

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)

Los linfocitos T, esenciales para nuestro sistema inmunitario

El equipo que dirige la doctora María Luisa Toribio García trabaja desde hace años en un tema de candente actualidad dentro del área de biomedicina, la investigación sobre las células madre.

Su trabajo se centra en el estudio de los mecanismos que determinan la generación de un tipo concreto de célula hematopoyética ó célula sanguínea que son los linfocitos T.



María Luisa Toribio y su equipo intentan entender los factores que determinan que las células madre o células tronco sanguíneas generen diferentes tipos celulares, en concreto, el linaje de los linfocitos T en el sistema humano. Su labor va encaminada a obtener información que permita entender el origen de patologías como las leucemias y que ayuden al diseño de tratamientos eficaces basados en terapia celular o génica.

Isabel Gayol Menéndez

Las células de la sangre, como el resto de las células del organismo, proceden de un tipo de célula pluripotencial, que es capaz de generar todos los tipos celulares del individuo y que es lo que se conoce como célula madre o célula tronco, cuya investigación ha despertado en los últimos años un profundo interés en nuestra sociedad.

Las células de la sangre proceden de un tipo de célula multipotencial, que es capaz de generar todos los tipos celulares del individuo y que se conoce como célula madre, célula tronco o progenitor.

Los diferentes tipos de células sanguíneas proceden de un tipo concreto de célula madre que es la célula madre hematopoyética. Esta célula se encuentra en el individuo adulto en el interior de los huesos, es decir, en la médula ósea, aunque en el embrión se encuentra mayoritariamente en el hígado fetal. En la médula ósea, los progenitores van a generar todos los tipos de células sanguíneas que existen y que se dividen en aproximadamente ocho linajes diferentes. El equipo que dirige M^a Luisa Toribio centra sus estudios en uno de esos linajes, los linfocitos T, y el sistema experimental que analizan es el sistema humano.

El interés de este grupo de investigación es saber cuáles son las bases moleculares y celulares de la especificación del linaje T. Pretenden averiguar qué es lo que hace que una célula capaz de generar ocho linajes diferentes decida, en un momento dado, generar un tipo concreto de linaje y no otro. Además, analizan si ésta es una decisión autónoma, o si existen otros factores del microambiente en el que se desarrolla el progenitor celular que condicionan la generación de ese linaje en particular. En definitiva, estudian cuáles son los mecanismos que determinan ese tipo de decisiones de linaje en las células tronco, concretamente en las células tronco hematopoyéticas, y específicamente para la diferenciación de linfocitos T.

La generación de linfocitos T, en oposición a otros tipos de células hematopoyéticas,

tiene lugar en una localización anatómica concreta: el timo. Se trata de una glándula localizada en la parte superior torácica, que tiene una función muy activa durante el desarrollo embrionario y el periodo neonatal, pero que sufre una atrofia a partir de la pubertad y durante la vida adulta. Por lo tanto, los progenitores ubicados en la médula ósea deben migrar al timo durante las etapas más tempranas de la vida para generar los linfocitos T.

Lo que no se ha sabido durante mucho tiempo es si la célula que llega al timo es una célula idéntica a la célula tronco hematopoyética, que mantiene la multipotencialidad que caracteriza a ésta o, si por el contrario, es una célula que ya está predeterminada para generar linfocitos T de una manera irreversible. Esta es la cuestión que ha venido investigando durante los últimos años M^a Luisa Toribio, junto con su personal de investigación.

Otra característica de las células tronco es su capacidad de autorenovación, que permite su mantenimiento prolongado durante la vida del individuo, de tal manera que aunque se diferencien y den lugar a una célula más madura, la división y la proliferación no ocurre de una manera simétrica, como ocurre en el resto de las divisiones celulares, en las que una célula se divide y da lugar a dos células idénticas. Por el contrario, la división de las células tronco ocurre de forma asimétrica, una célula hija es idéntica a la célula madre y la otra es una célula diferenciada, que producirá un linaje celular determinado. Esta capacidad de las células madre es la que permite que el sistema hematopoyético de un individuo adulto se pueda regenerar en cualquier momento de su vida.

Como ya se ha citado anteriormente, una diferencia de los linfocitos T con respecto a otros linajes hematopoyéticos es que se generan en el timo y no en la médula ósea, por lo que los procesos madurativos que determinan su generación podrían incluir un programa específico característico de los progenitores del linaje T y no de otros, que determinaría su migración al timo. También podría ocurrir que todos los progenitores de la médula ósea sean capaces de migrar a la periferia, y que sólo aquellos que alcanzasen el timo recibirían las señales necesarias para iniciar el proceso de generación de los linfocitos T.

Para investigar esta cuestión, se intenta saber si los progenitores antes de migrar al timo ya tienen características del linaje T. En la médula ósea se ha visto que no ocurre así, pero el grupo de Toribio comenzó entonces a investigar progenitores en etapas embrionarias muy tempranas, cuando no hubiera existido aún la posibilidad de que se hubiera generado un timo funcional. Esto ocurre en una edad gestacional de entre siete y nueve semanas, en la que las células madre embrionarias hematopoyéticas se encuentran en el hígado fetal. Se analizaron molecular y funcionalmente los progenitores que existen en el hígado embrionario humano entre siete y nueve semanas y se vio que en estas células existen una serie de características que sugerían que parte del programa madurativo se podría estar iniciando previamente a la llegada al timo, aunque la generación de células T funcionalmente maduras resultó ser dependiente de la interacción con el microambiente esencial que proporciona el timo.

Se sabe que el timo es indispensable para la generación de los linfocitos T porque existe una patología humana denominada síndrome de Di George, en la que los

La característica principal de las células tronco es su capacidad de autorenovación ya que nunca se agotan, lo que permite que el sistema hematopoyético de un individuo se pueda regenerar en cualquier momento de su vida

Se sabe que el timo es esencial para la generación de los linfocitos T porque existe una patología humana popularmente conocida como "los niños burbuja", en la que los individuos carecen de timo y por lo tanto de linfocitos T y no tienen posibilidades de montar una respuesta inmunitaria.

individuos carecen de timo y por lo tanto de linfocitos T, y son individuos inmunodeficientes, incapaces de montar una respuesta inmunitaria frente a antígenos externos. Dentro del sistema hematopoyético existen tipos celulares que forman parte del sistema inmunitario, encargados de defendernos de las agresiones externas, de tal manera que, aunque tengamos contacto con múltiples patógenos, este sistema se encarga de defendernos de ellos y por lo tanto éstos son incapaces de producir una infección, a no ser que exista un escape en esa respuesta inmunitaria.

La respuesta inmunitaria puede darse de dos formas diferentes: la innata y la adaptativa. En la primera participan una serie de tipos celulares cuyos receptores de reconocimiento no están adaptados de una manera específica a los diferentes patógenos. Se trata de células de tipo mielóide y células natural killer (NK) o citotóxicas naturales. La segunda respuesta defensiva, la adaptativa, es más sofisticada, ya que la desarrollan los linfocitos B y T a través de estructuras específicas de reconocimiento de antígenos, distribuidas clonalmente, que les permiten reconocer un número infinito de patógenos.

Los linfocitos B se encargarían de responder frente a patógenos solubles, mientras que los T lo harían frente a antígenos procesados presentados en la superficie de otras células. Los linfocitos T durante su desarrollo en el timo aprenden a defenderse de los patógenos en el contexto del individuo en el que se han generado, pero no en el contexto de otro individuo, por eso son capaces de reconocer no solamente patógenos presentados en la superficie de nuestras células, sino también antígenos, que no siendo patogénicos son específicos de un individuo diferente, como son los antígenos de histocompatibilidad. Esta es la base fundamental del rechazo a los trasplantes y esta función es realizada por los linfocitos T.

Cuando no existen linfocitos T, el sistema inmune está seriamente comprometido y nos encontramos ante una inmunodeficiencia, por eso es importante que el proceso de generación de linfocitos T sea lo más eficaz posible. El linfocito T, cuando sale del timo tiene que haber aprendido a reconocer lo que es un patógeno y diferenciarlo de sus propias células. Si no fuera tolerante con las propias células nos encontraríamos ante una reacción autoinmune, que es otra de las patologías consecuencia de una deficiente generación de linfocitos T y que provoca enfermedades como la diabetes, el lupus o las artropatías. En este caso, los linfocitos T no distinguirían entre las células nocivas para el organismo y las propias por lo que las atacan. Los linfocitos T también se encargan de reconocer moléculas alteradas presentadas sobre las células del individuo, como por ejemplo las proteínas que están expresadas en células tumorales, por lo que otra de las misiones importantes de los linfocitos T es la de rechazar tumores. Además, durante el desarrollo de los linfocitos T, si los sistemas de generación no están controlados es posible que acabe apareciendo una leucemia específica del linaje T (linfoma o timoma), porque los procesos de diferenciación de los linfocitos T llevan asociados procesos de proliferación.

En el timo ocurre un proceso de maduración donde, tras una serie de cambios genéticos en distintos momentos del desarrollo de ese linfocito se llega a obtener un linfocito T maduro. Este grupo de investigación analizó tanto fenotípicamente, es

En los casos de reacción anti-inmune, los linfocitos T no distinguen entre las células nocivas para el organismo y las propias, por lo que las atacan.

decir, a las moléculas de membrana, como genéticamente a los progenitores que llegaban al timo. También se investigó su función para saber si el progenitor que llega al timo era capaz de generar otros tipos de células hematopoyéticas y no sólo linfocitos T. Mediante cultivos celulares *in vitro*, analizaron el potencial de diferenciación de esas células y comprobaron que efectivamente podían generar otros tipos como células dendríticas, a las que se conoce como células presentadoras de antígenos profesionales, es decir, aquellas encargadas de presentar los antígenos patogénicos a las células T para desarrollar así una respuesta inmune. Además, se generaban también otro tipo de células, las “células naturales asesinas” (natural killer), que están implicadas en las respuestas inmunes no adaptativas o innatas.

Notch induce en el progenitor una capacidad de autorenovación parecida a la de las células tronco hematopoyéticas, lo cual sería muy importante porque es uno de los problemas que plantea el trasplante de progenitores hematopoyéticos.

El progenitor que llega al timo era capaz, por lo tanto, de generar diferentes células linfoides, por lo que se pensó que ese progenitor era linfoide. Posteriormente comprobaron que esos progenitores incluso generaban células mieloides, por lo que de las tres grandes ramas hematopoyéticas que son los linfocitos, las células mieloides y las células rojas, el timo recibe progenitores capaces de generar los linajes mieloides y linfoides. “Pensamos que de las tres grandes ramas, lo que llegaba al timo era una célula con potencial linfoide y mieloide, de hecho, en ratón se vio que esas células que llegan al timo también eran capaces de generar linfocitos B, aunque en humanos nadie ha descrito todavía esa potencialidad”, afirma M^a Luisa Toribio.

Por lo tanto se supone que la célula que llega al timo ya ha recibido una señal madurativa y ahora en lo que está trabajando la doctora Toribio es en intentar conocer cómo es esa señal. “Lo que nosotros estamos intentando publicar ahora y además, creo que empieza a haber indicios en ratón que apoyan los datos que tenemos en humanos, es que es una célula muy inmadura”, afirma Toribio. Se trataría, entonces, de una célula bastante parecida a la célula tronco hematopoyética, pero que ha perdido la capacidad de generar células de la estirpe roja, es decir eritrocitos y plaquetas y genera toda la serie blanca de la sangre, que es como se denomina a los leucocitos o glóbulos blancos.

La conclusión a la que ha llegado este equipo de investigación es que el timo recibe progenitores bastante inmaduros, diferentes de las células tronco, porque no tienen capacidad de autorenovación, pero que siguen manteniendo la capacidad de generar diferentes tipos de leucocitos.

Proyecto de investigación

Como ya se ha dicho, el grupo de investigación de M^a Luisa Toribio intenta entender las bases moleculares de la especificación de los linfocitos T a partir de células madre hematopoyéticas en el timo humano. Para comprender ese complejo proceso de diferenciación se han centrado en el análisis de una proteína de membrana denominada Notch. Se trata de una familia de moléculas muy conservadas en términos evolutivos desde el gusano *C. elegans* hasta el humano, lo que significa que su misión es muy importante ya que se ha mantenido su función a lo largo de la evolución.

En enfermedades como el cáncer, en las que se emplea quimioterapia, el tratamiento consiste en destruir el sistema hematopoyético de ese individuo. En ocasiones se preservan progenitores de la médula ósea para introducirlos luego y regenerar, con sus propias células, el sistema inmunitario.

Notch es una molécula que controla procesos de diferenciación, proliferación y

muerte celular, es decir, tres procesos que están íntimamente relacionados con el proceso general de desarrollo de los organismos. Para analizar cuál es la función de este gen en el desarrollo de los linfocitos T humanos, el equipo de Toribio ha tenido que desarrollar una serie de sistemas experimentales y estrategias diferentes a las utilizadas en el estudio del sistema del ratón. En humanos esta investigación requiere el empleo de cultivos organotípicos, en los que se utilizan lóbulos tímicos, a los que se les inyectan los progenitores manipulados genéticamente para analizar su función.

La principal conclusión del equipo es que la función del gen Notch o de la activación de esa vía funcional en el timo es supuestamente la inhibición de la generación del resto de los linajes celulares que no sean linfocitos T. Además, la idea más generalizada es que esta vía madurativa también induce de una manera activa un programa específico de linaje T. El equipo de Toribio tiene datos en los que está trabajando en la actualidad que sugieren que Notch no es suficiente para inducir el programa madurativo de un linfocito T. Lo que han visto es que Notch tiene como principal función bloquear la diferenciación no T, pero no se sabe hasta que punto también tiene la función de inducir específicamente un programa T o es otra señal la que se requiere para que el programa del linfocito T se active.

Lo que han visto hasta el momento es que Notch además de bloquear la diferenciación, lo que hace es inducir en el progenitor una capacidad de autorenovación y expansión que se asemeja bastante a la de las células tronco hematopoyéticas y esta propiedad sería muy importante, porque uno de los problemas que tiene el trasplante de progenitores hematopoyéticos, utilizado en algunas patologías graves, es que el número de células madre es muy limitado.

Cuando un individuo es inmunodeficiente, o tiene una patología como el cáncer en la que se emplea quimioterapia o radioterapia, el tratamiento conlleva la destrucción del sistema inmunitario, el sistema hematopoyético de ese individuo. En ocasiones se preservan progenitores de la médula ósea de ese individuo, para introducirlos posteriormente al tratamiento y poder así regenerar, con sus propias células, todo el sistema inmunitario que ha quedado comprometido. También se utiliza el trasplante de células madre hematopoyéticas en terapia génica, cuando existe una inmunodeficiencia genética en un individuo. Se pueden manipular genéticamente células tronco de ese individuo para introducir el gen del que carece y luego se reinfunden esas células tronco ya funcionales en el paciente.

En este sentido, los estudios que está realizando el equipo de la bióloga serían muy interesantes, ya que aún no se sabe como inducir proliferación de células tronco sin que éstas se diferencien y dejen de ser células progenitoras, y esto supone el principal problema que tiene la manipulación *in vitro* de las células madre. “Nadie sabe, hoy por hoy, como separar el proceso de proliferación del proceso de diferenciación de la célula”, afirma la doctora Toribio. En la actualidad se cree que el proceso de expansión de las células tronco implica un proceso de diferenciación que hace que las células nuevas sean diferentes a las de partida. A pesar de esto, lo que Toribio está comprobando es que el gen Notch inhibe la diferenciación, pero al mismo tiempo estimula la proliferación, por lo que esta vía funcional podría hacer que una célula tronco se pueda dividir manteniéndose idéntica a la original. “Los datos que tenemos ahora sugieren que la activación de la vía de Notch puede ser

Se pueden manipular genéticamente células tronco de un individuo para introducir en ellas el gen del que carecen y más tarde infundírselas de nuevo al paciente.

importante para el mantenimiento de la capacidad de autorenovación de las células tronco, inhibiéndose simultáneamente su diferenciación”, explica María Luisa Toribio.

Otra de las líneas de trabajo también relacionadas con el desarrollo de los linfocitos T es la generación de leucemias. Como se ha citado antes, Notch está implicado en inducción de proliferación y, de hecho, otros grupos de investigación han observado que en un tipo particular de leucemia T, la leucemia linfoblástica aguda T, existe una activación constitutiva de la vía de Notch. La activación de la vía de Notch tiene que estar muy regulada durante el desarrollo, ya que de no ser así da lugar a la generación de una leucemia.

Este grupo de investigación también estudia como se regula la vía de Notch durante el desarrollo y cuáles serían los efectos funcionales de la sobre-expresión de dicha vía en distintos momentos del desarrollo para ver si serían capaces de reproducir *in vitro* la generación de una leucemia T y así entender cual es el proceso que subyace a la generación de este tipo de leucemias y, además, analizar cuáles podrían ser las soluciones a esa patología.

Existen también varias líneas adicionales de investigación. Una de ellas es la diferenciación de células dendríticas humanas. Este grupo demostró que el progenitor que llega al timo es capaz de generar células dendríticas, que son esenciales para la presentación de antígenos y en la generación de respuestas inmunes. El equipo ha querido seguir estudiando esta cuestión porque existe un tipo de terapia celular con células dendríticas, por lo que es esencial el entendimiento de los mecanismos de generación de las células dendríticas para el correcto diseño de estas terapias. Los antígenos tumorales se presentan sobre las células dendríticas, por lo que si se consigue tener un sistema eficiente de presentación de proteínas tumorales a las células T, se podrá tener un sistema idóneo de tratamiento anti-tumoral.

Existe también otra línea de investigación adicional. La base molecular del reconocimiento de los linfocitos T es una proteína de membrana llamada TCR que es el receptor de antígeno de los linfocitos T que, al contrario de la inmunoglobulina o receptor antigénico de los linfocitos B, no es soluble. A pesar de esta diferencia, en términos de estructura y de organización genética ambos receptores son bastante similares. El receptor de los linfocitos T es una estructura compleja, que se ha generado mediante diferentes procesos de recombinación somática durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo, y que está anclado en su membrana. Antes de que ese receptor (TCR) sea maduro, existe otro receptor durante el desarrollo en el timo que se expresa de forma transitoria y que precede a la expresión del TCR maduro. Se trata del pre-TCR, que es un receptor que está implicado en procesos de proliferación, de tal manera que la señalización a través de ese receptor hace que en el timo haya una expansión enorme de linfocitos T. Es, por lo tanto, un sensor de que la célula ha emprendido correctamente un programa madurativo concreto que es el de los linfocitos T en el timo. Se ha visto que este receptor está también implicado en los casos de leucemia linfoblástica aguda T, asociadas a la activación de la vía de Notch. Pudiera ser que la función del pre-TCR, que induce la proliferación celular, no pueda funcionar simultáneamente con Notch, que es otra vía de proliferación, porque quizá sea esto lo que determine la generación de una

leucemia.

El equipo intenta entender hasta qué punto ese receptor tiene que estar regulando su expresión de forma coordinada con Notch para evitar que aparezcan procesos linfoproliferativos que desemboquen en leucemia. La forma en la que el pre-TCR regula su expresión es mediante su desaparición de la membrana. El receptor da su señal y luego se esconde dentro de la célula, se internaliza y desaparece. Este proceso es conocido como endocitosis y se estudian los mecanismos que la determinan, se analiza la eliminación del complejo pre-TCR de la membrana y su eliminación de los linfocitos en desarrollo. Entender cómo se regula este proceso puede ser importante para entender qué es lo que se desregula cuando se produce una leucemia como consecuencia de la señalización por el pre-TCR.

Proyectos realizados

María Luisa Toribio García ha participado en importantes y muy diversos proyectos:

Grupo de Investigación: Desarrollo del sistema linfohematopoyético humano:

- Diferenciación de precursores humanos del linaje T. Implicaciones en el diseño de protocolos de trasplante de precursores hematopoyéticos procedentes de médula ósea y órganos fetales.
 - Estudio de los progenitores, microambientes y requerimientos moleculares de la linfohematopoyesis en humanos.
 - Estudio de los mecanismos de muerte celular programada implicados en los procesos de selección intratímica en el hombre.
 - Estudio de los mecanismos implicados en la diferenciación de células dendríticas linfoides y mieloides a partir de precursores multipotenciales intratímicos.
 - Desarrollo y análisis de sistemas de reconstitución mielóide y/o linfóide a partir de precursores transducidos con vectores retrovirales.
 - Desarrollo de sistemas experimentales de reconstitución hematopoyética en estudios preclínicos de terapia génica somática.
 - Estructura y función del pre-TCR humano: regulación de su expresión durante el desarrollo linfóide T.
 - Estudio funcional de los progenitores hematolinfoides humanos responsables de la reconstitución post-trasplante: aplicaciones en terapia génica.
 - Análisis del potencial de reconstitución linfóide de precursores hematopoyéticos humanos modificados genéticamente: aplicaciones en terapia génica.
 - Terapia génica del sistema hematolinfóide: estudios pre-clínicos de transferencia y expresión génica en precursores de células linfoides y células dendríticas humanas.
 - Estadios pre-T en la diferenciación intratímica humana: Caracterización bioquímica del complejo pre- TCR.
 - Análisis de la expresión y función de pre-TCR durante el desarrollo intratímico humano.
- Caracterización de los procesos moleculares asociados a la selección β .
- Regulación de la función de Notch durante el desarrollo intratímico humano.

FICHA TÉCNICA

Centro: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM)

Investigador: María Luisa Toribio García

Dirección: Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. Cantoblanco
Ctra. de Colmenar Viejo, Km. 15. 28049 Madrid (Spain)

Teléfono: 91 4975070

Fax: 91 497 47 99

Email: mtoribio@cbm.uam.es

Página web: www2.cbm.uam.es/cbm2001/memo9900/Memoria.pdf

Líneas de investigación: Generación de linfocitos T humanos, generación de leucemias T, procesos de proliferación y diferenciación inducidos por la vía de Notch, expresión del pre-TCR