo que reciben el nombre de anticuerpos policlonales ya que proceden de la expansión clonal de diferentes clones de LB. Sin embargo, cuando es una LB tumoral, la expansión clonal de la misma, generará células que producirán el mismo anticuerpo que la célula tumoral de la cual proceden, estos anticuerpos reconocerán un único antígeno presente en el patógeno, por lo que reciben el nombre de anticuerpos monoclonales. La aplicación de anticuerpos policlonales en la terapia anti-infecciosa se realiza desde el siglo XIX, sin embargo desde 1975, Georges Köhler y César Milstein desarrollaron técnicas para la obtención de sueros monoclonales específicos frente a un antígeno concreto. Los AcM pueden ser : **murinos**, del ratón exclusivamente, con efecto terapéutico reducido por su rechazo inmunológico; **quiméricos**, donde el Fab sigue siendo del ratón, pero el Fc es humano, por lo cual tiene más aceptación terapéutica; **humanizados**, donde el 90% es humano y sólo un 10% del ratón en las zonas hipervariables del Fab, y **humanos**, que desgraciadamente, hay pocos, y no hay ningún fenómeno de rechazo. Recientemente, apareció un anti-Covid 19, humano a partir del “plasma” de donantes curados de la enfermedad.

La célula del mieloma debe ser histocompatible con la célula productora de anticuerpos, no secretar inmunoglobulinas, y carecer de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT), la que será utilizada para el proceso de selección de los hibridomas. La obtención de hibridomas y posterior producción de anticuerpos monoclonales consta de 3 fases básicas: **fusión, selección y mantenimiento**. Para realizar la **fusión** de ambas células, se cultivan en presencia de polietilenglicol, con el fin de preservar la fusión de las membranas celulares. Esta fusión se produce al azar, por lo que además de conseguir los híbridos deseados (linfocito-célula de mieloma) también aparecen híbridos linfocito-linfocito y célula de mieloma-célula de mieloma. El proceso de **selección** de hibridomas se realiza mediante cultivo de las células en presencia de un medio que contenga hipoxantina (posible precursor de nucleótidos en algunas células), aminopterina (inhibidor del ácido fólico) y timidina. En este medio pocas células pueden sobrevivir y replicarse debido a la imposibilidad de sintetizar nucleótidos. Únicamente los hibridomas linfocito-mieloma pueden sobrevivir debido a que el mieloma aportará inmortalidad y el LB aportará la enzima HGPRT que permite la síntesis de nucleótidos a partir de la hipoxantina (independiente al ácido fólico). Finalmente, tras el proceso de selección, los hibridomas sobrevivientes se someten a pruebas de ELISA para seleccionar aquellos clones que secretan los anticuerpos monoclonales deseados. Posteriormente, dichos clones se conservan y **mantienen** mediante técnicas de cultivo celular habituales o tras la inoculación intraperitoneal de los hibridomas en animales histocompatibles. Los anticuerpos obtenidos proceden de células de un animal inmunizado (roedores habitualmente), por lo que existe una elevada probabilidad que se produzca un rechazo del paciente frente a los mismos (su sistema inmune los detectará como extraños y generará anti-anticuerpos), y esto puede

provocar, no sólo la ineficacia del tratamiento, sino, la aparición de reacciones adversas de hipersensibilidad. La solución a estos problemas de rechazo, comenzó en la década de los 80 gracias a la aparición de técnicas de ingeniería genética. Así la utilización de técnicas de DNA recombinante (rDNA), permitió fusionar los genes murinos que codifican para los Fab de las inmunoglobulinas, con genes humanos que codifican para regiones Fc de los anticuerpos. Así, se obtuvieron los anticuerpos quiméricos, los cuales eran un 70% humanos y un 30% murinos. Ante la aparición de rechazos frente a los anticuerpos quiméricos, en 1986 se desarrolló, la humanización de anticuerpos, que consiste en transferir las CDR (regiones determinantes de complementariedad) murinos a las regiones Fab humanas. El inconveniente de dichos anticuerpos, es que se pierde afinidad por el antígeno, disminuyendo la eficacia del mismo. Además la existencia de tan sólo una parte no humana en un anticuerpo monoclonal va ser capaz de generar rechazo, por lo que actualmente, se están desarrollando técnicas para conseguir AcM completamente humanos, gracias a las bibliotecas de fagos. Mediante PCR se generan genotecas de genes responsables de las regiones variables tanto de las cadenas pesadas como de las ligeras del anticuerpo. Después se digieren estas secuencias con enzimas de restricción y se combinan mediante PCR, obteniendo un repertorio de secuencias génicas que codificarán las fracciones variables de cadena simple (que contienen los dominios de unión antigénica). A continuación, se introducen estas secuencias en el genoma de un fago para que las exprese para posteriormente seleccionar aquellas que posean una mayor afinidad por el determinante deseado y se transfectan a bacterias para que produzcan estas fracciones variables de elevada afinidad. Actualmente los AcM se producen a partir de líneas celulares inmortalizadas modificadas genéticamente a través de la tecnología del DNA recombinante (rDNA). Los sistemas biológicos que se utilizan a nivel industrial (biofactorias) son las células NSO (células de mieloma murino) y células CHO (células ováricas de hámster chino). Las células NSO son auxótrofas para el colesterol y no expresan glutamina sintetasa (lo que permite la selección con metotrexato), su principal inconveniente es que glicosilan los anticuerpos con ácido N-glicolilneuramínico (NGNA) que no es producido por los seres humanos, por lo que existe el riesgo de reacción frente al AcM. Las células CHO se usan en la industria biotecnológica por su versatilidad y alta producción, pero provocan problemas de tolerancia en los pacientes debido a las glicofomas de los AcM producidos (generan NGNA y uniones  $\alpha$ -gal (1,3)  $\alpha$ -gal), que pueden provocar la generación de anti-anticuerpos anti-AcM. Para la producción de AcM mediante la técnica del rDNA, en primer lugar se debe construir un vector plasmídico que contenga la información génica necesaria para codificar las cadenas del anticuerpo, y además permita la selección de las células secretoras de AcM de mayor productividad. Para asegurar una mayor expresión del AcM, se introducen tanto promotores fuertes (como el del citomegalovirus o el asociado al factor de elongación 120), como un intrón en el extremo 5' para aumentar la exportación de mRNA al citoplasma, posteriormente se añade una cola de poliadenina (poliA) en el extremo 3' para aumentar la concentración de mRNA, una secuencia Kozak de consenso antes del codón de inicio que aumenta el rendimiento de la traducción, y se añade un péptido señal que permite que la célula secrete el AcM de interés facilitando su separación. La transfección (introducción del DNA exógeno en la célula que va a ser productora) se realiza por electroporación o lipofección. Tras esto, se cultivan las células en medio selectivo, de tal manera que sobrevivirán aquellas que hayan integrado y expresado el plásmido, cuya

información génica les permitirá la producción del AcM, así como la maquinaria metabólica necesaria para sobrevivir en el medio específico. Se seleccionan por ELISA y perfiles de glicosidación, las colonias de células productoras que sean más productivas y tolerables por el paciente. Gracias a la tecnología del RNA interferente (RNAi) se silencian genes para mejorar las características del AcM. Mediante estas técnicas se eliminan restos de fucosa unidos al AcM, que aumenta su capacidad de desencadenar la citotoxicidad celular por anticuerpos o silenciar genes apoptóticos que evitarían la muerte de las células productoras de anticuerpos. Una vez seleccionadas las líneas celulares que producen los AcM deseados, estas se cultivan en grandes birreactores, ajustando las condiciones y el medio de cultivo para alcanzar una producción óptima. La separación y purificación de AcM se realiza mediante cromatografía (de proteína A y de intercambio iónico).

AcM dirigidos frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (o HER1 o ErbB1), es una proteína transmembrana de la familia tirosina quinasa y posee función de receptor de factores de crecimiento, cuyos ligandos endógenos son: la anfiregulina y la epiregulina. La unión de estos ligandos hace que este sufra una dimerización y se autofosforile, creándose así un lugar de unión para las proteínas adaptadoras. EGFR activa preferencialmente la vía de las MAP quinasas. Esta red de señalización controla gran variedad de funciones biológicas como proliferación, diferenciación, supervivencia, adhesión y migración. La frecuencia de sobre-expresión de este receptor en carcinomas humanos es alta, y habitualmente se co-expresa con alguno de sus ligandos. La existencia de una mayor cantidad de este tipo de receptores y ligandos generará una activación de las vías de señalización indicadas, provocando un aumento de la proliferación que puede desencadenar una alteración del ciclo celular, así como la replicación e inmortalización de las células (en definitiva, la transformación en células tumorales). Cetuximab es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG1 quimérico cuya diana específica es el receptor EGFR. Actualmente es utilizado en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico y el cáncer de células escamosas de cabeza y cuello y posee una afinidad entre 5 y 10 veces mayor por EGFR que sus ligandos naturales. La unión de AcM-receptor provoca: inhibición de la función del receptor EGFR, así como internalización del mismo, con lo que disminuye la cantidad de EGFR en la membrana celular. Por otro lado va activar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) . Así, se induce la apoptosis de la célula diana, se inhibe la proliferación, se bloquea la migración y se evita la neovascularización (esto impide la metástasis) de las células tumorales. Los pacientes tratados con cetuximab, tienen una baja producción de anticuerpos anti-quiméricos, lo que evita reacciones adversas, sin embargo se han descubierto varios tipos de resistencia a esta molécula, en pacientes que presentan mutaciones en los exones 2, 3 y 4 de KRAS (oncogén), que active de manera independiente al receptor, por lo que la acción bloqueante del AcM carece de efectividad. Únicamente, se van a someter a tratamiento con cetuximab, los pacientes con expresión nativa del oncogén mencionado. Tratar con esta molécula a pacientes con las mutaciones nombradas, disminuye su tiempo de supervivencia libre de progresión tumoral (PFS). Las pautas de administración del cetuximab implican su combinación junto con: irinotecán (inhibidor de topoisomerasas) y oxaliplatino (agente alquilante) en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico con expresión KRAS nativo. Puede administrarse como monoterapia tras el fracaso del tratamiento con irinotecán y oxaliplatino o cuando no se tolera el irinotecán, o bien combinarlo con radioterapia en el cáncer de células escamosas de cabeza y cuello

localizado, pero avanzado, o con quimioterapia de platino en el cáncer de células escamosas de cabeza y cuello recurrente y/o metastásico. Las reacciones adversas son la presencia de anafilaxia producida por reacciones cruzadas con IgE preformadas, síndrome de liberación de citoquinas, enfermedad intersticial pulmonar, reacciones cutáneas, riesgo de hipocalcemia e hipomagnesemia y queratitis ulcerativa. Panitumumab es otro AcM que tiene el mismo mecanismo de acción que Cetuximab (están dirigidos frente al receptor EGFR) y sus aplicaciones clínicas son muy similares. Se trata de un anticuerpo IgG2 completamente humano producido en línea celular CHO mediante tecnología del DNA recombinante. Las **funciones** de los AcM podrían resumirse en las siguientes 10 acciones: **1)**: actuar como inmunomodulador; **2)**: comportarse como inmunodepresor; **3)**: ejercer un bloqueo funcional sobre los LT-reg.; **4)**: intervenir como un bloqueante entre un receptor y su ligando; **5)**: es un activador del sistema complemento llevando a la lisis celular; **6)**: son responsables de una lisis celular mediada por anticuerpos; **7)**: activación de los LT y de sus mecanismos efectores; **8)**: son inductores de apoptosis; **9)**: inhibición de la traducción de señales, y, **10)**: inhibición de la activación de receptores.

12.- El CRISPR/cas9 en la Investigación básica.

Toda técnica que permita editar o corregir con precisión el genoma de las células vivas es uno de los objetivos de la investigación biomédica. En los últimos años se investigaron herramientas genómicas entre las que sobresale el sistema CRISPR/Cas9, que es un mecanismo de defensa bacteriano, que se adaptó y rediseñó para otros modelos celulares. Su técnica económica, y enorme potencial de CRISPR/Cas9 han revolucionado las ciencias biomédicas y son un gran avance en el campo de la terapia génica que requiere la bioética apropiada. Se conocen más de 10.000 enfermedades hereditarias monogénicas (causadas por un único gen) que afectan a millones de personas en todo el mundo. Algunas son causadas por mutaciones autosómicas dominantes, o sea que la herencia de una copia defectuosa del gen responsable puede causar síntomas clínicos. Las técnicas que permitan editar o corregir con precisión el genoma de células vivas es uno de los objetivos de la investigación biomédica.

La revista Nature publicó el uso de la técnica de edición génica CRISPR/Cas9 para corregir una mutación patogénica en embriones humanos viables. Las metodologías de edición genómica se basan en un corte en las 2 hebras de la doble hélice del ADN realizado en forma precisa y dirigida en la región a editar. Este corte es reparado por la célula por 2 mecanismos alternativos. La vía de reparación preferencial es la unión de extremos no homólogos o recombinación no homóloga. Es la simple unión de los extremos generados que introduce mutaciones adicionales por inserciones o deleciones en la zona de la unión. La recombinación homóloga que utiliza como molde la región correspondiente del cromosoma homólogo o una molécula exógena de ADN provista para llevar a cabo la correcta unión de los extremos. El cromosoma así editado es heredado por las células hijas. Las técnicas de edición genómica para aplicaciones clínicas se enfrentan a 3 desafíos principales:

**1)**: Generar un genoma en forma eficiente y precisa, es decir en la secuencia que contiene la mutación o en la zona que se desea editar, y únicamente allí. Este desafío plantea otro que es el desarrollo de técnicas muy sensibles para detectar si se generaron cortes no deseados

en otras regiones del genoma; **2)**: Conseguir una reparación correcta del genoma. Esto implica vencer la baja eficiencia de la vía homóloga frente a la vía heteróloga y/o monitorear y seleccionar las células en las que la reparación fue correcta (la reparación por la vía heteróloga es usada en la investigación cuando se interrumpe un gen para estudiar su función, pero es inaceptable en las aplicaciones clínicas, a menos que el objetivo sea anular la función de un gen); **3)**: En la edición genómica para obtener embriones, se lleva a cabo la edición tempranamente, para que todas las células posean la secuencia editada, y no se generen organismos “mosaico”, con células que porten la versión corregida, y otras con la versión original, mutada. Si algunas células mantienen la mutación, la generación de “mosaicos” dificultaría el diagnóstico genético preimplantatorio. Se han investigado metodologías para superar estos desafíos, o sea, la capacidad de dirigir una nucleasa a una secuencia determinada del ADN, a elección del investigador. Entre ellas se encuentran las meganucleasas, las nucleasas efectoras tipo activador de transcripción (Transcription Activator-Like Effector Nucleases o TALENs), y las nucleasas con dominios de dedos de zinc (Zinc Finger Nucleases o ZFNs), actualmente testeadas en ensayos clínicos. Las técnicas de edición genómica se basan en un corte en las 2 hebras de la doble hélice del ADN (corte doble cadena, o “double strand break, DSB”) realizado en la región del cromosoma a editar, para ser reparado por la célula por recombinación no homóloga o unión de extremos no homólogos (NHEJ, Non-homologous end-joining) o por recombinación homóloga (HDR, Homology-directed repair), usando como molde la región correspondiente del cromosoma homólogo o una molécula exógena de ADN provista.

#### CRISPR/cas9 y la terapia génica.

Se hallaron en diversos microorganismos, varios tipos de sistemas CRISPR de variado grado de complejidad que les permiten defenderse de virus y de otros ADNs foráneos. Estos sistemas son utilizados por los microorganismos para generar un “catálogo” de los ADN virales con los que se encuentran. Al tener un segundo encuentro con el virus, los microorganismos realizan una copia de las secuencias almacenadas (denominada “ARN guía”) para reconocer a las moléculas del ADN invasor, dirigir a la nucleasa Cas9 y cortarlas para luego eliminarlas. Se trata de un sistema inmune adaptativo. El estudio de estos mecanismos planteó la posibilidad de utilizarlo en otros sistemas celulares para guiar a la nucleasa Cas9 hacia otras secuencias. Esto requirió una extensa labor de optimización para conseguir que la nucleasa bacteriana se dirija al núcleo de las células eucariotas. La secuencia blanco que es cortada por Cas9 está determinada por la secuencia del ARN guía, por lo que basta con sintetizar una nueva molécula de ARN para redireccionar a la nucleasa hacia otro gen. En este aspecto, CRISPR se distingue de las nucleasas mencionadas, para las que, por cada secuencia que se quiere editar, se requiere diseñar una nueva enzima. Esto convierte al sistema CRISPR/Cas9 en una técnica de edición genómica simple y accesible (económica y técnicamente) comparada con los métodos anteriores.

El sistema CRISPR/Cas9, adaptado para células eucariotas está compuesto por la nucleasa Cas9 y un ARN guía que, por su secuencia, la direcciona hacia el genoma a editar. La nucleasa efectúa entonces 2 cortes, uno en cada hebra de la doble hélice del ADN. En algunos casos, secuencias no idénticas, pero similares a la región blanco pueden ser reconocidas por el ARN guía provocando cortes inespecíficos por parte de Cas9.

El sistema fue rediseñado para muchas aplicaciones: el encendido o apagado de genes específicos para el estudio de su función, el desarrollo de estudios en gran escala (con una gran población de ARN guías distintos), para la identificación de genes involucrados en un proceso celular determinado, la creación de modelos animales de enfermedades humanas, el direccionamiento de proteínas a secuencias específicas del genoma y la modificación genética de plantas, entre muchas otras.

La edición genómica de embriones por CRISPR/Cas9, con varios intentos de corrección de células y/o embriones humanos, en algunos de los cuales se observó una alta tasa de mosaicismos. Esto requiere de una mayor comprensión del funcionamiento del sistema CRISPR, así como del entorno celular en el que opera la nucleasa, y, por el otro, de una extrema cautela en su utilización. En la revista Nature, el especialista en biología reproductiva Shoukhrat Mitalipov eligió una mutación en el gen MYBPC3, que causa miocardiopatía hipertrófica, una enfermedad hereditaria que afecta a 1 de cada 500 personas. En el espermatozoides donado por un hombre portador de una mutación dominante (una deleción de 4 nucleótidos), fue utilizado para fertilizar in vitro oocitos normales. Como el donante era un heterocigota portador de la mutación, un 50% de sus espermatozoides llevarían la copia normal, salvaje, del gen MYBPC3, mientras que el otro 50% llevaría la copia mutada, generando, un 50% de embriones normales y un 50% de embriones portadores de la mutación. El trabajo se destacó por su edición, reflejada tanto en una alta tasa de corrección de la mutación como en una baja generación de embriones mosaico. La estrategia del investigador consistió, en inyectar los componentes del sistema CRISPR/Cas9 junto con el espermatozoides, en oocitos en metafase II (inyección intracitoplasmática de espermatozoides). Esto aumenta la probabilidad de que la nucleasa Cas9 actúe antes de la primera duplicación del alelo paterno mutado. En segundo lugar, se eligió inyectar la proteína recombinante junto con la molécula ARN guía en vez de introducir la secuencia de ADN que codifica la proteína Cas9 para permitir que ésta se fabrique en las células. Así, la proteína Cas9 estaría activa en las células durante un período acotado, hasta degradarse, reduciendo la exposición a la actividad de la nucleasa, y, la probabilidad de que se sigan generando cortes (específicos o inespecíficos) en el genoma del cigoto. En fin, se obtuvo un 72% de embriones correctamente editados, es decir un 22% de reparación precisa (vía HDR) y de aumento de embriones normales con respecto al 50% esperado. En el 28% de los embriones analizados, los cortes generados por Cas9 habían sido reparados por la vía NHEJ generando inserciones y deleciones en el gen MYBPC3, y éstos habrían sido, por lo tanto, descartados. Un estudio exhaustivo, no detectó ningún corte no deseado por parte de la nucleasa Cas9.

La relevancia del sistema CRISPR/Cas9, no tiene precedentes en las ciencias biológicas. Su simpleza y economía lo pone al alcance de todos y su potencial es

inmenso. Desde la terapia génica hasta la modificación de especies vegetales, pasando por la erradicación de especies de mosquitos portadores de parásitos, de bacterias resistentes a antibióticos, de virus y hongos dañinos para el hombre y los animales, el desarrollo de CRISPR/Cas9, generó entusiasmo y alarma, y, los organismos regulatorios pertinentes deberán implementar los controles bioéticos de la tecnología.

En la clínica, la técnica enfrenta todavía ciertas limitaciones, como ser : la eficiencia y precisión de los cortes generados por Cas9, la eliminación y/o reducción de cortes off-target y su detección, la reparación correcta de los cortes por la vía HDR, la obtención de mosaicos y la vía de administración de los componentes del sistema: la nucleasa Cas9 y el ARN guía. En la fecundación in vitro y diagnóstico preimplantatorio, como el del trabajo de Mitalipov, ¿qué sentido tendría la edición genómica por CRISPR, si la mitad de los embriones ya eran normales? El trabajo fue una prueba del principio, y los embriones NO fueron implantados. Es de esperar que los primeros ensayos que utilicen la técnica de CRISPR/Cas9, sean situaciones en las que los componentes de CRISPR sean inyectados o administrados en los tejidos blanco o en los que las células afectadas sean recolectadas del cuerpo, editadas y reintroducidas. Existen ensayos clínicos con la modificación de células inmunocompetentes y células neoplásicas de cuello uterino.

Nuevamente la manipulación genética, adquiere protagonismo con CRISPR, la actual estrategia de “cortar y pegar”, que ya se aplica en el estudio de la “nueva Cardiología”, con la insuficiencia cardíaca y las coronariopatías.

La técnica CRISPR-Cas9, se desarrolló en 2012, pero se consagró en 2018, cuando el investigador chino He Jiankiu anunció su empleo para crear mellizas con una mutación “beneficiosa” en el gen CCR5, que les conferiría resistencia a la infección por HIV. A pesar de que Jennifer Doudna, una de las creadoras de CRISPR, advirtió que la técnica no está lista para ser aplicada a seres humanos, los especialistas en fertilidad ya mostraron interés en el experimento de He Jiankiu.

La perspectiva de utilizar CRISPR desde estadios embrionarios tempranos para evitar enfermedades hereditarias, e incluso, para mejorar ciertos rasgos humanos, (como la inteligencia), es un proyecto que tienta a más de uno. Si bien la mejora de la especie humana está bastante lejos, la aplicación de CRISPR a la Cardiología es una realidad experimental. El cardiólogo y genetista Sekar Kathiresan, de Harvard, intenta desarrollar una terapia que disminuya el colesterol LDL, por la edición del gen de la enzima PCSK9. Sus primeros candidatos fueron los pacientes con hipercolesterolemia familiar, una condición que afecta a 1 de cada 250 personas, y que aumenta 13 veces el riesgo de enfermedad coronaria si no es tratada, como lo sufrieron un hermano y el tío de Kathiresan, fallecidos antes de los 40 años.

El ADN es una sucesión de bases nitrogenadas compuestas por Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) y Guanina (G). La G siempre se empareja con la C, y la A siempre se empareja con la T. Con el sistema CRISPR / cas9, cortamos una secuencia o base nitrogenada, y, la célula intenta reparar el daño siguiendo su código original, es decir, llegar a tener As delante de Ts o Gs delante de Cs, y como si fuera una cremallera, intentar engancharlas, para restaurar así la herida, y restañar la cicatriz y mantener la continuidad del cromosoma. En esa reparación, de 30 ó 40 veces, solamente en una de ellas, la célula repara de la manera adecuada. O sea que no hay un 100% de concordancia, tan sólo un 3, 4 ó 5%. El 95% de las veces lo que pasa es que la célula en sus intentos de reparación, provoca más daño del que queríamos restaurar. Ese es el rubicón que esta prodigiosa técnica deberá resolver en el futuro para que la bioética la incorpore en la investigación básica.

### 13.-LA SENESCENCIA CELULAR, EL ENVEJECIMIENTO Y LA LONGEVIDAD.

La mayoría de las células somáticas en mamíferos, exceptuando las células germinales y las embrionarias tempranas, no expresan telomerasa (ribonucleoproteína que adiciona repeticiones teloméricas de novo a los cromosomas). Dado que la replicación del ADN es bidireccional, que las ADN polimerasas son unidireccionales y requieren un "primer" o iniciador de la transcripción (fragmento corto e inestable de ARN), de 50-200 pares de bases de ADN telomérico, queda sin replicar al final de cada fase S. Así, sin telomerasa, los telómeros se acortan con cada división celular. Al alcanzar una longitud crítica, las células detienen su proliferación y muestran características morfológicas y funcionales diferentes. Esta es la llamada **senescencia celular** o replicativa.

Esta longitud crítica es de 4 a 6 Kb en células germinales (de un tamaño máximo de 10-15 Kb). Es probable que la célula responda a una modificación de la estructura del telómero más que a su acortamiento

Algunas células somáticas adultas expresan telomerasa, aunque esto no es común, por ejemplo, los LT humanos la expresan transitoriamente. Independiente de la telomerasa, estas células pierden ADN telomérico con cada división celular y senescen. Así, la presencia de telomerasa es insuficiente para prevenir la erosión telomérica y la senescencia como resultado de la replicación del ADN. Por otro lado, la expresión ectópica de telomerasa puede prevenir el acortamiento de los telómeros y la senescencia replicativa en algunas células humanas como fibroblastos y células epiteliales.

Hay evidencias que la respuesta senescente evolucionó para suprimir la tumorigénesis, actuando como mecanismo de seguridad para prevenir la proliferación de células con riesgo de sufrir transformaciones neoplásicas. De acuerdo con esto, las células normales sufren el arresto senescente cuando se

enfrentan a diferentes estímulos capaces de inducir o promover transformaciones neoplásicas. Estos estímulos incluyen a telómeros cuya función ha sido afectada, algunos tipos y niveles de daño al ADN, perturbación en la estructura de la cromatina, y, ciertas señales mutagénicas transductoras de oncogenes como RAS mutado. La telomerasa es incapaz de prevenir la senescencia en fibroblastos humanos en respuesta a RAS mutado, lo cual indica que las células pueden expresar un fenotipo senescente y contar con telómeros funcionales.

La senescencia celular no solo se expresa por un cambio en el crecimiento de la célula sino cuando se manifiestan cambios funcionales que definen al fenotipo senescente.

Causas del fenotipo senescente.

**1): Acortamiento del telómero:** no se conocen aún las señales a través de las cuales el acortamiento del telómero conduce a modificaciones del crecimiento en células normales, aunque estudios en hongos han suministrado algunos mecanismos posibles, que incluyen un daño al ADN inducido por el telómero corto, la liberación de factores de transcripción-modulación por dichos telómeros, y cambios en la heterocromatina inducidos por estos. Esos mecanismos potenciales no son mutuamente excluyentes.

En 1938, el genetista Hermann J. Müller del Instituto de Genética Animal de Edimburgo con moscas *Drosophila melanogaster* expuestas a rayos X, acababa de observar que en los extremos de los cromosomas irradiados, no había deleciones o inversiones, por la presencia de un casquete protector que él mismo llamó «gen terminal» y luego «telómero», del griego «telos» (fin) y «meros» (parte).

Más tarde, Bárbara McClintock, en la Universidad de Missouri, que estudiaba la genética del maíz (*Zea mays*), describió cómo la ruptura de los cromosomas resultaba en adhesión y fusión de sus extremos, con la formación de cromosomas dicéntricos. A pesar del daño, los extremos se restauraban por la adquisición de nuevo telómero. Según sus conclusiones, los telómeros jugaban un importante papel en la integridad de los cromosomas, pues evitaban la aparición de los ciclos de «ruptura-fusión-puente», deletéreos para la supervivencia celular.

El término telómero acuñado por Müller tuvo en apariencia carácter promisorio, aunque el escepticismo de la época hacia la genética, hizo que la investigación sobre los telómeros cesara abruptamente.

Treinta años después cuando se develaron los mecanismos de la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), gracias al trabajo de James Watson (que describió la doble hélice del ADN) revistió una singular importancia. Él señaló el «problema de la replicación terminal», dada la incapacidad de las células para copiar

totalmente los extremos del ADN linear. Señalaba Watson que, por las características de la síntesis de la cadena rezagada del ácido nucleico, que hacen que la ADN polimerasa no pueda replicar por completo su extremo 3', los telómeros y por ende los cromosomas se acortaban. Por entonces, Alexei Olovnikov, un desconocido científico ruso, halló el eslabón entre la replicación terminal -enunciada por Watson- y la senescencia celular, previamente descrita por Hayflick y Moorhead, como un estado de detención de la proliferación, de las células somáticas humanas con alteraciones bioquímicas y morfológicas por haber sobrepasado su capacidad límite de división.

Para Olovnikov, el problema de la replicación terminal era la causa del acortamiento de los telómeros, que a su vez, era como un reloj interno para limitar las divisiones que la célula podría tener en su existencia y, por ende, poder controlar el envejecimiento. El modelo demostró una notable exactitud; en la actualidad se acepta que el acortamiento telomérico es la principal causa de la senescencia celular, y que el reloj molecular cuenta el número de ciclos que la célula puede soportar.

Como Watson, Olovnikov pensó que la célula tenía una estrategia para mantener la longitud telomérica durante la replicación del ADN.

Así se descubrió que esa estrategia tenía nombre propio. Era la telomerasa, enzima transcriptasa reversa, descubierta por Blackburn y Gall, (1975), en su trabajo con *Tetrahymena thermophila*, protozoo ciliado que, posee además de un micronúcleo con los cromosomas normales, un macronúcleo donde hay cromosomas fragmentados en múltiples segmentos de ADN con el mismo gen codificante para ARN ribosomal. Así fue posible determinar la secuencia del ADN extracromosómico, en cuyos extremos aparecieron repeticiones del hexanucleótido CCCCAA, que también había en el micronúcleo. El hallazgo generó dudas: ¿se trataba de una propiedad de un gen extracromosómico en un organismo ciliado que no formaba parte de la línea evolutiva eucariota? ¿o era quizá una auténtica secuencia telomérica?

Recién cuando Blackburn se asoció con Szostak, se logró el descubrimiento de las secuencias teloméricas y de la enzima que las sintetiza.

Szostak probó si las secuencias de Blackburn y Gall actuarían como telómeros en su experimento con *Saccharomyces cerevisiae*, y sus resultados fueron contundentes: los plásmidos de la levadura -ensamblados a partir del vector y de los extremos teloméricos del ADN de *T. thermophila*- se replicaron de manera estable.

Blackburn y Szostak concluyeron que si la levadura era capaz de reconocer y utilizar tales extremos propios de un organismo tan distante evolutivamente, este hecho constituía evidencia razonable acerca de la alta conservación evolutiva de los

mecanismos de replicación de los telómeros. El hallazgo estaba ligado a otro no menos importante: cuando con mapas de restricción y ensayos de hibridización analizaron los extremos del ADN de *T. thermophila*, y los fragmentos de levadura que suponían actuarían como telómeros, encontraron que las secuencias teloméricas eran comunes a ambos. Además, los plásmidos replicados tenían una mayor longitud, debida a la estrategia de las células de levadura que añadían secuencias repetitivas a los extremos de las secuencias repetitivas de *T. thermophila*.

Así, Blackburn y Szostak sugirieron que la elongación de los telómeros se debía a la actividad de una enzima desconocida que sintetizaba telómero, después llamada telomerasa.

Habían creado Blackburn y Szostak no sólo el primer ensayo funcional para telómeros del que se tenga noticia, sino también sentado las bases para la construcción de los primeros cromosomas artificiales de levadura, los famosos YACs, que se emplearon en el Proyecto Genoma Humano, para clonar segmentos grandes de ADN humano, que se pudieran secuenciar.

Años después, Blackburn y Greider propusieron la existencia de una actividad enzimática a la que llamaron «transferasa telómero terminal», en realidad la misma telomerasa. Utilizaron extractos de células de *T. thermophila* y primers o cebadores sintéticos constituidos por secuencias idénticas a las de los telómeros de células de levadura y de *T. thermophila*. Así, demostraron la síntesis de novo de las repeticiones en tándem TTGGGG, que se añadían a los oligonucleótidos iniciadores de la elongación, gracias a la actividad de la nueva enzima. Los resultados de Blackburn y Greider marcaron un hito en la investigación de la biología de los telómeros, pues dilucidaron la aparente contradicción entre 2 hechos irrefutables: 1): el acortamiento progresivo de los telómeros durante cada división celular y 2): su replicación, proceso que ocurre en forma independiente a la del resto del ADN cromosómico. Mientras el ADN no telomérico utiliza para su replicación la enzima ADN polimerasa, el ADN de los telómeros se vale de un templete constituido por ARN que adiciona nuevas repeticiones teloméricas. Éste forma parte integral de la molécula de telomerasa y es el molde sobre el que se genera la copia del telómero, en un proceso de transcripción reversa.

Además de la subunidad ARN (TR), la telomerasa presenta una subunidad catalítica (TERT). Ausente o poco expresada en las células somáticas, la telomerasa se encuentra en las células embrionarias, las germinativas (ovogonias y espermatogonias), así como en la mayoría de las células transformadas (líneas celulares inmortalizadas y células cancerosas), donde contrarresta el problema de la ausencia de replicación en los extremos teloméricos.

Hoy se acepta que la longitud de los telómeros y la expresión de la enzima telomerasa varían con la edad y con el tipo celular, lo que ha justificado su utilización como biomarcadores que permitan evaluar la historia y el potencial replicativo en tejidos y en grupos etáreos diferentes. Así, en la mayoría de éstos, ha sido posible identificar un patrón aproximado de dinámica telomérica y de expresión de telomerasa. Es interesante resaltar que en la génesis de ciertas entidades como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad coronaria y el cáncer, entre otras, juega un papel clave la diferencia entre la edad biológica (predicha con base en la longitud telomérica) y la edad cronológica. Por otra parte, la expresión de la telomerasa se ha asociado con la oncogénesis y con la inmortalización celular, lo que ha servido para proponerla como blanco terapéutico en el tratamiento del cáncer.

En las células normales, el acortamiento de los telómeros durante la división celular es un mecanismo supresor tumoral que «obliga» a que las células salgan del ciclo celular y entren en un estado irreversible de senescencia, donde cesan de dividirse y finalmente mueren. No obstante, en el proceso de transformación tumoral, la senescencia es también un importante factor de riesgo: existe amplia evidencia que demuestra que puede ser eludida por la célula con telómeros cortos que han comenzado a expresar telomerasa. En este caso, la célula «fugitiva» adquiere un nuevo status, pues se transforma no sólo en maligna, sino además en inmortal, gracias a la acción estabilizadora que la enzima ejerce sobre los telómeros. Pero la senescencia no es sólo un estado de detención del crecimiento celular: también implica cambios en la expresión de ciertos genes y torna a las células resistentes a la apoptosis. Esto explica por qué las células senescentes pueden acumularse en los tejidos y contribuir así tanto al proceso de envejecimiento, como a la génesis de las enfermedades asociadas. Cuando esto ocurre, se manifiestan alteraciones patológicas hiperplásicas o premalignas, lo que favorece la teoría que propone el desarrollo del cáncer como dependiente de la edad, quizá debido a la suma de múltiples mutaciones. Así pues, la senescencia ejerce un efecto protector contra el cáncer a edades tempranas mientras que, a mayores edades promueve el fenotipo típico del envejecimiento.

No deja de sorprender que mecanismos supresores tumorales como el acortamiento telomérico y por ende la senescencia, puedan estimular el desarrollo del cáncer en las etapas tardías de la vida. Esta aparente paradoja ha llevado en la última década a que muchos científicos escudriñen en el dúo telómeros-telomerasa, con el fin de descubrir la hasta ahora oculta clave de la inmortalidad o bien, de develar el secreto de la malignidad que tan celosamente guarda.

La velocidad a la que se acortan los telómeros está influenciada por factores que aceleran el envejecimiento, tales como el estrés, el tabaco, el alcohol y la obesidad. La longitud de los telómeros parece ser predictiva de demencia y de alteraciones

cognitivas. Algunos síndromes humanos se caracterizan por mutaciones en los genes de la telomerasa, los cuales dan lugar a ritmos acelerados de acortamiento telomérico con la edad. Entre estos se incluyen algunos casos de disqueratosis congénita, anemia aplásica y fibrosis idiopática pulmonar. Los pacientes con disqueratosis congénita acarrean mutaciones en componentes del complejo telomerasa que dan lugar a una disminución de la estabilidad de la telomerasa y a telómeros más cortos. Estas mutaciones afectan a uno u otro de los genes Tert y Terc, en pacientes con la variante de disqueratosis congénita dominante autonómica, o al gen Dkc1 que codifica una proteína que interacciona con la telomerasa implicada en la estabilidad de Terc, y en el procesamiento de RNA pequeño nucleolar, en pacientes con la forma de enfermedad asociada a X. Los pacientes con disqueratosis congénita desarrollan muchas de las patologías demostradas en el modelo experimental de ratón con deficiencia en Terc, tales como corta estatura, hipogonadismo e infertilidad, defectos en la piel y del sistema hematopoyético, fallos en la médula ósea y muerte prematura. Además, al igual que los ratones deficientes en Terc, los pacientes con disqueratosis congénita muestran también una elevada inestabilidad cromosómica a medida que envejecen, lo cual está de acuerdo con una pérdida telomérica más rápida. Finalmente, estos enfermos y los ratones deficientes en Terc muestran afectada la progenia lo que hace pensar que los telómeros cortos contribuyen al padecimiento de la enfermedad. Una diferencia importante existe entre los pacientes de esta enfermedad y los ratones deficientes en Terc, y es que los enfermos muestran elevada incidencia en cáncer espontáneo, mientras que esto no ocurre a los ratones deficientes en Terc, excepto en aquellos con deficiencia en p53 y sobreexpresión de TRF2. Una razón que puede explicar esta diferencia es que, en contraste con los ratones deficientes en Terc, los pacientes con esta patología, retienen todavía genes de la telomerasa, que pueden ser activados durante la tumorigénesis.

**2): Daño al ADN:** las lesiones oxidativas en el ADN o rupturas de doble cadena, inducen a las células humanas normales a detener de forma irreversible su crecimiento, con cambios fenotípicos asociados similares a los de la senescencia replicativa. Numerosos estudios muestran que niveles moderados de daño al ADN frecuentemente resultan en apoptosis, la mayoría utilizaron células inmortales de roedores. Las células normales humanas, no sufren con frecuencia apoptosis en respuesta a daños moderados al ADN, sino que responden adoptando un fenotipo senescente. La capacidad de ciertos tipos de daño al ADN se puede explicar por la senescencia replicativa prematura hallada en las células de donantes con el síndrome de Werner (SW), o síndrome hereditario de envejecimiento prematuro en el hombre. Los pacientes con el SW son asintomáticos hasta la pubertad, sin embargo, a partir de los 20 ó 30 años, desarrollan un conjunto de patologías

asociadas a la vejez incluidos cáncer, aterosclerosis, diabetes tipo II, cataratas, osteoporosis, caída del cabello y atrofia de la piel. El SW no es una copia exacta del envejecimiento normal, pero se caracteriza por el desarrollo prematuro de un conjunto de patologías asociadas a éste. La expectativa media de vida de individuos con el SW es de aproximadamente 45 años, y son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer las principales causas de muerte.

Este síndrome es causado por una inactivación homocigótica del gen WRN, recientemente clonado, y que se localiza en el cromosoma 8 humano. WRN codifica una proteína de elevado peso molecular que posee actividad ADN helicasa y actividad 3'-5' exonucleasa. Aunque la función precisa de esta proteína no se conoce todavía, sus actividades bioquímicas y su marcada homología con el dominio del gen RecQ de *E. coli* que codifica para una helicasa, sugieren con mucha fuerza que participa en una o más vías de reparación del ADN. Las células de SW acumulan una gran variedad de mutaciones, con una elevada proporción de deleciones y translocaciones cromosómicas. Se conoce que estas células senescen después de muchas menos duplicaciones que las células de donantes de la misma edad. Hay también evidencias de que estas células senescen con longitudes del telómero mayores (7-9 Kb), que la de las células senescentes de donantes normales (5-7 Kb). Así, el daño acumulado sobre el ADN, más que el acortamiento del telómero, puede ser la causa de la senescencia prematura en las células con SW. El hecho de que la pérdida de la función de un gen (WRN) cause tanto la aceleración de los fenotipos envejecidos in vivo como la aceleración de la senescencia de las células in vitro, apoya la idea de que la senescencia celular puede contribuir al envejecimiento, o al menos a varias patologías asociadas a la vejez.

Estímulos oncogénicos o mutagénicos inapropiados: resultados recientes sugieren que las células normales pueden responder a estímulos oncogénicos adoptando un fenotipo senescente. La primera evidencia para esta idea deriva de estudios en los cuales una forma activada del gen RAS (oncogénico) se introdujo en fibroblastos humanos normales. RAS es un proto-oncogen bien caracterizado que transduce señales de ciertos receptores de crecimiento. Los receptores de respuesta a RAS, una vez que reciben sus ligandos, estimulan a la proteína RAS a unirse al GTP. Este complejo transmite señales mitogénicas a través de la activación de la vía de la proteína-kinasa activada por mitógeno. La señal se termina por la actividad GTPasa de RAS. Las mutaciones que convierten a RAS en una oncoproteína inactivan su actividad GTPasa, pero no su capacidad de unirse al GTP, provocando que la proteína transmita continuamente señales mitogénicas. Las formas activadas de RAS estimulan el crecimiento de muchas células de roedores y transforma a las células inmortales en células tumorigénicas; por lo que no se esperaba que la introducción de un gen RAS oncogénico en fibroblastos humanos normales provocara la detención del crecimiento de éstos con un fenotipo similar al

senescente. Esta misma respuesta también fue observada al introducir 2 efectores activados de la actividad RAS: las proteínas-kinasas RAF y MEK.

Por el contrario, formas activadas de RAS y MEK estimularon la proliferación en células inmortales o en células en las que la proteína supresora de tumores p53 estaba inactivada. De esta forma, señales mitogénicas inapropiadas y potencialmente oncogénicas estimularon la proliferación en células con la función p53 comprometida, pero indujeron el fenotipo senescente en células humanas normales.

El factor de transcripción E2F1 se encuentra negativamente regulado por la proteína supresora del retinoblastoma (pRb), y es importante para la transcripción de muchos genes que se requieren para la síntesis del ADN. La sobreexpresión de este factor de transcripción también induce una respuesta senescente en fibroblastos humanos normales. Recientemente, se ha detectado que la ruptura en la organización de la cromatina también origina una respuesta senescente de las células.

Implicación en el envejecimiento.

La senescencia celular se ha implicado en el envejecimiento. Debido a que las células senescentes son incapaces de autorrenovarse, se postula que estas células podrían contribuir al envejecimiento, al fallo inmunológico, pobre cicatrización, atrofia de la piel, disminución de la función gastrointestinal, etc.

Se supone que estos cambios surgen por la pérdida de la capacidad proliferativa de la célula, y por ende de la capacidad regenerativa del tejido.

Esta idea surge porque el primer estímulo que se reconoce como causa de la senescencia celular fue la división celular repetida (senescencia replicativa). Estudios posteriores mostraron que la senescencia replicativa es obra del acortamiento progresivo de los telómeros, el cual se genera en cada ciclo celular de células que no expresan la enzima telomerasa. La mayoría de los mamíferos no expresan telomerasa en sus células somáticas, aunque hay algunas excepciones y diferencias con el cual la telomerasa es reprimida en el soma. En especies con telómeros relativamente cortos como en los humanos, las células que se dividen adquieren uno o más telómeros críticamente cortos y no funcionales. Esto provoca el daño senescente e irreversible del crecimiento celular. El papel particular de los telómeros en el desencadenamiento de esta respuesta dio lugar a la llamada "hipótesis del envejecimiento asociado al telómero", que realmente debería llamarse "hipótesis del envejecimiento asociado a la senescencia celular", pues la funcionalidad del telómero es solo uno de los mecanismos involucrados en el desencadenamiento de la senescencia. De más relevancia para el envejecimiento es el hecho de que la respuesta senescente resulta en cambios en la morfología y

funcionalidad de la célula. Por la senescencia, algunos tipos celulares resisten ciertas señales apoptóticas. Esto explicaría por qué las células senescentes se acumulan en los tejidos con la edad. De igual importancia es el hecho de que las células senescentes sobreexpresan moléculas de secreción, las que actúan en sitios distantes de su producción dentro del tejido, y afectan el microentorno local. Entre ellas hay varias metaloproteasas de matriz y otras enzimas degradativas, citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento. **(SASP)**.

Los cambios funcionales de la senescencia celular sugieren un mecanismo adicional que puede contribuir al envejecimiento. Debido a que las células senescentes, funcionalmente afectadas se acumulan in vivo, sus fenotipos secretores pueden provocar afectaciones en el entorno tisular local. Esto podría explicar la pérdida de la integridad tisular y funcionalidad durante el envejecimiento. Además, esto podría iniciar o promover ciertas enfermedades de la vejez. Así, se ha propuesto que la aterosclerosis puede iniciarse por las secreciones producidas por células endoteliales senescentes.

También las células senescentes podrían estimular la progresión del cáncer, lo cual requiere tanto de mutaciones oncogénicas, como de un microentorno tisular afectado o dañado en el cual las células mutadas puedan expresar su fenotipo neoplásico.

Estudios recientes reportaron que fibroblastos humanos senescentes estimularon a proliferar en cultivo a células epiteliales pre-neoplásicas, pero fueron incapaces de estimular la proliferación de células epiteliales normales. Esto se ve favorecido en edades avanzadas donde las células senescentes y las células con mutaciones pre-neoplásicas se acumulan.

El fenotipo senescente y el pleiotropismo antagónico.

Es muy probable que la senescencia celular haya evolucionado para proteger a los mamíferos del cáncer. Si además de esto también contribuye al envejecimiento, constituiría un ejemplo de pleiotropismo antagónico evolutivo.

Según esta teoría, los eventos que fueron seleccionados para optimizar el buen estado de salud en los organismos adultos jóvenes, pueden ejercer además efectos dañinos, pobremente seleccionados sobre el organismo envejecido.

La determinación del crecimiento, que suprime la tumorigénesis en organismos jóvenes, puede ser el evento seleccionado. Por el contrario, la funcionalidad afectada de la célula, puede ser el evento no seleccionado con efectos dañinos para el tejido envejecido. Presumiblemente estos efectos dañinos son despreciables en los tejidos jóvenes, donde las células senescentes son raras. Pero, en la medida en que el organismo envejece, las células senescentes se acumulan, y entonces sus funciones

alteradas, por sus fenotipos secretorios, comprometan la fisiología e integridad del tejido.

Dado el pleiotropismo antagónico de la senescencia celular, se sospecha que las células senescentes pueden también contribuir al incremento de la incidencia del cáncer que se produce con la edad en mamíferos. El fenotipo secretorio de las células senescentes afecta su microentorno en el tejido. Así, el daño al ADN, la pérdida de función de los telómeros o errores en señales mitogénicas, puede causar una acumulación de células senescentes, pero solo ser significativas y dañinas en edades avanzadas, donde alcancen suficiente cantidad. Simultáneamente, las mutaciones se acumulan con la edad. Entonces en la medida en que envejecemos se incrementa la probabilidad de que las células senescentes y las células con mutaciones oncogénicas se produzcan cercanamente. Las células senescentes crearían el microentorno que promueva el crecimiento y la progresión neoplásica de las células mutadas.

Otro ejemplo de pleiotropismo antagónico de la senescencia celular es la psoriasis. Esta enfermedad de la piel posee un crecimiento excesivo de los queratinocitos epidérmicos, que forman una capa gruesa, con pérdida de su funcionalidad, resistentes a la apoptosis, y un fenotipo similar al senescente, sugiriendo que las placas están constituidas por queratinocitos senescentes. Es muy rara la aparición de tumores en las lesiones psoriásicas, aunque pueden desarrollarse en la piel intacta adyacente a las lesiones.

La senescencia celular o replicativa consiste en un cambio del ciclo celular permanente o estado de parálisis celular irreversible, en el cual las células no proliferan, pero el organismo no las elimina, y persisten por largos periodos. En el cambio del ciclo celular en senescencia, participa el gen *CDKN2A*, que codifica para las proteínas p16<sup>INK</sup> y p14/p19<sup>ARF</sup>. La senescencia implica cambios moleculares generalizados y modificaciones en la homeostasis, que se manifiestan como una desregulación sistémica del organismo. También existe la senescencia inducible o patológica, que ocurre después de numerosas divisiones celulares o como respuesta al estrés psicológico o fisiológico (oncogenes, daño oxidativo, ADN alterado, etc).

Entre los procesos primarios que se inician con el **envejecimiento** se incluyen:

- 1.-Pérdida de la homeostasis de proteínas (proteostasis);
- 2.-Inestabilidad genómica;
- 3.-Acortamiento de telómeros, y
- 4.-Alteraciones epigenéticas.

La senescencia celular evolucionó para prevenir el desarrollo de tumores en células mitóticamente competentes de organismos jóvenes para garantizar, en última instancia, la supervivencia de la especie. Curiosamente, los mecanismos que la inducen pueden provocar crecimientos neoplásicos. El cambio irreversible del crecimiento celular no es el único rasgo característico de su fenotipo, también incluye cambios en las funciones secretoras, que pueden afectar la integridad del tejido y contribuir de esta forma a las disfunciones orgánicas asociadas a la vejez. Esto sugiere que la senescencia celular puede ser un ejemplo de pleiotropismo antagónico, y, que es la vejez el precio que se paga por un óptimo estado de salud en la juventud.

Una respuesta inmune para ser efectiva debe alternar mecanismos de proliferación y de muerte celular. Estudios indican que la reexpresión de telomerasa es posible en LB para mantener el largo de los telómeros y prevenir la senescencia. Se ha observado que se produce un alargamiento en los telómeros de LB vírgenes cuando son estimulados por el antígeno, evento en el cual se diferencian en células efectoras, se dividen, experimentan expansión clonal y originan células de memoria. Los pasos anteriores se acompañan de un aumento transitorio de la telomerasa, ya que las LB en reposo muestran poca cantidad. Al terminar el estímulo, la mayoría de las células efectoras mueren por apoptosis. Conforme avanza la edad se agota la telomerasa, los marcadores de senescencia p16<sup>INK4a</sup> y p14/p19<sup>ARF</sup> aumentan en los LB, y se observan las alteraciones de la senescencia replicativa. Los estudios muestran que, en condiciones normales, y como ayuda de sus funciones, el mecanismo de la senescencia dependiente de telómeros, puede ser utilizado por el sistema inmune para regular su respuesta y la homeostasis celular durante toda la vida del individuo. El aumento transitorio de la telomerasa durante la activación de los LB constituye un ejemplo de lo señalado.

En la embriogénesis, grupos de células NK deciduals, conocidas como inductoras de tolerancia y protectoras del embarazo, al ser estimuladas por la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) del trofoblasto se transforman en senescentes. Estas células NK-SASP secretan moléculas que regulan la neo-angiogénesis para la implantación del embrión. Entre los mecanismos de los LT-reg (CD4-CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>) para suprimir una respuesta inmune, está impedir la proliferación de LT mediante la inducción de senescencia en los LT efectores.

Para limitar la excesiva fibrosis durante la reparación tisular, los miofibroblastos, estimulados por la proteína Ccn1, adquieren características de células senescentes agudas y secretan moléculas que degradan componentes de la matriz extracelular. Ello pone de manifiesto un efecto positivo de la senescencia celular transitoria en la actividad fisiológica inmunitaria.

Inmunosenescencia.

Es el nombre que reciben los cambios deletéreos del sistema inmune asociados con la edad. El envejecimiento se asocia con la declinación en la función del sistema inmune, lo cual origina disminución de la respuesta a vacunas, y de su capacidad defensiva, con aumento en el riesgo de infección. Se ve comprometida la cicatrización, y hay aumento en la incidencia del cáncer y de la autoinmunidad. Algunos factores como los genéticos influyen en ello, sin embargo, otros, como el estilo de vida y la nutrición que son modificables, pueden impactar en la progresión de la inmunosenescencia.

Cambios inmunológicos similares a los relacionados con la edad se llevan a cabo durante el estrés crónico o la exposición a glucocorticoides e inmunodepresores. Del análisis en el comportamiento de las diferentes células del sistema inmune, se ha comprobado lo siguiente : las NKC aumentan en cantidad, pero disminuye su toxicidad; los LB disminuyen su linfopoyesis y su memoria; los LT-CD4 son a predominio Th2, mientras el balance CD8 supera al CD4, los LT de memoria exhiben telómeros cortos mientras que los LT vírgenes poseen telómeros largos; los LT-reg se incrementan en cantidad de preferencia en los naturales; los macrófagos experimentan una caída en su capacidad fagocítica y en la autofagia; los PMN presentan una quimiotaxis disminuída mientras que los mastocitos se desgranulan fácilmente mientras su número disminuye. De lo expuesto, se advierte que el sistema inmune sufre una peligrosa senectud, que no sólo nos expone a mayores infecciones de todo tipo, sino que no se encuentra en adecuadas condiciones para liberarse de las células senescentes, las que se acumulan perturbando el normal funcionamiento del organismo. Si bien no existe aún un fármaco que pudiera remediar o mejorar este déficit, la confección de un esquema racional obligatorio para los sujetos mayores parecería razonable, pues obligaría durante tiempos programados a vacunar contra patógenos prevalentes en el medio ambiente, y así, obligar al sistema inmune a una actividad más acorde con las funciones esperadas, tal como se ha documentado en los llamados “supercentenarios,” que son aquellas personas que han cumplido una centuria, y no evidencian mayor deterioro general ni inmunológico. Si bien corresponde recordar al Phaseolus vulgaris, productor de una sustancia llamada fitohemaglutinina (muy usada en técnicas de laboratorio), que se obtiene de los porotos comunes, y se ha demostrado como positivo estimulantes de los LT, en 2010, en la Prensa Médica Argentina, vol. 97 (3), pág.128-137, recordábamos el siguiente párrafo “Ante el avance de las neurociencias para preservar las funciones cerebrales y evitar el deterioro neuronal, parecería prudente establecer un **“calendario de vacunaciones”** en la edad proveya, que además de brindar protección ante patógenos potenciales, induciría a través de la cadena IL-12→IL-1→IL-6→TNF-α→LTCD4-Th1→LTCD4-Th2→IL-2→IL-3→IL-4→IL-5→IL-10→IL-17→TGF-β, una liberación de NPO (neuropéptidos), y la constitución de nuevos circuitos interneuronales aptos, para el desarrollo de nuevas

actividades creativas, y motivaciones vitales no valoradas suficientemente en la edad mayor.”

En los mayores de 65 años, el receptor TCR tiene menor diversidad, se alteran las señales de traducción y los receptores de superficie, como el CD8 que aumenta y el CD28 que desaparece, con adhesión y activación celular, aumento de actividad de la telomerasa y apoptosis. En los mayores de 80 años, se pierde CD28 en el 10 % de los LTCD4 y en 60 % de los LTCD8. La acumulación de estas células (TCD8+CD28-) es uno de los cambios más notorios en esta edad, y la pérdida de su receptor origina disminución en la activación y proliferación del linfocito durante la presentación de un antígeno, así como de su vida media; así, se genera aumento de IL-6 y TNF.

Por otra parte, estas células acrecientan su actividad citotóxica, pero también su función reguladora supresora, con disminución en la respuesta a patógenos y vacunas. La capacidad timopoyética decrece con la edad, pero, los linfocitos TCD4+CD25+ FoxP3+, así como los CD8+CD28-CD25+ **aumentan** en la sangre periférica. Estos últimos mostraron una función similar en jóvenes y ancianos, al suprimir la proliferación y producción de citocinas en respuesta a la estimulación policlonal del LT.

De los grupos de TCD4-reg, las naturales (que se originan en timo), aumentan con la edad y las T-reg inducibles (que adquieren FOXP3+ en la periferia), disminuyen. Estudios en ratones viejos muestran cambios en su función; los LTCD4 FoxP3+ producen más IL-10 y suprimen a la molécula CD80 (B7-1) en células dendríticas, lo que aumenta la supresión inmune.

Las células madre del mesénquima de ancianos, contrario a lo que sucede con las de jóvenes, no son capaces de diferenciarse in vitro a células neuroectodérmicas, lo que limita la utilización de células autólogas de personas mayores, para reemplazo o regeneración de tejidos, más aún su donación.

La edad no transforma a las células madre hematopoyéticas individualmente, cambia su composición clonal. La actividad de las células madre disminuye, pero su cantidad aumenta en médula ósea, en lo cual cambian los compartimentos medulares: aumenta el mieloide y se reduce el linfoide, consecuentemente, las enfermedades clonales de células madre mieloides ocurren con mayor frecuencia y con el aumento de la edad son más resistentes al tratamiento.

Algunos mecanismos paracrinos, mediante los cuales las células senescentes SASP pueden producir disfunción celular, y del nicho de las células madre, son impedimento de homeostasis celular, inducción de diferenciación celular aberrante, degeneración de la matriz extracelular, estimulación de inflamación tisular estéril, e inducción de senescencia de células recién nacidas.

La disminución del compartimento medular linfoide se refleja en el decremento de la linfopoyesis de LB, lo cual reduce el número de LB vírgenes; los de memoria pueden aumentar, pero están afectados. Aun cuando el número de LB secretoras de anticuerpos se incrementa, la respuesta de anticuerpos decrece en cantidad, especificidad y cambio de isotipo. Lo anterior se puede atribuir a defectos en Th y en la señalización por alteraciones del receptor del LB y de las moléculas CD40 y B7. Como consecuencia, los ancianos tienen pobre protección contra gérmenes con los cuales **no** habían tenido contacto y una respuesta **muy disminuida** a las vacunas.

Los LB de memoria normales tienen en la superficie Ig con cambio de isotipo: G, A o E y el marcador CD27. Al disminuir este marcador en los ancianos, aumentan las células CD27- (LB de memoria exhaustas con mayor producción de citocinas), las cuales contribuyen con la inflamación basal típica de ellos; esto aumenta el riesgo de inflamación y disfunción endotelial, función vascular alterada y enfermedades (como las cardio-pulmonares). La activación de las citocinas proinflamatorias y sus receptores, es requerida para el inicio de la senescencia, mientras que su desactivación frena el proceso. La secreción de IL-6 predomina en células senescentes (epiteliales, queratinocitos, monocitos, fibroblastos, TCD8). Los fibroblastos sobreexpresan también IL-1, GM-CSF, IL-8, MCP1, MCP2, MCP3 y MCP4, así como los factores de crecimiento tipo insulina (IGF, insulin like growth factor) y sus proteínas unidoras.

Las IL-1, IL-6 e IL-8, al interactuar con su receptor CXCR2, generan sobrerregulación de los factores de transcripción C/EBP $\beta$  y NF $\kappa$ B, que se autorregulan en células senescentes e inducen la producción de estas citocinas. Al respecto, se ha señalado que las citocinas IL-6 e IL-8 y sus receptores son requeridos en la senescencia replicativa inducida por oncogenes como BRAF.

En esta etapa, el incremento en las citocinas IL-1, IL-6 y TNF contribuye al estado inflamatorio crónico del anciano.

Las integrantes del tipo Th1, las citocinas IL-2 e IFN $\gamma$ , se encuentran en menor cantidad, lo cual disminuye la activación de los linfocitos y de los macrófagos. Estudios han mostrado que los genes para estas 2 moléculas tienen alteraciones en la metilación del ADN durante el envejecimiento, y que su producción decrece; sucede lo contrario con las citocinas tipo Th2, ya que aumenta la cantidad de IL-4, IL-10 e IL-13. Todo ello orienta hacia el predominio de una respuesta de citocinas tipo Th2, a lo que se suman resultados de estudios realizados en personas nonagenarias, quienes mostraron una cantidad mayor de células Th2, secretoras de IL-4, IL-10 e IL-13.

La respuesta de tipo Th2 (alérgicas) tiene una relación con la respuesta inmune humoral, pero en condiciones adversas con las reacciones de hipersensibilidad del

tipo I. ¿Será un precoz envejecimiento del **sistema inmune**, motivado por el estilo de vida cotidiana, quien condicione el envejecimiento de todo el organismo? ¿Será como dijimos con antelación necesario un calendario de vacunaciones con antígenos adecuados a las patologías de la mayor edad necesario para estimular a los LB y a los LT a cumplir con sus funciones específicas evitando su precoz deterioro?.<sup>6-7-8-9-101-102-103-104</sup> Investigadores de la Universidad de Tel Aviv, en Israel, aseguran haber encontrado la **detención del envejecimiento celular** con el tratamiento con **oxígeno puro** en el interior de las **cámaras hiperbáricas (OHB)** durante un período de 3 meses. Uno de los procesos asociados al envejecimiento es el **acortamiento de los telómeros**, situados en los extremos de los cromosomas, y la acumulación de **células viejas**, o que han dejado de cumplir su función. En las células inmunes obtenidas de la sangre de los pacientes, (células NK, LB y LT), descubrieron que después del tratamiento, los telómeros no sólo no se habían encogido, sino que se habían **alargado hasta un 38%**, mientras que las células senescentes habían disminuido hasta en un 37%.

### **Sistema inmunológico y electromagnetismo: una revisión histórica. Introducción.**

La relación entre el sistema inmunológico humano y los campos electromagnéticos es un tema de investigación que cuenta ya con varias décadas, sin haberse llegado todavía a una respuesta concluyente. Los efectos orgánicos de las radiaciones ionizantes (RI) son indiscutibles, y se conocen prácticamente desde el descubrimiento de los rayos X y de la radiactividad, a fines del siglo XIX. Pero la problemática de la acción biológica de las radiaciones no-ionizantes (RNI), o de los campos magnéticos estáticos, aún continúa abierta. Y si nos referimos específicamente a los efectos sobre el sistema inmune de los seres humanos, la cuestión se vuelve todavía más compleja. Complejidad que se ve acentuada porque, en ciertas oportunidades, el tema se desliza sutilmente hacia el terreno de la pseudociencia. Un ejemplo de esto es la **terapia magnética, magnetoterapia o biomagnetismo**, una práctica de medicina alternativa pseudocientífica que implica el uso de campos magnéticos estáticos, y que ha sido promovida como un tratamiento para el cáncer y otras enfermedades.

En realidad, a pesar de que la hemoglobina, la proteína de la sangre que transporta el oxígeno, es débilmente diamagnética (cuando está oxigenada) o paramagnética (cuando está desoxigenada), y por lo tanto presenta muy débiles propiedades magnéticas, los imanes utilizados en la terapia magnética son en muchos órdenes de magnitud demasiado débiles para tener algún efecto medible sobre el flujo sanguíneo. En caso de que tal efecto existiese, los poderosos campos magnéticos utilizados en Resonancia Magnética Nuclear (RMN) darían lugar a efectos biológicos importantes y objetivamente cuantificables; sin embargo, tales efectos no han sido observados. Respecto de las declaraciones sobre el rol curativo de los campos magnéticos estáticos para las patologías oncológicas, la American Cancer

Society declara que *"la evidencia científica disponible no apoya estas afirmaciones"*. Sin embargo, existe una disciplina científica que se ocupa de estas cuestiones y es el **Bioelectromagnetismo (BEM)**, una ciencia aún en construcción que estudia la forma en que los organismos vivos interactúan con los campos electromagnéticos (CEM). El concepto del **Bioelectromagnetismo** se fundamenta en que los fenómenos eléctricos se hallan en todos los organismos vivientes. Existen débiles corrientes eléctricas en el organismo humano que producen campos magnéticos, también débiles, de muy limitada extensión fuera del cuerpo. En consecuencia, los seres vivos podrían verse influidos por campos magnéticos y electromagnéticos externos.

Los ejemplos del **Bioelectromagnetismo** incluyen el potencial eléctrico de las membranas celulares y las corrientes eléctricas que fluyen en nervios y músculos como consecuencia de su potencial de acción. Las células usan gradientes electrostáticos para almacenar energía metabólica, para realizar trabajo o desencadenar cambios internos, e intercambiar señales. En concreto, existen 3 procesos fundamentales que implican interacciones eléctricas a nivel celular:

- 1): la despolarización eléctrica de la membrana celular en la sinapsis, con el consiguiente flujo de iones de calcio,
- 2): la transmisión de impulsos nerviosos desde neuronas motoras hacia las fibras musculares, eléctricamente excitables (unión neuromuscular) y
- 3): los campos electromagnéticos endógenos (CEME) generados en las células como consecuencia de la vibración de macromoléculas dipolares y algunos componentes del microesqueleto celular, por ejemplo los microtúbulos.

Estos campos electromagnéticos generados dentro de los tejidos pueden ser afectados por los campos electromagnéticos externos. De esta situación surge el concepto de "homeostasis electromagnética", es decir, la capacidad del cuerpo humano para mantener un equilibrio de interacciones electromagnéticas altamente complejas dentro de las células, a pesar de un entorno "ruidoso" electromagnético externo.

En el presente trabajo efectuaremos una sintética revisión de publicaciones importantes relacionadas con este tema. Se han elegido no solo por el hecho de aportar nuevos conocimientos, sino también porque todas ellas realizan revisiones del estado del arte hasta la fecha de su publicación, y de esa forma nos permiten conocer el pensamiento de la comunidad científica sobre esta cuestión. Las hemos ordenado correlativamente por fecha de publicación, a los efectos de detectar las modificaciones que fueron experimentando la comprensión del tema, si las hubiere.

Aclaremos que el tema de los efectos biológicos producidos por las RNI es mucho más amplio que lo que aquí presentamos, pues nos hemos limitado específicamente

a los efectos sobre el sistema inmunológico. Además, deben diferenciarse los efectos producidos por los campos de muy baja frecuencia (ELF, frecuencias inferiores a 300 Hz) de los correspondientes a frecuencias superiores y de aquellos generados por campos magnéticos estáticos, dado que todos ellos interactúan con los sistemas biológicos a través de mecanismos diferentes. Hemos optado por listar los trabajos solo en atención a su fecha de publicación, indicando en cada caso a qué tipo de efectos se están refiriendo. **Los trabajos : J. Walleczek (1992): *Electromagnetic field effects on cells of the immune system: the role of calcium signal***: afirma que durante la década de 1980 se acumuló una evidencia considerable que demuestra que las exposiciones no térmicas de las células del sistema inmunológico a campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (ELF) pueden provocar cambios celulares que podrían ser relevantes para la actividad inmunitaria *in vivo*. Dice también que se ha documentado una capacidad de respuesta similar a la radiación electromagnética no ionizante en ese rango de frecuencia para los tejidos del sistema neuroendocrino y musculoesquelético. Sin embargo, el conocimiento sobre los mecanismos biológicos subyacentes por los cuales tales campos pueden inducir cambios celulares es todavía muy limitado. De acuerdo con el autor, en general, se cree que la membrana celular y la actividad regulada por átomos de calcio doblemente ionizados ( $\text{Ca}^{2+}$ ) están implicadas en el acoplamiento del campo ELF bioactivo con los sistemas vivos. Este artículo comienza con una breve revisión del estado del conocimiento sobre los efectos de los niveles no térmicos de campos electromagnéticos ELF en la bioquímica y la actividad de las células inmunes y luego examina de cerca nuevos resultados que sugieren un papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la inducción de estos campos en las células. Con base en estos hallazgos, propone que los procesos de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  mediados por la membrana celular están involucrados en la mediación de los efectos de campos electromagnéticos sobre el sistema inmunológico.

S. Grimaldi et al (1997): Exposure to a 50 Hz electromagnetic field induces activation of the Epstein-Barr virus genome in latently infected human lymphoid cells: plantean que el genoma del VEB (Virus Epstein-Barr) en células linfoides infectadas de forma latente ofrece la oportunidad de seguir los efectos de los CEM sobre el producto transcripcional y traduccional resultado de la acción del virus, claramente distinguibles de los del genoma de la célula huésped. La exposición de las células Akata, una línea celular linfóide humana infectada de forma latente por el genoma del VEB, a un campo electromagnético de 50 Hz dio como resultado un mayor número de células que expresan los antígenos tempranos del virus. Este hallazgo proporciona evidencia adicional de que el ADN puede ser modulado por un campo magnético.

J. Torres y L. Alzate (2006): Efectos de las radiaciones electromagnéticas no-ionizantes en sistemas biológicos: dicen que no hay resultados concluyentes debido a la gran complejidad del sistema inmune.

**Grupo PRINIA (2009): *Efectos sobre la salud humana de los campos magnéticos y eléctricos de muy baja frecuencia (ELF)***: analizaron diversos estudios clínicos con voluntarios, en los

que se evaluaron los efectos de la exposición a los campos electromagnéticos en hormonas, el sistema inmunitario, y las características químicas de la sangre. Estos estudios no proporcionaron resultados consistentes, por lo que los autores afirman que las evidencias de los efectos de los campos ELF sobre los componentes del sistema inmunológico en general son inconsistentes.

Mencionan que, en algunos estudios en seres humanos, utilizando campos de magnéticos de 10  $\mu$ T hasta 2 mT, se observaron cambios en las células citolíticas, que mostraron tanto un aumento como una disminución de su número, mientras que el recuento total del número de células blancas (leucocitos) permaneció sin cambios o con una disminución del número. En estudios en animales, se observó una actividad reducida de las células citolíticas en ratones hembras, pero no en los machos ni en grupos formados por ratas de ambos sexos. También, en el recuento de leucocitos se obtuvieron resultados inconsistentes, con una disminución o ningún cambio en los distintos estudios. La gama de exposición de los animales fue aún más amplia, con intensidades del campo magnético de 2  $\mu$ T a 30 mT. La dificultad para interpretar el impacto potencial de estos datos en la salud radica en las grandes variaciones de las condiciones de exposición y ambientales, el número relativamente pequeño de individuos sometidos a prueba y la amplia variedad de efectos finales. Por lo tanto, concluyen que no puede afirmarse con certeza la generación de efectos por los campos ELF sobre el sistema inmunológico humano.

O. Johansson (2009): *Disturbance of the immune system by electromagnetic fields—A potentially underlying cause for cellular damage and tissue repair reduction which could lead to disease and impairment*: es un trabajo muy completo, en el que efectúa una revisión de gran parte de la literatura disponible hasta el momento de su publicación. Plantea que un conjunto de células particularmente interesante son las diversas células dendríticas de la piel (el autor trabaja en un departamento de dermatología experimental). Las mismas son los reactores clásicos a la radiación externa, como radiactividad, rayos X y luz ultravioleta. Demuestra que las mismas desempeñan un rol muy importante en las personas con electrohipersensibilidad, que son especialmente sensitivas a las RNI de baja frecuencia. Además, estudia las alteraciones que se encuentran en la población de mastocitos de personas expuestas a tales radiaciones. Considera que el incremento en el número de mastocitos es un “cambio fisiológico medible” que indica una respuesta de tipo alérgica e inflamatoria a la acción de las RNI. Afirma que se ha producido un aumento internacional muy rápido de alergias, asma y otras hipersensibilidades. Sin embargo, reconoce que los experimentos no prueban modificaciones en la cantidad de componentes sanguíneos en animales expuestos y no expuestos.

El trabajo presenta una visión algo apocalíptica del tema, con la que no necesariamente se debe estar de acuerdo. Su conclusión final es una “señal de advertencia”: *“Es, por tanto, posible que la provocación crónica por exposición a los campos electromagnéticos puede conducir a una disfunción inmunológica, alérgica crónica, respuestas inflamatorias y mala salud si ocurren de forma continua a lo largo del tiempo. Esta es un área que debe investigarse de inmediato.”*

**M. Solano Vérez y J. Sáiz Ipiña (2010): Efectos biológicos del campo electromagnético:** concluyen que el sistema inmunológico no parece verse afectado por niveles bajos de ELF, si bien reconocen que, ante la presencia de un campo magnético externo, se redistribuyen las cargas eléctricas en una célula.

*E. Alonso Fustel, R. García Vázquez y C. Onaindia Olade (2012): Campos electromagnéticos y efectos en la salud:* afirman que los datos son muy variados y de difícil síntesis. Respecto a los efectos generales se ha encontrado en ratones un efecto sobre el incremento de células progenitoras hematopoyéticas, aunque el mismo depende de la temperatura y de otros factores ambientales. Plantean que se ha demostrado la existencia de algún efecto en las células T de los conejos, pero no efectos en linfocitos B de ratones. Respecto a otros síntomas se ha indicado un incremento en la producción de serotonina en las células de la piel en ratas. Reconocen que, de todos modos, existe controversia entre lo publicado respecto a los efectos citogénicos. Este trabajo es importante porque los autores efectuaron una revisión de artículos sobre interacción entre CEM y sistema inmune desde 1990 a 2003, en la que se encontró que los artículos con informes negativos (reportaban efectos patológicos de los CEM) fueron el 58%, los positivos el 23% y los no concluyentes el 19%.

F. Guerriero y G. Ricevutti (2016): *Extremely low frequency electromagnetic fields stimulation modulates autoimmunity and immune responses: a possible immunomodulatory therapeutic effect in neurodegenerative diseases:* plantean que cada vez hay más pruebas que demuestran que la estimulación de campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (ELF-EMF) puede ejercer una determinada acción sobre la autoinmunidad y las células inmunes. Pero consideran que esto presenta la posibilidad de la utilización de las ELF-EMF con fines terapéuticos, dado que, en el pasado, la eficacia de los ELF-EMF pulsados para aliviar los síntomas y la progresión de la esclerosis múltiple se ha visto respaldada por su acción sobre la neurotransmisión y los mecanismos autoinmunitarios responsables de la desmielinización.

De acuerdo con los autores, con respecto al sistema inmunológico, la exposición a ELF-EMF contribuye a una activación general de los macrófagos, lo que resulta en cambios de autoinmunidad y varias reacciones inmunológicas, como el aumento de la formación de especies reactivas de oxígeno, de la actividad fagocítica y de la producción de quimiocinas. Agregamos nosotros que el incremento en las especies reactivas del oxígeno (ROS) es un factor de riesgo importante, que establece cierta similitud entre la acción orgánica de las radiaciones ionizantes y las no-ionizantes.

Regresando a los autores del trabajo, estudian los datos que respaldan el papel de ELF-EMF en la generación de respuestas inmunomoduladoras, neuromodulación y posibles beneficios neuroprotectores. No obstante, consideran que los mecanismos subyacentes de interacción entre los campos electromagnéticos y el sistema inmunológico aún deben entenderse completamente y necesitan más estudios a nivel molecular. Por ejemplo, afirman que la estimulación cerebral electromagnética transcraneal es una técnica novedosa no invasiva utilizada recientemente para tratar diferentes trastornos neurodegenerativos, en particular la enfermedad de Alzheimer. A pesar de su valor probado, los mecanismos a través de los cuales la estimulación cerebral con EMF ejerce su acción beneficiosa sobre la función neuronal siguen sin estar claros.

Lei-Zhang et al (2017): *27 T ultra-high static magnetic field changes orientation and morphology of mitotic spindles in human cells:* a partir de trabajos anteriores los autores conocían que un campo magnético estático ultra alto cambia la orientación y la morfología de los husos mitóticos en las células humanas. Se conocía también que, en estudios realizados in vitro, los microtúbulos se alinean a lo largo de las líneas de un campo magnético elevado, efecto que es consecuencia de las propiedades de anisotropía

diagmagnética de los microtúbulos; es decir, que presentan en su estructura diferentes valores de diamagnetismo en una u otra dirección dentro de la estructura del microtúbulo. Sin embargo, no se había probado experimentalmente si el huso mitótico en células de mamíferos puede alinearse mediante un campo magnético. En particular, nunca se habían informado los efectos biológicos de campos magnéticos estáticos (SMF) por encima de 20 T en células de mamíferos. Los autores encontraron que el huso mitótico se alinea con el campo magnético exterior en un SMF de 27 T. Encontraron también que tanto la orientación de los cromosomas como la morfología del huso se vieron perturbadas. Este es el primer estudio informado que investigó las respuestas celulares de los mamíferos a un campo magnético ultra alto de más de 20 T. No solo encontraron que un campo magnético ultra alto puede cambiar la orientación y morfología de los husos mitóticos, sino que también proporcionaron una herramienta para investigar el papel de la orientación y la perturbación del huso en la biología del desarrollo y del cáncer.

***M. Rosado et al (2018): Immune-modulating perspectives for low frequency electromagnetic fields in innate immunity:*** plantean que, en los últimos años, los efectos de los campos electromagnéticos (CEM) sobre el sistema inmunológico han recibido un interés considerable, no solo para investigar el posible impacto negativo en la salud sino también para explorar la posibilidad de modular favorablemente las respuestas inmunes. Para generar respuestas beneficiosas, el sistema inmunológico debe erradicar los patógenos "respetando" el organismo y al mismo tiempo tolerar antígenos irrelevantes. Según la opinión actual, las moléculas asociadas a daños liberadas por células infectadas o lesionadas, o secretadas por las células inmunes, generan señales de peligro que activan una respuesta inmunitaria. Estas señales también son relevantes para la activación posterior de los mecanismos homeostáticos que controlan la respuesta inmune en reacciones pro o antiinflamatorias, una característica que permite la modulación por tratamientos terapéuticos. Este trabajo es una revisión en la que se discuten los efectos de campos de frecuencia extremadamente baja (ELF) y campos electromagnéticos pulsados. Al discutir los efectos moduladores sobre las funciones celulares de los campos electromagnéticos, prevén el uso de los mismos como agentes terapéuticos para regular las respuestas inmunitarias asociadas con la cicatrización de heridas.

Comisión Iberoamericana de Protección Radiológica de Campos Electromagnéticos (CIPRACEM), Federación de Radioprotección de América Latina y el Caribe (FRALC) y Asociación Internacional de Protección Radiológica (IRPA) (2021): La Protección Radiológica de los Campos Electromagnéticos (CEM) - Guía Informativa para la aplicación de los 3 Principios Fundamentales de Radioprotección por parte de organismos y autoridades regulatorias: presenta un apartado titulado "La disminución de las defensas naturales del organismo por los efectos que producen los CEM al sistema inmune". Al igual que los primeros trabajos que hemos analizado, consideran que existe un primer fenómeno sobre las defensas que se produce por la apertura de los canales de calcio localizados en la membrana celular, lo que determina el ingreso descontrolado de iones de calcio al interior de las células, produciendo inicialmente la síntesis de óxido nítrico y luego un conjunto de reacciones que incluyen la producción de peroxinitrito y radicales libres, que determinan finalmente "la inhibición de la calcineurina", siendo esta última una enzima esencial para la producción y diferenciación de las células T. Esto determina un aumento de los riesgos inherentes a las infecciones y por ende mayor número de muertes por la imposibilidad de

utilizar las defensas naturales. Afirman textualmente que: “esta situación en el caso de una pandemia es doblemente grave”.

Asimismo, los CEM provocan un aumento de la permeabilidad de la membrana hemato-encefálica, disminuyendo su función de protección al ingreso de toxinas, macromoléculas, virus y bacterias, lo que expone a las neuronas a daños que han sido cuantificados en diversas experiencias con animales de laboratorio.

Concluyen que se debe señalar que estos dos procesos: apertura de los canales de calcio y aumento de la permeabilidad de la membrana hemato-encefálica, ocurren a valores de dosis 100 veces inferiores a los límites establecidos, razón por la cual consideran conveniente disminuir los límites actuales a valores 100 veces inferiores.

En relación con nuestro sistema inmune y las infecciones, mencionan el trabajo de Taheri *et al*, quienes demostraron que la exposición a la radiación de teléfonos móviles y de wifi determina que dos bacterias, la *Listeria monocytogenes* y la *Escherichia coli*, se hacen resistentes a diferentes antibióticos. Considerando que la listeriosis es una enfermedad mortal con síntomas de aborto, septicemia y meningitis, recalcan que este es un hecho que debe ser tenido en cuenta.

A modo de conclusión:

El hecho de considerar las células de los seres vivos en general, y de los seres humanos en particular, como pequeños imanes susceptibles de experimentar efectos electromagnéticos reconoce una ya larga historia, pues se remonta a la tesis de Ángel Gallardo, en la que interpretó la mitosis como un resultado de polarizaciones eléctricas y el establecimiento de un “campo de fuerza cariocinético” a nivel celular. Si bien estos conceptos seminales se encuentran hoy abandonados, el desarrollo tecnológico experimentado en las últimas décadas ha vuelto a llamar la atención sobre la posibilidad de que las células puedan ser afectadas por los campos electromagnéticos. En realidad, ni siquiera debemos restringirnos a la época actual, con el auge de las comunicaciones inalámbricas y el wifi, que ha incrementado la inmisión (dosis total de RNI recibida por un ser humano individual o por una población, obtenida sumando la contribución de todas las fuentes de irradiación) en forma significativa: vimos que ya hacia 1980 se habían publicado numerosos trabajos al respecto.

Las radiaciones no-ionizantes podrían tener efectos, de distinta naturaleza y de distinto grado, sobre varios de los órganos y sistemas del cuerpo humano. En este trabajo nos hemos limitado a considerar los posibles efectos sobre el sistema inmunológico.

La complejidad de dicho sistema torna imposible obtener siquiera una aproximación a la respuesta; por ello nos hemos limitado a reseñar algunos trabajos importantes sobre la cuestión. Del análisis de los mismos surge que:

- el número mayor de estudios realizados hasta ahora refiere a las RNI de muy baja frecuencia, habiéndose estudiado en menor medida la acción orgánica de las microondas y otras RNI de frecuencia superior a 300 Hz. También hemos encontrado un número relativamente apreciable de estudios sobre los campos magnéticos estáticos.
- los trabajos consultados, si bien nunca son concluyentes, tienden a considerar que las RNI a nivel celular actúan generando la apertura de los canales que permiten el flujo de iones de calcio hacia el interior de las células.

- como resultado de esto, la acción tóxica de las RNI estaría mediada por la formación de radicales libres oxidantes; más exactamente, de especies reactivas del oxígeno (ROS). Por lo tanto, la acción de las RNI podría presentar similitudes con la de las radiaciones ionizantes, de las que ya se conoce que su toxicidad resulta de la formación de ROS. Esto podría ampliar notablemente la aplicación de la Teoría de Gerschman, ya aceptada para las RI, al campo de las RNI.
- aceptando la acción de las RNI sobre el sistema inmunológico, algunos trabajos han propuesto utilizarlas con fines terapéuticos, debido a la posibilidad de que las RNI sirvan como “moduladoras” de dicho sistema.

La problemática, sin embargo, continúa abierta. Por ello, podemos cerrar este trabajo con tres preguntas:

¿Afectan realmente las RNI al sistema inmunológico humano?

Si la respuesta es afirmativa, ¿cuáles son exactamente los procesos mediadores de tal actuación?

¿Qué medidas deberían tomarse para proteger a un grado razonable a la población de tales efectos, sin menoscabo del desarrollo tecnológico de nuestra civilización?

### **Bibliografía.**

- 1.- Mosmann T., Moore K.: The role of IL-10 in cross-regulation of Th1 and Th2 responses. *Immunoparasitol. Today*, 1991; 12 : 49-53.
- 2.- Del Prete G., Ricci M., Romagnani S. : Purified protein derivate (PPD) of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) (TES) of *Toxocara canis* select human T cells clones with stable and opposite (Th1 or Th2) profile of cytokine production. *J. Clin. Invest.*, 1991; 88 : 346-350.
- 3.- Romagnani S. : Human Th1 and Th2 subsets : Doubt no more. *Immunol. Today*, 1991; 12 : 256-257.
- 4.- Ricci M., Rossi O., Matucci A. : The importance of Th2 like cells in the pathogenesis of airway allergic inflammation. *Clin. Exp. Allergy*, 1993; 23 : 360-369.
- 5.- Bradding P : Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. *J. Immunol.*, 1993; 151: 3853-3865.
- 6.- Alonso A., Albónico J., Mouchiàn K., Pionetti C., Varela M. : *Alergia atópica*. Edit. H. Macchi. Buenos Aires. 1987.
- 7.- Alonso A. : *Claves de la Inmunología*. Edit. Lòpez. Buenos Aires. 1992.
- 8.- Alonso A. : *Fundamentos de Alergia para el mèdico general*. Edit. El Ateneo. Buenos Aires. 1996.
- 9.- Alonso A. y colab. : *Temas de Inmunoalergia*. Tomos I al VI. Edit. CTM. Buenos Aires. 1998 – 2006.
- 10.- Wierenga E., Snoek M. : Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4+ T lymphocytes in atopic patients. *J. Immunol.*, 1990; 144 : 4651-4656.

- 11.- Parronchi P., Macchia D. : Allergen and bacterial antigen specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 1991; 88 : 4538-4542.
- 12.- Parronchi P. : Aberrant IL-4 and IL-5 production in vitro by CD4+ helper T cells from atopic subjects. *Eur. J. Immunol.*, 1992 ; 22 : 1615-1620.
- 13.- Parronchi P. Cytokine production by allergen –Der p I- specific CD4+ T clones derived from a patient with severe atopic disease. *Int. J. Clin. Lab. Res.*, 1991; 21 : 186-189.
- 14.- Kay A.B. : Origin of type 2 helper cells. *N. Engl. J. Med.*, 1994; 330: 567-568.
- 15.- Del Prete G., Carli M., Ricci M. : Allergen exposure induces the activation of allergen specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergenic respiratory disorders. *Eur. J. Immunol.*, 1993; 23: 1445-1449.
- 16.- Holt P., Phillips M. : Ia+ dendritic cells form a tightly meshed network within the human airway epithelium. *Clin.Exp.Allergy*, 1989; 19 : 587-601.
- 17.- Zwollo P., Marsh D. : Molecular studies of human immune response genes for the short ragweed allergen, Amb a V : Sequencing of HLA-D second exon in responders and non-responders . *Immunogenetics*, 1991; 33 : 141-151.
- 18.- Ansari A., Marsh D. : Molecular genetics of human immune responsiveness to *Lolium perenne* (rye) allergen Lol p III. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.*, 1989; 88: 164-169.
19. Marsh D. : Genetic basis for asthma and other allergies. In Ricci M., Romagnani S., Maggi E. (Eds) *Allergia respiratoria*. Florence : Società Italiana Allergologia e Immunologia Clinica, 1993, pp. 27-35.
- 20.- Renz H. : T-cells expressing specific V- $\beta$  elements regulate immunoglobulin E production and airways responsiveness in vivo. *J.Exp.Med.*, 1993; 177: 1175-1180.
- 21.- Van Neerven R.J., Jansen H.M. : T-cell epitopes of house dust mite major allergen Der p II. *J. Immunol.*, 1993; 151 : 2326-2335.
- 22.- Maggi E., Ricci M., Romagnani S. : Reciprocal regulatory effects of IFN- $\gamma$  and IL-4 in the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J. Immunol.*, 1992 ; 148 : 2142-2147.
- 23.- Seder R., Boulay J. : CD8+ T cells can be primed in vitro to produce IL-4. *J. Immunol.*, 1992; 148 : 1652-1656.
- 24.- Mc Kenzie A., De Vries J. : Interleukin 13, a T-cell derived cytokine that regulates human monocyte and B cell function. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 1993; 90 : 3735-3739.
- 25.- Kopf M. : Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature*, 1993; 362 : 245-248.
- 26.- Romagnani S. : Induction of Th1 and Th2 responses : a key role for the “natural” immune response ? *Immunol. Today*, 1992 ; 13 : 379-381.

- 27.- Manetti R. : Natural killer cell stimulatory factor (IL-12) induces Th1 specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th2 cells. *J.Exp.Med.*, 1993 ; 177 : 1199-1204.
- 28.- Hsieh C. : Development of Th1-CD4-T cells through IL-12 produced by Listeria induced macrophages. *Science*, 1993 ; 260 : 547-549.
- 29.- Zlotnik A. : Cytokine production by mature and immature CD4 – CD8 - T cells. *J. Immunol.*, 1992 ; 149 : 1211-1215.
- 30.- Borysenko M. : Phylogeny of immunity. *Immunogenetics*, 1976; 3 : 305-326.
- 31.- Voorhorst R. : Allergology : past, present and future. *Annals of Allergy*, 1978; 40 : 206-210.
- 32.- Robinson D. : Th2 cytokines in allergic disease. *Br. Med. Bull.*, 2000; 56 : 956-968.
- 33.- Gould H., Sutton B. : The biology of IgE and the basis of allergic disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003; 21 : 579-628.
- 34.- Galli S., Tsai M. : Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells : recent advances. *Annu. Rev. Immunol.*, 2005 ; 23 : 749-786.
- 35.- Johansson S. : A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. 2005.
- 36.- El Biaze M., Boniface S. : T cell activation from atopy to asthma : more a paradox than a paradigm. *Allergy*, 2003; 58 : 844-853.
- 37.- Sabra A., Bellanti J. : IgE and non-IgE food allergy. *Ann.Allergy Asthma Immunol.*, 2003; 90 : 71-76.
- 38.- Strachan D. : Family size, infection and atopy : the first decade of the “hygiene hypothesis”. *Thorax*, 2000; 55 : 2-10.
- 39.- Umetsu D., McIntire J.: Asthma : an epidemic of dysregulated immunity. *Nat. Immunol.*, 2002; 3 : 715-720.
- 40.- Pérez Machado M., Ashwood P. : Reduced transforming growth factor beta-1 producing T cells in the duodenal mucosa of children with food allergy. *Eur .J. Immunol.*, 2003; 33 : 2307-2315.
- 41.- Montero Vega M. : New aspects of inflammation in allergic diseases. *Allergol et Immunopathol.*, 2006; 34 : 156-170.
- 42.- Ling E., Smith T. : Relation of CD4+ CD25+ regulatory T-cells suppression of allergen driven T cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*, 2004 ; 363 : 608-615.
- 43.- Akdis M. : Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.*, 2004; 199 : 1567-1575.

- 44.- Hawrylowicz C., Garra A. : Potential role of IL-10 secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat. Rev.Immunol.*, 2005; 5 : 271-283.
- 45.- Akdis M. : T regulatory cells in allergy : novel concepts in the pathogenesis, prevention and treatment of allergic diseases. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 2005; 116: 961-968.
- 46.- Grunig G., Banz A. : Molecular regulation of TH2 immunity by dendritic cells. *Pharmacol.Ther.*, 2005; 106: 75-96.
- 47.- Kappler J., Marrack P. : T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*, 1987; 49 : 273-280.
- 48.- Sakaguchi S. : Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells : their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.*, 2001; 182 : 18-32.
- 49.- Sakaguchi S. : Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004; 22 : 531-562.
- 50.- Maloy K. : Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.*, 2001; 2 : 816-822.
- 51.- Curotto de Lafaille M.A. : CD4+ regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol.*, 2002; 14 : 771-778.
- 52.- Gavin M. : Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 2003 ; 15 : 690-696.
- 53.- Curotto de Lafaille M. : The role of regulatory T cells in allergy. *Springer Semin. Immunopathol.*, 2004; 25 : 295-310.
- 54.- Maloy K. : CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine dependent mechanisms. *J. Exp. Med.*, 2003; 197 : 111-119.
- 55.- Stassen M. : Human CD4+ CD25+ regulatory T cells and infectious tolerance. *Transplantation*, 2004; 77 : 23-25.
- 56.- Vigouroux S. Yvon E. : Antigen induced regulatory T cells. *Blood*, 2004; 104 : 26-33.
- 57.- Nakamura K. : Cell contact dependent immunosuppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is mediated by cell surface bound transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.*, 2001; 194 : 629-644.
- 58.- Bennett C.L. : The immune dysregulation , polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.*, 2001; 27: 20-21.
59. Lin W. : Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia E in Foxp3 mutant mice. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 2005; 116 : 1106-1115.
- 60.- Loser K. : In vitro generated regulatory T cells induced by Foxp3- retrovirus infection control murine contact allergy and systemic autoimmunity. *Gene Ther.*, 2005 ; 12 : 1294-1304.

- 61.- Curotto de Lafaille M. : Hyperimmunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *J.Exp.Med.*, 2001 ; 194 : 1349-1359.
- 62.- Farrerons Co F.J. : Alergia y paralergia. Edit. Espaxs. Barcelona. 1987.
- 63.- Charpin J. : El asma bronquial. Edit. El Ateneo. Buenos Aires. 1970.
- 64.- Marone G., Austen K. : Asthma and allergic diseases. Academic Press. London. 1998.
- 65.- Neffen H., Baena Cagnani C. : Asthma, a link between environment, immunology and the airways. Edit. Hogrefe & Huber. Buenos Aires. 1999.
- 66.- Kitamura Y. : Biological and molecular aspects of mast-cell and basophil differentiation and function. Raven Press. New York. 1995.
- 67.- Sheldon J., Lovell R. : A manual of clinical allergy. W. B. Saunders Co. London. 1953.
- 68.- Ciba Foundation Symposium 78 : Metabolic activities of the lung. Excerpta Medica. Amsterdam. 1980.
- 69.- Urbach E., Gottlieb P. : Allergy. Edit. Grune & Stratton. New York. 1943.
- 70.- Mygind N. : Alergia nasal. Edit. Salvat. Barcelona. 1982.
- 71.- Stura C.A. : Tratado de Inmunobiología y serología. Edit. Alfa. Buenos Aires. 1950.
- 72.- Mathov E. : Actas del VII° Congreso Nacional de Alergia e Inmunología. 1968.
- 73.- Fainboim L., Satz L. : Introducción a la Inmunología Humana. Edición del autor. Buenos Aires. 1995.
- 74.- Gras J. : Mecanismos inmunológicos. Edit. Jims. Barcelona. 1972.
- 75.- Wolfrohm R., Charpin J., Herman D. : Alergia. Edit. Espaxs. Barcelona, 1973.
- 76.- Varela Fuentes B., Recarte P., Graña A. : Alergia en la práctica clínica. Espasa Calpe Argentina. Buenos Aires. 1946.
- 77.- Lustig A., Cesaris Demel A., Frugoni C. : Anafilassi. Edit. Istituto Sieroterapico Milanese. Milano. 1923.
- 78.- Naranjo P. : Timo, inmunización y alergia. Edit. Universidad Central del Ecuador. Quito. 1969.
- 79.- Van Furth R. : Hemopoietic growth factors and mononuclear phagocytes. Edit. Karger. Basel. 1993.
- 80.- Lepoittevin J.P., Basketter D.A. : Allergic contact dermatitis. Edit. Springer. Berlin. 1998.
- 81.- Sulzberger M. : Dermatologic allergy. Charles Thomas.Publisher. Baltimore. 1940.
- 82.- Cordon F. : Inmunidad y automultiplicación proteica. Edit. Revista de Occidente. Madrid. 1954.
- 83.- Ciba Foundation. La alergia y sus problemas. Berna. 1950.

- 84.- Hansen K. : Tratado de alergia. Edit.Labor. Buenos Aires. 1946.
- 85.- Crieip L.H. : Inmunología Clínica y alergia. Edit. Paz Montalvo. Madrid. 1964.
- 86.- Tapella P.A.: Introducción al estudio de la alergia. Edit. López.Buenos Aires. 1941.
- 87.- Doerr R. : La anafilaxia. Edit. Revista de Occidente. Madrid. 1954.
- 88.- Mathov E. : Alergia a drogas. Edit. Paidós. Buenos Aires. 1969.
- 89.- Ring J. : New trends in allergy. Ed. Springer-Verlag. Berlin. 1981.
- 90.- Ruiz Moreno G.: Lecciones de alergia. Edit. López & Etchegoyen. Bs Aires. 1957.
- 91.- Blanco A. : Alergia y asma. Edit. Aguilar. Madrid. España. 1996.
- 92.- Nolte D. : Asma. Edit. Doyma. Barcelona. España. 1982.
- 93.- Arasa F. : Tratado de alergia. Edit. Científico-Médica. Barcelona. España. 1960.
- 94.- Neffen H.E., Baena Cagnani C.E.: Asthma, allergy & respiratory medicine. Proceedings of the Interasma 1995. Buenos Aires.
- 95.- Miatello V.R., Bózzola C.J. : Inmunopatología y transplantes de órganos. Edit. López. Buenos Aires. 1969.
- 96.- Becker E.L. : Biochemistry of the acute allergic reactions. Edit. Alan R. Liss. New York. 1981.
- 97.- Ducombs G. : Alergia cutánea por contacto. Ed. Toray-Masson. Barcelona. España. 1982.
- 98.- García Ortega M.P. : Lo fundamental en alergia. Edit. Doyma. Barcelona. España. 1986.
- 99.- Lockey R., Bukantz S. : Fundamentos de inmunología y alergia . Ed. Interamericana. Madrid. España. 1989.
- 100.- Quiroga M. : Eczema. Edit. López & Etchegoyen. 1949.
- 101.- Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K., Potenza M., Rodríguez S.R. : “Las cucarachas y la alergia: 40 años de investigación.” Anales de la Sociedad Científica Argentina, 2018; 261; (1) : 5-44.
- 102.- Alonso A. : “Incógnitas de la Alergia”. Ed. Del Autor, 2013.
- 103.- Rodríguez S.R., Alonso A.: “Fronteras de la Inmunidad Connatural”. Ed.de los Autores. 2015.
- 104.- Alonso A., Dokmetjián J., Mouchián K., Albónico J.F., Rodríguez S.R. : “¿Los anticuerpos asimétricos sirven para algo?” Anales de la SCA, 2021 ; 271 (2): 23-51.
- 105.- Á. Gallardo, Interpretación dinámica de la división celular, tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Naturales de la Universidad de Buenos Aires, 1902.Disponible online en:

[https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/tesis/document/tesis\\_n0042\\_Gallardo](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/tesis/document/tesis_n0042_Gallardo).

Acceso: junio de 2021.

- 106.- M. Rosado, M. Simko, M. Mattson y C. Pioli, : Immune-modulating perspectives for low frequency electromagnetic fields in innate immunity, *Frontiers in Public Health*, 6, 1-13, 2018.
- 107.- A. de Ninno, M. Pregnolato : Electromagnetic homeostasis and the role of low amplitude electromagnetic fields on life organization. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 36 (2), 115-122, 2017.
- 108.- Walleczek J.: Electromagnetic field effects on cells of the immune system : the role of calcium signal. *FASEB Journal*, 6 (13), 3177-3185, 1992.
- 109.- Lei-Zhang T. : 27 T ultra-high static magnetic field changes orientation and morphology of mitotic spindles in human cells. [https:// elifesciences org/articles/ 22911](https://elifesciences.org/articles/22911), 2017, agosto 2021.
- 110.- Comisión Iberoamericana de Protección Radiológica de Campos Electromagnéticos (CIPRACEM), Federación de Radioprotección de América Latina y el Caribe (FRACL) y Asociación Internacional de Protección Radiológica (IRPA) . La protección radiológica de los Campos electromagnéticos (CEM). Guía informativa para la aplicación de los 3 principios fundamentales de radioprotección por parte de organismos y autoridades regulatorias, documento entregado por el Dr. Rodolfo Touzet a los autores en agosto de 2021.-

## ¿QUÉ HACEMOS CON LOS PRIONES ?

Ángel Alonso

Div. Alergia e Inmunología- Hospital de Clínicas- UBA-

Sociedad Científica Argentina- Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires.-

**Resumen:** se exponen las características principales de los priones y su potencialidad patológica en el hombre, los animales y las plantas. Se discute su prevención y eventual neutralización.

**Palabras clave :** priones; PrPn; PrPsc; neurodegeneración; Alzheimer.

**Summary:** the medical and biological importance of prion proteins are exposed; their prevention and critical neutralization are discussed.

**Key words:** prion proteins; neurological diseases; Alzheimer.

Introducción.

La primera evidencia escrita de lo que se conoce como enfermedades causadas por los priones la realizó McGowan en 1922, con su descripción de "la temblante" (del francés, la tembladera) en ovejas, luego llamada "scrapie" o tembladera ovina, y que se describió como una enfermedad infecciosa, transmisible y con larga incubación (Cuille y Chelle, 1936).

Se adjudicaron a Creutzfeldt y a Jakob las primeras descripciones de esta enfermedad neurodegenerativa en los humanos: enfermedad de Creutzfeldt- Jakob o CJD (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921a; Jakob, 1921b; Jakob, 1921c).

La enfermedad presentaba una degeneración extensa, pero localizada de la sustancia gris, con alteraciones neuronales difusas, astrogliosis, degeneración vacuolar en el cortex cerebral, con proliferación astrocítica y degeneración neuronal. En 1957, se describió una enfermedad encefálica vinculada al canibalismo ritual realizado en Papúa, Nueva Guinea, a la que bautizaron como "kuru" (escalofrío), sin que tuviera causa ni terapéutica eficaz (Gajdusek y Zigas, 1957).

La relación existente entre las enfermedades del kuru, CJD y scrapie y su naturaleza "infecciosa" no tardaría en ser demostrada. Mientras que en 1959, el veterinario americano Hadlow puso de manifiesto las similitudes clínicas y neuropatológicas existentes entre el kuru y el scrapie, algún tiempo después, Gajdusek comprobó que el kuru presentaba aspectos comunes con la CJD.

La incógnita a resolver en años sucesivos fue descubrir la naturaleza del agente responsable de estas enfermedades, invisible a los métodos de detección. Durante años se

habló de las "infecciones lentas", concepto propuesto en 1953, por Sigurdsson y colaboradores, a partir de su experiencia en el estudio de 2 enfermedades ovinas, maedi y scrapie (Sigurdsson et al., 1953).

Sin embargo, el hecho de que nunca se aisló ningún virus, así como la ausencia de una respuesta inmune frente al extraño agente, cambió el concepto con respecto a estas enfermedades.

Los experimentos realizados por Alper y colab., contribuyeron decisivamente a dicho cambio. Este grupo probó mediante técnicas radiológicas, que la infectividad del scrapie resultaba resistente a la inactivación mediante radiación ultravioleta e ionizante (Alper et al., 1966; Alper et al., 1967). Por su parte Griffith, en 1967, postuló que el agente transmisible podría ser una proteína, lo cual fue tomado con escepticismo por parte de la comunidad científica del momento (Griffith, 1967). En 1982, Prusiner resucitó la idea de Griffith, y postuló la hipótesis de "solo proteína", acuñando por primera vez el término "prión" (del inglés, proteinaceous infectious particle) para definir a las partículas proteicas "infecciosas" resistentes a la inactivación mediante métodos que alteran ácidos nucleicos, hipótesis por la que fue distinguido con el Premio Nobel de Medicina en 1997.

La hipótesis proponía que el material "infeccioso" estaba compuesto exclusivamente por una proteína capaz de auto-replicarse en ausencia de ácido nucleico (Prusiner, 1982; Prusiner et al., 1998). El aislamiento a partir de material "infeccioso" de una proteína resistente a proteasas, demostró por primera vez que el agente "infeccioso" correspondía con una isoforma patógena (PrP<sup>sc</sup>) de una proteína celular apatógena (PrP<sup>n</sup>), bautizada con el nombre de prión (Bolton et al., 1982).

Actualmente los priones constituyen las únicas partículas biológicas que contradicen el gran Dogma Central de la Biología enunciado por J. Monod en 1970: ***"La secuencia de aminoácidos o estructura primaria de la proteína determina de manera unívoca el plegamiento de la proteína para adoptar su estructura terciaria. Es decir, entre las miles de configuraciones tridimensionales en principio posibles, sólo se adopta una."*** A pesar de que la tembladera ovina causada por priones fue descubierta hace más de 200 años, y que se describió en la literatura hace casi un siglo, no ha sido hasta 1985 cuando hubo una gran alarma en torno a estas enfermedades. La causa fue la detección en Gran Bretaña de una enfermedad en el ganado bovino cuya manifestación clínica consistía en una afección nerviosa acompañada de un comportamiento agresivo y ansioso en los animales. Fue denominada encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) o "mal de las vacas locas". El análisis anatomopatológico del encéfalo mostró un patrón de lesiones muy semejante al descrito en la tembladera ovina. Desde entonces, se han diagnosticado más de 200.000 casos en el mundo (Anderson et al., 1996). La situación provocó una gran alarma social no sólo por las pérdidas económicas sufridas por los ganaderos, sino por la aparición en el hombre de una variante de encefalopatía espongiiforme, conocida como la nueva variante de Creutzfeldt-Jakob (nvCJD), y su vinculación al consumo de carnes procedentes de ganado vacuno afectado por EEB (Bruce et al., 1997; Prusiner, 1997). Desde entonces, los gobiernos de los países afectados han destinado grandes sumas al desarrollo de los

métodos de diagnóstico e investigación de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs).

Patogenia.

La principal característica de este grupo de enfermedades es la acumulación en el cerebro de una isoforma patógena del prión (PrPsc), proteína que en su estructura normal (PrPn o proteína del prión celular), se encuentra expresada en la membrana celular de forma constitutiva (Prusiner, 1991). Aunque las 2 isoformas son idénticas en su secuencia primaria, la PrPsc puede distinguirse de la PrPn por sus diferentes propiedades bioquímicas y biofísicas, como la formación de agregados en presencia de detergentes y la resistencia a la hidrólisis por enzimas proteolíticas (Pan et al., 1993). La aparición y acumulación de la isoforma patógena es debida a un proceso postraducciona sobre la proteína celular como consecuencia de su probable interacción con PrPsc (Gabizon y Prusiner, 1990). Si bien, los mecanismos moleculares de este proceso llamado transformación, no son totalmente conocidos, únicamente parecen implicar cambios en la conformación de la proteína (Borchelt et al., 1990). Así, para la producción de proteína infectiva es necesaria la presencia de la isoforma celular, capaz de ser transformada. El hecho de que los ratones PrPKO (del inglés knock out, ratones en que el gen codificante para la PrPn había sido inactivado), fueran resistentes a la enfermedad tras la inoculación intracraneal con priones infecciosos, demostró definitivamente esta teoría (Bueler et al., 1993).

La susceptibilidad a la infección se pudo restablecer simplemente reintegrando en su genoma el gen de la proteína del prión (Fischer et al., 1996).

A pesar del escepticismo inicial, las nuevas evidencias presentadas en los últimos años consolidan la teoría de “la proteína sola”, como la más lógica para explicar la patogenia de las EETs. Por un lado, se demostró la capacidad de reproducir la enfermedad mediante la inoculación intracraneal de fibras amiloides sintéticas de prión (Legname et al., 2004). Por otro lado, se consiguió amplificar *in vitro* el material infeccioso mediante la técnica de la PMCA (del inglés, cyclic amplification of protein misfolding), material que es infectivo tras la inoculación experimental en ratones (Soto et al., 2005). Las EETs son un grupo de enfermedades degenerativas del sistema nervioso central (SNC) que afectan tanto al hombre como a varios animales. Exhiben muchas similitudes con otras enfermedades neurodegenerativas como son el Alzheimer, la enfermedad de Huntington y el Parkinson, en las que el agente causal es una proteína del organismo cuyo plegamiento es anómalo, pero difieren de éstas en que las EETs son de carácter “infeccioso” y transmisible entre diferentes especies. Si bien resulta necesario realizar estudios para ratificar la naturaleza infecciosa del Alzheimer, recientemente se ha descrito el carácter “infeccioso” del péptido amiloide (Meyer-Luehmann et al., 2006). Las EETs se caracterizan por la ausencia de lesiones macroscópicas, siendo las microscópicas, bilaterales, de distribución difusa, no inflamatorias y afectando exclusivamente al SNC. Así, para diagnosticar una EETs se encontrará: degeneración espongiiforme del tejido con la presencia de vacuolas, gliosis, degeneración y muerte neuronal y depósitos del PrPsc en el citoplasma neuronal. Las EETs

se presentarán como: 1) enfermedades con un origen genético, 2): enfermedades transmitidas por una infección exógena y 3): como enfermedades esporádicas. En el ser humano, las EETs reciben diversos nombres según los síntomas y signos clínicos presentes. Así, la enfermedad causada por priones con mayor incidencia en los humanos, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), tiene varios orígenes: esporádico, familiar o iatrogénico. Mientras que la esporádica supone el 85% de los casos, la iatrogénica únicamente afecta al 1% del total. Además del CJD, existen otros tipos de EETs, algunas con un origen “infeccioso”, como el kuru y la nueva variante de Creutzfeldt-Jakob (nvCJD), y otras con un origen genético, como el Insomnio Familiar Fatal (IFF) y la enfermedad de Gerstmann-Stráßler-Scheiker (GSS) (Prusiner, 1997). El 15% de las enfermedades causadas por priones se deben a mutaciones germinales en el gen que codifica para la PrPn (CJD familiar, GSS e IFF) (Collinge, 2001; Wadsworth et al., 2003).

Los síntomas de la ECJ incluyen : demencia que empeora rápidamente en el transcurso de unas pocas semanas o meses; visión borrosa; cambios en la marcha; confusión o desorientación, alucinaciones (auditivas o visuales); falta de coordinación; rigidez muscular, fasciculaciones; sensaciones de estar nervioso o sobresaltado; cambios de personalidad; somnolencia; convulsiones o movimientos espasmódicos repentinos y dificultad para hablar.

La ECJ iatrogénica se transmite a través de una transfusión de hemoderivados, un trasplante o instrumentos quirúrgicos contaminados. La vECJ es causada por comer carne infectada. Se cree que la “infección” que causa la enfermedad en las vacas locas es la misma que ocasiona la vECJ en los humanos. La vECJ ocasiona menos del 1% de todos los casos de ECJ y afecta a personas jóvenes. Menos de 200 personas en todo el mundo han tenido esta enfermedad, sufrida en Inglaterra y Francia. La ECJ estaría relacionada con la enfermedad consuntiva crónica de los venados.

Enfermedades por mutaciones priónicas.

Los casos de CJD familiar, GSS e IFF son los 3 fenotipos principales de enfermedades por priones que contienen mutaciones en el gen que codifica para la proteína del prión humano (PrPn), localizado en el cromosoma 20 (Prusiner, 2001).

Se describieron 50 mutaciones que afectan a este gen, pero el 95% de ellas están asociadas, a la inserción de 5 ó 6 octapéptidos repetidos o bien a mutaciones puntuales en los codones 102, 178, 200 ó 210 (Capellari et al., 2005). Adicionalmente, la susceptibilidad a la enfermedad y/o en el fenotipo de enfermedad se ve afectado por el polimorfismo existente en el codón 129 del PrPn, que permite la presencia de una valina o de una metionina (Collinge et al., 1991; Lee et al., 2001; Mead et al., 2003; Palmer et al., 1991). Así, la mutación D178N (Asp→Gln) con una metionina en posición 129 resulta en Insomnio Familiar Fatal (Goldfarb et al., 1992), mientras que la misma mutación con una valina en posición 129 resulta en un CJD familiar (Goldfarb et al., 1991b).

La patogenicidad de las moléculas del prión mutadas, se debe a un plegamiento anormal de la proteína, en este caso como consecuencia de la pérdida de puentes de hidrógeno y puentes disulfuro necesarios para mantener la estructura natural de la proteína del prión “normal” (PrPn) (Riek et al., 1998). En función del lugar en que se produce la mutación, la desestabilización de la PrPn resulta diferente, aunque anómala en todos los casos. Así, la mutación Al 17V (GSS) desestabiliza la conformación de hélice de la proteína del prión “normal” (PrPn) en las posiciones 106 a 126, dando lugar a una proteína anómala y patogénica (Frauenfelder et al., 1991). **Enfermedad de Gerstmann-Stráussler-Scheinker (GSS)**

La primera se detectó en 1928 en una familia austriaca cuyos miembros presentaban ataxia cerebelar de progresión lenta acompañada de pérdidas cognitivas paulatinas. (Gerstmann, 1928; Gerstmann et al., 1936). Los casos de GSS se caracterizan por una progresión en los signos cerebelares, degeneración esponjiforme de la materia gris y depósitos de placas amiloides.

La mutación afecta al codón 102 de la PrPn, y, transforma una prolina en una leucina (P102L) (Dohura et al., 1989; Goldgaber et al., 1989; Hsiao et al., 1989), aunque otras mutaciones se dan con frecuencia en determinados grupos étnicos (Yamada et al., 1993). Ocasionalmente, se presenta la mutación que afecta al codón 117 de la PrPn, y, transforma una alanina en una valina (Al 17V) (Mastrianni et al., 1995). Existen, casos de GSS esporádicos, no asociados a ninguna mutación en el gen de la PrPn, que son menos frecuentes (Liberski et al., 1998).

**Insomnio Familiar Fatal (IFF).**

Fue descrito por primera vez en una familia italiana en 1986 (Lugaresi et al., 1986), pero no fue hasta 1992 cuando esta enfermedad se incluyó dentro del grupo de enfermedades causadas por priones (Medori et al., 1992). Se caracteriza por una desorganización completa en los patrones del sueño, hiperactividad simpática y anomalías endocrinas. Presenta una mutación del gen en la posición 178, dando lugar a la sustitución del aminoácido aspártico por una asparagina (D178N). La descripción de esta mutación asociada al IFF despertó un gran escepticismo dado que la misma había sido descrita previamente como propia del CJD familiar (Goldfarb et al., 1991b). La solución a este conflicto no tardó en llegar, y, en 1992, Goldfarb describió que ello se debía al polimorfismo del codón 129: que en el IFF se asocia a la mutación D178N, Met 129 mientras que en la CJD va asociado a la mutación D178N con la Val en posición 129 (Goldfarb et al., 1992).

**CJD familiar.**

Los casos de CJD sufren una progresión subaguda de demencia, signos motores y degeneración esponjosa de la sustancia gris cerebral, acompañados de la formación de placas amiloides. Los pacientes con CJD familiar presentan un número variable de inserciones de octapéptidos repetidos en la región N-terminal de la proteína o bien mutaciones puntuales en la misma. La mutación E200K, afecta al codón 200 de la PrPn, transforma un glutámico en una lisina, y es la de mayor incidencia. (Goldfarb et al., 1991a).

## La proteína del prión celular: PrPn

La proteína del prión celular o PrPn es una sialo-glicoproteína anclada en la membrana plasmática por una molécula de glico-fosfatidilinositol (GPI) (Caughey and Raymond, 1991; Stahl et al., 1987) y asociada a microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos insolubles en los detergentes (Kooyman et al., 1998). Está constituida por una cadena polipeptídica de 250 aminoácidos (Prusiner, 1993), y su peso molecular oscila entre 33 y 35 KDa, dependiendo del grado de glicosilación. (Harris, 1999a; Harris, 1999b). La PrPn está codificada por un gen de copia única localizado en el brazo corto del cromosoma 20 del hombre, en el cromosoma 2 del ratón y en el cromosoma 13 de la vaca. La secuencia genética del mismo está altamente conservada en los mamíferos, la homología aminoacídica se encuentra entre un 80-90%. El gen se expresa de manera constitutiva en todos los tejidos, siendo su expresión más elevada en el tejido nervioso, como cerebro, cerebelo, médula e hipotálamo. (Chesebro et al., 1985). Aún hoy no se ha definido claramente las funciones concretas de la PrPn, pero está implicada en el metabolismo del cobre en las neuronas (Brown et al., 1997; Bums et al., 2003; Jobling et al., 2001), en fenómenos de transmisión sináptica (Collinge et al., 1994; Herms et al., 1999), y, también se le atribuye una función neuroprotectora (Lasmezas, 2003). La proteína del prión celular está constituida por 253 aminoácidos en el hombre, 254 en el ratón y hámster y por 256 en la vaca. En la estructura primaria de la PrPn (siempre el humano) se pueden diferenciar 5 regiones: **región 1-22**: comprende el péptido señal que dirige a la proteína hacia el retículo endoplásmico rugoso donde será escindida, antes de su transporte a través del aparato de Golgi; **región 23-91**: donde se encuentran una serie de octapéptidos ricos en glicina y prolina muy conservados entre las diferentes especies que son capaces de unir cobre y zinc (Lehmann, 2002). Posibles inserciones o deleciones en esta zona se asocian a enfermedades familiares en humanos; **región 92-135**: es hidrofóbica, altamente conservada, y que es crucial en la conversión de PrPn a PrPsc. (Wegner et al., 2002). La **región 136-231**: en las posiciones 181 y 197 en que se encuentran 2 aspárticos, existen 2 sitios de N-glicosilación (Endo et al., 1989; Haraguchi et al., 1989) que permiten la incorporación de azúcares, responsables de las 3 formas características de esta proteína, como no glicosilada (5%), monoglicosilada (25%) y biglicosilada (70%). Dos cisteínas en las posiciones 179 y 214 permiten la formación de un puente disulfuro intracatenario (Welker et al., 2002). En la posición 231 existe una serina capaz de unirse al grupo glico-fosfatidilinositol (GPI) responsable del anclaje de la proteína a la membrana celular (Stahl et al., 1987). La **región 232-253**: es una región C-terminal hidrofóbica que actúa como péptido señal para el anclaje del grupo GPI, y, que es degradada durante la maduración de la proteína (Stahl et al., 1987). La **estructura secundaria** de la proteína del prión celular está compuesta por un 42% de  $\alpha$ -hélice y un 3% de lamina p, detectado por medio de la difracción infraroja transformada de Fourier (Pan et al., 1993). La **estructura terciaria** consiste en 3  $\alpha$ -hélices que conforman un núcleo ordenado en el extremo carboxilo terminal de la molécula y una zona amino terminal desestructurada y flexible (Zhang et al., 2000).

Estado actual de la situación.

Los priones son proteínas extrañas al organismo que NO son agentes infecciosos, es decir, NO son ni bacterias, ni hongos, ni parásitos, y menos aún virus. El primer hallazgo que desconcertó a los investigadores fue que NO estaba presente ningún ácido nucleico, ni ADN ni ARN, ni tampoco bases nitrogenadas o estructuras químicas, que, ante ciertos estímulos ambientales o celulares, pudieran dar origen a un pequeño ácido nucleico de estructura no convencional o incompleta (llamado por algunos autores como virino), rodeado por una envoltura de proteínas de la célula huésped, que le conferirían su resistencia a los agentes que desnaturalizan o modifican a los ácidos nucleicos habitualmente. Esta especulación aún no ha sido probada. Lo que sí está probado, es que muchas células de nuestro organismo poseen una glicoproteína natural, citoplasmática, estructural, y no relacionada con ningún proceso patológico o cascada metabólica, que fue bautizada como proteína priónica o PrPn, que puede convertirse en patogénica cuando un factor exógeno le modifica su estructura conformacional secundaria conduciéndola a un incorrecto plegamiento ( $\beta$ ) de su estructura terciaria (PrPsc), que, a su vez es autorreproducible y engendra fibrillas y placas de amiloide vinculadas con muchas enfermedades animales (encefalopatía espongiiforme bovina o EBB o enfermedad de las vacas locas), y humanas o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ). Stanley B. Prusiner, en 1982, señaló que las EBB son afecciones de lento desarrollo del sistema nervioso central que se caracterizan por la degeneración progresiva de la sustancia gris. En los animales, describió el scrapie, la encefalopatía transmisible del visón, la EBB y la enfermedad con consunción crónica del cariacú y el alce en cautiverio. Las modificaciones histopatológicas relevantes son: la pérdida neuronal, la proliferación e hipertrofia de los astrocitos, la vacuolización neuronal y la escasa respuesta inflamatoria. La coexistencia de pequeñas y frecuentes vacuolas en el tejido nervioso configuran el “cambio espongiiforme” mientras que si las vacuolas son escasas y grandes constituyen un “estado esponjoso”. Estas encefalopatías son transmisibles con un período de incubación muy prolongado, un curso crónico e inexorablemente fatal. La resistencia a los tratamientos físicos y químicos que, habitualmente inactivan a los virus, y la carencia de una respuesta inmune específica en estas enfermedades, lleva a profundizar ciertas líneas de investigación que posibiliten proteger a la PrPn natural del efecto deletéreo de la PrPsc. Merz en 1981, describió las “fibrillas asociadas con el scrapie”, y con técnicas de purificación del tejido cerebral de animales con scrapie pudo aislar una proteína entre 27 y 30 kDa, que bautizó PrPn 27-30, y caracterizó como una sialoglicoproteína asociada a las membranas celulares, resistente a la proteinasa K. Esta proteína forma una proteína más grande (PrPn 33-35), y se polimeriza en bastones amiloides. El gen que codifica para PrPn 27-30 se halla en cerebros de animales normales, no se polimeriza y es degradada por la proteinasa K. Un error postranscripcional podría generar cambios en las propiedades fisicoquímicas de la PrPn 27-30, que alteren su procesamiento intracelular. La PrPn posee una estructura helicoidal del tipo  $\alpha$ , con 4 regiones globulares, sensible a las proteasas, es una proteína monomérica con monómeros estables que poseen resistencia normal y es soluble a los detergentes. Por su parte, la PrPsc es una proteína plana con una estructura laminar  $\beta$ , resistente a las proteasas, que compone agregados proteicos, con monómeros poco estables que forman agregados amiloides, con resistencia notable a la radiación y a los disolventes fuertes, pero es insoluble ante la actividad de los detergentes. Se destaca que las investigaciones determinaron que ambas proteínas priónicas poseen la misma secuencia de aminoácidos pues en el fondo derivan del mismo gen. De tal manera, una proteína globular

(PrPn) con una conformación espacial del tipo  $\alpha$ -hélice del citoplasma neuronal normal entra en contacto con una proteína PrPsc que le induce modificaciones espaciales del tipo  $\beta$ -hélice, con una forma de plegamiento inadecuado y perjudicial para la vida celular, ya que no puede ser degradada con lo cual facilita la formación de acúmulos intracitoplasmáticos insolubles de aspecto amiloide, que llevan al mal funcionamiento celular, y, como estos acúmulos se autorreproducen, la muerte celular es inevitable. El mecanismo por el cual ocurre este plegamiento es poco conocido aunque se especula con la participación de varios aminoácidos en su génesis. Así, los radicales -SH presentes en la forma  $\alpha$  se intercambiarían con cisteínas formando puentes disulfuro, y un cambio conformacional del tipo  $\beta$ . En este cambio, intervendrían la metionina, la cisteína y la valina. Si bien en el cerebro es imposible romper estos puentes disulfuro, en el laboratorio es factible lograrlo con beta-mercaptoetanol y acetilación con iodoacetato o bien oxidándolos con ácido per fórmico. Otros autores sostienen que la sustitución de leucina por prolina, sería la causa de la desestabilidad de la forma  $\alpha$  hacia la forma  $\beta$ .

Como consecuencia de una ingesta “contaminada” (de ahí surgió el paralelismo conceptual con los agentes infecciosos), en el epitelio intestinal se ubica en las células M, especializadas en el transporte de macromoléculas y agregados particulados. Luego se incorpora al sistema fagocítico (macrófagos y leucocitos), que conjuntamente con las células dendríticas y LB locales, inician una respuesta inmune con la síntesis de un anticuerpo específico que no tiene ninguna capacidad para anular la funcionalidad, y así, como un “inmuno-complejo” aberrante, se dirige por los vasos linfáticos al bazo y a los ganglios linfáticos adyacentes. Se discute si su llegada al sistema nervioso central es por la linfa o bien por el propio tejido nervioso afectado en esta peregrinación. La muerte neuronal se produce porque las PrPsc son insolubles y resistentes a las proteasas lisosomales, lo cual conduce a su acumulación en los lisosomas que se rompen por la presión endógena de numerosas PrPsc, acidificando el medio e induciendo la muerte neuronal.

Las enfermedades humanas y animales debidas a los priones pueden ser de 3 clases : a): formas hereditarias de base genética, homocigotos metionina-valina en el codón 129 del gen, que inducen el plegamiento erróneo de la PrPn ; b): formas mal llamadas “infecciosas” donde la PrPn es inducida a transformarse en PrPsc por un agente exterior, que generalmente ingresa por la vía oral-digestiva, y c): una forma esporádica que aparece sin causa aparente, sin base genética ni agente exterior demostrable, y que puede cesar espontáneamente con un mínimo de lesiones cerebrales. En los animales, las enfermedades priónicas se caracterizan por incoordinación de sus movimientos, ceguera y muerte. La más conocida es la EBB, que desde 1984, fue causada por la alimentación de bovinos con restos suplementarios de ovinos y caprinos que habían padecido la enfermedad. La llamada “tembladera” (prurito lumbar) de ovejas y cabras también se transmite a los vacunos, que, a su vez la pueden transmitir a los humanos. La preparación industrial de estos suplementos dietarios muchas veces no están adecuadamente supervisados, y la materia prima que se emplea en su elaboración dista mucho de ser la que corresponde. Los gatos pueden sufrir estos procesos cerebrales por sus ingestas “contaminadas”, siendo curiosamente los perros más resistentes a ellas.

## El KURU.

Es una enfermedad humana debida a los priones, localizada en Papúa (Nueva Guinea), y que fuera descrita por Gajduzek y Zigas en 1957, luego de muy laboriosas investigaciones en un ambiente muy hostil y primitivo. Kuru puede ser traducido como temblor por miedo o por frío, así como, sonriente sin motivo aparente. Era la causa de muerte más común de la población pudiendo alcanzar hasta el 1% anual de un total de 35.000 personas. Se pensó que era una enfermedad degenerativa de causa desconocida, hasta que en 1959, Hadlow observó las notables similitudes entre el kuru y el scrapie, una enfermedad “infecciosa” de las ovejas. Gajduzek, en 1966, estudió la transmisión del kuru a los primates, inoculándolos con restos cerebrales y logró el primer kuru no humano y develó un misterio que podía ser remediado. El kuru sólo enferma a los miembros del grupo lingüístico Fore en Nueva Guinea. Era una enfermedad desconocida antes del canibalismo ritual. Los niños y las mujeres de ambos sexos eran muy afectados. La preparación del cadáver para el ritual y la ingestión de trozos de cerebro para conservar el espíritu del fallecido debían facilitar la incorporación de priones que, luego con los meses o años darían lugar a la enfermedad. Curiosamente, las embarazadas no producían transmisión transplacentaria.

Sistema inmune y priones.

La acumulación del agente “infeccioso” en los tejidos linfoides es un requisito fundamental para el desarrollo de la enfermedad, como fue demostrado por diversos hechos: 1) La ausencia de placas de Peyer en ratones inoculados oralmente con scrapie impide la neuroinvasión (Prinz et al., 2003b); b); 2) El desafío intra-peritoneal con scrapie en ratones esplenectomizados tampoco produce neuroinvasión (Fraser and Dickinson,1970); 3) Bloquear la acumulación del agente “infeccioso” en los nódulos linfáticos impide la invasión del sistema nervioso (Mohan et al., 2005a). El tiempo de permanencia del prión en los tejidos linfoides y la magnitud de la implicancia de cada uno de ellos puede variar en función del hospedador y de la cepa de prión (Foster et al., 2001; Glatzel et al., 2003; Jeffrey et al.,2002; Terry et al., 2003; Wadsworth et al., 2001). Como se comentó antes, para que la PrPsc se acumule en los tejidos linfoides se hace necesario que interactúe con la proteína celular en las células del sistema inmunitario. Así, la PrPn se expresa en: 1) los linfocitos, viéndose implicada en las rutas de señalización (Bainbridge and Walker, 2005; Cashman et al., 1990; Li et al., 2001; Mattel et al., 2004), ; 2) en macrófagos, donde la PrPn sería un marcador de activación (directo o indirecto) que sufre el macrófago tras una infección (Brown and Besinger, 1998; Hutter et al., 2003), ; 3) en células dendríticas donde la PrPn es capaz de inducir la maduración de las mismas (McBride, 2005). Todas las EETs poseen un período de incubación muy largo que en los humanos varia entre los 1,5 y 40 años (Hilton, 2006). Este período de incubación tan largo se debe a la ineficiente replicación del agente infeccioso, que a su vez retarda su acumulación a la concentración necesaria para que ocurra la neuroinvasión. Existen una serie de pasos críticos en la patogénesis de las EETs: la entrada del agente “infeccioso” (en el caso de que este sea su origen), su acumulación en ciertos tejidos, su replicación intracelular y su transporte final al sistema nervioso central donde causa las lesiones. Las células del sistema inmunológico han demostrado jugar un papel importante durante este proceso

(Aucouturier and Camaud, 2002), por un lado amplificando la señal (permitiendo la replicación de PrPsc), y, por otro actuando como “caballo de Troya” transportando el material infeccioso al SNC, evitando su reconocimiento por parte de las defensas inmunológicas del organismo. Tras la ingesta de alimentos contaminados por priones (la ruta natural de infección), estos deben, atravesar el epitelio intestinal para acceder a los tejidos linfoides, que resultan esenciales para que la infección por priones progrese. Mediante sistemas *in vitro*, se ha comprobado que el agente causal del *scrapie* es capaz de penetrar a través de las células M del epitelio intestinal (Heppner et al., 2001a), vía de entrada de numerosos microorganismos (Neutra et al., 1996). A pesar de que son necesarios estudios *in vivo* que lo confirmen, la resistencia de ratones con un número bajo de placas de Peyer, (y por tanto de células M), al desafío oral con priones, parece ratificar esta teoría (Prinz et al., 2003b).

El hecho de que las células M estén especializadas en internalizar antígenos para su rápida diseminación hacia otras células, tales como macrófagos, linfocitos y células dendríticas (CDs), (Neutra, 1996), facilitaría su distribución por el sistema inmunológico. También se postula que para atravesar la barrera intestinal, el prión pudiera utilizar una vía alternativa de entrada con endocitosis dependiente de la ferritina. (Mishra et al., 2004). El núcleo resistente a proteasas de PrPsc es capaz de formar complejos proteicos asociados a ferritina, junto con la abundancia de ésta en los alimentos cárnicos, apoyan esta teoría. Mientras que la ruta oral de infección es lenta y poco eficaz, la infección de priones a través de escarificaciones en la piel es una ruta de infección altamente efectiva (Carp, 1982; Taylor et al., 1996). Mientras que unos autores defienden el papel de las CDs de la piel en esta infección, otros apuestan por la entrada del agente infeccioso desde la piel a los nervios periféricos. Esta última hipótesis avalaría la velocidad con que se disemina la PrPsc hasta el sistema nervioso central. Cuando la proteína de prión atravesó el epitelio intestinal, llegó a una invaginación intraepitelial de las células M o bolsillo intraepitelial. Desde allí, el agente “infeccioso” sería transportado por los LB, LT, macrófagos o células dendríticas de la lámina propia epitelial, hacia los tejidos linfoides donde se hallan las células dendríticas foliculares (CDFs), que juegan un papel fundamental durante las fases de replicación y acumulación del prión infeccioso. Dado que los linfocitos se localizan en el “bolsillo” intraepitelial de las células M, no estarían implicados en el transporte del agente infeccioso tras la exposición intra-intestinal, ya que no presentan altos niveles de PrPsc en ningún momento durante el transcurso de la enfermedad (Huang et al., 2002). El papel de los macrófagos resulta controvertido, pues *in vitro* se ha demostrado que juegan un papel protector, limitando la infectividad de los priones (Carp & Callahan, 1981; Carp & Callahan, 1982). Esta teoría está avalada por el hecho de que tratamientos *in vivo* con diclorometileno-bifosfanato (DP), que depleciona temporalmente a los macrófagos, provoca la rápida acumulación del prión en los tejidos linfoides tras el desafío oral (Maignien et al., 2005) o intraperitoneal (Beringue et al., 2000) con el agente infeccioso. No obstante, este dato no excluye la posibilidad de que el macrófago pudiera ser el transporte o propagación en fases más avanzadas de la enfermedad. Estudios *in vitro* han demostrado que la célula dendrítica es capaz de degradar el prión mediante cistein proteasas (Luhr et al., 2004; Luhr et al., 2002; Mohan et al., 2005c), indicando que, a priori, la CD no sería un buen candidato del transporte del agente “infeccioso” a los órganos linfoides. Sin embargo,

otros autores demuestran que un subtipo de CD es capaz de captar y retener en su forma nativa la proteína infecciosa PrPsc (Huang et al., 2002; Mohan et al., 2005c). Este subtipo celular es único de entre las CDs, por su capacidad para migrar dentro de los folículos de LB (Wykes et al., 1998), área de los órganos linfoides donde se localizan las CDFs (Bemey et al., 1999; Yu et al., 2002). La capacidad de ciertos péptidos específicos del prión de actuar como sustancias quimio-atractivas para las CDs, avalan aún más el papel de este subtipo celular, como transportadores del PrPsc (Kaneider et al., 2005; Kaneider et al., 2003), incluso porqué no de manera independiente a las células M insertando sus prolongaciones citoplasmáticas entre las células epiteliales del intestino (Rescigno et al., 2001). Se ha defendido incluso el papel de las CDs como transportadores directos de PrPsc desde el intestino a las fibras nerviosas que inervan las placas de Peyer. (Defaweux et al., 2005; Hosoi et al., 1993). Así, la transferencia de priones a las terminaciones nerviosas del nervio esplénico y del nervio vago ocurriría fácilmente en la región suprafolicular, sin que las CDFs intervinieran en el proceso (Aucouturier, 2001).

Aunque las células dendríticas jugarían un papel en la propagación de los priones hacia el sistema nervioso central, no olvidemos su papel fagocítico, por lo que serían protectoras frente a la infección degradando PrPsc, (Luhr et al., 2002), de una manera similar a los macrófagos. Tras la exposición inicial al agente “infeccioso” y antes de que tenga lugar la neuro-invasión, el prión se acumula en tejidos linfoides: bazo, nódulos linfáticos, tonsilas, apéndice y placas de Peyer (Eklund, 1967; Hadlow, 1987; Hilton, 1998; Kimberlin and Walker, 1979; Sigurdson, 1999). Notables experimentos permitieron definir el tipo celular implicado en la propagación de los priones de baja densidad (Clarke and Kimberlin, 1984), de extensa vida media y mitóticamente quiescentes (Fraser and Farquhar, 1987). Las células de los folículos linfoides o células dendríticas foliculares (CDF), poseen altos niveles de expresión de PrPn. También es el caso de los macrófagos y los linfocitos, que han sido descritos como candidatos responsables de la acumulación y propagación del agente infeccioso (Beekes and McBride, 2000; Jeffrey et al., 2000; van Keulen et al., 1996). Mediante técnicas de inmuno-histoquímica y microscopía electrónica sobre secciones de tejido cerebral de varias especies afectadas por EETs, se ha observado que el agente “infeccioso” se localiza en las CDF, y en los lisosomas de los macrófagos de cuerpo tingible dentro de los centros germinales (Brown et al., 1999; McBride et al., 1992; van Keulen et al., 1996). Una de las funciones de los macrófagos dentro de los centros germinales es endocitar los inmuno-complejos atrapados en la superficie de las CDFs. Al igual que las CDFs, los macrófagos son células radioresistentes (con bajo índice mitótico), por lo que, en principio, podrían estar involucradas en la acumulación de infectividad tras una infección periférica.

Se pudo comprobar experimentalmente que la disminución de la población de macrófagos incrementaba la acumulación de PrPsc, y que se reducían significativamente los tiempos de incubación en bioensayos de ratón (Beringue et al., 2000). Este hecho sugiere, por un lado, que el papel de los macrófagos consistiría en la eliminación de los agregados de PrPsc y, por otro, que la degradación lisosómica de la PrPsc en los macrófagos debe ser un fenómeno menos eficiente que la transformación de PrPn a PrPsc (Brun, 2003). Por tanto, mientras que las CDF parecen jugar un papel fundamental en la acumulación temprana y replicación del

prión, el papel principal de los macrófagos sería impedir la acumulación del agente infeccioso eliminando los agregados de PrPsc. Las CDFs están en los folículos primarios de LB y en los centros germinales de los tejidos linfoides. A diferencia de las células dendríticas, las CDF son un linaje derivado de precursores no hematopoyéticos (Kapasi, 1993; Shortman and Liu, 2002), y no tienen funciones fagocíticas ni migratorias (Imazeki, 1992). Las CDF son capaces de atrapar y retener antígenos en su estado nativo y, debido a que son células de extensa vida media, pueden retener estos antígenos durante meses e incluso años (Mandel, 1980). Dada la asociación de las CDF y los LB se ha sugerido que las CDF jugarían un papel relevante durante la generación de respuestas de anticuerpos, y mantienen la memoria inmunológica, aunque también se han asociado a muchas otras funciones (Haberman and Shlomchik, 2003; Kosco-Vilbois, 2003). En la infección con priones, se demostró la importancia de este tipo celular en los momentos tempranos de la infección; es decir, en las fases de acumulación y replicación del agente “infeccioso”. En ausencia de CDFs, la neuroinvasión se ve retrasada y la susceptibilidad a la enfermedad reducida (Mabbott, 2000a; Mabbott, 2003; Mohan, 2005b; Montrasio, 2000). Mediante estudios *in vitro* se ha podido confirmar que las CDFs expresan altos niveles de PrPn (requisito necesario para la replicación del agente “infeccioso”) (Brown, 1999), y que la PrPsc se acumula en el citoplasma y en los espacios extracelulares de las dendritas (Jeffrey, 2000). Para mantener a las CDFs en sus diferentes estados de maduración, son imprescindibles los estímulos de las citoquinas procedentes de los LB (Mackay and Browning, 1998), entre los que la linfotoxina de membrana y el factor de necrosis tumoral (TNF  $\alpha$ ), juegan un papel fundamental. El bloqueo de ambos receptores provoca la depleción temporal de las CDFs (Mackay and Browning, 1998) y reducen la susceptibilidad a la enfermedad (Mabbott et al., 2000a; Mabbott, 2002; Mabbott, 2003; Mohan, 2005a; Montrasio, 2000), de un modo parecido a lo que ocurre en ratones carentes de LB (Klein, 1997; Mabbott, 2000b; Prinz, 2002). Demostrada la importancia de las CDFs en la patogénesis de las EETs, la siguiente cuestión es el modo en que el prión es captado por este tipo celular. Normalmente, los antígenos captados por la CDFs se encuentran en forma de inmuno-complejos antígeno-anticuerpo y/o componentes del complemento. Las CDFs reconocen los inmuno-complejos a través del receptor Fc del anticuerpo y/o a través de los receptores CRI y CR2 del complemento (Yoshida, 1993). Mientras que deficiencias en los receptores Fc no afectan a la acumulación de priones, la ausencia de componentes del complemento (Clq, C2, C3 y factor B) o la ausencia de receptores de los mismos si afectan su acumulación en el bazo (Klein, 2001; Mabbott, 2001). Además, estudios preliminares han demostrado que el Clq es capaz de unirse a una proteína prión (Prn). Existen evidencias que la proteína infecciosa por sí misma en un sistema in vivo no resulta directamente neurotóxica, necesitando de la presencia de la PrPn (los ratones PrPKO no se infectan), y además, no siempre existe una estrecha correlación entre los depósitos de PrPsc y la severidad de la enfermedad (Bueler et al., 1994; Collinge et al., 1995; Hill et al., 2000; Hsiao et al., 1990; Lasmezas et al., 1997; Mallucci et al., 2003; Medori et al., 1992). Estos datos sugieren que más que la acumulación del PrPsc, la clave de la patogénesis de las EETs reside en el proceso de conversión de PrPn a PrPsc. Así pues, cualquier estrategia terapéutica eficaz frente a las EETs debería ir dirigida a frenarlo. Finalmente, para validar una buena terapia o profilaxis resulta fundamental tener en cuenta la cepa de prión de que se trata, la especie afectada y la ruta de inoculación del agente “infeccioso”, dado que la

eficacia de ésta dependerá de estas variables. Existen líneas de investigación dirigidas a generar una terapia efectiva frente al prión. Entre las más prometedoras, nos encontramos con la utilización de: heptámeros de ARN que bloquean la PrPn y consecuente producción de PrPsc de novo (Proske et al., 2002; Rhie et al., 2003); sustancias que inhiben las cascadas de señalización intracelular en que la PrPn se ve implicada (Bate et al., 2004; Ertmer et al., 2004; Nordstrom et al., 2005; Shaked et al., 2003) y sustancias químicas que interfieren directa o indirectamente en el proceso de conversión de PrPn a PrPsc. Entre estas sustancias encontramos el rojo congo (Caughey and Race, 1992), la anfotericina B (Pocchiari et al., 1987), las antraciclinas (Tagliavini et al., 1997), los polianiones sulfatados (Caughey and Raymond, 1993), las porfirinas (Priola et al., 2000), las poliaminas (Supattapone et al., 2001), los péptidos “rompedores” de hojas P (Soto et al., 2000) y la curcumina (Caughey et al., 2003). Ninguna de estas estrategias ha resultado efectiva para ser empleada como una terapia anti-prión (Aguzzi and Sigurdson, 2004), muchas resultan prometedoras como para seguir investigando sobre ellas. Al igual que los ratones “artificialmente” privados del gen del prión (PrPKO), son resistentes a la enfermedad, existen “variantes naturales” del prión resistentes a la transformación infecciosa. Así, en ovejas y en humanos han sido descritas 2 mutaciones naturales en el gen que codifica para la proteína PrP, Q167R y Q218K, respectivamente, que confieren resistencia frente al scrapie y CJD (Goldmann et al., 1994; Shibuya et al., 1998). La expresión transgénica de estas mutaciones en ratones los hace resistentes al desafío con priones (Perrier et al., 2002).

Se está estudiando la posibilidad de seleccionar animales (ovejas y vacas) genéticamente resistentes a la enfermedad para evitar futuras epidemias. La aplicabilidad de estas mutaciones en protocolos de terapia génica se ha barajado como posible herramienta para luchar contra las enfermedades causadas por priones. Uno de los resultados más esperanzadores en este aspecto procede de experimentos de bloqueo de la PrPn y la consecuente imposibilidad de ser transformada. En 1973, Porter describió las enfermedades producidas por priones como enfermedades que cursaban sin una respuesta inmunológica humoral detectable en el huésped afectado (Porter et al., 1973), no obstante existir una reacción inflamatoria (Baker et al., 2004). Al día de hoy, se investiga si estimular el sistema inmunológico del huésped contra el prión podría ser una terapéutica o profilaxis eficaz contra estas enfermedades. De ellas, cabe destacar: la depleción de las CDFs, la estimulación del sistema inmunológico innato y la utilización de anticuerpos específicos para inhibir la progresión de la enfermedad. La linfotoxina del LT y el factor de necrosis tumoral (TNF  $\alpha$ ) generados por los LB son necesarios en la diferenciación y maduración de las CDFs (Brown et al., 1999; Mabbott et al., 2000b), y el bloqueo en cualquiera de estas citoquinas da lugar a un incremento en el tiempo de incubación de la enfermedad. Este hecho hizo pensar en la posibilidad de deplecionar temporalmente las CDFs como posible terapia en fases tempranas de una infección por priones. Con este objetivo, se administró una inmunoglobulina fusionada al receptor de la linfotoxina  $\beta$  (LT p-R-Ig), tratamiento capaz de bloquear la maduración de las CDFs inhibiendo la cascada de señalización que conduce a la expresión de estas linfotoxinas. Curiosamente, el efecto del tratamiento de ambos dependía del momento y la ruta de administración. Así, por ejemplo, si la proteína de fusión se administraba tras el desafío intra-peritoneal del scrapie (en una

fase temprana), los animales quedaban protegidos (Mabbott et al., 2000a; Mabbott et al., 2003; Montrasio et al., 2000), mientras que si el tratamiento se aplicaba antes del desafío intra-peritoneal, la protección era total para algunos animales mientras que en otros únicamente retrasaba la aparición de la enfermedad (Mabbott et al., 2003). Por otro lado, el tratamiento con LT p-R-Ig inmediato tras el desafío oral con scrapie evitaba la aparición de la enfermedad, no observándose depósitos de PrPsc en el cerebro de los animales (Mabbott et al., 2003). Sin embargo, el tratamiento administrado 14 días post desafío oral no tuvo ningún efecto en el desarrollo de la enfermedad (Mabbott et al., 2003), lo cual indicaría que la entrada del prión en el sistema neuronal ocurre rápidamente tras el desafío oral. Finalmente, el desafío a través de escarificaciones de la piel dio como resultado una mejora del tratamiento cuando éste era administrado previo al desafío (similar a la ruta intra-peritoneal) (Mohan et al., 2005a). En los humanos, las enfermedades causadas por priones tienen tiempos de incubación muy largos (desde años a décadas), una fase clínica muy breve (meses), no existe un diagnóstico preclínico y la enfermedad es de desenlace fatal. Un gran problema de las EETs, junto a todas las enfermedades neurodegenerativas, es que la posible terapia debe dirigirse necesariamente al sistema nervioso central, lo cual supone que debe ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. En las situaciones en que la infección por priones se produce periféricamente (infección oral o intra-peritoneal), la utilización de terapias y/o profilaxis podrían tener más probabilidades de éxito si se aplican en etapas tempranas de la infección, antes de que el agente “infeccioso” llegue al SNC. Así, pues, resulta necesario desarrollar herramientas profilácticas contra estas enfermedades, a pesar de que el número de afectados sea relativamente bajo (aproximadamente 160 personas han sido diagnosticadas con la nvCJD en el mundo hasta el momento), sobre todo pensando en el número de personas asintomáticas potencialmente infectadas (la infección puede durar décadas) (Trevitt and Collinge, 2006). En lo que se refiere a las otras etiologías de la enfermedad (iatrogénica, familiar y esporádica), no se justifica el desarrollo de vacunas o medidas profilácticas capaces de proteger o paliar la enfermedad a grupos de riesgo. Es muy prometedora la modulación del sistema inmunológico con el fin de conseguir estrategias terapéuticas y/o profilácticas frente a estas enfermedades. Este tipo de terapias podrían resultar de utilidad en el futuro para el tratamiento de individuos conscientes de haber sido infectados o como método preventivo para el personal con alto riesgo de ser infectados (médicos, enfermeros, etc.). Del mismo modo, sería interesante explorar las posibilidades de esta metodología para prevenir el desarrollo de encefalopatías hereditarias. La respuesta inmunológica innata actúa como una primera barrera de agresiones del exterior, bien consecuencia de un patógeno (virus, bacterias, parásitos y hongos) o bien de cualquier otra naturaleza como sería la exposición a un adyuvante o a otras sustancias inmuno-estimuladoras. Varios son los actores que intervienen en la respuesta innata, jugando un papel predominante las células dendríticas, los macrófagos y las células NK (células asesinas naturales), así como las quimiocinas y chemocinas como moduladores químicos responsables finales de la defensa (Byrne and Halliday, 2002; Foti et al., 2006; Young and Ortáldo, 2006), Rodríguez y Alonso, 2015). De entre las quimiocinas más relevantes para el sistema inmunológico innato, nos encontramos con los interferones, citoquinas que son capaces de inhibir, por ejemplo, evoluciones virales eficientemente. Sin embargo, el tratamiento con interferón o con estimuladores de

interferón en ratones infectados con scrapie no parece tener un efecto en la progresión de la enfermedad (Allen and Cochran, 1977; Field et al., 1969; Gresser et al., 1983; Gresser and Pattison, 1968; Worthington, 1972). Estos mismos resultados se reprodujeron en monos infectados con CJD, scrapie y kuru (Amyx et al., 1984). La administración de citidil-guanil oligodeoxi-nucleótidos (CpGs), concretamente de CpG 1826 es conocida por su estimulación de la respuesta innata en mamíferos (Lipford et al., 1998). En ratones infectados con *scrapie* se ha observado un leve incremento en los tiempos de incubación cuando CpG 1826 fue administrado inmediatamente tras la infección y diariamente durante 4 días. Cuando este tratamiento fue prolongado durante 3 semanas, la aparición de la sintomatología se retrasó aproximadamente 149 días (Sethi et al., 2002). Podrían generarse anticuerpos frente al prión responsables de este retraso (Sethi et al., 2002), pero, la administración repetida de CpGs da lugar a la destrucción de los folículos linfoides (lugares de amplificación del prión), y una inmunosupresión, hechos que pueden explicar el efecto protector del tratamiento. Así, hoy en día, no se utiliza CpGs por sus efectos tóxicos. Uno de los efectos del tratamiento con CpGs es la expansión masiva de macrófagos y células dendríticas. Ambos tipos celulares juegan un importante papel en la degradación o secuestro de la proteína infecciosa (Seringue et al., 2000) y, por ende, dando lugar al retraso de la enfermedad. También el adyuvante de Freund completo, magnífico estimulador del sistema inmunológico innato, es capaz de retrasar ligeramente los tiempos de incubación de la enfermedad en ratones tras el desafío intraperitoneal o intracraneal. (Tal et al., 2003). Otros, generaron anticuerpos frente a la proteína del prión utilizando distintas estrategias. Se han hecho en ratones normales y en PrPKO inmunizando con priones purificados (Bendheim et al., 1984) y con fibras asociadas a scrapie (SAFs) (Kascsak et al., 1987). También, se ha descrito la utilización de proteína recombinante del prión como una estrategia para generar anticuerpos, tanto en ratones PrPKO (Seringue et al., 2003; Khalili-Shirazi et al., 2005; Korth et al., 1997; Krasemann et al., 1996; White et al., 2003; Williamson et al., 1996) como en ratones normales (Gilch et al., 2003; Schwarz et al., 2003; Sigurdsson et al., 2002; Souan et al., 2001). El potencial terapéutico de estos anticuerpos in vitro mostró una reducción de 2 logaritmos de un inóculo infeccioso de scrapie tras la incubación con un anticuerpo policlonal anti prión (Gabizon et al., 1988). Varios autores utilizaron anticuerpos para ver su efecto en diferentes líneas celulares in vitro. Por ejemplo, el anticuerpo 6H4, que reconoce tanto la PrP bovina (residuos 144-152) como de otras especies (Korth et al., 1997), es capaz de inhibir la acumulación de PrPsc en células infectadas con scrapie (Enari et al., 2001). Otros autores describen los efectos beneficiosos de la utilización de anticuerpos frente al prión en estudios in vitro utilizando distintas cepas de prión y distintas líneas celulares, mostrando el gran potencial de esta estrategia. A pesar de lograr efectos beneficiosos in vitro, algunos modelos no han resultado ser efectivos in vivo (Trevitt and Collinge, 2006); (Aguzzi and Sigurdson, 2004). La administración del anticuerpo ICSM 18 (que reconoce el epitopo 144-152 de la PrPn humana) o del anticuerpo ICSM 35 (que reconoce el epitopo 94-105 de la PrPn humana) a elevadas dosis durante 7 días tras el desafío intra-peritoneal con scrapie, previene la aparición de la enfermedad. Sin embargo, el tratamiento no es efectivo si se inicia con la aparición de la sintomatología clínica, o bien si el desafío se realiza mediante la ruta intracraneal (White et al., 2003).

Por otro lado, la administración de los anticuerpos capaces de reconocer los epitopos 34-52 (8B4) y 175-185 (8H4) de la PrP murina tras la infección intra-peritoneal con scrapie, fueron capaces únicamente de retrasar un poco la aparición de la infección (Sigurdsson et al., 2003).

A pesar de los aparentes efectos beneficiosos de la administración pasiva de anticuerpos, se ha visto que si éstos se administran directamente a nivel del hipocampo y a una concentración elevada (1 mg/ml), provocan la apoptosis de neuronas en cerebelo e hipocampo, en 24 horas.

Este efecto se pudo conseguir únicamente tras la administración de anticuerpos monoclonales que reconocen el epitopo comprendido entre los aminoácidos 95 y 105 de la secuencia de la PrP humana, y no con otros monoclonales que reconocen otras partes de la proteína (Solfrosi et al., 2004). Este resultado indica que como consecuencia de la unión del anticuerpo a este dominio de la PrPn, se bloquea alguna vía de señalización esencial para la supervivencia neuronal.

La transferencia pasiva de anticuerpos puede ser una buena herramienta para luchar contra las enfermedades priónicas. Sin embargo, para su futura aplicabilidad en humanos será necesario realizar estudios muy exhaustivos que descarten posibles efectos deletéreos. A pesar de que a lo largo de una infección con priones no se generan anticuerpos detectables frente al prión, acabamos de comprobar que se pueden generar anticuerpos específicos de muy diversas maneras, pudiendo en algún caso ser eficientes contra la enfermedad (Aguzzi and Sigurdson, 2004). Existen una serie de puntos críticos en la generación de anticuerpos frente a la PrPn, entre ellos la tolerancia que presentan los animales frente a la PrP como inmunógeno al tratarse de un antígeno propio (Aucouturier and Camaud, 2002; Aucouturier et al., 2000; Berg, 1994; Heppner and Aguzzi, 2004; Porter et al., 1973; Williamson et al., 1996). Por otro lado, dado que la PrPn se expresa en muchos tipos celulares (Cashman et al., 1990; Manson et al., 1992) podría ser que la generación de anticuerpos frente a la PrPn desencadenara una enfermedad autoinmune. Finalmente, parece complicado que los anticuerpos específicos frente a PrPn sean capaces de atravesar la barrera hematoencefálica en concentraciones terapéuticas de manera que pueda hacer su efecto terapéutico en el sistema nervioso central. A pesar de ello, en los últimos años, diversos autores han descrito los efectos beneficiosos de la inmunización activa en ratones con proteína de prión. Sigurdsson y colab. han descrito un incremento de un 10% en el tiempo de incubación de la enfermedad en ratones inmunizados con proteína recombinante murina (residuos 23-230). Este incremento se observa únicamente cuando la inmunización se realiza dentro de las 14 semanas anteriores al desafío con scrapie adaptado al ratón. Ha sido descrita también una correlación paralela entre el título de anticuerpos y el incremento en el tiempo de incubación, mientras que no se observaron diferencias en la histopatología y en los niveles de PrPsc entre los animales tratados y los controles en las fases terminales de la enfermedad (Sigurdsson et al., 2002).

La inmunización activa con el péptido de prión comprendiendo los residuos 105-125 de la PrP murina incrementa el tiempo de incubación en ratones PrP infectados oralmente con

scrapie, mientras que esta misma inmunización con el polipéptido que comprende los residuos 90-230 no tiene ningún efecto de retraso en la enfermedad. Los anticuerpos generados tras la inmunización con el fragmento 90-230 reconocen un epítipo de la región 159-188 de la proteína priónica. Los autores proponen que mientras que éstos anticuerpos resultan ineficaces frente a la enfermedad, los anticuerpos que reconocen las regiones 105-125 y/o 144-152 de la proteína priónica son capaces de retrasarla eficazmente (Schwarz et al., 2003).

Rosset y colab. describieron en el año 2004 la inducción no únicamente de una respuesta humoral, sino también de una respuesta celular en ratones C57BL/J601aHsd mediante la utilización de péptidos de prión junto al inmunoestimulador CpG. En este estudio fueron utilizados 3 péptidos diferentes (P98-127; P143-172 y P158-187) mezclados con CpG-1826. Así, demostraron la inducción de LT secretoras de IFN- $\gamma$  e IL-4 y la producción de anticuerpos en función del péptido utilizado. De este modo quedó patente la capacidad de inducir una respuesta inmunológica tanto humoral como celular con la proteína del prión utilizando un protocolo de vacunación que rompió la tolerancia frente al prión (Rosset et al., 2004).

### **Profilaxis y tratamiento.**

Los Prsc se propagan transmitiendo proteínas mal plegadas. Cuando un prión se introduce en el cuerpo, induce a los Prn a cambiar a la conformación anómala. El Prsc actúa como una plantilla para dirigir el mal plegado. Los Prsc nuevos anómalos formados pueden entonces convertir otros Prn a conformaciones anómalas. Se genera una reacción en cadena que produce grandes cantidades de Prsc. La propagación de Prsc requiere la presencia de Prn. Los animales que no expresan priones normales no contraen la enfermedad ni la transmiten. Todos los priones anómalos conocidos inducen un pliegue amiloide, que causa que la proteína normal polimerice en un agregado de láminas  $\beta$  muy apretadas. Estos agregados amiloides son fibrillas que tienen la capacidad de crecer por sus extremos y replicarse cuando la rotura hace que 2 extremos se conviertan en cuatro. El período de incubación está determinado por la tasa de crecimiento exponencial de la replicación del prión. Una infección por prión permanece latente durante años. Sin embargo, cuando aparece un síntoma, la muerte tiene lugar en pocos meses. Esta nueva estructura alterada del prión normal es estable y comienza a acumularse, provocando un daño en gran escala al tejido y la muerte celular. El prión plegado anómalamente es resistente a la desnaturalización por agentes físicos y químicos haciendo enormemente difícil su destrucción. Hay un gran número de priones diferentes, que tienen estructuras ligeramente distintas. Durante el proceso de réplica, los priones están sujetos a mutaciones seguidas por selección natural de otras formas de replicación. La tembladera de las ovejas es un problema en gran parte del mundo y es la forma más extendida de encefalitis espongiiforme transmisible (EETs) en Europa. Por ello, el control y la erradicación de la EETs en pequeños rumiantes es una de las mayores prioridades de la Unión Europea. Aunque las proteínas priónicas plegadas de modo anómalo son características de la EETs, es posible que no sean el agente infeccioso inicial. La idea se basa en cómo los priones son absorbidos por el intestino ovino. Hay investigadores que inocularon intestinos de oveja con

extractos de cerebro que contenían Prsc, que se creía que eran la causa de la EETs. Informaron que los priones anómalos inoculados fueron detectados en poco tiempo (3,5 horas) en la pared intestinal, y no en lugares donde las proteínas priónicas generadas por la enfermedad se agregaban. Las proteínas priónicas normales que se convierten en anómalas se acumulan tras un mes desde la inoculación y aparecen en diferentes lugares donde los priones anómalos inoculados fueron absorbidos. Es más, los experimentos sugieren que en los animales normales todos los priones ingeridos se digirieron antes de que pudieran ser absorbidos en el intestino. Ello sugiere que los priones no causan la enfermedad pasando por la pared intestinal. Este descubrimiento no excluye la posibilidad de que los priones pudieran causar aún la enfermedad si se absorbe una cantidad suficiente, pero es posible que los priones sean capaces de infectar directamente las terminaciones nerviosas por algún mecanismo desconocido.

### **Esterilización de priones**

Los priones son obviamente diferentes de otros agentes infecciosos que lo son por su capacidad de provocar cambios conformacionales a los priones normales. Por tanto, la esterilización de priones requiere la desnaturalización de las proteínas a un estado en el que los priones no puedan inducir conformaciones anómalas de priones normales. Los priones son resistentes a las proteasas, al calor, a la radiación y a la formalina. Su destrucción requiere la hidrólisis o la reducción o la destrucción de la estructura terciaria. Tenga en cuenta que los priones parcialmente desnaturalizados pueden ser renaturalizados a partículas infecciosas bajo determinadas condiciones. Los priones pueden ser desactivados en un autoclave a presión a temperatura de 132° C a 21 psi durante 90 minutos. Si el material infectado de prión se encuentra en una solución de hidróxido de sodio, se puede tratar en autoclave a 121° C a 21 psi durante una hora. También puede usar un desinfectante común en una solución al 1% y dejar en remojo durante 10 horas o usar una solución al 10% durante una hora. Sin embargo, las carnes de diverso origen, la leche, los embutidos de dudosa preparación, en fin, todos aquellos alimentos que no cumplen con las normativas de los entes de regulación y control, así como, las transfusiones de sangre y todo el instrumental quirúrgico, así como todo tejido humano o animal, no debe ser suministrado sin haber sido previamente esterilizado según normas establecidas. La vacunación con ADN ha sido ensayada como estrategia contra las enfermedades causadas por priones. Así, el caso más espectacular se refiere a la protección total conseguida en ratones transgénicos bovinos tras la inmunización con una vacuna de ADN expresando la proteína bovina y una posterior infección oral con proteína infecciosa. A pesar de lo prometedor de los resultados, se desconocen absolutamente los mecanismos de protección desencadenados por la vacuna, ya que no se pudo detectar ni respuesta humoral ni celular consecuencia de la vacunación (Muller et al., 2005; Calabrese A, Alonso A.,1975).

## Bibliografia.

- Abbott, A. (2004) : Doctors seek lost data on Alzheimer's vaccine. *Nature*, 430, 715.
- Adorini, L., Moreno, J., , Fuchs, S. (1991): Exogenous peptides compete for the presentation of endogenous antigens to major histocompatibility complex class II-restricted T cells. *J Exp Med*, 174, 945-948.
- Aguzzi, A. , Sigurdson, C.J.: (2004) Antiprion immunotherapy; to suppress or to stimulate? *Nat Rev Immunol*, 4, 725-736. Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A.: (1967): Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? , *Nature*, 214, 764-766.
- Alper, T., Haig, D.A. , Clarke, M.C. : (1966): The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun*, 22, 278-284. Allen, L.B. , Cochran, K.W.: (1977) : Acceleration of scrapie in mice by target-organ treatment with interferon inducers. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 284, 676-680.
- Amyx, H., Salazar, A.M., Gajdusek, C D. : (1984) : Chemotherapeutic trials in experimental slow virus diseases. *Neurology*, 34.
- An, L.L., Rodriguez, F., Harkins, S.: (2000): Quantitative and qualitative analyses of the immune responses induced by a multivalent minigene DNA vaccine. *Vaccine*, 18, 2132-2141.
- An, L.L. , Sette, A.: (1999): The multivalent minigene approach to vaccine development. *Expert Opin Investig Drugs*, 8, 1351-1357.
- Anderson, R.M., Donnelly, C.A. : (1996): Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature*, 382, 779-788.
- Anton, L.C., Schubert, U., Yewdell, J.W. : (1999): Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen.: *J Cell Biol*, 146, 113-124.
- Anton, L.C., Yewdell, J.W., Bennink, J.R.: (1997): MHC class I-associated peptides produced from endogenous gene products with vastly different efficiencies.: *J Immunol*, 158, 2535-2542.
- Antony, P.A., Piccirillo, C.A., : (2005): CD8+ T cell immunity against a tumor/selfantigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol*, 174, 2591-2601.
- Aucouturier, P. and Camaud, C.: (2002): The immune system and prion diseases: a relationship of complicity and blindness. *J Leukoc Biol*, 72, 1075-1083.
- Aucouturier, P., Carp, R.I., Wisniewski, T.: (2000): Prion diseases and the immune system. *Clin Immunol*, 96, 79-85.
- Aucouturier, P., Geissmann, P., Damotte, D. :(2001): Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J Clin Invest*, 108, 703-708.
- Badovinac, V.P. , Harty, J.T.: (2002): CD8(+) T-cell homeostasis after infection: setting the 'curve'. *Microbes Infect*, 4, 441-447. Bainbridge, J., Walker, K.B.: (2005) : The normal cellular form of prion protein modulates T cell responses. *Immunol Lett*, 96, 147-150.

- Baker, C.A., Lu, Z.Y., Manuelidis, L.: (2004): Early induction of interferon responsive mRNAs in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurovirol*, 10, 29-40.
- Baldauf, E., Beekes, M., Diringer, H.: (1997): Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol*, 78 (F t 5), 1187-1197.
- Barry, M., Bleackley, R.C.: (2002): Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*, 2, 401-409.
- Barry, M.A., Howell, D.P., Singh, R.A. :(2004): Expression library immunization to discover and improve vaccine antigens. *Immunol Rev*, 199, 68-83.
- Bate, C., Reid, S., Williams, A.: (2004): Phospholipase A2 inhibitors or platelet activating factor antagonists prevent prion replication. *J Biol Chem*, 279, 36405-36411.
- Beekes, M., Baldauf, E.: (1996): Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *Virol*, 77 ( Ft 8), 1925-1934.
- Beekes, M., McBride, P.A.: (2000): Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett*, 278, 181-184.
- Beekes, M., McBride, P.A., Baldauf, E.: (1998): Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol*, 79 ( Ft 3), 601-607.
- Bendheim, P.E., Barry, R.A., Prusiner, S.B.: (1984): Antibodies to a scrapie prion protein. *Nature*, 310, 418-421. Berg, L J.: (1994): Insights into the role of the immune system in prion diseases. *Proc Natl Acad Sci, U S A*, 91, 429-432.
- Beringue, V., Demoy, M., : (2000): Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *J Pathol*, 190, 495-502.
- Beringue, V., Mallinson, G.:(2003) : Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. *Brain*, 126, 2065-2073.
- Beringue, V., Vilette, D.: (2004): PrPSc binding antibodies are potent inhibitors of prion replication in cell lines. *J Biol Chem*, 279, 39671-39676.
- Bemey, C., Herren, S.:(1999): A member of the dendritic cell family that enters B cell follicles and stimulates primary antibody responses identified by a mannose receptor fusion protein. *J Exp Med*, 190, 851-860.
- Blanco, E., Garcia-Briones, M., Sanz-Parra, A.: (2001): Identification of T-cell epitopes in nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 75, 3164-3174.
- Blanquet-Grossard, F.: (2005): Complement protein C1q recognizes a conformationally modified form of the prion protein. *Biochemistry*, 44, 4349-4356.
- Bolton, D.C., McKinley, M.P., Prusiner, S.B.: (1982) : Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, 218, 1309-1311.
- Bonifacino, J.S., Weissman, A.M.: (1998): Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14, 19-57.

- Bonifaz, L.C., Arzate, S. : (1999): Endogenous and exogenous forms of the same antigen are processed from different pools to bind MHC class II molecules in endocytic compartments. *Eur J Immunol*, 29, 119-131.
- Bonini, C., Lee, S.P.: (2001): Targeting antigen in mature dendritic cells for simultaneous stimulation of CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*, 166, 5250-5257.
- Borchelt, D R., Prusiner, S.B.: (1990): Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* 110, 743-752.
- Borrego, B., Fernandez-Pacheco, P.: (2006): DNA vaccines expressing B and T cell epitopes can protect mice from FMDV infection in the absence of specific humoral responses. *Vaccine*, 24, 3889-3899.
- Botija, C.:(1970): Diagnosis of African swine fever by immunofluorescence. *Bull Of Int Epizoot*, 73,1025-1044.
- Boyle, J.S., Brady, J.L., Lew, A.M.: (1998) :Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature*, 392, 408-411.
- Brown, D.R., Besinger, A.: (1998): Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J*, 334 ( Ft 2), 423-429.
- Brown, D.R., Herms, J.W. :(1997): The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*,390, 684-687.
- Brown, K.L., Bruce, M.E.: (1999): Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat Med*, 5, 1308-1312.
- Bruce, M.E., Will, R. G.: (1997): Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 389, 498-501.
- Brun, A., Castilla, J., Torres, J.M. :(2003): Involvement of the immunological system in the pathogenesis of transmissible spongiform encephalopathies. *Rev Neurol*, 37, 648-653.
- Brun, A., Castilla, J., Torres, J.M. :(2004): Proteinase K enhanced immunoreactivity of the prion protein-specific monoclonal antibody 2A11. *Neurosci Res*, 48, 75-83.
- Buch, T.,Waisman, A.: (2006): Protection from autoimmunity by DNA vaccination against T-cell receptor. *Methods Mol Med*, 127, 269-280.
- Bueler, H., Aguzzi, A.: (1993): Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, 73,1339-1347.
- Bueler, H., Raeber, A. :(1994): High prion and PrPSc levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med*, 1, 19-30.
- Byrne, S.N. , Halliday, G.M. :(2002): Dendritic cells: making progress with tumour regression? *Immunol Cell Biol*, 80, 520-530.
- Calin-Laurens, V., Forquet, F.: (1992): High efficiency of endogenous antigen presentation by MHC class II molecules. *Int Immunol*, 4,1113-1121.

- Capellari, S., Cardone, F.: (2005): Creutzfeldt-Jakob disease associated with the R208H mutation in the prion protein gene. *Neurology*, 64, 905-907.
- Capellari, S., Parchi, P. :(2000): Effect of the E200K mutation on prion protein metabolism. Comparative study of a cell model and human brain. *Am J Pathol*, 157, 613-622.
- Carp, R.I.: (1982): Transmission of scrapie by oral route: effect of gingival scarification. *Lancet*, 1, 170-171.
- Carp, R.I., Callahan, S.M.: (1981): In vitro interaction of scrapie agent and mouse peritoneal macrophages. *Intervirology*, 16, 8-13.
- Carp, R.I. , Callahan, S.M. :(1982) :Effect of mouse peritoneal macrophages on scrapie infectivity during extended in vitro incubation. *Intervirology*, 17, 201-207.
- Cashman, N.R., Loertscher, R. :(1990) Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell*, 61, 185-192.
- Castilla, J., Diaz-San Segundo, F. :(2005): Vertical transmission of bovine spongiform encephalopathy prions evaluated in a transgenic mouse model. *J Virol*, 79, 8665-8668.
- Caughey, B.: (1995): Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem Biol*, 2, 807-817.
- Caughey, B. , Race, R.E.: (1992): Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red. *J Neurochem*, 59, 768-771.
- Caughey, B., Raymond, G.J.: (1991): The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem*, 266, 18217-18223.
- Caughey, B. , Raymond, G.J.: (1993): Sulfated polyanion inhibition of scrapie associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol*, 67, 643-650.
- Caughey, B., Raymond, L.D. :(2003) : Inhibition of protease-resistant prion protein accumulation in vitro by curcumin. *J Virol*, 77, 5499-5502.
- Ciemik, I.F., Berzofsky, J.A., Carbone, D.P.: (1996): Induction of cytotoxic T lymphocytes and antitumor immunity with DNA vaccines expressing single T cell epitopes. *J Immunol*, 156, 2369-2375.
- Clarke, M.C. , Kimberlin, R.H. :(1984): Pathogenesis of mouse scrapie: distribution of agent in the pulp and stroma of infected spleens. *Vet Microbiol*, 9, 215-225.
- Cohen, F.E., Pan, K.M., Prusiner, S.B.:(1994): Structural clues to prion replication. *Science*, 264, 530-531.
- Cohen, F., Prusiner, S.B. :(1998): Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem*, 67, 793-819.
- Cohen, J. :(2005): Can we selectively shut off immune responses? *Science*, 309, 97.
- Collen, T., Pullen, L. : (1989): T cell-dependent induction of antibody against foot-and-mouth disease virus in a mouse model. *J Gen Virol*, 70 ( Ft 2), 395-403.

- Collinge, J.: (2001): Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*, 24, 519-550.
- Collinge, J.: (1991): Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 337, 1441-1442.
- Collinge, J.: (1995): Transmission of fatal familial insomnia to laboratory animals. *Lancet*, 346, 569-570.
- Collinge, J.: (1994): Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, 370, 295-297.
- Creutzfeldt, H.G. :(1920): Über eine eigenartige herdformige Erkrankung des Zentralnervensystems. Vorläufige Mitteilung. *Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 57, 1-18.
- Cuille, J. , Chelle, P.L.: (1936): La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *C R Acad Sci*, 203, 1552-1554.
- Check, E. : (2002): Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug. *Nature*, 415, 462.
- Chen, S.G., Gambetti, P. :(2002): A journey through the species barrier. *Neuron*, 34, 854-856.
- Chesebro, B. : (2002): Grand ideas floating freely. Conference on the new prion biology: basic science, diagnosis and therapy. *EMBO Rep*, 3, 1123-1126.
- Chesebro, B., Keith, J.M.: (1985): Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*, 315, 331-333.
- Davis, B.S., Chang, G.J. , Bunning, M.L.: (2001): West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Virol*, 75, 4040-4047.
- Davis, H.L. , Whalen, R.G.: (1995): DNA-based immunization. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser*, 5, 368-387.
- De Marco, P (2003) :DNA vaccines against HPV-16 E7-expressing tumour cells. *Anticancer Res*, 23,1449-1454.
- Dealler, S. :(1997): The key must fit: macrophages transport prion infection to the central nervous system and may determine the sites of infection within it. *Med Hypotheses*, 49, 213-220.
- Defaweux, V. (2005): Interfaces between dendritic cells, other immune cells, and nerve fibres in mouse Peyer's patches: potential sites for neuroinvasion in prion diseases. *Microsc Res Tech*, 66, 1-9.
- Del Val, M. , : (1991): Protection against lethal cytomegalovirus infection by a recombinant vaccine containing a single nonameric T-cell epitope. *J Virol*, 65, 3641-3646.
- Deliyannis, G.: (2000): A fusion DNA vaccine that targets antigen-presenting cells increases protection from viral challenge. *Proc Natl Acad Sci US A* , 97, 6676-6680.

- Deng, X., Cai, M.: (2003): Mechanism of priming cytotoxic T cell response and strategy for enhancing DNA vaccine potency in DNA immunization. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, 20, 175-179.
- Denzer, K.: (2000): Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J C Sci*, 113 Ft 19, 3365-3374.
- Dickinson, A.G. :(1976): Scrapie in sheep and goats. *Front Biol*, 44, 209-241.
- Djilali-Saiah, I.:(2002): DNA vaccination breaks tolerance for a neo-self antigen in liver: a transgenic murine model of autoimmune hepatitis. *J Immunol*, 169, 4889-4896.
- Doh-ura, K., Sakaki, Y.: (1989): Pro-leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Straussler syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*, 163, 974-979.
- Donnelly, J.J., Liu, M.A. , Ulmer, J.B.: (2000): Antigen presentation and DNA vaccines. *Am J Respir Crit Care Med*, 162, S 190-193.
- Donofrio, G.: (2005): Paracrine inhibition of prion propagation by anti-PrP single-chain Fv miniantibodies. *J Virol*, 79, 8330-8338.
- Eklund, C., Hadlow, W.: (1967): Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse. *J Infect Dis*, 117, 15-22.
- Ellgaard, L.:(1999): Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*, 286, 1882-1888.
- Enari, M.: (2001): Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 9295-9299.
- Endo, T., Prusiner, S.B.:(1989): Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry*, 28, 8380-8388.
- Ertmer, A., Gilch, S. :(2004): The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrP<sup>Sc</sup> in prion-infected cells. *J Biol Chem*, 279, 41918-41927.
- Février, B.: (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 9683-9688.
- Field, E.J., Joyce, G.: (1969): Failure of interferon to modify scrapie in the mouse. *J Gen Virol*, 5, 149-150.
- Fischer, M.: (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *Embo J*, 15, 1255-1264.
- Foster, J.D.: (2001) Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J Gen Virol*, 82, 2319-2326.
- Foti, M.: (2006) :Dendritic cells in pathogen recognition and induction of immune responses: a functional genomics approach. *J Leukoc Biol*, 79, 913-916.
- Fraser, H. : (1970): Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen. *Nature*, 226, 462-463.
- Fraser, H. : (1987) Ionising radiation has no influence on scrapie incubation period in mice. *Vet Microbiol*, 13, 211-223.

- Frauenfelder, H.: (1991) The energy landscapes and motions of proteins. *Science*, 254, 1598-1603.
- Fujii, S., Senju, S.: (1998) The CLIP-substituted invariant chain efficiently targets an antigenic peptide to HLA class II pathway in L cells. *Hum Immunol*, 59, 607-614.
- Fuller, D.H.: (2006): Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases. *Methods*, 40, 86-97.
- Gabizon, R., Prusiner, S.B.: (1988): Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 6617-6621.
- Gabizon, R., Prusiner, S.B.: (1990): Prion liposomes. *Biochem J*, 266, 1-14.
- Gajdusek, D.C. : (1957) : Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med*, 257, 974-978.
- Galloway, D.R., Baillie, L.: (2004): DNA vaccines against anthrax. *Expert Opin Biol Ther*, 4, 1661-1667.
- Ganges, L., : (2005): A DNA vaccine expressing the E2 protein of classical swine fever virus elicits T cell responses that can prime for rapid antibody production and confer total protection upon viral challenge. *Vaccine*, 23, 3741-3752.
- Gerstmann, J. : (1928): Über ein noch nicht beschriebenes Reflex phänomen bei einer Erkrankung des Zerebellaren Systems. *Wien Medizin Wochenschr*, 78, 906-908.
- Gerstmann, J., Straussler, E.: (1936): Über eine eigenartige hereditär familiäre Erkrankung des Zentralnervens systems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Altems. *Z Neurol*, 154, 736-762.
- Gilch, S.: (2003): Polyclonal anti-PrP auto-antibodies induced with dimeric PrP interfere efficiently with PrPSc propagation in prion infected cells. *J Biol Chem*, 278, 18524-18531.
- Glatzel, M., Aguzzi, A. :(2003): Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*, 349, 1812-1820.
- Goldfarb, E.G., Rubenstein, R. : (1991a): Creutzfeldt-Jacob disease associated with the PRNP codon 200Lys mutation: an analysis of 45 families. *Eur J Epidemiol*, 7, 477-486.
- Goldfarb, L.G., Gajdusek, D.C.: (1991b): New mutation in scrapie amyloid precursor gene (at codon 178) in Finnish Creutzfeldt-Jakob kindred. *Lancet*, 337, 425.
- Goldfarb, L.G., Pendelbury, W.W.: (1992): Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science*, 258, 806-808.
- Goldfarb, E.G., Feinstone, S.M.: (1989): Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler-Scheinker's syndrome. *Exp Neurol*, 106, 204-206.

- Goldmarm, W.: (1994): PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J Gen Virol*, 75 ( Ft 5), 989-995.
- Goni, F., Rubenstein, R., Wisniewski, T.: (2005): Mucosal vaccination delays or prevents prion infection via an oral route. *Neuroscience*, 133, 413-421.
- Gould, S.J., Booth, A.M. : (2003): The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* ,100,10592-10597.
- Grégoire, S.,Aucouturier, P.: (2004): Identification of two immunogenic domains of the prion protein-PrPn which activate class II-restricted T cells and elicit antibody responses against the native molecule. *J Leukoc Biol*, 76, 125-134.
- Gresser, L, Maury, C. : (1983): Failure to modify scrapie in mice by administration of interferon or anti-interferon globulin. *J Gen Virol*, 64 (Ft 6), 1387-1389.
- Gresser, I. : (1968): An attempt to modify scrapie in mice by the administration of interferon. *J Gen Virol*, 3, 295-297.
- Griffith, J.S.: (1967): Self-replication and scrapie. *Nature*, 215, 1043-1044.
- Haberman, A.M. : (2003): Reassessing the function of immunecomplex retention by follicular dendritic cells. *Nat Rev Immunol*, 3, 757-764.
- Hadlow, W.J.: (1987): Temporal distribution of transmissible mink encephalopathy virus in mink inoculated subcutaneously. *J Virol*, 61, 3235-3240.
- Haik, S., Hauw, J.J.: (2003): The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Nat Med*, 9, 1121-1123.
- Hammerberg, C. : (1986): Characterization of monoclonal antibodies directed against swine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol*, 11, 107-121.
- Haraguchi, T.: (1989): Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys*, 274, 1-13.
- Harris, D.A. :(1999a): Cell biological studies of the prion protein. *Curr Issues Mol Biol*, 1, 65-75.
- Harris, D.A.: (1999b): Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev*, 12, 429-444.
- Hartl, A., Thalhamer, J.: (2003): Strategies for the development of safe and effective DNA vaccines for allergy treatment. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M*, 279-298; discussion 299.
- Heggebo, R.: (2003): Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *J. Gen Virol*, 84, 1327-1338.
- Heikenwalder, M., Aguzzi, A.: (2004): Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med*, 10, 187-192.
- Heppner,F.,Aguzzi, A.:(2004):Recent developments in prion immunotherapy.*Curr Opin Immunol*, 16, 594-598.
- Heppner, F.L., Aguzzi, A.: (2001a): Transepithelial prion transport by M cells. *Nat Med*, 7, 976-977

- Heppner, F.L., Aguzzi, A.: (2001b): Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science*, 294, 178-182.
- Herms, J.:(1999): Evidence of presynaptic location and function of the prion protein *J Neurosci*, 19,8866-75 .
- Hilton, D.A.: (2006): Pathogenesis and prevalence of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Pathol*,208,134-141.
- Hilton, D.A.: (1998): Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 352, 703-704.
- Hill, A.F.: (2000): Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91 , 10248-10253.
- Hosoi, J.: (1993): Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature*, 363, 159-163.
- Hsiao, K., Prusiner, S.B.: (1989): Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature*, 338, 342-345.
- Hsiao, K.K., Prusiner, S.B.:(1990): Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science*, 250, 1587-1590.
- Huang, F.P.: (2002): Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J Gen Virol*, 83, 267-271.
- Huang, Z., Prusiner, S.B.: (1996): Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Fold Des*, 1, 13-19.
- Hung, C.F.: (2003): Improving DNA vaccine potency via modification of professional antigen presenting cells. *Curr Opin Mol Ther*, 5, 20-24.
- Hurtley, S.M. : (1989): Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol*, 5, 277-307.
- Hutter, G.: (2003): No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo. *Biol Chem*, 384,1279-85
- Khalili-Shirazi, A., : (2005): Protein conformantly influences immune responses to prion protein. *J Immunol*, 174,3256-3263.
- Imazeki, N.: (1992): Is the follicular dendritic cell a primarily stationary cell? *Immunology*, 76, 508-510.
- Ingram, D.K. :(2001): Vaccine development for Alzheimer's disease: a shot of good news. *Trends Neurosci*, 24, 305-307.
- Inoue, H., : (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96, 23-28.
- Ivanova, L., : (2001): Mutant prion proteins are partially retained in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 276, 42409-42421.
- Jakob, A. :(1921a): Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnerven systems mit bemerkten swertem anatomischem Befunde (spastische Pseudosklerose-

- Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). Vorläufige Mitteilung. *Deut Z Nervenheilk*, 70, 132-146.
- Jakob, A. :(1921b): Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunden (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 64, 147-228.
- Jakob, A. :(1921c): Über eine der multiplen Sklerose klinisch nahestehende Erkrankung des Zentralnervensystems (spastische Pseudosklerose) mit bemerkenswerten anatomischen Befunden. Mitteilung eines vierten Falles. *Med Klin*, 13, 372-376.
- Janus, C.: (2000): Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1502, 63-75.
- Jeffrey, M.: (2002): Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapie cases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland. *J Comp Pathol*, 127, 264-273.
- Jeffrey, M.:(1995): Pathology of the transmissible spongiform encephalopathies with special emphasis on ultrastructure. *Micron*, 26, 277-298.
- Jeffrey, M.: (1998): Determination of the frequency and distribution of vascular and parenchymal amyloid with polyclonal and N-terminal-specific PrP antibodies in scrapie-affected sheep and mice. *Vet Rec*, 142, 534-537.
- Jeffrey, M.: (2000): Sites of prion protein accumulation in scrapie-infected mouse spleen revealed by immunoelectron microscopy. *J Pathol*, 191, 323-332.
- Ji, H., Wang, T.L.: (1999): Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors. *Hum Gene Ther*, 10, 2727-2740.
- Jiao, J.G.: (2006): A plasmid DNA vaccine encoding the extracellular domain of porcine endoglin induces anti-tumour immune response against self-endoglin-related angiogenesis in two liver cancer models. *Dig Liver Dis*, 38, 578-587.
- Jin, T., Gu, Y.:(2000): The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome. *J Biol Chem*, 275, 38699-38704.
- Jobling, M.F.: (2001): Copper and zinc binding modulates the aggregation and neurotoxic properties of the prion peptide PrP 106-126. *Biochemistry*, 40, 8073-8084.
- Kaneider, N.C.: (2005): Neurokinin-1 receptor interacts with PrP(106-126)-induced dendritic cell migration and maturation. *J Neuroimmunol*, 158, 153-158.
- Kaneider, N.C.: (2003): Sphingosine kinase-dependent migration of immature dendritic cells in response to neurotoxic prion protein fragment. *J Virol*, 11, 5535-5539.
- Kapasi, Z.F.:(1993): Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice. Influence of B and T cells. *J Immunol*, 150, 2648-2658.

- Kascsak, R.J.: (1987): Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J Virol*, 61, 3688-3693.
- Kimberlin, R.H.: (1987): Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J Virol*, 68 ( Pt 7), 1875-1881.
- Kimberlin, R.H.: (1979): Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain. *J Comp Pathol*, 89, 551-562.
- Kimberlin, R.H.: (1989): The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J Gen Virol*, 70 ( Pt 8), 2017-2025.
- Kitamoto, T. : (1991): Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol*, 65, 6292-6295.
- Klavinskis, L.S.: (1990): Vaccination and protection from a lethal viral infection: identification, incorporation, and use of a cytotoxic T lymphocyte glycoprotein epitope. *Virology*, 178, 393-400.
- Klein, M.A., Aguzzi, A.: (1997): A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature*, 390, 687-690.
- Klein, M.A., Aguzzi, A.: (2001): Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat Med*, 1, 488-492.
- Kooyman, D.L.:(1998): Glycosyl phosphatidylinositol anchor. *Exp Nephrol*, 6, 148-151.
- Korth, C.: (1997): Prion (PrPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*, 390, 74-77.
- Kosco-Vilbois, M. :(2003): Are follicular dendritic cells really good for nothing? *Nat Rev Immunol*, 3,764-769.
- Krasemann, S.: (1996): Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrPO/0mice. *Mol Med*, 2, 725-734.
- Lasmezas, C.I.: (2003): Putative functions of PrP(C). *Br Med Bull*, 66, 61-70.
- Lasmezas, C.I.: (1997): Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*, 275,402-405.
- Leachman, S.A.: (2002): Ubiquitin-fused and/or multiple early genes from cotton tail rabbit papillomavirus as DNA vaccines. *J Virol*, 76, 7616-7624.
- Lee, H.S., Gajdusek, D.C.: (2001): Increased susceptibility to Kuru of carriers of the PRNP 129 methionine/methionine genotype. *J Infect Dis*, 183, 192-196.
- Legname, G., Prusiner, S.B.: (2004): Synthetic mammalian prions. *Science*, 305, 673-676.
- Lehmann, S. :(2002): Metal ions and prion diseases. *Curr Opin Chem Biol*, 6, 187-192.
- Leifert, J.A.: (2004): Targeting plasmid-encoded proteins to the antigen presentation pathways. *Immunol Rev*, 199, 40-53.
- Leitner, W.W.: (2003): Alphavirus-based DNA vaccine breaks immunological tolerance by activating innate antiviral pathways. *Nat Med*, 9, 33-39.

- Lemaire-Vieille, C.: (2000): Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under the control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci US A*, 97, 5422-5427.
- Li, R., Liu, D.: (2001): The expression and potential function of cellular prion protein in human lymphocytes. *Cell Immunol*, 207, 49-58.
- Liberski, P.P., Gajdusek, D.C.: (1998): A case of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with a Gerstmann-Straussler-Scheinker phenotype but no alterations in the PRNP gene. *Acta Neuropathol (Berl)*, 96, 425-430.
- Lin, K.Y.: (1996): Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res*, 56, 21-26.
- Lipford, G.B.: (1998): Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol*, 6, 496-500.
- Lode, H.N.: (2004): DNA minigene vaccination for adjuvant neuroblastoma therapy. *Ann N Y Acad Sci*, 1028, 113-121.
- Lugaresi, E.: (1986): Familial insomnia with a malignant course: a new thalamic disease. *Rev Neurol (Paris)*, 142, 791-792.
- Luhr, K.M.: (2004): Scrapie protein degradation by cysteine proteases in CD11c+ dendritic cells and GT1-1 neuronal cells. *J Virol*, 78, 4776-4782.
- Luhr, K.M.: (2002): Processing and degradation of exogenous prion protein by CD11c(+) myeloid dendritic cells in vitro. *J Virol*, 76, 12259-12264.
- Mabbott, N.A.: (2001): Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nat Med*, 1, 485-487.
- Mabbott, N.A.: (2000a): Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat Med*, 6, 719-720.
- Mabbott, N.A.: (2006): Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol*, 4, 201-211.
- Mabbott, N.A.: (2002): Temporary blockade of the tumor necrosis factor receptor signaling pathway impedes the spread of scrapie to the brain. *J Virol*, 76, 5131-5139.
- Mabbott, N.A.: (2000b): Tumor necrosis factor alpha-deficient, but not interleukin-6-deficient, mice resist peripheral infection with scrapie. *J Virol*, 74, 3338-3344.
- Mabbott, N.A.: (2003): Follicular dendritic cell dedifferentiation by treatment with an inhibitor of the lymphotoxin pathway dramatically reduces scrapie susceptibility. *J Virol*, 11, 6845-6854.
- Ponti, W., Poli, G.: (2005): Decrease in pathology and progression of scrapie after immunisation with synthetic prion protein peptides in hamsters. *Vaccine*, 23, 2862-2868.
- Maignien, T.: (1999): Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *Virology*, 80 (Pt 11), 3035-3042.

- Maignien, T.: (2005): Role of gut macrophages in mice orally contaminated with scrapie or BSE. *Int J Pharm*, 298, 293-304.
- Malcherek, G.:(1998): MHC class II-associated invariant chain peptide replacement by T cell epitopes: engineered invariant chain as a vehicle for directed and enhanced MHC class II antigen processing and presentation. *Eur J Immunol*, 28, 1524-1533.
- Mallucci, G.:(2003): Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science*, 302, 871-874.
- Mandel, T.E.: (1980): The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol Rev*, 53, 29-59.
- Manson, J.: (1992): The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development*, 115, 117-122.
- Manson, J.C.:(1994): Mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol*, 8, 121-127.
- Masel, J. :(2001): The measured level of prion infectivity varies in a predictable way according to the aggregation state of the infectious agent. *Biochim Biophys Acta*, 1535, 164-173.
- Masel, J.:(1999): Quantifying the kinetic parameters of prion replication. *Biophys Chem*, 11, 139-152.
- Mastrianni, J.A.,Prusiner, S.B. : (1995): Prion disease (PrP-A117V) presenting with ataxia instead of dementia. *Neurology*, 45, 2042-2050.
- Mattei, V.: (2004): Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. *FEBS Lett*, 560, 14-18.
- Maxam, A.M. : (1977): A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74, 560-564.
- McBride, P.A. : (1999): Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie. *Neurosci Lett*, 265, 135-138.
- McBride, P.A.: (1992): PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice. *J Pathol*, 168, 413-418.
- McBride, P.A.: (2001): Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol*, 75, 9320-9327.
- McBride, S.M. :(2005): Prion protein: a pattern recognition receptor for viral components and uric acid responsible for the induction of innate and adaptive immunity. *Med Hypotheses*, 65, 570-577.
- Mead, S.: (2003): Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. *Science*, 300, 640-643.
- Medawar, P.B.: (1953): Biological problems of skin surgery. *J Int Chir*, 13, 385-391;

- Medori, R.: (1992): Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med*, 326, 444-449.
- Meier, P., Aguzzi, A.: (2003): Soluble dimeric prion protein binds PrP(Sc) in vivo and antagonizes prion disease. *Cell*, 113, 49-60.
- Meyer-Luehmann, M.: (2006): Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science*, 313, 1781-1784.
- Meyer, R.K., Prusiner, S.B.: (1986): Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 2310-2314.
- Mishra, R.S., Singh, N.: (2004): Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine. *J Neurosci*, 24, 11280-11290.
- Mohan, J.: (2005a): Follicular dendritic cell dedifferentiation reduces scrapie susceptibility following inoculation via the skin. *Immunology*, 114, 225-234.
- Mohan, J.: (2005b): Neuroinvasion by scrapie following inoculation via the skin is independent of migratory Langerhans cells. *J Virol*, 79, 1888-1897.
- Mohan, J.: (2005c): Skin-derived dendritic cells acquire and degrade the scrapie agent following in vitro exposure. *Immunology*, 116, 122-133.
- Montrasio, F., Aguzzi, A.: (2000): Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science*, 288, 1257-1259.
- Moore, M.W.: (1988): Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell*, 54, 777-785.
- Moreno, J.: (1991): Processing of an endogenous protein can generate MHC class II restricted T cell determinants distinct from those derived from exogenous antigen. *J Immunol*, 147, 3306-3313.
- Morgan, D., Arendash, G.W.: (2000): A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*, 408, 982-985.
- Muller, S.: (2005): Testing the possibility to protect bovine PrPC transgenic Swiss mice against bovine PrPSc infection by DNA vaccination using recombinant plasmid vectors harboring and expressing the complete or partial cDNA sequences of bovine PrPC. *Virus Genes*, 30, 279-296.
- Nagata, T.: (2002): Induction of protective immunity to *Listeria monocytogenes* by immunization with plasmid DNA expressing a helper T-cell epitope that replaces the class II-associated invariant chain peptide of the invariant chain. *Infect Immun*, 70, 2676-2680.
- Nagata, T.: (2004): Cytotoxic T lymphocyte and helper T-lymphocyte oriented DNA vaccination. *DNA Cell Biol*, 23, 93-106.
- Nagata, T.: (2001): Immunization with plasmid DNA encoding MHC class II binding peptide/CLIPreplaced invariant chain induces specific helper T cells in vivo: the assessment of li p31 and p41 isoforms as vehicles for immunization. *Vaccine*, 20, 105-114.

- Negro, A.: (2001): The metabolism and imaging in live cells of the bovine prion protein in its native form or carrying single amino acid substitutions. *Mol Cell Neurosci*, 17, 521-538.
- Neutra, M R.:(1996): Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*, 86, 345-348.
- Nguyen, D.G.:(2003): Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem*, 278, 52347-52354.
- Nicoll, J.A.:(2003): Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med*, 9, 448-452.
- Nikles, D., Aguzzi, A.: (2005): Circumventing tolerance to the prion protein (PrP): vaccination with PrP-displaying retrovirus particles induces humoral immune responses against the native form of cellular PrP. *J Virol*, 79, 4033-4042.
- Nordstrom, E.K.: (2005): Inhibitors of the mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 signaling pathway clear prioninfected cells from PrPSc. *J Neurosci*, 25, 8451-8456.
- Orme, I.M. :(2006): Preclinical testing of new vaccines for tuberculosis: a comprehensive review. *Vaccine*, 24, 2-19.
- Oxenius, A.:(2007): Functional in vivo MHC class II loading by endogenously synthesized glycoprotein during viral infection. *J Immunol*, 158, 5717-5726.
- Paillet, R.: (2006): Vaccination against equine influenza: quid novi? *Vaccine*, 24, 4047-4061.
- Palmer, M.S.: (1991): Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature*, 352,340-342.
- Pan, K.M.: (1993): Conversion of alphahelices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* , 90, 10962-10966.
- Pardoll, D. :(2003): Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol*, 21, 807-839.
- Parra-Lopez, C.A.: (1997): Presentation on class II MHC molecules of endogenous lysozyme targeted to the endocytic pathway. *J Immunol*, 158, 2670-2679.
- Peretz, D., Prusiner, S.B.: (2001): Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature*, 412, 739-743.
- Perrier, V., Prusiner, S.B. : (2002): Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* , 99, 13079-13084.
- Perrier, V.: (2004): Anti-PrP antibodies block PrPSc replication in prion infected cell cultures by accelerating PrPC degradation. *J Neurochem*, 89, 454-463.
- Pescovitz, M.: (1985): Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies: distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cells. *J Immunol*, 134, 37-44.
- Petersen, R.B.: (1996): Effect of the D178N mutation and the codon 129 polymorphism on the metabolism of the prion protein. *J Biol Chem*, 271, 12661-12668.

- Pisetsky, D.S. :(1996): Immune activation by bacterial DNA: a new genetic code. *Immunity*, 5, 303-310.
- Pocchiari, M.: (1987): Amphotericin B delays the incubation period of scrapie in intracerebrally inoculated hamsters. *J Gen Virol*, 68 ( F t 1), 219-223.
- Polymenidou, M., Aguzzi, A.: (2004): Humoral immune response to native eukaryotic prion protein correlates with anti-prion protection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 Suppl 2, 14670-14676.
- Porter, D.D.: (1973): Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. *J Immunol*, 111, 1407-1410.
- Prinz, M.: (2003a): Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature*, 425, 957-962.
- Prinz, M., Aguzzi, A.: (2003b): Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. *Am J Pathol*, 162,1103-1111.
- Prinz, M., Aguzzi, A.: (2002): Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* , 99, 919-924.
- Priola, S.A.: (2000): Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science*, 287, 1503-1506.
- Proske, D.:(2002): Prion-protein-specific aptamer reduces PrPSc formation. *Chembiochem*,3,717-725.
- Prud'homme, G.J. :(2005): DNA vaccination against tumors. *J Gene Med*, 7, 3-17.
- Prusiner, S.B. :(1982) :Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*,216, 136-144.
- Prusiner, S.B.: (1991): Molecular biology of prion diseases. *Science*, 252, 1515-1522.
- Prusiner, S.B. :(1993): Genetic and infectious prion diseases. *Arch Neurol*, 50, 1129-1153.
- Prusiner, S.B. :(1997): Prion diseases and the BSE crisis. *Science*, 278, 245-251.
- Prusiner, S.B. :(2001): Shattuck lecture-neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med*,44, 1516-1526.
- Prusiner, S.B.: (1983): Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*, 35, 349-358.
- Prusiner, S.B.: (1990): Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, 63, 673-686.
- Prusiner, S.B.: (1998): Prion protein biology. *Cell*, 93, 337-348.
- Prusiner, S.B., Millhauser, G.L.: (2003): Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein. *Biochemistry*, 42, 6794-6803.
- Rapoport, T.A. :(1992): Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science*, 258, 931-936.
- Rescigno, M.: (2001): Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*, 2, 361-367.

- Rhie, A.: (2003): Characterization of 2'-fluoro-RNA aptamers that bind preferentially to disease-associated conformations of prion protein and inhibit conversion. *J Biol Chem*, 278, 39697-39705.
- Riek, R.:(1998): Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 11667-11672.
- Rock, K.L. : (1996): Analysis of the role of MHC class II presentation in the stimulation of cytotoxic T lymphocytes by antigens targeted into the exogenous antigen-MHC class I presentation pathway. *J Immunol*, 156, 3721-3726.
- Rodriguez, F.: (1998): DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination. *J Virol*, 72, 5174-5181.
- Rodriguez, F.: (2001): CD4(+) T cells induced by a DNA vaccine: immunological consequences of epitope-specific lysosomal targeting. *J Virol*, 75, 10421-10430.
- Rodriguez, F.: (2002): Immunodominance in virus-induced CD8(+) T-cell responses is dramatically modified by DNA immunization and is regulated by gamma interferon. *J Virol*, 76, 4251-4259.
- Rodriguez, F. : (2000): Enhancing DNA immunization. *Virology*, 268, 233-238.
- Rodriguez, F.: (1997): DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *J Virol*, 71, 8497-8503.
- Rosset, M.B., Aucouturier, P.:(2004): Breaking immune tolerance to the prion protein using prion protein peptides plus oligodeoxynucleotide-CpG in mice. *J Immunol*, 172, 5168-5174.
- Rowell, J.F.: (1995): Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells. *J Immunol*, 155, 1818-1828.
- Sambrook, J.: (1989): *Molecular cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanderson, S.: (1995): Expression of endogenous peptide major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 7217-7221.
- Sato, Y.: (1996): Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science*, 273, 352-354.
- Schwarz, A.:(2003): Immunisation with a synthetic prion protein-derived peptide prolongs survival times of mice orally exposed to the scrapie agent. *Neurosci Lett*, 350, 187-189.
- Sethi, S.: (2002): Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. *Lancet*, 360, 229-230.
- Shaked, G.M.: (2003): Dimethyl sulfoxide delays PrPsc accumulation and disease symptoms in prion infected hamsters. *Brain Res*, 983, 137-143.

- Shedlock, D.J. : (2000): DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol*, 68, 793-806.
- Shi, X.J.: (2007): Immune enhancing effects of recombinant bovine IE-18 on foot-and-mouth disease vaccination in mice model. *Vaccine*, 25, 1257-1264.
- Shibuya, S.: (1998): Protective prion protein polymorphisms against sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 351,419.
- Shortman, K. : (2002): Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*, 2, 151-161.
- Sigurdson, C.J.: (2001): PrP (CWD) in the myenteric plexus, vago sympathetic trunk and endocrine glands of deer with chronic wasting disease. *Virology*, 82, 2327-2334.
- Sigurdson, C.J.: (1999): Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrPres in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*). *J Gen Virol*, 80 ( Pt 10), 2757-2764.
- Sigurdsson, B.: (1953): Transmission experiments with maedi. *J Infect Dis*, 93, 166-175.
- Sigurdsson, E.M.: (2002): Immunization delays the onset of prion disease in mice. *Am J Pathol*, 161, 13-17.
- Sigurdsson, E.M.: (2003): Anti-prion antibodies for prophylaxis following prion exposure in mice. *Neurosci Lett*, 336, 185-187.
- Singh, N.: (1997): Prion protein aggregation reverted by low temperature in transfected cells carrying a prion protein gene mutation. *J Biol Chem*, 272, 28461-28470.
- Sotlforosi, L.: (2004): Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science*, 303, 1514-1516.
- Soto, C.: (2005): Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding. *FEBS Lett*, 579, 638-642.
- Soto, C.: (2000): Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides. *Lancet*, 355, 192-197.
- Souan, L.: (2001): Modulation of proteinase-K resistant prion protein by prion peptide immunization. *Eur J Immunol*, 31, 2338-2346.
- Sparrer, H.E.: (2000): Evidence for the prion hypothesis; induction of the yeast [PSI<sup>+</sup>] factor by in vitro-converted Sup35 protein. *Science*, 289, 595-599.
- Stahl, N., Prusiner, S.B.: (1987): Scrapie prion protein contains a phosphatidyl inositol glycolipid. *Cell*, 51, 229-240.



ANCBA 2023