FISIOPATOLOGIA ENDOCRINA:

Bioquímica y Métodos Diagnósticos

Directores:
M.A. Pisarev *(CNEA, UBA, CONICET)*
y ***R.S. Calandra*** *(UNLP, CONICET)*

Coordinadores:
M.O. Suescun *(UNLP, CONICET)*
y ***G. J. Juvenal*** *(CNEA, CONICET)*

Los conceptos que se expresan en esta publicación son exclusiva responsabilidad de su autor y no involucran necesariamente el pensamiento del editor.

SEPARATA MONTPELLIER
Publicada por Química Montpellier S.A.
Virrey Liniers 673 - Buenos Aires
Director: Dr. Héctor Ascierto

Introducción

Con este segundo fascículo continúa la publicación de una serie que intenta abarcar los conceptos más actualizados acerca de la Fisiopatología Endocrinológica, en sus aspectos bioquímicos y diagnósticos. Esta Especialidad ha realizado avances notables, en función de los nuevos conocimientos que incluyen entre otros, la Bioquímica, la Biología Celular y Molecular y los Métodos Diagnósticos no invasivos.

Esta serie de fascículos está basada en la Maestría del mismo nombre que se dicta a nivel de postgrado. El creciente y constante interés y apoyo de numerosos colegas nos ha impulsado a emprender esta tarea, que no sería posible sin la invalorable colaboración de los numerosos co-autores, que son al mismo tiempo docentes de la Maestría.

Para la concreción de este esfuerzo ha sido de fundamental importancia el entusiasta apoyo que nos brindaron las autoridades de Química Montpellier S.A., sin cuya participación esta Obra no se habría concretado.

A todos ellos nuestro más sincero y profundo agradecimiento.

El presente trabajo no tendría sentido si no contáramos con la cálida recepción de nuestros colegas de las diferentes profesiones y estudiantes avanzados vinculados a la Endocrinología. Es a ellos a quienes está dedicada la misma.

Contenido de la Obra:

- *Principios del Metabolismo Celular.*
- *Principios de Bioquímica y Genética Molecular en Eucariotes. Modelos Transgénicos.*
- *Bases de la Genética en Endocrinología. Genoma.*
- *Bases de la Inmunología en Endocrinología. Interacciones Inmuno-Endócrinas.*
- *Introducción a la Endocrinología. Estructura y Función de las Hormonas. Secreción, Producción, Cinética y Transporte Hormonal. Cronobiología en Endocrinología.*
- *Hormonas. Mecanismos de acción hormonal. Evaluación de un sistema hormona-receptor.*
- *Exploración de la Función endócrina. Tipos de Ensayos. Control de Calidad. Tests Funcionales. Radioisótopos. Valores normales y Pruebas Funcionales.*
- *Hormonas Digestivas. Fisiopatología y Diagnóstico.*
- *Bases Moleculares de la Tumorigénesis. Oncogenes. Factores de Crecimiento.*
- *Neuroendocrinología. Bases Fisiológicas. Fisiopatología y su Diagnóstico.*
- *Corteza Suprarrenal. Bases Fisiológicas. Fisiopatología y su Diagnóstico.*
- *Metabolismo Hidrosalino. Hormonas: Hipotálamicas, Adrenal y Cardiovasculares. Fisiopatología y su Diagnóstico.*
- *Médula suprarrenal. Bases Fisiológicas. Fisiopatología y su Diagnóstico.*
- *Tiroides. Bases Fisiológicas. Fisiopatología y su Diagnóstico*
- *Metabolismo del Calcio. Bases Fisiológicas. Fisiopatología y su Diagnóstico.*
- *Función Reproductiva Femenina. Bases Fisiológicas. Fisiopatología y su Diagnóstico.*
- *Menopausia y Climaterio. Riesgos, Complicaciones y Laboratorio.*
- *Función Reproductiva Masculina. Bases Fisiológicas. Fisiopatología y su Diagnóstico.*
- *Biología de la Reproducción. Fertilización e Implantación. Reproducción Asistida. Unidad Fetoplacentaria. Anticoncepción.*
- *Endocrinología Pediátrica. Desarrollo Normal. Fisiopatología y su Diagnóstico.*
- *Cánceres Hormonodependientes. Fisiopatología y su Diagnóstico.*
- *Páncreas Endocrino. Bases Fisiológicas. Fisiopatología y su Diagnóstico.*
- *Trastornos de la Alimentación. Tejido Adiposo. Fisiopatología Hormonal. Obesidad, Anorexia y Bulimia.*
- *Imágenes en el Diagnóstico de la Patología Endocrina.*

Fascículo II :

*Bases de la Inmunología en Endocrinología. Interacciones Inmuno-Endocrinas

PARTE I: Carlos A. Fossati, Fernando G. Chirdo, Guillermo H. Docena y Martín Rumbo.
(Fac. Ciencias Exactas, UNLP y CONICET)

PARTE II: Amada Segal-Eiras[1] y María V. Crocce[2]
(Fac. Ciencias Exactas, UNLP, CONICET[1], CIC PBA[2])

*Introducción a la Endocrinología. Estructura y Función de las Hormonas. Secreción, Producción, Cinética y Transporte Hormonal

Ricardo S. Calandra *(Fac. de Ciencias Exactas, UNLP, CONICET)*

*Cronobiología en Endocrinología

Daniel P. Cardinali *(Fac. de Medicina, UBA, CONICET)*

*Hormonas. Mecanismos de acción hormonal

*Hormonas Esteroideas

Isabel A. Luthy *(IBYME, CONICET)*

*Hormonas Peptídicas

Guillermo J. Juvenal *(CNEA, CONICET)*

*Evaluación de un sistema hormona-receptor

Juan C. Calvo *(Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, IBYME, CONICET)*

Introducción a la Inmunología

Carlos Alberto Fossati, Fernando Gabriel Chirdo, Guillermo Horacio Docena, Martín Rumbo.

PREFACIO

El presente Capítulo no pretende ser un libro de inmunología ni reemplazar a ninguno de los diversos y excelentes textos actualmente disponibles, en los que el desarrollo de los conocimientos fundamentales de la Inmunología requiere centenares de páginas. Este Capítulo sólo puede ser interpretado como una versión resumida de algunos de los aspectos básicos de la Inmunología moderna de manera que, en manos de un lector con conocimientos previos, constituya un rápido recordatorio y una actualización sobre conceptos centrales de la Inmunología Molecular y Celular.

Esperamos que también pueda constituir una base de apoyo para aquellos que quieran iniciarse en el tema.

Debemos reiterar que dada la extensión, necesariamente reducida, de este texto muchos temas, incluyendo algunos muy importantes, no son cubiertos en estas páginas. Por otra parte, cabe destacar que nos referiremos exclusivamente al sistema inmune en los humanos y/o algunos animales, que sirven de modelo experimental.

Aspectos generales

La Inmunología es la ciencia que estudia al sistema inmune y los mecanismos que desencadenan la respuesta inmunológica. Esta respuesta está fundamentalmente destinada al reconocimiento y eliminación, o inactivación, de microorganismos patógenos, componentes derivados de estos o sustancias exógenas nocivas. Existen, no obstante, circunstancias ante las cuales el sistema inmune desarrolla una respuesta que resulta perjudicial para el huésped porque reacciona contra componentes (**Antígenos - Ag**) propios [autoinmunidad] o componentes inocuos [Alergia]. Esto significa que el sistema inmune puede discriminar lo propio de lo ajeno, respondiendo contra lo extraño y tolerando a lo propio, ya que existen muchos elementos no propios que están en simbiosis con nuestro organismo que no deben ser atacados. Por ende, este sistema debe discriminar entre lo inocuo para nuestra salud y lo que no lo es.

Mecanismos de defensa

La resistencia a la infección puede producirse de manera natural mediante mecanismos heredados y constitutivos, **Inmunidad Innata**, o desarrollados como consecuencia de la reacción inmune, **Respuesta Adquirida** (o **Adaptativa**).

Inmunidad Innata

Los mecanismos de defensa Innata, están mediados por distintos componentes: barreras Físicas, Mecánicas, Químicas y Celulares

Físicas: tales como la piel, los epitelios, etc. (que impiden el paso de los microorganismos hacia el interior del huésped). **Mecánicas**: lágrimas, orina (que barren las superficies hacia el exterior), el movimiento ciliar del epitelio respiratorio, etc. **Químicas**: enzimas y sustancias bactericidas, el ácido estomacal, el sistema de complemento, los interferones, y otras citoquinas; **Celulares**: macrófagos, leucocitos polimorfonucleares, mastocitos, células "natural killer" (**NK**), células dendríticas, entre otras.

La activación de estos componentes normalmente conduce a la formación de un foco inflamatorio tendiente a aislar y destruir al agente agresor.

Inmunidad Adquirida

La respuesta adaptativa se basa en la capacidad de los linfocitos T y B de responder selectivamente y clonalmente a millones de antígenos diferentes y producir **células efectoras** o **anticuerpos (Ac)** capaces de interactuar específicamente contra los componentes desencadenantes de la activación o contra células por ellos invadidas.

El sistema del complemento

El sistema del complemento está formado por más de 15 proteínas capaces de activarse secuencialmente y ensamblarse en unidades con funciones diferentes, a saber: **1-** Liberación de péptidos activos en la inflamación (**anafilotoxinas**). **2-** Deposición de **C3b**, potente promotor de la fagocitosis, sobre membranas celulares y **3-** Daño de la membrana (formación del **poro lítico**) que conduce a la lísis celular.

La activación del complemento puede producirse mediante dos mecanismos básicos. La vía **clásica**, iniciada por Ac específicos de isotipo IgG o IgM unidos a antígenos y la vía **alterna**, que puede ser inducida por una serie de moléculas expresadas en microorganismos.

La activación del complemento puede producirse mediante dos mecanismos básicos. La vía **clásica**, iniciada por Ac específicos de isotipo IgG o IgM unidos a antígenos y la vía **alterna**, que puede ser inducida por una serie de moléculas expresadas en microorganismos. Normalmente la activación del complemento se limita a un entorno muy cercano al sitio de activación debido a la vida media corta de sus componentes activados y a la existencia de inhibidores específicos, sin embargo, la activación excesiva del complemento puede conducir a situaciones patológicas.

Células del sistema inmune

La gran mayoría de las células involucradas en la respuesta inmune de los mamíferos, derivan de precursores de la médula ósea, denominadas **células troncales**, que retienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos de células sanguíneas por efecto de distintos factores de crecimiento. Los linfocitos se originan a partir de la **Célula troncal linfoidea** que en la médula ósea da origen a los linfocitos B (**LB**) y en el timo se diferencia a linfocitos T (**LT**)**.** La **Célula troncal hematopoyética** da lugar al: precursor **megacariocítico**, que termina formando las **plaquetas**; el precursor **eritroide** que da lugar a los glóbulos rojos; el **precursor granulocito-monocítico** que puede derivar en la línea productora de **monocitos-macrófagos** o dar lugar a la producción de **neutrófilos**, **eosinófilos, basófilos y mastocitos**. Las **células dendríticas**, que son las células presentadoras de antígeno por excelencia, se originarían en precursores monocíticos de la médula ósea y adquieren distintas características y diferentes nombres de acuerdo al órgano o tejido en el cual se ubiquen, en los que pueden encontrarse células dendríticas inmaduras. Las células **NK**, derivan también de médula ósea, pero no son ni LT ni LB. Son capaces de lisar células infectadas sin necesidad de una activación especial ni de un reconocimiento específico del antígeno.

Sistema linfoide

El sistema linfático está conformado por las células linfoides y un número de órganos **primarios** y **secundarios** distribuidos por todo el organismo e interconectados tanto por el sistema circulatorio como por el de los vasos linfáticos. En mamíferos, los órganos primarios principales, donde se produce la expansión y diferenciación de las células hemáticas, son la **médula ósea** y el **timo**. Tanto en la vida prenatal como en la vida adulta otros órganos pueden poseer capacidad hematopoyética. La médula ósea es el sitio de división de las células troncales pluripotenciales. En el timo las células troncales linfoideas se diferencian a Timocitos y luego a LT capaces de pasar a la circulación. La diferenciación a LT y LB, involucra el reordenamiento de genes para que cada célula adquiera una única molécula receptora de antígeno. Este proceso de diferenciación es particularmente complejo para los LT ya que deben ser seleccionados por su capacidad de reconocer células propias y de diferenciar entre antígenos propios y componentes extraños. Este fenómeno es llamado **educación tímica** y será resumido más adelante.

Los órganos secundarios son los ganglios linfáticos, el bazo y las estructuras linfoides asociadas a mucosas. La interconexión mencionada entre estos órganos permite la **recirculación** de los linfocitos entre ellos. La estructura particular de los ganglios y el bazo hace que las células presentadoras de antígenos (**CPA**) puedan contactarse con los linfocitos T y B potencialmente capaces de responder al antígeno presentado. Los LT y LB tienden a agruparse en áreas específicas de los órganos linfoides, denominadas áreas T o B respectivamente.

En general, en los ganglios se produce la respuesta adaptativa a los antígenos que drenan de los tejidos por la linfa, mientras que en el bazo se produce la respuesta contra los antígenos que son conducidos a través de la circulación. Las CPA también pueden actuar como transportadores de Ag de un sitio de respuesta a otro. El intestino, pulmón, mama, piel y las superficies mucosas externas, poseen sus propias estructuras linfoides especializadas que tienen características particulares y, de alguna manera, constituyen un circuito de recirculación separado que, en su conjunto se denomina tejido linfoide asociado a mucosas o **MALT**, por su sigla en inglés. El intestinal se denomina **GALT**, el bronquial **BALT** y el asociado a piel **SALT**. Estas organizaciones están especializadas para proveer inmunidad contra los antígenos que penetran por esas vías.

Inflamación aguda

Es un proceso involucrado tanto en la respuesta inmune como en la reparación tisular causada por cualquier tipo de daño, incluyendo el causado por una infección. Está mediado por las células fagocíticas pertenecientes a un amplio sistema denominado **Sistema Retículo Endotelial,** conformado por el endotelio vascular y el tejido reticular, y una serie de macrófagos encargados de limpiar tanto los detritos propios como de destruir y degradar bacterias. El proceso inflamatorio se inicia con la injuria de tejidos y vasos sanguíneos, frecuentemente causada por la infección bacteriana. El daño tisular induce la liberación de una serie de mediadores químicos, Prosta-glandinas (**PG**), Leucotrienos (**LT**) y la liberación de sustancias vasoactivas por parte de los mastocitos (principalmente histamina), que provocan un **aumento en la permeabilidad capilar** responsable de los síntomas característicos: enrojecimiento, calor, tumor y dolor. También tienen fundamental importancia en este fenómeno los leucocitos polimorfonucleares y los macrófagos. Por otra parte, la inmunidad adaptativa juega un rol preponderante que, en ocasiones, puede establecer la diferencia entre la vida y la muerte del huésped. Los Ac y los linfocitos son fuertes amplificadores de la reacción. También es de gran trascendencia la participación del complemento y del sistema de la

coagulación en el proceso de curación.

La vasodilatación y el aumento de la permeabilidad capilar, permiten el flujo y la rápida extravasación de células, neutrófilos, macrófagos, monocitos y células dendríticas atraídas por mediadores quimiotácticos (**quimioquinas**), así como de una variedad de moléculas regulatorias (proteasas, citoquinas, etc.)

Los neutrófilos y macrófagos (**fagocitos profesionales**) endocitan y/o fagocitan los microorga-nismos y partículas, eventos mediados por distintos sistemas de reconocimiento a través de receptores de superficie. Estos receptores [**Pattern-Recognition Receptors**] son capaces de reconocer una serie de componentes de los microorganismos normalmente ausentes en mamíferos (LPS, polisacáridos, lipo-proteínas, secuencias de ADN CpG no metiladas, etc). Como efecto de la fagocitosis, la célula fagocítica profesional pone en marcha una serie de mecanismos tendientes a lograr la muerte y degradación del agente patogénico. Por otra parte, se activan los mecanismos de procesamiento y presentación de antígenos, con la correspondiente activación de la expresión de moléculas, entre otras, del **Complejo Mayor de Histocompatibilidad** (**CMH**) y de moléculas **coestimulatorias**. Estos mecanismos son fundamentales en el establecimiento y desarrollo de la respuesta inmune adquirida.

Receptores antigénicos

Inmunoglobulinas

Estructura

Un monómero de inmunoglobulina está compuesto por cuatro cadenas: dos cadenas pesadas (**H**) y dos cadenas livianas (**L**). Puentes disulfuro unen a las cadenas H entre sí y a las cadenas H con las L. Por exclusión alélica, se asegura que el linfocito B exprese sólo un gen H y un gen L, de modo que las dos cadenas H y L resulten iguales entre sí.

Cada cadena se pliega en **dominios** de estructura similar. Las cadenas H poseen 4 ó 5 dominios mientras que las cadenas L están formadas por dos dominios. Cada dominio está codificado por un exón, por lo que el dominio constituye la menor unidad estructural de los anticuerpos. El plegamiento del dominio es muy compacto por lo que resultan resistentes a la acción de proteasas, mientras que los péptidos inter-dominios permanecen más expuestos y son más susceptibles a la proteólisis. Esta diferencia permite la proteólisis controlada de la molécula en sus fragmentos **Fab**, **F(ab)'$_2$** y **Fc**.

Los dominios N terminales tanto de las cadenas pesadas como de las livianas tienen grandes diferencias en las secuencia de aminoácidos entre diferentes anticuerpos y se los denomina regiones **variables** (**V_H** y **V_L**, respectivamente). El resto de los dominios constituyen las regiones **constantes** de las cadenas pesadas y livianas (**C_H** y **C_L**, respectivamente) que son los que le confieren al anticuerpo todas sus propiedades y funciones metabólicas y efectoras.

Las cadenas pesadas pueden ser clasificadas en base a su comportamiento antigénico en 5 isotipos (μ, γ, δ, α, y ε) y las cadenas livianas en dos isotipos (κ y λ). Algunos isotipos pueden, a su vez, ser subdivididos. Por ejemplo, para cadenas γ humanas pueden distinguirse cuatro subclases, γ_1, γ_2, γ_3 y γ_4. Dado que las propiedades de un anticuerpo están determinadas por el isotipo de la cadena pesada que la compone, los anticuerpos son denominados por el isotipo de esa cadena. Así, las cadenas μ, γ, δ, α, y ε definen a las inmunoglobulinas IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, respectivamente.

Dependiendo de las condiciones de la estimulación el linfocito B puede cambiar la región C, modificando la clase de anticuerpo que produce (**switch**). De esta forma se puede orientar la respuesta de anticuerpos hacia el isotipo que resulte más adecuado para combatir al agente agresor.

Dependiendo de las condiciones de la estimulación el linfocito B puede cambiar la región C, modificando la clase de anticuerpo que produce (**switch**). De esta forma, se puede orientar la respuesta de anticuerpos hacia el isotipo que resulte más adecuado para combatir al agente agresor.

Los dominios variable y constante presentan características conformacionales muy conservadas lo que ha conducido a que cada uno cumpla con una determinada función biológica. Todas las moléculas constituídas por este tipo de dominios estructurales pertenecen a la denominada **Superfamilia de las Inmunoglobulinas**.

Las regiones variables corresponden a los dominios N-terminal de las cadenas pesadas y livianas. Existen tres regiones con muy alta variabilidad y son las que constituyen las denominadas regiones **hipervariables**. Estas regiones hipervariables de las cadenas H y L conforman el sitio de combinación del anticuerpo y por ello son denominadas regiones determinantes de complementariedad **CDR** (complementarity-determining regions). Las secuencias conservadas alrededor de los CDRs, denominadas **FR** (framework-regions), son responsables del mantenimiento de la estructura del dominio y de la orientación de los CDRs.

Los estudios estructurales mostraron que ambos dominios variables (V_H y V_L) se asocian entre sí. Está interacción, hace posible que los 6 CDRs (3 de cada cadena) queden ubicados espacialmente en forma contigua, formando una gran superficie protuberante y de estructura flexible, donde reside el **sitio de combinación** al antígeno.

La parte constante del anticuerpo posee las regiones que le permiten interactuar con las moléculas de las vías efectoras fisiológicas.

Todas las cadenas pesadas (y las inmunoglobulinas que determinan) pueden existir unidas a la membrana del linfocito B que las sintetiza, permitiendo la presencia de anticuerpos como receptor antigénico específico.

Algunas inmunoglobulinas pueden formar **dímeros** o **polímeros** mediante un péptido adicional denominado **J**. Así la IgA se presenta frecuentemente en forma dimérica, mientras que la IgM produce pentámeros o hexámeros. Estos anticuerpos poseen muchos sitios de unión para el antígeno y por ende mayor avidez por éstos. Este hecho, resulta particularmente ventajoso para la función de la IgA y la IgM como mediadores primarios de defensa en las mucosas. La cadena J es una glucoproteína que se une covalentemente a los dímeros de IgA y a los polímeros de IgM.

El **componente secretorio** (**CS**) es parte de IgA e IgM secretorias y se encuentra fuertemente unido al Fc en cada una de ellas. Contrariamente a la cadena J, el CS no es sintetizado por el linfocito B, sino que el anticuerpo lo adquiere durante su transporte por la mucosa. El componente secretorio es, en realidad parte del receptor para Igs de la superficie basolateral del epitelio y constituye la porción extracelular de ese receptor (**pIgR**) que es clivado proteolíticamente durante la translocación de la inmunoglobulina hacia la región apical de la célula epitelial.

Propiedades funcionales de las inmunoglobulinas

- IgM. es el marcador superficial del linfocito B inmaduro y constituye el principal isotipo de la respuesta inmune primaria. En membrana se expresa como monómero y actúa como receptor antigénico específico de esas células para su activación. Después de la estimulación, el linfocito se diferencia a plasmocito secretor de IgM polimérica. Generalmente son de baja afinidad, pero actúan con alta avidez. La IgM es también un importante mediador de la fagocitosis mediada por fijación del componente C3b del complemento y aparece en secreciones mucosas y en la leche.

- IgD. En suero tiene una vida media muy corta y se presenta en muy baja cantidad, donde no parece cumplir ningún rol específico. Se presenta en la membrana del linfocito B maduro conjuntamente con IgM, donde parece actuar como receptor antigénico

- IgG. Las funciones principales de IgG son: la activación del complemento por la vía clásica, la inducción de destrucción del antígeno por fagocitosis (macrófagos y granulocitos), la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (linfocitos, células NK, etc.) y el bloqueo del Ag.

- IgA. Representa el 10 al 15 % de las inmunoglobulinas séricas, pero en su forma dimérica es la inmunoglobulina mayoritaria en las secreciones. Posee una vida media corta en suero pero constituye, en las mucosas, la primera línea de defensa contra la invasión de patógenos. Sus principales funciones son: fijación de complemento por la vía alterna y síntesis de opsoninas para la fagocitosis por macrófagos.

- IgE. Es el isotipo mas escaso en el suero (<0,01 %), pero es un poderoso mediador de respuesta inflamatoria. La IgE circulante es unida por receptores de alta afinidad para el Fcε de mastocitos y basófilos y eosinófilos activados, células sobre las que media la liberación de sustancias inflamatorias. La respuesta mediada por IgE es muy importante en la eliminación de parásitos, pero también es la responsable de las reacciones alérgicas y anafilácticas.

Genética de las Inmunoglobulinas

La variabilidad total de la secuencia es producto del sistema de **recombinación** de segmentos de genes que codifican para las inmunoglobulinas. En este proceso participan un centenar de genes funcionales para las regiones $\mathbf{V_H}$, **V**κ y **V**λ que codifican parte del extremo 5' del CDR_3, y una decena de **minigenes J** ("joining"), codificantes del extremo 3' de CDR_3 y FR_4. Las cadenas H incluyen, además, **minigenes D** ("diversity") que codifican la parte del CDR_3. La región variable esta formada por segmentos V que codifican para aproximadamente los primeros 95 aminoácidos de los 110 de una típica secuencia de dominio de Ig. Están precedidos por un pequeño exón que codifica para el péptido señal.

El locus de cadena pesada en humanos presenta una región donde se encuentran los segmentos V_H (unos 100). Hacia 3', se encuentran el conjunto de segmentos D (alrededor de 30) y luego, los nueve segmentos J (tres de los cuales son seudogenes). Siguiendo hacia 3', se hallan las regiones que contienen los exones para cada uno de los isotipos de la cadena pesada.

A su vez, el locus κ presenta una organización similar al de cadena pesada. Es decir, los segmentos V se encuentran agrupados y distantes de un grupo de segmentos J, con un sólo Cκ. En el locus λ, la organización es diferente, pues existen varias regiones C cada una acompañada por un segmento J propio.

Reordenamiento de los segmentos V, D y J.

En la unión entre segmentos V(D)J, aparecen modificaciones respecto a las secuencias que originalmente presentaba cada segmento en la línea germinal. Por lo tanto, se requiere de un sistema que reconozca el orden de unión entre segmentos, realice el corte de ADN y la eliminación del material intercalar y que, finalmente, una los diferentes segmentos.

Se encontró un patrón de secuencias de características distintivas. Estas secuencias señal presentan dos secuencias conservadas, un heptámero (siete nucleótidos) palindrómico y un nonámero (nueve nucleótidos), separados por un fragmento de ADN, no conservado en secuencia pero si en longitud, de 12 o 23 bases (longitudes que corresponden a una o dos vueltas del ADN de doble cadena). Los segmentos se unen siempre que un extremo tenga un espaciador de 12 y otro de 23 bases, dando lugar a la regla denominada 12/23

El reordenamiento de los segmentos que forman la región V sucede en dos pasos. Primero se reordenan los segmentos D y J, y posteriormente, un segmento V se unirá a un D-J reordenado. Este estadio de diferenciación del linfocito B es llamado **pro-B**. En el reordenamiento participa un complejo sistema de enzimas del que sólo se conoce parcialmente sus funciones. Los segmentos V-D-J unidos presentan importantes diferencias con la secuencia de la línea germinal debidas a la pérdida de bases y a la aparición de otras nuevas que no estaban codificadas originalmente (**regiones P y N**). Estos eventos de reordenamiento generan modificaciones en las secuencias, que de hecho determinan la estructura primaria del CDR3. Calculando la combinación de las posibles uniones entre los segmentos V(D)J, suponiendo que la unión entre cualquier cadena pesada y liviana es funcional, y considerando la enorme variación en secuencia aportada por las regiones N y P en la CDR3, se puede estimar que el grado de diversidad es cercano a 10^{10}. Este conjunto es conocido como **Repertorio B** y se constituye independientemente de la presencia del antígeno.

Una diversificación adicional en la región V se produce por **hipermutación**, proceso que introduce mutaciones puntuales (con una frecuencia de 10^{-3} por base por ciclo celular), tasa que resulta 10^3-10^4 veces más alta que la mutación al azar en el resto del genoma. Como consecuencia de la hipermuta-ción, se generan moléculas de Igs con distintas regiones V, y por lo tanto, con diferentes afinidades por el antígeno, fenómeno conocido como **maduración de la afinidad**.

Progresivamente, a lo largo de la respuesta inmune, se observa que son secretados otros isotipos con la misma región V. El cambio de isotipo ("switch") se logra por recombinación y deleción del material intercalar, permitiendo la transcripción de la región V con una nueva región constante. El cambio es inducido durante la colaboración entre linfocitos B y T. La secreción de ciertas citoquinas dirige la síntesis de determinadas clases de Igs. Así, por ejemplo, la presencia de IL-4 induce un switch hacia IgG_1 e IgE.

Receptor T.

Estructura del TCR

Al igual que todos los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, el receptor T tiene una estructura polipeptídica organizada en dominios. Este receptor, es un heterodímero formado por dos cadenas de dos dominios cada una, un dominio C que contiene un corto segmento intramem-brana y un domino V distal. La mayoría de los linfocitos T de la circulación y de los órganos linfoides secundarios, poseen el heterodímero αβ, responsable de reconocer péptidos presentados en las moléculas de MHC clase I y clase II. Para ejercer su función el TCR necesita de la asociación con otras moléculas de membrana.

El sitio de reconocimiento de los péptidos presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (**MHC**) está formado por las regiones variables de ambas cadenas. Tres regiones CDR de cada cadena se yuxtaponen para conformar el sitio, que es una superficie planar similar a la de un anticuerpo. Generalmente CDR1 y CDR2 reconocen a la molécula de MHC y CDR3 al péptido presentado.

La afinidad del TCR por los complejos MHC-péptido es muy baja en comparación con la de los anticuerpos por lo que se requieren moléculas accesorias para estabilizar esta unión. Las moléculas que forman el **CD3,** asociadas no covalentemente al TCR, son las que cumplen esa función y además son las que transducen las señales de activación del linfocito T. **CD4** y **CD8** son proteínas de la superfamilia de las inmunoglubulinas que se unen a las regiones no polimórficas de la molécula de MHC. La unión selectiva de CD4 a las moléculas MHC de clase II y las de CD8 a las de clase I aseguran que las células T $CD4^+$ reconozcan y respondan a Ag asociados a moléculas de clase II y que las células T $CD8^+$ respondan a péptidos presentados en clase I. La mayoría de las células T $CD4^+$ restringidas por el MHC clase II son productoras de citoquinas que participan en la defensa del huésped frente a microorganismos extracelulares y actúan como colaboradoras. Mientras que la mayoría de las células $CD8^+$, restringidas por clase I son citolíticas/citotóxicas (**CTL**), su función es erradicar infecciones por microorganismos intracelulares. Existen otra serie de moléculas accesorias que participan en los eventos de activación y regulación de las células T, tales como **CD28**, **CTLA-4**, **CD45**, **CD2**, **adhesinas**, **integrinas**, etc.

Existe otro tipo de receptor T, es el formado por las cadenas γδ, que se encuentra mayoritariamente en los linfocitos de la mucosa intestinal. El mismo es capaz de reconocer antígenos sin necesidad de que estos sean presentados por el MHC.

Genética del TCR

La generación de diversidad de los receptores T sigue mecanismos similares a la de las inmunoglobulinas. En este caso la recombinación somática se producen entre genes V, J o D, dependiendo del tipo de cadena que se trate. La cadena β está organizada de manera similar a la cadena liviana λ de las inmunoglobulinas.

El conjunto de genes que codifican para la cadena δ se encuentra insertado en el locus TCRα entre los segmentos que codifican para los genes Vα y Jα. Debido a su ubicación y orientación al producirse la recombinación del locus α, todo el locus para δ será eliminado como secuencia interviniente de la recombinación Vα-Jα.

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)

El MHC se descubrió como el locus cuyos productos son responsables del rechazo de injertos de tejidos entre cepas endogámicas de ratones. Aunque ahora se conoce que su función biológica, central al sistema inmune, se basa en la capacidad de unión selectiva de péptidos derivados de proteínas tanto exógenas como endógenas, según se describirá luego. Los genes del sistema MHC aparecen como formas alternativas o variantes con frecuencias estables en diferentes miembros de la población. Este sistema es **polimórfico** y cada variante constituye un **alelo**.

En humanos, el MHC se denomina **HLA** (human leukocyte antigens) y sus moléculas se agrupan en dos clases, Clase I que incluye a **HLA-A, HLA-B y HLA-C** y clase II que comprende a **HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ**. E**stas moléculas son las que cumplen la función de presentación clásica de antígenos, tal como se verá más adelante.** Las regiones no polimórficas de las moléculas de MHC comparten las características estructurales descriptas para los dominios de Ig y TCR. Las moléculas de clase I están compuestas por dos cadenas proteicas unidas mediante uniones no covalentes, una cadena α codificada por el MHC y una cadena β codificada fuera del MHC, denominada β_2 **microglobulina**. Los segmentos α_1 y α_2 del extremo amino terminal forman una plataforma de hebras beta antiparalelas y dos cadenas paralelas de α-hélice, las que en conjunto delimitan un hueco central donde se aloja el péptido presentado. El tamaño de este sitio es suficiente para alojar un péptido en conformación extendida de 8 a 11 aminoácidos. En humanos se pueden expresar hasta 6 moléculas diferentes de clase I heredadas de ambos progenitores. O sea, que la expresión de estos alelos es codominante (no existe exclusión alélica como en el caso de Igs o TCR).

Las moléculas de MHC clase II están compuestas por dos cadenas polipeptídicas unidas en forma no covalente, una cadena α y una cadena β, ambas codificadas por genes polimórficos del sistema HLA. Los segmentos α_1 y β_1 del extremo amino terminal de ambas cadenas, interaccionan formando el hueco de unión al péptido similar al de clase I. Sin embargo, en este caso los extremos están más abiertos permitiendo la incorporación de un péptido de hasta unos 20 aminoácidos, aunque comúnmente se encuentran péptidos de menos de 15. Cada molécula del MHC de clase I y Clase II, tienen un único sitio de unión de péptidos, aunque este sitio puede alojar numerosos péptidos diferentes que comparten ciertas características estructurales.

Educación Tímica y Tolerancia

La función del sistema inmune es reconocer y responder frente a un agente extraño al organismo. Para que esto sea posible es necesario que, en primer lugar, el sistema inmune reconozca las estructuras propias. La distinción entre **propio-no propio** es central a la respuesta inmune y se logra mediante el proceso denominado educación tímica.

El timo es el órgano linfoide primario donde se produce la generación de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$. Los precursores de timocitos se alojan en el área subcapsular donde se dividen activamente para, posteriormente, comenzar las etapas de diferenciación. Los timocitos, doble negativos ($CD4^-CD8^-$), inician los eventos de reordenamiento de los genes α y β y la expresión del receptor T. Los timocitos pasan al estadío doble positivo donde ambos marcadores, CD4 y CD8, se expresan en baja densidad. La expresión del complejo receptor de antígeno (TcR) y las moléculas accesorias CD4 y CD8 permite el inicio de las etapas de selección. En el timo se observa una alta tasa de muerte celular, y de hecho se estima que 98-99% de los timocitos mueren dentro del timo por apoptosis o muerte celular programada debido a que fallan en completar las etapas de selección. Conceptualmente se describen dos etapas denominadas selección positiva y negativa.

La **selección positiva** está mediada por células epiteliales presentes en la zona subcapsular. En esta etapa se rescata de la muerte celular programada, sólo a aquellos timocitos que expresen un receptor T capaz de reconocer complejo MHC-péptidos propios. Luego, los timocitos interaccionan con las células derivadas de médula ósea, células dendríticas y macrófagos presentes en la región córtico-medular. Estas células son las encargadas de inducir la muerte celular programada en aquellos timocitos que expresan receptores T de alta afinidad para las estructura de MHC–péptido propio. Este ajuste dual (modelo de afinidad), considera que finalmente los linfocitos T que emigran han atravesado un proceso que, en primer lugar determina que sólo aquellos linfocitos T "útiles", es decir los que tengan receptores T capaces de reconocer las estructuras propias (restringidos al MHC propio), prosigan la diferenciación. Mientras que en la segunda etapa, los linfocitos T que tienen receptores de alta afinidad para estructuras propias, potencialmente "autoagresivos", son eliminados por **deleción clonal**, (selección negativa). El producto de estas etapas son células T maduras $CD4^+$ o $CD8^+$ que emigran a la periferia.

La falla en producir un reordenamiento funcional de receptor T, la muerte celular por falta de selección

positiva y la inducción de apoptosis en la **selección negativa,** explican la alta tasa de muerte celular intratímica. Aunque constituye un elevado costo energético este es el mecanismo de ajuste fino que permite producir linfocitos T funcionales.

Si bien se considera que la educación tímica es altamente eficiente, existe un mecanismo adicional a la deleción clonal para el control de la reactividad de los linfocitos T, denominado **anergia**. Este mecanismo está presente también en el timo y tiene un rol central en la tolerancia periférica. El estado de no respuesta, anergia, en un linfocito T, se establece si no recibe la señal de activación adecuada.

En este sentido, la activación de los linfocitos T requiere el reconocimiento del complejo MHC – péptido en el contexto de las denominadas células presentadoras de antígeno (APC). Estas células se caracterizan por una alta capacidad de procesamiento de antígeno y la expresión de moléculas coestimulatorias (CD80, CD86, CD40L).

Se sabe que la primer señal de activación se origina en el reconocimiento del complejo MHC-péptido en una célula presentadora y junto con esta señal debe existir un reconocimiento de pares de moléculas (**CD28** en el linfocito T, **CD80** o **CD86** en la APC) que en conjunto disparan la señal 2. Estos eventos, que suceden en la membrana celular, se trasladan al núcleo de la célula por un complejo sistema de cascada de **quinasas** y **fosfatasas**, que inducen la expresión de genes (por ej., IL-2) y la activación y diferenciación celular. Como mencionamos, si las señales de activación recibidas por el linfocito T no son adecuadas, éste no sólo no se activa, sino que a su vez se establece un estado de anergia específico para el MHC-peptido. Este mecanismo de tolerancia es importante en la periferia para evitar la autoreactividad y se produce cuando los linfocitos T reconocen MHC presentando un péptido propio, para el cual el linfocito T no fue seleccionado negativamente, en una célula que no expresa las moléculas coestimulatorias. Los mecanismos de tolerancia, deleción clonal y anergia, también se observan en el compartimiento de linfocitos B.

Un tercer mecanismo que actúa en la periferia es el de la supresión y está determinado por la acción de citoquinas inhibitorias.

En conjunto, en condiciones fisiológicas, estos mecanismos permiten mantener un amplio repertorio de receptores de antígeno en estado de alerta ante la infección sin generar respuesta autoreactiva.

Procesamiento y presentación de antígenos

Receptores antigénicos en células linfocitarias

Durante la respuesta adaptativa se produce el reconocimiento fino de una gran variedad de estructuras antigénicas a través de los receptores antigénicos presentes en los LB (inmunoglobulinas de superficie) y en los LT (TCR). Estos receptores además intervienen en la activación linfocitaria que dará origen a los distintos mecanismos efectores de la respuesta inmune, para lo cual se encuentran asociados en membrana a otros co-receptores: Igα, Igβ, CD19 y CD21 para las inmunoglobulinas de superficie., y CD3, CD4 y CD8 asociados al TCR. A pesar de tener una estructura similar, difieren en el tipo de ligando que reconocen: las inmunoglobulinas reconocen epitopes presentes en la superficie de los microorganismos o en forma soluble, y los TCR reconocen pequeños péptidos provenientes del antígeno unidos a moléculas del MHC. Las CPA son las encargadas de generar estos péptidos y ligarlos al MHC, procesos denominados **procesamiento y presentación antigénica.**

Células presentadoras de antígeno

Los antígenos reconocidos por los receptores antigénicos pueden provenir de microorganismos que se replican en el espacio extracelular y/o en el citosol de las células (virus, bacterias, parásitos, hongos). Las CPA por lo tanto deben tener la capacidad de poder presentar péptidos provenientes de los distintos tipos de microorganismos. Para tal fin, se emplearán distintas vías de procesamiento de antígeno y presentará péptidos en moléculas de MHC también diferentes. Para un microorganismo alojado en el citosol celular los péptidos serán ensamblados por moléculas MHC clase I, mientras que si el patógeno se replica en vesículas intracelulares o proviene del medio extracelular, los péptidos serán unidos por moléculas clase II.

Se define como **CPA profesional** aquella célula que expresa moléculas de MHC clase I y II, junto a las denominadas moléculas co-estimulatorias indispensables para lograr la activación linfocitaria. Las células que mejor cumplen este rol son las células dendríticas (DC), ya que se encuentran en los lugares adecuados para captar antígenos (mucosas principalmente), y expresan moléculas de MHC y co-estimulatorias en niveles adecuados para inducir la activación de linfocitos vírgenes.

Otras células importantes como CPA profesionales son los macró-fagos y los linfocitos B. Las primeras, se c*aracterizan por su alta capacidad de fagocitosis de antígenos particulados, mientras que los LB son altamente eficientes en la fagocitosis de antígenos solubles (mediado por Ig de superficie). Es decir, que los LB cumplen una función dual de CPA y célula efectora.*

En general, cualquier célula nucleada del organismo (expresan MHC clase I) tiene la capacidad de comportarse como una CPA, siendo la evidencia de este hecho la lisis de células infectadas con virus, por LT CD8 o citotóxicos.

Vías de procesamiento y presentación. Generación de mecanismos efectores

Las estrategias para eliminar a los patógenos son las siguientes: células con virus y bacterias localizados en el citosol, serán eliminadas por LTCD8$^+$ citotóxicos, mientras que patógenos o sus productos (captados por fagocitosis, endocitosis o macro-pinocitosis) y presentes en los compartimentos vesiculares serán detectados por LT CD4$^+$. La capacidad de un LT específico de reconocer un dado antígeno y activarse está determinada por la posibilidad que un péptido proveniente del antígeno sea capaz de unirse a una molécula de MHC y posteriormente estas sean reconocidas por el TCR. Existen dos vías de procesamiento y presentación dependiendo de la localización antigénica.

1) Vía biosintética

Las moléculas de MHC se sintetizan en el interior del retículo endoplásmico rugoso (RER). Aquí, las proteínas traducidas se unen a distintas chaperonas para evitar su degradación proteolítica, hasta que unan un peptido que estabilice su conformación final. Las moléculas de MHC Clase I se unen a chaperonas solubles o ancladas en la membrana del RER (**calnexina, calreticulina, ERP57, tapasina,** etc.), posteriormente un ligando adecuado desplazará a la tapasina formándose un complejo estable. De esta manera, en el interior del RER las moléculas clase I cargan péptidos provenientes del citosol. En la membrana del RER existen transportadores ATP-dependientes llamados **TAP** (Transportadores Asociados al Procesamiento antigénico), los cuales son capaces de transportar distintos ligandos (hidratos de carbono, iones, péptidos, aminoácidos, etc.) a través de la membrana lipídica del RER. Existe en el citosol un complejo multicatalítico llamado **proteasoma** encargado de degradar proteínas citosólicas. En CPA profesionales el proteasoma adopta una composición tal en subunidades que genera principalmente péptidos de aproximadamente 10 aminoácidos. Este tipo de péptidos son los que tienen una estructura más afín por las moléculas TAP, por lo cual al ser transportados al interior del RER pueden unirse a la tapasina y luego a la molécula de MHC clase I. En ausencia de infecciones intracelulares los péptidos provenientes de moléculas propias son transportados y unidos a clase I.

Determinadas subunidades catalíticas del proteosoma, TAP y MHC clase I son inducibles en las CPA por IFN-γ. Por lo tanto, bajo circunstancias en las cuales se genera esta citoquina (por ejemplo una infección viral), la célula se adecua para mostrar con mayor eficiencia al exterior información proveniente del citosol.

2) Vía endocítica

Las moléculas de MHC clase II sintetizadas en el RER se unen a la **cadena invariante "I"** formando un trímero de trímeros (α-β-I). Esta chaperona bloquea el acceso de ligandos a la hendidura de la molécula, estabiliza al heterodímero y lo guía a través del RER, y el Aparato de Golgi hasta que las vesículas post-Golgi se unen a los endosomas. Aquí, el pH reducido de su interior activa a las proteasas lisosomales y degradan a la cadena I. Las moléculas de clase II que logren unir péptidos adecuados se estabilizarán y se dirigirán a la membrana plasmática.

Los endosomas se generan a partir de vesículas formadas por la endocitosis de material extracelular en la periferia de la célula. Durante su migración, el pH es de aproximadamente 4. Posteriormente, se fusionan con los lisosomas provenientes del Aparato de Golgi y la activación de las proteasas degrada a los componentes proteicos presentes en su interior.

Por otro lado, las CPA profesionales emplean esta vía de procesamiento y presentación antigénica para unir péptidos a MHC clase II. Los linfocitos B se caracterizan por su alta especificidad para endocitar antígenos solubles a través de la Ig de superficie; los macrófagos presentan una alta capacidad fagocítica; y las células dendríticas inmaduras captan antígenos principalmente por pinocitosis. La formación del fagolisosoma inicia el procesamiento antigénico, a través de la activación de proteasas denominadas **catepsinas**. Este proceso puede degradar completamente a las proteínas a aminoácidos. Los péptidos de hasta 20 aminoácidos son rescatados por unión a las moléculas de MHC clase II. Este proceso se ve facilitado por la presencia de una chaperona llamada **HLA-DM**, que posibilita la liberación del **CLIP** (péptido proveniente de la degradación de la cadena I. Los complejos MHC-

péptido se dirigen a la membrana plasmática y se exponen al exterior durante un cierto tiempo.

De esta manera, péptidos provenientes de microorganismos o de proteínas propias pueden ser retenidos sólo por moléculas de clase II en estos compartimentos llamados **MIIC (compartimentos de MHC clase II)** y rescatarlos de su degradación a aminoácidos. Los microorganismos que se replican en el citosol serán degradados por la vía biosintética y presentados en moléculas clase I a linfocitos $CD8^+$. Aquellos microorganismos que se repliquen en el medio extracelular o en las vesículas intracelulares serán procesados por la vía endocítica y presentados en moléculas clase II a linfocitos $CD4^+$. En circunstancias en las que se produce un aumento de IFN-γ en el medio, las APC incrementan la expresión de moléculas MHC, moléculas co-estimulatorias, contenido de enzimas lisosomales, etc., lo que en conjunto, potencia la capacidad de procesamiento y presentación antigénica.

Mecanismos efectores

Como fué mencionado anteriormente la interacción entre CPA y los linfocitos sólo se produce en ciertas áreas de órganos linfoides secundarios. Para que se produzca la activación linfocitaria se requieren 3 señales: **señal 1** dada por MHC-TCR, **señal 2** dada por los pares de moléculas co-estimulatorias: principalmente CD28-con CD80 o CD86 y la **señal 3** dada por citoquinas presentes en el medio por interacción con sus receptores. Según las citoquinas presentes en el microentorno de activación será la subpoblación de LT $CD4^+$ que se diferencie. Existen dos subpoblaciones de LT: **TH1** y **TH2**.

En presencia de IFN-γ se generan **LT TH1** cuya principal función es activar macrófagos. Los LTH1 activados secretan IFN-γ, entre otras citoquinas, e inducen el estallido respiratorio en células fagocíticas y un aumento en la expresión de moléculas de MHC. De esta manera, los microorganismos presentes en vesículas intracelulares de células fagocíticas serán degradados por diferentes mecanismos: aumento del contenido de enzimas lisosomales, generación de radicales libres de oxígeno y nitrógeno, etc. Asimismo, el IFN-γ secretado induce en los LB la síntesis y secreción de inmunoglobulinas fijadoras de complemento, a fin de aumentar la opsonización de los microorganismos. En este caso, se debe producir una interacción entre LB y LT mediante la señal 1 (MHC-TCR), la señal 2 (CD40-CD40 ligando) y la señal 3 (IFN-γ- receptor).

Si en el área T del órgano linfoide secundario predominan citoquinas como la **IL-4**, los LT se diferenciarán a **TH2** secretores de diferentes interleuquinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, etc.). Al interactuar con LB se inducirá la secreción de distintos isotipos de inmunoglobulinas (IgE, IgA, IgG_1, IgG_4). Este mecanismo es relevante frente a antíge-nos extracelulares.

Si los péptidos son expresados en el contexto de clase I sólo los $LTCD8^+$ podrán interactuar con las CPA. Si se producen las señales 1, 2 y 3 (aquí también es importante la presencia de IFN-γ), se generarán LT citotóxicos que se dirigen a la periferia en busca de células que muestran en su superficie MHC clase I con el péptido específico. Bajo estas circunstancias, pueden requerir o no la colaboración de LT $CD4^+$ (IL-2) y secretar un conjunto de moléculas llamadas **perforinas** y **granzimas** que inducen la lisis y apoptosis respectivamente, de la célula blanco infectada.

Bibliografía:

Bibliografía General Básica

1. ImmunoBiology. Janeway CA, Travers P, Walporf M, Scholmchik MJ, (eds), Garland Publishing, Taylor and Francis Group - 5ta Edición, New York, USA, 2001.
2. Inmunología Celular y Molecular. Abbas AK, Lichman AH, Pober JB, Interamericana - Mc. Graw Hill, 4ta Edición, Madrid, España, 2002.
3. Introducción a la Inmunología Humana. Fainboim L, Satz L, Geffner J, 4ta Edición, Buenos Aires, Argentina, 1999
4. Inmunología e Inmunoquímica: Fundamentos. Margni RA, (ed), Editorial Médica Panamericana, 5ta Edición, Buenos Aires, Argentina, 1996.
5. The Experimental Foundations of Modern Immunology. Clar WR, John Wiley & Sons, (eds), Inc. 4ta Edición, Singapur, 1991.
6. Inmunología. Fundamentos. Roitt I, Delves PJ. Margni RA, (ed), Editorial Médica Panamericana, 10ma Edición, Buenos Aires, Argentina, 2003.
7. Fundamental Immunology. Paul W, Raven Press, 4a edición, Philadelphia, USA, 1998.
8. Immunology. Weir DM, Stewart J, (eds), Churchill Livingstone, 8a edition, Oxford, UK, 1997.
9. Inmunología básica y clínica. Stites DP, Terr AI, El Manual Moderno, (ed), México DF, México, 1993.

Revistas de actualización:

1. Trends in Immunology (antes Immunology Today)
2. Current Opinion in Immunology
3. Seminars in Immunology
4. The Immunologist

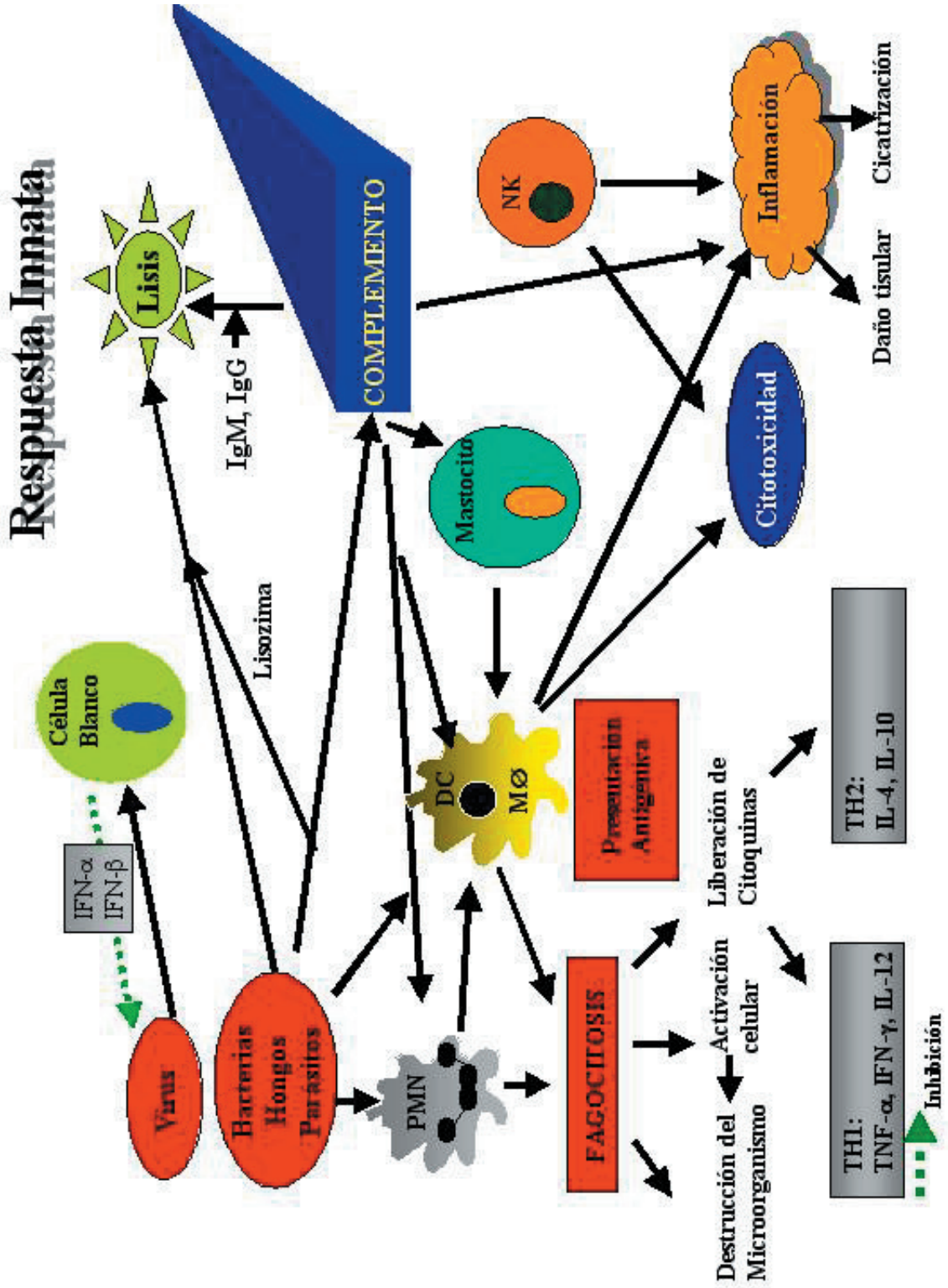
Apéndice

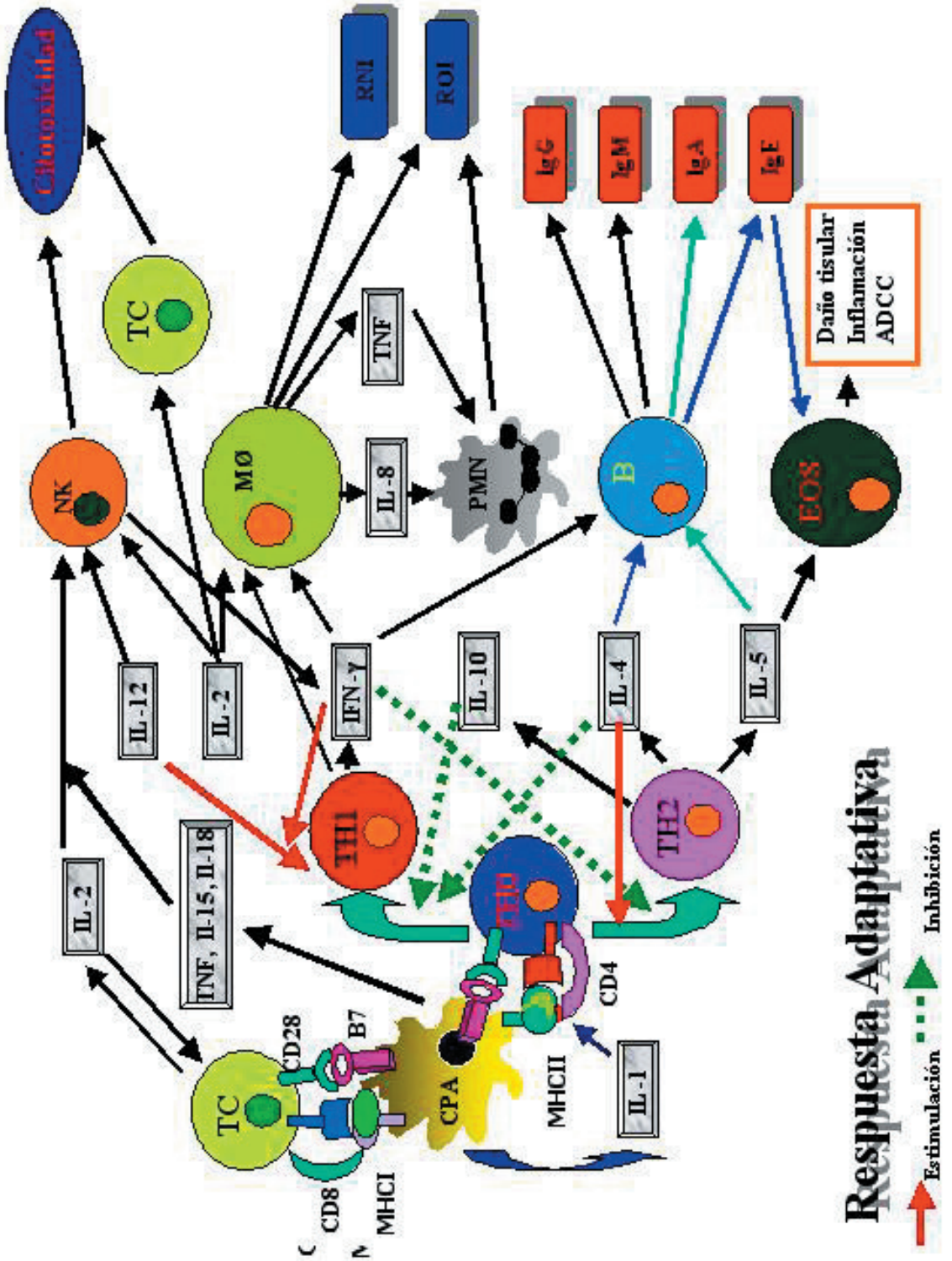
Características fundamentales de algunos de los principales CD

CD	Expresado en:	Función Principal
CD1 (a, b c y d)	Timocitos y cel. dendríticas	Presentación Ag no peptídicos
CD2	LT, Timocitos, NK	Adhesión,
CD3 (γ, δ, ε)	LT, Timocitos	Transducción de señales (coreceptor)
CD4	LT restringido MHCII	Correceptor en activación T
CD8	LT restringido MHCI	Correceptor en activación T
CD14	Monocitos, macrófagos	Unión a LPS
CD19	LB	Correceptor en activación B
CD20	LB	Activación-Regulación B
CD23	LB activados, monocitos, macrófagos	Receptor Fcε baja afinidad
CD25	LB y LT activados	Cadena α receptor IL-2
CD28	LT	Coestimulación
CD32	Macrófagos, granulocitos, LB, eosinófilos	Receptor Fcγ
CD40	LB, macrófagos, dendríticas	Activación
CD80	Dendríticas, Macrófagos, LB	Coestimulación
CD86	Dendríticas, Macrófagos, LB	Coestimulación
CD132	LT, LB, NK, monocito y macrófago	Cadena γ de los receptores para IL-2,4,7,9,15
CD152	LT activados	Señal inhibitoria LT (CTLA-4)
CD154	LT CD4 activadas	Ligando de CD40

Características fundamentales de las principales Citoquinas y Quimoquinas

Nombre	Expresado en o secretado por:	Función
IL1	Macrófagos, cel. endoteliales,	Inflamación
IL2	LT	Proliferación T
IL4	LT, mastocitos	Diferenciación TH2
IL5	LT, mastocitos	Activación eosinófilos, producción de IgA
IL6	Macrófagos, cel endoteliales, LT	Proliferación LB, proteínas fase aguda
IL10	Macrófagos, LT	Inhibición IL12, Aumenta expresión coestimuladoras y MHCII, inhibe TH1
IL12	Macrófagos, dendríticas	IFNγ,diferenciación a TH1
TNF	Macrófagos, LT	Proinflamatoria
IFNα	Macrófagos	Antiviral
IFNβ	Fibroblastos	Antiviral
IFNγ	LT, NK	Inductor TH1, aumento de procesamiento y presentación antigénica . Proinflamatorio
TGFβ	LT, macrófagos y otros	Inductor de IgA, supresor
IL8	Monocitos, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales	Inflamación aguda
CXCR1/2	Neutrófilos	Receptor IL8
CXCR4	LT, LB, Monocitos, neutrófilos	Reclutamiento linfocitos, correceptor HIV
CCR1	Monocitos, basófilos, eosinófilos, LT	Inflamación (Receptor MIP-1α)
CCR3	Eosinófilos, basófilos, LT	Hipersensibilidad Tipo 1
CCR5	Monocitos, LT	Inflamación (Correceptor HIV)
CCR6	LT, LB, dendríticas	Tráfico celular
CCR7	Monocitos, dendríticas	Tráfico celular


Respuesta Innata
Lisis
COMPLEMENTO
IgM, IgG
NK
Inflamación
Cicatrización
Daño tisular
Célula Blanco
IFN-α
IFN-β
Lisozima
Mastocito
Citotoxicidad
Virus
Bacterias
Hongos
Parásitos
PMN
DC
MØ
Presentación Antigénica
FAGOCITOSIS
Activación celular
Liberación de Citoquinas
Destrucción del Microorganismo
TH1:
TNF-α, IFN-γ, IL-12
TH2:
IL-4, IL-10
Inhibición


Citotoxicidad
TC
NK
MØ
RNI
ROI
TNF
IL-8
PMN
IgG
IgM
IgA
IgE
B
EOS
Daño tisular
Inflamación
ADCC
IL-12
IL-2
IFN-γ
IL-10
IL-4
IL-5
TH1
TH2
APC
IL-2
INF, Il-15, Il-18
TC
CD28
B7
CPA
MHCII
CD4
IL-1
CD8
MHCI
Respuesta Adaptativa
Estimulación
Inhibición

Introducción a la Inmunología

Amada Segal-Eiras - María Virginia Croce

MECANISMOS PATOGENICOS DEL DAÑO INMUNE

La respuesta inmune es una función normal del organismo; la alteración funcional de la respuesta hacia antígenos extraños o la limitación para mantener la tolerancia respecto a los propios tejidos (autotolerancia), conducen a patologías en las que el mecanismo primario de lesión es inmunológico [1, 2].

Las reacciones inmunes se pueden producir por antígenos exógenos así como por antígenos endógenos o intrínsecos, o sea que provienen del propio individuo.

Las enfermedades por hipersensibilidad se inducen por diversas clases de antígenos e implican fenómenos de inmunidad humoral y celular. Las enfermedades por hipersensibilidad se clasifican según el mecanismo inmunológico que interviene en su inducción. Las variedades son las siguientes:

1.- Tipo I denominado anafilaxia: Se define como una reacción inmunológica de desarrollo rápido que se produce a escasos minutos de la combinación del antígeno (o alergeno) con el anticuerpo, los que se unen a las células cebadas o basófilos en individuos previamente sensibilizados al mismo antígeno[3]. Esta reacción aguda puede ser localizada o sistémica; ésta última habitualmente se produce por la entrada a la vía sanguínea de un antígeno; inmediatamente se produce una reacción de diferente intensidad y gravedad que puede causar shock y muerte en el individuo. En cambio, la reacción local depende del sitio de entrada del antígeno; es generalmente cutánea, nasal o conjuntival; se denomina fiebre de heno y puede presentarse como rinitis alérgica, conjuntivitis y gastroenteritis (alergia alimenticia). La forma localizada de hipersensibilidad de tipo I presenta dos fases definidas: a.- La respuesta inicial que se caracteriza por vasodilatación, secreción glandular, espasmo del músculo liso y aumento de la permeabilidad vascular. Estas alteraciones aparecen entre los 5-60 minutos posteriores a la exposición al antígeno. b.- En la rinitis alérgica y en el asma bronquial una fase secundaria o tardía puede presentarse entre las 2-8 horas sin necesidad de una nueva exposición al antígeno y puede durar varios días; en este caso de reacción tardía la infil-tración tisular está constituída por eosinófilos, neutrófilos, basófilos, monocitos y células T CD4 positivas, observándose lesiones en el epitelio mucoso [4].

Los mastocitos, importantes en esta forma de hipersensibilidad, poseen gránulos que liberan mediadores químicos con una variedad de actividades biológicas. Tanto los mastocitos como los basófilos pueden activarse por uniones cruzadas de elevada afinidad con los receptores IgE y actúan preferentemente a nivel tisular. La IgE interviene en forma fundamental en la reacción de tipo I; la diferenciación de las células B para producir IgE depende de la inducción de células T helper CD4-TH2. El alergeno es presentado por las células dendríticas a las células precursoras TH2 [5] y éstas liberan citoquinas. Los anticuerpos IgE citofílicos se unen a los mastocitos y basófilos que por su parte tienen receptores de alta afinidad para la porción Fc de la IgE induciendo la degranulación de los gránulos preformados (primarios) y la síntesis de gránulos nuevos (secundarios) [6]. Los mediadores primarios pueden ser aminas biógenas, mediadores quimiotácticos, enzimas y proteoglicanos. La histamina es una de las aminas biógenas e induce la contracción del músculo liso de la pared bronquial, aumenta la permeabilidad vascular, la secreción nasal, bronquial y de las glándulas gástricas. Los factores quimiotácticos pueden

provenir de los eosinófilos y de los neutrófilos. Por su parte, las enzimas están localizadas en la matriz celular e incluyen proteasas e hidrolasas ácidas y conllevan la producción de quininas y de factores activados del complemento (C3a) al actuar sobre las proteínas precursoras. Los proteoglicanos incluyen a la heparina y al condroitínsulfato y su función es almacenar y aglutinar a los otros mediadores dentro de los gránulos. La respuesta inmune induce la liberación de aminas vasoactivas y espasmogénicas que actúan sobre los vasos sanguíneos y el músculo liso y de citoquinas proinflamatorias que atraen a las células inflamatorias.

La anafilaxia local está representada por la alergia atópica que afecta al 15% de la población [7]; la predisposición familiar es un hecho demostrado asociado a factores que regulan la respuesta IgE; en los individuos con predisposición genética hacia la atopía los antígenos ambientales estimulan la activación TH2 [8].

HIPERSENSIBILIDAD DE TIPO II

Esta forma de daño tisular está mediada por anticuerpos que reconocen a ciertos antígenos normales o no, presentes en la superficie celular o de otros componentes tisulares. Existen tres mecanismos de este tipo de hipersensibilidad: uno lo constituyen las reacciones dependientes del complemento; los mecanismos más importantes son la opsonización y la lisis directa. La opsonización determina que las células adquieran una mayor sensibilidad para la fagocitosis por fijación del fragmento C3b y/o de anticuerpos a la membrana celular. En la lisis celular el anticuerpo ya sea IgG o IgM reacciona con el antígeno expresado en la superficie celular induciendo la activación del complemento, el ataque y perforación de la membrana plasmática producen soluciones de continuidad en la doble capa lipídica. Las células que experimentan con mayor frecuencia esta forma de hipersensibilidad son las células sanguíneas (hematíes, leucocitos y plaquetas) y estructuras no celulares tal como la membrana basal glomerular en la nefropatía membranosa.

Las reacciones transfusionales por sangre incompatible constituyen un ejemplo de este tipo de hipersensibilidad; los anticuerpos propios reaccionan con los eritrocitos inyectados. En la eritroblastosis fetal, la diferencia antigénica entre la madre y el feto determina anticuerpos IgG que atraviesan la placenta y fluyen de la madre hacia el feto hemolizando los eritrocitos del hijo. En la anemia hemolítica autoinmune, la agranulocitosis y en la plaquetopenia, las células son destruidas por acción de autoanticuerpos contra las células respectivas.

Otro mecanismo de tipo II, es la citotoxicidad anticuerpo-dependiente; en este caso no interviene el complemento pero sí lo hacen los leucocitos. La célula blanco cubierta con escasa cantidad de IgG es destruida por una variedad de células no-sensibilizadas que tienen receptor Fc en la membrana; este receptor se une al fragmento Fc de la IgG y produce lisis celular sin previa fagocitosis. En este mecanismo, intervienen los monocitos, eosinófilos, neutrófilos y las células NK; cuando este tipo de reacción ocurre en las parasitosis, el anticuerpo es IgE y la reacción es mediada por los eosinófilos. Este mecanismo de daño es de gran utilidad para destruir noxas grandes que no pueden ser fagocitadas, como son los parásitos y las células tumorales y también interviene en la reacción de rechazo contra los transplantes [9].

HIPERSENSIBILIDAD DE TIPO III

Consiste en el daño mediado por complejos inmunes (CI) antígeno-anticuerpo como resultado de su capacidad de activar el complemento [10]. Los CI son circulantes y además pueden estar depositados a nivel extravascular donde están los antígenos que los inducen. La formación de CI no siempre induce enfermedad; por otra parte, su formación es un buen mecanismo para la depuración de antígenos. Los CI se depositan en los tejidos cuya trama vascular es filtrante tal como el glomérulo renal, la microcir-culación y en algunos casos el lecho vascular pulmonar. Los antígenos pueden ser exógenos como virus, bacterias y proteínas extrañas, o bien endógenos, membranas basales, tejido sinovial, antígenos nucleares, inmunoglobulinas y antígenos asociados a tumores malignos. En la microvasculatura de la piel los IC se depositan induciendo el fenómeno o reacción de Arthus.

La hipersensibilidad por CI puede ser de dos formas, sistémica y localizada [1, 2]. La hipersensibilidad de tipo sistémico está representada por la enfermedad del suero aguda y es la entidad patognomónica de esta variedad de hipersensibilidad; algunos ejemplos podrían ser el desafío con suero antitetánico de origen equino empleado en la inmunización pasiva y el tratamiento con antibióticos en la infección microbiana.

La secuencia de esta variedad de hipersensibilidad es la siguiente: a.- formación de CI antígeno-anticuerpo en la circulación; b.- depósito de los CI en los tejidos; c.- la cascada inflamatoria diseminada en varios tejidos del organismo inducida por los CI. La primera fase es la entrada de antígenos a la circulación los que reaccionan con células inmunocompetentes e inducen la formación de anticuerpos. Escasos días después, se forman anticuerpos contra esos antígenos generando CI. En la segunda fase, los CI circulantes se depositan en los tejidos que dependen del tamaño de los complejos y de la integridad del sistema fagocítico mononuclear.

Los CI que implican daño hístico son los de tamaño intermedio o menor, se mantienen en la circulación en forma prolongada y tienen una baja afinidad por las células fagocíticas. También intervienen otros factores tales como la carga, valencia, avidez de los anticuerpos, afinidad de los antígenos por los componentes tisulares y hemodinámicos. Por otra parte, la excesiva producción de CI determina la persistencia de los CI en la circulación y en los tejidos (glomérulo, articulaciones, piel, corazón, serosas y en la microcirculación). La salida de los CI hacia el espacio extravascular está supeditada al aumento de la permeabilidad vascular. Cualquiera sea el tejido u órgano donde los CI se depositan, el daño tisular es similar y los mecanismos que lo producen son la activación del sistema complemento y la activación de macrófagos y neutrófilos a través de receptores para Fc.

La secuencia inflamatoria es la siguiente: 1.- liberación de C3b que promueve la fagocitosis de microorganismos y partículas; 2.- producción de factores quimiotácticos que inducen la migración de polimorfonucleares y monocitos (fragmento C5, C5b-7); 3.- liberación de anafilatoxinas (C3a y C5a) que incrementan la permeabilidad vascular y propicia la contracción del músculo liso; 4.- formación del complejo C5-9 que ataca la membrana celular y conduce hacia la citolisis. Por otra parte, los neutrófilos y macrófagos pueden activarse en ausencia del complemento ya que tienen el receptor para Fc de IgG y por lo tanto se pueden unir a la porción Fc de la IgG acomplejada.

Los CI poseen tambien otros efectos: facilitan la agregación plaquetaria al activar el factor de Hageman que aumenta la respuesta inflamatoria e induce a la microtrombosis. Así a nivel vascular, producen vasculitis, en el riñón, glomérulo-nefritis y en las articulaciones, artritis, entre otros ejemplos.

Las inmunoglobulinas pueden ser IgG y la IgM que fijan complemento e IgA que puede activar el complemento por vía alterna y producir daño por hipersensibilidad en especial en los epitelios secretores de IgA, tales como el respiratorio y digestivo.

La enfermedad por complejos inmunes localizada, denominada reacción de Arthus, se caracteriza por una zona de necrosis restringida a una porción de la piel causada por vasculitis e inducida por CI.

HIPERSENSIBILIDAD DE TIPO IV

Se denomina hipersensibilidad mediada por células y esta reacción se inicia por los linfocitos T específicamente sensibilizados [1, 2]. Es una reacción clásica mediada por células T CD4 y por citotoxicidad directa mediada por linfocitos T CD8. Consiste en una respuesta inmune fundamental contra agentes microbianos intracelulares (*M. tuberculosis y M. leprae*) [11] y también contra virus, protozoos, parásitos y hongos. La dermatitis de contacto y el rechazo de los transplantes son exponentes del mismo tipo de hipersensilbilidad.

Existen dos formas de la hipersensibilidad de tipo IV: a.- la hipersensibilidad retardada y b.- la citotoxicidad mediada por linfocitos T.

a.- La hipersensibilidad retardada tiene como ejemplo típico a la reacción inducida por la tuberculina (Mantoux), componente proteico-lipopolisacárido del bacilo tuberculoso que se inyecta a nivel intradérmico. Si el sujeto inyectado está sensibilizado al antígeno, en el sitio de la inyección y dentro de las 8-12 h con un pico entre las 24-72 h, se observa una zona de hiperemia e induración que luego retrograda lentamente en los días siguientes. La hipersensibilidad retardada consiste histológicamente en la infiltración perivenular con linfocitos T CD4 positivas que aprisionan al vaso sanguíneo y determinan el edema de la dermis y el depósito de fibrina en el intersticio; frecuentemente las vénulas presentan hipertrofia e hiperplasia endotelial. El conjunto de células forman lo que se denomina granuloma inmune. La secuencia de la reacción es la siguiente: linfocitos T CD4 reconocen a los péptidos derivados del bacilo de Koch en asociación con las moléculas MHCII localizadas en la superficie de células dendríticas (células de Langerhans de la piel) o en los monocitos.

Las células T CD4 no comprometidas (naïve o TH0) se diferencian hacia TH1 las cuales secretan citoquinas fundamentales para la expresión de la hipersensibilidad retardada [12]. Algunos de estos linfocitos TH1 pasan a la circulación y se mantienen como células de memoria; en una segunda exposición, las células de memoria TH1 reaccionan con el antígeno en la superficie de las células presentadoras de antígeno e inducen transformación blástica y proliferación; estos fenómenos son simultáneos a la secreción de linfoquinas por las células TH1.

Las linfoquinas más relevantes en la hipersensibilidad retardada incluyen a la IL-12 que es segregada por los macrófagos y es fundamental para la respuesta TH1 al inducir la diferenciación de CD4 TH0 hacia TH1, que a su vez, inducen la secreción de otras citoquinas tal como el IF-gamma por las células T y NK; y además interviene en la diferenciación de las células TH1.

El IFN-gamma es un activador macrofágico que conlleva a la secreción posterior de IL-12; exacerba la fagocitosis, la lisis microbiana y de células tumorales. Facilita la presentación de antígenos al tener numerosas moléculas de clase II en la superficie. La activación macrofágica induce la anulación de agentes patógenos, la síntesis de colágeno y finalmente la fibrosis.

La IL-2 estimula la proliferación autocrina y paracrina de linfocitos T que se acumulan en el sitio donde la respuesta tipo IV tiene lugar, donde además figuran linfocitos CD4 TH1 antígeno-específicos y otros linfocitos T activados por la IL-2.

El TNF-alfa y otras linfotoxinas ejercen un efecto marcado sobre las células endoteliales: aumentan la secreción de prostaciclinas las que estimulan la vasodilatación local; por otra parte, aumentan la expresión de E-selectinas y otras moléculas de adhesión de linfocitos y monocitos. Otra función del TNF-alfa es la inducción y secreción de factores quimiotácticos de bajo peso molecular.

La citotoxicidad mediada por células T, es una variedad de la hipersensibilidad retardada en la que los linfocitos T CD8 sensibilizados destruyen a las células portadoras de un antígeno (T citotóxicos). En las células infectadas por virus, los péptidos virales asociados a las moléculas de clase I que están en la célula en forma de un complejo, son transportados hacia la superficie celular y este complejo es reconocido por el TCR (T cell receptor) de los linfocitos T citotóxicos CD8+. De esta manera, se logra la neutralización viral por la lisis de la célula infectada y la eliminación de la infección. Un hecho similar se observa en la respuesta inmune anti-tumor a través del reconocimiento de antígenos tumorales que se presentan en la superficie celular. En las enfermedades autoinmunes, la citotoxicidad mediada por células puede ocurrir ya sea por el sistema dependiente de perforina-granzima o bien por el sistema dependiente del ligando Fas-Fas.

AUTOINMUNIDAD

El proceso de autoinmunidad se desarrolla cuando la respuesta inmune adaptativa específica se induce contra el propio organismo; se desconoce la causa etiológica de esta alteración si bien se considera como posible a la acción inductora que ejercen ciertos factores ambientales y genéticos, en especial el genotipo del complejo mayor de histocom-patibilidad (CMH) [1, 2].

La respuesta autoinmune es sostenida, prolongada y progresiva en el tiempo, hecho que aumenta el daño tisular; por otra parte, los autoantígenos responsables de la patogenia autoinmune solamente pueden ser neutralizados cuando se destruyen las células portadoras de tales antígenos; por lo tanto, la fuente de antígeno podría ser inagotable perpetuando la enfermedad

La patogenia de las lesiones tisulares es similar a la observada en la inmunidad adaptativa y en la atopía, si bien en la autoinmunidad no intervienen reacciones inmunes por IgE.

La autoinmunidad se desarrolla por una respuesta de linfocitos T; la activación anómala de los macrófagos y la respuesta T citotóxica pueden ser muy patogénicas mientras que la cooperación anormal de células T puede inducir anticuerpos con grave daño orgánico. La respuesta autoinmune es una consecuencia natural de la activación del repertorio de receptores T y B que les permite reconocer cualquier agente patógeno, entre los cuales quedan involucrados los autoantígenos.

La autoinmunidad aparece espontáneamente[13]; las enfermedades de patogenia autoinmune tienen asociaciones con el sistema HLA. Y así el genotipo DQbeta posee una intensa relación con la diabetes mellitus de tipo I (insulino-dependiente) [14]. En la diabetes insulino-dependiente se ha demostrado la asociación entre los alelos HLA-DR3 y HLA-DR4 del CMH clase II, los que están fuertemente unidos al HLA-DQ y a la tendencia a contraer la enfermedad.

Los factores ambientales pueden aumentar la susceptibilidad hacia las enfermedades auto-inmunes. Los gemelos idénticos presentan una mayor incidencia de diabetes; las infecciones, los factores dietéticos y el sexo por los factores hormonales suelen colaborar para la adquisición de la enfermedad. Así se ha observado cierta relación con los estrógenos y progesterona, lo que implica una mayor frecuencia de ciertas enfermedades de patogenia autoinmune en el sexo femenino. Se ha establecido que todos los mecanismos inmunológicos habitualmente descritos pueden intervenir en la respuesta autoinmune. La patogenia, o sea el mecanismo de daño se puede desarrollar de diferentes formas; una es por la presencia de anticuerpos IgG e IgM que reconocen antígenos propios tales como membranas celulares o matriz extracelular determinando el daño hístico y este mecanismo aparece en varias enfermedades[15]. En el lupus eritematoso sistémico, se forman crónicamente anticuerpos IgG contra antígenos propios constituyendo inmunocomplejos que se depositan en los tejidos, en especial en la microcirculación. Este es un ejemplo de enfermedad sistémica autoinmune habiendo otros que afectan en forma localizada a algunos órganos. Otro mecanismo patogénico que induce una enfermedad autoinmune es la formación de autoanticuerpos contra moléculas de receptores ubicados en la membrana plasmática celular; cuando este fenómeno ocurre se desarrolla un mecanismo de hipersensibilidad de tipo II, el anticuerpo se une al receptor produciendo un efecto estimulante o bloqueante por su ligando natural[16] siendo ejemplos la enfermedad de Graves y la miastenia gravis [17].

Otro mecanismo de daño autoinmune es el mediado por complejos inmunes formados en forma crónica y que paulatinamente determinan un daño sistémico. La presencia de gran cantidad de antígeno soluble determina la formación exagerada de inmunocomplejos los cuales no logran ser removidos de la circulación. Un ejemplo es el lupus eritematoso sistémico, donde se forman inmuno-complejos contra las núcleoproteínas; los inmuno-complejos son activadores del sistema fagocítico y del complemento induciendo un mayor daño celular. Éste a su vez, libera más nucleoproteínas que a su turno vuelven a formar inmunocomplejos, perpetuando el mecanismo patogénico de hipersensi-bilidad de tipo III. Otro de los mecanismos se produce por acción de células T específicamente reactivas las que son necesarias para mantener la respuesta de anticuerpos. En la diabetes de tipo I, las células beta son selectivamente destruídas por linfocitos T específicos, T CD8 [18]. Por otra parte, la presencia de un autoantígeno reconocido por un determinado anticuerpo conlleva a la identificación de la célula T helper responsable de la producción de autoanticuerpos. Debe tenerse presente que en autoinmunidad participan y conviven las células T así como las células B, ambas reactivas.

En la inducción de autoinmunidad se anula la tolerancia normal hacia las proteínas propias; normalmente, las células derivadas de la médula ósea que reaccionan contra los antígenos propios son anuladas por el timo durante la selección clonal negativa. No está totalmente aclarado cómo se mantiene la tolerancia a las proteínas propias o a nuevas proteínas que se generan a lo largo de la vida.

Los antígenos propios modificados pueden crear neoantígenos hacia los cuales el sistema inmune nunca fue expuesto o tolerado; por ejemplo, en la esclerosis múltiple las proteínas básicas de la mielina están alteradas por fosforilación y acetilación, entre otros procesos [19]. Los anticuerpos inducidos por estas proteínas modificadas las reconocen así como a las no alteradas, posiblemente porque identifican además a los aminoácidos laterales que acompañan al sitio modificado. En cambio, la respuesta T es más específica contra el autoanticuerpo neofor-mado y no siempre reacciona en forma cruzada con la proteína normal. La modificación de los antígenos propios actúa sobre las funciones de los órganos efectores, el procesamiento de los antígenos, la transducción de señales y la expansión de citoquinas y quimioquinas. Otras modificaciones relacionadas con autoinmunidad [20] están relacionadas con la glicosilación modificada de la IgG, característica importante, porque facilita su unión al complemento, la resistencia a las proteasas, el mantenimiento de la vida media y la capacidad de unirse al fragmento Fc de los monocitos.

La autoinmunidad es un proceso patológico que tiene un sustrato inflamatorio causado por infecciones previas; así mismo, se ha observado con cierta frecuencia la asociación de infecciones con la enfermedad autoinmune. Durante el proceso inflamatorio antes del desarrollo de la autoinmunidad con lesiones irreversibles, tanto las células infectadas como las no infectadas por diversos patógenos pueden sufrir muerte celular ya sea por la infección directa o por destrucción causada por células NK, NKT o bien por células T. En la progresión de la enfermedad autoinmune, las células NK están en los órganos afectados tales como músculo, sinovial, páncreas y cerebro entre otros, si bien no ejercen un efecto lítico directo sobre el órgano afectado. Esto indicaría que las células NK en los órganos blanco y en el tejido linfático periférico, están involucradas en la regulación de la respuesta inmune contra los autoantígenos. Se ha observado la disminución de células NK en enfermedades autoinmunes, tanto en el número como en la función [21]. Las células NK pueden promover la patología autoinmune por interacción directa con las células presentadoras de antígeno tales como macrófagos y células dendríticas así como con las células T y B antígeno-específicas.

Los linfocitos γ/δ constituyen un grupo pequeño de la población T. La expansión de estas células inducida por la IL-4 y observada en algunas enfermedades, indicaría que serían activadas cuando reconocen ciertas sustancias no-proteicas e inducirían una respuesta inmune humoral contra ellas [22]

Bibliografía

1. Cotran, RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathological basis of disease. WB Saunders Co, p. 188-259, 6th ed., 1999.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: Cellular and molecular immunology. WB Saunders Co, 3rd ed. 1997.
3. Howarth PH: ABC of allergies. Pathogenic mechanisms: a rational basis for treatment. Brit. Med. J, 316: 578-587, 1998.
4. Costa JJ: The cells of the allergic reponse: mast cells, basophils and eosinophils. JAMA, 278: 1815-1822, 1997.
5. Theryc C, Amigorena S: The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. Curr Opin Immunol 13: 45-51, 2001.
6. Sutton BJ, Gould HJ: The human IgE network. Nature, 366: 421-428, 1993.
7. Anderson JA: Allergic reactions to drugs and biological agents. JAMA 268: 2845-2857, 1992.
8. Huang SK, Marsh DG. Genetics of allergy. Ann Allergy 70: 347-358, 1993.
9. Heyman B: Regulation of antibody responses via antibodies, complement and Fc Receptors. Amm Rev Immunol 18: 709-·37, 2000.
10. Dixon FJ, Cochrane CC, Theophilopoulos AN: Immune complex injury. In Samter M, Talmage DW, Farnk MM, Austen KF, Claman HN: Immunological diseases. Little, Brown and Co. 233-259, 1988.
11. Flynn JL, Chan J: Immunology of tuberculosis. Ann Rev Immunol 19: 93-129, 2001.
12. Russell JH, Ley TJ: Lymphocyte-mediated cytotoxicity. Ann Rev Immunol 20:323-370, 2002.
13. Shi FO, Ljunggren HG, Sarvetnick N: Innate immunity and autoimmunity: from self protection to self destruction. Trends in Immunol 22: 97-101, 2001.
14. Bach JF, Chatenoud L: Tolerance to islet autoantigens in type I diabetes. Ann Rev Immunol 19:131-161, 2001.
15. Stevenson FK, Natvig J: Autoantibodies revealed the role of B cells in autoimmune diseases. Immunoloçy Today 20:296-298, 1999.
16. Brown RS: Immunoglobulins affecting thyroid growth: a autoimmune controversy. J Clin Endocrinol Meth 80:1506-15111, 1995.
17. Balasa B, Sarvetnick N: Is pathogenic humoral autoimmunity a TH1 response ? Leóson fòom (for) myastenia gravis. Immunol Today 21: 19-23, 2000.
18. Rosmalen JMG, vaî Ewijk W, Leenen JM: T- cell education in autoimmune diabetes: teacher and students Trends in Immuîoloçy 23": 40-46, 2002.
19. Doyle HA, Mamula MJ: Post-translational modifications in antigen recognition and autoimmunity. Trends in Immunol 22: 409-465, 2001.
20. Chui D: Genetic remodeling of protein glycosylation 'in vivo' induces autoimmune diseases. Proc Natl Acad Sci USA 98: 1142-1147, 2001.
21. Shi FD: Natural killer cells determine the outcome of B-cell-mediated autoimmunity. Nat Immunol 1: 245-251, 2000.
22. Fisch P, Moris A, Rammensee HG, Handgretinger R. Inhibitory MHC class I receptors gamma and delta cells in tumor immunity and autoimmuîity. Immunol Today 21: 187-191, 2000.

Citoquinas

Amada Segal-Eiras - María Virginia Croce

La fase efectora de la inmunidad innata y de la específica o adaptativa es mediada en su mayor parte por sustancias de naturaleza proteica de tipo hormonal denominadas citoquinas; que cuando son segregadas por linfocitos se denominan linfoquinas y las producidas por los monocitos, monoquinas.

Las citoquinas constituyen un grupo de proteínas diferentes entre sí. Sin embargo comparten ciertas características: se producen durante la activación y la fase efectora de la inmunidad innata y de la adquirida e intervienen en la inflamación, y la regulación de la respuesta inmune. En la inmunidad innata, los productos liberados por gérmenes tales como los lipopolisacáridos y productos virales estimulan a las células mononucleares para la secreción de citoquinas. Su secreción es un proceso autolimitante y la síntesis se inicia a partir de una nueva transcripción génica; la activación de una transcripción es pasajera siendo inestable el ARNm que codifica para las citoquinas; una vez sintetizadas son rápidamente liberadas. Por otra parte, las citoquinas pueden tener diferentes efectos sobre el mismo blanco celular; estos efectos pueden ser simultáneos, tener diferente duración (minutos, horas, días) y además algunas comparten entre sí varias funciones y siendo capaces de estimular o suprimir la producción de otras citoquinas a través de mecanismos reguladores ya sean positivos o negativos.

El Interferon de tipo I (IFN-1) está formado por una familia de 20 estructuras polipeptídicas relacionadas de un peso de 18 kD, codificadas cada una en forma individual. Existen dos clases, IF-alfa e IF-beta; el primero es producido por los fagocitos mononucleares y el segundo se origina en fibroblastos en cultivo. La señal que induce la síntesis de IFN-1 es la infección viral. Ambas clases de IFN-1 no ofrecen gran parecido entre sí, si bien todas las moléculas de IFN-1 se unen al mismo receptor de la superficie celular e inducen la misma respuesta celular. Las acciones biológicas del IFN-1 incluye la inhibición de la replicación viral en la célula infectada por virus y la protección de las células colindantes frente a la agresión viral ; el estado de resistencia anti-viral se denomina estado anti-viral. Otra acción del IFN-1 es aumentar la acción lítica de las células NK anulando a las células infectadas al principio de la infección y antes de inducirse la respuesta inmune específica. Asimismo, el IFN-1 modula la expresión de las moléculas del CMH aumentando la expresión de las moléculas de clase I e inhibiendo las de clase II. Es sabido que los linfocitos T citotóxicos reconocen a los antígenos extraños unidos a las moléculas de clase I, el IFN-1 activa la fase efectora de la respuesta inmune mediada por células aumentando la eficiencia del daño inducido por esos linfocitos. Al mismo tiempo, este IFN puede inhibir en la respuesta inmune la fase de reconocimiento del antígeno y prevenir la activación de los linfocitos T helpers limitados a los antígenos de clase II del CMH.

Además, el IFN-1 inhibe la proliferación celular debido a la inducción de las mismas enzimas que inhiben la replicación viral y de otras que restringen la síntesis de aminoácidos esenciales tal como el triptofano. La acción anti-proliferativa se ha empleado en el tratamiento de ciertos tumores tales como la leucemia de células vellosas y de los hemangiomas infantiles. Por otra parte, se ha empleado en el tratamiento de ciertas formas de hepatitis viral; el IFN- beta se emplea en el tratamiento de la esclerosis múltiple, una enfermedad autoinmune del sistema nervioso que determina lesiones en placas en el tejido llevando a alteraciones neurológicas funcionales en relación a las áreas de esclerosis.

La IL12 es un potente inductor de la producción de IFN-gamma por las células T y NK. Es producida por las células dendríticas y mononucleares, y los

receptores de IL-12 se encuentran en la superficie celular de las células NK, T y en ciertas poblaciones de células B. Entre las acciones biológicas induce a las células NK y T a producir IFN-gamma, actúa como factor de diferenciación sobre las células CD4+ para que se especialicen en células tipo TH1 productoras de IFN-gamma que colabora en la función de fagocitosis. La IL-12 además aumenta la acción citolítica de las células NK y T CD8+, no actúa sobre poblaciones celulares inactivas y puede tener una función en las señales de diferenciación. Por otra parte, es un mediador de la inmunidad natural porque une la activación macrofágica por microbios con el desarrollo de la función efectora NK. Además, la IL-12 establece una fuerte relación entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa específica que facilita una respuesta inmune específica que protege con mayor eficacia contra las infecciones por bacterias y virus. La IL-12 actúa como un coadyu-vante endógeno (los exógenos son productos bacterianos) que recluta macrófagos activados e induce una respuesta inmune específica contra los antígenos. La IL-12 recombinante es empleada en protocolos clínicos como componentes de vacunas para acelerar la protección proveniente de la inmunidad celular.

Por su parte, IL-15 es un polipéptido de 17 kD y constituye una citoquina liberada por las células mononucleares fagocíticas y otras células en respuesta a la agresión viral, a lipopolisacáridos (LPS) y a otras señales que inician la inmunidad innata. La IL-15 es homóloga con la IL-2 y su función primordial es la inducción de la proliferación NK dentro de las 24-72 h de la infección viral. También actúa como factor de crecimiento para la células T porque se une y da señales a través del IL-2R de baja afinidad que se encuentra sobre células T inactivas.

La IL-16 es una citoquina que interviene en la inflamación atrayendo linfocitos CD4+ al foco inflamatorio; la IL-16 es un ligando para CD4 lo que implica que en estos linfocitos actúa como un receptor centinela entre las funciones inmunológicas y las inflamatorias.

La IL-17 es producida por los linfocitos T de memoria activados y está constituida por seis miembros tanto la humana como la IL-17 del ratón. Es el prototipo de una nueva familia de IL habiéndose identificado moléculas que modulan las funciones inmunológicas.

A la IL-18 la producen los macrófagos durante la respuesta adaptativa y conjuntamente con la IL-15 tiene una gran influencia en la respuesta inflamatoria. Estas ILs son importantes para la inducción y perpetuación de la inflamación crónica

El factor de necrosis tumoral (FNT) es el mediador más importante en la infección por bacterias gram-negativas y otros microorganismos a través de la inmunidad innata. Los LPS bacterianos estimulan la función de las células mononucleares fagocíticas y constituyen un activador policlonal de las células B. Esta respuesta colabora para anular la invasión bacteriana; sin embargo,una elevada cantidad de LPS bacterianos causa lesión tisular, coagulación vascular diseminada seguido a veces por shock y deceso del paciente. La reacción de Shwartzman es un modelo experimental para estudiar LPS siendo el principal mediador el FNT. El origen celular de elección del FNT es el fagocito mononuclear activado por LPS, células NK activadas y los mastocitos activados que también secretan esta proteína. El IFN-gamma producido por las células T aumenta la síntesis de FNT a través de fagocitos mononucleares estimulados por LPS. Por lo tanto, el FNT es un mediador de la inmunidad innata y específica y relaciona a la respuesta inmune específica con la inflamación aguda.

REGULACION NEUROENDOCRINA DE LA RESPUESTA INMUNE

El sistema nervioso central (SNC) y el sistema inmune tienen una regulación recíproca mediante señales hormonales y neuronales que el primero envía al segundo a través del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal; el sistema inmune emite sus propias señales hacia el SNC mediante las citoquinas. El sistema nervioso simpático regula al sistema inmune mediante la liberación de neurotransmisores adrenérgicos.

La regulación neuroendócrina del sistema inmune es fundamental para la sobrevida en situaciones de estrés e infecciones, pues modula la respuesta inmune durante el proceso inflamatorio.

Los glucocorticoides son las sustancias efectoras de este sistema neuroendocrino que a través de los receptores para glucocorticoides poseen múltiples efectos sobre las células y las moléculas que intervienen en la respuesta inmune.

Las citoquinas producidas en una inflamación distante al cerebro, actúan sobre el SNC para inducir los síntomas de la enfermedad y la fiebre; las citoquinas pueden producirse en áreas del SNC tales como la glía, neuronas y macrófagos y regular la sobrevida y la muerte de las células nerviosas. Es por ello, que las citoquinas juegan un rol muy importante en las manifestaciones del SIDA neurológico, en la enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, accidente cerebrovascular y en el traumatismo nervioso. Además de este comportamiento como factor de crecimiento en el SNC, las citoquinas a nivel periférico pueden funcionar como hormonas y estimular al SNC; atravesar la barrera hematoencefálica, estimular al cerebro a través del neumogástrico (o vago) y activar a mensajeros secundarios tales como el ácido nítrico y prostaglandinas, etc.

El SNC regula a la respuesta inmune por dos mecanismos: 1.- la respuesta hormonal frente al estrés y la producción de glucocorticoides, y 2.- el sistema nervioso autónomo con la liberación de noradrenalina. Asimismo el SNC regula al sistema inmune localmente a través de los nervios periféricos mediante la liberación de neuropéptidos (sustancia P) y la producción local de hormona liberadora de ACTH.

El efecto de los glucocorticoides sobre la respuesta inmune varía de acuerdo a la dosis. En efecto, la concentración fisiológica (350 nmol/l a 950 nmol/l) como se produce durante el estrés físico y psicológico, modula la transcripción génica involucrada en la inflamación, mientras que a dosis farmacológicas (dosis más elevadas que las fisiológicas) determina una total supresión de la respuesta inflamatoria. La potencia de la inmunosupresión inducida por los glucocorticoides sintéticos (dexametasona), es más intensa que la determinada por los glucocorticoides naturales (hidrocortisona) como se observa cuando suprimen a la IL-12.

Los glucorticoides regulan la transcripción de numerosas citoquinas; suprimen a las citoquinas pro-inflamatorias IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, FNT-alfa e interferon gamma, mientras estimulan a las citoquinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10.

Los glucocorticoides suprimen la maduración, diferenciación y proliferación de las células inmuno-competentes que intervienen en la inmunidad innata, actúan sobre los linfocitos T y B y en la anafilaxia crónica e interfieren con el efecto protector y defensivo de los macrófagos y monocitos. Por lo tanto, los glucocorticoides en los niveles circulantes imputables al estrés, son capaces de reducir el número de monocitos circulantes, inhibir la secreción de IL-1, IL-6, FNT-alfa y de los factores activadores de quimiotaxis de los monocitos, así como impedir la síntesis de colagenasa, elastasa y del activador del plasminógeno tisular.

Por otra parte, pueden causar el cambio de los linfocitos TH1 hacia TH2 mediante la disminución de las citoquinas TH1 que permiten la expresión dominante de las citoquinas TH2. Esta acción es regulada por IL-12 o a nivel de su receptor. Este cambio TH1 hacia TH2, es característico de algunas enfermedades autoinmunes tales como la diabetes mellitus de tipo I, artritis reumatoidea, esclerosis múltiple y lupus eritematoso sistémico. En situaciones donde se produce un incremento en los gluco-corticoides (mujeres en el tercer trimestre de embarazo o en modelos animales de hiperactividad del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal), se ha observado una resistencia relativa a desarrollar enfermedades autoinmunes asociadas a TH1. Por el contrario, la falta de corticoides determina la susceptibilidad de la patología autoinmune asociada a TH1.

Bibliografía

1. Cotran, RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathological basis of disease. WB Saunders Co, p. 188-259, 6th ed., 1999.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: Cellular and molecular immunology. WB Saunders Co, 3rd ed. 1997.
3. Farrar MA, Schreiber RD: The molecular cell biology of IF-gamma and its receptors. Ann Rev Immunol 11: 571-611, 1993.
4. Trinchieri G: Interleukin 12, a pro-inflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptative immunity. Ann Rev Immunol 13: 251-276, 1995.
5. Liew FY, McInnes IB: Role of interleukin - 15 and interleukin - 18 in inflammatory responses. Ann Rheum Dis 61: II 100 – II 102, 2002.
6. Conti P, Kempuraj D, Kandere K, DiGioacchino M: Interleukin-16 network in inflammatory and allergy. Allergy Asthma Proc 23: 103-108, 2002.
7. Aggarwall S, Gurney AL: Il-17: Prototype member of an emerging cytokine family. J Leukoc Biol, 71: 1-8, 2002.
8. Biet F, Locht C, Kremer L: Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. J Mol Med 80: 147-162, 2002.
9. Vasalli P: The pathophysiology of tumor necrotic factor. Ann Rev Immunol 10:411-452, 1992.
10. Gaillard RC. Cytokines in the neuroendocrine system. Int Rev Immunol 17:181-216, 1998.
11. de Rijk R, Sternberg EM. Corticosterone resistance and disease. Ann Med 29:79-82, 1997.
12. de Kloet ER. Stress in the brain. Eur J Pharmacol 405:187-98, 2000.
13. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. Clin Sci 94:557-572, 1998.
14. Joyce DA, Steer JH, Abraham LJ. Glucocorticoid modulation of human monocyte/macrophage function: Control of TNF-alpha secretion. Inflamm Res 46:447-51.

Introducción a la Endocrinología.

Estructura y Función de las Hormonas.

Concepto de Secreción. Producción.

Ricardo Saúl Calandra

Los tejidos especializados funcionan en el organismo de una manera integrada debido a la existencia de tres mecanismos de control interconectados y estos son : 1) el Sistema Nervioso (SN), el cual transmite las señales electroquímicas (neurotransmisores, neurohormonas) entre el cerebro y los tejidos periféricos o bien entre los propios tejidos (circuito reflejo); 2) el Sistema Endocrino (SE), el cual libera mediadores químicos (Hormonas) a la circulación ; y 3) el Sistema Inmune (SI), el que a través de moléculas especializadas (Citoquinas, Factores de Crecimiento, FC) interactúa con el Sistema Endocrino de manera recíproca. (Ej.: células inmunoreactivas secretan Prolactina, β -Endorfinas, etc.) En la Endocrinología clásica, se señalaba al órgano en el cual la hormona se sintetiza, se libera y luego los efectos son ejercidos por dicha hormona. Sin embargo, el SN es capaz de sintetizar y liberar agentes químicos, que actuarán como mediadores o verdaderas hormonas locales y también, distintos tipos de hormonas que ejercerán sus efectos como mediadores neurogénicos en el Sistema Nervioso Central. Por lo tanto, se ha demostrado una estrecha conexión entre el SN y el SE (Ej. el eje hipotálamo-hipofisario), lo que constituye la integración de ambos en una unidad funcional. De la misma manera, existe una significativa interrelación entre el SI y los SN / SE, tanto a nivel fisiológico como en la fisiopatología de distintas patologías. Por último, debe mencionarse el rol que diferentes hormonas pueden ejercer a nivel local, es decir en el sitio donde se sintetizan (Ej. estradiol en el SN Central),

Figura 1. (tomado y modificado de Williams Textbook of Endocrinology, Wilson & Foster, W.B. Saunders Comp, Philadelphia, 1992). Etapas en que las hormonas y factores de crecimiento influencian al organismo.

o en células vecinas (Ej. la testosterona sobre la espermatogenésis) . En este sentido, ha surgido en la comprensión del funcionamiento de los distintos tejidos endocrinos, el concepto de regulación hormonal a través de productos sintetizados en la misma población celular y sin secreción externa (regulación autocrina), la regulación llevada a cabo por productos hormonales sintetizados, secretados y que influencian células vecinas (regulación paracrina) y la regulación ejercida por productos sintetizados y que previamente a ejercer su efecto deben convertirse en otro compuesto en el interior de la célula con el fin de ejercer su acción biológica (regulación intracrina) [(1)].

Las hormonas y FC influencian el organismo a lo largo de la vida en cuatro etapas: a) reproducción, b) crecimiento y desarrollo, producción, c) utilización y depósito de la energía y d) en el mantenimiento de la homeostasis (Figura 1) .

A-Reproducción: regulan no solo el desarrollo de las gametas, sino que también controlan el dimorfismo sexual y funcional y el comportamiento sexual. Es así, que se requiere una precisa y temporal programación genética que posibilite la síntesis y acción de un complejo enzimático en las gonadas, el cual a su vez promoverá la elaboración de una cantidad de Hormonas / Factores, en un período crítico del desarrollo.

B-Crecimiento y Desarrollo: se realiza de manera armónica sobre la base de la interacción de las Hormonas péptidicas, esteroideas y tiroideas. También participan activamente los distintos FC tales como: EGF, TGF α / β , FGF, PDGF, Interleuquina 2, etc, los cuales ejercen su efecto a nivel local.

C-Producción, Utilización y Depósito de Energía: Las Hormonas son los mediadores en el flujo de substratos y la producción ó depósito de energía. Por ejemplo, luego de una ingesta, el exceso de calorías se deposita como glucógeno y grasa bajo la influencia predominante de la insulina (anabolismo); mientras que en el caso opuesto, el ayuno origina que el glucagón y otras hormonas, induzcan la degradación del glucógeno y movilización de los ácidos grasos y aminoácidos con el fin de mantener la glucemia (catabolismo).

D-Mantenimiento de la Homeostasis: Las Hormonas se hallan involucradas en la regulación de la distribución de los líquidos y electrólitos del organismo, tensión arterial, ritmo cardíaco, equilibrio ácido-base, temperatura corporal, masa y distribución corporal de la grasa, desarrollo óseo y muscular.

Interacción de las Hormonas

Los efectos de las Hormonas / Factores, es a través de mecanismos complejos y una sola Hormona puede desplegar distintos efectos en diversos tejidos y en el mismo tejido en diferentes etapas del desarrollo. También es oportuno recordar eventos biológicos que se encuentran bajo la influencia de una única Hormona, mientras que otros requieren la compleja interacción de varias Hormonas / Factores. En el primer caso, se halla una Hormona con acciones múltiples y un ejemplo es la testosterona o dihidrotestosterona (DHT), la cual puede ejercer múltiples acciones tanto en la diferenciación sexual como en la vida adulta. En este caso en particular, el andrógeno se une a proteínas receptoras específicas originando el complejo receptor-hormona, el que se acopla a sitios específicos de unión al ADN en el núcleo celular de los tejidos efectores e induce la síntesis de ARNm específicos (ver Fascículo I, Sección 4). Estos efectos múltiples son modulados por un mecanismo único, si bien debe recordarse que el mismo puede variar según la programación de cada estadio de la diferenciación. En esta dirección, hay que señalar, que ciertas hormonas, tal cuál se expreso previamente, para ejercer su efecto biológico, deben convertirse en otro producto y de esa manera las primeras participan en estos procesos en calidad de Pro-Hormonas (Ej.: la testosterona convertida en DHT estimula la diferenciación de ciertos órganos sexuales accesorios). En el segundo caso, se tiene que la regulación de una función requiere múltiples hormonas. Son ejemplos, el control de la glucemia y la lactancia. En el primer caso, el rol principal lo ejerce la insulina, a través de la producción hepática de glucosa y la entrada de esta a las células. Por otro lado, se hallan el glucagón, adrenalina, cortisol y la hormona de crecimiento (GH), hormonas que elevan los niveles de la glucemia, por medio de un incremento en la glucogenólisis y gluconeogenésis.

La existencia de estos complejos mecanismos de control posibilitan por un lado un ajuste rápido y fino de la función en cuestión y por el otro proveen al organismo de un mecanismo alternativo cuando una de las Hormonas involucradas está en déficit.

Estructura de las Hormonas

En general corresponden a 2 clases, las derivadas de aminoácidos o peptídicas y las provenientes del colesterol.

Peptídicas (según su peso molecular):

Moléculas
- grandes — LH, FSH, hCG, TSH
- intermedias— Insulina, Glucagón
- pequeñas— TRH
- aminas— Catecolaminas, Serotonina, Histamina
- con aminoácidos iodados— Tiroideas
- Esteroideas :
  — ciclo completo del ciclopentaperhidrofenantreno— adrenales / gonadales
  —ciclo ciclopentanoperhidrofenantreno con anillo A abierto — Vit D y sus derivados

Además de su estructura, todas las hormonas comparten un número de características salientes entre las que pueden enumerarse las siguientes:

—existen en la circulación en pequeñas concentraciones (μM, pM, fM)

—existen mecanismos específicos que transportan las Hormonas al sitio de acción donde se hallan las moléculas receptoras: periféricas o membrana externa (Peptídicas) y nucleares (Tiroideas / Esteroideas)

—existen mecanismos que aseguran la entrega de la Hormona al sitio de acción y es por proximidad (Ej. el cortisol de la corteza adrenal sobre la biosíntesis de catecolaminas en la médula)

—existen mecanismos que permiten la entrega de la Hormona por difusión (Ej. la testosterona de las células de Leydig y su acción sobre los túbulos seminíferos en el testículo)

—existen mecanismos enzimáticos adicionales que posibilitan su síntesis en sitios distantes de los tejidos principales (Ej. la biosíntesis de estradiol en el cerebro a partir de andrógenos)

Síntesis, Depósito y Secreción Hormonal

Los mecanismos de síntesis hormonal son diversos. Así las hormonas peptídicas son sintetizadas en el retículo endoplásmico liso como proteínas de tamaño mayor o Pro-Hormonas (con secuencias peptídicas, crípticas, en varios casos sin actividad biológica conocida), las que a posteriori son escindidas y originan moléculas pequeñas y activas (ej. preproPTH ⇒ proPTH ⇒ PTH) . El péptido principal o señal de las Prepro o PreHormona, debido a su naturaleza hidrofóbica, permite que la proteína sintetizada se traslade a través de la membrana del retículo endoplásmico al aparato de Golgi. En esta organela, se completa la cadena polipeptídica y por acción de enzimas proteolíticas se genera la hormona madura y/o agregado de carbohidratos. Así, la hormona es almacenada en gránulos que se fusionan con la membrana celular durante el proceso de secreción y luego la misma es transportada al espacio extracelular (exocitosis).

En el caso de las Hormonas esteroideas, la molécula precursora es el colesterol, el cual proviene de la circulación general a través de las lipoproteínas o bien se sintetiza "de novo" en la propia glándula. Un aspecto importante a considerar, es que las distintas Hormonas no son sintetizadas de manera exclusiva en determinado órgano endocrino, debido a que se ha demostrado que diferentes tejidos poseen los sistemas enzimáticos necesarios para su elaboración. En este sentido, el glucagón se sintetiza no sólo en el páncreas, sino que también lo hace en la pared del tracto gastrointestinal. Por otro lado, existen situaciones donde la Hormona en cuestión no puede ser elaborada por ausencia (gonada y castración previa), pero la síntesis de precursores (testosterona) en otra glándula (adrenal), permite que el cerebro o los adipocitos conviertan al precursor en estradiol.

En cuanto al proceso de liberación o secreción de una hormona de su glándula, este proceso se relaciona a su velocidad de síntesis que a su vez depende en especial de: a) la concentración propia de la hormona, la cual influencia su tasa de síntesis, y b) de su almacenamiento. En general, sólo limitadas cantidades de hormona se almacenan. En conclusión, puede decirse que en casi todos los tejidos que sintetizan hormonas hay una continua síntesis y recambio con escaso depósito.

Transporte hormonal

Este es de dos tipos, es decir el que corresponde a las hormonas solubles las cuales son transportadas en el plasma en solución y las no solubles, que requieren transportadores o carriers y se denominan proteínas transportadoras. La hormona libre o no unida a proteínas, es la que es capaz de poder atravesar la membrana celular. Por lo tanto, la hormona unida se constituye en un reservorio hormonal y se halla en equilibrio dinámico con la pequeña fracción libre. Las principales proteínas transportadoras de hormonas son las siguientes:

a) Pre-albúmina y albúmina, y b) globulinas específicas (TBG, CBG, SHBG). Estas globulinas son glicoproteínas y presentan una serie de características comunes entre las cuales pueden destacarse:

—influencian la Depuración Metabólica de la hormona (cuanto mayor es la capacidad en unir hormonas de las proteínas transportadoras menor será la Depuración. Este proceso se realiza en el hígado o riñón y esta en relación directa con el nivel de Hormona libre)

—las proteínas transportadoras poseen una capacidad mayor que la concentración fisiológica de la hormona

—la tasa de Producción hormonal (ver más adelante) se halla en relación directa con el nivel de hormona libre y por lo tanto la Producción puede ser influida a través de cambios en las proteínas transportadoras.

En que manera las Hormonas son transportadas a través de la membrana celular? En el caso de las peptídicas, las cuales se unen a sitios receptores específicos, el complejo receptor-hormona se internaliza por el mecanismo de endocitosis. Si bien el mismo es activo, es decir requiere energía, no se ha de-mostrado un transporte activo. En lo que respecta a las Hormonas esteroideas, se señala que la Hormona unida a la proteína transportadora, puede selectivamente ser transportada, pero en la mayoría de las situaciones se considera que sólo la fracción libre o bien la unida a la albúmina, la cual posee una tasa de asociación ⇔ disociación rápida y es la que difunde pasivamente y es la fracción biodisponible [2].

Secreción, Producción y Depuración Hormonal

Secreción es la hormona sintetizada por una glándula y que se detecta en mayor concentración en la vena eferente que en la sangre periférica, es decir hay un gradiente de concentración entre el sitio secretor y la periferia. Producción es la suma del compuesto hormonal secretado (Ej. testosterona ovárica) + la cantidad derivada de la conversión periférica a partir de un precursor (Ej. androstenediona ovárica ⇒ testosterona en el hígado). La Tasa de Depuración Metabólica (MCR) representa la cantidad de una Hormona removida de la circulación en condiciones de equilibrio y por unidad de tiempo (L / día) [3,4].

Mecanismos de retroalimentación

Una característica significativa, pero no absoluta, en el sistema endocrino, es el control de la secreción hormonal a través del mecanismo de retroalimentación. Así, se presenta la interrelación entre la hipófisis con las distintas glándulas periféricas (tiroides, adrenal, etc.), la producción hormonal periférica de las mismas interactuando con el sistema hipotálamo-hipofisario y la regulación de la síntesis y liberación de las hormonas tróficas hipofisarias que envían la señal de regulación sobre las glándulas periféricas (Figura 2).

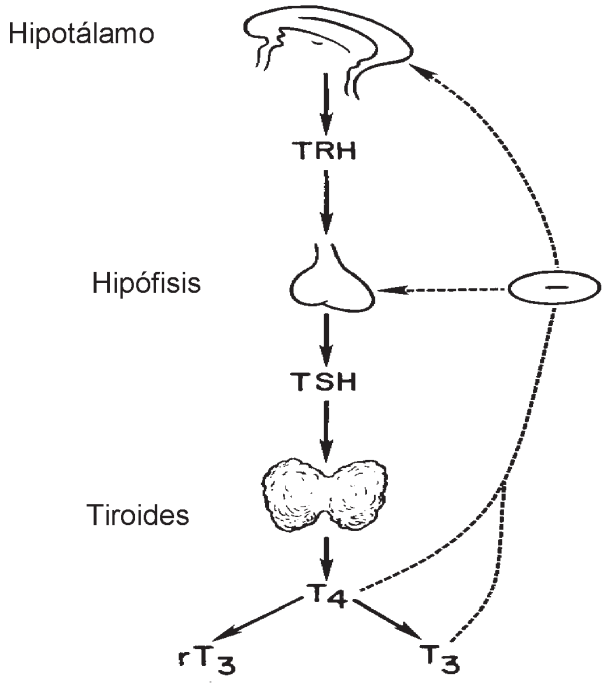


Figura 2. (tomado y modificado de Williams Textbook of Endocrinology, Wilson & Foster, W.B. Saunders Comp, Philadelphia, 1992). Ejemplo de mecanismo de retroalimentación: control de la síntesis y liberación de hormonas

Tal como se indicó más arriba, existen excepciones a este sistema de regulación, y es el caso del rol de los cationes (Ca_2 ⇔ PTH) , metabolitos (glucosa ⇔ secreción de insulina / glucagón), hormonas (somatostatina ⇔ secreción de insulina / glucagón) y el volumen del líquido extracelular (osmolaridad ⇔ vasopresina , Factor Natriurético, aldosterona) .

La interrelación referida al mecanismo de retro-alimentación es la base sobre la cual asienta la exploración dinámica del binomio **hormona ⇔ Efector**, en cada eje y así las distintas patologías pueden ser exploradas no sólo a través de las determinaciones basales sino también de manera complementaria utilizando las Pruebas Dinámicas (ver Fascículo III). Sin embargo, se presentan dos situaciones bien definidas, donde no ha sido posible demostrar un mecanismo de regulación por retroalimentación y es en el control de la secreción hormonal en la Unidad Feto-placentaria y la secreción hormonal ectópica (Tumoral), donde la síntesis y secreción es autónoma.

Bibliografía

1. Saez, JM. Leydig cells : Endocrine,paracrine, and autocrine regulation. (1994). Endoc. Rev. 15: 574-526
2. Parridge, WM. Serum bioavailability of sex steroid hormones (1986). Clin.Endocrinol.Metab. 15: 259-278
3. Baird DT, Horton R, Longcope C, y col. (1969). Steroid dynamics under steady state conditions. Recent. Prog. Horm. Res. 25: 611-663

Cronobiología en Endocrinología

Daniel P. Cardinali

El Reloj de la vida

Como la Tierra rota sobre su eje, ella presenta dos ambientes bien definidos: la luz y la oscuridad. Como el eje de rotación de la Tierra está inclinado, la duración relativa de los periodos de luz y oscuridad cambia sistemáticamente durante el año. Como consecuencia del proceso de la evolución, los seres vivientes han respondido a estas dos situaciones geofísicas desarrollando mecanismos específicos de predicción con el fin de adaptarse exitosamente. Este es el origen de los ritmos biológicos que se repiten cada 24 horas (*circadianos*, del latín *circa*, aproximadamente, y *dies*, día) y de los ritmos anuales, que oscilan sistemáticamente con las estaciones del año. El nombre de circadiano fue dado por la característica de estos ritmos de acercarse, pero no ser exactamente iguales a 24 horas, en condiciones de ausencia de sincronizadores ambientales (ejemplo: en oscuridad permanente). En el hombre este periodo endógeno es de unas 25 horas.

Por lo tanto, cuando los animales cambian entre modos diurnos, nocturnos o estacionales de conducta, no están meramente respondiendo a cambios en las condiciones externas de luz. Por el contrario, responden a señales generadas por un marcapasos interno, sincronizado con los ciclos de rotación de la Tierra por acción de factores ambientales, anticipa las transiciones entre el día y la noche y desencadena cambios fisiológicos y conductuales acordes con ellas. De esta forma, el marcapasos cerebral crea un "día" y una "noche" dentro del organismo, a modo de espejo del mundo exterior. Permite así optimizar nuestra adaptación a un mundo que cambia previsiblemente.

La investigación en animales y seres humanos ha demostrado que sólo unas pocas claves ambientales periódicas, como los ciclos de luz-oscuridad, son efectivas para sincronizar al reloj circadiano a exactamente 24 horas. Así la exposición a la luz natural de cada mañana "adelanta nuestro reloj" una hora en promedio, haciendo que el periodo propio de 25 horas cambie a 24 horas. Además, en los seres humanos, otros factores como el ejercicio físico o la dieta y factores sociales también juegan un papel.

¿Cómo actúan estos factores sincronizadores, *Zeitgebers,* del alemán, dadores de tiempo? Un agente sincronizador puede "resetear", o modificar la fase, del reloj corporal. La variabilidad de la respuesta, que sin embargo es siempre predecible, se ilustra en la "curva de respuesta de fase": dependiendo de cuándo se aplica el estímulo resincro-nizador, los ritmos circadianos son adelantados, atrasados o no se modifican (Figura 1). Es decir, como elemento central del efecto del agente sincronizador sobre la fase de los ritmos existe una variación rítmica en la respuesta del organismo ante él.

En los humanos, la exposición a la luz durante la primera parte de la noche retrasa la fase del ciclo, mientras que ese mismo estímulo, aplicado durante la segunda fase de la noche, la adelanta (Figura 1). En otros momentos del día, la exposición a la luz no ejerce efectos apreciables de adelanto o retraso de la fase del ritmo circadiano. La melatonina, señal química circulante de la noche producida cada día de nuestra vida por la glándula pineal (una verdadera "hormona de la oscuridad"), presenta una curva de respuesta de fase opuesta a la de la luz, con adelantos de fase cuando se la administra en la primera parte de la noche y retrasos en la segunda (Figura 1).

La totalidad de las respuestas fisiológicas presentan ritmos de 24 horas; la diferencia entre estos ritmos es cuándo ocurre su máximo. Tal secuencia y espaciamiento de los valores máximos

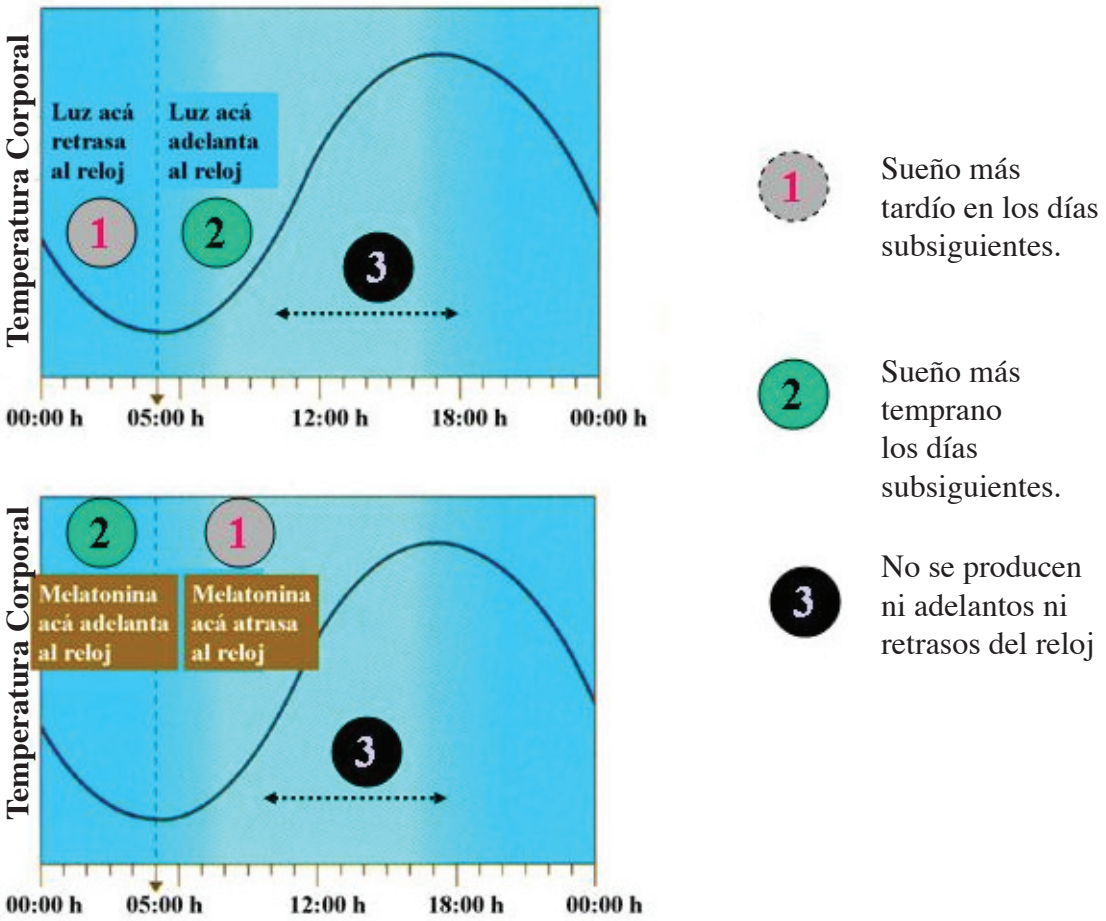


Figura 1. Curva de respuesta de fase ante la luz y la melatonina en el hombre. Los cambios en temperatura corporal marcan la actividad del reloj. La temperatura corporal central alcanza su nadir a las 04:00 – 05:00 h.

diarios revela las ordenadas relaciones causa-efecto en los procesos corporales de toda índole, desde los genómicos a los conductuales, y su normalidad constituye lo que podríamos definir como la quintaesencia de la salud. Estos mapas de fase pueden experimentar transitorias disrupciones cuando el organismo es obligado a hacer un rápido ajuste a un nuevo horario, como el que acaece luego de un vuelo transmeridiano o por el cambio de turno de trabajo. En tales circunstancias las diferentes funciones rítmicas no se adaptan con la misma velocidad y se modifican las relaciones temporales entre ellas. La resincronización requiere unos días (en promedio 1 día por cada hora de desfasaje), y durante este periodo existen alteraciones, que en el caso de los viajeros aéreos, se conocen como *"jet-lag"*

Está hoy establecido que los mecanismos del reloj son genómicos y en los últimos años ha habido un tremendo progreso en la elucidación de las bases moleculares del reloj circadiano. Existen ritmos circadianos en la expresión de genes en todo el reino animal y vegetal y a cada nivel de organización. Se han identificado genes que controlan ritmos circadianos (genes per, tim, frq, clock) y están en estudio los productos de estos genes. Los genes del reloj son una propiedad universal de los seres vivos, tan universal como el ciclo celular. Como existe una homología notable entre los genes involucrados desde la Drosophila hasta los seres humanos puede decirse que estos genes hablan un "idioma común", tan común como el del código genético

En los organismos pluricelulares la expresión genómica circadiana individual de cada célula requiere ser sincronizada por una estructura jerárquicamente superior a fin de dar origen a

los distintos ritmos circadianos. En los mamíferos existe evidencia de que una región del hipotálamo anterior, los núcleos supraquiasmáticos, constituye el marcapasos central para los ritmos circadianos (Figura 2). Estos núcleos, que contienen unos pocos miles de neuronas en el hombre, tienen la propiedad de generar ritmos de 24 horas aun aislados del resto del cerebro. La integridad de estos núcleos es necesaria para la generación y mantenimiento de los ritmos de 24 horas, así como para su sincro-nización por los ciclos de luz-oscuridad. Es decir que si bien las conductas complejas, como el sueño, la vigilia o la alimentación, involucran una gran cantidad de áreas cerebrales funcionando en red, en el caso de los ritmos circadianos la región cerebral participante es única y de volumen insignificante.

La luz ambiental de intensidad adecuada (por ejemplo, la luz natural del amanecer) activa células en la retina, las que a su vez producen, a través de proyecciones neurales específicas (haz retino-hipotalámico), la activación genómica de las neuronas de los núcleos supraquiasmáticos. La información generada en estos núcleos es trasmitida a áreas específicas del hipotálamo basal, que controlan los dos grandes canales de comunicación corporal: los sistemas endocrino y nervioso autónomo (Figura 2).

Remedando a las oligarquías humanas, puede decirse que las "oligarquías neuronales" de los núcleos supraquiasmáticos controlan las oscilaciones genómicas de trillones de células del organismo, monopolizando tanto la información relevante originada en el *Zeitgeber* ambiental (la recibida a través del haz retino-hipotalámico) como los medios de comunicación (los sistemas endocrino y nervioso autónomo). El oscilador maestro es también sincronizado, aunque secundariamente, por estímulos no fóticos, como la actividad física.

Los Cronobióticos

En los últimos años el interés en la manipulación del reloj circadiano humano ha crecido de la mano de la comprensión creciente de las consecuencias de su disrupción, sea por causas intrínsecas (envejecimiento, alteraciones del sueño, ceguera, enfermedades mentales) o exógenas (trabajo en turnos, *"jet-lag"*). Se han propuesto varios procedimientos para modificar las alteraciones del reloj circadiano, entre ellos el desarrollo de un nuevo tipo de fármacos, los "cronobióticos".

La melatonina (5-metoxi N-acetiltriptamina) es el prototipo de los agentes cronobióticos. Nuestro interés en esta molécula data de fines de la década de los sesenta y ha estado desde entonces centrado en el estudio tanto de los factores que controlan su síntesis como de su mecanismo de acción. Este derivado de la serotonina es producido no sólo por la glándula pineal sino también en numerosos tejidos centrales y periféricos. Sin embargo, sólo la melato-nina pineal es la que se vuelca en cantidades importantes a la circulación general.

En el hombre, la información sobre la luz ambiental es transmitida desde la retina a la glándula pineal a través de una vía neural que incluye varias neuronas en serie. La secreción de melatonina está normalmente limitada a las horas de la noche, y este patrón de secreción está regulado de dos formas: i) la luz suprime la producción de melatonina; ii) la secreción de melatonina está bajo el control del oscilador circadiano, mostrando un ritmo cercano a 24 horas en ausencia total de sincronizadores ambientales. Por esta razón, la melatonina puede ser utilizada como un marcador del sistema circadiano (Figura 2).

Hacia fines de los setenta describimos por primera vez en nuestro Laboratorio la existencia de receptores cerebrales para la melatonina en el hipotálamo de

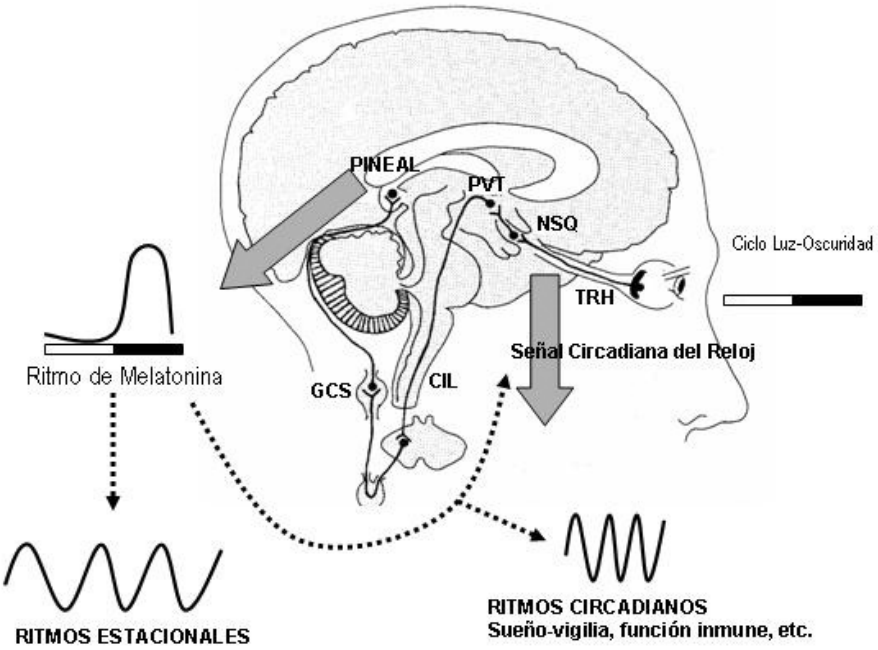


Figura 2. El ritmo de melatonina es señal de sincronización para los ritmos circadianos y estacionales. RHT: haz retino-hipotalámico, que proyecta en forma directa sobre los núcleos supraquiasmáticos (NSQ). Se muestra la vía por la que la luz inhibe la síntesis de melatonina pineal, que incluye a los núcleos paraventriculares (PVT), la columna intermediolateral medular (CIL) y los ganglios cervicales superiores (GCS)

bovinos. Ciertamente, el cerebro es uno de los sitios en los cuales existen procesos sensibles al mensaje temporal enviado por el oscilador circadiano en forma de secreción de melatonina. Asimismo existe hoy evidencia sobre la existencia de receptores para la melatonina en la casi totalidad de los tejidos periféricos por lo que la melatonina parece desempeñar el papel de *"Zeitgeber interno"* exportando la información de tiempo del reloj circadiano a cada célula del organismo (FIGURA 2). También es claro que la melatonina es una molécula de gran versatilidad que ejerce funciones que trascienden las propias circadianas, como el de ser un constituyente de importancia en las defensas antioxidantes.

¿Cómo Mover las Agujas del Reloj?

En los seres humanos se ha estudiado el efecto de cronobiótico de la melatonina en varias situaciones controladas. Por ejemplo, la melatonina es eficaz para corregir los trastornos de sueño en ciegos con ceguera completa, quienes al no percibir la luz presentan desincronización de sus ritmos circadianos. En ausencia de visión luz, estos pacientes muestran un trastorno periódico del sueño con insomnio cada 8 – 12 días, pues el día subjetivo en estas condiciones de libre curso de la oscilación circadiana expresa la periodicidad propia del reloj humano (como hemos visto, de unas 25 horas) y así se atrasa una hora en relación al horario local por cada día transcurrido. La administración de melatonina en el horario de sueño produce un adelanto del reloj (Figura 1) y así corrige el trastorno.

Otra situación de desincronización es la del rápido cambio geográfico por viajes aéreos a través de varios husos horarios, que produce el desacople entre las señales de sincronización del nuevo lugar geográfico y el sistema circadiano del viajero (o *"jet-lag"*). Cualquier viajero necesita algunos días para adaptarse al nuevo horario ambiental, a menos que permanezca en un ambiente totalmente aislado y manteniendo los horarios de su residencia usual. El tiempo que lleva adaptarse al nuevo horario depende tanto de la magnitud del cambio horario como de la fuerza del *Zeitgeber* (por ejemplo, intensidad de luz), pero en promedio es de 1-1.5 h de cambio por día.

Existe importante evidencia que indica que la melatonina es útil para mejorar los síntomas del "jet-lag" en los viajeros aéreos. En un reciente meta-análisis sobre la eficacia de la melatonina se concluyó que tomada a la hora de acostarse en horario de destino, es eficaz en vuelos que cruzan 5 – 8 husos horarios.

En los casos extremos de traslaciones de unos 12 husos horarios (como por ejemplo, los vuelos transpolares que unen Buenos Aires con Sydney) hemos utilizado durante años la combinación de diversas manipulaciones cronobiológicas, incluida la melatonina, para obtener resincronizaciones al nuevo horario en pocos días y aumentar la eficacia de cada uno de estas medidas aplicadas en forma aislada. Tuvimos recientemente la posibilidad de evaluar este procedimiento por primera vez en la bibliografía científica internacional en un grupo de deportistas de elite compuesto por jugadores de fútbol profesional que compitieron por la Copa Intercontinental 2000 en Tokio con el Real de Madrid.

¿Cómo Aumentar las Campanadas del Reloj?

El envejecimiento se caracteriza por cambios en la calidad del ritmo sueño - vigilia. Los estereotipos de disminución del alerta durante el día y despertar de madrugada de las personas mayores a partir de la sexta década de la vida reflejan esos cambios y son reportados por aproximadamente un tercio de los pacientes mayores en consultas médicas. Aunque la atenuación de la amplitud de las "campanadas del reloj" es el cambio más marcado, también se manifiestan avances en fase y desincronización de los ritmos circadianos.

Con el envejecimiento se produce una disminución del ritmo de secreción de la melatonina y de la temperatura corporal. La degeneración de neuronas de los núcleos supraquiasmáticos y la disminución en la amplitud del ritmo de melatonina con la edad podrían relacionarse en el geronte tanto con el insomnio como con cambios de conducta (por ejemplo, disminución de la actividad física). Otros ritmos circadianos, como el de la secreción de cortisol, están también amortiguados con la edad.

Si la deficiencia de melatonina es causa más que marcador del insomnio, el reemplazo mediante la administración exógena de melatonina debiera ser beneficioso. En jóvenes, ello es dudoso. En cambio en pacientes añosos, en los que existe demostrable insuficiencia de melatonina endógena, el tratamiento con melatonina tiene efecto terapéutico.

Esto fue demostrado en pacientes con insomnio sin otros trastornos, en insomnes añosos que sufrían varias afecciones crónicas relacionadas con la edad y recibían otras medicaciones y en enfermos con tratamiento con benzodiacepinas. En estos estudios el reemplazo con melatonina durante 1 a 3 semanas indujo un aumento en la calidad y duración del sueño.

¿Qué tipo de sueño es afectado por la melatonina? Para responder a esta pregunta estudiamos, en colaboración con el Prof. Jaime Monti, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, 10 pacientes (66-86 años), tipificados como insomnio primario crónico. Luego de recoger una muestra de orina para determinar los niveles de 6-sulfatoximelatonina, los pacientes recibieron placebo durante 3 noches, melatonina (3 mg) por los siguientes 14 días y placebo en los últimos 2 días. Se efectuaron polisomnografías en las noches 2-3, 4-5, 15-16 y 17-18. En comparación con la población normal, los pacientes mostraron dificultad en conciliar el sueño y en su mantenimiento, mayor frecuencia de despertares, fragmentación del sueño, desaparición del sueño lento y disminución de la latencia y duración del sueño de movimientos oculares rápidos. La administración de melatonina redujo el tiempo despierto durante el sueño y aumentó la duración del sueño así como su eficiencia. La melatonina produjo también un aumento en el sueño en estadio 2, sin modificaciones en el sueño de movimientos oculares rápidos. Estos resultados avalan la eficacia de la melatonina para recuperar el sueño lento en gerontes. Es de destacar que hormonas anabólicas como la hormona de crecimiento (GH) se liberan durante los episodios de sueño lento, y que la desaparición de sueño lento con la edad es posiblemente responsable de la severa reducción o abolición de la secreción de GH en la vejez.

Bibliografía

1. Albrecht, U. Invited Review: Regulation of mammalian circadian clock genes. J Appl.Physiol 92: 1348-1355, 2002.
2. Cardinali, D. P., G. P. Bortman, G. Liotta, S. Pérez Lloret, L. E. Albornoz, R. A. Cutrera, J. Batista, and P. Ortega Gallo. A multifactorial approach employing melatonin to accelerate resynchronization of sleep-wake cycle after a 12 time-zone westerly transmeridian flight in elite soccer athletes. J Pineal Res 32: 41-46, 2002.
3. Cardinali, D. P. and P. Pévet. Basic aspects of melatonin action. Sleep Med Rev 2: 175-190, 1998.
4. Herxheimer, A. and K. J. Petrie. Melatonin for preventing and treating jet lag (Cochrane Review). Cochrane. Database. Syst.Rev 1: CD001520, 2001.
5. Monti, J. M., F. Alvarino, D. Cardinali, I. Savio, and A. Pintos. Polysomnographic study of the effect of melatonin on sleep in elderly patients with chronic primary insomnia. Arch Gerontol Geriatr 28: 85-98, 1999.
6. Rosato, E. and C. P. Kyriacou. Flies, clocks and evolution. Philos. Trans.R.Soc Lond B Biol Sci. 356: 1769-1778, 2001.

Hormonas. Mecanismos de acción hormonal

Isabel Luthy

de los ritmos Las hormonas esteroides (HS) juegan un rol crítico en el desarrollo, la diferenciación sexual, la reproducción, el crecimiento y el metabolismo. La acción clásica de las HS consiste en efectos "crónicos" o de larga duración, que pueden manifestarse en horas o días, e incluyen cambios en la expresión génica. Las HS ejercen su acción biológica mediante la unión de alta afinidad a receptores específicos, localizados intracelularmente en órganos blanco y que inician la estimulación o la represión de la transcripción de genes específicos de la célula (Shupnik, 1997). Los receptores de esteroides (RS) son factores de transcripción activados por ligando y actúan en general por unión a secuencias específicas del ADN llamadas elementos de respuesta hormonal (HRE) (Beato & Sánchez-Pacheco, 1996). Los RS forman una superfamilia de receptores nucleares, que representa la mayor familia de factores de transcripción conocida en eucariotes (ya se han identificado 48 de ellos en el genoma humano, pero la mayoría son "receptores huérfanos", de los que aún se espera conocer el ligando y a veces también la función). Comprenden a los receptores de estrógenos: RE, progesterona: RP, glucocorticoides: RG, mineralocorticoides: RM y andrógenos: RA. Los RS son proteínas de PM de 80 a 100 kDa, con entre 595 y 984 aa en humanos. Cada unidad monomérica une una única molécula de esteroide, pero los receptores se dimerizan. Son acídicos, asimétricos y están presentes en baja abundancia en las células blanco (0,001% de las proteínas solubles para el RM y 0,1% para el RP). Deben tener alta afinidad para sus respectivas hormonas, dado que las concentraciones séricas típicas oscilan entre 0,1 y 10 nM. Exceptuando a la fosforilación, no se conocen modificaciones covalentes post-transcripcionales.

El análisis de secuencia de aminoácidos (aa) y disección mutacional han demostrado que estos receptores son modulares, es decir, pueden ser divididos en diferentes dominios (Shupnik, 1997).

La zona amino (N) terminal A/B varía significativamente tanto en la secuencia como en su longitud entre los diferentes receptores y las diferentes especies, y es por lo tanto una zona inmunogénica. Usualmente contiene un dominio de trasactivación (AF-1) que activa genes blanco de forma constitutiva. Esta región puede también ser importante para determinar la especificidad de genes blanco en los receptores con diferentes isoformas, que reconocen el mismo HRE. La región central C contiene 8 residuos cisteína conservados que forman complejos con dos iones zinc en arreglos tetrahédricos formando estructuras llamadas "dedos de Zinc", que son responsables del reconocimiento del ADN. Esta zona C se denomina dominio de unión al ADN (DBD), y es la zona más conservada en la superfamilia de receptores. Estos dedos de zinc se unen a los HRE, secuencias de ADN que están ubicadas normalmente en la región 5' de los genes blanco de las hormonas (aunque también han sido identificados en intrones y aún 3' de la secuencia codificante) y se los clasifica como secuencias "enhancer" (Shupnik, 1997). La deleción o mutación de estas secuencias eliminan la respuesta hormonal, y la inserción en un gen que carece de él le confiere respuesta hormonal. El HRE de RG, RM, RA y RP consiste de dos repeticiones cortas (hexaméricas), invertidas, normalmente imperfectas, separadas por 3 nucleótidos y la secuencia es común a todas estas

hormonas. El elemento de respuesta de RE es similar pero diferente, y consiste también de un palíndrome invertido (Tsai & O'Malley, 1994). Una corta secuencia de 5 aa situados en la base del primer "dedo" de Zn (proximal) llamada "caja P" es suficiente para conferir especificidad hacia la familia hexamérica correspondiente a RG o RE. Otra secuencia de 5 aa acídicos en el segundo "dedo" de Zn (distal), llamada "caja D" permite diferenciación funcional dentro de un tipo determinado de respuesta (Shupnik, 1997). Las interacciones específicas entre las bases del promotor y los aa de la "caja P" del DBD del RS se estabilizan por una serie de interacciones no específicas entre aa en las parte N y carboxi- (C) terminales del DBD y los residuos fosfato del ADN (Verrijdt y col, 2003). Luego de la región C, hay una región bisagra (zona D), que puede permitir que la proteína cambie su conformación o se pliegue, y a menudo contiene el dominio de localización nuclear (RG, RP), y/o un dominio de transactivación (receptor de hormona tiroidea, RG). El dominio de unión al ligando (HBD o región E) está localizado en posición C terminal de la región D. Esta zona es relativamente grande (alrededor de 250 aa) y es funcionalmente compleja. Contiene regiones importantes para la asociación con proteínas del shock térmico (hsp), dimerización, localización nuclear, transactivación, represión intra-molecular (RP) y fundamentalmente unión del ligando. En la HBD se ha descripto la región de transactivación dependiente de unión al ligando llamada AF-2. El mayor dominio de dimerización de receptores ha sido localizado en la mitad C-terminal del HBD. Finalmente, localizada en el extremo C-terminal se halla la región F, de función específica no determinada aún. Se han obtenido clones genómicos para la mayoría de estos receptores. Estos genes usualmente contienen ~ 60kb y están interrumpidos por numerosos intrones. Múltiples sitios de iniciación son la regla (Tsai & O'Malley, 1994).

Los RS se recuperan de las células en forma de grandes heterocomplejos (9S) que contienen tanto hsp como inmunofilinas (ver más adelante). Algunas proteínas de este heterocomplejo cumplen funciones conocidas de chaperonas, (hsp70 y hsp90) y una de las funciones críticas de este complejo es la de facilitar el plegado del HBD de algunos receptores (RG y RM) en una estructura de alta afinidad por la hormona. Hsp90 interactúa directamente con el HBD de los receptores nucleares en una asociación que parece dar cuenta de la represión de la regulación de la transcripción por el receptor. Esta represión se anula cuando la hormona se une al receptor y se libera la hsp90 del complejo (Pratt & Toft, 1997). Los RS están constantemente pasando dentro y fuera del núcleo en células que carecen de hormona, y bajo estas condiciones de estado estacionario la mayoría de las moléculas de RG y RM se encuentran en el citosol, mientras que la mayoría de RP, RE y RA en el núcleo (Pratt & Toft, 1997). El complejo de chaperonas existe en el citosol como heterocomplejo multiproteico independientemente de su asociación con los receptores, funcionando como maquinarias de plegado proteico. Este heterocomplejo proteico está formado por múltiples proteínas. La hsp90 es una familia de proteínas ubicuas en eucariotes (hsp90 representa aproximadamente el 1-2% de las proteínas citosólicas). En ausencia de estrés, hsp90 se expresa constitutivamente en células, está muy fosforilada y está localizada predominantemente en el citoplasma y mínimamente en el núcleo. En condiciones de estrés hsp90 migra hacia el núcleo. Una molécula de RS se une a dos moléculas de hsp90. Se supone que la dimerización del receptor ocurre luego de la liberación del heterocomplejo proteico (Pratt & Toft, 1997). La hsp70 es una familia conservada en eucariotes. Varios de los miembros de esta familia están presentes en citoplasma y en organelas donde actúan como chaperonas en el plegado y translocación. Existen dos formas citoplasmáticas, una constitutiva de 73-kDa (dominante) y otra inducible por estrés de 72-kDa (minoritaria). Los miembros de esta familia unen proteínas con gasto de ATP para desenrollar

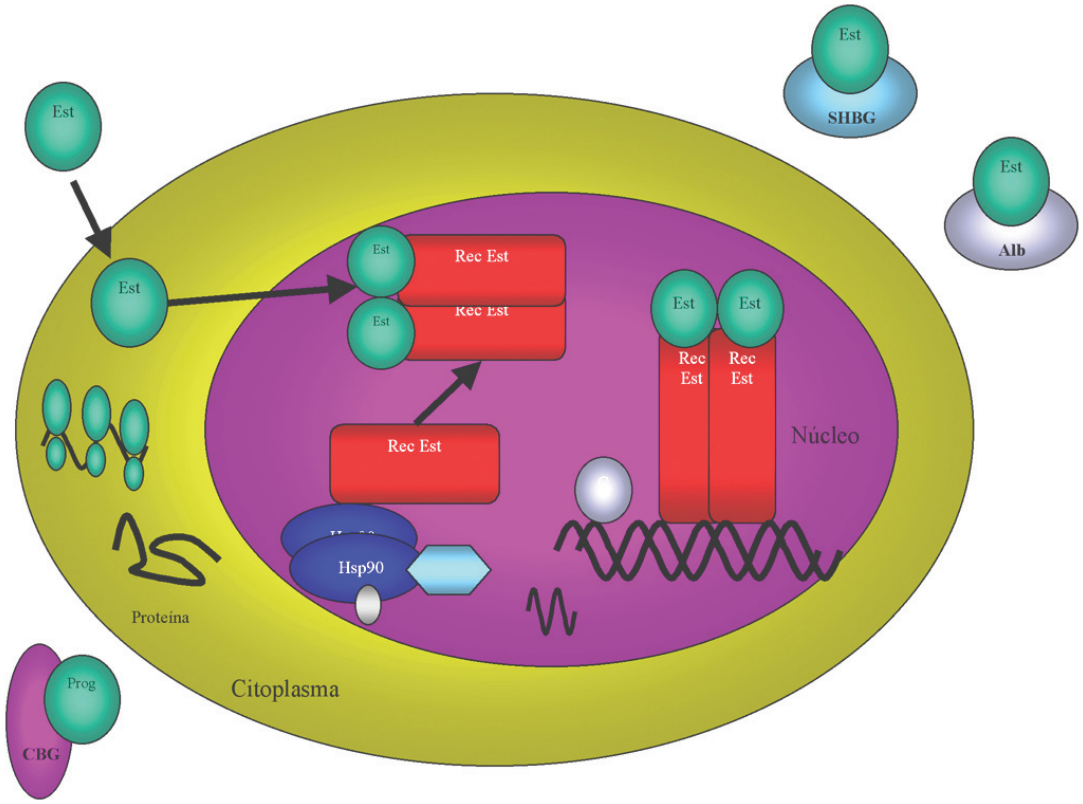


FIGURA : Se muestra en esta figura que las hormonas esteroides (Est) sexuales, estrógenos y andrógenos se hallan unidos a la globulina que une hormonas sexuales (SHBG), mientras que la progesterona (Prog) y los corticoides se unen a la globulina que une corticoides o transcortina (CBG). Todos las hormonas esteroides se unen con baja afinidad a la albúmina (Alb). Una fracción de HS se encuentra libre y es la biológicamente activa, que entra a la célula, llega hasta el núcleo en el caso de los esteroides sexuales o hasta el receptor citoplasmático en el caso de los de gluco y mineralocorticoides. Una vez que se produce la unión del esteroide al receptor si este último es nuclear se produce la separación del receptor del complejo proteico y la dimerización en un elemento de respuesta hormonal. Si el receptor es citoplasmático además se produce la translocación al núcleo. El receptor como dímero interacciona con coactivadores (c) además de la maquinaria básica de transcripción, que no se muestra por claridad. Se produce entonces un aumento en la transcripción de genes regulados por la hormona, y por lo tanto en la síntesis proteica. La respuesta clásica a hormonas esteroides es un incremento de la síntesis de proteínas específicas por la acción genómica de las hormonas.

regiones de proteínas, y la hidrólisis del ATP facilita la liberación de la proteína. La hsp70 interacciona directamente con HBD de los RS. La estequiometría no es clara y en este momento no está claro su rol en el complejo proteico. La p23 se une directamente a hsp90 en un proceso que requiere energía. Hay también inmunofilinas en el heterocomplejo proteico. Estas son proteínas ubicuas y conservadas que unen drogas inmuno-supresoras como FK506 y ciclosporina A. Se ha postulado que una inmunofilina, la FKBP52 puede cumplir un rol en el direccionamiento del receptor hacia el núcleo celular, aunque aún no se ha establecido fehacientemente su función. Se ha postulado un modelo para la formación del heterocomplejo proteico: en el primer paso existe una unión estrecha entre hsp90, la inmunofilina p60 y hsp70 por un lado y el RS por el otro, seguido de disociación de toda la p60 y cantidades variables de hsp70 y unión de p23 que estabiliza el complejo. Se supone que la liberación de p60 deja libre el sitio aceptor de inmunofilinas en el hsp90 para su ocupación por otras proteínas que poseen secuencias de este tipo como FKBP52, FKBP51, CyP-40 o PP5 (Pratt & Toft, 1997).

Mecanismo de acción:

Las HS son moléculas hidrofóbicas que usualmente circulan en la sangre unidas débilmente a proteínas transportadoras séricas como la albúmina o la globulina que une esteroides sexuales, (SHBG, de reducida especificidad para la unión de estróge-nos y andrógenos), o en algunos casos transportadores más específicos como transcortina (CGB, que une glucocorticoides y progesterona). Fisiológica-mente solamente 5-10% de la hormona está en forma libre, siendo ésta la forma que se une a los receptores. Se supone que la hormona libre es capaz de difundir a través de la membrana celular y unirse a los sitios receptores de alta afinidad (Shupnik, 1997). Una vez que la hormona entró en la célula, se produce la unión de la misma con su receptor. Los RG y RM se encuentran en el citoplas-ma, mientras que los de estroides sexuales son nucleares. Al producirse la unión del RS con la hormona correspondiente, se libera el complejo proteico, los RS se dimerizan manteniendo la unión con la hormona, aunque existen evidencias de dimerización en ausencia de HS, (Tamrazi y col, 2002), se translo-can al núcleo en el caso de los receptores citoplas-máticos, y en todos los casos se unen a las secuencias HRE de los promotores de genes regulados por la hormona, aumentando la transcripción de mensajeros específicos, que luego serán traducidos a proteínas. La mayoría de los genes regulados por hormonas posee un "TATA box", que indica el sitio de inicio de la transcripción. Para iniciar la transcripción, es necesario reclutar en el promotor los factores generales de transcripción y la ARN polimerasa II ya sea en forma secuencial o en la forma de una holoenzima (Lee & Chang, 2003). Los RS son capaces de interactuar con numerosos componentes de la maquinaria transcripcional general. Además se han descripto una serie de factores intermediarios de la transcripción, coactivadores o adaptadores transcripcionales para casi todos los RS (Gao y col, 2002). Se ha demostrado que los activatores estimulan una o más etapas del ciclo de transcripción por comunicación directa o indirecta con los factores generales de la transcripción. Además, los activatores pueden interactuar también con factores auxiliares, llamados coreguladores, aumentando el reclutamiento de la maquinaria general de transcripción en el promotor. Se sugirió que el mecanismo de activación de la transcripción podría involucrar interacciones directas de los activadores con los coreguladores y/o los factores generales de la transcripción (Lee & Chang, 2003). Se propone el siguiente modelo de acción de coreguladores: una vez que el RS se une a la hormona, se produce un cambio conformacional en el HBD que permite el reclutamiento de coactivadores, que a su vez facilitan la interacción más efectiva del receptor con la maquinaria transcripcional basal y se activa la transcripción. En cambio, cuando se une un antagonista, el cambio conformacional es diferente y el resultado es que si bien en algunos casos existe dimeriza-ción y unión al HRE en el ADN, no puede desalojarse a los posibles corepresores presentes resultando en una interacción no productiva con la maquinaria transcripcional basal. En el caso de agonistas/antagonistas parciales, la activación de la transcripción puede ser resultado de la relación relativa coactiva-dores/corepresores en una célula determinada (Shibata y col, 1997). La especificidad de expresión de receptores en células o de tejidos específicos, el metabolismo hormonal, el reclutamiento diferencial de cofactores, los factores de transcripción dependientes de secuencia y finalmente, el reconocimiento diferencial del ADN probablemente actúan conjuntamente generando respuestas dependientes de hormona in vivo, aún en los caos en el que el HRE es común para diferentes receptores (Verrijdt y col, 2003). Basándose en estudios moleculares y bioquímicos intensivos acerca de los mecanismos de transcripción, se sugirió que por lo menos el RA es capaz de incrementar además

la eficiencia de la elongación transcripcional en los genes blanco de andrógenos, además del tiempo de permanencia de la ARN polimerasa II en el promotor del gen blanco (Lee & Chang, 2003). Por otro lado las HS, juegan un rol importante en la estabilización de los mensajeros regulados por estas hormonas (Pascall, 1997).

Por otro lado, el ADN eucariote está organizado en forma de cromatina dentro de la célula. La forma básica de la cromatina es el nucleosoma, La estructura del nucleosoma puede ocultar determinados elementos de reconocimiento en el ADN, impidiendo la unión de los factores de trascripción correspondientes. Se cree que la unión de la hormona puede provocar un corrimiento o desorganización del nucleosoma en la región HRE, desenmascarando entonces los sitios de reconocimiento y facilitando así la unión de los factores de trascripción a esas secuencias (Beato & Sánchez-Pacheco, 1996). Para que la transcripción pueda iniciarse es necesario que la estructura de la cromatina alrededor de la región HRE en el promotor del gen blanco se reorganice. La acetilación de los residuos lisina en el extremo N terminal de las histonas desestabiliza los contactos entre el ADN y las histonas en los nucleosomas y permite el acceso de las proteínas que unen ADN (Lee & Chang, 2003). En contraste con la acetilación de histonas, la desacetilación de las mismas por la histona deacetiltransferasa lleva a la condensación de las estructuras nucelosomales provocando represión de la transcripción (Lee & Chang, 2003).

Isoformas de receptores:

La mayoría de los RS se expresan en diferentes isoformas y variantes de esas isoformas. Por ejemplo, estudios "in vitro" han demostrado que tanto en tejido de mama normal como tumoral se expresan varias variantes de "splicing" de ambas isoformas (α y β) del RE además de la forma salvaje (Poola y col, 2002). El RP posee también dos isoformas, A y B. Estas dos isoformas se transcriben de diferentes promotores inducibles por estrógenos, pero ambos promotores están en un único gen de RP; poseyendo la isoforma B los primeros 164 aa que están ausentes en la isoforma A (Giangrande & McDonnell, 1999).

Fosforilación de receptores:

Los RS que están unidos a hsp, están fosforilados basalmente, y exhiben un incremento de la fosforilación cuando se produce su unión del ligando. Las quinasas dependientes de cAMP y MAP pueden fosforilarlos. Se ha descripto que la fosforilación influencia la unión al ADN, la activación transcrip-cional, y la estabilidad de los receptores, aunque la regulación de la actividad de RS por fosforilación es compleja. Como en la mayoría de los factores de transcripción, ninguno de los sitios de fosforilación se comporta como una llave prendido/apagado (Weigel, 1996).

Receptores de membrana:

Además de las acciones descriptas a nivel genó-mico, se han encontrado una serie de efectos muy rápidos (de milisegundos a minutos) de las hormonas en los órganos blanco que no son compatibles con los mecanismos genómicos clásicos. Los mecanismos implicados en la acción de esteroides incluyen influencias no específicas sobre la bicapa lipídica, unión específica a sitios de unión de membrana, interacción con otros receptores de membrana, modulación directa de complejos entre canales iónicos y neurotransmisores (como ciertos receptores de GABA) y activación directa de sistemas de segundos mensajeros (Moss y col, 1997). La mayoría de los trabajos realizados sobre

efectos rápidos de estrógenos en el sistema nervioso central indicarían la existencia de otro RE, o de otra isoforma del REα asociados a la membrana (Kelly & Levin, 2001). Se han descripto acciones no genómicas mediadas por hormona para cada tipo de esteroide, incluyendo progestágenos, andrógenos y estrógenos. Ejemplos de estas respuestas biológicas incluyen la proliferación de líneas celulares de mama inducida por estrógenos, la dilatación de los vasos sanguíneos mediada por estrógenos y la activación de la reacción acrosomal inducida en espermatozoides por progesterona (Hammes, 2003). Uno de los dos RE de membrana podría ser la expresión del mismo transcripto que para un RE nuclear, mientras que los RM y RP parecen ser productos de genes diferentes que los de los receptores nucleares. Existen también interfaces de mecanismos no genómicos y genómicos para esteroides. Por ejemplo, para los mecanismos no genómicos, los estrógenos pueden promover fosforilación en serina del RE nuclear, pudiendo de esta manera alterar la actividad transcrip-cional de estos receptores nucleares (Davis y col, 2002). Muy recientemente, se han clonado 14 genes de diferentes especies que codifican para receptores de progesterona que están localizados en la membrana plasmática y que tienen tanto los 7 dominios transmembrana como un dominio extrace-lular N terminal y un dominio intracelular C terminal típicos de los receptores acoplados a proteína G (Zhu y col, 2003). Se ha demostrado además un único sitio de unión de alta afinidad y saturable para pro-gesterona en algunas de estas proteínas. Estudios adicionales en uno de estos receptores mostró que la unión es específica para progestágenos y fácilmente desplazable. Más aún, la cinética de asociación y disociación es rápida (ocurre en unos pocos minutos), lo cual es típico de RS de membrana. Es muy interesante que varios progestágenos y anti-progestágenos sintéticos, que tienen una alta afinidad de unión al RP nuclear, no muestran afinidad por el RP de membrana estudiado (Zhu y col, 2003).

Bibliografía

1. Beato, M., Sánchez-Pacheco, A. (1996). Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. Endocrine Rev. **17:** 587-609.
2. Davis, P.J., Tillmann, H.C., Davis, F.B., Wehling, M. Comparison of the mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone and steroid hormones. J Endocrinol Invest (2002) **25:** 377-388.
3. Gao, X., Loggie, B.W., Nawaz, Z. (2002). The roles of sex steroid receptor coregulators in cancer. Molecular Cancer **1:** 7.
4. Giangrande, P.H., McDonnell, D.P. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. Recent Prog Horm Res (1999) **54:** 291-313.
5. Hammes, S.R. The further redefining of steroid-mediated signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2003) **100:** 2168-2170.
6. Kelly, M.J., Levin, E.R. (2001). Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. Trends Endoc. Metab. **12:** 152-156.
7. Lee, D.K., Chang, C. Molecular communication between androgen receptor and general transcription machinery. J. Ster. Biochem Mol. Biol. (2003) **84:** 41-49.
8. Moss, R.L., Gu, Q., Wong, M. (1997). Estrogen: nontranscriptional signaling pathway. Rec. Progr. Horm. Res. **52:** 33-69.
9. Pascall, J.C. (1997). Post-transcriptional regulation of gene expression by androgens: recent observations from the epidermal growth factor gene. J. Mol. Endocrinol. **18:** 177-180.
10. Poola, I., Abraham, J., Liu, A. Estrogen receptor beta splice variants mRNAs are differentially altered during breast carcinogenesis. J. Ster. Biochem. Mol. Biol. (2002) **82:** 169-179.
11. Pratt, W.B., Toft, D.O. (1997). Steroid receptor interaction with Heat Shock Protein and immunophilin chaperones. Endocrine Reviews **18:** 306-360.
12. Shibata, H., Spencer, T.E., Oñate, S.A., Jenster, G., Tsai, S.Y., Tsai, M-J., O'Malley, B.W. (1997). Role of co-activators and co-repressors in the mecanism of steroid/thyroid receptor action. Rec. Progr. Horm. Res. **52:** 141-165.
13. Shupnik, M.A. (1997). Steroid & thyroid hormone receptors. En: 1997 Syllabus. Introduction to molecular & cellular research. The Endocrine Society.
14. Tamrazi A, Carlson KE, Daniels JR, Hurth KM, Katzenellenbogen JA. (2002). Estrogen Receptor Dimerization: Ligand Binding Regulates Dimer Affinity and Dimer Dissociation Rate. Mol Endocrinol **16:** 2706-19.
15. Tsai, M-J, O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. Annu. Rev. Biochem. **63:** 451-486.
16. Verrijdt, G., Haelens, A., Claessens, F. Selective DNA recognition by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific regulation of gene expression. Mol. Genetics Metab. (2003) **78:** 175-185.
17. Weigel, N.L. (1996). Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. Biochem. J. **319:** 657-667.
18. Zhu, Y., Bond, J., Thomas, P. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2003) **100:** 2237-2242.

Receptores de Membrana

Guillermo Juan Juvenal

Los receptores de membrana son muy similares entre si y fueron originados a partir de genes comunes ancestrales. Su función es reconocer estímulos ambientales (olores, luz, moléculas gustativas, etc.) así como señales intercelulares (neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento, etc.). Estos receptores pueden ser clasificados de acuerdo a sus estructuras y a las funciones que cumplen: receptores asociados a Proteína G, receptores asociados con actividad enzimática y receptores unidos a canales iónicos (Tabla 1).

Receptores asociados a proteína G

Son los más comunes. Esta familia está compuesta por unos 1000-2000 tipos de receptores diferentes y responden a señales tan diversas como las mencionadas anteriormente. Todos comparten una estructura común: un polipéptido que posee siete dominios de transmembrana (Figura 1) y el mecanismo de transducción es a través de su acoplamiento a proteína G.

Tabla 1.
Clasificación de los receptores de membrana

1) Receptores asociados a proteína G
2) Receptores asociados con actividad enzimática
   a) Receptores tirosina quinasas
   b) Receptores asociados a tirosina quinasa
   c) Receptores con actividad de fosfatasas
   d) Receptores serina/treonina quinasas
   e) Receptores con actividad guanilato ciclasa
3) Receptores canal

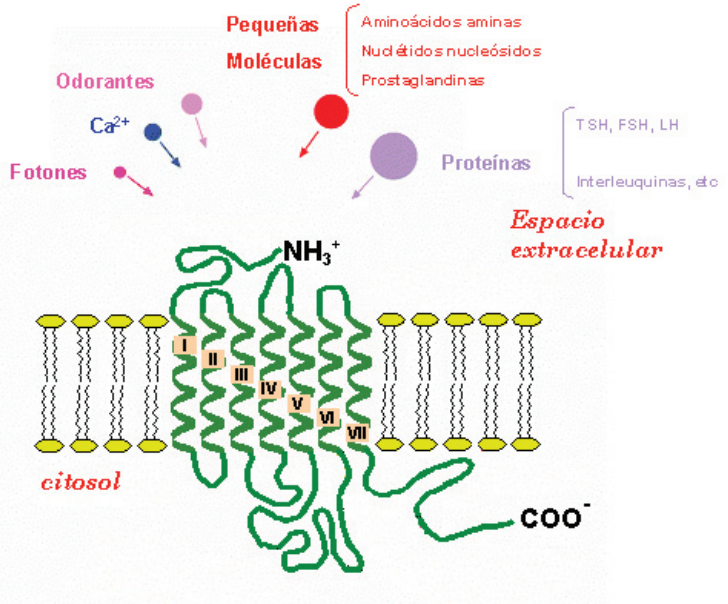


Figura 1. Estructura de los receptores asociados a proteína G

Ésta es un heterotrímero (subunidades α, β, γ) que une nucleótidos de guanina. La subunidad α une con alta afinidad GTP y tiene actividad de GTPasa. Al unirse el ligando (por ej. hormona) al receptor este sufre un cambio conformacional que resulta en la activación de la proteína G liberando GDP y uniendo GTP por parte de la subunidad α. A continuación esta subunidad se disocia del dímero β γ y tanto la subunidad α como el dímero β γ pueden modular diferentes señales intracelulares a través de segundos mensajeros: estimulación o inhibición de la adenilato ciclasa, fosfolipasas, actividad de canales de Ca^{2+} y K^{+}, etc. Una vez que el GTP es hidrolizado a GDP la subunidad se reasocia al dímero para reformar la proteína G inactiva. (Figura 2)

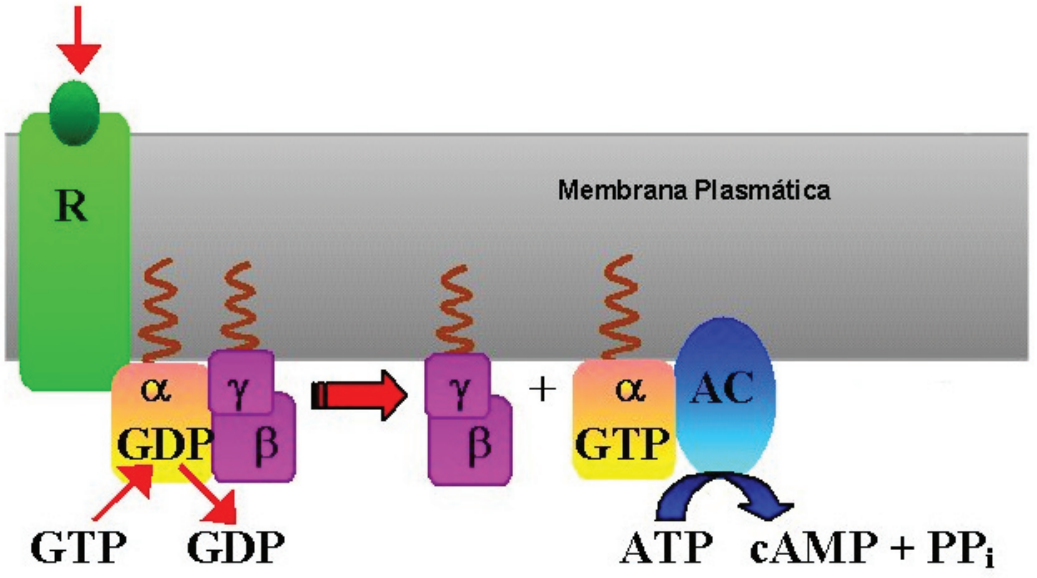


Figura 2. Activación de la proteína G

AMP cíclico (AMPc) como segundo mensajero

La adenilato ciclasa, activada por la proteína G estimulatoria (Gs), cataliza la síntesis de AMPc a partir de ATP. La concentración normal de AMPc dentro de la célula es de 10^{-7} M pero ante un estímulo, ésta puede aumentar hasta 20 veces en pocos segundos. El AMPc generado interactúa con las subunidades reguladoras de la proteína quinasa A (PKA). Esta se halla compuesta por cuatro subunidades (dos reguladoras, R y dos catalíticas, C). Al interactuar se liberan las subunidades C las cuales se encargan de fosforilar a diferentes proteínas que como consecuencia de este proceso cambian su actividad, por ej. factores de transcripción. Algunas de ellas también son proteínas quinasas, que a su vez fosforilan a otras proteínas, dando como resultado una amplificación de la señal. A su vez, estas proteínas son defosforiladas por las fosfatasas de serina/treonina, permitiendo que las actividades enzimáticas estén balanceadas.

Los substratos de la PKA difieren en los distintos tipos de células explicando la razón por la cual el AMPc posee diferentes efectos de acuerdo al tipo celular. Las fosfodiesterasas de AMPc lo hidrolizan a 5´AMP inactivando la señal.

Otra proteína G inhibitoria (Gi), como su nombre lo indica inhibe la adenilato ciclasa, aunque actúa principalmente regulando canales iónicos mas que a través de una reducción del AMPc.

Existen varias isoformas de las proteínas Gs y Gi.

Resumiendo: la unión de la hormona al receptor hace que la proteína G se active, ésta regula la actividad de la adenilato ciclasa, estimulándola o inhibiéndola, según se trate de Gs o Gi.

Mutaciones en la subunidad Gα pueden ocasionar una activación constitutiva de la señal y estar involucradas en el desarrollo de tumores y síndromes como por ej. el de McCune Albright que será descripto en otro capítulo. En forma inversa ciertas mutaciones pueden provocar una pérdida de la función, originando, entre otros cuadros, la osteodistrofia hereditaria de Albright, cuadro caracterizado por baja estatura, obesidad, bradicardia, déficit mental, etc.

¿Por qué del efecto estimulador del café?

El café contiene cafeína que es una xantina. La cafeína inhibe la fosfodiesterasa y por lo tanto aumentan los niveles de AMPc. Los efectos de la adrenalina, que actúa a través de un receptor acoplado a proteína G, se prolongan en el corazón; como consecuencia: provee más oxígeno al cerebro y al resto de los tejidos.

Fosfoinositoles como segundos mensajeros

Los receptores asociados a proteína G pueden activar también a la enzima fosfolipasa C-β que se encuentra en la membrana plasmática (la proteína G involucrada es la Gq). Esta enzima actúa sobre el fosfatidil inositol 4,5-bifosfato [PI(4,5)P2], clivándolo en dos productos: el inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol. El IP_3 generado es una molécula hidrofílica y difunde al citosol actuando en el retículo endoplásmico a través de la interacción con canales liberadores de Ca^{2+} (Figura 3). Este catión es liberado, aumentando las concentraciones en el citosol (las concentraciones normales son 10.000 veces menor que la concentración extracelular) y como consecuencia se regulan diversas funciones celulares.

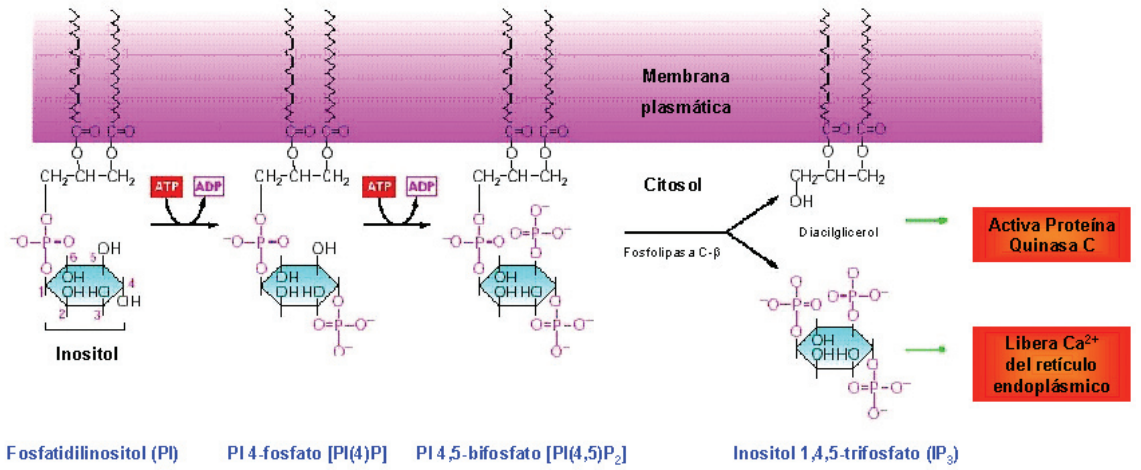


Figura 3. Activación de la señal del fosfatidilinositol

El diacilglicerol que se encuentra en la membrana puede ser clivado y liberar ácido araquidónico o bien activar la proteína quinasa C (PKC). Esta enzima por efecto del Ca^{2+} inducido por IP_3 migra del citosol a la membrana plasmática. Una vez activada fosforila a diferentes proteínas. En este mecanismo de acción, similar al AMPc la señal se transmite en segundos y se inactiva también rápidamente. El IP_3 es inactivado por defosforilación para formar IP_2 o puede ser fosforilado a IP_4.

La calmodulina es un receptor para Ca^{2+}, y una vez acomplejado a éste, puede modular la función de proteínas intracelulares algunas de las cuales son Ser/Tre quinasas.

Mutaciones en receptores acoplados a proteína G

Receptores acoplados a proteína G mutados pueden adoptar conformaciones activas adquiriendo ganancia de función y actuando como si el ligando estuviera permanentemente unido o por el contrario dichas mutaciones provocan resistencia a su ligando. Muchas de estas mutaciones provocan enfermedades diversas (algunas de las mencionadas serán tratadas en otros capítulos) tales como retinitis pigmentosa (rodopsina), pubertad precoz (rLH), adenomas tiroideos (rTSH), hipocalcemia (rCa^{2+}) entre las activantes y diabetes insípida nefrogénica ligada al X (r vasopresina V2), pseudoherma-froditismo masculino (rLH), hipotiroidismo (rTSH) entre las de resistencia.

Las células poseen varios mecanismos para desensibilizarse o adaptarse a altas concentraciones del ligando durante un tiempo prolongado. Este tipo de receptores se pueden desensibilizar en tres formas diferentes: a) inactivación del receptor b) secuestro del receptor por internalización del mismo d) destrucción en lisosomas. En todos los casos este proceso depende de la fosforilación del receptor por PKA, PKC o quinasas de receptores unidos a proteína G (GRKs).

Receptores asociados con actividad enzimática

En organismos superiores existen varias clases de receptores asociados con actividad enzimática: a) Receptores tirosina quinasas; b) Receptores asociados a tirosina quinasa; c) Receptores con actividad de proteína fosfatasa; d) Receptores serina/treonina quinasas y e) Receptor guanilato ciclasas.

Receptores tirosina quinasas: los correspondientes a insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas o factor de crecimiento epidérmico, fosforilan tirosinas específicas de proteínas intracelulares. Los ligandos al unirse inducen la dimerización del receptor incrementando su actividad de proteína quinasa y llevando en ciertos casos a la fosforilación del mismo receptor (autofosforilación). La mayoría de estos receptores consisten en una sola cadena proteica, mientras que otros, como el de insulina, son dímeros consistentes en dos pares de cadenas polipeptídicas.

La autofosforilación además de aumentar su actividad catalítica origina sitios específicos de unión para otras proteínas que transmiten señales intracelulares. La mayoría de éstas contienen dominios denominados SH2 que interactúan con la quinasa fosforilándose y por lo tanto activándose. Algunas de estas proteínas, no tienen actividad propiamente dicha pero sirven para que otras proteínas se acoplen al complejo. Una de las proteínas que participa en este complejo de activación es la fosfolipasa Cγ. Ello conduce a un aumento en el sistema de transducción de fosfoinositoles, mencionado anteriormente por un mecanismo diferente (fosfolipasa Cβ). Otras proteínas adaptadoras (Grb-2) sirven para acoplar a los receptores la proteína Ras. Esta proteína pertenece a una familia de GTPasas monoméricas y está involucrada en el crecimiento y proliferación celular. En un porcentaje considerable de tumores se encuentran mutaciones activantes de Ras. La secuencia de eventos se puede observar en la Figura 4.

El receptor una vez activado se acopla a la proteína Grb-2, ésta se une a GEF que promueve el intercambio de GTP por GDP activando Ras. Esta proteína a su vez, activa una serie de quinasas (serinas/treoninas quinasas), la última de las cuales es la MAP quinasa (**m**itogen **a**ctivated **p**rotein kinase). Una vez activada la MAP quinasa se activan otras quinasas y/o proteínas así como la expresión de diversos genes de respuesta rápida. Según la señal, las MAP quinasas son activadas por períodos cortos de tiempo (minutos) o períodos más largos (horas). Otro de los pasos intracelulares involucrados es la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa), que como su nombre lo indica fosforila fosfatidilinositoles mas que proteínas y esta quinasa también puede ser activada por otro tipo de receptores.

Los receptores para insulina e IGF1 difieren en cuanto a que son tetrámeros y al unirse el ligando induce un rearreglo en el dominio con actividad de quinasa. Esto será detallado más adelante cuando se trate el mecanismo de acción de la insulina.

Receptores asociados a tirosina quinasa: estos receptores no tienen actividad enzimática pero se asocian a proteínas con actividad de tirosina quinasa. Se deben oligomerizar para funcionar y el mecanismo de señalización es similar al caso anterior. Entre estos receptores encontramos los correspondientes a las citoquinas. Estos receptores están asociados a tirosinas quinasas citoplasmáticas llamadas Jaks (Janus quinasas), las cuáles activan a otras proteínas llamadas STATs que tras la unión de la citoquina u hormona migran al núcleo y regulan la expresión de diversos genes.

Receptores con actividad de fosfatasas: tal cual se comentó anteriormente existen fosfatasas que remueven grupos fosfatos de proteínas conteniendo serinas/treoninas fosforiladas. Los receptores aquí mencionados remueven grupos fosfatos de tirosinas

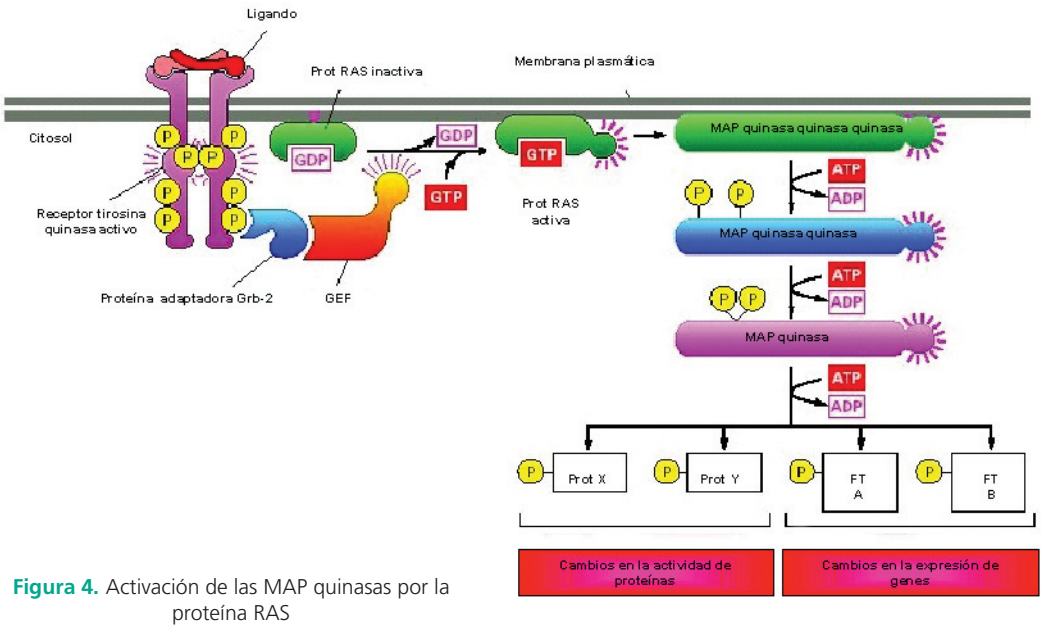


Figura 4. Activación de las MAP quinasas por la proteína RAS

de proteínas intracelulares. Sin embargo, estas moléculas no deberían ser consideradas como receptores pues todavía no se han encontrado sus ligandos. En estudios utilizando mutantes carentes de estas fosfatasas, se ha observado una alteración en la respuesta a antígenos.

Receptores serina/treonina quinasas: en este grupo encontramos, entre otros, a los receptores para la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF-β).

Receptores con actividad guanilato ciclasa: al unirse el ligando (por ej., péptidos natriuréticos) se activa la actividad guanilato ciclasa del receptor con la consecuente síntesis de GMP cíclico (GMPc) el cual se une y activa a la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG). Esta quinasa fosforila diversas proteínas en serina y treonina. Por otro lado, existe otra guanilato ciclasa soluble que es activada por el óxido nítrico (NO). Este gas es formado como consecuencia de la acción de neurotransmisores y hormonas y la posterior activación de la óxido nítrico sintasa que cataliza la deaminación de la arginina para que se forme el NO.

Receptores canal

Existen otros receptores que funcionan de un modo muy distinto a los descriptos anteriormente; y entre ellos se encuentran los receptores para glicinas, un tipo de receptor para GABA, otro para acetilcolina, etc. Estos receptores al activarse a través de la unión con su ligando funcionan como canales permitiendo el paso de iones en forma selectiva a través de la membrana plasmática (Figura 5).

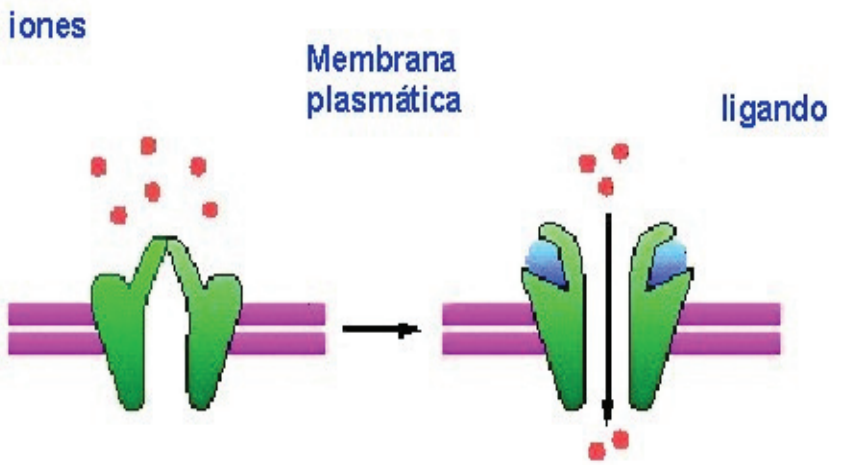


Figura 5. Receptores con actividad de canales iónicos

Las fosfodiesterasas (PDE)

Las fosfodiesterasas regulan negativamente a los nucleótidos cíclicos y funcionan como sensores, controlando el acceso de los segundos mensajeros a sus efectores intracelulares. La actividad de la PDE además de estar regulada por interacciones proteína-proteína se regula a través de fosforilaciones. Así, por ejemplo en adipocitos la activación de la fosfodiesterasa PDE3 es central a la acción antilipolítica de la insulina. Este paso involucra a la activación de la fosfatidilinositol 3 quinasa, activación de la proteína quinasa B y fosforilación/activación de la PDE3B. Consecuentemente, la disminución del AMPc y la inactivación de la PKA causan la defosfo-rilación de la lipasa hormona dependiente disminuyendo la hidrólisis de triglicéridos.

Más aún, en las células β del páncreas, IGF-1 y leptina, reducen la secreción de insulina dependiente de glucosa a través de la activación de PDE3B, implicando una interrelación en la regulación de la secreción de insulina. En la actualidad se está evaluando la posibilidad de utilizar inhibidores de la PDE3 como secretagogos de insulina.

Una activación patológica de las PDE podría llegar a ser responsable de una resistencia hormonal, y esto se ha observado en modelos animales. En pacientes con retinitis pigmentosa, se han encontrado mutaciones en las subunidades de la PDE. El sildenafil (Viagra), un inhibidor de la PDE5, utilizado en la clínica andrológica, aumenta los niveles de GMPc con la consecuente acción vasodilatadora e inducción de la relajación muscular.

En esta sección se han presentado en forma breve, los mecanismos de acción a través de receptores de membrana. Si bien cada ligando puede activar una de las vías descriptas, existe una interrelación entre las mismas y así se puede observar en la Figura 6, en la cual se han eliminado algunas de las vías intracelulares, para simplificar.

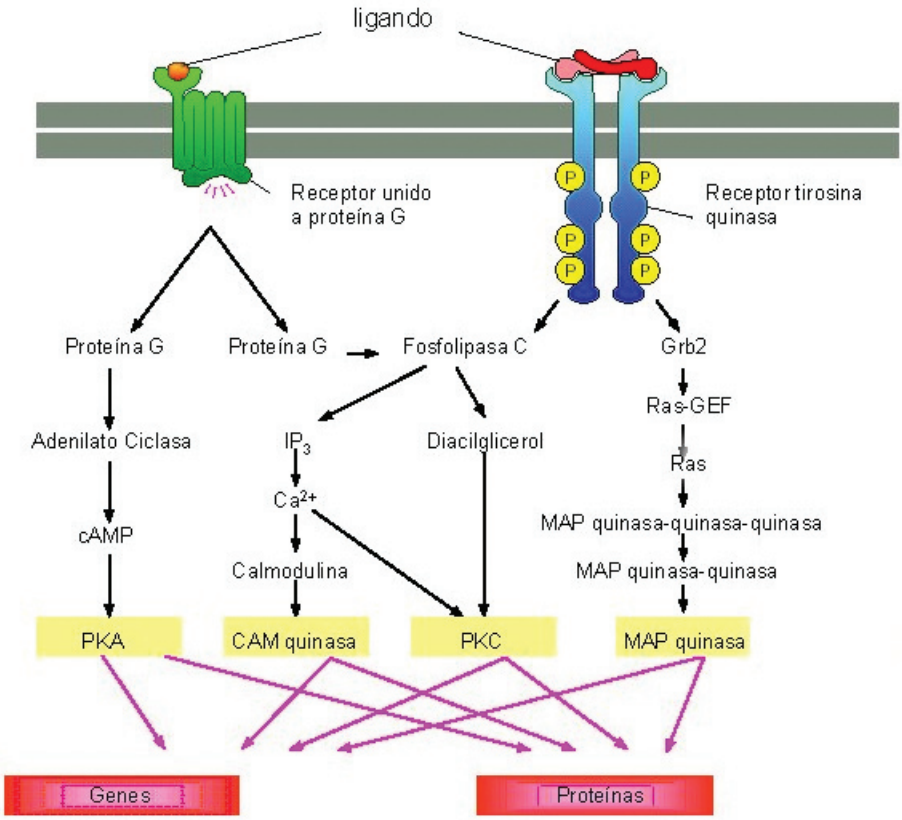


Figura 6. Interrelación de diferentes señales activadas por receptores unidos a proteína G y por receptores tirosina quinasas

A lo largo de los diversos capítulos se describirán los mecanismos de acción de cada hormona en particular y su implicancia en la correspondiente fisiopatología.

Nota: *Las figuras se han modificado de M.A. Wall y de Mol. Biol. of the Cell, 2003.*

Bibliografía:

1. Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors.Parnot Ch, Miserey-Lenkei, Bardin S, Corvol P y Clauser E. Trends in Endocrinol and Metabol. 13 (8) 336-343, 2002.
2. G proteins mutations in endocrine diseases. Lania A, Mantovani G and Spada A. European J. of Endocrinol 145: 543-559, 2001.
3. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways Regulation and Physiological Functions. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B, Karandikar M, Berman K, Cobb M. Endocrine Reviews 232: 153-183, 2001.
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell V4, Cell Communication chapter 15, 2002.

Evaluación de un Sistema Hormona-Receptor

Juan Carlos Calvo

Tal como se describió en los capítulos anteriores, la fisiopatología endócrina está íntimamente relacionada con la funcionalidad de los receptores hormonales. Al analizar el mecanismo de acción de cualquier sustancia biológicamente activa, en particular las hormonas, debe pensarse en la participación obligatoria de los sitios de reconocimiento, que denominamos receptores.

Podría definirse un sitio receptor como una macromolécula capaz de unir sustancias biológicamente activas, generando, mediante esta interacción, una respuesta fisiológica o patológica. Esto último debido a la existencia de respuesta "hormonal" en ausencia de hormona, desencadenada por un receptor "activado".

Cuando algo falla en esta molécula es de esperar en primera instancia una alteración en la respuesta mediada o determinada, por el receptor.

Esto se debe a que la función de una determinada molécula en la célula, depende de su configuración espacial, la que está fijada, en primera instancia por la estructura molecular y en segundo término por su interacción con el medio ambiente celular.

La conformación espacial de una molécula proteica, como son los receptores hormonales, define la existencia de sitios de interacción a los que pueden unirse los ligandos específicos. Estos ligandos, mediante uniones no covalentes interactuarán con los residuos activos de dichos sitios y, por interacciones electrostáticas mediarán cambios conformacionales que se transmitirán no solamente al resto de la misma molécula sino, a través del medio ambiente en que se encuentre (membrana plasmática o compartimiento intracelular), a otras moléculas con las que proseguirá en una cascada de señalización amplificada. Esta amplificación involucra interacciones eficaces con múltiples sistemas membranosos o solubles intracelulares que definirán, finalmente, el tipo y la intensidad de la respuesta final.

La interacción entre moléculas, especialmente cuando no involucra enlaces covalentes, lleva al concepto de afinidad, reversibilidad, constantes de velocidad de asociación y disociación, etc. Dependiendo de la modificación impartida al receptor como consecuencia de la falla fisiopatológica o, tal vez, originante de dicha alteración, será la alteración que se observe. Por ejemplo, puede estar alterada la síntesis de la molécula receptora, con la consiguiente disminución en el número de sitios disponibles para interactuar con la hormona; puede haber ocurrido una mutación puntual o varias mutaciones que den como resultado un sitio activo configuracionalmente alterado, con una subsiguiente modificación en la constante de afinidad; o pueden darse ambas situaciones. También podría ocurrir que una alteración en la respuesta inmunológica del paciente, produjese como consecuencia la presencia de anticuerpos dirigidos contra la molécula receptora, con el consiguiente bloqueo en la interacción seguido de, aunque no necesariamente, un bloqueo en la respuesta.

Al analizar en detalle la definición anteriormente mencionada, encontramos que todos los receptores hormonales pertenecen a la familia de macromoléculas proteicas. La ubicación subcelular dependerá de la característica del ligando que reconozcan: en membrana plasmática para ligandos hidrofílicos e intrace-lular, citoplasmático o nuclear, para ligandos hidrofóbicos.

El hecho de poder correlacionar ciertos órganos con la respuesta a una determinada hormona, no es sino un reflejo de la distribución o especificidad tisular que encontramos en este tipo de sistema de reconocimiento. No todos los tejidos poseen receptores para todas las hormonas y, por lo tanto, no todos responden a todas las hormonas.

Pero existe otro tipo de especificidad, relacionada con la interacción molecular entre el sitio de reconocimiento o sitio activo y la estructura molecular que reconoce como ligando. Esta especificidad estructural, hace que existan receptores para andrógenos, estrógenos, progestágenos, gonadotrofinas, etc. y que no se evidencie una reacción cruzada entre estos sistemas.

Esa especificidad tan estricta es compartida por otras moléculas que interactúan entre sí, tales como enzimas y sustratos o anticuerpos con sus antígenos correspondientes.

Dado que cada célula poseerá un número limitado de sitios receptores, se desprende que se puede saturar los mismos con el agregado de cantidades crecientes de hormona.

Tal como mencionáramos más arriba, las interacciones más importantes, funcionalmente hablando, son las más débiles. En general puede establecerse una reacción reversible, cuyo desplazamiento hacia la formación del complejo Hormona-Receptor o en la dirección opuesta, dependerá de la afinidad existente entre el sitio activo y la molécula del ligando.

En situaciones patológicas o durante cambios fisiológicos que acompañan el desarrollo de un organismo o su crecimiento y diferenciación, las células pueden regular tanto el número de sitios receptores, como la afinidad de la interacción.

Para evaluar estas posibles situaciones, debe desarrollarse un sistema de detección del número de sitios activos y de la constante de afinidad con que los mismos interactúan con el ligando.

El método más utilizado y que resuelve ambas situaciones al mismo tiempo, es el conocido como método según Scatchard y que consiste en lo siguiente: dada la imposibilidad de conocer exactamente la cantidad de receptor presente en una muestra de tejido o células, considerando que generalmente se cuenta con un homogeneizado tisular o suspensión celular, se recurre a tener la hormona identificada mediante una "marca" radiactiva o similar. En este caso, colocada esta hormona en presencia de la preparación de sitios receptores, se establecerá un equilibrio que dejará las especies libres y asociadas de hormona y receptor.

En un sistema "in vitro", las especies que pueden encontrarse en cualquier momento, son: Receptor libre, Hormona libre y complejo Hormona-Receptor. Debemos notar que, una vez establecido el equilibrio entre las diversas especies, una molécula de ligando se unirá a un sitio activo y que, por lo tanto, el valor del número de sitios de unión totales representará el número de sitios activos y no de moléculas de receptor (estas podrían tener más de un sitio activo por molécula nativa).

Con esta salvedad, cada vez que una molécula de hormona radiactiva se una a un sitio activo, se puede cuantificar como la expresión de un complejo ligando-receptor.

Considerando que se establece el siguiente equilibrio:

$$Hormona + Receptor \leftrightarrow Hormona - Receptor$$

Es posible describir el equilibrio, en términos de hormona, de la forma siguiente:

$$Ka = \frac{[HormonaUnida]}{[HormonalLibre]*[ReceptorLibre]}$$

Considerando que no existan otras especies involucradas, tales como las formas degradadas de las moléculas, complejos con otras especies, etc, es correcto asumir que:

$$[ReceptorTotal] = [ReceptorLibre] + [ReceptorUnido]$$

Con esto, se reemplaza el factor [ReceptorLibre] (que queda indefinido ante la imposibilidad de determinarlo en forma directa) por su equivalente:

$$[ReceptorLibre] = [ReceptorTotal] - [ReceptorUnido]$$

De esta manera, la ecuación quedará constituida por:

$$Ka = \frac{[HormonaUnida]}{[HormonalLibre]*([ReceptorTotal] - [ReceptorUnido])}$$

En realidad, si se considera que por cada sitio activo de molécula receptora, debe haber una sola molécula de hormona unida, es correcto decir que la [ReceptorUnido] es igual a la [HormonaUnida] y reemplazarlo. Esto tiene la ventaja de permitirnos manejar un dato conocido y de dejar la ecuación expresada en los términos que nos interesa calcular: [ReceptorTotal] y la Ka. Una vez determinados estos parámetros, sabremos si la falla ocasionó una disminución o incremento en el número de sitios receptores o si lo que se modificó fue la afinidad de los mismos por su ligando específico.

Si escribimos esta ecuación, utilizando las abreviaturas de las palabras inglesas que normalmente se encuentran en los trabajos científicos, resulta:

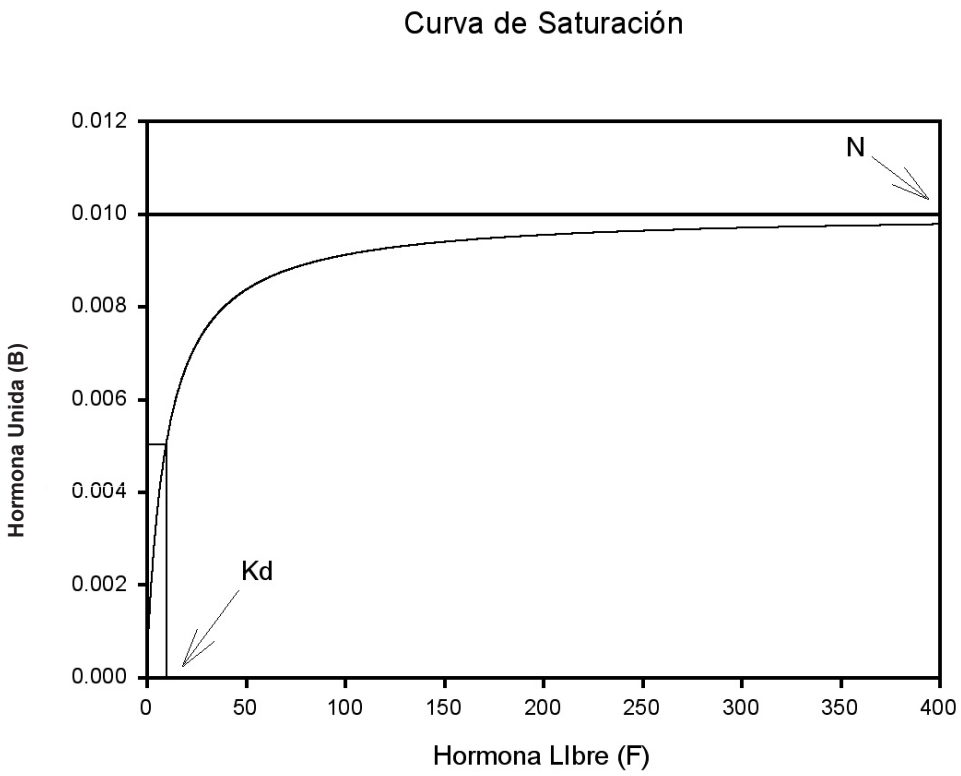
$$Ka = \frac{B}{F^* (N - B)}$$

Donde B = [Hormona Unida], F = [Hormona Libre], N = [Sitios Receptores totales] y Ka = Constante de afinidad al equilibrio.

Si se reordenan los términos, para encontrar la relación entre Hormona Unida y Libre, se obtiene la expresión de una hipérbola:

$$B = \frac{N * F}{Kd + F}$$

Donde Kd = 1/Ka, es decir la constante de disociación al equilibrio.



Este gráfico recibe el nombre de Curva de Saturación porque en el experimento se mantiene constante la concentración de sitios receptores y varía la concentración de hormona radiactiva.

De dicho gráfico se puede observar que el valor de Kd se obtiene igualando la ecuación a B = N/2, de lo que sigue que Kd resulta ser la concentración de hormona libre para la que se satura la mitad de sitios receptores.

Debe hacerse notar que en muchos trabajos se representa el mismo tipo de gráfico usando la concentración de hormona total agregada, en lugar de la hormona libre, lo cual no es correcto. En ese caso, el valor de la concentración de hormona total agregada, para saturar la mitad de sitios receptores será igual a Kd + N/2. Solamente cuando el número de sitios receptores sea despreciable frente a la Kd, ambos gráficos serán equiparables.

Si bien en la figura se colocaron valores arbitrarios, las coordenadas tienen unidades de concentración.

Como el patrón de referencia para los cálculos es la hormona radiactiva, el valor de concentración de hormona unida y libre se deberá obtener a partir de la actividad específica de la hormona marcada.

Este valor de actividad específica, es la relación entre la actividad radiactiva y la masa correspondiente a la molécula hormonal. Las unidades podrán variar pero, para el cálculo más sencillo de los parámetros, se transforma la ecuación en la de una línea recta,

tal como se indica a continuación:

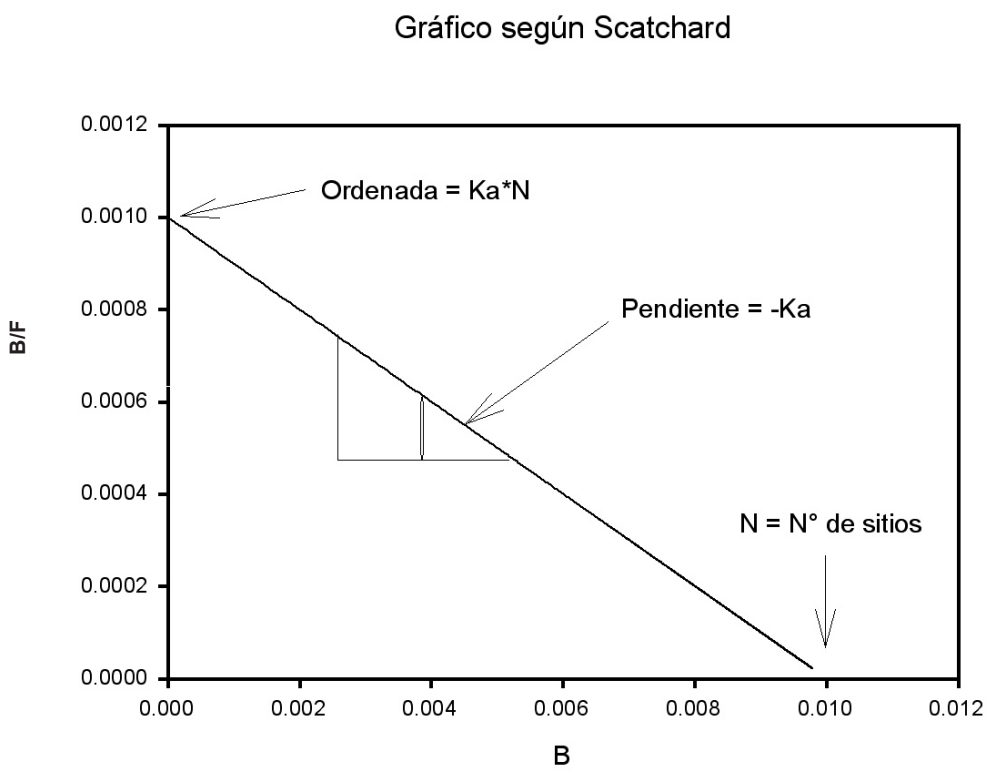
$$\frac{[HormonaUnida]}{[HormonalLibre]} = Ka*[Receptortotal] - Ka*[HormonaUnida]$$

Esta ecuación es la expresión de una línea recta, con variable dependiente (y) igual a [HormonaUnida]/[HormonaLibre], ordenada al origen igual a Ka*[ReceptorTotal], pendiente igual a –Ka y variable independiente (x) igual a [HormonaUnida].

En nuestra forma de nombrar las especies, resulta:

$$B = Ka* N - Ka*B$$

Más aún, si uno extrapola esta recta hasta la intersección de la abscisa al origen, es decir el punto (x,y)=(x,0), el valor de x resulta ser igual al número total de sitios receptores, es decir la [ReceptorTotal]. De la pendiente se puede obtener el valor de la constante de equilibrio de afinidad (Ka).



Este gráfico ha sido realizado utilizando los mismos valores arbitrarios que figuran en el gráfico anterior.

Esta forma de representación, tiene la ventaja de permitir, en un mismo par de ejes de coordenadas, visualizar la situación que se presente entre muestras controles y las muestras experimentales o bien, entre normales y pacientes, de cuyos tejidos (generalmente sangre o biopsias) se hayan obtenido los receptores.

Debe notarse que, para el cálculo de los valores incluidos en el gráfico según Scatchard, así como también para el gráfico de saturación, debieron calcularse los valores de hormona libre y de hormona unida en forma específica al receptor.

¿Por qué hacer esta salvedad? Porque es de sentido común el pensar que la hormona se unirá no solamente al receptor sino, también, al tubo de ensayo dado que su pared ofrecerá sitios de interacción inespecíficos. Resulta, por lo tanto, necesario determinar la cantidad de hormona que se ha unido en forma específica a los sitios receptores. Para esto, en paralelo a la incubación con hormona radiactiva, deberá incluirse una serie de tubos conteniendo una cantidad máxima, saturante, de hormona no radiactiva o "fría". Esta hormona competirá con la radiactiva por los sitios receptores y, al saturar los mismos, la radiactividad que quede asociada corresponderá al valor inespecífico. Dado que la hormona unida de esta manera no estará disponible para interactuar con el receptor, el valor de hormona libre se calculará como:

[Hormona total] – [Hormona Unida tanto a los receptores como al inespecífico]

La hormona unida en forma específica se calculará descontando al total unido el inespecífico.

Está más allá de las posibilidades de este capítulo, el analizar lo que sucede en otros casos donde el modelo es más complejo y no permite analizar los parámetros en forma tan sencilla, debido a la presencia de sitios múltiples de interacción, o interacciones tan fuertes que pueden considerarse "irreversibles".

En la mayoría de las situaciones, un análisis directo y simple como el presentado, permite resolver el problema planteado.

Bibliografía

1. Receptor-ligand interactions: a practical approach. E. C. Hulme. The practical approach series. IRL Press, Oxford University Press, New York, 1992.

2. Teoría de la interacción ligando-receptor. Monografía. Juan Carlos Calvo. Biblioteca Instituto de Biología y Medicina Experimental. Vuelta de Obligado 2490. (1428) Ciudad de Buenos Aires.

3. Measurement of specific activities in labelled hormones by self-displacement analysis. Calvo JC, Radicella JP, Charreau EH. Biochemical Journal 212(2): 259-264, 1983

4. A simple computer program for Scatchard plot analysis of hormone receptors including statistical analysis on a low cost desk top calculator. Sagripanti JL, Santa Coloma TA, Calvo JC. Acta Physiologica et Pharmacologica Latinoamericana 34: 51-59, 1984

5. Effects of radioiodination on hormone binding ability. Radicella JP, Calvo JC, Charreau EH. Journal of Receptor Research 5: 345.369, 1985

Próximos Fascículos

Fascículo III :

Exploración de la Función Endócrina.

Conceptos elementales del uso de radioisótopos.
Mario A. Pisarev

Métodos de valoración hormonal.
María O. Suescun y Silvia I. Gonzalez-

Fascículo IV :

Bases Moleculares de la Tumorigénesis

Oncogenes.
Alberto Baldi

Factores de Crecimiento.
Patricia Elizalde

Neuroendocrinología. Bases Fisiológicas. Fisiopatología y su Diagnóstico.

Hipotálamo. Hipófisis: estructura macro y microscópica.
Pablo Scacchi

Neurotransmisores.
Eduardo Spinedi

Fisiopatología de los tumores hipofisarios.
Alberto Chervin

Hormonas Digestivas
Pablo Scacchi, Daniel Ponzo