

EL SUEÑO DEL PIBE ¹

Palabras clave: innovación, solidaridad, resiliencia.
Key words: innovation, solidarity, resilience.

El lenguaje técnico para develar las complejidades de la inmunología moderna se complementa con los cálidos recuerdos de familiares, colegas y amigos

Leonardo Fainboim

Laboratorio de Inmunogenética. INIGEM-UBA-CONICET

lfainboim@yahoo.com

¹ Editora asignada: **María Cristina Añón**

Nací el 26 de marzo de 1942 en una casa del barrio de Avellaneda. El fútbol con los chicos de la cuadra era mi principal diversión. A los 9 años luego de un partido, y como ocurre frecuentemente entre los niños, nos preguntamos qué hacer cuando seamos grandes. Cuando me tocó opinar, dije que quería ser médico. Me preguntaron por qué, y dije que me interesaba saber cómo funciona el cuerpo humano y que quería encontrar una cura para el cáncer.

■ MI VIDA MÉDICA

En el año 1962 se abrió en el Hospital Fiorito de Avellaneda la Unidad Hospitalaria y formé parte de la primera promoción de médicos que egresó de ese Hospital en diciembre de 1964. En mi caso, mi último examen fue oftalmología en mayo de 1965, dos meses después de haber cumplido 23 años. El atraso se debió a que por el servicio militar postergué algunas cursadas.

Al finalizar el primer año de la Unidad Hospitalaria me incorporé a la guardia del hospital en coincidencia con los feriados de Navidad y Año Nuevo. En mi segunda guardia, 31 de diciembre, estando en el consultorio externo absolutamente solo porque los mayores estaban en

el comedor celebrando la entrada del año 1963, se abre bruscamente la puerta con un padre trayendo en sus brazos un bebé sin respirar que había fallecido por ingesta de alcohol. Al llegar mis compañeros, para hacerse cargo de la situación, salí a caminar muy alterado emocionalmente. Como con tantas otras cosas traumáticas, mi capacidad de resiliencia me permitió seguir adelante.

Con mi título de médico, permanecí unos meses en la sala de clínica médica del hospital Fiorito. Seguí durante ese periodo la evolución de varios pacientes que presentaban alteraciones renales, que terminamos derivando para su estudio al Servicio de Nefrología de la Fundación Pombo que dirigía el Dr. Víctor Raúl Miatello. Luego de que esto ocurriera con varios pacientes, decidí acompañar a uno de ellos y le pedí al Dr. Miatello hacer mi concurrencia en su servicio.

Mi concurrencia al Instituto Pombo en 1965 coincidió con los preparativos para el primer trasplante que se realizó ese año y fracasó. Yo continué con mi entrenamiento en Nefrología hasta el año 1967. En ese periodo, mientras el Dr. Miatello estaba convaleciente de un infarto de miocardio, el Dr. Moledo se hizo

cargo del segundo trasplante renal, que tampoco fue exitoso. En 1966 se comienza a establecer el papel del HLA (*human leukocyte antigen*), y en 1970 se introduce la utilización del *crossmatch* que investiga la presencia en el receptor de anticuerpos dirigidos hacia el HLA del donante. Era claro por entonces, que el problema era inmunológico y el desafío era superar el rechazo del trasplante

Como la formación inmunológica en esa época estaba restringida a los especialistas en Alergia, decidí en el año 1967 realizar un curso de Alergia e Inmunología que se desarrollaba en el Hospital Ramos Mejía. Al terminar el curso, tomo una concurrencia en ese Servicio, y completo mi entrenamiento en el diagnóstico y tratamiento de pacientes afectados de patologías alérgicas. Simultáneamente, en este periodo 1967-1969 combino mi trabajo clínico con mi primera aproximación al laboratorio que funcionaba en el Servicio, fundamentalmente utilizando técnicas de detección de anticuerpos. A mediados de 1969, conozco al Dr. Enrique Mathov, y le comento mi interés en estudiar mecanismos asociados con la inmunidad celular que podrían involucrar a la alergia. Le dije a Mathov que quería investigar la respuesta a alérgenos de las células

mononucleares. Me miró con cierta incredulidad; sin embargo, me ofreció un pequeño cuarto dentro de su Servicio de Alergia e Inmunología del Policlínico "R. Finochietto". Mi primera tarea fue, con un carpintero, armar una cámara de cultivo que consistía en un cajón revestido de teflón. La noche anterior encendía la luz ultravioleta y dejaba el cajón con el vidrio bajo, para generar un ambiente estéril. Acá comenzó una odisea de varios meses, tratando de purificar células mononucleares de sangre periférica, hasta que el 26 de marzo de 1970 (fecha que recuerdo, por ser el día de mi cumpleaños número 28) logré ver mis primeros linfoblastos luego de un cultivo de cuatro días con PHA y tinción de un frotis con May-Grünwald/Giemsa. En ese año, Mathov me pone en contacto con su sobrina, la Dra. Alicia Mazzolli que había regresado de Francia y trabajaba en la 2ª cátedra de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Alicia utilizaba el test de migración de los macrófagos para detectar la presencia del MIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos). Comienzo entonces a combinar mi trabajo en el Hospital por las mañanas, con el trabajo en la cátedra de Histología por la tarde y mi consultorio que comenzaba a atender a partir de las 18 horas. Esto continúa hasta abril de 1972, en que el profesor Roberto Mancini me propone asumir un cargo de Ayudante de primera con dedicación exclusiva, ofrecimiento que acepté.

Me encuentro, a los 30 años, iniciando mi carrera científica sin haber transitado la etapa de becario de formación, sin haber tenido un ambiente de tutelaje y por ende con muy poca experiencia formal en la carrera de un investigador científico. A pesar de estas falencias, vivía este proceso con mucho entusiasmo. A tal punto que grande fue mi alegría

cuando recibí mi primer sueldo de Ayudante de primera, que significaba recibir un pago por algo que venía haciendo en forma honoraria y en total soledad.

A fines de 1972, publico con la Dra. Mazzolli mi primer trabajo en la *Revista Medicina*, sobre el efecto del MIF (*Macrophage Migration Inhibitory Factor*) sobre los túbulos seminíferos testiculares aislados in vitro. Sin embargo, un día del año 1973, recibí un llamado de la Dra. Mazzolli, diciéndome que ella consideraba que debía buscar otro laboratorio. Este llamado fue demoledor para mí, no podía entender los motivos para tal determinación, salvo ser una persona molesta por mi interés en iniciar nuevos proyectos. El Dr. Ricardo Monastirski, a pesar de no trabajar en inmunología me ofrece generosamente un espacio en su laboratorio. Así fue que me mudé a su laboratorio, con la generosa donación de la Dra. Mazzolli, de algunas pipetas de 10 ml, otras de 5 ml, y un par de cámaras de Mackaness que se empleaban para el estudio del MIF y determinar la inmunidad celular. Debo destacar que además de estar solo no disponía de ningún subsidio para el desarrollo experimental.

El Dr. Mancini solía recorrer los laboratorios a última hora de la tarde y me plantea estudiar qué efecto puede tener un traumatismo que daña profundamente a un testículo sobre el testículo contralateral. Estos experimentos estaban basados en el efecto que ejerce un gran traumatismo ocular sobre el ojo contralateral, fenómeno conocido como oftalmia simpática. Esta idea generó dos nuevas publicaciones, una que inducía el daño testicular con sueros anti-espermáticos (Mancini, R., y col, *J. Allergy Clin. Immunol.* 1974) y otra que medía la respuesta inmune y la respuesta testicular contralateral después de inducir en cobayos un

daño testicular traumático (Fainboim, L., y col, *Andrology* 1976).

Mientras estaba realizando estos trabajos, comienza a germinar la idea de un posible papel del ácido ribonucleico (ARN) en la autoinmunidad. En el año 1970, Howard Temin y David Baltimore describieron en forma independiente la enzima transcriptasa inversa que podía generar un ácido desoxirribonucleico (ADN) complementario a partir de un ARN de cadena simple. Esto fue seguido por modelos experimentales in vivo o in vitro que mostraron que células linfoides tratadas con el ARN de donantes inmunes era capaces de transferir la reactividad específica hacia antígenos bacterianos (Jureziz, Thor y Dray, 1968), tumorales (Kern, Chou y Pilch, 1976), virales (Bilello, Fishman y Koch, 1976) o sintéticos (Paque, Ali y Dray, 1975). Sin embargo, no existían reportes sobre la posibilidad de transferir una enfermedad autoinmune experimental con su ARN.

La orquitis alérgica experimental (OAE) es un modelo clásico de enfermedad autoinmune órgano-específica, caracterizada por un daño en los túbulos seminíferos testiculares rodeados por un infiltrado linfoplasmocitario. Este cuadro se acompaña de una respuesta humoral y celular frente a antígenos espermáticos. La OAE es inducida por la inyección de una suspensión de tejido testicular homólogo emulsionado en adyuvante de Freund completo (Freund, Thompson y Lipton, 1953).

A principios de 1970 se había demostrado que la OAE podía ser transferida a animales sanos mediante la inyección de células linfoides de donantes con OAE (Kantor y Dixon, 1972; Tung y col., 1971). Mientras, inducía diferentes maneras de reproducir la orquitis oftálmica, comencé a preguntarme si el

ARN de células linfoides de cobayos con una OAE sería capaz de generar la transferencia a cobayos sanos.

Mi formación en biología molecular era nula, como así también en muchos otros aspectos del trabajo experimental. Sin embargo, tuve la fortuna de conocer al Dr. José La Torre, que trabajaba unos pisos más abajo en la primera cátedra de Histología. José había regresado poco tiempo atrás de Filadelfia, donde habían descrito junto a R. Perry la técnica de extracción de ARN de polirribosomas (Perry, R., La Torre, J. y col., *Biochem. Biophys Acta*, 1972).

La primera dificultad fue superar mi falta de recursos financieros. Los cobayos, para inducir la OEA y obtener de ellos los órganos linfáticos para la extracción del ARN, me fueron donados por el INTA Castellar. Contaba con la colaboración de dos brillantes estudiantes de medicina: Marcelo Sztein y Susana Serrate, ambos ayudantes de segunda en la cátedra. Todos los días, luego de sus

clases en la Unidad Hospitalaria, llegaban al Laboratorio donde permanecíamos juntos hasta muy tarde por la noche. Formados como técnicos en histología, realizaban los cortes y tinciones de los tejidos donde se analizaba tanto la inducción de la OEA como los efectos de la transferencia de ARN.

Los ganglios y bazo de cobayos con OAE se conservaban a -70°C , hasta el momento de la extracción del RNA. Cada pool de ARN procedente de 10-12 cobayos se analizaba mediante un gradiente lineal continuo de sacarosa donde la presencia de los tres picos de 28S, 18S y 4S indicaba que, luego de múltiples experimentos fallidos, habíamos finalmente obtenido un ARN no degradado. La transferencia del ARN por vía intraperitoneal se evaluaba a los 45 días cuando se sacrificaba el animal. Grande fue nuestra alegría cuando evidenciamos que el ARN de los animales con OAE transfería la enfermedad, efecto no detectado con el ARN tratado con Rnasa o

proveniente de cobayos inoculados con AFC de cobayos sanos. La lesión testicular se asoció con una respuesta celular detectada por el ensayo del MIF frente al antígeno testicular (ASPM). Estos resultados, se publicaron en *Clin. Exp. Immunology*, Fainboim, Sztein, Serrate y Mancini, 1978.

Al finalizar una presentación de este trabajo en la I Cátedra de Histología, se acercó un joven estudiante de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, con intención de sumarse a este proyecto. Era Leonardo Satz, quién fue mi querido compañero y amigo, hasta su temprana muerte. Con la incorporación de Leo al grupo se estudiaron los mecanismos que involucran a la inmunidad celular inducida por el ARN (Fainboim y col., *Immunology*, 1979).

Para la fecha en que aparecieron las dos publicaciones sobre la transferencia de autoinmunidad mediada por ARN, yo ya había emigrado a Inglaterra. Hacia mediados de 1976,



Figura 1: En Ezeiza antes del embarque para Inglaterra: De izquierda a derecha se puede ver a Leíto Satz, Susana Serrate, Marcelo Stein, mi hermano Hugo y mis padres a la Derecha. En mis brazos mi hija Paula.

cuando la dictadura militar tomó el poder en Argentina, opté por aceptar una beca de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que tenía otorgada desde 1974 y Marcelo, Susana y Leíto completaron experimentos que finalmente fueron publicados en 1978 y 1979.

■ MI ESTADÍA EN INGLATERRA

En junio de 1976 arribo al Departamento de Inmunología del *London Hospital Medical College*, el Hospital más antiguo de Londres. El director del Departamento Hilliard Festenstein, al que todos llamaban H, era una persona cálida, inteligente y con ideas muy progresistas en ciencia y en política. Era un judío sudafricano, que había conocido la cárcel en su país por su posición anti-apartheid. Esta condición no encajaba demasiado con el ambiente formal del resto de los profesores de la Universidad. Muy raramente almorzaba con sus pares, y prefería comer con nosotros en la cantina del hospital, pues decía que era un buen momento para hablar de ciencia.

Mi esposa Marta y mi hija Paula que tenía 14 meses, llegaron en agosto. Los primeros meses fueron difíciles. Marta estaba inscrita para hacer un máster en el *Birbeck Co-*

llege. Yo salía temprano al Hospital. Marta se quedaba con Paula hasta el mediodía y luego la llevaba a la casa de una señora que cuidaba niños (*child minder*). Yo pasaba a buscarla a las 5 de la tarde, me la entregaba con los pañales sucios, la bañaba, la cambiaba y preparaba la cena. A las 9 de la noche íbamos con Paula a la estación del subterráneo a buscar a Marta que regresaba de la Universidad, cenábamos, acostamos a Paula y volvíamos a nuestras tareas. Al cumplir 2 años, Paula fue aceptada en la guardería de la Universidad de Londres, y a través de esa misma universidad alquilamos una casa victoriana de dos plantas a un precio bastante accesible. Esto representó un cambio importante en nuestra inserción. Al tener una habitación más, pudimos contratar a una estudiante extranjera que a cambio de casa y comida y un pequeño sueldo de bolsillo, se ocupaba de tareas mínimas, como ir a buscar a Paula, y colaborar con alguna tarea de la casa.

■ LOS RATONES EN MI VIDA

Nuestro Instituto tenía dos pisos, en el primero funcionaban los laboratorios de histocompatibilidad, y en el segundo los bioterios y los laboratorios de experimentación con ra-

tones. Aquí comencé a familiarizarme con las técnicas de citotoxicidad mediada por células y en el cultivo mixto linfocitario (CML). Festenstein, estaba interesado en los genes determinantes de la activación linfocitaria o Lads (por su sigla en inglés), en particular el denominado *Mls* (*mouse lymphocytes stimulating*), que Colin Bischof y H. Festenstein ubicaron en el cromosoma 1 del ratón, por fuera del sistema mayor de histocompatibilidad (CMH). Se habían identificado expresados en diferentes cepas de ratones cinco alelos *Mls* (*Mls^a* hasta *Mls^e*). Los Lads de los *Mls* poseen un poderoso efecto estimulante de linfocitos que funcionan en un solo sentido; por ejemplo, *Mls^a* y *Mls^d* estimulan a *Mls^b* pero no viceversa. Comencé con los ensayos de CML y de injerto contra huésped y H me pide que me involucre en la generación de un *Mls* congénito. El método consistía en generar un híbrido F1 de la cruce de padres con diferentes haplotipos *Mls*. El F1 es vuelto a cruzar con una de las cepas paternas, "backcross" (Bcs). Luego se seleccionaba el Bcs, por la presencia del *Mls* mediante un cultivo mixto linfocitario. El objetivo era llegar hasta la generación 12 de los Bcs para obtener el *Mls* congénito. Repentinamente, luego de muchos meses de intenso trabajo, las res-

Cuadro 1 El cultivo mixto linfocitario (CML)

En 1964, Bach y Hirschorn describen en forma independiente los cambios morfológicos y la división celular que ocurre cuando se mezclan leucocitos de diferentes cepas de ratones, lo que representó la primera descripción de un CML. En 1967, Bach y Amos observaron que la mezcla de linfocitos de hermanos HLA idénticos no se estimulaban entre ellos, indicando que el CML estaba gobernado por la región cromosómica del HLA. En 1973, Mempel y col. observaron que individuos que no responden a la estimulación de células homocigotas humanas, compartían el mismo determinante linfocitario (LD). Finalmente, en 1975, durante el 6° Taller Internacional de Histocompatibilidad se identificaron los LD responsables de la activación de los linfocitos humanos en el CML. Durante este taller se intercambiaron 62 células homocigotas (HTCs) obtenidas de hijos de matrimonios entre primos hermanos, las cuáles se irradiaban o se trataban con mitomicina C y se utilizaban como células estimuladoras en el CML. Las HTCs que no estimulaban a un grupo de células respondedoras permitieron identificar a los primeros 6 alelos del locus HLA-D.

puestas de los CML para la selección del Bcs así como los ensayos de supresión empleando la técnica del injerto contra huésped (GvsH) empiezan a dar resultados inentendibles. Finalmente, a principios de 1977 se detecta en el bioterio una infección por virus Sendai, que obliga a eliminar a todos los animales, incluyendo los Bcs de la cepa congénita. Con la frustración que esto generó, paso a trabajar en el área de HLA.

■ SE DEFINEN NUEVAS PREGUNTAS

A mediados de 1977, se incorporó al laboratorio donde Dolores Jaraquemada tenía a su cargo la tipificación y caracterización de los nuevos alelos HLA-D, un trabajo cuyos resultados formaron parte de su tesis de doctorado. Con Dolores compartimos el trabajo y una amistad que

se mantiene hasta el presente. Con la identificación de los alelos del *locus* HLA-D, surgió la pregunta sobre cuáles eran las células portadoras de los antígenos HLA-D. En 1978 no existían marcadores que identificaran el fenotipo de las células mononucleares (CMN) responsables de activar un CML. Iniciamos experimentos purificando células T, por su capacidad de formar rosetas con glóbulos rojos de carnero que se recuperaban mediante un gradiente de densidades y lisado de los glóbulos rojos. En otros experimentos, las CMN se incubaban sobre una de las caras de un frasco de cultivo para adherir los monocitos, luego sobre la otra cara del frasco conteniendo un suero anti-IgG humano previamente adherido que retiene a los linfocitos B. De las CMN remanentes se purificaban los linfocitos T por la técnica de las rosetas con

glóbulos rojos. Esto permitió obtener cuatro poblaciones: una enriquecida en linfocitos T, otra con linfocitos B, una tercera con monocitos (ambas recuperadas de ambas caras del plástico) y una cuarta población remanente sin linfocitos T, B y monocitos. El resultado sorprendente para ese momento fue que la población a la que se había removido a los LT, B o monocitos inducía una estimulación 10 veces mayor que los linfocitos B o monocitos, mientras que los LT no estimulaban el CML. Esta población correspondía a las células dendríticas responsables de estimular el CML como demostró 14 años después R. Thomas y col. en *J. Immunology* en el año 1993. Evidentemente, perdimos una enorme oportunidad de demostrar que estábamos trabajando con estas células.

Cuadro 2

El descubrimiento de las células supresoras CD8+

En los años 1970 y 71; Robert Gershon demostró que linfocitos derivados del timo inducían una tolerancia antígeno específica que podía transferirse en forma adoptiva a ratones vírgenes, fenómeno que se denominó como "tolerancia infecciosa". A estos linfocitos que inhiben la respuesta inmune se los denominó T supresores Ts, e identificados como linfocitos Ly2,3+ (CD8+). En esa época se especulaba que los factores responsables del efecto supresor eran producidos en la región J, que se la ubicaba junto a los genes que codificaban a los antígenos de clase II del CMH del ratón, e incluía a factores determinantes de la activación linfocitaria.

Otro elemento que orientó nuestro trabajo fue la descripción que en 1978 realizaron en forma simultánea S. Schlossman y A. Gottlieb quienes demostraron que los linfocitos T luego de ser activados expresan moléculas de clase II en su superficie. En junio de 1979, mientras estaba en el mar en Sorrento (Italia) acostado en una colchoneta inflable asocié estos dos tipos de experimento. A mi regreso al laboratorio tomé la idea de inducir células T que expresan moléculas de clase II y evaluar su actividad supresora. Empecé generando líneas celulares de células T activadas con PHA que eran mantenidas mediante un medio condicionado (MC), obtenido del sobrenadante de CMN estimulados durante 36 horas con PHA. Las células activadas fueron criopreservadas a diferentes tiempos de cultivo para su caracterización fenotípica y funcional. La incubación de las células activadas con el anticuerpo monoclonal DA2 que reconoce el componente no polimórfico de HLA-DR demostró su positividad en las células en cultivo y permitió separar por citometría de flujo las poblaciones HLA-DR+ y HLA-DR-. El efecto supresor se evaluó por la capacidad de las células activadas de inhibir la proliferación de células del mismo individuo en reposo frente a antígenos específicos y aloantígenos en el CML. Los ensayos confirmaron el efecto supresor totalmente restringido a los linfocitos T HLA-DR+. Un análisis dosis respuesta demostró que pequeñas cantidades (1000-2000) de células T DR+ eran suficientes para inducir una fuerte supresión de

la respuesta proliferativa, no ejercida por los linfocitos T HLA-DR-. Mi entrañable amiga y compañera Cristina Navarrete confirmó que las células en reposo y los linfocitos T activados del mismo individuo compartían los mismos antígenos HLA-DR.



Figura 2: Con Cristina Navarrete escribiendo el manuscrito de *Nature*

El anticuerpo anti-TH2 que gentilmente me facilitó George Janossy reconocía una población presente en alrededor de un 20% de linfocitos T, que unos meses más tarde se caracterizó como T CD8+. Las células TH2 positivas representaban aproximadamente un 70% de las células que alcanzaban el día 23 del cultivo. De ellas más del 90% expresan HLA-DR.

Este trabajo apareció publicado en la revista *Nature* (Fainboim, L., Navarrete, C. y Festenstein, H.) en noviembre de 1980, con el título *Precursor and effector phenotypes of activated human T lymphocytes*. En realidad, un título poco afortunado, ya que no señalaba la importancia de la expresión del HLA-DR en las células con capacidad supresora. Hasta el día de hoy, la expresión de HLA-DR en linfocitos T, se considera como el resultado de la activación celular. Si bien su expresión se induce con la activación celular, su presencia tanto en linfocitos CD4 como CD8 está asociada con su capacidad supresora, y esta característica sigue hasta el día de la fecha sin ser convenientemente contextualizada (ver más adelante).

Estudios simultáneos nos brindaron información sobre el papel de células supresoras a nivel genético. Identificamos una familia donde la madre y la hija no solo no responden a la HTC por compartir el HLA-D tampoco responden a los miembros de la familia de esa HTC que eran HLA-Bw35 homocigotas, independiente de su HLA-D. Existía un antecedente donde los linfocitos de la madre no responden a los linfocitos de su esposo, a pesar de no compartir HLA-D (McMichael y Sasazuki, *J. Exp. Med.* 1977). En ese caso, también se asoció la inducción de la supresión a que el esposo era HLA-Bw35 homocigota. En nuestro estudio, fuimos afortunados en poder estudiar la segregación de los factores estimulantes de la supresión asociados a los individuos B35 homocigotos donde el *crossing over* y la recombinación ocurrieron entre HLA-B y HLA-D en uno de los hijos. De esta manera pudimos ubicar a los determinantes supresores separados de HLA-D y asociado con los antígenos de clase I. (Fainboim, L. y col. *Scand. J. Immunol.* 14, 655-667, 1981).

Cuadro 3

El locus HLA-DR

A comienzos de los años 70, A. van Leeuwen en el laboratorio de van Rood demostró que anticuerpos anti-HLA bloqueaba a los determinantes HLA-D responsables de la estimulación del CML, Por esta capacidad se denominó a estos sueros DR (D related). La caracterización de los sueros DR fue el tópico principal del 7º Taller Internacional de Histocompatibilidad (IHWS) realizado en 1977, donde se identificaron 7 alelos HLA-DRw1-7 (los antígenos definidos en los IHWS llevan provisoriamente la letra w, hasta que son confirmados).

Después de la identificación de los antígenos HLA-DR, se identificaron los sueros HLA-DC que se pensaban que corresponden al mismo locus que los que codificaban HLA-DR. Cristina Navarrete observó que un suero que reconoce HLA-DR y HLA-DC en células de una leucemia mieloide aguda, luego de ser absorbido con plaquetas, seguía reconociendo DR, pero negativiza la expresión de DC, indicando que las moléculas DR y DC eran codificadas por genes diferentes. Esto generó una primera publicación (Navarrete, C. y col. *Leukemia Markers*, Academic Press, New York 1981, p. 65), luego confirmado cuando se compararon células linfoides maduras con células precursoras de células mieloides normales o leucémicas utilizando el anticuerpo Genox 353 que identifica a productos del locus DC (Newman, R. A. y col, *Eur. J. Immunol.* 1983.13).

Finalmente, en la década del 80 quedó demostrado que HLA-D, incluía 3 loci estrechamente ligados que codifican para los determinantes DR, DQ (el previo DC) y DP.

■ NUESTRA VIDA SOCIAL EN LONDRES Y LA DECISIÓN DEVOLVER A LA ARGENTINA

Describí las dificultades para insertarse durante el primer año. Las cosas mejoraron a partir del segundo año con la mudanza a una casa victoriana de fines del siglo 19, amplia y con capacidad para recibir a la enorme cantidad de argentinos que viajaban con el dólar "barato". Los recogía en el aeropuerto, compartimos comidas y salidas para que conocieran lugares atractivos de Londres y de la campiña inglesa. El tráfico llegó a ser tan intenso que ocupaban la pieza de huéspedes y la sala de estar.

En un momento dado, los dueños de la casa nos anunciaron que venden la casa y que deberíamos dejarla. Mi banco me ofreció una hipoteca por el 80% del valor de la casa y con algunos préstamos pudimos comprarla. Fue la mejor y más importante inversión de mi vida, debido al boom inmobiliario ocurrido en Inglaterra en los años siguientes

que generó un aumento del valor de la propiedad.

Moisés Spitz junto con su esposa Lidia eran una especie de refugio para muchos de nosotros. Tenía en su casa un taller/carpintería donde ponía de manifiesto su capacidad de construir muebles, armar y desarmar cualquier aparato o auto. Eran memorables los domingos en que nos encontrábamos con nuestras familias para amasar pastas, actividad en la que participaban grandes y chicos, intercalados con algún auto que arreglar. En junio de 1977, llega a Londres, procedente de Chicago, Osvaldo Uchitel (<https://aargentinapciencias.org/wp-content/uploads/2021/06/04-RESENA-Uchitel-CelResenasT9N2-2021.pdf>), en Enero de 1978, Alberto Fossati (<https://aargentinapciencias.org/publicaciones/revista-resenas/resenas-tomo-6-no-4-2018/>) y su esposa Cristina Añón (<https://aargentinapciencias.org/publicaciones/revista-resenas/resenas-tomo-6-no-3-2018/>), y muchos otros que

formaban la colonia argentina. A mi lista de amigos, debo incorporar a Monique Gilly, hija de un argentino que se fue a España para unirse a las brigadas internacionales. Con Monique, entablamos una amistad que perdura hasta estos días. Ahora está radicada en Madrid, y la vemos cada vez que podemos.

Al ocupar la investigación científica un papel tan fundamental en mi vida londinense no es de extrañar que la gente de mi laboratorio también ocupara un lugar central en los afectos. Ya mencioné mi entrañable relación con Dolores Jaraquemada y Cristina Navarrete. Con Cristina, su marido Roberto, un neurocientífico y sus hijos compartimos comidas y política. Ambos son exiliados chilenos de Pinochet. El idioma español era muy frecuente en nuestro laboratorio, porque además de los sudamericanos, pasaron por el mismo muchos científicos de la era post-Franco que trabajaron en este laboratorio y que son referentes actuales de la Inmunología Española, como

Dolores, Arnaiz-Villena, Federico Garrido, Antonio Alonso y muchos otros, que generaban el enojo de nuestras queridas secretarías Deny Williams, Zoe Denby y Valery Derbi.

El 2 de abril de 1982 se produce la invasión a las Islas Malvinas. Mi hija Paula con sus casi 7 años tenía una fuerte posición pro-Argentina. Pensando que la situación podía tener una pronta resolución, decidimos no enviar a Paula a clase, esperando que después de estas vacaciones las cosas se calmaran. Para nuestra sorpresa, nos visita David el maestro de Paula, quien nos pregunta si la ausencia de Paula es por la situación bélica. Nos dice que por favor la enviemos al colegio, que ellos serían muy cuidadosos de respetarla. Así fue y ella siguió yendo normalmente a sus clases. Sin embargo, la situación se complicó en varios aspectos. Nuestro banco, donde se acredita nuestros sueldos, bloqueó nuestras cuentas y solo podíamos realizar pequeñas extracciones semanales. Si salíamos del país por cualquier motivo, debíamos tramitar el reingreso en condiciones diferentes a las que teníamos por ser residentes. Yo estaba inscripto en el *College* para entregar mi tesis de Doctorado y dejé de escribirla. Marta, mi esposa, insistía en la idea de volver, ante lo cual yo había enviado unos meses antes mi solicitud de ingreso a la carrera del CONICET. La aceptación fue muy rápida, y tenía 12 meses para hacerme cargo. Ese plazo se cumplía en diciembre de 1982. Durante estos meses del año 82, solíamos tener largas charlas con Sarita y Osvaldo Uchitel, que formaban parte de ese grupo de argentinos que considerábamos nuestra familia. Sarita y Marta por un lado y por el otro Osvaldo y yo que teníamos todas las dudas de que sería de nuestro futuro científico. Finalmente, en diciembre de 1982 iniciamos el regreso a Buenos Aires.

■ DE VUELTA A CASA

Como se cumplían los plazos, al mediodía de mi llegada a Buenos Aires me presenté en el CONICET para asumir mi cargo de Investigador Adjunto del CONICET. Yo traía conmigo un termo de nitrógeno líquido conteniendo todo un panel de sueros HLA de clase I y clase II y otro panel de anticuerpos monoclonales contra antígenos leucocitarios que muy generosamente me había donado mi laboratorio y varios otros colegas amigos de varios centros de investigación de Inglaterra, Holanda e Italia.

Al día siguiente me presenté en el Laboratorio de Inmunología del Hospital Durand que dirigía la Dra. Ana María Di Lonardo que poseía un incipiente laboratorio de histocompatibilidad, contaba con un flujo laminar y estufa gasificada para cultivo celular. Tenía un tanque con gran capacidad de almacenamiento de células en nitrógeno líquido, que nunca había sido utilizado. Mi primera tarea fue poner en funcionamiento ese tanque para poder preservar el material que había traído conmigo. Mi llegada generó entusiasmo tanto en la Dra. Di Lonardo como en el resto de los profesionales del laboratorio. A partir de las fiestas de fin de año, la Dra. Di Lonardo se toma su mes de vacaciones. Yo continuo con mi instalación, consigo un escritorio que lo incorporo al cuarto donde se encontraba el flujo laminar y comienzo mis tareas de intentar poner en condiciones el cuarto de cultivo celular. En simultáneo, organizo un seminario semanal bibliográfico, donde también incluyo mis trabajos realizados en Londres. A comienzos de febrero de 1983 con el regreso de sus vacaciones se produce un cambio radical en la Dra. Di Lonardo. Su primera decisión es retirar mi escritorio del cuarto donde me había instalado. Al mismo tiempo

se genera una extraña situación, donde un grupo de bioquímicos y médicos se nuclean alrededor de mí en busca de encuentros y discusiones sobre temas que querían incursionar, pero encontraron resistencia en su jefa que consideraba que se vulneraba su autoridad. Rápidamente, entendí mi error por el lugar que había elegido para mi regreso a Argentina.

No debe ser difícil para el lector imaginar la situación de alguien que deja un ambiente académico en Londres, donde el estímulo para investigar era la norma, para encontrarme en esta tan complicada situación. En ese momento, decido que ese no era mi lugar y, a pesar de los pedidos de mis compañeros de que no abandonara ese embrión de esperanza para alguno de ellos, mi decisión ya estaba tomada.

■ MI CAMBIO DE LUGAR DE TRABAJO AL CENTRO DE INVESTIGACIONES MÉDICAS ALBERTO EINSTEIN (CIMAE)

Coincidentemente con los episodios arriba referidos, el Dr. Morgenfeld, un prestigioso hematólogo del Hospital Ramos Mejía que había asumido la dirección del CIMAE me invita a incorporarme a dicha institución. Acepto y me mudo junto a una concurrente que estaba formando en HLA, la Dra. Alicia Mota. Compartí mi estadía en el CIMAE con los investigadores del CONICET Ignacio Reisin, biofísico, y José Burdman, endocrinólogo, dos excelentes personas y científicos.

Antes de mi regreso de Inglaterra el Dr. Mel Greaves de la *Imperial College Research Facility* (ICRF) de Londres me había invitado a participar en un estudio colaborativo internacional con el objetivo de definir el fenotipo y distribución de los diferentes subtipos de leucemias

linfáticas agudas (LLA) mediante el uso de anticuerpos monoclonales. Para esta actividad se incorporó la Bioquímica Susana Barbieri a mediados de 1983. Para este proyecto recibimos muestras de los servicios de hematología, del Hospital de Pediatría "Pedro Elizalde", del Hospital Pirovano, Policlínico Bancario y del Hospital Ramos Mejía, que de esta manera incorporaron el fenotipo al diagnóstico hematológico. Con la Dra. Marion Eppinger, del Hospital Ramos Mejía establecimos que los residentes de su servicio realicen una pasantía por nuestro laboratorio, para entrenarse en el diagnóstico fenotípico de las LLA. Recuerdo entre otros residentes a Gregorio Jaimovich, actual director del programa de trasplantes de médula ósea de la Fundación Favaloro, o de la entusiasta Dra. Marta Zerga, relevante figura de la hematología argentina. Este trabajo dio lugar a nuestra primera publicación, Fainboim L., Garbiero S., Kohan R., Dragosky M. y Eppinger M., *Immunological phenotype of leukaemias and lymphomas in argentina*. Leukemia Research, 9:813, 1985.

Simultáneamente, con Alicia Mota montamos el laboratorio de histocompatibilidad. Hacia fines de 1983, nos visitó Julia Awad, compañera de Cristina Navarrete en nuestro laboratorio de Londres, quien contribuyó a la puesta a punto de la tipificación de los alelos HLA de clase II. Esto permitió que el laboratorio del CIMAE, fuera pionero en Argentina en la tipificación HLA de clase II.

■ CREACIÓN DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE HISTOCOMPATIBILIDAD (AAH)

Con el objetivo de desarrollar la inmunogenética en Argentina, se crea el 23 de marzo de 1983 la AAH, siendo sus socios fundadores el Dr.

Emilio Hass, por el Sanatorio Güemes, el Dr. Argimiro Suárez por el CEMIC, Víctor Morales del Hospital San Martín de La Plata, Constanzo Giraud del Hospital Privado de Córdoba, Pedro Zukas en Santa Fe, y nuestro laboratorio del CIMAE. Con la presidencia del Dr. Morales y yo como vicepresidente, organizamos el primer taller Latino-Americano de Histocompatibilidad, siguiendo el modelo de intercambios de sueros llevados a cabo por los talleres internacionales de histocompatibilidad.

Con esta tarea colaborativa, nuestro laboratorio inició un periodo de desarrollo de su área de inmunogenética, que se expandió con la incorporación de Ethel Palavecino, y fundamentalmente con el retorno al país de Leonardo Satz a fines de 1984.

■ LEONARDO SATZ (LEÍTO) Y LEONARDO FAINBOIM (LEO)

Hacia fines de 1985 nuestro laboratorio fue invitado a participar en

Cuadro 4

El desarrollo del área molecular del laboratorio de histocompatibilidad

Enfermedad celiaca (EC)

Un primer trabajo de Ethel Palavecino y los miembros del área de histocompatibilidad confirmaron la asociación de la EC con HLA-DR3 y HLA-DR7 descrita previamente. Sin embargo, el estudio introdujo la presencia de una nueva asociación con HLA-DR5 y la participación del locus HLA-DQ (Palavecino L. y col., *Disease Markers*, 8: 5-10, 1990). Mariana Herrera investigó el problema, confirmando que es el locus HLA-DQ el involucrado en la EC. Como el DQw2 está presente en el 90-95% de los pacientes con EC, desde el año 2012, la ESPGHAN (European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) incluye al DQw2 como criterio diagnóstico de EC (Herrera M. y col., *Human Immunol.* 26: 272-280, 1989 y Herrera M. y col., *Tissue Antigens* vol.39, 1994).

HLA-B35

Nuestros trabajos previos que relacionaban al HLA-B35 con fenómenos funcionales y asociaciones con patologías incidieron para que Leito iniciara su caracterización molecular. Junto con Lilien Chertkoff, utilizando la técnica del RFLP estudiaron los DNA de individuos tipificados como HLA-B35 por serología, El estudio de un panel de individuos HLA-B35+ demostró que aquellos que comparten el Cw4 mostraron la presencia de la banda EcoR4.6 kb, que estaba ausente en los individuos HLA-B35-Cw4+ o en los B35+ Cw4-, sugiriendo la primera evidencia de un polimorfismo del antígeno HLA-B35 (Chertkoff L.P., *Human Immunol.*, 1988). Luego de que la secuencia genómica fuera depositada en el *GenBank*, el comité de nomenclatura de la OMS designó a este nuevo alelo HLA-B 3502, La completa secuenciación y caracterización de este nuevo alelo fue publicada (Chertkoff L.P. y col., *Human Immunol.*, 31: 153-158, 1991). Estos dos trabajos formaron parte de la tesis de doctorado de Liliana en mayo de 1992. Con la incorporación en 1991 de Graciela Theiler a su laboratorio Leito establece colaboración con investigadores de Europa, Israel y Brasil para analizar el polimorfismo de HLA-B-35 en estos países (Theiler G. y col., *Inmunogenetics* 46:529. 1997). Este estudio, junto a la secuenciación de nuevas variantes del HLA-B35 formó parte de la tesis de doctorado de Graciela Theiler (Theiler G. y col., *Inmunogenetics* 43: 1996, *Tissue antigens* 50:311, 1997).

el 10o Taller Internacional de Histocompatibilidad y Conferencia (IHWC) que se iba a realizar en Nueva York en 1987. Esto que significaba un avance muy importante para nuestra inserción en el mundo de la histocompatibilidad se acompañaba de dos condiciones. La primera era que debíamos afrontar el gasto de varios miles de dólares por el costo de los reactivos y líneas celulares. La segunda era que teníamos dos días para decidir nuestra participación. Recuerdo mi pánico en el momento en que acepté hacerme cargo del pago que implicaba nuestra participación. Después de mucho trabajo, llegamos a Nueva York donde el laboratorio participó en la caracterización de varias sociedades antigénicas y de moléculas HLA por las nuevas técnicas de RFLP. Esto último involucró mucho trabajo de Leíto y sus dos estudiantes, Liliana Chertkoff y Mariana Herrera.

Nuestra participación en el IHWC se tradujo en ser el primer laboratorio en Latinoamérica que en el año 1993 utilizó la tipificación molecular en los estudios de histocompatibilidad para el trasplante de órganos y para los de asociación del HLA con enfermedades.

■ CREACIÓN DEL ÁREA DE INMUNOLOGÍA EN LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UBA

En el año 1985, mediante un concurso de profesores en la Facultad de Medicina, por primera vez con jurados internacionales, obtuvimos Leíto y yo los cargos de profesores Adjunto y Titular respectivamente en el Departamento de Microbiología. Parasitología e Inmunología. Cargo que asumimos el 1 de agosto de 1986.

Para dar comienzo al periodo lectivo 1987, tomé dos determinaciones. La primera, actualizar las notas que le entregamos a los alumnos en Inglaterra y generar un apunte que publicó el centro de estudiantes de la Facultad de Medicina. Lo segundo, consensuado con el resto de los profesores del Departamento, dividir el dictado en 5 orientaciones: Virología, Bacteriología, Parasitología, Micología e Inmunología, con un Profesor a cargo en cada una de esas áreas.

Comienza el curso de 1987 haciéndonos cargo con Leo Satz del dictado de todos los teóricos del área de Inmunología, incorporan-

do los nuevos conceptos celulares y moleculares de la inmunología humana. Sin embargo, nos encontramos con la dificultad de que los docentes auxiliares dictaban las temáticas referidas a las cinco áreas del departamento, y muy pocos con formación inmunológica. Esto trajo aparejado que los nuevos conceptos que los alumnos recibían en las clases teóricas no pudieran ser adecuadamente discutidos en los trabajos prácticos. Esto se fue mejorando en la medida que los estudiantes de doctorado de nuestros laboratorios y en particular los del área inmunología de la Academia Nacional de Medicina se fueron incorporando al dictado de clases. En esta tarea fue importante el papel de Jorge Geffner, que ya era docente en el Departamento e investigador en la Academia. Con Leito dedicamos muchas horas a la formación de los docentes auxiliares en clases y discusiones semanales, en las cuales los docentes preparaban las clases que eran discutidas y evaluadas en forma grupal. Esto requirió una tarea adicional importante, pero se tradujo en un buen nivel de nuestros docentes, eliminando la discrepancia entre lo que recibían en los teóricos generales y en los trabajos prácticos.



Figura 3: A la izquierda, Guillermo Jaim Etcheverry me entrega el Diploma de Profesor Titular. A la derecha, Aspecto masivo de nuestras clases.

■ CREACIÓN DEL LABORATORIO DE INMUNOGENÉTICA DEL HOSPITAL DE CLÍNICAS

A fines de 1986, coincidiendo con mi designación como profesor del Departamento de Microbiología, el Dr. Roberto Soto prestigioso endocrinólogo e investigador clínico, y Director del Hospital de Clínicas, nos comenta al Dr. Sánchez Ávalos y a mí, su deseo de impulsar la investigación en el Hospital. Ambos aceptamos la convocatoria y el Dr. Soto puso a nuestra disposición dos áreas en el tercer piso del Hospital, que habían sido trasladadas a los pisos superiores. Hubo que adaptar las salas con nuevas líneas eléctricas y gas para equipos de investigación de alto consumo eléctrico y reformas edilicias para incluir áreas de cultivo de tejidos, cuartos oscuros para microscopía, mesadas de laboratorio y mejoras edilicias. Esta tarea demoró más de un año. Finalmente,

en marzo de 1988 nos mudamos de la fundación CIMAE al Laboratorio de Inmunogenética del Hospital de Clínicas.

En su comienzo, disponíamos de un laboratorio de histocompatibilidad para tipificación serológica de HLA-A, B-C DR y DQ. Un área de cultivos celulares, un área de tipificación para patologías oncohematológicas y un área de Biología molecular.

Por nuestra experiencia en la tipificación fenotípica de leucemias agudas, el laboratorio fue invitado a participar en el IV Taller Internacional de Antígenos de Diferenciación Leucocitaria. Estos talleres a través del intercambio de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos leucocitarios contribuyen a la definición de los nuevos *clusters de diferenciación leucocitaria* o CDs. Nuestra tarea fue caracterizar el panel de anticuerpos anti-mieloides expresados en diferentes estadios madurativos de la ontogenia mieloides, y los anticuerpos anti-CD1 que se expresan en leucemias agudas T. Fue una tarea agotadora, en la que participaron Félix Roisman, María del Carmen Salamone y Liliana Aquilia. Debíamos analizar cientos de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta. Esta primera participación dio lugar a cinco presentaciones en la Conferencia asociada al Taller que se realizó en Viena en el año 1989 y abrió el acceso a una gran cantidad de anticuerpos monoclonales que iniciaron una nueva etapa en el laboratorio. Al año siguiente el CONICET llama a licitación para la compra del primer equipo de citometría de flujo en el país. Por mi experiencia en el uso de la citometría de flujo y separación celular en Inglaterra, y la experiencia acumulada por nuestra participación en el taller de antígenos de diferenciación leucocitaria, el CONICET decidió

ubicar el primer equipo del país en nuestro laboratorio. Luego de un largo y engorroso trámite, en 1991 mi becario Adrián Morelli, fue enviado a ser entrenado en su uso en California.

Adrián se incorporó al laboratorio, una vez finalizada su residencia en patología en nuestro hospital, abocándose a estudiar las células de Langerhans de la piel. Por su experiencia como patólogo, implementó rápidamente estudios planimétricos que identificaban a las células de Langerhans en vulva, pene y vagina en tejidos normales y las comparó con pacientes que presentaban condilomas planos inducidos por VPH. Completados y publicados estos trabajos, se incorpora al laboratorio su mujer, Adriana Larregina, que también había completado su residencia en patología. Ambos desarrollaron una técnica de obtención de células dendríticas de epidermis y de dermis de piel proveniente del servicio de cirugías plásticas de nuestro Hospital. Los anticuerpos que disponíamos y el acceso a la citometría de flujo permitieron estudiar la maduración de las células dendríticas, desde su ubicación epidérmica a su migración a la dermis. Se estableció claramente un fenotipo para ambos estados madurativos que permitieron correlacionar a las CDs dérmicas con las originalmente descritas como células "velo" ubicadas en la zona paracortical del ganglio linfático del ratón. Esta etapa se reflejó en un número importante de publicaciones totalmente innovadoras y dos tesis de doctorado: la de Adrián en noviembre de 1994 y la de Adriana en abril de 1996. Adrián y Adriana son en la actualidad, Profesores de Inmunología en el *Thomas E. Starzl Transplantation Institute* en Pittsburgh, EE.UU.

Con la incorporación de la citometría de flujo y los operadores



Figura 4: Ana Ostrosky, mi asistente hasta el año 2015. Pilar fundamental en nuestro crecimiento. Manejaba los subsidios, la interacción entre la áreas del laboratorio con rigor, y un compromiso incondicional. Para ella mi cariño y mi agradecimiento para siempre.

Marcos Barboza y Mónica Saracco, el laboratorio tuvo una muy activa participación en el 5to Taller Internacional sobre Antígenos de Diferenciación Leucocitaria, realizado en Boston en noviembre de 1993. En este taller fueron incluidos anticuerpos desarrollados en nuestro laboratorio por Bibiana Achino y Alberto Horenstein. La actividad fue frenética e involucró todo el laboratorio en el análisis de los paneles de anticuerpos dirigidos a antígenos de linfocitos T, B, CD1, mieloides, y receptores de citocinas y se reflejó en 17 publicaciones en un número especial de la revista *Tissue Antigens*.

El estudio del panel de anticuerpos CD1 estuvo a cargo de María del Carmen Salamone, ya que coincidía con su tema de tesis y venía trabajando con este antígeno descrito por César Milstein en Cambridge, donde realizó una pasantía en el año 1989.

Ese año, que había sido tan activo en el laboratorio se tiñó de tragedia con la muerte de Félix Roisman en el atentado a la AMIA. El 18 de julio de ese año se aplicaba al automóvil de Félix una restricción vehicular para circular por el centro basado en el último número de la patente. Dejó su auto estacionado, y tomó el subte de Corrientes, bajándose en la estación Pasteur, pasando por la sede de la Amia en el momento de la explosión. Recuerdo nuestra desesperación mientras lo buscábamos en los hospitales de la ciudad. Finalmente, como médico me permitieron entrar a la morgue de la calle Junín, donde encontré su cuerpo sin heridas visibles, indicando que fue víctima de la onda expansiva.

■ EL RECUERDO DE LEÍTO SATZ

Leo fue un pionero en el estudio del polimorfismo molecular del sistema HLA, una mente brillante y un compañero generoso, dispuesto siempre



Figura 5: Como reconocimiento a todo el intenso trabajo llevado adelante por todo el grupo, al finalizar el congreso de Boston alquilamos una van y nos fuimos todos juntos a Quebec a pasar unos días de vacaciones. En la foto de arriba estoy en el departamento lavando los platos y en la foto inferior de izq. a derecha: María del Carmen Salamone, Adrian Morelli, Adriana Larregina, Monica Saracco y Bibiana Achino en un paseo en la nieve.



Figura 6: Foto con Cesar Milstein, Moises Spitz y la Dra. María Inés Di Mitri

a ayudar a quien requiriera de su ayuda. Fue por sobre todas las cosas un maestro de la Inmunología. Requerido como profesor visitante de numerosas universidades nacionales: Mar del Plata, Río Cuarto, La Plata, Misiones y del exterior, Universidad Autónoma de Barcelona, Universidad Nacional de la República en Montevideo y Universidad Nacional de México. En este último país fue profesor invitado en los años 1995, 1996 y 1997 de los cursos organizados por el INDRE y la *American Society of Histocompatibility and Immunogenetics* (ASHI). Como reconocimiento a su trayectoria docente, la ASHI le brindó su apoyo para que organizara en los años 1996 y en agosto de 1997 (pocos días antes de su muerte) el curso teórico-práctico "Recientes avances en Histocompatibilidad e Inmunogenética" que durante 10 días se desarrolló en nuestro Hospital de Clínicas, con la presencia de destacados científicos internacionales y locales.

Como profesor visitante en la Universidad Nacional de Misiones, Leíto dictaba la materia Inmunogenética, que formaba parte de la licenciatura en genética de dicha Universidad. Desde el año 1995, dedicaba 15 días a dicho dictado y habíamos decidido que no podíamos estar los dos fuera del laboratorio por tanto tiempo. En el año 1997, otro docente que participaba en el dictado no podía viajar ese año, y habíamos considerado la posibilidad de que yo lo acompañara, pero el dictado coincidía con mi aniversario de casado, el 11 de octubre, pero habíamos decidido con mi mujer tomarnos unos días. Bibiana Achino, que estaba en el proceso de terminar su tesis de doctorado me solicita viajar, yo traté de desalentarla para no interrumpir su trabajo, pero su insistencia y su amor por la docencia hicieron el resto. El 10 de

octubre, apenas llegué a mi destino, me llamó Moisés Spitz para avisar del accidente del avión de Austral en Fray Bentos. Me fui a caminar por la playa, tratando de juntar fuerzas para volver manejando a Buenos Aires, donde la muerte de Leíto y Bibiana puso a muchísima gente en estado de conmoción. Pocos meses antes de su muerte, a sus 43 años Leíto fue designado por concurso Profesor Titular del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina-UBA. La misma edad que yo tenía cuando concursé mi cargo de profesor titular.

En lo personal, la muerte de ambos tuvo un efecto devastador. Bibiana era pura alegría en el laboratorio y siempre positiva y colaborativa. Con Leíto iniciamos una tarea conjunta que uno asume más fácilmente cuando sabe que tiene un soporte y compañía para el comienzo de nuevos proyectos. Juntos habíamos iniciado la construcción

de nuestro laboratorio, juntos habíamos modificado la enseñanza de la Inmunología en la Facultad de Medicina y compartido todos los viajes al exterior relacionados con nuestros proyectos y la presidencia y la secretaría de la Sociedad Argentina de Inmunología entre los años 1994 y 1996.

Habíamos instalado la costumbre de bajar todos los días a las 5 de la tarde a tomar un café en la esquina del Hospital. Ese era el momento donde se planifican las cosas y discutimos avances y dificultades. En ese lugar, un día de 1989 le propuse a Leíto hacer el libro de Inmunología. Tomamos una servilleta y nos dividimos que capítulo iba a escribir cada uno, e inmediatamente comenzó el proyecto de la primera edición del libro que como edición del autor financiamos y pudimos tenerlo disponible para el comienzo de la cursada de 1990. A esta le siguió una segunda edición en 1992 y una tercera en 1995. La segunda edición,



Figura 7: Charles Janeway, Peter Cresswell y Hans Gustaf Ljunggren participantes en el curso organizado por Leo Satz, durante una visita a El Viejo Almacén.

fue publicada en España por Mosby/Doyma libros de Barcelona, donde las citoquinas pasaron a ser citocinas y otras traducciones del argentino al español. Dos años después, invité a Jorge Geffner a participar en la 4ª edición, que la trabajé como un homenaje a Leito. Con Jorge lanzamos la 5ª edición en el año 2005 y la 6ª en el año 2011, ahora editada por la Editorial Panamericana. Debo decir que he sido muy afortunado con mis sociedades, ya que Jorge, una persona comprometida y generosa rápidamente se convirtió en un hermano de la vida.

■ EL LABORATORIO SATZ

En el año 1998, comienza a tomar forma la idea de construir un nuevo laboratorio que llevará su nombre. Conseguí una autorización del Hospital para usar un espacio de 100 metros cuadrados vecino a nuestro laboratorio que era una antigua cocina dietética abandonada. Con la ayuda de personal del Hospital, procedimos a la demolición de la antigua estructura y, con arquitectos amigos, elaborar los nuevos planos. Conseguimos una donación del banco Mercantil, una ayuda de la fundación del Hospital de Clínicas y algunos investigadores, como Jorge Geffner que contribuyeron con el piso de goma del laboratorio. Moisés Spitz y Marcelo Guthmann construyeron como buenos carpinteros las repisas de las mesadas.

Norberto Zwirner al regresar de su postdoc en Texas, fue el primero en incorporarse al Laboratorio Satz, seguido por Gabriel Rabinovich, con una beca postdoctoral, bajo mi dirección. La Dra. Verónica García, trasladó su laboratorio de la Facultad de Medicina al laboratorio Satz. Eduardo Chuluyan regresó de Canadá y Marcelo Guthmann que finalizó su doctorado en Israel, se unieron al laboratorio, junto con

Moises Spitz que había dejado la dirección del Instituto Malbrán. Es decir, que logramos generar una masa crítica de investigadores que favorecen nuestro desarrollo científico. Gabriel Rabinovich publicó su trabajo *Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T-cell-mediated rejection: a novel mechanism of tumor-immune privilege* (Rubinstein N. y col. *Cáncer Cell: March 2004*, 5: 241-251), que tuvo una enorme repercusión, y que lo lanzó a Gaby al primer plano de la Inmunología.

A nivel personal, muchas de mis energías se concentraron en mantener el crecimiento del laboratorio con la finalidad de convertirlo en un Instituto del CONICET, como un reaseguro para la sustentabilidad de este proyecto. Por razones no del

todo comprensibles nuestra inserción como Instituto del CONICET demoró muchos años en concretarse.

■ NUESTRA CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LAS PATOLOGÍAS HEPÁTICAS: LA SOCIEDAD CON MI HERMANO HUGO

Con mi hermano Hugo nos une un profundo cariño y respeto mutuo. Hugo, trabajaba y sigue dirigiendo la sala de hepatopatías del Hospital Muñiz.

Nuestro primer trabajo fue estudiar la asociación del HLA-B35 con las hepatitis crónicas activas inducidas por el virus de la hepatitis B, (Mota A. y col., *Tissue Antigens*. 30:238, 1987). En los cuadros que sigue se dan detalles técnicos de la labor realizada.



Figura 8: Con mi hermano Hugo.

Cuadro 5

Nuestra contribución a la Autoinmunidad Hepática (AH)

La AH es una enfermedad progresiva del hígado caracterizada por la presencia de autoanticuerpos circulantes, hipergammaglobulinemia y respuesta al tratamiento inmunosupresor. En pediatría no existían estudios a nivel molecular sobre las formas pediátricas de la AH (PAH). La tipificación molecular de las moléculas de clase II permitió identificar a HLA-DRB1*1301 como el alelo de susceptibilidad primaria asociado con las PAH de tipo I (Fainboim L. y col.; *Human Immunol* 41, 146-150, 1994). La extensión de este primer estudio en una cohorte importante demostró que los portadores de este alelo poseen un riesgo 16 veces mayor de contraer esta enfermedad. Un hallazgo asombroso fue que el alelo HLA-DRB1*1302 no se detectó en ninguno de los PAH estudiados. Este alelo protector difiere del HLA-DRB1*1301 en un solo aminoácido en la posición 86 de la cadena beta (glicina en lugar de valina). El alelo DRB1*1302 ha sido asociado con protección a contraer malaria, explicando su alta frecuencia en el oeste de África, donde la selección natural por la enfermedad explicaría su alta frecuencia en la población. La sustitución de glicina por valina cambia las preferencias de aminoácidos hacia cadenas laterales más pequeñas. Es concebible que la valina 86 en el HLA-DRB1* pueda modular la respuesta hacia un autoantígeno putativo hepático. Este nuevo trabajo concluyó que las formas pediátricas y adultas de la autoinmunidad hepática de tipo 1 representan entidades diferentes, con una diferente base genética y diferencias clínicas. Las formas pediátricas requieren una mayor inmunosupresión y evolucionan a requerir más frecuentemente un trasplante hepático (Pando M. y col. *Hepatology* 1999 Dec; 30(6):1374-1380). En simultáneo con los estudios en PAH, pudimos confirmar que las formas adultas de autoinmunidad hepática (AAH) poseen una asociación similar a la descrita en otras partes del mundo. Sin embargo, aquellos pacientes que padecen manifestaciones autoinmunes extrahepáticas asociada a la AAH involucraron a HLA-DRB1*405 en forma sinérgica con el gen HLA de clase I; HLA-A11. (Marcos Y. y col. *Hepatology* 19: 1371-1374, 1994).

Durante el 12th Workshop Internacional de Histocompatibilidad, en St. Malo, Francia, en junio 1996 organicé y presidí el componente de Autoinmunidad Hepática, donde se confirmó la asociación del DRB1*1301 en otras poblaciones geográficas y diferencias étnicas, como el caso de Brasil.

En el año 1999 fui incorporado al Grupo Internacional de Hepatitis Autoinmune, que tiene a su cargo hasta el día de hoy los criterios para el diagnóstico de la hepatitis autoinmune, y en el año 2002 fui designado consejero internacional vitalicio de los Talleres Internacionales de HLA e Inmunogenética.



Figura 9: Recibiendo un premio por ser nuestro laboratorio uno de los más activos en el 12th Taller Internacional de Histocompatibilidad en St. Malo.



Figura 10: Leito, Julián Larriba y Marcelo Pando en St. Malo.

Como durante años se había sugerido que la hepatitis A (HAV) podría operar como disparador de la hepatitis autoinmune, decidimos investigar la evolución de niños con formas autolimitadas de HAV y niños cuya infección se prolongaba más allá de las 12 semanas. En las formas autolimitadas, los pacientes desarrollaron anticuerpos anti-músculo liso/actina que dejan de detectarse antes de los 3 meses de evolución. En cambio, en los pacientes con formas prolongadas de infección por HAV, que mantenían títulos elevados de estos anticuerpos se asocia con la presencia del alelo HL-DRB1*1301. Estas últimas fueron seguidas durante dos años, pero ninguno de estos pacientes desarrolló hepatitis autoinmune. Es decir, que a pesar de que las formas prolongadas están fuertemente asociadas con el alelo de susceptibilidad para el desarrollo de hepatitis autoinmune pediátrica, los

resultados indican que el desarrollo de la enfermedad autoinmune involucra otros genes todavía no determinados (*Hepatology* 2001; 33:1512-1517).

Varios años después demostramos que HLA-DRB1*1301 en combinación con la forma funcional del receptor NK activador KIR2DS4 (ver Cuadro 6 receptores NK) tiene un fuerte sinergismo en incrementar la susceptibilidad a padecer PAH (Podhorzer A. *Genes & Immunity*, 17:187-192, 2016). Este incremento del gen activador no se observa en las formas adultas, confirmando una vez más la diferente asociación genética en los mecanismos involucrados en PAH y AAH.

Cuadro 6

Patologías hepáticas asociadas con el virus de la hepatitis C (HCV): Papel de los receptores NK

En el año 2003 se incorporaron al Laboratorio las licenciadas Natalia Paladino y Ana Claudia Flores para implementar la tipificación de los genes KIR a través de una colaboración con Derek Middleton del Hospital de la ciudad de Belfast en Irlanda del Norte, financiada por un subsidio de la *Wellcome Trust*. Esto permitió que nuestro laboratorio fuera el primero en Latinoamérica en realizar tipificación molecular de genes KIR, incluso en la rutina diagnóstica a cargo de Yanina Marcos. También nos permitió tener una muy activa participación en el *14th International Histocompatibility Workshop and Conference (IHCW)* que se realizó en Melbourne Australia entre el 29 de Nov y el 3-12 del año 2005.

Ana Claudia analizó el polimorfismo de los genes KIR en la población caucasoide Argentina y amerindias del norte argentino, estableciendo la distribución y frecuencia de los genes KIR en estas poblaciones en comparación con otros grupos étnicos (Flores A.C. y col. *Tissue Antigens* 69, 568-576, 2007)



Figura 11: De izquierda a derecha: Ceci Venier, Lourdes Arruvito, Graciela Theiler, Natalia Paladino y Ana Claudia Flores (arriba), Adriana Corigliano y Mónica Capucchio.

Con esta información, Natalia Paladino pudo comparar el papel de los genes KIR en la progresión de la infección por el HCV. Los pacientes HCV RNA+ mostraban una incrementada frecuencia del gen activador 2DS3, y en los que desarrollaron cirrosis se detectó un incremento en la frecuencia de dos copias del gen activador 3DS1 y de su ligando HLA-Bw4. Ello nos permitió sugerir que un incremento en la citotoxicidad

podría estar asociado con una peor progresión a la infección por HCV (Paladino N. y col. *Tissue Antigens* 69; SUPPL. 1; 12-2007; 109-111). Más recientemente, Ariel Podhorzer retomó el análisis del fenotipo y la función de las células NK que expresan receptores KIR, en pacientes crónicamente infectados por HCV (CHCV). Confirmó el perfil de activación de las células NK, reflejado en el incremento del marcador de desgranulación CD107, y del receptor activador KIR2DS3 y KIR2DS4-FL en pacientes con niveles intermedios y elevados de carga viral. La presencia de KIR2DS4 en homocigosis se asoció con la evolución a cirrosis. En forma similar, en estos pacientes que evolucionan a cirrosis se observa la disminución del receptor fuertemente inhibidor NKG2A en las células NK CD56^{bright} productoras de citocinas, con un incremento del receptor activador NKG2C en las células necro-inflamatorias NK CD56dim. (Podhorzer A. y col. *Front. Immunol.*, 2018).

Casi en forma simultánea, Ariel emprendió el estudio comparativo del fenotipo y función de las células T, NKT, y NK en la sangre periférica y en el hígado normal. Para este análisis las células mononucleares se obtuvieron mediante la perfusión de hígados de donantes para trasplante. El estudio reveló que, en contraste con la sangre periférica, las células NK CD56^{bright} constituyen el 50% de las células NK en el hígado y se hallan en un estado de activación reflejada por una baja expresión del receptor inhibidor NKG2A, y un incremento del receptor activador NKp44. Por su parte, las células T hepáticas son en su mayoría CD8+, con un fenotipo de células memoria efectoras o terminalmente diferenciadas, y revelan una mayor capacidad de degranulación y secretar interferón- γ . Tanto los linfocitos T como las células NK no expresan la quimiocina CCR7, esencial para la migración, lo que sugiere que estas células no vuelven a la circulación (Podhorzer A. y col. *Immunology* 154; 2; 6-2018; 261-273).

Cuadro 7

Efecto de las citocinas en la progresión de la infección por HCV

Se han detectado niveles elevados de IL-10 en pacientes crónicamente infectados por HCV. En estas poblaciones Natalia investigó el polimorfismo de los genes que codifican a los promotores de la IL-10 y observó que el genotipo alto productor está aumentado en mujeres que no eliminaron el virus. Esta asociación resultó más significativa en mujeres con elevados niveles de transaminasas hepáticas. En cambio, el genotipo bajo productor de IL-10 se observó más elevado en mujeres que eliminaron el virus. Estos resultados permiten demostrar, no solo el efecto deletéreo de niveles elevados de IL-10, sino también que existe un efecto de género en la respuesta al HCV (Paladino N. y col. *J. Virology*: 2006, 80 p. 9144 – 9144).

■ EL DESARROLLO DE LAS VACUNAS ANTI-GANGLIÓSIDOS

A mediados del año 1994 el Dr. Hugo Sigman del laboratorio ELEA me convoca para que realice la evaluación de una vacuna anti-gangliósidos que se estaba desarrollando en el Centro de Inmunología Molecular de La Habana. La preparación vacunal tenía una respuesta de anticuerpos específicos anti-gangliósidos, que para éste y otros grupos había recibido atención como blancos posibles en la terapia del cáncer. Mi reserva consistía en la nula in-

formación de la respuesta celular que a mi juicio debía ser importante en una terapia anti-tumoral. Hugo tomó la decisión de aceptar el riesgo e involucrarse en el proyecto, y me propuso que mi laboratorio se involucrara en el proyecto a través de un convenio que se firmó entre ELEA y CONICET.

Este convenio significó para nuestro laboratorio la incorporación de un muy valioso equipamiento, que incluyó flujos laminares, estufas gasificadas, freezers de -70°, lectores de ELISA, un equipo para

ELISPOT y gran cantidad de consumibles, que contribuyeron mucho al crecimiento de nuestro laboratorio. Marcelo Guthmann, que había regresado recientemente de su doctorado en Israel, pasó a involucrarse activamente en el proyecto, junto a Cecilia Venier, que tomó a su cargo la detección de los anticuerpos anti-gangliósidos, mientras que con Marcelo nos enfocamos en la respuesta celular a las diferentes formulaciones vacunales que se fueron desarrollando a lo largo de los años. Para el desarrollo de los aspectos preclínicos, se incorporó el laboratorio de

Oncología Molecular de la Universidad Nacional de Quilmes a cargo de Daniel Gómez y Daniel Alonso. Esta etapa contó desde su comienzo con la creativa participación de la Dra. Silvia Gold del laboratorio ELEA. A este grupo inicial se fueron incorporando otros laboratorios e investigadores clínicos, que fueron consolidando una estructura amplia y sólida.

En julio de 1999, el ANMAT autoriza el ensayo de fase I del preparado vacunal N-acetil GM3/ VSSP/ Montanide ISA 51, que utiliza el gangliósido GM3 conjugado en forma hidrofóbica con la proteína de la membrana externa (OMP) de *neisseria meningitidis*, donde el gangliósido y las proteínas del OMP se incorporan dentro de proteoliposomas de muy pequeño tamaño (VSSP).

Este fue el primer ensayo de fase 1 para una vacuna oncológica aprobado en la Argentina. El ensayo clínico se realizó en 26 pacientes con melanoma metastásico, con un seguimiento clínico a cargo del Dr. Roberto Bitton.

El GM3/VSSP generó en todos los pacientes evaluados una fuerte secreción *in vitro* de IFN γ , siendo

en uno de ellos GM3 específico. En un paciente se documentó una remisión de un 62% de su masa tumoral mediastinal (respuesta parcial), mientras que un segundo paciente se benefició de una estabilización inicial de la enfermedad seguido de una reducción en tejido blando acompañado de vitíligo.

Un segundo ensayo utilizó como preparado vacunal el anticuerpo 1E10, un anticuerpo anti-idiotípico Ab2 generado en respuesta al Ab1 que reconoce al antígeno N-glicosilado. De esta manera el Ab2 se comporta como si fuera el antígeno N-Glicolil GM3, que al ser una proteína es mucho más inmunogénico. El ensayo se inició en febrero del 2002 en pacientes con cáncer de mama avanzado, o con alto riesgo de recaída y se cerró en diciembre de 2014. En este ensayo obtuvimos la primera demostración de una respuesta celular al gangliósido N-glicolil-GM3. Todos los pacientes desarrollaron una fuerte respuesta de anticuerpos hacia el gangliósido "blanco", y un incremento de la frecuencia de células productoras de IFN γ gangliósido-específica en 5 de los 13 pacientes evaluados mediante la técnica del ELISPOT. La respuesta T específica se detectó a partir de la

semana 14 del inicio del tratamiento y persistió por al menos 42 semanas (Guthman M. y col. *J. Immunother.* 2006, 215-223).

Un ensayo en ratones utilizando el GM3-VSSP demostró su capacidad de inducir la maduración de las células dendríticas con un patrón de alta secreción de IL-6, e IFN γ y baja de IL-10. Un patrón que favorece el desarrollo de una respuesta inmune eficiente, con capacidad de funcionar como adyuvante de vacunas peptídicas y antígenos tumorales (Venier C. y col. *Clinical and Experimental*.

En octubre de 2010 se inicia un estudio prospectivo, abierto, randomizado, de inmunoterapia activa específica con racotumomab (nombre con el que se designó al anticuerpo anti-idiotípico 1E10) vs. soporte clínico en pacientes con cáncer avanzado de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Racotumomab obtuvo su registro como Vaxira, e inscripto en el ANMAT en el Registro de Especialidades Medicinales en el año 2013, (continúa hasta la fecha).

La respuesta inmune detectada en un niño con recaída de neuro-



Figura 12: Reuniones de trabajo en la Habana: Las fotos incluyen a los compañeros cubanos con los que manteníamos reuniones periódicas. Ana María Vázquez y Rolando Pérez que desarrollaron el anticuerpo anti-idiotípico y Luis Enrique Fernández que desarrolló el preparado vacunal N-acetil GM3/ VSSP. A la izquierda, Daniel Alonso, Daniel Gómez, Hugo Sigman, Silvia Gold, Rolando Pérez, Roberto Bitton, Luis E Fernández, y Ana María Vázquez. A la derecha: De Derecha a Izquierda Roberto Bitton, Héctor Ostroski, Marcelo Guthmann, Daniel Gómez y Daniel Alonso.

blastoma luego de la aplicación de Racotumomab en el Servicio del Dr. G Chantada, en el Hospital Garrahan (Sampor C. y col., *Frontiers in Oncology*. 2012. 10.3389), generó el inicio de un ensayo de fase I en pacientes con malignidades pediátricas que expresen gangliósidos y son resistentes o refractarias al tratamiento convencional (Cacciavillano C. y col., *Pediatr Blood Cancer* 2015. DOI: 10.1002/pbc.25631). En el año 2017 se inició la fase II de racotumomab en pacientes pediátricos con neuroblastoma de alto riesgo, con un protocolo abierto y multicéntrico. Este ensayo sigue en curso.

■ INMUNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

En 1994 iniciamos la aplicación de células mononucleares paternas como terapia para pérdidas recurrentes de embarazo. En el año 2000

publicamos el primer trabajo que incluía los primeros 92 pacientes estudiados entre 1994 y 1998 (Ramhorst y col., *AJRI*, 2000; 44; 129-135). Este trabajo estableció como criterio de respuesta a la inmunoterapia, la generación del Factor Bloqueante (FB) del cultivo mixto linfocitario (CML), en contraste con la presencia de anticuerpos anti-paternos detectados por la técnica del *cross-match*. La presencia del FB se determina por un bloqueo del CML mayor a un 50%, que corresponde al que presentan todas las mujeres con embarazos exitosos. El suero materno se evalúa tanto cuando las células mononucleares respondedoras en el CML son maternas, o paternas, ya que en el caso de que el bloqueo se deba a un anticuerpo anti-paterno, el bloqueo se obtendría solamente en la primera condición.

Establecida la importancia del FB, estudios de nuestro laboratorio

determinaron que la Galectina-1 induce una inhibición del CML en forma dosis dependiente y que depende en su propiedad de unirse a los sitios de unión en los hidratos de carbono (Rabinovich G, y col. *Cell Death & Differentiation*. Jun 2002. 9: 661-670). Evaluamos también el papel de ciertas quimiocinas, involucradas en la migración leucocitaria, la angiogénesis y la activación celular. Observamos que RANTES participa activamente en la supresión de la respuesta proliferativa en el CML y que el uso de un anticuerpo anti-RANTES, abroga tanto la respuesta supresora inducida por RANTES recombinante, como la inducida por un suero con actividad bloqueante del CML. (Ramhorst R. y col. *Clin Immunol*. 2004, Jan 110 (1) 71-80). Si bien el endometrio de pacientes con ARE y mujeres fértiles muestran niveles similares de RANTES, las pacientes con ARE difieren en la expresión de CCR5, uno de sus

Cuadro 8 Papel de las células T reguladoras (Tregs) en el embarazo

En el año 2004, Aluvihare y col. (*Nat Immunol* 2:1-6) demuestran en ratones que la expansión de las células supresoras CD4+CD25+ contribuyen a la tolerancia materna al feto. Tres estudios independientes realizados en humanos en el año 2004 validaron el papel de las células CD4+CD25+ en la tolerancia materno fetal.

A fines del año 2005, no existían anticuerpos comerciales anti FOXP3, pero accedimos a una colaboración con la Dra. Alison Banham del *John Radcliffe Hospital* de Oxford Inglaterra, que había desarrollado anticuerpos anti-FOXP3. Lourdes Arruvito comenzó evaluando la expresión de las células CD4+ CD25+ FOXP3+ en la sangre periférica durante el ciclo menstrual. Observamos la expansión de las células CD4+CD25+FOXP3+ en la fase folicular tardía del ciclo menstrual de mujeres fértiles no embarazadas (pero con embarazos exitosos previos). Esta expansión estaba estrechamente relacionada con los niveles séricos de estradiol y seguida por una dramática caída del número de Tregs en la fase lútea. El grupo de mujeres con ARE mostraban niveles semejantes de Tregs en ambas fases del ciclo menstrual y comparables a los niveles de las mujeres post-menopáusicas. Pudimos demostrar que la disminución en el número de Tregs, se acompañaba de una disminución en su capacidad de suprimir la respuesta inmune. El agregado de las Tregs de mujeres con ARE a un CML genera índices de supresión de la respuesta proliferativa significativamente menores que la supresión generada por las Tregs de una mujer fértil. Demostramos que este defecto es intrínseco a las Tregs de las mujeres con ARE (Arruvito y col. *J. Immunol*. 178: 2572-2578, 2007). Posteriormente demostramos que los pacientes con ARE también muestran una menor capacidad de inducir Tregs (iTregs). Esto se debe a que los pacientes con ARE, no solo poseen una disminución de IL-2 y TGF- β , factores asociados con la inducción de las iTregs, sino que la vía de señalización IL-2-STAT-5 está alterada (Arruvito y col. *Clinical Immunol*. 136:432, 2010 y Fainboim L., *JRI* 88: 93-98, 2011).

receptores (Ramhorst R. y col. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2006; 56(5-6):302-11). Los cuadros que siguen describen algunos aspectos técnicos de la labor realizada en este campo.

■ EVALUACIÓN DE LA INMUNOTERAPIA CON CÉLULAS MONONUCLEARES PATERNAS EN EL TRATAMIENTO DE ALTERACIONES DE LA REPRODUCCIÓN

Si bien la respuesta a la inmunoterapia parental (PIT) mostraba una tasa de embarazo a término muy

alta, no tener una población control con un número grande de pacientes sin tratamiento fue siempre una dificultad. Durante los meses de alto confinamiento por la pandemia de la COVID-19, fue fácil contactar a todos los pacientes entrevistados en nuestro consultorio y completar los datos faltantes.

Verónica González, técnica del CONICET con nosotros desde el año 1999 recibía a todos los pacientes y realizaba su seguimiento a través de una base de datos que ella elaboró.

Durante la pandemia, Pablo Fernández y Verónica realizaron llamados para completar datos de una población de 2033 pacientes. Se rescataron datos completos de 905 pacientes que recibieron la inmunoterapia y 829 que no la recibieron por decisión personal. Se descartaron del análisis aquéllos que decidieron suspender la búsqueda de embarazo, aquéllos que tenían menos de 2 años de seguimiento. Con el mismo criterio fueron excluidos los miembros del grupo que no recibió la inmunoterapia. La inmunoterapia

Cuadro 9

El papel de la IL-6 sobre las Tregs

En la vía clásica, la señal inducida por la IL-6 se genera por la unión a su receptor (IL-6R) expresado en forma restringida en pocos tipos celulares. El complejo IL-6/IL-6R así formado se asocia con la proteína de membrana gp130 promoviendo su dimerización y el inicio de la señal intracelular.

Otra vía de señalización es la del *trans-signaling*. En esta vía, las formas solubles del IL-6R (sIL-6R) forman complejos con la IL-6. Todas las células expresan la proteína gp130, por lo que en ausencia de un IL-6R, el complejo sIL-6R/IL-6 se une al gp130 y genera la señal intracelular en cualquier célula.

Un rasgo distintivo del suero de mujeres con ARE es que su agregado al CML entre los miembros de la pareja, no solo no bloquea la respuesta, sino que facilita una mayor respuesta proliferativa. El aumento de la IL-6 y de la sIL-6R (componentes del complejo que se unen a gp130) en el suero de las pacientes con ARE puede explicar el incremento de la respuesta proliferativa. Hemos demostrado que la inmunoterapia parental normaliza estos valores, y se asoció con un incremento de las Tregs FOXP3+ (Arruvito y col., *JRI*, 82: 158-165, 2009).

Cuadro 10

Papel de las células asesinas naturales (NK) en el embarazo

Durante el embarazo, las células NK carentes de capacidad citotóxica son la población predominante en el útero. La función de las células NK está regulada por un balance entre receptores inhibidores y activadores, pertenecientes a tres tipos de familias. 1- Los receptores KIR (*killer immunoglobulin-like receptors*); 2- Los de lectina tipo C (CD94/NKGs); y 3- Los ILT (*immunoglobulins-like-transcripts*, también conocidos como LIRs). En base a su contenido génico se definen dos haplotipos KIR: El haplotipo A tiene hasta 7 loci KIR, con un solo gen activador (KIR2DS4). Los haplotipos B presentan loci no presentes en el haplotipo A, como los receptores inhibitorios KIR2DL2, y KIR2DL5, y 5 genes activadores: KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS6 y KIR3DS1.

Ana Claudia Flores estudió la distribución de los genes KIR en pacientes con ARE demostrando que presentan un número reducido del receptor inhibitorio KIR2DL2 y un aumento del genotipo AA, que, si bien contiene al receptor inhibitorio KIR2DL3 en homocigosis, su carácter inhibitorio es menor que el KIR2DL2. Por lo tanto, el balance entre receptores inhibidores y activadores, hacia un predominio de estos últimos, favorece un papel de las células NK orientadas hacia la pérdida del embarazo (Flores A.C. y col. *Tissue Antigens* 69 Suppl 1:112, 2007).



Figura 13: A la izquierda, el autor con Verónica González; a la derecha, con Adriana Corigliano y Gabriela Magro a cargo de la detección de los FB en el CML.

consistió en la aplicación de células mononucleares, cada 15 días hasta que el suero generase un bloqueo del CML en ambos miembros de la pareja. En el grupo de mujeres hasta 35 años, la tasa de embarazos exitosos fue del 73% vs 26% en los controles. La tasa de éxito disminuyó entre los 36 y 40 años (47% vs. 13% en controles). Un resultado inesperado, por no haber sido analizado previamente, fue la respuesta a la inmunoterapia en parejas con infertilidad de causa no explicada. La tasa de embarazo a término en mujeres menores de 35 años fue de 46% vs. 26% en controles. Las mujeres que recibieron PIT y lograron el embarazo a través de fertilización in vitro (FIV) requirieron una mediana de un procedimiento. Las no inmunizadas requirieron una mediana de 3 procedimientos FIV. Este trabajo publicado en el mes de marzo de 2021, resultó ser un buen resumen de la larga actividad de investigación básica y clínica realizada, y que muestra como el PIT no solo mejora la tolerancia materna, sino que mejora la implantación.

■ LA VUELTA AL PRIMER AMOR: EL RETORNO DE LAS CÉLULAS SUPRESORAS

Durante la década de los 80, una convergencia de cuestionamientos generó en la comunidad científica una pérdida de interés por las células supresoras. Si bien nuestros experimentos en humanos permitieron mantener una línea celular con capacidad supresora por casi un mes, las nuevas metodologías de líneas celulares murinas mantenidas en cultivo por períodos prolongados generaron muy pocos clones T con actividad supresora específica. A esto se agregaba la ausencia de un fenotipo que permitiera su clara identificación. Hubo que esperar hasta el año 1995 cuando Sakaguchi describe a la población de células CD4+CD25+ que existen en forma natural y son capaces de mantener la tolerancia a lo propio. Debido al desprestigio que habían sumado las células supresoras, a estas células CD4+CD25+ se las llamó células T regulatorias (Treg), un término que quizás sea desafortunado, porque incluye efectos tanto positivos como negativos. La relevancia

de estas células se incrementó con la identificación primero en el ratón y luego en humanos del factor de transcripción de la familia *forkhead/winged helix* FoxP3 (Factor Scurfín), como el gen a cargo del desarrollo y de la función de las CD4 CD25 Tregs, (Schubert L.A., *J. Biol. Chem.* 2001; 276:37672–9; Khatri R. y col. *Nat. Immunol.* 2003; 4:337–42, Brunkow M.E. y col. *Nat. Genet.* 2001; 27:68–73; Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. *Science* 2003; 299:1057–61).

Con la descripción de 3 tipos diferentes, en los últimos años se reavivó el campo de las Treg con fenotipo CD8+ (Mishra y col. *Front Immunol.*, August 2021):

Más recientemente se ha descrito en ratones una población supresora con capacidad de suprimir in vivo el rechazo de trasplantes alogénicos, con un fenotipo CD8+CD122+CD49d+ PD-1, IL-10+.

A partir de estos trabajos en ratón, decidimos volver a caracterizar

la población CD8+HLA-DR+ que habíamos reportado como la primera célula supresora humana CD8+, (Fainboim L. y col. *Nature* 1980). Demostramos que la Treg CD8+HLA-DR+ está normalmente presente en la sangre periférica y en el cordón umbilical, como una población regulatoria natural de los seres humanos. Su efecto supresor es dependiente de un contacto célula

a célula e involucra a la molécula CTLA-4. Estas células regulatorias pueden ser expandidas *in vitro*, con una capacidad supresora similar a la ejercida por las CD8+HLA-DR+ naturales. Detectamos una alta frecuencia de estas células en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, que sugiere un efecto supresor putativo en este tipo de tumores agresivos (Arruvito y col. *J.*

Immunol, 2014, 193: 4469–4476). Un nuevo estudio extendió la caracterización fenotípica de estas Treg CD8+HLA-DR+ comprobando que comparte gran similitud con las Tregs CD4+FOXP3+. Entre ellas, la expresión de PD-1, los receptores de quimiocinas CCR4 y CCR5, una baja expresión de CD127, y un fenotipo de célula memoria y efectora. Estas Tregs CD8+HLA-DR+ inducen una supresión sobre las células CD8+ respondedoras, (no sobre las CD4+) que es abrogada por un anticuerpo neutralizante anti-PD-1. Cuando las células mononucleares de sangre periférica son activadas, las células CD8+HLA-DR+ aumentan su frecuencia de positividad para IFN- γ , TNF α y sufren una mayor degranulación, lo que contradice el concepto de que basadas en su fenotipo puedan ser consideradas células exhaustas (Machicote A. y col. *Frontiers in Immunol*, Noviembre 2018).

■ MI FAMILIA

Marta, mi esposa y compañera. Con ella hemos vivido los últimos 56 años, que han sido de una mutua admiración y respeto. Compartimos



Figura 14: El autor con Andrés Machicote y Santiago Belén.

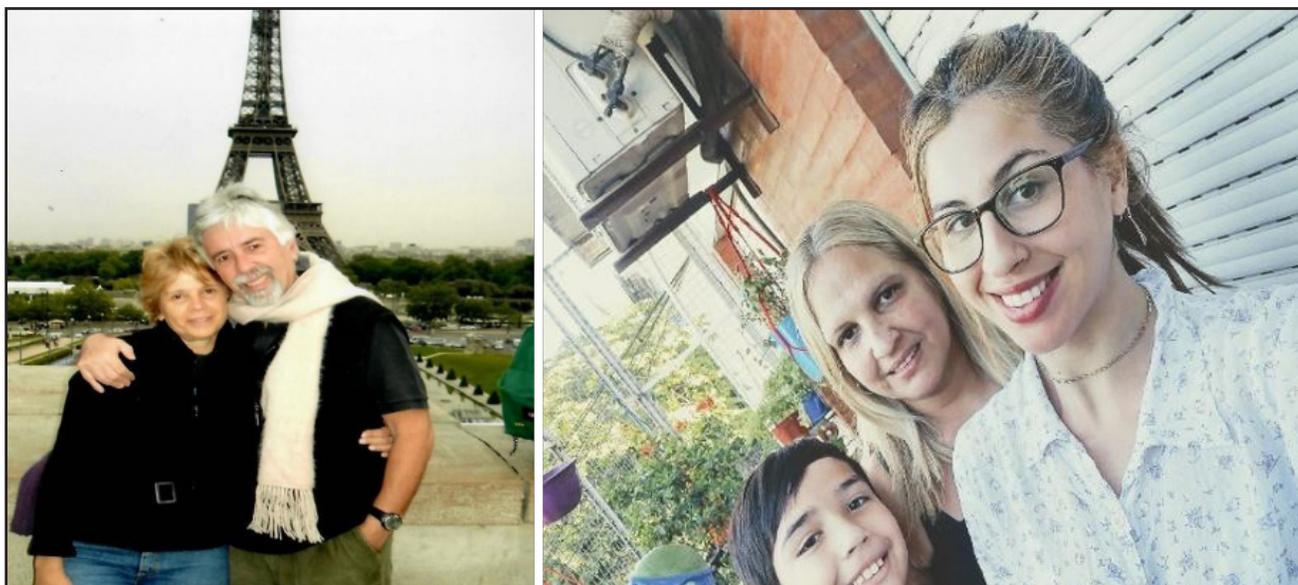


Figura 15: A la izquierda, con Marta en París; a la derecha, Bruno, Paula y Camila.

con mucho amor todos estos periodos que termino de describir, contando con su constante apoyo y su palabra oportuna.

Mi hija Paula es una persona entrañable, generosa, solidaria y una madraza para Camila y Bruno, a quienes amo y disfruto, cada vez que la palabra "abu" suena en ellos.

Mi papá Bernardo llegó desde su Odesa natal, Ucrania, en 1928. Llegó con 21 años, sin compañía alguna, reflejo de su iniciativa y decisión. Aquí conoció a Mamá Natalia Zima que llegó desde un pueblo campesino de Polonia en 1927, con apenas 11 años y una historia de privaciones. Mi madre cumplió el papel de ser la convocante en los eventos familiares, que siempre

resultaron en una excelente oportunidad para una buena comida. Mi padre fue el que puso la vara alta en mi vida con sus predicciones de que sería una persona destacada. Mi hermano Ignacio, 6 años mayor que yo, fue odontólogo, falleció dejando tres hijos, mis sobrinos Alejandro (mi ahijado) Vanesa, ambos reconocidos pediatras y muy comprometidos con sus profesiones, y Javier odontólogo como su padre, y que tiene una gran facilidad para encontrar el placer en lo que vive y hace.



Figura 16: A la izquierda, papá y yo; a la derecha, Mamá Natalia.

Mi hermano Hugo nació 9 años después que yo. Con él compartimos un enorme cariño, proyectos de vida y visiones del mundo. Tiene tres hijas, Soledad, Lucía y Julia, una criatura increíblemente dulce, nacida de su unión con Silvia, su compañera de los últimos años, en la vida y en el Hospital Muñiz.

Mi sobrino Javier tiene a su hija Carolina (también odontóloga). Vanesa, dos hijas mujeres (Lola y Jazmín) y un varón (Matías) y Alejandro dos hijas mujeres (Micaela y Julieta) y un varón Guido. Soledad, una hija mujer, (Sofía) y Lucia, un varón (Ca-



Figura 17: A la izquierda, con mis hermanos Ignacio y Hugo (en el medio); a la derecha, Javier (izq), Vanesa y Alejandro.



Figura 18: Mis sobrinas Lucia (izquierda), Soledad y Julia.

milo) y una nena (Catalina). Ha llegado el matriarcado Fainboim.

■ BIBLIOGRAFÍA SELECCIONADA

Fainboim L., Navarrete C. y Festeinstein H. (1980). *Precursor and effector phenotypes of activated human T lymphocytes*. *Nature*, **288**: 391-393.

Fainboim L., Marcos Y., Pando M., Capucchio M., Reyes G.B., Galoppo C., Badia I., Reimondino G., Ciocca M., Ramonet M., Fainboim H. y Satz M.L. (1994). *Chronic Active hepatitis in children: strong association with a particular HLA-DR6 (DRB1*1301) haplotype*. *Human Immunology* **41**, 146-150.

Marcos Y., Fainboim H.A., Capucchio M., Findor J., Daruich J., Reyes B., Pando M., Theiler G., Méndez N., Satz M.L. y Fainboim L. (1994). *Two loci involvement in the association of HLA with the extrahepatic manifestations of autoimmune chronic active hepatitis*. *Hepatology* **19**: 1371-1374.

Pando M., Larriba J., Fernández G.C., Fainboim H., Ciocca M., Ramonet M., Badia I., Daruich J., Findor J., Tano H., Fainboim L. (1999). *Pediatric and Adult Forms of type 1 Autoimmune Hepatitis in Argentina: Evidence for Differential Genetic Predisposition..* *Hepatology*. **30**(6):1374-1380.

Ramhorst R., Agriello E., Zittermann S., Pando M., Larriba J., Irigoyen M., Cortelezzi M., Auge L., Lombardi E., Etchepareborda J.J., Contreras Ortiz y Fainboim L (2000). *Is the paternal mononuclear cells' Immunization a successful treatment for recurrent spontaneous abortion?* *American J Reprod Immunology*. **44**(3):129-135.

Fainboim L., Cañero Velasco M. C., Marcos C. Y. Ciocca M., Roy A., Theiler G., Capucchio M., Nuncifora S., Sala L., Zelazko M. (2001). *Protracted, but not acute, Hepatitis A Virus Infection Is Strongly Associated with HLA-DRB1*1301, a Marker for Pediatric Autoimmune Hepatitis*. *Hepatology*, **33**(6):1512-7.

Arruvito L, Sanz M, Banham A.H y Fainboim L. (2007). *Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications in human reproduction*. *J. Immunol*. **178**(4):2572-8.

Ramhorst R, Gutierrez G, Corigliano A, Fainboim L. (2007). *Implication of RANTES in the modulation of alloimmune response by progesterone during pregnancy*. *Am J Reprod Immunol*. **57**(2):147-152.

Flores AC, Marcos CY, Paladino N, Arruvito L., Williams F, Middleton D. y Fainboim L. (2007). *KIR Receptors and HLA-C in the maintenance of pregnancy*. *Brief Communic. Tissue Antigens*. **69**: 112-3.

Flores AC, Marcos CY, Paladino N, Capucchio M, Theiler G, Arruvito L, Pardo R, Habegger A, Williams F, Middleton D y Fainboim L. (2007). *KIR genes polymorphism in Argentinean Caucosoid and Amerindian populations*. *Tissue Antigens* **69**(6):568-76.

Paladino N, Flores AC, Fainboim H, Cuarterolo M, Galoppo C, Costanzo G, Arruvito L y L Fainboim (2009). *The most severe forms of type I autoimmune hepatitis are associated with genetically determined levels of TGF- 1*. *Clinical Immunology* **134**: 305-312.

Arruvito L, Billordo A., Capucchio M., Prada M.E. y Fainboim L (2009). *IL-6 trans-signaling and the frequency of CD4+FOXP3+ cells in women with reproductive failure*. *Jr. of Reproductive Immunology* **82**(2):158-65.

- Arruvito L, Sotelo A, A Billordo y Fainboim L. (2020). *A Physiological Role for Inducible FOXP3+TREG cells. Lessons from Women with Reproductive Failure. Elsevier Editorial System (tm) for Clinical Immunology* **136**: 432-441.
- Arruvito L. y Fainboim L. (2011). *Mechanisms involved in the expansion of Tregs during pregnancy: Role of IL-2/STAT5 signalling.* *Journal of Reproductive Immunology* **88**: 93-98.
- Arruvito L, Pasyaslián F, Baz P, Podhorzer A, Billordo A, Pandolfi J, Semeniuk G, Arribalzaga E y Fainboim L. (2014). *Identification and Clinical Relevance of Naturally Occurring Human CD8+HLA-DR+Regulatory T Cells.* *The Journal of Immunology.* **193**:4469-76
- Cacciavillano W., Sampor C., Venier C., Gabri M., De Dávila M., Galluzzo M., Guthmann M., Fainboim L., Alonso D. y Chantada G. (2015) *A Phase I Study of the Anti-Idiotypic Vaccine Racotumomab in Neuroblastoma and Other Pediatric Refractory Malignancies.* *Pediatr Blood Cancer.* DOI: 10.1002/ pbc.25631.
- Podhorzer A., Paladino N., Cuarterolo, ML., Fainboim HA., Paz S., Theiler G., Capucchio M., López SL., Machicote A., Montal S., Podestá G. y Fainboim L. (2016). *The early onset of type 1 autoimmune hepatitis has a strong genetic influence: role of HLA and KIR genes.* *Genes and Immunity* **2016**, 1-6.
- Podhorzer A., Machicote A., Belén S., Lauferman L, Invenzarza O., Montal S, Marciano S., Galdame O., Podestá G. y Fainboim L. (2017). *Intrahepatic and peripheral blood phenotypes of NK and T cells: Differential surface expression of KIR receptors:* *Immunology.* Manuscript ID: IMM-2017-4771.R1
- Podhorzer A., Dirchwolfb M., Machicote A., Belén P., Montal S., Paz S., Fainboim H., Podestá L. y Fainboim L. (2017). *Clinical features of chronically infected HCV patients are associated with KIR genes and their expression at the surface of NK cells.* *Frontiers in Immunology.* Doi: 10.3389/ fimmu.2017.01912
- Machicote S., Belén P., Baz L. Billordo A. y Fainboim L. (2028). *Human CD8+HLA-DR+ Regulatory T Cells, Similarly to Classical CD4+Foxp3+ Cells, Suppress Immune Responses via PD-1/PD-L1 Axis,* *Frontiers in Immunology,* Nov 2018, doi:10.3389/fimmu2018.02788
- Fainboim L., Belén S., González V. y Fernández P. (2021). *Evaluation of paternal lymphocyte immunotherapy and potential biomarker mixed lymphocyte reaction-blocking factor in an Argentinian cohort of women with unexplained recurrent spontaneous abortion and unexplained infertility.* *Am J Reprod Immunol.* **86**(2):e13422..