

# Modelo matemático de la regulación del sistema inmune mediante la tolerancia dominante

Kalet León Monzón, Rolando Pérez Rodríguez, Agustín Lage Dávila

Centro de Inmunología Molecular. Ave 16 y 216, Siboney, Playa, Ciudad de La Habana 11600.  
AP 16040, Cuba. Telf.: (53-7) 271 4335; Fax: (53-7) 335049; E-mail: kalet@ict.cim.sld.cu

## RESUMEN

El presente trabajo constituye el primer estudio cuantitativo del fenómeno de la supresión mediada por células T, a partir de técnicas biomatemáticas. Los resultados obtenidos en el mismo aportan una visión novedosa, cuantitativa, sobre el fenómeno de la Tolerancia Inmunológica mediados por linfocitos T-reguladores. En particular se predijo y demostró por primera vez la proliferación de los linfocitos T reguladores bajo la influencia de los efectores. Se descartaron como improbables varios modelos propuestos en la literatura para el mecanismo de acción de las células T reguladoras. Se definieron las condiciones en las cuales es posible el surgimiento de enfermedades autoinmunes y aquellas en que es posible lograr una inmunización efectiva. Se propuso una explicación totalmente novedosa para la selección positiva y la selección negativa en el timo; que diverge de la visión convencional. Este tipo de técnicas, basadas en la construcción de formalismos matemáticos y su simulación en computadoras, resultan imprescindibles para la comprensión de los fenómenos inmunológicos, a medida que la ciencia va superando los enfoques reduccionistas del Siglo XX, y sustituyéndolos por análisis a nivel de sistemas complejos, donde las propiedades del sistema, tolerancia e inmunogenicidad en este caso, no se intenta reducirlas a propiedades de las células componentes; sino que se estudian como propiedades dinámicas de todo el sistema. La intuición y los análisis cualitativos suelen fallar en este nivel de complejidad; y así las herramientas tales como las construidas en este trabajo, se vuelven esenciales para la comprensión de los fenómenos y para el diseño de nuevos experimentos.

## Introducción

Los mecanismos por los cuales el sistema inmune distingue aquellas estructuras moleculares contra las cuales debe reaccionar (lo "ajeno") de aquellas que deben ser toleradas (lo "propio") constituye el problema central de la inmunología [1]; y tiene enormes implicaciones prácticas para el tratamiento de infecciones, cáncer y enfermedades autoinmunes. En los últimos 10 años ha habido un cambio trascendental en la manera de pensar de los inmunólogos sobre este tema: a la explicación clásica basada en la idea de que los clones autoreactivos son suprimidos (delección clonal) [2, 3] se adiciona ahora la posibilidad de que para muchos antígenos los linfocitos potencialmente auto-agresivos existen, pero son controlados por otros linfocitos-T-reguladores (tolerancia dominante) [4, 5]. La interpretación cuantitativa de la tolerancia es ahora más compleja, pues si bien en la teoría de la delección clonal la tolerancia a lo propio es simplemente la ausencia de células autoreactivas; para la teoría de la tolerancia dominante, la capacidad de tolerar lo propio es una propiedad dinámica de todo el sistema [6].

El presente trabajo estudió el papel de las células T reguladoras en la tolerancia inmunológica. El enfoque de este estudio es biomatemático. En él se desarrollaron varios modelos teóricos y se confrontaron con datos experimentales. En este trabajo se distinguieron dos etapas complementarias. Inicialmente se estudió el mecanismo por el cual las células T reguladoras suprimen la actividad de sus células blanco. En esta primera etapa los modelos matemáticos se utilizaron para evaluar y comparar cuantitativamente varias hipótesis alternativas para dicho mecanismo. Posteriormente, y a partir de los modelos antes analizados, se estudiaron las implicaciones de estos mecanismos de regulación en la organización y funcionamiento del

sistema inmune. Particularmente, el interés se centró en las implicaciones para una distinción efectiva entre antígenos propios y ajenos en el sistema inmune. En esta última etapa los modelos matemáticos sirvieron para establecer relaciones causales entre fenómenos en diferentes niveles de organización del sistema. En otras palabras, para derivar las consecuencias a nivel sistémico de propiedades individuales de las células y sus interacciones.

## Descripción de los resultados

### Construcción y calibración de un modelo para la actividad de las células T reguladoras

La hipótesis principal a lo largo de este trabajo es que las células T reguladoras suprimen la actividad de sus células blanco mientras ambas células están simultáneamente conjugadas con la misma célula presentadora de antígenos (APC) [7-9]. En otras palabras, la supresión requiere la formación de complejos multicelulares, que contienen al menos una APC, una célula reguladora y una célula blanco. Las interacciones entre complejos multicelulares han sido propuestas en varios problemas biológicos, no obstante al comienzo del presente trabajo no existían en la literatura modelos matemáticos para su análisis. Por esta razón la primera tarea y el primer resultado fue el desarrollo de un formalismo matemático para el estudio de esta clase de interacciones celulares, aplicándolo directamente al estudio de la interacción entre las células reguladoras y sus células blancos (Figura 1).

El modelo desarrollado [10] esta compuesto de dos ecuaciones diferenciales ordinarias que describen la variación en el tiempo del número de células reguladoras (R) y células blanco (T) como resultado de su interacción mutua y con las APCs. En la formu-

1. Tauber AI. The immunological self: Theory or Metaphor? Cambridge: University Press.; 1994.
2. Burnet FM. The clonal selection theory of acquired immunity. Nashville: Vanderbilt University Press., 1958.
3. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. Cell 1987; 49(2): 273-80.
4. Sakaguchi S, et al., Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. Immunol Rev 2001; 182: 18-32.
5. Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. Annu Rev Immunol. 2000; 18: 423-49.
6. León K. A quantitative approach to Dominant Tolerance. University of Porto, Portugal November 2002.
7. Davies JD, et al. T cell suppression in transplantation tolerance through linked recognition. J Immunol 1996; 156(10): 3602-7.
8. Lombardi G, et al. Anergic T cells as suppressor cells in vitro [see comments]. Science 1994; 264(5165): 1587-9.
9. Cobbold SP, et al. Mechanisms of peripheral tolerance and suppression induced by monoclonal antibodies to CD4 and CD8. Immunol Rev 1996; 149: 5-33.
10. León K, et al. Modelling T cell mediated suppression dependent on interactions in multicellular conjugates. J Theor Biol, 2000; 207: 231-54.

lación del modelo se hicieron las siguientes asunciones, que ayudan a simplificar el mismo:

1. Las APCs constituyen una población homogénea de células, que poseen en su superficie un número dado (parámetro S) de sitios independientes para su unión a linfocitos.

2. Los procesos de conjugación y desconjugación de los linfocitos a los sitios de conjugación en las APCs pueden ser descritos como procesos cinéticos de primer orden, en analogía con los formalismos utilizados para describir las interacciones proteína-ligando. Estos procesos fueron además asumidos como procesos rápidos comparados con otros procesos en la fisiología de los linfocitos (ejemplo división y muerte celular).

En el formalismo obtenido fueron implementados cuatro modelos matemáticos específicos que se describe la dinámica de las poblaciones de las células reguladoras y sus células blancas (Figura 1). Estos modelos representan las siguientes hipótesis existentes en la literatura para el mecanismo de supresión:

C1- La supresión es el resultado de la competencia entre las células R y T por recursos en la superficie de las APCs [8-9].

C2- La supresión es mediada por una señal inhibitoria directa dada por la célula R a la célula T en el complejo multicelular [11].

C3- La interacción entre las células T y R no solo media una inhibición directa de la activación de las células T, sino que también media una estimulación positiva de la proliferación de las células R. Quizás como resultado de factores de crecimiento producido por las células T [10].

C4- La célula R no solo inhibe la activación de las células T, sino que induce la diferenciación de las mismas al fenotipo regulador [12].

Para cada uno de estos modelos [10] se obtuvieron inicialmente sus diagramas de fase y se analizó la bifurcación de sus propiedades dinámicas dependiendo de los parámetros del mismo. Se argumentó que para explicar cuantitativamente los resultados de los experimentos de transferencia adoptiva de tolerancia (*in vivo*), se requiere un modelo donde: i) exista una región de su espacio de parámetros donde es biestable, siendo posible interpretar estos dos estados de equilibrio estable como un estado de tolerancia y otro de inmunidad, respectivamente; y ii) en el estado de equilibrio, interpretado como tolerancia, ambas poblaciones de células, las reguladoras y sus blancos, pueden coexistir en equilibrio. Se concluyó entonces que sólo aquellos modelos de interacción donde el crecimiento de la población de células T reguladoras es estrictamente dependiente de sus células blancas cumplen con las dos propiedades antes mencionadas (modelos C3 y C4) y por tanto son compatibles con los resultados de experimentos *in vivo*.

Posteriormente [13] los modelos fueron comparados en cuanto a su capacidad de explicar cuantitativamente los resultados de experimentos de supresión *in vitro*. Este estudio permitió cuantificar la eficiencia de la supresión en mecanismos de interacción que son dependientes de la formación de complejos multicelulares, demostrándose la existencia de un límite superior. La comparación de este límite con los datos experimentales mostró que el modelo C1 no es capaz de ajustar

$$\frac{dT}{dt} = \sigma_e + \sum_{i=1}^S \sum_{j=0}^S \alpha_e(i,j) \cdot A_{i,j}(T,R) - T_f$$

$$\frac{dR}{dt} = \sigma_r + \sum_{i=1}^S \sum_{j=0}^S \alpha_r(i,j) \cdot A_{i,j}(T,R) - R_f$$

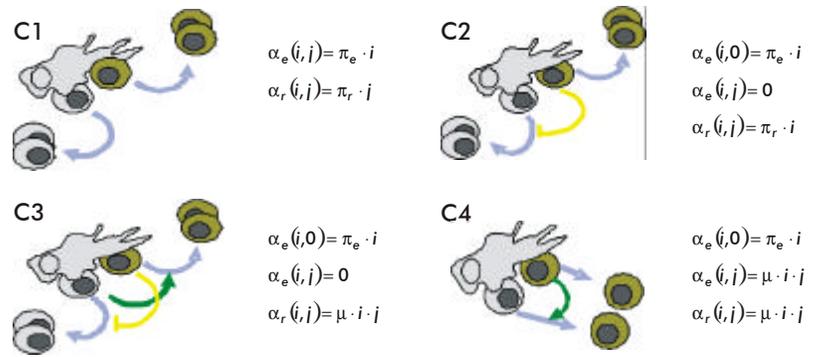


Figura 1. Formalismo matemático para el estudio de interacciones en complejos multicelulares. Diferentes hipótesis para la interacción de las células R y T entre sí y con las APCs pueden ser representados, a partir de la definición de los coeficientes de interacción  $\alpha_e(i,j)$  y  $\alpha_r(i,j)$ .

los datos experimentales en ningún rango de parámetros, mientras que el modelo C2 solo alcanza los niveles de supresión obtenidos para valores no realistas para el tiempo medio de división de las células T ( $td < 6$  horas) (Figura 2A). Por otra parte los modelos C3 y C4 consiguieron ajustar los datos experimentales para valores realistas de sus parámetros (Figura 2B), concluyéndose que solo estos dos modelos son compatibles con los resultados de inhibición *in vitro*.

De conjunto, el análisis teórico realizado redujo considerablemente el número de hipótesis para el mecanismo de supresión y se propuso como modelo adecuado aquel en el cual la población de células T reguladoras crece dependiendo de las células blanco que suprime. El crecimiento de la población de células reguladoras pudiera explicarse a partir de la proliferación de estas células dependiente de estimulación por las células blanco o a partir de una diferenciación de las células blanco al fenotipo regulador. La primera de estas hipótesis, que fuera originalmente propuesta en el grupo (modelo C1), fue entonces explorada experimentalmente a partir del diseño de un nuevo ensayo de supresión *in vitro* [6, 14] donde la proliferación de las células reguladoras y sus blancos puede ser cuantificada independientemente usando la citometría de flujo. Los resultados de este estudio (Figura 3) muestran que las células blanco cuando se estimulan *in vitro* en ausencia de células reguladoras, proliferan y se observan varios picos en el marcaje con CFSE. Más si se co-cultivan células T y células R, la proliferación de las células T disminuye dependiendo de la proporción de células R en el cultivo. Por otra parte las células R no proliferan cuando se estimulan solas con APCs en cultivo (se observa único pico en el marcaje con CFSE). Pero si se co-cultivan con células T, entonces se observa claramente su proliferación. Por lo que este estudio corrobora experimentalmente la hipótesis planteada con lo que se demostró por primera vez que las células reguladoras T CD4+CD25+ proliferan si

11. Takahashi T, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;10(12):1969-80.

12. Le Douarin N, et al. Evidence for a thymus-dependent form of tolerance that is not based on elimination or anergy of reactive T cells. *Immunol Rev* 1996;149: 35-53.

13. León K, et al. Three-cell interactions in T cell mediated suppression? A mathematical analysis of its quantitative implications. *J Immunol* 2001;166:5356-65.

14. Oliveira Y, et al. Target CD4+CD25- T cells promote the growth of regulatory CD4+CD25+ T cells in vitro.

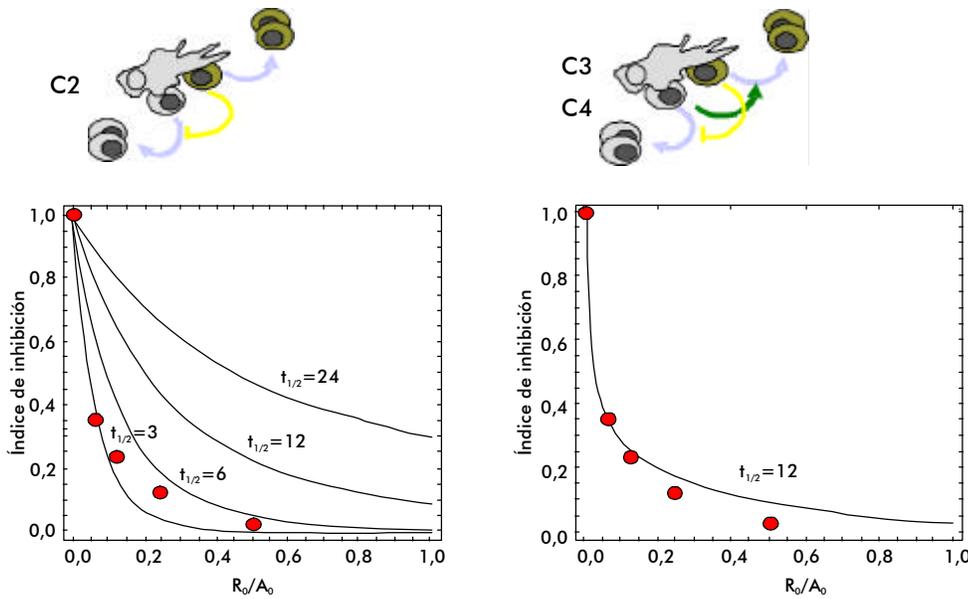


Figura 2. Ajuste de los modelos C2, C3 y C4 a datos experimentales obtenidos en la literatura.

son estimuladas en presencia de células blanco CD4+CD25-. Mas aún, la proliferación de las células reguladoras correlaciona directamente con la proliferación de las células blanco, sugiriendo la existencia de un factor de crecimiento compartido por ambas poblaciones y que es producido exclusivamente por las células blanco en ausencia de supresión directa por las células reguladoras. La naturaleza de este factor de crecimiento fue extensamente discutida, proponiéndose que el mejor candidato es la IL-2, lo que adicionalmente proporciona una explicación mecanística simple para la alta expresión del receptor de IL-2 (CD25) en las células del fenotipo regulador.

**Discriminación propio/foráneo en un modelo de sistema inmune con células T reguladoras**

Una vez desarrollado y validado el modelo matemático de los mecanismos de regulación, se pasó a uti-

lizarlo en el estudio de las implicaciones de la supresión mediada por células T para una efectiva discriminación entre antígenos propios y foráneos en el Sistema Inmune [15]. Si la actividad supresora de las células reguladoras sobre las células blanco es mediada por el co-reconocimiento de antígenos en las APCs y los antígenos foráneos son siempre copresentados con algún antígeno propio en las APCs, entonces ¿cómo puede el Sistema Inmune garantizar tolerancia a los antígenos propios y a la vez montar respuestas inmune efectivas contra microorganismos invasores? Para abordar este problema varias simulaciones numéricas de los modelos fueron diseñadas e implementadas y se adicionaron a las mismas funciones para la generación y selección intratímica de nuevos clones de células reguladoras y blanco. La Figura 4 muestra esquemáticamente la estructura de las simulaciones.

15. León K. et al. Tolerance and Inmunity in a mathematical model of T-cell mediated suppression. J Theor Biol. 2003 Nov 7; 225(1):107-26.

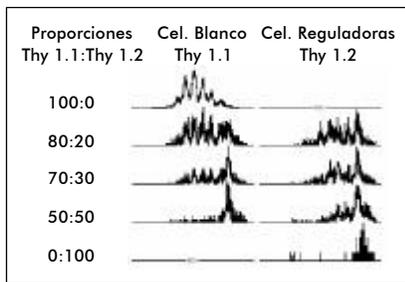


Figura 3. Proliferación de las células blanco (CD4+CD25-, marcador Thy 1.1) y reguladoras (CD4+CD25+, marcador Thy 1.2) cultivadas *in vitro* en diferentes proporciones. La proliferación es medida a partir de marcaje con una sustancia fluorescente (CFSE) que permite determinar el número de veces que una célula se ha dividido a partir de un marcaje inicial. Esto es células que no se dividieron están en el pico del extremo derecho del perfil de CFSE. Células que se han dividido una, dos o más veces aparecen ordenadas en los picos subsiguientes de derecha a izquierda.

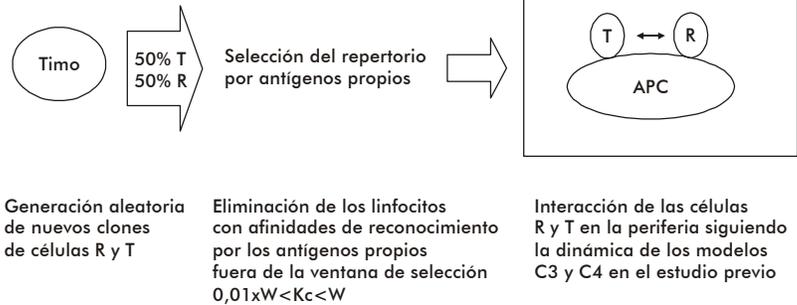


Figura 4. Representación esquemática de las simulaciones del sistema inmune. Los clones generados en el compartimento "timo" son seleccionados en su interacción con los antígenos propios y sólo aquellos con afinidades de reconocimiento dentro de cierta ventana son exportados al compartimento periferia. En la periferia los linfocitos interactúan inicialmente con antígenos propios y ocasionalmente se introduce en este compartimiento un nuevo antígeno que se denomina como antígeno foráneo (o no propio) para simular un reto antigénico.

Los resultados alcanzados demostraron que existe una solución dinámica simple al problema antes planteado. En las simulaciones la interacción con antígenos propios produce 1 de 2 modos diferentes de respuesta (Figura 5) que se pueden identificar respectivamente como autoinmunidad y tolerancia. Dada la aleatoriedad de la simulación estos 2 modos de respuesta pueden ser siempre obtenidos, mas la frecuencia de aparición de uno u otro depende de los parámetros que controlan el sistema. Mas aun a partir de un sistema que se organiza tolerante a los antígenos propios (Figura 5b), el sistema puede ser perturbado por la introducción de un antígeno foráneo a producir una expansión de las células T específicas para el antígeno introducido (modo de respuesta inmune (Figura 6), volviéndose al estado tolerante después de eliminado el antígeno foráneo. La obtención de este modo de respuesta requiere que la introducción del antígeno foráneo provoque una reducción cuantitativa de la frecuencia de APCs conjugadas con células reguladoras. Lo que en el modelo puede lograrse si la introducción de un antígeno foráneo conlleva al desplazamiento significativo de los antígenos propios de las APCs o al incremento del número total de APCs en el sistema.

Finalmente un balance adecuado de tolerancia e inmunidad en las simulaciones depende de los parámetros que controlan el sistema y particularmente aquellos que controlan la generación y selección del repertorio en el timo. La Figura 7 muestra esta dependencia. Para altos valores de la velocidad de generación de nuevos clones en el timo y altas afinidades de reconocimiento por antígenos propios escapando la eliminación el timo, el sistema tolera frecuentemente los antígenos propios, y también tolera frecuentemente la introducción de antígenos foráneos. Mientras que para valores pequeños de las magnitudes antes mencionadas el sistema raramente tolera los antígenos propios, mas si lo hace es muy reactivo a la introducción de antígenos foráneos. Solo en una franja intermedia del plano de parámetros el sistema tolera frecuentemente a los antígenos propios, mas mantiene una alta reactividad a la introducción de un antígeno foráneo. Esta depen-

dencia permite concluir que una adecuada distinción entre antígenos propios y ajenos requiere que el timo seleccione los clones generados para tener afinidades de interacción por los antígenos propios dentro de una ventana de valores dados, pero una vez satisfecha esta condición, la diferenciación de los timocitos al fenotipo regulador puede asumirse como antígeno independiente. Este resultado plantea una reinterpretación del papel de los procesos de selección positiva y negativa en el timo en este marco teórico que es precisamente la opuesta a la propuesta por las teorías inmunológicas clásicas. La selección positiva es necesaria para obtener una frecuencia lo suficientemente elevada de células T autoreactivas, tanto efectoras como reguladoras, que garanticen una tolerancia robusta a los antígenos propios. La selección negativa es necesaria para prevenir la aparición en periferia de clones T reguladores de muy alta afinidad por los antígenos propios, lo que impediría la ruptura de tolerancia a partir de la introducción de un antígeno foráneo.

## Conclusiones

El presente trabajo constituye el primer estudio cuantitativo del fenómeno de la supresión mediada por células T, a partir de técnicas biomatemáticas. Los resultados obtenidos aportan una visión novedosa (cuantitativa) sobre el fenómeno de la Tolerancia Inmunológica mediados por linfocitos T-reguladores. Los principales aportes de este estudio son:

- La construcción de un formalismo matemático basado en ecuaciones diferenciales para describir las interacciones entre células presentadoras, linfocitos efectores y linfocitos reguladores.
- La extensión del modelo para incorporar el efecto de la salida permanente de nuevos clones celulares del timo, para obtener un primer simulador simple del sistema inmune.
- La comparación cuantitativa de 4 modelos alternativos propuestos en la literatura para el mecanismo de acción de las células T reguladoras, se descartaron los 2 primeros modelos por no ajustarse a los datos experimentales.

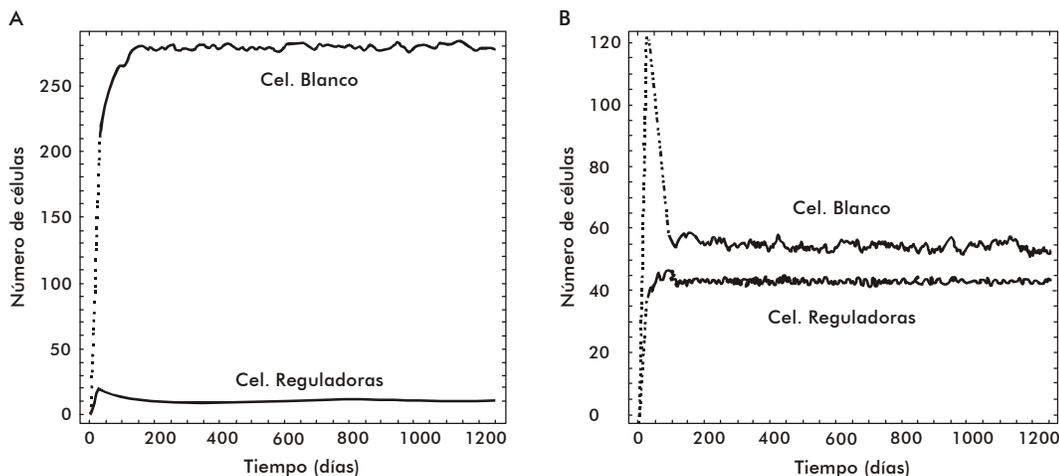


Figura 5. Modos de respuesta del modelo en la interacción con antígenos propios. A) Modo de interacción autoinmune. En este caso las células blanco se expanden y sólo una población residual de células reguladoras es mantenida por la generación tímica. B) Modo de interacción tolerante, la expansión de las células blanco controlada por la expansión concomitante de las células reguladoras.

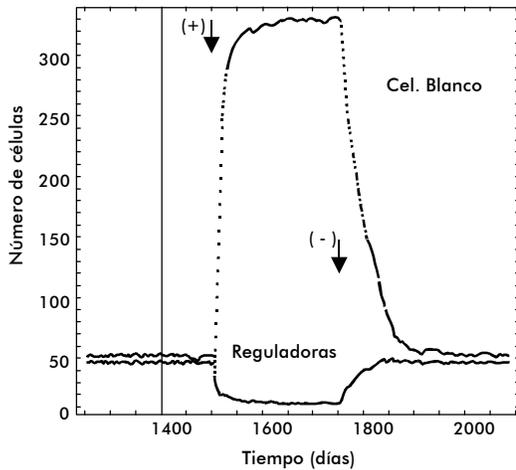


Figura 6. Inducción de un modo de respuesta inmune por la introducción de un antígeno foráneo. La introducción del antígeno (signo + en el gráfico) provoca la expansión de células blanco antígeno específicas. La eliminación del antígeno foráneo (signo - en el gráfico) provoca el retorno al estado tolerante en la interacción con antígenos propios.

- La predicción, según los modelos 3 y 4, que la población de células T-reguladoras debe expandirse en su interacción con las células efectoras, se obtuvieron datos experimentales que demostraron la proliferación de las células T reguladoras en presencia de sus células blanco (según lo propuesto en el modelo 3).

- La proposición de una explicación totalmente novedosa para la selección positiva y la selección negativa en el timo; que diverge de la visión convencional, al establecer que la selección positiva es necesaria para asegurar un número suficiente de células auto-reactivas y hacer posible la tolerancia; mientras que la

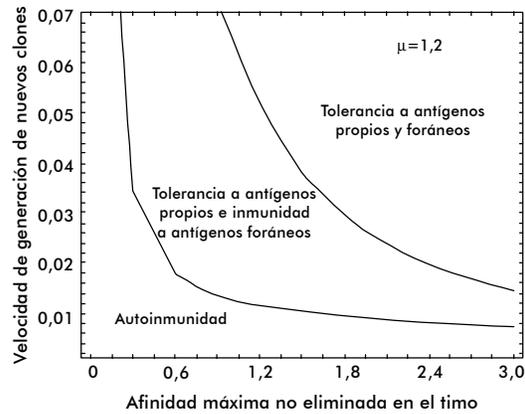


Figura 7. Dependencia del comportamiento del modelo con los parámetros que controlan la generación y selección del repertorio de linfocitos Reguladores y Blanco.

selección negativa de las muy altas afinidades es requerida para evitar la aparición en periferia de células reguladoras de alta afinidad, que harían imposible la reacción contra antígenos foráneos.

Por otra parte, el "simulador" matemático desarrollado tendrá aplicaciones prácticas en el diseño de tratamientos con vacunas de cáncer. Nótese que el mismo puede ser utilizado para estudiar las condiciones en las que una "vacunación" contra células cancerosas es posible, con la inclusión de algunas condiciones "contra-intuitivas" tales como la necesidad de combinar vacunas con tratamientos de reducción de linfocitos reguladores. Actualmente estos estudios se desarrollan en el Centro de Inmunología Molecular, para el diseño de experimentos de inmunoterapia combinada entre anticuerpos, vacunas y citostáticos; así como para el diseño de ensayos clínicos.