

¿PUEDEN LAS INMUNOGLOBULINAS ENTRAR A LAS CÉLULAS?

Dra. Daniela Iragüen C. (M.V.)
Dr. Gonzalo Cabrera V. (M.V.)
Dr. Rodolfo Paredes E. (M.V.)

El sistema inmune está constituido principalmente por tres componentes, el sistema inmune humoral, el sistema inmune celular y el sistema del complemento. Se describe que la respuesta inmune humoral actuaría como un nexo entre los sistemas. Tradicionalmente, la acción de las inmunoglobulinas (Igs) se ha limitado al medio extracelular, ya sea reconociendo Ags de superficie celular o circulantes. Así, Anticuerpos (Acs) que reconocen a su Antígeno (Ag) entregan una señal capaz de reclutar células linfocitarias y proteínas del complemento, que llevan a la destrucción de la célula que presenta el antígeno específico.

Las Igs que participan directamente en enfermedades autoinmunes han sido utilizadas como una herramienta diagnóstica, sin atribuirle un rol patológico específico más que la injuria mediada por complemento y la formación de complejos inmunes. Sin embargo, existen evidencias de que éstas no serían las únicas funciones que los Acs ejercerían en este tipo de patologías.

Por todos los antecedentes que se disponen hasta la fecha, el dogma que indica que las Igs sólo actúan en el compartimento extracelular parece ser algo del pasado. En 1978, Alarcón-Segovia y col describieron por primera vez que IgG contra ribonucleoproteínas eran capaces de ingresar y reconocer a su Ag en núcleos de linfocitos viables. A partir de ese momento, numerosos autores han descrito el ingreso de Igs al interior de células vivas de distintos tipos celulares, tales como monocitos nucleares, neuronas, fibroblastos, células epiteliales, glomerulares, hepáticas y neoplásicas.

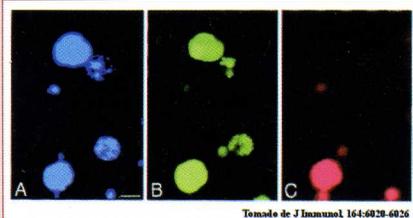


Figura N°1

Anticuerpo mononuclear 3E10, penetra en células COS-7 vivas y se localiza a nivel nuclear. A: tinción con Hoechst, que se une al DNA e identifica los núcleos. B: mAb 3E10 unido a FITC, identifica el anticuerpo al interior de los núcleos. C: Etidio homodímero, identifica células muertas (núcleos rojos) y permite la identificación de núcleos en células vivas (núcleos sin teñir). Barra: 5 μ m.

En el presente artículo se presentan las teorías que intentan explicar como ingresan las Igs al interior de las células, su implicancia en patologías autoinmunes y las posibles utilidades de estos anticuerpos en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

MECANISMO DE INGRESO DE INMUNOGLOBULINAS A LAS CÉLULAS

El mecanismo exacto de cómo ingresan las Igs al interior de las células aún no se conoce con exactitud y los resultados hasta ahora publicados son disímiles. Por un lado, se describe que el ingreso de Igs a las células no utilizaría los mecanismos clásicos de endocitosis mediada por receptor, ya que se realiza con alta tasa de internalización, aparentemente no es dependiente de temperatura y no se localizan significativamente en vesículas endocíticas; utilizarían un transporte proteico en su paso desde el citoplasma al núcleo y solo aquellos isotipos que reconocen Ags in-

tracelulares serían capaces de entrar a la célula. Sin embargo, también se ha descrito el ingreso de las Igs a través de endocitosis mediada por receptores que reconocen la fracción Fc (porción distal de la cadena pesada de Ig), sin descartar otras vías de ingreso tal como la vía descrita para calreticulina (proteína multifuncional que entre sus funciones destaca el ser chaperona en el citoplasma y retículo endoplásmico rugoso), que podría actuar como receptor de superficie celular para la penetración de Acs a la célula.

Por otro lado, las IgGs que ingresan a la célula tendrían características especiales y serían del isotipo 2a. IgG 2a posee en sus regiones hiper-variables CDR2 y CDR3 de las cadenas pesadas, motivos con residuos básicos, generalmente residuos de arginina, que facilitarían el reconocimiento y el ingreso al medio intracelular, dando de esta forma especificidad al proceso.

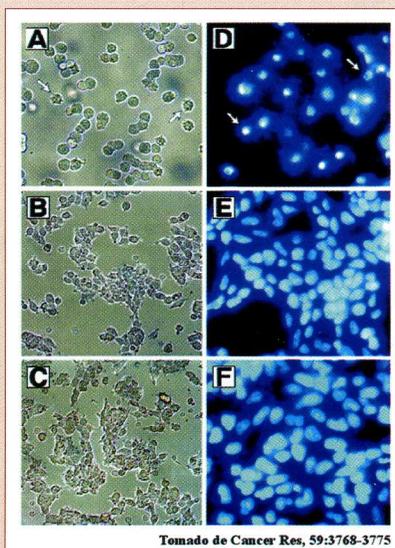
La visualización de las Ig dentro de las células ha sido la evidencia clave para demostrar el ingreso de estos Acs a las mismas. Sin embargo, muchos de los detractores de este fenómeno indican que la visualización de las Igs a nivel nuclear mediante técnicas de microscopía de fluorescencia, corresponden a artefactos que se producirían durante la preparación de la muestra. Con el fin de demostrar que este fenómeno no era producto de artefactos en la técnica empleada, es que Weisbart y col (2000), realizaron experimentos en células COS-7 vivas utilizando un anticuerpo monoclonal (mAb) llamado 3E10. En la Figura 1A se aprecian los núcleos teñidos con Hoechst que tiñe el DNA (azul); 1B muestra el ingreso de mAb 3E10 marcado con FITC (verde) y 1C con etidio

homodímero (rojo) que sólo tiñe las células muertas. Con estos resultados se demuestra que Acs específicos como mAb 3E10, que está dirigido contra doble hebra de DNA, pueden ingresar a células, que estos Acs alcanzan su antígeno en el núcleo y que son incorporados a células vivas, por lo que la visualización de Ig en el núcleo de las células no se debería a artefactos atribuibles a la técnica, sino a que efectivamente las Igs entrarían a células viables.

IMPLICANCIA EN PATOLOGÍAS

Los Acs involucrados en enfermedades autoinmunes contra Acs nucleares han sido agrupados y denominados ANA (Anti-Nuclear Antibodies). Entre ellos están los descritos para Lupus Eritematoso Sistémico (anti-Sm y anti-dsDNA), Esclerosis Sistémica Generalizada (anti-topoisomerasa 1) y Esclerosis sistémica localizada (anti-centrómero). Dichos Acs han sido utilizados desde hace tiempo en clínica como herramientas diagnósticas para estas patologías. También se han descrito Acs contra el antígeno nuclear Hu, que ha sido involucrado en la fisiopatología de Neuropatías paraneoplásicas; Acs anti-recoverina, una proteína de 23 kDa presente en células bipolares y fotorreceptoras de retina, que pueden inducir apoptosis en dichas células y con ello producen pérdida paulatina de la vista; Acs anti-hsp27 impiden la estabilización de actina en el citoesqueleto de células neuronales de retina, induciendo la muerte de estas células.

Actualmente, se postula que la presencia de Acs contra antígenos celulares no siempre sería nociva para el organismo, ya que en algunos casos las Igs cumplirían un rol fisiológico, participando en la regulación de autoantígenos circulantes y ejerciendo una función protectora frente a enfermedades autoinmunes y neoplásicas, siendo la desregulación de estos procesos preventivos una de las causales



Tomado de Cancer Res, 59:3768-3775

Figura N° 2

Anticuerpos anti proteína NB, inducen apoptosis en células de neuro-blastoma humano. A-C: microscopía de luz; D-F: tinción de Hoechst que tiñe los núcleos. A y D muestra señales morfológicas de inducción de apoptosis (flechas indican núcleos condensados y cuerpos apoptóticos), luego de incubar con Acs provenientes de dadores positivos de Igs específicas contra proteína NB. B y E muestran la morfología luego de incubar con Acs provenientes de dadores negativos. C y E son controles sin tratamiento. A-F: aumento 400X.

en el desencadenamiento de estas patologías. Al respecto, David y col (1999) demostraron que Acs contra la proteína NB de 260 kDa, expresada específicamente por parte de las células de una neoplasia extracraneal denominada Neuroblastoma, pueden inducir directamente a las células que presenten dicho Ag a apoptosis; de esta forma el gran porcentaje de reversión de esta neoplasia en niños se debería a la actitud protectora que presentarían estas Igs. La Figura 2 muestra como Acs específicos contra la proteína NB presentes en individuos sanos pueden inducir apoptosis en células de cultivos primarios de Neuroblastoma. En la Fig 2D se aprecia como al incubar estas células con estos anticuerpos, aparecen signos característicos de apoptosis como núcleos picnóticos y cuerpos apoptóticos, mientras que dadores negativos de estos Acs no son capaces de inducir la muerte celular programada (Fig 2E).

¿CÓMO LAS Igs INDUCEN APOPTOSIS?

Basándose en lo expuesto anteriormente, es necesario ahondar en el vínculo que presentaría el ingreso de Igs a las células y la inducción de apoptosis (muerte celular programada). Una vertiente indica que durante la apoptosis se presentarían antígenos nucleares a nivel de la superficie celular, como motivos de DNA u otras proteínas específicas del interior de la célula, que permitirían el reconocimiento de dichos antígenos con la consecuente expansión clonal de linfocitos B capaces de producir autoanticuerpos. Con ello se podría desencadenar una enfermedad, por ejemplo Lupus Eritematoso. Otros investigadores postulan que la presencia de autoanticuerpos puede ser el evento que precede a la apoptosis. Así, autoanticuerpos presentes en circulación ingresarían a las células, reconocerían a su antígeno intracelular y las inducirían a apoptosis. Las vías de señalización intracelular involucradas en la activación no han sido bien dilucidadas. Sin embargo, se ha propuesto, como se aprecia en la Figura 3, que las Igs podrían unirse a receptores Fas (conocidos receptores pro-apoptóticos) y activar la cascada de caspasas (proteínas efectoras de apoptosis). A su vez, las Igs podrían generar una privación de citoquinas, siendo esto una señal de muerte celular, o bien activar moléculas pro-apoptóticas al ingresar a la célula. Por otro lado se describe que Acs contra proteínas mitocondriales generarían un cambio en el potencial de la membrana interna mitocondrial, desencadenando la liberación de Citocromo C y posterior activación de caspasas. Finalmente se ha relacionado a los Acs contra proteínas nucleares como moléculas capaces de interferir con los procesos de reparación celular y estabilización de citoesqueleto, con ello se altera la homeostasis celular y se en-

tregan señales pro-apoptóticas (Williams y Peen, 1999).

NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

Se ha presentado en este artículo como es que las Igs pueden entrar a las células y como podrían estar asociadas a diversas patologías. De igual forma, se ha informado respecto de la especificidad que deben presentar los anticuerpos para que ingresen a las células y como sólo aquellos anticuerpos que reconocen un antígeno intracelular son capaces de penetrar una célula viva. Utilizando este razonamiento, es que diversos investigadores han iniciado nuevas estrategias terapéuticas.

Es conocido que uno de los factores involucrados en la enfermedad de Alzheimer sería el estrés oxidativo que presenta el sistema nervioso y el consecuente daño neurodegenerativo. Weisbart y col (2000) diseñaron un nuevo sistema de transfección de proteínas, utilizando la especificidad que presentan las Igs. Unieron en forma covalente catalasa (enzima protectora contra el estrés oxidativo) a un Ac monoclonal capaz de penetrar células neuronales. La Figura 4 muestra como al incubar previamente con el Ac conjugado a catalasa se disminuye el porcentaje de muerte en las células al someterlas a un tratamiento con H₂O₂, sin embargo esta protección no está dada ni por la catalasa, ni el Ac por sí solo. De esta forma se puede entregar una proteína completamente funcional a un tejido específico.

Otro ejemplo es la aplicación en terapias anticancerígenas. Tse y Rabbitts (2000), crearon un constructo que posea las secuencias necesarias para el ingreso de una Ig a la célula, seguida de la secuencia de Caspasa 3 activa. De esta forma se expresó una proteína capaz de ingresar a la célula con otra efectora de apoptosis. Esta proteína de fusión fue capaz de inducir apoptosis en las células que presentaban el Ag pero no así en aquellas

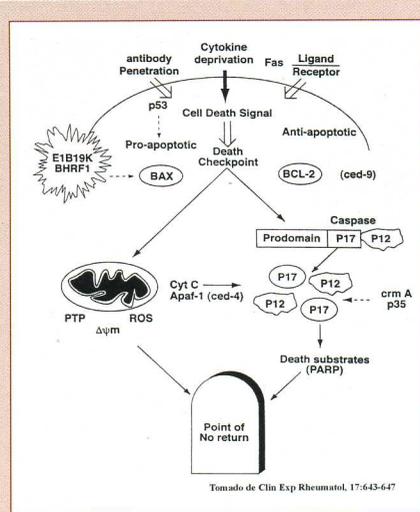


Figura N° 3

Esquema propuesto de la inducción de apoptosis por Inmunoglobulinas. El ingreso de Igs puede activar proteínas pro-apoptóticas como BAX, alterar el potencial de membrana del mitocondrio liberando Citocromo C, activar receptores de muerte como Fas, activar caspasas o activar endonucleasas como PARP que llevan al punto de no retorno desencadenando el proceso de apoptosis.

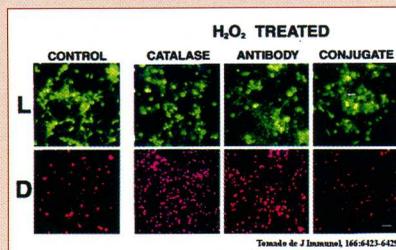


Figura N° 4

Anticuerpo monoclonal 3E10 conjugado a catalasa protege a neuronas corticales de rata de la injuria producida por el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Control: neuronas sin tratar; Catalase: neuronas tratadas solo con catalasa; Antibody: neuronas tratadas solo con mAb 3E10; Conjugate: neuronas tratadas con mAb 3E10 conjugado a peroxidasa. L: ensayo de células vivas; D: ensayo de células muertas. Barra: 20 μm.

que no lo poseían. De esta forma se ha iniciado un nuevo camino en la eliminación de poblaciones celulares específicas, como en el caso de las neoplasias, sin alterar las que no presentan anomalías.

Finalmente las proyecciones que

presentan este grupo de inmunoglobulinas aparece como muy promisorio, ya sea para un diagnóstico más eficaz de las enfermedades autoinmunes, como también para la creación de nuevas estrategias terapéuticas que no sólo podrían restringirse a este tipo de enfermedades, sino que podría abarcar otros grupos como es el caso de las enfermedades neoplásicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón-Segovia, D; Ruiz-Argüelles, A y Fishbein, E. 1978. Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors. *Nature*, 271:67-68.
- David, K; Ollert, M; Vollmert, C; Heiligtag, S; Eickhoff, B; Erttmann, R; Bredehorst, R y Vogel, C. 1999. Human natural immunoglobulin M antibodies induce apoptosis of human neuroblastoma cells by binding to a Mr 260,000 antigen. *Cancer Res*, 59:3768-3775.
- Tse, E y Rabbitts, T. 2000. Intracellular antibody-caspase-mediated cell killing: An approach for application in cancer therapy. *PNAS*, 97:12266-12271.
- Weisbart, R; Baldwin, R; Huh, B; Zack, D y Nishimura, R. 2000. Novel protein transfection of primary rat cortical neurons using an antibody that penetrates living cells. *J Immunol*, 164:6020-6026.
- Williams, RC y Peen, E. 1999. Apoptosis and cell penetration by autoantibody may represent linked processes. *Clin Exp Rheumatol*, 17:643-647.

Dra. Daniela Iragüen C. (M.V.)
Departamento de Ciencias Clínicas
Unidad de Farmacología
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Universidad de Chile
Dr. Gonzalo Cabrera V. (M.V.)
Programa de Genética
Dr. Rodolfo Paredes E. (M.V.)
Programa de Patología Celular
I.C.B.M. Facultad de Medicina
Universidad de Chile