

ARTÍCULO DE REVISIÓN/REVIEW ARTICLE

■ Revisiones Básicas/Basics reviews

Ctla-4, una molécula que inhibe la activación de los linfocitos T

Ctla-4. A Molecule that inhibits activation of T lymphocytes

Cecilia Fernández-Ponce¹, Juan David Hernández-Martínez², Carlos Silvera-Redondo³

Resumen

CTLA-4 (Antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico) es una molécula expresada en la superficie de la mayoría de los linfocitos T activados. Su función es regular la homeostasis y la tolerancia periférica inmunológica inhibiendo la activación de los linfocitos T. Dos mecanismos han sido postulados para mediar la inhibición por CTLA-4 de la respuesta de los linfocitos T: Señalización negativa y antagonismo competitivo de la vía de coestimulación mediada por CD28/B7. Las diferentes moléculas que participan en la activación e inactivación de los linfocitos T han sido analizadas con el objetivo de diseñar estrategias terapéuticas de tolerancia inmunológica. Los progresos han estado basados en los mecanismos de activación linfocitaria, la coestimulación o la señalización por citocinas, pero ha sido difícil diseñar terapias de inhibición endógena. La molécula CTLA-4 ha sido el blanco de muchos estudios, los cuales han planteado diferentes estrategias novedosas para inducir inmunosupresión, algunos antígeno específicos, que se han convertido en nuevos pilares en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes y rechazo de trasplantes.

Palabras claves: Linfocito T, Ag-4 asociado al Linfocito T Citotóxico, tolerancia inmunológica, inmunosupresión, autoinmunidad, trasplante / SALUD UNINORTE. Barranquilla (Col.) 2006; 22 (2): 168-181

Abstract

CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte-associated Ag-4) is a molecule expressed on the surface of activated T lymphocytes, the function of CTLA-4 is regulate T cell homeostasis and peripheral immune tolerance, inhibiting T cell activation. Two mechanisms have been postulated to mediate CTLA-4 inhibition of T cell responses: Negative signaling and competitive antagonism of CD28:B7-mediated costimulation. The different participating molecules in T cell activation and T cell inactivation have been analyzed to design therapeutic strategies for immune tolerance. The progress has been based upon interference with lymphocyte activation, costimulation, or cytokine signals, but It has been very difficult to design therapeutic strategies that specifically enhance endogenous inhibitory pathways. CTLA-4 has been the target of several studies, that have brought forward different novel strategies to induce immunosuppression, some of them Ag-specific, that have become a new basis for the treatment of autoimmune disease and tissue transplantation rejection.

Key words: T lymphocyte, Cytotoxic T lymphocyte-associated Ag-4, immune tolerance, immunosuppression, autoimmunity, transplant / SALUD UNINORTE. Barranquilla (Col.) 2006; 22 (2): 168-181

¹Grupo de Investigación en Genética y Medicina Molecular, Departamento de Ciencias Básicas Médicas, Universidad del Norte, Barranquilla (Colombia). cecimat20@yahoo.com

²Programa de Medicina, Fundación Universitaria San Martín, Barranquilla (Colombia).

Fecha de recepción: 15 de agosto de 2006
Fecha de aceptación: 18 de septiembre de 2006


Vol. 22, N° 2, 2006
ISSN 0120-5552

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de una respuesta inmune apropiada depende de la regulación cuidadosa de las señales de activación linfocitaria. Este proceso implica no sólo la interacción dinámica de múltiples moléculas de membrana presentes en las Células Presentadoras de Antígenos (CPAs) y los linfocitos, sino también la transmisión intracelular de dos señales independientes que le permitan a los linfocitos vírgenes activarse, proliferar y diferenciarse en linfocitos efectores y de memoria.

En el caso de los linfocitos T (LT), la primera señal es generada por la interacción del Complejo Péptido Antigénico – Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CPH) con el Receptor de la Célula T (RCT) y los correceptores CD4 y CD8. La segunda señal es independiente del receptor antigénico, procede de moléculas de membrana presentes en la CPA denominadas coestimuladoras y cuyos ligandos se encuentran en la membrana de los linfocitos.

Existe un nivel adicional de regulación generado por la expresión de receptores inhibidores que inician la transmisión intracelular de señales negativas. El balance entre las señales negativas y las señales positivas transmitidas por el receptor antigénico, las moléculas coestimuladoras y las inhibidoras regulan el nivel del umbral crítico de activación de los linfocitos T (1,2,3).

El receptor CTLA-4 (Ag-4 asociado al Linfocito T Citotóxico), también conocido como CD152, es la principal molécula inhibidora implicada en la regulación negativa de la activación de los linfocitos. CTLA-4 es expresada principalmente en la superficie celular de los LT activados, su expresión es constitutiva sólo en los LTCD4⁺CD25⁺. No obstante, varios estudios han demostrado la expresión del gen CTLA-4 en otro tipo de células, incluyendo linfocitos B, monocitos, granulocitos, entre otras. La función de CTLA-4 en estas células es desconocida (3,4,5,6,7). En los Linfocitos T activados, CTLA-4 utiliza dos mecanismos inhibitorios diferentes, uno de ellos es la transmisión de una señal negativa a través de su región intracelular, y el segundo es el antagonismo competitivo de la señal coestimuladora mediada por CD28 (3,4,5,8,9,10).

En esta revisión se describen las vías de señalización que participan en la activación de los linfocitos T, los receptores que inducen la regulación negativa de su activación y presentamos la molécula CTLA-4 como una interesante alternativa en el diseño de nuevas terapias inmunorreguladoras.

OBJETIVO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T

El reconocimiento del antígeno por parte del Receptor de la célula T (RCT) inicia una secuencia de señales bioquímicas que estimulan la transcripción de genes que están silentes en los linfocitos T vírgenes y cuyos productos intervienen en las respuestas funcionales de los linfocitos T activados.

El reconocimiento del antígeno por parte del RCT induce el movimiento coordinado de varias moléculas de señalización de los LT (proteínas del CD3 y cadenas ζ , que hacen parte del complejo del RCT, CD4 o CD8, enzimas y proteínas adaptadoras) hacia el lugar donde se produce el contacto entre el LT y la CPA. Este lugar de contacto se denomina "sinapsis inmunológica" (SI). La unión del RCT al complejo péptido-CPH permite la unión de CD4 o CD8 a una región no polimórfica de la molécula del CPH clase II o clase I respectivamente. Estas interacciones inducen la activación de la Lck (tirosina cinasa asociada a los extremos citoplasmáticos de CD4 y CD8), la cual fosforila a las tirosinas de los ITAM (Motivos de Activación del Inmunoreceptor basados en Tirosina) de CD3 y las cadenas ζ . Las tirosinas fosforiladas de las cadenas ζ se convierten en sitios de anclaje para ZAP-70 (tirosina cinasa asociada a las cadenas zeta). A su vez, la ZAP-70 activada de este modo por Lck cataliza la fosforilación de varias moléculas adaptadoras que actúan como puntos de fijación para la incorporación de importantes vías de transducción de señales intracelulares, como son la vía de la enzima citosólica Fosfolipasa C γ 1 (PLC γ 1), que hidroliza al fosfatidilinositol asociado a la membrana, dando lugar a 1,4,5 trifosfato de inositol (IP $_3$) y diacilglicerol (DAG). El IP $_3$ induce la liberación de Ca $^{++}$ del retículo endoplásmico y abre canales de Ca $^{++}$ en la membrana celular, elevando así la concentración del calcio libre intracitosólico. El calcio forma un complejo con la calmodulina y dicho complejo Ca $^{++}$ /calmodulina induce la activación de varias enzimas, incluida una serina/treonina fosfatasa denominada calcineurina. Esta enzima elimina grupos fosfato del factor de transcripción citoplásmico NFAT y descubre una región que permite su translocación hacia el núcleo. En el núcleo, NFAT estimula la transcripción de los genes de IL2 e IL4, entre otros.

El DAG y el calcio activan a la enzima proteína cinasa C (PKC), una de las enzimas que fosforila a las proteínas denominadas inhibidores de κ B (I κ B), haciéndolas reconocibles por los sistemas de ubiquitinación, y por lo tanto convirtiéndolas en una diana del proteasoma citosólico que cataliza su degradación, todo esto con el fin de liberar al Factor Nuclear Kappa B (NF- κ B) de sus inhibidores y permitir su entrada al núcleo, donde contribuye a la transcripción de múltiples genes de citocinas y de los receptores de las mismas (figura 1).

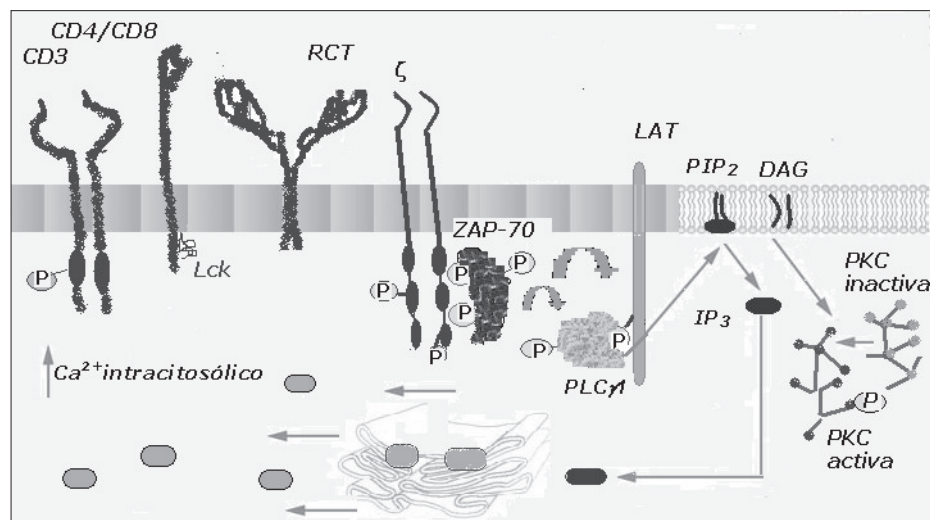


Figura 1

La ZAP-70 activada fosforila proteínas adaptadoras que reclutan factores de intercambio GDP/GTP, activando éstos a su vez las vías de señalización Ras-MAP cinasas y Rac-MAP cinasas. Existen tres *Mitogen-Activated Protein kinases* (MAP cinasas) principales en los LT. Una de ellas es activada por la molécula Ras-GTP y se denomina cinasa del receptor extracelular activado (ERK), la cual fosforila a una proteína (ELK) que estimula la transcripción de Fos, un componente del factor de transcripción de la proteína de activación 1 (AP-1). La segunda MAP cinasa, conocida como cinasa aminoterminal de c-Jun (JNK), es activada por la Rac-GTP, la JNK activada fosforila a c-Jun, el segundo componente del factor de transcripción AP-1. Los dos componentes de AP-1 se unen entre sí mediante una estructura compartida denominada “cremallera” de leucinas, entran al núcleo de los LT y en combinación con el NFAT participan en la transcripción de genes de citocinas. La tercera de las MAP cinasas es p38, que se activa por la Rac-GTP y participa en la activación de otros factores de transcripción (1,2,3,4) (figura 2).

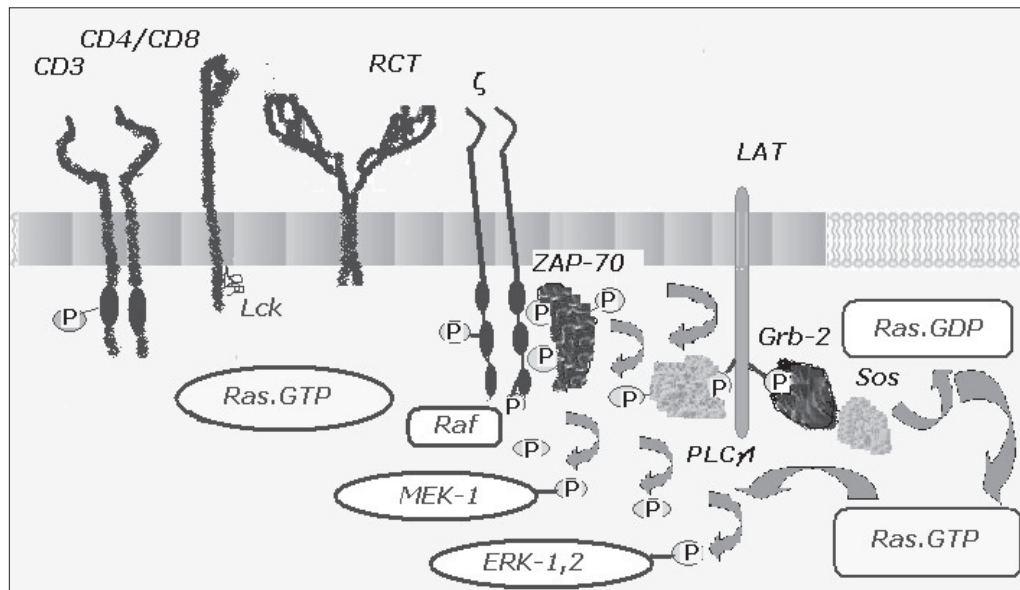


Figura 2

La activación de estas vías de señalización contribuye a la expresión de diferentes genes que codifican proteínas necesarias para la expansión clonal, la diferenciación y las funciones efectoras de los LT, pero para la activación completa de los mismos son necesarias las señales coestimuladoras.

SEÑALES COESTIMULADORAS

Desde hace aproximadamente 20 años se conoce la importancia de las señales coestimuladoras en la activación de los linfocitos. La coestimulación involucra una señal entre las células recíproca y secuencial; los linfocitos que carecen de esta señal cuando se encuentran con su antígeno ingresan en un estado de anergia o mueren por apoptosis.

Las señales coestimuladoras son emitidas principalmente por las interacciones entre el receptor CD28 que se encuentra en la superficie de los LT y sus ligandos B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) expresados por las CPA, con el fin de potenciar las respuestas de los LT frente a los antígenos, entre ellas, las señales de supervivencia y proliferación celular, la síntesis de citocinas, que permiten la cooperación célula – célula y la diferenciación de los linfocitos vírgenes en linfocitos efectores y de memoria.

La expresión de moléculas coestimuladoras aumenta en presencia de productos microbianos (endotoxinas) y citocinas como el Interferón gamma (IFN γ), todo esto para que la respuesta de los linfocitos se inicie en el lugar y el momento oportuno, lo cual evita el desarrollo de patologías autoinmunes (1,2,3).

Las moléculas coestimuladoras B7 (B7-1 y B7-2) son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y presentan dominios extracelulares similares entre sí, pero dominios citosólicos muy diferentes. Se expresan en forma constitutiva en células dendríticas, y se induce su expresión en macrófagos activados y células B activadas. Las células dendríticas maduras son las que expresan las concentraciones más elevadas de coestimuladores y, por lo tanto, son estimuladores potentes de los linfocitos T vírgenes (que son completamente dependientes de la coestimulación para activarse). Los ligandos para B7 son las moléculas expresadas en la membrana de los linfocitos CD28 y CTLA-4, ambas miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, estructuralmente similares pero funcionalmente antagónicas (1,2,3,4).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que CD28 es la principal molécula coestimuladora expresada en linfocitos vírgenes. Sin embargo, las vías de señalización de CD28 han sido difíciles de caracterizar y sólo recientemente comenzaron a ser elucidadas. Las señales mediadas por CD28 aumentan la síntesis de citocinas, especialmente del factor de crecimiento autocrino IL-2. Esta elevación puede ser consecuencia de la activación de mecanismos inductores de la transcripción y la estabilización del ARN mensajero de IL2. Varias investigaciones han demostrado que la interacción de CD28 con su ligando B7 (expresado en células dendríticas, macrófagos activados y células B activadas) induce la fosforilación de las tirosinas de su dominio intracitoplasmático, permitiendo así el reclutamiento y la activación de las GTPasas de pequeño tamaño Rac y CDC42, las cuales activan la cinasa activada por p21 (PAK), que a su vez activa la cascada de las MAP cinasas, y causa una posterior síntesis de IL2 (3,11,12).

Otra molécula con funciones coestimuladoras es la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), la cual se encuentra asociada al dominio intracitoplasmático de CD28 y se relaciona con la serina / treonina cinasa Akt (también conocida como proteína cinasa B o PKB). Ciertos estudios sugieren que la PI3K y la PKB / Akt tienen una función coestimuladora. Paradójicamente, el receptor inhibitorio de los linfocitos T, CTLA-4, también recluta estas moléculas (3,13,14). Se puede concluir entonces que su papel en la coestimulación permanece aún sin resolver.

Adicionalmente, estudios del AMPc demuestran que su elevación intracelular en los LT es inhibitoria, lo que sugiere que la activación de los LT requiere una inhibición de la acumulación de AMPc. De esta manera, CD28 induce la expresión de

fosfodiesterasa de AMPc para disminuir los niveles intracelulares de AMPc y permitir la activación de los LT (3,15). Existe otro mecanismo adicional de modulación que consiste en la expresión de receptores inhibidores que inician vías de señalización negativa.

SEÑALES INHIBIDORAS

Existen moléculas homólogas a los receptores que intervienen en los mecanismos de coestimulación pero que transducen una señal inhibitoria para la activación de los linfocitos T. El receptor inhibitor mejor estudiado y definido es CTLA-4; fue el segundo miembro de la familia de CD28 que se descubrió y caracterizó mediante el uso de anticuerpos monoclonales (1,2,3,16). Su nombre se debe a que esta molécula fue el cuarto receptor identificado durante la búsqueda de moléculas expresadas por los Linfocitos T Citotóxicos, aunque actualmente se sabe que no está restringida sólo a este tipo de células.

El gen de CTLA-4 ha sido localizado en humanos, en el cromosoma 2. Este gen presenta 4 exones: Los exones 1 y 2 codifican la región extracelular de la molécula, mientras el exón 3 codifica la región transmembranal y el 4 la región intracelular (17,18). En relación con la evolución de esta molécula, CTLA-4 presenta un alto grado de conservación. El dominio intracelular de CTLA-4 está 100% conservado en mamíferos, mientras que el dominio extracelular presenta una variabilidad mayor. Esto sugiere la existencia de una presión selectiva en la conservación de los mecanismos que median la dimerización de CTLA-4 y la señalización a través de su dominio intracitoplasmático (5,18).

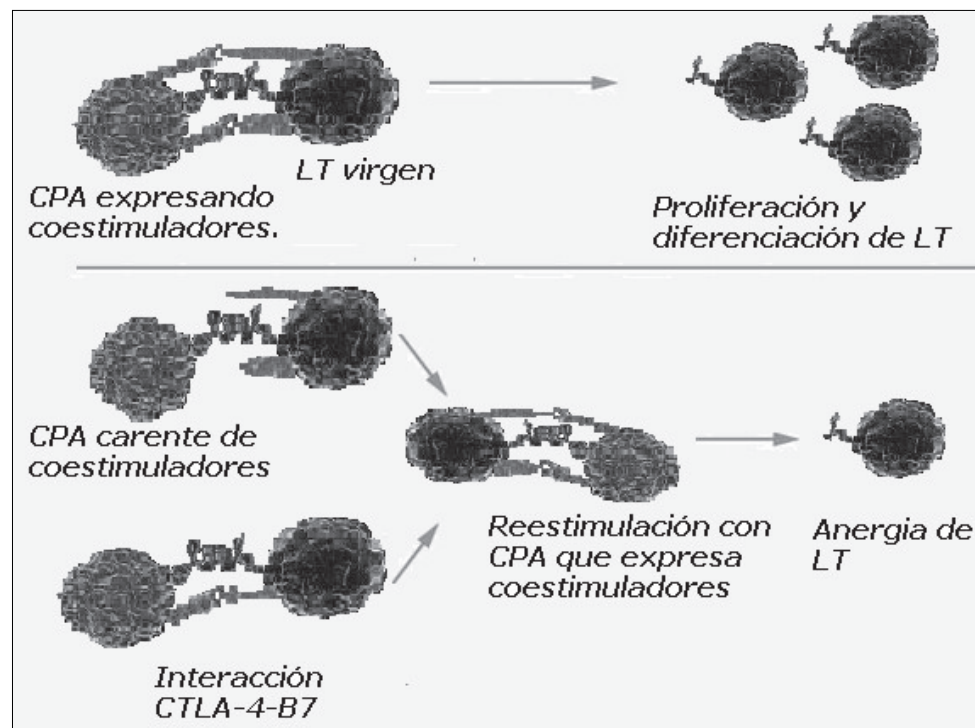


Figura 3

La molécula CD28 ha sido mapeada en la misma región cromosómica que CTLA-4 (16,17,19,20). Estas dos moléculas presentan una gran similitud estructural y homología en sus secuencias génicas, lo que les permite compartir los mismos ligandos –las moléculas B7-1 y B7-2–. Sin embargo, CTLA-4 se une a sus ligandos B7 con mayor afinidad y avidéz que CD28 (21,22). CTLA-4 se une a B7-1 y B7-2 con una constante de disociación (Kd) de 0.2 y 2.6 μM respectivamente, mientras CD28 se une a B7-1 y B7-2 con Kd de 4 y 20 μM respectivamente (23,24). La mayor afinidad y avidéz de CTLA-4 con las moléculas B7, en relación con CD28, sugiere que las señales inhibitorias son dominantes sobre las señales coestimuladoras. La alta avidéz de CTLA-4 por B7 se debe en gran parte a la estructura de homodímero de CTLA-4, que le permite unirse bivalentemente a B7 (25), mientras CD28 sólo puede unirse monovalentemente a B7 (5,23,24) (figura 3).

CD28 se expresa constitutivamente en los linfocitos T; por el contrario, CTLA-4 se expresa en la superficie de los LT en reposo en niveles muy bajos, sólo a medida que el linfocito se activa, los niveles de CTLA-4 en la superficie celular se elevan. La expresión de CTLA-4 a bajos niveles es suficiente para inducir una señal negativa en los LT; por esta razón su expresión está estrictamente regulada mediante dos mecanismos: el primero es la redistribución de las moléculas de CTLA-4 que se encuentran en la región intracelular; el segundo es el incremento de su síntesis (3,6). La mayoría de las moléculas CTLA-4 se acumulan intracelularmente en lisosomas donde son degradadas rápidamente con el fin de regular su expresión (26); sólo un pequeño grupo de moléculas CTLA-4 se expresa en la superficie del LT, pero de una manera muy dinámica. Esta distribución de CTLA-4 es regulada a través de una interacción del dominio intracitoplasmático de CTLA-4 con AP-1, el cual media el transporte de CTLA-4 desde el Aparato de Golgi hasta la superficie celular (27). El transporte de CTLA-4 a endosomas y lisosomas para su almacenaje o degradación es mediado por la interacción de la molécula CTLA-4 que se encuentra en la superficie celular con AP-2; esta interacción sólo sucede cuando los residuos de tirosina del dominio intracitoplasmático de CTLA-4 no han sido fosforilados (28,29). De esta forma, en ausencia de estimulación, la CTLA-4 será degradada, y en presencia de activación del RCT, la CTLA-4 contenida en los lisosomas es secretada aumentando su expresión en la superficie celular. En el caso de los LT de memoria, éstos tienen una gran cantidad de CTLA-4 intracelular, la cual es expresada mucho más rápidamente en la superficie del LT de memoria activado, en comparación con la velocidad de su expresión durante la activación de los LT vírgenes. Adicionalmente, CTLA-4 es retenida en la superficie del LT de memoria activado un tiempo considerablemente más largo que en el caso del LT virgen activado (5,30).

Al igual que CD28 y CTLA-4, los patrones de expresión de las moléculas B7-1 y B7-2 en la superficie celular de las CPAs son diferentes. B7-2 es expresada constitutivamente en las CPAs y su expresión aumenta rápidamente después de la activación, alcanzando un pico de expresión a las 24 horas (31,32); por el contrario, la molécula B7-1 sólo se expresa después de la activación, alcanzando un pico a las 48-72 horas (31). Con base en estas diferencias y a otros datos cristalográficos y moleculares, investigadores concluyen que B7-2 es el principal ligando de CD28 (coestimulador), y B7-1, el principal ligando de CTLA-4 (inhibidor) (5).

Se han postulado dos mecanismos que median los efectos inhibitorios de CTLA-4: Uno de ellos es la señalización negativa transmitida a través del dominio intracitoplasmático de esta molécula, que aumenta paralelamente a la activación del RCT. Actualmente no se conocen claramente las señales transmitidas por CTLA-4. Se han propuesto 3 modelos para explicar los niveles en los que posiblemente actúa CTLA-4: Inhibición temprana de las señales de activación inducidas por el RCT, Inhibición de las señales de activación inducidas por el RCT y CD28, Inhibición de las señales coestimuladoras dependientes de CD28. Independientemente de la vía de señalización usada por CTLA-4, las señales transmitidas por esta molécula inhiben la acumulación de AP-1, NF- κ B y NFAT en el núcleo de los LT activados, disminuyendo de esta manera la síntesis de citocinas (33,34). CTLA-4 también regula la proliferación celular inhibiendo la ciclina D3, las ciclinas dependientes de cinasas 4 y 6 y la degradación del inhibidor del ciclo celular p27^{kip1} (35). Otros estudios han demostrado que CTLA-4 disminuye los niveles de actividad de ERK y JNK, induciendo de esta manera la inhibición de la síntesis de IL-2 (5,36).

Con respecto al dominio intracitoplasmático de esta molécula, se han realizado numerosas investigaciones que tienen como objetivo elucidar las regiones de CTLA-4 indispensables en la transducción de las señales inhibitorias. El dominio intracitoplasmático de CTLA-4 está altamente conservado entre especies. Se ha estudiado un posible acoplamiento de residuos de tirosina presentes en el dominio intracitoplasmático de CTLA-4 a proteínas que contienen dominios SH2 (Src homology-2). Entre los residuos más estudiados se encuentran los localizados en las posiciones 165 y 182 (Y165 y Y182), que pueden proveer un sitio de unión a dominios SH2. Ambos pueden ser fosforilados *in vitro* por las cinasas Lck, fyn y lyn, entre otras, y potencialmente reclutar dominios SH2 (37,38). Sin embargo, se ha encontrado que aunque la fosforilación de estos residuos es importante para la retención de CTLA-4 en la superficie celular, no es requerida para mediar la inhibición de la activación del LT (8,9). Estos hallazgos se relacionan con los mencionados anteriormente, que muestran la importancia de la fosforilación de residuos de tirosina del dominio intracitoplasmático de CTLA-4 en la inhibición de su interacción con AP-2. Si los residuos de tirosina son fosforilados, AP-2 interacciona con CTLA-4 e induce la endocitosis de esta molécula (29). Algunos investigadores realizaron mutaciones en residuos de prolina presentes en el dominio intracitoplasmático de CTLA-4 para evaluar su participación en la señalización negativa, y demostraron que esta señal no se relaciona con la presencia o ausencia de estos residuos (8). Otros estudios indican que las mutaciones en diferentes aminoácidos que forman parte de la estructura intracelular de la molécula pueden originar un déficit parcial en la transmisión de la señal o pueden afectar directamente sitios de acoplamiento importantes en las vías de señalización. Sin embargo, la señal inhibitoria se conserva a pesar de la presencia de mutaciones en residuos de tirosina o prolina y de la delección de la mitad carboxi-terminal del dominio intracitoplasmático; por el contrario, la delección de la región proximal a la membrana (yuxtamembranal) del dominio intracitoplasmático inhibe completamente la señal inhibitoria. Así, estos aminoácidos yuxtamembranales están directamente involucrados en la transducción de la señal (9).

Investigaciones recientes han mostrado la asociación de la subunidad A de la serina/treonina fosfatasa 2A (PP2A) con tres residuos de lisina conservados locali-

zados en la porción juxtamembranal del dominio intracitoplasmático de CTLA-4. Mutaciones en los residuos de lisina impiden su unión a PP2A y aumentan la inhibición de la transcripción del gen de la IL-2, indicando que el acoplamiento de PP2A con CTLA-4 inhibe la función de CTLA-4 (5,10). Las bases bioquímicas y las implicaciones funcionales de estas asociaciones son aún desconocidas, aunque se demostró por ingeniería genética que la interacción del RCT con CTLA-4 durante la activación del LT induce una fosforilación de la subunidad A de PP2A y su disociación de CTLA-4. Liberada de PP2A, CTLA-4 inicia el envío de señales negativas para la activación del LT. PP2A también es capaz de desfosforilar e inactivar a la proteína cinasa B (PKB)/ Akt, sugiriendo la participación de CTLA-4 en la inhibición de las señales coestimuladoras mediadas por CD28. Esto puede ser explicado de la siguiente forma: Cuando CTLA-4 es expresada pero no está unida a su ligando, PP2A está asociada a CTLA-4, por lo que no puede inactivar a Akt. Bajo estas condiciones CTLA-4 no es inhibidora. Sin embargo, después de la interacción de CTLA-4 con el RCT, PP2A podría disociarse de CTLA-4 y permanecer libre para inactivar a Akt, mediando así la función inhibitoria de CTLA-4 (5). Adicionalmente, mientras el LT está inactivo, PP2A puede asociarse a CD28; en estas condiciones PP2A parece estar activa enzimáticamente. Durante la activación del LT, CD28 es fosforilado por Lck y se disocia de PP2A (41). De esta manera, PP2A puede ser mirada como una molécula que funciona como regulador negativo de los receptores de membrana a los que se asocia. Podemos concluir a partir de estas investigaciones que CTLA-4 puede inducir la inactivación del LT inhibiendo las señales coestimuladoras mediadas por CD28. Esta inhibición puede ocurrir a través de la transferencia de PP2A desde CTLA-4 hacia CD28 o, alternativamente, por una actividad fosfatasa directa de PP2A sobre las proteínas que hacen parte de las vías de señalización mediadas por CD28 (Ej. Akt).

El segundo mecanismo propuesto es la inhibición de la activación celular debido al antagonismo competitivo de la coestimulación mediada por CD28. Las señales de activación en los LT permiten la reorientación de la CTLA-4 que se encuentra en el espacio intracelular hacia la superficie celular y principalmente hacia las balsas esfingolipídicas para participar en la sinapsis inmunológica (SI) (42,43). De esta manera, CTLA-4 está disponible para competir con CD28 por B7. Debido a su mayor afinidad, CTLA-4 secuestra moléculas B7 y reduce la cantidad disponible de coestimulación dependiente de CD28. A diferencia de la señalización negativa intracelular, este segundo mecanismo no requiere la presencia del dominio intracitoplasmático de CTLA-4 y está regulado por los niveles de expresión de CTLA-4 en la superficie celular (3,5,8). Este hallazgo explica por qué la expresión de CTLA-4 está finamente regulada y altamente compartimentalizada, puesto que la presencia de altos niveles de CTLA-4 en la superficie celular podrían inhabilitar al LT para el desarrollo de una respuesta inmune. Sin embargo, numerosos estudios sugieren que el secuestro de moléculas B7 en la SI probablemente no es suficiente para bloquear las señales coestimuladoras del LT.

NUEVAS TERAPIAS BASADAS EN EL ESTUDIO DE CTLA-4

Los resultados de las investigaciones mencionadas anteriormente han permitido postular diferentes terapias basadas en los mecanismos que utiliza la molécula CTLA-4 para inhibir la activación de los LT.

La molécula CTLA-4 es potencialmente un importante blanco terapéutico en el tratamiento de neoplasias, enfermedades autoinmunes y rechazo de trasplantes, pero desafortunadamente los esfuerzos que se han realizado para inducir tolerancia por esta vía han sido fallidos debido a varias razones: CTLA-4 sólo es expresada por la mayoría de LT hasta el momento de su activación; los anticuerpos contra CTLA-4 deben presentar múltiples sitios de unión y una alta afinidad con esta molécula para inducir la señalización negativa, la administración de anti-CTLA-4 soluble en la práctica inhibe la señalización negativa y aumenta la respuesta inmune (44).

La realización de estudios utilizando células presentadoras de antígenos transfectadas expresando en su superficie anticuerpos específicos anti-CTLA-4, anti-CD3 y anti-CD28 demostró que la interacción selectiva de CTLA-4 con su anticuerpo induce atenuación de la respuesta del LT sólo cuando es co-estimulado el RCT durante la sinapsis inmunológica entre LT/CPA. Estos resultados apoyan un modelo de mecanismo de regulación negativa en el cual la asociación física entre CTLA-4 y el RCT origina una alteración en la fosforilación de las tirosinas proximales del RCT y es independiente de la vía de señalización de CD28 (45).

Estos hallazgos son compatibles con los de otros estudios, en los cuales anticuerpos anti-CTLA-4 usados para estimular interacciones de CTLA-4 con el RCT inducen una regulación negativa en la activación del LT (35,46,47,48, 49,50,51). Es interesante observar que la magnitud de los efectos de CTLA-4 en la proliferación de los LT y la producción de interleucinas depende en gran medida de la fuerza de interacción de la CPA con el TCR (la cantidad de MHC/péptido presentada y su afinidad por el TCR). Estos experimentos muestran que es posible estimular la vía inhibitoria de CTLA-4 no sólo a partir de señales antigénicas no específicas, sino también a partir de péptidos antigénicos presentados en MHC o anticuerpos anti-CTLA-4 ligados a membrana, lo cual sería de utilidad en la inducción de tolerancia para antígenos específicos en el contexto de trasplante de tejidos y autoinmunidad (52).

Un descubrimiento novedoso que ha alentado el uso de esta vía para inhibición terapéutica está relacionado con una molécula conocida como CD45. Se trata de una tirosina fosfatasa transmembranal íntimamente involucrada en la activación de los LT. Existen múltiples isoformas de CD45 que difieren en su dominio extracelular e influyen de maneras diferentes en la señalización. Un subgrupo de LT CD4+ que expresa constitutivamente CTLA-4 también expresa en su superficie una isoforma de CD45 de bajo peso molecular (CD45RB^{low}). El uso de un anticuerpo anti-CD45RB induce tolerancia, y causa un rápido cambio en la expresión de la isoforma CD45 de alto peso molecular a la isoforma de bajo peso molecular sin inducir la activación de los LT. Este incremento en la expresión de CD45RB^{low} ha sido asociado con un aumento significativo en el número de LT CD4+ expresando CTLA-4, lo cual sugiere la posibilidad que el anti-CD45RB actúe aumentando la expresión de CTLA-4. Estos estudios han mostrado que la señalización negativa por CTLA-4 puede ser específicamente aumentada utilizando anti-CD45RB, con el fin de inducir tolerancia de trasplantes a largo plazo (44).

Uno de los hallazgos más importantes en el estudio de esta molécula se ha convertido en el tema principal de nuevas investigaciones: los motivos ricos en lisina

presentes en el dominio intracitoplasmático de CTLA-4, imprescindibles en el acoplamiento con la enzima PP2A, podrían ser usados como blanco para la identificación de pequeñas moléculas que bloqueen su unión a PP2A y, por consiguiente, actúen como agonistas de la función de CTLA-4, permitiendo una modulación negativa de la respuesta inmune mediada por los LT (10).

Actualmente se están aplicando estos conocimientos en el desarrollo de nuevos procedimientos terapéuticos. Estudios clínicos realizados en pacientes con melanoma metastásico o cáncer renal han mostrado que anticuerpos para CTLA-4 promueven un rechazo inmunológico contra estas células tumorales clínicamente significativo y con una respuesta antitumoral duradera. Otros investigadores están sintetizando inmunotoxinas contra CTLA-4 para estudiar cómo inducen la muerte de poblaciones celulares y poder utilizarlas en el tratamiento del cáncer (53,54,55,56).

Nuevas estrategias son el uso de CPAs transfectadas con un gen que codifica para una molécula B7 anómala. Estas CPA con una expresión alterada de B7-1/B7-2 en su superficie pierden su capacidad para estimular respuestas alogénicas, péptido-específicas de los LT, induciendo en los LT una anergia antígeno-específica, estrategia interesante en prevención de rechazo de trasplantes y el tratamiento de enfermedades autoinmunes a partir del uso de células dendríticas inmaduras (57). Sin embargo, el bloqueo de CTLA-4 durante enfermedades autoinmunes puede resultar unas veces en una disminución y otras en un incremento de la respuesta de los LT; estas variaciones están relacionadas con la fuerza de la primera señal (TCR-CD3): En presencia de una primera señal fuerte y de altas cantidades de B7-1/B7-2, la expresión de CTLA-4 se incrementa, induciendo una inactivación de los LT. Otras señales, como los niveles de IL-2, también influyen en la modulación de la activación de los linfocitos T, por lo que es importante estudiar todos estos factores para poder desarrollar terapias más eficaces (58).

CONCLUSIONES

El propósito de esta revisión ha sido presentar a la molécula CTLA-4 como una opción terapéutica novedosa en la inducción de tolerancia inmunológica. Es, además, una alternativa optimista para quienes presentan un pronóstico carente de esperanza en relación con la curación y prevención del rechazo inmunológico en trasplante de órganos y múltiples enfermedades autoinmunes. El análisis de las diferentes vías de señalización intracelular que permiten la activación y la inactivación de los linfocitos T, así como el reconocimiento de cada una de las moléculas que intervienen en estos procesos para posteriormente profundizar en el análisis biomolecular de CTLA-4 y su importante aplicación en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas tolerogénicas, es una muestra de cómo la evolución del conocimiento científico se concentra cada vez más en la investigación básica biomolecular, convirtiéndose en pilar para el desarrollo de numerosas y efectivas estrategias preventivas y terapéuticas en el campo de la salud, con el fin de brindarle a la humanidad una mejor calidad de vida.

Financiación: Universidad del Norte

Conflicto de intereses: Ninguno

Referencias

1. Abbas, A.; Lichtman, A. *Inmunología celular y molecular*, 5ª ed.; p. 163-188. Madrid: Elsevier, 2004.
2. Goldsby, R.; Kindt, T.; Osborne, B.; Kuby, J. *Inmunología*, 5ª ed., pp. 224-250. México: Mc Graw Hill, 2004.
3. Frauwirth, K.; Thompson, CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J. Clin. Invest.* 2002; 109(3): 295-9.
4. Janeway, C.; Travers, P.; Walport, M.; Capra, D. *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*, 4ª ed., pp. 163-190. Barcelona: Masson, 2000.
5. Teft, W.A.; Kirchhof, MG.; Madrenas J. A Molecular Perspective of CTLA-4 Function. *Annu. Rev. Immunol.* 2006; 24:65-97.
6. Pioli, C.; Gatta, L.; Ubaldi, V.; Doria, G. Inhibition of IgG1 and IgE production by stimulation of the B cell CTLA-4 receptor. *J. Immunol.* 2000; 165(10):5530-36.
7. Wang, XB.; Giscombe, R.; Yan, Z.; Heiden, T.; Xu, D.; Lefvert, AK. Expression of CTLA-4 by human monocytes. *Scand. J. Immunol.* 2002; 55(1):53-60.
8. Carreño, BM.; Bennett, F.; Chau, T. et al. CTLA-4 (CD152) Can Inhibit T Cell Activation by Two Different Mechanisms Depending on Its Level of Cell Surface Expression. *J. Immunol.* 2000; 165(3):1352-6.
9. Cinek, T.; Sadra, A.; Imboden, J. Cutting Edge: Tyrosine-Independent Transmission of Inhibitory Signals by CTLA-4. *J. Immunol.* 2000; 164(1):5-8.
10. Baroja, M.; Vijaykrishnan, L.; Bettelli, E. et al. Inhibition of CTLA-4 Function by the Regulatory Subunit of Serine/Threonine Phosphatase 2A. *J. Immunol.* 2002; 168(10):5070-78.
11. Reif, K.; Cantrel, D. Networking Rho family GTPases in lymphocytes. *Immunity* 1998; 8(4): 395-401.
12. June, C.; Lebketter, JA.; Linsley, PS.; Thompson, CB. Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol. Today* 1990; 11(6):211-6.
13. Fruman, D. Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85alpha. *Science* 1999; 283(5400): 393-7.
14. Chan, T.; Rittenhouse, S.; Tsichlis, P. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 1999; 68:965-1014.
15. Li, L.; Yee, C.; Beavo, J. CD3 - and CD28-dependent induction of PDE7 required for T cell activation. *Science* 1999; 283(5403):848-51.
16. Brunet, JF.; Denizot, F.; Luciani, MF.; Roux-Dosseto, M.; Suzan, M. et al. A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature* 1987; 328(6127):267-70.
17. Dariavach, P.; Mattei, MG.; Golstein, P.; Lefranc, MP. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur. J. Immunol.* 1988; 18(12):1901-5.
18. Ling, V.; WuPW, Finnerty, HF.; Sharpe, AH.; Gray, GS.; Collins, M. Complete sequence determination of the mouse and human CTLA4 gene loci: cross-species DNA sequence similarity beyond exon borders. *Genomics.* 1999; 60(3):341-55.
19. Harper, K.; Balzano, C.; Rouvier, E.; Mattei, MG. ; Luciani, MF.; Golstein, P. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J. Immunol.* 1991; 147(3):1037-44.
20. Lafage-Pochitaloff, M.; Costello, R. ; Couez, D. ; Simonetti, J. ; Mannoni, P. et al. Human CD28 and CTLA-4 Ig superfamily genes are located on chromosome 2 at bands q33-q34. *Immunogenetics* 1990; 31(3):198-201.
21. Linsley, PS.; Brady, W.; Urnes, M.; Grosmaire, LS.; Damle, NK. ; Ledbetter, JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* 1991; 174:561-69.
22. Linsley, PS.; Greene, JL.; Brady, W.; Bajorath, J.; Ledbetter, JA.; Peach, R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1994; 1(9):793-801.

23. Collins, AV.; Brodie, DW.; Gilbert, RJ.; Iaboni, A.; Manso-Sancho, R. et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 2002; 17(2):201-10.
24. Van der Merwe, PA.; Davis, SJ. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2003; 21:659-84.
25. Stamper, CC.; Zhang, Y.; Tobin, JF.; Erbe, DV.; Ikemizu, S. et al. Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature* 2001; 410(6828):608-11.
26. Iida, T.; Ohno, H.; Nakaseko, C. et al. Regulation of Cell Surface Expression of CTLA-4 by Secretion of CTLA-4-Containing Lysosomes Upon Activation of CD4⁺ T Cells. *J. Immunol.* 2000; 165(9): 5062-8.
27. Schneider, H.; Martin, M.; Agarraberes, FA.; Yin, L.; Rapoport, I. et al. Cytolytic T lymphocyte-associated antigen-4 and the TCR ζ /CD3 complex, but not CD28, interact with clathrin adaptor complexes AP-1 and AP-2. *J. Immunol.* 1999; 163(4):1868-79.
28. Shiratori, T.; Miyatake, S.; Ohno, H.; Nakaseko, C.; Isono, K. et al. Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity* 1997; 6(5):583-9.
29. Bradshaw, JD.; Lu, P.; Leytze, G.; Rodgers, J.; Schieven, GL. et al. Interaction of the cytoplasmic tail of CTLA-4 (CD152) with a clathrin-associated protein is negatively regulated by tyrosine phosphorylation. *Biochemistry* 1997; 36(50):15975-82.
30. Jago, CB.; Yates, J.; Camara, NO.; Lechler, RI.; Lombarda, G. Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. *Clin. Exp. Immunol.* 2004; 136(3):463-71.
31. Lenschow, DJ.; Su, GH.; Zuckerman, LA.; Nabavi, N.; Jellis, CL. et al. Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90(23):11054-8.
32. Lenschow, DJ.; Walunas, TL.; Bluestone, JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14:233-58.
33. Fraser, JH.; Rincon, M.; McCoy, KD.; Le Gros, G. CTLA4 ligation attenuates AP-1, NFAT and NF- κ B activity in activated T cells. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29(3):838-44.
34. Olsson, C.; Riesbeck, K.; Dohlsten, M.; Michaelsson, E. CTLA-4 ligation suppresses CD28-induced NF- κ B and AP-1 activity in mouse T cell blasts. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(20):14400-5.
35. Brunner, MC.; Chambers, CA.; Chan, FK.; Hanke, J.; Winoto, A.; Allison JP. CTLA-4-mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J. Immunol.* 1999; 162(10):5813-20.
36. Calvo, CR.; Amsen, D., Kruisbeek, AM. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) interferes with extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Jun NH2-terminal kinase (JNK) activation, but does not affect phosphorylation of T cell receptor ζ and ZAP70. *J. Exp. Med.* 1997; 186(10):1645-53.
37. Miyatake, S.; Nakaseko, C.; Umemori, H.; Yamamoto, T.; Saito, T. Src family tyrosine kinases associate with and phosphorylate CTLA-4 (CD152). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 249(2):444-8.
38. Chuang, E.; Lee, KM.; Robbins, MD.; Duerr, JM.; Alegre, ML. et al. Regulation of cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 by Src kinases. *J. Immunol.* 1999; 162(3):1270-77.
39. Cazzolli, R.; Carpenter, L.; Biden, TJ.; Schmitz-Peiffer, C. A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase C ζ , in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate. *Diabetes* 2001; 50(10):2210-8.
40. Resjo, S.; Goransson, O.; Harndahl, L.; Zolnierowicz, S.; Manganiello, V.; Degerman, E. Protein phosphatase 2A is the main phosphatase involved in the regulation of protein kinase B in rat adipocytes. *Cell. Signal.* 2002; 14(3):231-8.
41. Chuang, E.; Fisher, TS.; Morgan, RW.; Robbins, MD.; Duerr, JM. et al. The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity* 2000; 13(3):313-22.
42. Egen, JG.; Allison, JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 2002; 16(1):23-35.

43. Linsley, PS.; Bradshaw, J.; Greene, J.; Peach, R.; Bennett, KL.; Mittler, RS. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* 1996; 4(6):535-43.
44. Ariyan, C.; Salvalaggio, P.; Fecteau, S. *et al.* Cutting Edge: Transplantation Tolerance through Enhanced CTLA-4 Expression. *J. Immunol* 2003; 171(11): 5673-7.
45. Griffin, M.; Hong, D.; Holman, P. *et al.* Blockade of T Cell Activation Using a Surface-Linked Single-Chain Antibody to CTLA-4 (CD152). *J. Immunol.* 2000; 164(9): 4433-42.
46. Walunas, T.; Lenschow, C.; Bakker, C. *et al.* CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994; 1(5):405-13.
47. Krummel, M.; Allison, P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* 1995; 182(2):459-65.
48. Walunas, T.; Bakker, C.; Bluestone, A. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J. Exp. Med.* 1996; 183(6):2541-50.
49. Krummel, M.; Allison, P. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J. Exp. Med.* 1996; 183(6):2533-40.
50. Blair, P.; Riley, B.; Levine *et al.* CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X_L induction. *J. Immunol.* 1998; 160(1):12-5.
51. Fallarino, P.; Fields, T.; Gajewski, F. B7-1 engagement of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 inhibits T cell activation in the absence of CD28. *J. Exp. Med.* 1998; 188(1):205-10.
52. Hwang, K.; Sweatt, W.; Brown, I. *et al.* Cutting Edge: Targeted Ligation of CTLA-4 In Vivo by Membrane-Bound Anti-CTLA-4 Antibody Prevents Rejection of Allogeneic Cells. *J. Immunol.* 2002; 169(2):633-7.
53. Korman, A.; Yellin, M.; Keler, T. Tumor immunotherapy: preclinical and clinical activity of anti-CTLA4 antibodies. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2005; 6(6): 582-91.
54. Peggs, KS.; Quezada, SA.; Korman, AJ.; Allison, JP. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 2006; 18(2):206-13.
55. Wan, L.; Zeng, L.; Chen, L. *et al.* Expression, purification, and refolding of a novel immunotoxin containing humanized single-chain fragment variable antibody against CTLA4 and the N-terminal fragment of human perforin. *Protein. Expr. Purif.* 2006; 48(2):307-13
56. Ghiringhelli, F.; Zitvogel, L. Vaccine strategies against melanoma. *Med. Sci. (Paris)* 2006; 22(2):183-7.
57. Tan, PH.; Yates, JB.; Xue, SA. *et al.* Creation of tolerogenic human dendritic cells via intracellular CTLA4: a novel strategy with potential in clinical immunosuppression. *Blood* 2005; 106(9): 2936-43.
58. Mukherjee, S.; Ahmed, A.; Malu, S.; Nandi, D. Modulation of cell cycle progression by CTLA4-CD80/CD86 interactions on CD4₊ T cells depends on strength of the CD3 signal: critical role for IL-2. *J. Leukoc. Biol.* 2006; 80(1):66-74.