



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y
BIOPROCESOS**

**ESTUDIO DE LAS SEÑALES INTRACELULARES
GENERADAS POR LA INTERACCIÓN DE CD43
CON ALBÚMINA SÉRICA HUMANA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

Biól. María Elena Bravo Adame

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay



CUERNAVACA, MORELOS 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay

COMITÉ TUTORAL

Dra. Yvonne Jane Rosenstein

Dra. Claudia Martínez

Dr. Carlos Rosales

JURADO DE EXAMEN

Dr. Baltazar Becerril
(Presidente)

Dra. Leonor Pérez
(Secretario)

Dra. Laura Bonifaz
(Vocal)

Dra. Yvonne Rosenstein
(Suplente)

Dra. Claudia Treviño
(Suplente)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la calidad en la enseñanza que ofrece a sus estudiantes, siempre en busca de la superación.

Al Instituto de Biotecnología por permitirme ser parte del programa de Posgrado y por brindarnos a los estudiantes una educación de excelencia, dándonos la oportunidad de ser formados por investigadores tan destacados.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me otorgó durante estos años de trabajo.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo económico brindado para la realización de este proyecto.

Al Banco de Sangre del Hospital Regional del IMSS en Cuernavaca por contribuir cada semana con la materia prima para mis experimentos.

A la Unidad de Docencia del IBt por toda su ayuda desde el inicio, cada inscripción, cada trámite, gracias.

A los miembros de mi comité tutorial por sus críticas, sus recomendaciones, sus consejos.

A los miembros del jurado de examen por las sugerencias hechas a mi trabajo.

AL LABORATORIO YR...

Especialmente a la Dra. Yvonne Rosenstein, le agradezco el haber aceptado ser mi tutora hace dos años, cuando la estuve molestando con llamadas constantes pidiéndole una oportunidad para trabajar con usted. ¡Gracias por decir que sí! Gracias por aceptarme en su grupo y por asignarme un proyecto tan interesante como este, por todas las pláticas en las que estuvimos de acuerdo en que la albúmina ¡sí hace cosas! Gracias por su confianza, por sus consejos, sus críticas a mi trabajo, sus sugerencias. Gracias por escuchar mis inquietudes y por el apoyo que me dio cada vez que me acerqué a usted. Gracias por ser mi guía estos dos años y por darme la oportunidad de continuar trabajando bajo su dirección. Gracias por impulsarme a dar lo mejor de mí, por motivarme, por ser un ejemplo a seguir.

Al Dr. Gustavo Pedraza, por estar siempre abierto a escuchar y resolver mis dudas, por sus opiniones y sus críticas que siempre fueron un punto importante para realizar este proyecto. Por responder siempre con una amable sonrisa ante cualquier inquietud o duda de mi parte, por toda la ayuda que me diste cada vez que te lo pedí.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio: a Erika por su amistad y por la paciencia para enseñarme a trabajar en el laboratorio cuando recién llegué y por los consejos que me diste cada vez que la albúmina me hacía dudar. A aquéllos que ya no están en el laboratorio, a José Luis, Rosita, Samadhi, Constance, María y Caty por la amistad que me brindaron desde que llegué al laboratorio, por las pláticas en las tardes y por todos esos buenos momentos. A Irma y Nora, por sus consejos, por las porras que me echaron, por resolver mis dudas, por ser también un ejemplo a seguir. A quienes están actualmente en el laboratorio, Amiel, Monse, Cecilia, Laura, Natasha, Nohemí y Oswaldo, por su amistad,

por sus consejos, su apoyo, por los cafecitos y las galletas de todos los días, por las risas, las pláticas, por ser unos excelentes compañeros y amigos.

A MI FAMILIA...

A mis papás, que siempre me han apoyado en todo lo que he querido hacer, por la inmensa ayuda que me han dado siempre. Gracias por la confianza que siempre han tenido en mí, por impulsarme a ser una mejor persona, por inculcar en mí las ganas de prepararme profesionalmente, ustedes son mi ejemplo a seguir. Les dedico con mucho cariño esta tesis porque sé que es un logro tan importante para ustedes como lo es para mí, ustedes son una parte esencial de todo esto. Una vez más, gracias por ayudarme a llegar hasta aquí y por motivarme para continuar por este camino. Gracias por todo, por sus palabras, sus consejos, ¡gracias!

A Israel, por estar a mi lado siempre, por darme tu apoyo incondicional, por motivarme a seguir adelante. Gracias por tu comprensión, tu paciencia y por tus palabras que han sido tan valiosas para mí ojos. Gracias por todo lo que has hecho para ayudarme a llegar hasta aquí, tú también eres una parte importante de este logro. Gracias por ayudarme a cumplir mis metas y por ser un apoyo constante.

Al resto de mi familia, no menciono todos sus nombres pero saben que agradezco el interés, el cariño y el apoyo que siempre me han demostrado.

TABLA DE CONTENIDO

GLOSARIO	3
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 LA RESPUESTA INMUNE	5
1.1.1 RESPUESTA INNATA	5
1.1.2 RESPUESTA ADAPTATIVA	6
1.2 CD43 ES UNA MUCINA	12
1.2.1 LA PROTEÍNA	13
1.2.2 ISOFORMAS	15
1.2.3 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD43	18
1.2.4 LOS LIGANDOS	21
1.2.5 LAS FUNCIONES	24
1.2.6 PARTICIPACIÓN DE CD43 EN DISTINTAS PATOLOGÍAS	29
1.3 JUSTIFICACIÓN	31
1.3.1 ALBÚMINA	31
2. HIPÓTESIS	38
3. OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVOS GENERALES	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4. MATERIALES Y MÉTODOS	39
4.1 REACTIVOS	39
4.2 CÉLULAS	41
4.3 CITOMETRÍA DE FLUJO PARA EVALUAR LA UNIÓN DE HSA A LINFOCITOS T	41
4.4 PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS	43
4.4.1 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR CON MTT	43
4.4.2 ANÁLISIS DE CICLO CELULAR POR TINCIÓN CON YODURO DE PROPIDIO	44
4.5 ACTIVACIÓN CELULAR	45

<u>5.</u>	<u>RESULTADOS</u>	<u>48</u>
5.1	UNIÓN DE HSA A LINFOCITOS T Y NEUTRÓFILOS	48
5.1.1	ASOCIACIÓN DE HSA A NEUTRÓFILOS	48
5.1.2	ASOCIACIÓN DE HSA A LINFOCITOS T	49
5.2	EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	54
5.2.1	ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR CON MTT	54
5.2.2	ANÁLISIS DE CICLO CELULAR POR TINCIÓN CON YODURO DE PROPIDIO	56
5.3	ACTIVACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN RESPUESTA A HSA	58
5.3.1	EFFECTO DE HSA SOBRE LA VÍA DE LAS MAPK	58
5.3.2	EFFECTO DE HSA SOBRE LA VÍA DE PI-3K/AKT	59
<u>6.</u>	<u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</u>	<u>62</u>
6.1	CONCLUSIONES	65
6.2	PERSPECTIVAS	66
<u>7.</u>	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>68</u>

GLOSARIO

APC	Célula presentadora de antígenos
ERM	Ezrina-radixina-moesina
FCS	Suero fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HSA	Albúmina sérica humana
IFN	Interferón
IL	Interleucina
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio
PMA	Forbol Miristato Acetato (éster de forbol)
TCR	Receptor para el antígeno de linfocitos T
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α

RESUMEN

La sobrevivencia y la proliferación de los linfocitos contribuyen de manera importante a mantener un repertorio de linfocitos vírgenes que puedan responder a diferentes antígenos. Los mecanismos que regulan la sobrevivencia de los linfocitos T se desconocen en su mayoría, sin embargo, se ha sugerido que las células podrían recibir señales basales de sobrevivencia a través de receptores en su membrana.

En este proyecto se evaluaron los efectos que resultan de la interacción entre CD43, un receptor abundante en la membrana de los linfocitos T, y uno de sus ligandos putativos, la albúmina sérica humana. Por medio de citometría de flujo se demostró la unión de albúmina sérica humana a linfocitos T de sangre periférica. La unión de albúmina a los linfocitos T indujo señales hacia el interior de las células que derivaron en la activación de las vías de Akt y de la MAPK ERK. Asimismo, la albúmina impidió la apoptosis espontánea de linfocitos T en reposo que permanecieron en cultivo por tiempos prolongados. En conjunto, estos resultados sugieren que la albúmina sérica humana, a través de su interacción con CD43, podría jugar un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de los linfocitos T circulantes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La respuesta inmune

Al reconocer antígenos, el sistema inmunológico protege al organismo de sustancias potencialmente nocivas, distinguiendo entre los antígenos propios del cuerpo y los extraños, para los cuales se produce una respuesta. Las células y moléculas responsables de tal respuesta constituyen el sistema inmunológico. El efecto de reconocimiento y protección contra un antígeno determinado se lleva a cabo a través de dos tipos de respuesta inmune: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa (Abbas et al., 2000).

1.1.1 Respuesta innata

La respuesta inmune innata o natural se desarrolla como primera línea de defensa contra patógenos. Se caracteriza por ser inmediata, ya que sus elementos efectores están presentes en el organismo y listos para actuar antes de que éste sea invadido por un antígeno. Entre los factores efectores de la respuesta innata, se encuentran barreras fisicoquímicas como la piel y las mucosas; moléculas circulantes, como el complemento; células, como los macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales (NK) y células cebadas; y factores humorales, como el interferón γ (IFN- γ) o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α).

Las células del sistema inmune y las epiteliales juegan un papel crítico en la defensa del hospedero frente a patógenos microbianos al reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de una familia de receptores conocidos como Toll like receptors (TLRs). Los TLRs son responsables del reconocimiento y activación de respuestas a productos

microbianos tales como LPS, peptidoglicano, flagelina y motivos de DNA bacterianos de tipo CpG (Abbas et al., 2000).

La respuesta inflamatoria es parte de la inmunidad innata pero constituye el puente con la inmunidad adaptativa, y se pone de manifiesto cuando los tejidos son lesionados por bacterias, trauma, toxinas, calor, etc. En el tejido dañado se liberan sustancias químicas vasodilatadoras como la histamina, bradiquinina y serotonina, lo cual ocasiona que los vasos sanguíneos derramen líquido en los tejidos, lo que a su vez deriva en una inflamación localizada. De esta forma se construye una barrera de contención que impide que la sustancia extraña entre en contacto con otros tejidos corporales (Abbas et al., 2000). Asimismo, las células del sistema inmune innato secretan citocinas y quimiocinas que reclutan a las células del sistema inmune adaptativo hacia los sitios de inflamación. En este punto, el sistema inmune adaptativo entra en acción para complementar la eficiencia del sistema innato, al generar señales y mecanismos efectores que mejoran la respuesta del sistema innato (Kindt et al., 2007).

1.1.2 Respuesta adaptativa

La respuesta inmune adaptativa o adquirida constituye una segunda línea de defensa. A diferencia de la respuesta inmune innata, es específica para un antígeno y tiene memoria inmunológica, por lo que "recuerda" antígenos que ya han sido reconocidos y atacados anteriormente. Los componentes principales de la respuesta inmune adaptativa son los linfocitos T, los linfocitos B y las células dendríticas (Abbas et al., 2000).

La respuesta adaptativa se clasifica a su vez en dos tipos: la respuesta humoral, mediada por los linfocitos B, y la respuesta celular, mediada por los linfocitos T. El desarrollo de las células B y T se lleva a cabo en la médula ósea, aunque los linfocitos T maduran en el timo.

Durante el desarrollo, mediante un complejo proceso de selección, los linfocitos “aprenden” a reconocer a los tejidos que son parte del cuerpo (propios) y a distinguirlos de tejidos y partículas extraños. A lo largo de este proceso, los linfocitos establecen interacciones con células del estroma, con otras células linfoides y con antígenos propios, y la información recolectada como resultado de esas interacciones conduce a la eliminación por apoptosis de las células autoreactivas, mientras que los linfocitos “sobrevivientes” continúan por una vía de maduración. Durante esta etapa, los linfocitos pasan por diversos estadios que se caracterizan por la expresión de diferentes genes y receptores. Los acontecimientos principales en el proceso de maduración son: reordenamiento y expresión de genes que codifican para los receptores para el antígeno, inmunoglobulina (Ig) en el caso de los linfocitos B y TCR (receptor para el antígeno de linfocitos T) en el caso de los linfocitos T, proliferación celular y selección del repertorio. La recombinación somática de los genes que codifican para los receptores para el antígeno permite que se genere una enorme diversidad en la especificidad de estos receptores. Al término de este proceso, cada uno de los linfocitos es capaz de reconocer a un solo tipo de antígeno, y tras esto, de activarse y multiplicarse (Abbas et al., 2000).

1.1.2.1 Respuesta celular

Los linfocitos T son los componentes esenciales de la respuesta celular específica. Las células T maduras se clasifican en base a sus marcadores de superficie en dos poblaciones principales: los linfocitos T $CD4^+$ y los linfocitos T $CD8^+$. En humanos, las primeras representan aproximadamente el 65% de las células T, y las segundas corresponden al 35% restante. En conjunto, ambas poblaciones ejercen un papel central en la inmunidad mediada por células y cooperan con los linfocitos B en la síntesis de anticuerpos (Abbas et al., 2000).

Los linfocitos T CD4⁺ reconocen al péptido antigénico presentado por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II y desempeñan una función crucial en la respuesta inmune, ya que tras reconocer el antígeno, se activan y expanden clonalmente, secretando citocinas clave para la activación de otras células (B, T, macrófagos), motivo por el cual reciben la denominación de linfocitos T ayudadores (helper) (Abbas et al., 2000). Funcionalmente, se han descrito cuatro tipos de poblaciones de linfocitos T helper (T_H): T_H1 que participan en la respuesta a bacterias intracelulares liberando IL-2 e IFN- γ ; T_H2 que confieren protección contra helmintos y producen IL-4, 5 y 13; T_H17, productoras de IL-17 e IL-22 para la respuesta a infecciones por bacterias extracelulares; y células T_{Reg} que regulan la respuesta de los linfocitos T mediante la producción de IL-10 y TGF- β (Weaver et al., 2006; Reiner S, 2007).

Por otra parte, los linfocitos T CD8⁺ reconocen antígenos expuestos en moléculas MHC-I de células propias infectadas con virus o transformadas. Las señales generadas por el reconocimiento del antígeno a través del TCR, junto con aquellas proporcionadas por la interacción de las citocinas presentes con sus respectivos receptores, provoca su activación y proliferación clonal, con diferenciación a linfocitos T citolíticos, que matan a las células propias enfermas. Los linfocitos CD8⁺ (T_C) a su vez se pueden subdividir en subpoblaciones (T_C1/ T_C2) que se diferencian según los patrones de síntesis de citocinas, en forma similar a las células CD4⁺ (Abbas et al., 2000).

1.1.2.2 TCR

El receptor para el antígeno de los linfocitos T (TCR) es un receptor de membrana formado por heterodímeros de las cadenas $\alpha\beta$ ó $\gamma\delta$, cada una de las cuales contiene un dominio variable y uno constante en la región extracelular (Figura 1). Los dominios variables se encuentran en la región amino terminal de las cadenas y presentan secuencias muy diversas que dan lugar a tres regiones hipervariables. En los dominios constantes, la secuencia es altamente conservada y se localiza además una secuencia corta de conexión que permite la formación de un enlace disulfuro entre las dos cadenas del receptor. El dominio intracelular del TCR es corto, formado por solamente 5 a 12 aminoácidos y su región transmembranal contiene cargas positivas que favorecen las interacciones de este receptor con el complejo CD3, el cual es responsable de la transducción de señales en respuesta al reconocimiento del antígeno (Kindt et al., 2007).

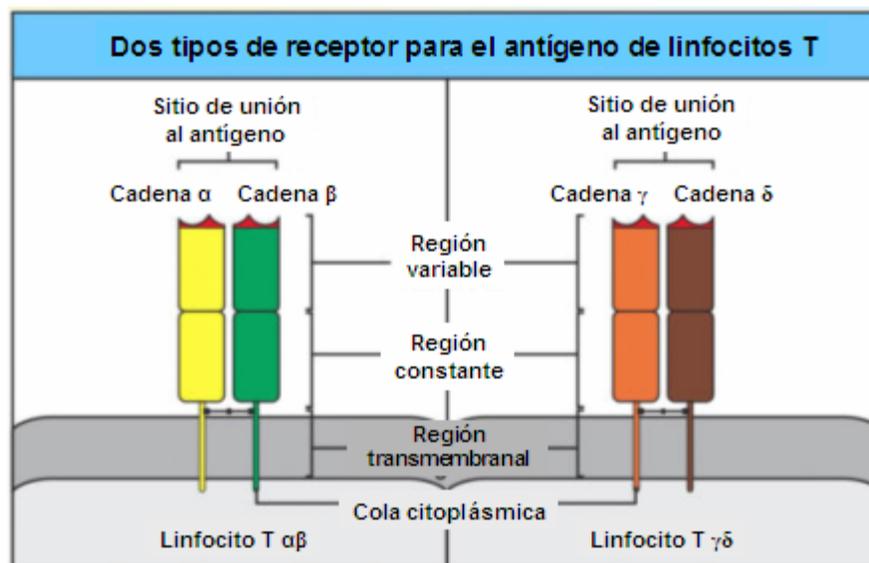


Figura 1. Estructura de los dos tipos de TCR, formados por los heterodímeros de las cadenas $\alpha\beta$ ó $\gamma\delta$ (Janeway, 2005).

La mayoría de las células T que circulan en sangre tienen un TCR $\alpha\beta$, sin embargo, existe un número elevado de linfocitos $\gamma\delta$ que residen en los tejidos. Los linfocitos $\alpha\beta$ requieren del procesamiento y la presentación de antígenos en el contexto de las moléculas del MHC y se caracterizan por su alto grado de especificidad. A diferencia de éstos, los linfocitos $\gamma\delta$ no requieren procesamiento ni presentación del antígeno y son capaces de reconocer antígenos que se expresan en grupos de patógenos, lo cual sugiere que podrían funcionar como parte de la respuesta inmune innata. Aunque los linfocitos $\gamma\delta$ presentan una menor variabilidad en sus receptores, pueden secretar citocinas y quimiocinas que regulan el reclutamiento de linfocitos $\alpha\beta$ a sitios de infección, de tal manera que las células $\alpha\beta$ cuya variabilidad de receptores es mayor, responden al llamado de las células $\gamma\delta$ para contender contra el patógeno generando una respuesta más específica (Kindt et al., 2007).

El complejo CD3 al cual se asocia el TCR es un complejo macromolecular formado por cinco cadenas polipeptídicas, responsable de la transducción de señales del TCR. Las cadenas del complejo CD3 se asocian entre sí para dar lugar a tres dímeros que difieren en la composición de sus cadenas: un heterodímero $\gamma\epsilon$, un heterodímero $\delta\epsilon$ y un homodímero $\zeta\zeta$ o un heterodímero $\zeta\eta$. Por lo tanto el complejo TCR-CD3 consta de cuatro dímeros: el heterodímero $\alpha\beta$ ó $\gamma\delta$ del TCR que determina la especificidad de la unión al antígeno, y tres dímeros CD3 que son requeridos para la expresión del TCR en la membrana, así como para la transducción de señales (Kindt et al., 2007) (Figura 2).

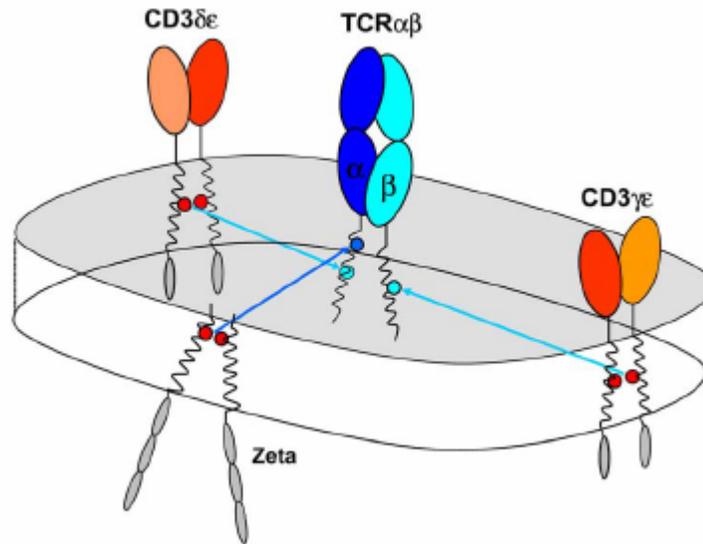


Figura 2. Asociación del TCR con los dímeros $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ y $\zeta\zeta$ del complejo CD3 mediante interacciones entre las cargas positivas de la región transmembranal del TCR y las cargas negativas de la región transmembranal del complejo CD3 (Call et al., 2004).

La cadena ζ se caracteriza por tener una región extracelular muy corta, una región transmembranal con cargas negativas que le permiten interactuar con las cargas positivas de la región transmembranal del TCR, y finalmente una cola citoplasmática larga en la que destacan los llamados “motivos de activación del inmunoreceptor vía tirosina” (ITAM). El estado de fosforilación de las tirosinas de los ITAMs regula la interacción de estas cadenas polipeptídicas con cinasas de tirosinas, y participa de manera importante en la transducción de señales. Las cadenas γ , δ y ϵ contienen un solo ITAM, mientras que las cadenas ζ y η contienen tres (Kindt et al., 2007).

Sin embargo, las señales que se generan a partir del solo reconocimiento del antígeno no son suficientes para activar a los linfocitos. Se considera que la activación exitosa de los linfocitos T requiere por lo menos de dos tipos de señales: 1) las generadas por la interacción específica del TCR con los péptidos presentados por las moléculas del MHC de las células

presentadoras de antígeno (APCs) y 2) las que resultan de la interacción de moléculas co-receptoras en la superficie de las células T con sus ligandos en las APCs (Abbas et al., 2000) (Figura 3). De esta forma, la modulación de la señalización de células T se da por la contribución de múltiples moléculas co-receptoras, entre las cuales CD2, CD4, CD8, CD28, CD40-L, integrinas y CD43 han sido las más descritas. En este trabajo nos enfocamos en particular a estudiar algunas de las señales que genera la molécula co-receptora CD43 al interaccionar con uno de sus ligandos putativos, la albúmina sérica humana.

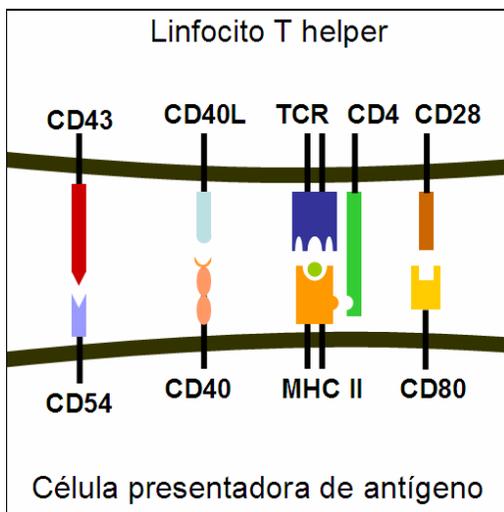


Figura 3. Interacciones entre el TCR y algunas moléculas accesorias de los linfocitos T (CD4, CD40L, CD28 y CD43) con sus ligandos en las células presentadoras de antígeno (MHC, CD40, CD80 y CD54).

1.2 CD43 es una mucina

Las mucinas son proteínas largas y altamente glicosiladas; la mayoría de ellas son secretadas por epitelios aunque algunas se encuentran ancladas en las membranas celulares (Agrawal et al., 1998; Carraway et al., 2003). Se caracterizan por tener regiones repetidas que contienen abundantes residuos de serina y treonina O-glicosilados, lo cual les proporciona una

conformación rígida y extendida, así como una gran hidrofobicidad. Las mucinas ancladas a membranas juegan un papel importante en la iniciación y la modulación de señales intracelulares (Carraway et al., 2003).

El co-receptor CD43 es una glicoproteína abundante que se expresa en la membrana de todas las células hematopoyéticas, excepto en eritrocitos y en células B en reposo (Remold-O'Donnell et al., 1987, 1990). CD43 es considerada como una mucina por tener arreglos secuenciales de residuos de serina y treonina en la estructura primaria de la proteína, la mayoría de los cuales está glicosilado en el grupo hidroxilo de la cadena lateral (O-glicosilación) (Cyster et al., 1991; Van den Steen et al., 1998; Brockhausen et al., 1995). En función de lo anterior, CD43 tiene un alto contenido de carbohidratos, siendo la galactosa y la N-acetilgalactosamina los más abundantes y presentes en cantidades más o menos equimolares (25 y 22 residuos por cada 100 aminoácidos, respectivamente), además de cantidades mucho menores de N-acetilglucosamina, fucosa y manosa. Una de las cadenas de azúcares presenta una unión N-glicosídica, y el resto, aproximadamente 80, tienen uniones O-glicosídicas, constituyendo en su totalidad más de la mitad del peso molecular de la molécula (Remold-O'Donnell et al., 1986).

1.2.1 La proteína

El co-receptor CD43 está formado por tres dominios: un dominio extracelular de 239 aminoácidos que sale de la membrana plasmática aproximadamente 45 nm y se encuentra altamente glicosilado, un dominio transmembranal de 23 aminoácidos, y un dominio citoplasmático de 123 aminoácidos (Remold-O'Donnell et al., 1986; Cyster et al., 1990) (Figura 4). La porción polipeptídica de CD43 tiene un peso molecular de 38.5 kDa (Fukuda

M, 1989). El núcleo protéico tiene un contenido bajo de lisina, un alto contenido de prolina y un alto contenido de hidroxiaminoácidos (12.5 residuos de serina y 12.5 residuos de treonina por cada 100 aminoácidos) (Remold-O'Donnell et al., 1986).

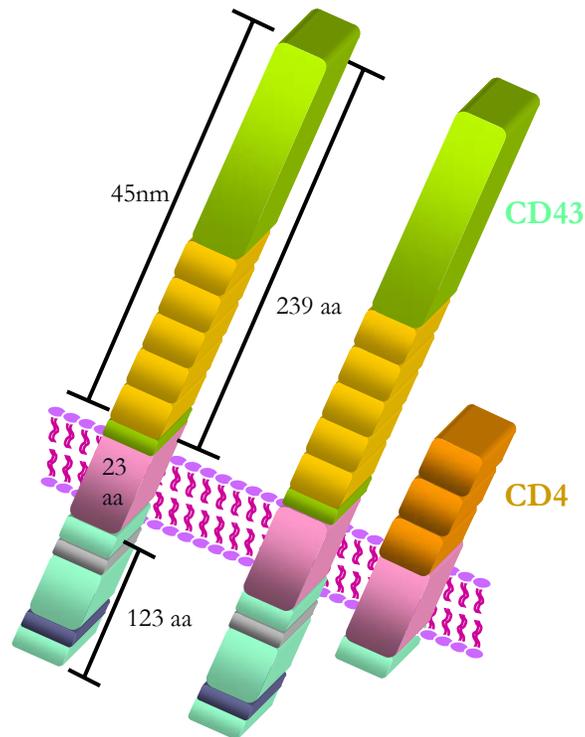


Figura 4. Estructura alargada de CD43. Se muestran los tres dominios de la proteína, así como una molécula de CD4 para comparar el tamaño de CD43 respecto a otras moléculas de superficie.

El dominio extracelular es extendido y rígido y contiene cinco arreglos en tándem de 18 aminoácidos que se repiten (Ile-116 a Ser-205) y se encuentran próximos a la membrana (Figura 5). La región extracelular de CD43 es rica en residuos de prolina, serina y treonina (39% de los aminoácidos del dominio son serinas y treoninas), la mayoría de los cuales están O-glicosilados, como se mencionó anteriormente, siendo GalNAc el primero residuo que se une a la proteína, y generando estructuras de carbohidratos con un alto contenido de ácido

siálico (Cyster et al., 1991; Van den Steen et al., 1998; Brockhausen et al., 1995; Shelley et al., 1989, 1990).

```

M A T L L L L L G V L V V S P D A L G S T T A V Q T P T S G E
P L V S T S E P L S S K M Y T T S I T S D P K A D S T G D Q T
S A L P P S T S I N E G S P L W T S I G A S T G S P L P E P T
T Y Q E V S I K M S S V P Q E T P H A T S H P A V P I T A N S
L G S H T V T G G T I T T N S P E T S S R T S G A P V T T A A
S S L E T S R G T S G P P L T M A T V S L E T S K G T S G P P
V T M A T D S L E T S T G T T G P P V T M T T G S L E P S S G
A S G P Q V S S V K L S T M M S P T T S T N A S T V P F R N P
D E N S R G M L P V A V L V A L L A V I V L V A L L L L W R R
R Q K R R T G A L V L S R G G K R N G V V D A W A G P A Q V P
E E G A V T V T V G G S G G D K G S G F P D G E G S S R R P T
L T T F F G R R K S R Q G S L A M E E L K S G S G P S L K G E
E E P L V A S E D G A V D A P A P D E P E G G D G A A P

```

Figura 5. Secuencia de aminoácidos de CD43. Los cinco arreglos en tándem del dominio extracelular se muestran subrayados, el dominio transmembranal está sombreado con color gris.

El dominio transmembranal y el citoplasmático están altamente conservados entre humano, ratón y rata, y la región intracelular contiene una región rica en prolina, así como residuos de serina y treonina potencialmente fosforilables que participan en la transducción de señales. Asimismo, el dominio intracelular de CD43 contiene sitios de unión para las proteínas adaptadoras del citoesqueleto ezrina, radixina y moesina (ERMs) (Shelley et al., 1989; Allenspach et al., 2001; Delon et al., 2001; Roumier et al., 2001), así como una señal de localización nuclear que permite la translocación de este dominio al núcleo. La región intracelular de CD43 interactúa también con β -catenina, lo cual induce la expresión de genes blancos de β -catenina como *c-Myc* y *Ciclina D1* (Andersson et al., 2004).

1.2.2 Isoformas

El desarrollo y la diferenciación de los linfocitos T son procesos que están acompañados de cambios en los patrones de glicosilación de las proteínas de membrana, los

cuales a su vez pueden influenciar el tráfico intracelular, la interacción entre proteínas, así como el desarrollo, la migración y las respuestas de los linfocitos T (Rudd et al., 1999, 2001; revisado en Daniels et al., 2002). Los patrones de glicosilación post-traducciona l de CD43 están altamente regulados y resultan en dos isoformas con pesos moleculares característicos que se expresan en diferentes tipos de células:

- Un producto de 115 kDa que está presente en timocitos, linfocitos T CD4⁺ en reposo y en monocitos.
- Un producto de 130 kDa que se expresa en linfocitos CD8⁺ en reposo, CD4⁺ activados, neutrófilos, plaquetas, linfocitos B y macrófagos (Remold-O'Donnell et al., 1987; Piller et al., 1988).

Las diferencias en el peso molecular se deben a cambios en la estructura de los carbohidratos. Las estructuras de los O-glicanos son características para cada tipo celular y para cada etapa de diferenciación. Los linfocitos T en reposo expresan “core1 O-glicanos” con secuencias Gal β 1,3GalNAc, mientras que las células T activadas presentan estructuras más complejas que dan lugar los “core2 O-glicanos” con secuencias Gal β 1,4GalNAc unidas a las ramificaciones de los glicanos core1 mediante un enlace GlcNAc β 1,6GalNAc (Onami et al., 2002; Jones et al., 1994; Ellies et al., 1996) (Figura 6).

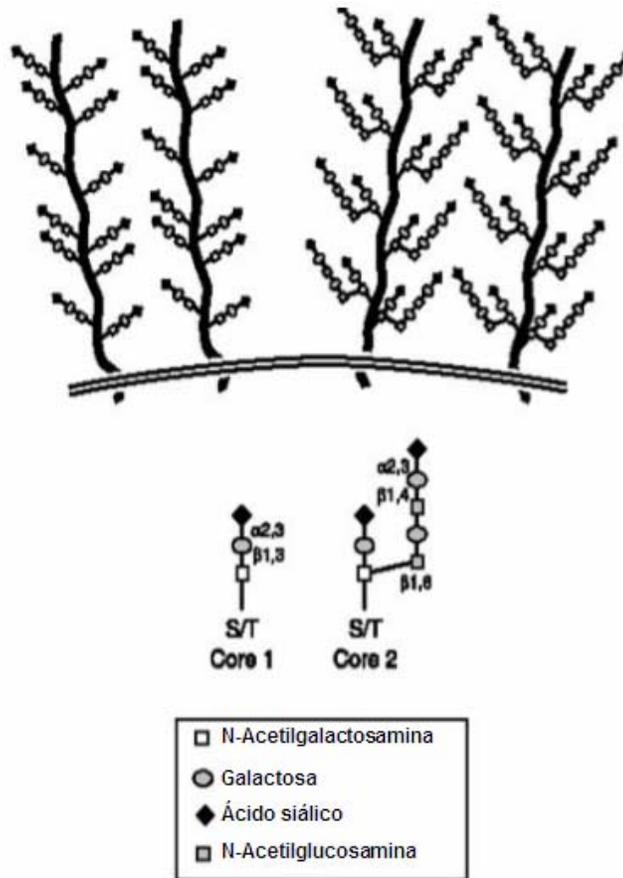


Figura 6. Estructura de los O-glicanos de CD43. CD43 presenta aproximadamente 80 uniones O-glicosídicas con estructuras de carbohidratos que pueden ser lineales (core 1) o ramificadas (core 2) (Hernández et al., 2006).

El cambio entre una y otra forma de glicanos que ocurre tras la activación celular se debe a un aumento en la expresión de la enzima $\beta 1 \rightarrow 6$ GlcNAc-transferasa, o core2 GlcNAc transferasa (C2GnT), la cual es responsable de iniciar las ramificaciones en los O-glicanos core2 favoreciendo el enlace $\text{GlcNAc}\beta 1,6\text{GalNAc}$. El cambio de O-glicanos de core1 a core2 modifica las características de la molécula, así como la carga neta de la membrana celular, resultante del aumento en el número de residuos de ácido siálico. Las consecuencias funcionales de este cambio no son totalmente claras, pero se ha sugerido que los O-glicanos que se expresan en la superficie celular podrían afectar las interacciones célula-célula

regulando la respuesta inmune. Además, los O-glicanos de core2 constituyen una estructura en la que se forman ligandos para selectinas, lo cual puede contribuir al reclutamiento de linfocitos T CD4+ de memoria hacia los sitios de inflamación (Kishimoto et al., 1999; Higgins et al., 1991; Ellies et al., 1994; Jones et al., 1994; Tsuboi et al., 2000; Mukasa et al., 1999).

1.2.3 Regulación de la expresión de CD43

El nivel de expresión de CD43 en la superficie celular es controlado en diferentes células por medio de mecanismos como regulación de la expresión génica (Kudo et al., 1995), proteólisis (Remold-O'Donnell et al., 1990, 1995; Bazil et al., 1993) o segregación (Allenspach et al., 2001; Delon et al., 2001).

1.2.3.1 Expresión génica

El gen que codifica para CD43 en humanos está localizado en el cromosoma 16 (Shelley et al., 1989; Pallant et al., 1989). La región del promotor no contiene cajas TATA o CAAT, pero es rica en citocinas y guaninas, y tiene secuencias cortas repetidas (GGTG). El gen tiene dos sitios principales para el inicio de la transcripción y un intrón de 378 pares de bases que interrumpe la secuencia que determina la región 5' no traducida del mRNA (Shelley et al. 1990). El gen de CD43 consta de dos exones, pero sólo el segundo codifica las regiones extracelulares, transmembranales e intracelulares de la proteína (Kudo S et al., 1991). Se ha comprobado que señales alternativas de poliadenilación generan mRNAs de 1.9 y 4.3 kilobases, los cuales difieren en la longitud de sus regiones 3' no traducidas: una señal de poliadenilación a 2301 pares de bases río abajo del primer sitio de inicio de la transcripción define el extremo 3' del mRNA de 1.9 kilobases, mientras que cinco señales de

poliadenilación que se sobrelapan y comienzan 2290 pares de bases río abajo, determinan el extremo 3' del mRNA de 4.3 kilobases (Figura 7).

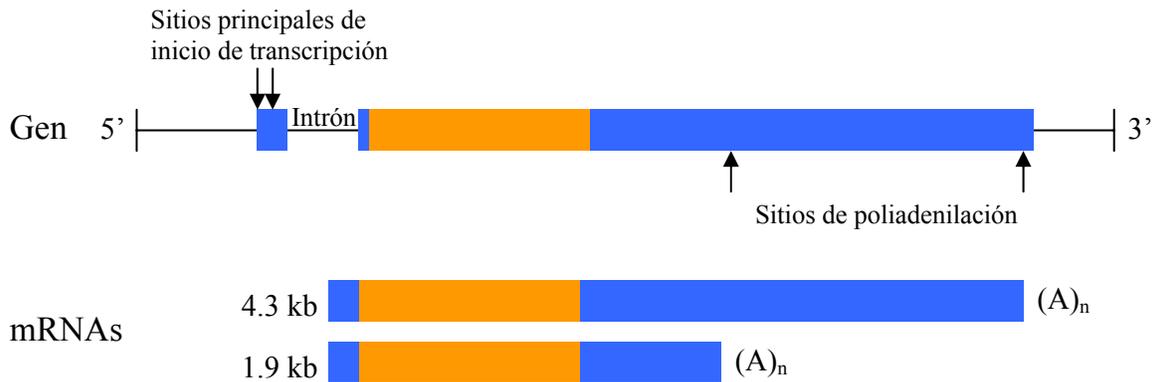


Figura 7. Estructura del gen de CD43 y de los mRNAs que se generan como consecuencia de señales alternativas de poliadenilación.

La metilación del DNA juega un papel importante en la expresión génica de CD43, ya que la metilación de la región 5' del DNA reduce la actividad transcripcional *in vitro*, y la expresión tejido-específica del gen de CD43 puede ser regulada por medio de metilación (Kudo et al., 1995).

La secuencia que se encuentra de -53 a -40 pares de bases del lado 5' del sitio de inicio de la transcripción también participa en la expresión de CD43. Esta secuencia 5'GGGTGGGTGGACGG3' representa una secuencia de promotor poco frecuente para otras moléculas expresadas en linfocitos T (Kudo S et al., 1991). La transcripción a partir de esta región del promotor está mediada por el factor de transcripción Sp1, el cual se une a secuencias repetidas GGGTGG de la región 5' (Kudo et al., 1995).

Asimismo, entre los nucleótidos +18 a +39 del promotor del gen de CD43, existe una secuencia que presenta repeticiones (CCCC) a las cuales se une el factor nuclear PyRo1, favoreciendo la transcripción (Farokhzad et al., 2000). En la línea celular K562 (eritroleucemia humana), los niveles de expresión del mRNA de CD43 están regulados por la ribonucleoproteína nuclear heterogénea K (hnRNP-K) y por Pura α , que actúan juntos para mediar la represión del promotor de CD43 durante la activación celular (Da Silva et al., 2002).

1.2.3.2 Proteólisis

El corte proteolítico constituye un mecanismo para regular la expresión de ciertas moléculas en la superficie celular. La proteólisis de CD43 se ha reportado en neutrófilos activados con el factor de necrosis tumoral α (TNF α) (Campanero et al., 1991), el ionóforo de calcio A23187 (Remold-O'Donnell et al., 1994), fMLP, PMA (Kuijpers et al., 1992; Rieu et al., 1992; Bazil et al., 1993), así como en linfocitos estimulados con anticuerpos anti-CD43 (Kuijpers et al., 1992; Bazil et al., 1993), los cuales podrían mimetizar la acción de los ligandos naturales de CD43. Se ha demostrado que la activación de los neutrófilos induce el corte de CD43 por la elastasa, generando fragmentos solubles de 52 y 40 kDa (Remold-O'Donnell et al., 1995). Además, se ha sugerido que enzimas como la γ -secretasa de líneas celulares de carcinoma de colon (COLO 205), y de leucemia T (Jurkat), podrían ser responsables de la proteólisis de CD43 en estas células (Andersson et al., 2005).

Aunque se desconoce la función que tiene la porción soluble de CD43, es posible especular que podría regular las interacciones entre el receptor anclado a la membrana y sus ligandos (Bazil et al., 1993). Asimismo, dado que el dominio intracelular de CD43 contiene una señal de localización nuclear, se ha sugerido que el corte del dominio extracelular CD43 podría

liberar la señal de localización nuclear y favorecer así la activación de genes blanco (Andersson et al., 2005).

1.2.3.3 Redistribución

El reconocimiento del antígeno por el TCR, induce la exclusión de CD43 del sitio de contacto entre la célula T y la APC, y se ha demostrado que la familia de proteínas adaptadoras del citoesqueleto ezrina-radixina-moesina (ERM) participan en estos eventos, a través de un mecanismo dependiente de PKC θ . Al suceder esto, CD43 migra fuera de la sinapsis inmunológica (Allenspach et al, 2001; Delon et al., 2001; Roumier et al., 2001). La exclusión de la sinapsis inmunológica no implica, sin embargo, que CD43 deje de generar señales intracelulares que modulan de manera positiva o negativa a las del TCR.

1.2.4 Los ligandos

CD43 es una glicoproteína para la cual se han identificado hasta la fecha siete ligandos naturales: ICAM-1, galectina-1, el complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC-I), albúmina sérica humana (HSA), E-selectina, sialoadhesina (Siglec-1) y nucleolina. Curiosamente, hay muy poca o ninguna información acerca de las funciones reguladas cuando CD43 interacciona con cada uno de sus ligandos; asimismo, no se sabe con certeza si las distintas isoformas de CD43 interaccionan con distintos ligandos, y si de esta manera ejercen diferentes funciones.

Al utilizar anticuerpos monoclonales anti-ICAM-1, se demostró que ICAM-1, un marcador de los procesos inflamatorios, es un ligando para CD43. La función principal de ICAM-1 es la adhesión firme, detención y migración transendotelial de los leucocitos, a través de la interacción con sus ligandos, las integrinas LFA-1 (CD11a/CD18) y CR3 (CD11b/CD18)

(Springer et al., 1987; Diamond et al., 1990). Estas últimas participan de manera imprescindible en la regulación de la migración y contactos celulares de los linfocitos. Además, las moléculas CR3 son receptores del fragmento C3b del complemento (Larson et al., 1990). Por medio de la interacción con ICAM-1, CD43 podría regular la adhesión celular además de transducir señales en linfocitos T, linfocitos NK, linfocitos B y monocitos (Rosenstein et al., 1991).

También se reportó que galectina-1, una lectina S, es un ligando para la isoforma de 130 kDa de CD43, así como para CD45, CD7 y CD3. La galectina-1 puede regular la apoptosis de linfocitos T durante su desarrollo en el timo, así como después de ser estimulados en la periferia. (Perillo et al., 1995, 1997; Rabinovich et al., 1997; Stillman et al., 2006; Baum et al., 1995). CD43 regula de manera positiva la muerte de linfocitos T inducida por galectina-1, posiblemente concentrando las moléculas de galectina-1 en la superficie celular y haciéndolas accesibles para su unión con CD7, el cual es indispensable para que ocurra la muerte en respuesta a galectina-1 (Hernandez et al., 2006). Sin embargo, la unión de galectina-1 a CD43 podría influenciar otros procesos celulares como la señalización, la producción de citocinas, la adhesión y el tráfico celular (Chung et al., 2000; Rabinovich et al., 1999; Ford et al., 2003).

Por otra parte, se observó que las moléculas del MHC-I de células presentadoras de antígeno de origen mieloide o linfocitos B tienen la capacidad de interactuar con las moléculas de CD43 de células T en reposo. Esta interacción y el entrecruzamiento de CD43 en los linfocitos T incrementan la adhesividad de CD2 por CD58. A su vez, la unión de CD2 con sus ligandos activa a CD43 y aumenta su afinidad por las moléculas del MHC-I. Se ha

sugerido que este sistema podría jugar un papel importante en la activación de las células T y en la mediación de las funciones efectoras (Stöckl et al., 1996).

Además, se reportó que la isoforma de CD43 de 130 kDa que se expresa en neutrófilos se une específicamente con albúmina sérica humana (HSA). A través de interacciones específicas con HSA, CD43 podría controlar la extensión de los neutrófilos sobre el sustrato. Asimismo, se ha propuesto que la interacción entre HSA y CD43 podría proteger a la molécula de ser degradada de la superficie de los neutrófilos por la elastasa, probablemente inhibiendo la función de los neutrófilos (Nathan et al., 1993).

Recientemente, se reportó que la isoforma de 130 kDa de CD43 es reconocida por la selectina E presente en la superficie de células endoteliales. Esta molécula regula el rodamiento de los leucocitos que expresan ligandos para la selectina E, como los neutrófilos y los linfocitos T activados, sugiriendo entonces que CD43 podría participar en la migración de los linfocitos T activados hacia los sitios de inflamación (Matsumoto et al., 2005).

Asimismo, Siglec-1, un receptor de macrófagos que se une a estructuras de carbohidratos que contienen ácido siálico, se une a CD43. Siglec-1 es mediador en la adhesión de células linfoides y mieloides. Considerando la estructura alargada, así como la longitud de ambas moléculas, es posible que éstas funcionen como mediadores de las interacciones intercelulares a larga distancia, promoviendo los contactos físicos iniciales entre macrófagos y linfocitos T (Van den Berg et al., 2001).

Por último, la nucleolina que se expresa en monocitos y macrófagos permite el reconocimiento de células que se encuentran en etapas tempranas de apoptosis mediante su unión a las cadenas de ácido siálico y polilactosaminoglicanos de CD43 de las células

apoptóticas. Esta unión es inhibida por anticuerpos anti-nucleolina, así como por anticuerpos anti-CD43, lo cual sugiere un papel importante de CD43 en el reconocimiento y la unión de macrófagos con linfocitos T. Aunque la afinidad de la nucleolina por los carbohidratos es baja, se ha sugerido que la agregación de glicoproteínas que ocurre cuando las células inician apoptosis, favorece un aumento en la avidéz de esta unión (Hirano et al., 2005).

En resumen, la multiplicidad de los ligandos, y la gama de funciones que desempeñan, sugiere un rol complejo de CD43 en la regulación de la adhesión celular, y/o la activación celular a través de las interacciones específicas de cada isoforma con sus ligandos.

1.2.5 Las funciones

La abundancia de CD43, su estructura altamente glicosilada, su configuración extendida y el alto grado de conservación de los dominios transmembranal e intracelular que se observa entre especies, sugieren que participa en el establecimiento y la regulación de los contactos entre células, así como en los mecanismos de diferenciación y activación de las células linfoides (revisado en Aguilar-Delfin et al., 2006). Aparentemente, CD43 tiene una doble personalidad, pues ejerce efectos reguladores positivos o negativos, dependiendo del momento en que participe durante la respuesta inmune.

1.2.5.1 Adhesión y anti-adhesión

Por su estructura alargada y su alto contenido de ácido siálico, se sugirió que CD43 confiere una fuerte carga negativa a la membrana celular y que constituye una barrera física que previene las interacciones célula-célula. A través de un impedimento estérico, CD43 podría interferir con la interacción de otras moléculas de adhesión con sus ligandos. Los resultados obtenidos con células transfectadas con el gen humano de CD43 o células

deficientes en la expresión de CD43 (CD43^{-/-}), apoyan esta idea y sugieren que CD43 regula de manera negativa la adhesión de linfocitos T con células blanco o células presentadoras de antígenos (Ardman et al., 1990). Sin embargo, los resultados reportados con el ratón CD43 deficiente no confirman esta hipótesis.

El ratón CD43-deficiente no tiene un fenotipo particular. Se ha reportado en estos animales un defecto parcial de migración hacia los órganos linfoides secundarios, en respuesta a un proceso inflamatorio (Woodman et al., 1998). Más aún, la teoría de la barrera negativa se contrapone con reportes que demuestran que anticuerpos anti-CD43 inhiben el rodamiento de linfocitos T sobre las células epiteliales de vénulas altas, y tampoco explica por qué numerosos anticuerpos anti-CD43 inducen fenómenos de agregación homotípica, independientes de la participación de las integrinas leucocitarias (Cyster et al., 1992; De Smet et al., 1993, Layseca-Espinosa et al., 2003). Asimismo, se ha reportado que un anticuerpo monoclonal anti-CD43 retarda significativamente el establecimiento de diabetes e inhibe específicamente el reclutamiento de linfocitos T a los islotes del páncreas así como a las glándulas salivales y lacrimales, bloqueando los procesos inflamatorios (McEvoy et al., 1997).

Además, los experimentos realizados con líneas de ratones CD43^{-/-} sugieren también, que la carencia de CD43 se traduce en un retraso en la contracción de la respuesta de los linfocitos CD8⁺ citotóxicos, lo cual altera la homeostasis de la respuesta inmune y podría favorecer el establecimiento de padecimientos autoinmunes (Wherry et al., 2004).

En conjunto, estos resultados sugieren que CD43, y las señales intracelulares que se generan en el momento en que interacciona con su(s) ligando(s), participan en los procesos de homing y migración celular, en la regulación de las interacciones célula-célula, así como en el

mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune, y que la regulación de sus funciones podría ser un blanco terapéutico.

1.2.5.2 Apoptosis y anti-apoptosis

Las células de la sangre son renovadas constantemente mediante la proliferación de células progenitoras. Para mantener un equilibrio en el número de células, esta proliferación debe ser compensada con la muerte de otras células. Si este equilibrio se rompe, las células podrían dividirse más rápido de lo que mueren, desarrollando un tumor, o bien, podrían morir más rápido de lo que proliferan, provocando una pérdida celular grave. El desarrollo de un sistema inmune maduro y efectivo depende, por lo tanto, de la regulación positiva y negativa de las vías de apoptosis durante las diferentes etapas de su maduración.

Las moléculas de adhesión regulan las interacciones entre las células progenitoras hematopoyéticas y el estroma de la médula ósea. Estas interacciones son fundamentales en la regulación de la hematopoyesis. CD43 se expresa desde etapas muy tempranas durante el desarrollo de las células hematopoyéticas y se han reportado funciones apoptóticas y antiapoptóticas para este receptor. Se demostró que el anticuerpo MEM-59 que reconoce a CD43 de humano es capaz de inducir apoptosis, lo que sugiere que CD43 podría participar como un regulador negativo en las etapas tempranas de la hematopoyesis (Bazil et al., 1995). En células Jurkat (leucemia T humana), el ligamiento de CD43 con el anticuerpo monoclonal J393 que reconoce la isoforma de 130 kDa, genera también una señal de apoptosis (Brown et al., 1996). Por otra parte, la expresión constitutiva de CD43 en linfocitos B reduce la susceptibilidad de la célula de entrar en arresto en la fase G1 del ciclo celular y retarda los procesos apoptóticos (Dragone et al., 1995; Ostberg et al., 1996; Misawa et al., 1996). Los

mecanismos moleculares a través de los cuales CD43 ejerce esta actividad anti-/pro-apoptótica se desconocen.

1.2.5.3 Activación de linfocitos T

La actividad co-estimuladora de CD43 es independiente de otras moléculas coestimuladoras como CD28 (Sperling et al., 1995). La función de CD43 como molécula co-estimuladora del TCR es aceptada, y se sabe que para ello requiere de su región intracelular (Park et al., 1991; Thurman et al., 1998). La región intracitoplásmica de la proteína es necesaria para la transducción de señales, contiene seis treoninas y once serinas potencialmente fosforilables, pero carece de residuos de tirosina, así como de una actividad catalítica (Remold-O'Donnell et al., 1986; Shelley et al., 1989). El ligamiento de CD43 con diferentes anticuerpos monoclonales induce la generación de diacilglicerol y fosfatos de inositol, movilización de Ca^{2+} y la activación de PKC (Silverman et al., 1989, Del Rio 2004).

En linfocitos T las señales generadas a partir de CD43 han sido estudiadas con cierto detalle. El entrecruzamiento de CD43 en células T humanas, induce la asociación de CD43 con cinasas de la familia Src (Pedraza-Alva et al., 1996). La porción intracelular de CD43 se une a Fyn y Lck a través de su región rica en prolinas, y posteriormente las señales mediadas por CD43 resultan en la fosforilación de la cadena ζ del complejo CD3 (Cruz-Muñoz et al., 2003), así como en la formación de complejos macromoleculares que comprenden a las moléculas adaptadoras Shc, Grb2, SLP-76 y el factor intercambiador de guanina Vav (Pedraza-Alva et al., 1998). Además, señales específicas de CD43 promueven la activación de ERK, el cual parece participar en procesos como la regulación del citoesqueleto de actina (Layseca et al., 2003) y la activación de un circuito de retroalimentación positiva sobre las

señales de Lck (Fierro et al., 2006). Las señales solas de CD43 llevan a la activación de las vías de señalización de PKC y la de calcio, lo cual conduce a la activación de factores de transcripción como AP-1, NFκB y NF-AT (Santana et al., 2000; Del Río et al., 2004). La activación de AP-1 y NFκB resulta de un pico alto y transitorio de calcio, así como de señales provenientes de la vía de las MAPKs (Santana et al., 2000; Mattioli et al., 2004) (Figura 8). Recientemente, se ha demostrado que además de inducir la expresión del gen de IL-2, CD43 induce la expresión de una serie de citocinas muchas de las cuales son pro-inflamatorias (Matteoli et al., 2004; Fierro et al., 2006). Como resultado de las señales intracelulares que genera, CD43 estimula también la expansión clonal, cuando se combinan sus señales con las del TCR (Fierro et al., 2006).

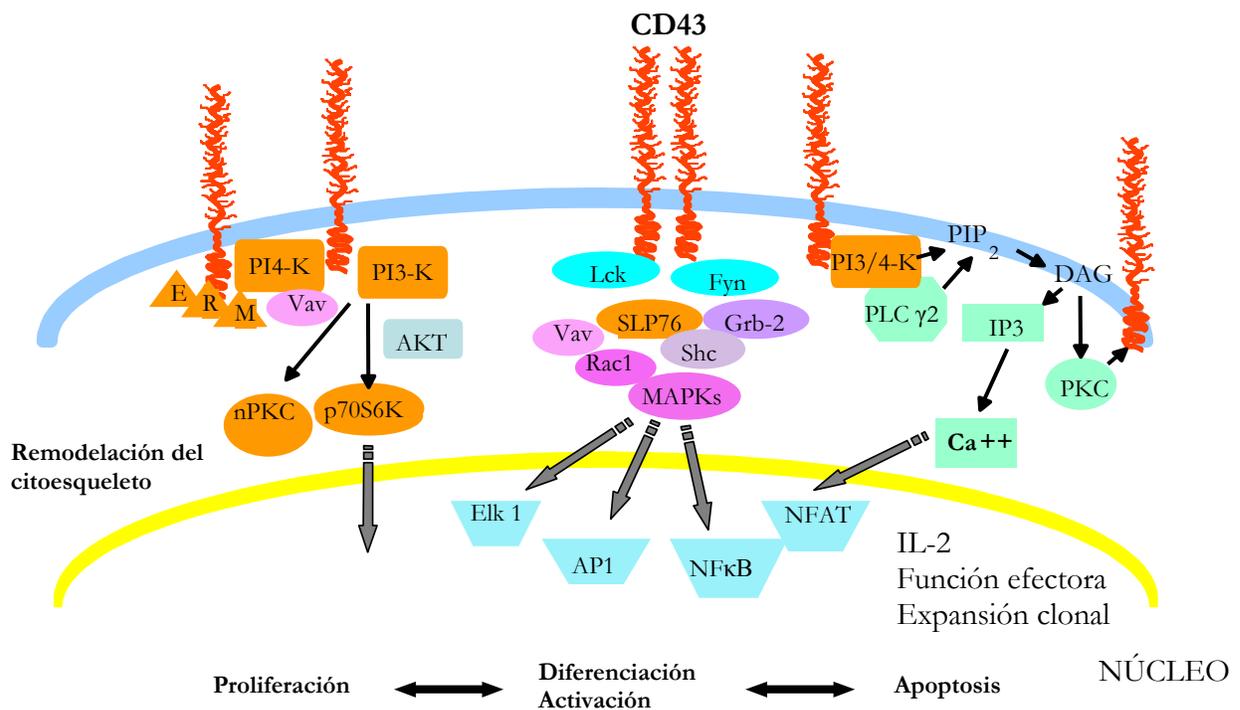


Figura 8. Vías de señalización que se activan en respuesta a las señales generadas por el entrecruzamiento de CD43.

1.2.6 Participación de CD43 en distintas patologías

La importancia funcional de CD43 es puesta en evidencia por su asociación con diversas patologías.

La expresión alterada de CD43 está asociada con el síndrome Wiskott-Aldrich, una inmunodeficiencia ligada al cromosoma X, que involucra una disfunción severa de plaquetas y linfocitos (Wiskott A, 1937; Cooper et al., 1968). El síndrome incluye procesos patológicos crónicos que mejoran con la ablación del bazo (Kenney et al., 1986; Lum et al., 1980). Sin embargo, el síndrome está causado por una mutación en el gen que codifica para la proteína WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein), la cual es una molécula adaptadora que participa activamente en los rearrreglos del citoesqueleto y en la señalización celular (Jin et al., 2004). Sin embargo, hasta el momento no se sabe la relación que existe entre CD43 y WASP en el desarrollo de esta enfermedad.

Por otra parte, todos los pacientes con VIH tienen autoanticuerpos anti-CD43 circulantes durante la fase asintomática de la infección. Se demostró que el entrecruzamiento de CD43 estimula la producción del VIH de manera independiente de CD28, y que esto está mediado por los factores de transcripción NF- κ B y NFAT (Barat et al., 2002), los cuales son activados a través de la vía de señalización de CD43 (Santana et al., 2000). Esto sugiere que CD43 podría modular la expresión de VIH-1 en los linfocitos T. Cabría preguntarse si, *in vivo*, los autoanticuerpos anti-CD43 entrecruzan a CD43 y activan así dichas vías de señalización; alternativamente, se podría pensar que los autoanticuerpos anti-CD43 podrían contribuir a la pérdida de células T que se observa en estos pacientes.

CD43 funciona también como un receptor para el virus de la influenza A en polimorfonucleares. Por medio de ensayos de inmunoprecipitación con la hemaglutinina del virus, se comprobó que la unión es dependiente de ácido siálico y que la hemaglutinina reconoce las dos isoformas de CD43, así como a otras moléculas de la superficie celular ricas en ácido siálico. La unión del virus de la influenza A a los polimorfonucleares estimula la expresión de integrinas y reduce la expresión de CD43, L-selectina y el ligando de P-selectina. Estos resultados sugieren que CD43 puede ser un punto de entrada del virus y/o de desactivación de los neutrófilos, aunque los mismos autores sugieren que existen otros sitios de unión para el virus que también pueden mediar la desactivación de los neutrófilos (Abramson et al., 1995; Rothwell et al., 1994; Hartshorn et al., 1995, 1999).

Por otro lado, se reportó que la porción extracelular de CD43 es indispensable para la unión de los macrófagos con *Mycobacterium avium*, *M. bovis* y *M. tuberculosis* y que las señales de CD43 son necesarias para la producción de TNF- α inducida por la unión de *M. avium*. CD43 podría funcionar como un correceptor que facilita la unión y la internalización de las micobacterias a los macrófagos. (Fratazzi et al., 2000). Igualmente, la transialidasa de *Trypanosoma cruzi* se une y coestimula a los linfocitos T a través de su interacción con CD43 en la superficie de los linfocitos T CD4+, y rescata a las células de la muerte inducida por activación a través de un mecanismo dependiente del entrecruzamiento de CD43 (Todeschini et al., 2002).

Si bien por mucho tiempo se consideró que CD43 era una molécula esencialmente hematopoyética, recientemente se ha descrito que su expresión es frecuente en adenomas y carcinomas de colon. La alta frecuencia de expresión de CD43 en las etapas tempranas del tumor, podría sugerir la participación de esta proteína en el desarrollo del tumor. Se ha

demostrado que la sobreexpresión de CD43 causa la acumulación de p53, una proteína supresora de tumor en la célula (Baeckstrom et al., 1995; Sikut et al., 1997; Kadaja et al., 2004).

Es evidente entonces que CD43 participa en el desarrollo de diversas enfermedades, por lo que es importante entender las funciones que desempeña esta molécula al interactuar con sus ligandos en la regulación de la respuesta inmune.

1.3 Justificación

Hasta el momento, la mayor parte de la información que se tiene acerca de las señales intracelulares que se inducen en respuesta al entrecruzamiento de CD43 proviene de estudios en los cuales se han utilizado anticuerpos monoclonales anti-CD43 para mimetizar la interacción de CD43 con sus ligandos. No se cuenta con un estudio sistemático que evalúe las respuestas que se generan cuando CD43 interactúa con sus ligandos naturales. En este trabajo, nos enfocaremos a estudiar los efectos de la interacción CD43-HSA.

1.3.1 Albúmina

La albúmina sérica humana (HSA) es una proteína de 66.3 kDa. Siendo la proteína más abundante del plasma y de los compartimentos extracelulares, la albúmina regula la presión vascular oncótica, transporta moléculas endógenas como iones, hormonas y vitaminas, neutraliza radicales libres e interacciona con varios fármacos. Sin embargo, se tiene relativamente poca información acerca del papel fisiológico de esta molécula, en particular en los tejidos inflamados.

1.3.1.1 Señalización inducida por albúmina en patologías renales

Uno de los puntos cardinales de la inflamación es el aumento de la permeabilidad vascular, lo cual conlleva al paso de la albúmina a los intersticios y superficies epiteliales de los órganos afectados, tales como el pulmón y los riñones. Actualmente se piensa que después de filtrarse a los tejidos vecinos, la albúmina interactúa con receptores específicos y participa en el desarrollo de patologías pulmonares y renales (Brunskill NJ, 2004). Recientemente se han estudiado los efectos de la albúmina en células renales. Bajo condiciones fisiológicas normales, la capacidad fagocítica de las células renales permite la reabsorción de albúmina, lo que previene la pérdida de grandes cantidades de esta proteína en la orina. En cambio, en enfermedades del glomérulo, la endocitosis de cantidades patológicas de albúmina podría ejercer un efecto tóxico sobre el epitelio tubular (Thomas et al., 1993).

Después de la filtración, la albúmina se une a sus receptores y es endocitada (Figura 9). La megalina y la cubilina, dos proteínas de membrana de las células proximales tubulares del riñón, han sido identificadas como receptores de la albúmina sérica, aunque todavía no se sabe con certeza si éstos son los receptores responsables de las primeras respuestas proinflamatorias que son generadas cuando las células entran en contacto con albúmina (Eddy A., 2004). A raíz de estos estudios se considera actualmente a la albúmina como un mediador clave en la señalización y el fenotipo de los túbulos proximales. Sin embargo, el hecho de que los ratones deficientes para megalina controlen eficientemente sus niveles de proteinuria, sugiere que existen otros receptores para albúmina en el riñón (Brunskill NJ, 2004; Leheste et al., 2003).

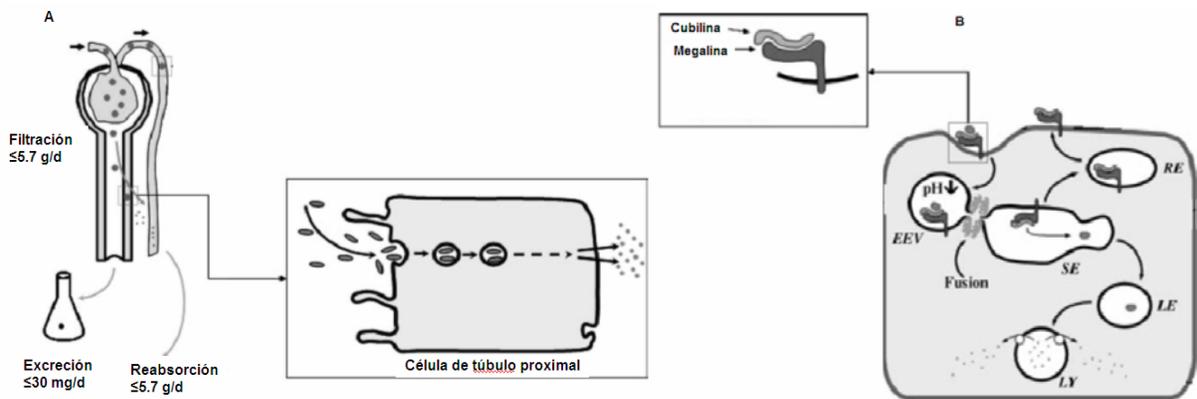


Figura 9. **A**, La albúmina es reabsorbida después de la filtración por medio de endocitosis en el túbulo proximal y es degradada en los lisosomas, generando aminoácidos que son liberados a través de la membrana basolateral de las células. **B**, Vía endocítica de la albúmina con el complejo formado por megalina-cubilina en la membrana apical de la célula. EEV, vesicular endocítica temprana; SE, endosoma clasificador; LE, endosoma tardío; RE, endosoma de reciclaje; LY, lisosoma (Gekle M, 2005).

La endocitosis de la albúmina lleva a la activación de varias cinasas involucradas en señalización intracelular, entre las cuales se encuentran MAPK, PI-3K, JNK y PKC (Christensen et al., 2001; Leheste et al., 2003; Brunskill et al., 1998; Dixon et al., 1999, 2000; Donadelli et al., 2003). Se ha considerado que el exceso de albúmina lleva a la activación de una vía común que involucra la expresión de genes dependientes de NF- κ B, cuyos productos proteicos actúan juntos para orquestar una cascada de eventos que generan señales celulares de inflamación tubulointersticial. Finalmente, estas señales podrían llegar al glomérulo y perpetuar el daño en los tejidos (Tang et al., 2002). A continuación se resumen algunos de los trabajos que han llevado a esta propuesta.

En células epiteliales tubulares, la albúmina induce la fosforilación, activación y translocación al núcleo de ERK en respuesta a la señalización del receptor para EGF (EGFR). Se ha sugerido que la respuesta inicial de las células está mediada por la interacción de albúmina con otros receptores, lo cual induce un aumento en la expresión del EGFR, y por lo tanto apunta

hacia la existencia de un loop de retroalimentación positiva que permitiría incrementar la respuesta de estas células a albúmina (Reich et al., 2005).

La estimulación de vías de señalización por albúmina resulta en la activación de los factores de transcripción STAT y NF- κ B (Nakajima et al., 2004; Wang et al., 1999; Zoja et al., 1998). A su vez, la activación de NF- κ B en respuesta a albúmina depende de la generación de H₂O₂ como segundo mensajero. En las células de los túbulos proximales, la albúmina (10mg/ml) induce rápidamente la producción y la liberación de H₂O₂, donde la PKC participa como regulador de los eventos que llevan a la producción de agentes oxidantes. Asimismo, la generación de especies reactivas de oxígeno en respuesta a albúmina es necesaria para la expresión de genes dependientes de NF- κ B como la quimiocina MCP-1, entre otros (Morigi et al., 2002). El resultado neto de la exposición de células proximales tubulares a albúmina es la producción de un conjunto de quimioattractantes, agentes pro-fibróticos, proteínas de matriz y agentes vasoconstrictivos. Algunos de estos compuestos son MCP-1, RANTES, IL-8, factor de crecimiento derivado de plaquetas, TGF- β , endotelina, fibronectina y colágeno (Donadelli et al., 2003; Wang et al., 1999; Zoja et al., 1998; Wohlfarth et al., 2003; Yard et al., 2001; Burton et al., 1999; Tang et al., 2003). Esta mezcla de sustancias pro-inflamatorias y factores de transcripción, atrae a los macrófagos hacia el intersticio y puede inducir cambios en el crecimiento y la diferenciación de las células tubulares proximales (Yang et al., 2001; Lan HY, 2003). Interesantemente, las señales de CD43 en conjunto con las del TCR son también capaces de inducir la producción de este mismo conjunto de moléculas (Fierro, Sandoval, datos no publicados; Fierro et al., 2006; Mattioli et al., 2004).

1.3.1.2 Señalización inducida por albúmina en otras células

Se han descrito señales inducidas por albúmina en otras estirpes celulares. Por ejemplo, en células de leucemia linfocítica crónica, la acumulación de albúmina en vesículas intracelulares está asociada con la activación de la vía de señalización de Akt y la protección de las células para no sufrir apoptosis (Jones et al., 2003). La albúmina inhibe la apoptosis espontánea inducida por estrés oxidativo, por lo que se ha sugerido que podría funcionar como un antioxidante que protege a las células leucémicas circulantes (Moran et al., 2002). Además, se demostró que la albúmina favorece la proliferación de linfocitos de humano, ratón y rata activados con concavalina A, así como fibroblastos de hámster (Polet & Spieker-Polet, 1975; Spieker-Polet & Polet, 1976). Los linfocitos que se encuentran en procesos de proliferación son capaces de unir, endocitar y secretar albúmina (Torres et al., 1992).

El transporte de albúmina a través de caveolas mediado por gp60, una proteína de unión a albúmina, es un factor que determina la permeabilidad del endotelio (Tiruppathi et al., 1996, 1997; Minshall et al., 2000; Vogel et al., 2001; John et al., 2003). En tejido de pulmón humano se han encontrado proteínas de unión a albúmina que fueron identificadas como mieloperoxidasa (Tiruppathi et al., 2004). Resulta interesante que la secuencia de la cadena pesada de la mieloperoxidasa sea homóloga a la secuencia de unión a albúmina de la proteína M12 de *Streptococcus pyogenes*, una proteína de unión a albúmina que confiere a la bacteria resistencia a la fagocitosis (Retnoningrum et al., 1994).

Las células endoteliales también tienen receptores específicos para albúmina (gp30, gp18) (Schnitzer et al., 1988, 1992) y se ha sugerido que éstos podrían funcionar como mediadores del mantenimiento de la permeabilidad vascular, al estimular los flujos de calcio

en estas células (He et al., 1993). La albúmina podría representar una de las primeras señales antiapoptóticas para las células endoteliales, ya que a concentraciones fisiológicas la albúmina inhibe la apoptosis de células endoteliales de vena umbilical en humanos (Zoellner et al., 1996).

Además, una forma parcialmente glicosilada de albúmina (Glc-HSA) induce la expresión de E-selectina en células endoteliales a través de la activación de Akt, IKK, JNK, NF- κ B y AP-1 (Higai et al., 2006). Esta forma parcialmente glicosilada de albúmina también induce la expresión de MCP-1, aumenta la proliferación celular a través de la activación de ERK y activa señales hacia NF- κ B y AP-1 en células vasculares de músculo liso (Ichiki et al., 2000; Hattori et al., 2001; Mandl-Weber et al., 2001). La Glc-HSA estimula la producción de IL-8 y MCP-1 en células pigmentadas del epitelio retinal a través de vías de señalización que involucran a la PKC, PTK, MAPK, p38, JAK y el factor de transcripción NF- κ B. Más aún, se ha detectado que esta forma glicosilada de la albúmina juega un papel importante en las retinopatías asociadas a la diabetes (Bian et al., 2001).

Por otra parte, la albúmina es capaz de estimular la migración de los eosinófilos, un proceso mediado por PI-3K. Además, causa un incremento en el tamaño de las células, lo cual indicaría la activación de éstas, así como una disminución en la expresión de CD49d y CD49f, lo que llevaría a una reducción de la adhesividad de las células y facilitaría la migración. En la enfermedad, la entrada de plasma a los tejidos inflamados permitiría una concentración más alta de albúmina en los tejidos, lo cual activaría eosinófilos y favorecería su acumulación en estos sitios. La activación de la vía de PI-3K podría inducir quimioquinesis de las células, aunque también podría ser necesaria para la respuesta de eosinófilos a factores quimiotácticos. (Lampinen et al., 2006).

Como se puede observar, los resultados de estos estudios están cambiando la percepción que se tiene de la albúmina como una molécula neutra en procesos patológicos y se le está considerando como un mediador clave en procesos de señalización. Interesantemente, se ha descrito que CD43 es un receptor para la albúmina sérica humana. CD43 es primariamente una proteína propia del sistema inmunológico, aunque se encuentra también expresada en diversos órganos tales como cerebro (Matsuo et al., 1996) e intestino (Amano et al., 2001); asimismo, recientemente se ha descrito su presencia en células tumorales no linfoides (Baeckstrom et al., 1995; Fernandez-Rodriguez et al., 2002; Ziprin et al., 2004; He et al., 1999; Kadaja-Saarepuu et al., 2007).

2. HIPÓTESIS

Si la HSA se une a la superficie de los linfocitos T, se inducirán señales hacia el interior de la célula que favorecerán un cierto tipo de respuesta por parte de la célula.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos generales

Evaluar las señales generadas por la interacción de CD43 con albúmina sérica humana (HSA).

3.2 Objetivos específicos

En linfocitos T:

1. Evaluar la unión de HSA a CD43.
2. Evaluar los efectos fisiológicos que resultan de la unión de HSA a linfocitos T.
3. Evaluar la activación de las vías de MAPKs y PI-3K/Akt.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos

Para realizar los experimentos se utilizaron los siguientes reactivos y soluciones:

- HSA: Albúmina sérica humana delipidada, Sigma
- Isotiocianato de fluoresceína (FITC), Sigma
- MTT: bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolio
- Anticuerpos primarios:

<i>Anticuerpo</i>	<i>Tipo de anticuerpo</i>	<i>Fabricante</i>
Anti-pERK	IgG de ratón	Santa Cruz Biotechnology
Anti-ERK2	IgG de conejo	Santa Cruz Biotechnology
Anti-pAKT (Ser 473)	IgG de ratón	Santa Cruz Biotechnology
Anti-AKT 1/2/3	IgG de conejo	Santa Cruz Biotechnology

- Anticuerpos secundarios:

<i>Anticuerpo</i>	<i>Tipo de anticuerpo</i>	<i>Fabricante</i>
HRP anti-ratón	IgG de cabra	Biomeda Corp.
HRP anti-conejo	IgG de cabra	Biomeda Corp.

- SDS 20% HCl 0.001N
- Solución de FACS: PBS 1x, 0.02% de NaN₃ y 2% de FCS
- TBS-T 1x: 10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl y 0.05% Tween
- Buffer de transferencia: 25 mM Tris, 20 mM Glicina, pH 8.9

- Buffer de lisis:

- 25 mM Hepes pH 7.5
- 0.5% Tritón X-100
- 1.5 mM MgCl₂
- 150 mM NaCl
- 0.2 mM EDTA
- Inhibidores:

<i>Inhibidores</i>	<i>Concentración</i>	<i>Blanco</i>
PMSF	1 mM	Serin proteasas
β-GP	10 mM	Fosfatasas
NaF	10 mM	Fosfatasa ácida
NaVO ₄	200 μM	Tirosin fosfatasa
		Fosfatasa alcalina
Leupeptina	1 mg/ml	Cistein proteasas
		Proteasas tipo tripsina
Antipainá	5 mg/ml	Serin proteasas
		Cistein proteasas
Aprotinina	10 mg/ml	Serin proteasas
DTT	0.5 mM	Reduce puentes disulfuro

- Yoduro de propidio:

- Solución hipotónica: 3.0g Polietilenglicol (8000 g/mol), Sigma
(100 ml)
- 5 ml Solución de yoduro de propidio (1mg/ml), Sigma

360 Unidades Kunitz de Rnasa A, Sigma

1ml Tritón X-100 10% en PBS

94ml Buffer citrato de sodio 4mM, pH 7.2

- Solución Hipertónica: 3.0 g Polietilenglicol (8000 g/mol), Sigma

(100 ml)

5ml Solución de yoduro de propidio (1mg/ml), Sigma

1 ml Tritón X-100 10% en PBS

94ml Cloruro de sodio 400mM

4.2 Células

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando linfocitos T aislados de sangre periférica de donadores sanos, a partir de paquetes leucocitarios de banco de sangre. Las células se obtuvieron por centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque; se realizaron tres lavados con PBS y se resuspendieron en RPMI con 10% de suero fetal para ser sembradas en cajas de Petri durante toda la noche a 37 °C para remover células adherentes. Posteriormente, las células no adherentes se pasaron por columnas de nylon pre-equilibradas con RPMI con 10% de suero fetal, y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, los linfocitos T se eluyeron de las columnas con RPMI con 10% de suero fetal, evaluando su pureza por citometría de flujo.

4.3 Citometría de flujo para evaluar la unión de HSA a linfocitos T

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que permite medir una serie de parámetros celulares evaluando las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se les hace pasar a través de un rayo de luz. Para su

análisis por citometría de flujo, las células deben encontrarse en suspensión en un fluido. Basándose en la difracción de la luz en sentido frontal, se puede evaluar el tamaño de las células que pasan y al medir la reflexión de la luz de manera lateral se evalúa la granularidad o complejidad de éstas. Además de la dispersión de la luz, si previamente a su análisis se coloca a las células en presencia de anticuerpos monoclonales marcados con moléculas fluorescentes, se pueden identificar aquellas células que poseen los antígenos complementarios a los anticuerpos monoclonales usados. El uso de moléculas fluorescentes distintas (distintos colores) permite analizar la presencia de varios marcadores de manera simultánea.

Para evaluar el pegado de HSA a los linfocitos se usaron 1×10^6 células por condición, las cuales fueron sometidas a centrifugación durante 5 minutos a 1200 rpm, eliminando el sobrenadante. Se realizó un lavado con 3 ml de medio RPMI al 2% FCS (RPMI 2%) y se centrifugó bajo las mismas condiciones, desechando el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 50 μ l de RPMI 2% y se incubaron bajo diferentes condiciones: HSA acoplada a FITC y/o anticuerpos anti-CD43. Posteriormente, se realizó otro lavado agregando 3 ml de solución de RPMI 2% y centrifugando 5 minutos a 1200 rpm. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 50 μ l de RPMI 2% y se agregaron 100 μ l de paraformaldehído 2% para fijarlas.

Para obtener el perfil de expresión de CD43, las células se incubaron con un anticuerpo anti-CD43 (L10, 1 μ g/ml) durante 30 minutos a 4°C, se hizo un lavado y se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo (Ramig-Alexa488) durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad, realizando un lavado final, antes de fijar las células.

Todas las muestras se analizaron en el citómetro de flujo (FACSort) añadiendo 500 µl de solución de FACS y se utilizaron los programas Cellquest (Becton Dickinson), para verificar granulosidad, tamaño y fluorescencia, así como Flow Jo para realizar el análisis de los datos.

4.4 Proliferación y apoptosis

4.4.1 Ensayo de proliferación celular con MTT

La evaluación de la proliferación celular aporta información acerca de la respuesta de las células a diversos factores externos. Las sales de tetrazolio que son reducidas por las células, son una herramienta útil para medir la proliferación. El tetrazolio amarillo MTT (bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolio) es reducido por las células metabólicamente activas, en parte debido a la acción de deshidrogenasas, generando equivalentes como el NADH y el NADPH. Como resultado se obtiene formazan de color morado que puede ser solubilizado y posteriormente cuantificado midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro. De esta manera se considera que la intensidad del color obtenido es proporcional al número de células vivas.

El número de células presentes en cada pozo se determina en base a una curva patrón. Los valores de absorbancia de la curva patrón se obtuvieron dentro de un rango de 2×10^4 hasta 4×10^5 células por pozo. Para realizar los ensayos, se utilizaron 5×10^4 células por condición en medio con 10% de suero fetal bovino, por triplicado. Se agregó el estímulo correspondiente (HSA 10 mg/ml o PMA/ionomicina) y se incubaron las células a 37°C durante diferentes períodos de tiempo. Al finalizar el período de incubación se agregaron 20 µl de MTT (5 mg/ml) a las células, manteniendo las placas a 37°C durante 4 horas.

Posteriormente, se agregaron 20 μ l de SDS al 20% en HCl 0.001 N para solubilizar los cristales de formazan y se incubó 4 horas con agitación, en la oscuridad. Finalmente, se midió la absorbancia utilizando un filtro de 570 nm y los datos obtenidos se compararon con los de la curva patrón para determinar el número de células en cada pozo.

4.4.2 Análisis de ciclo celular por tinción con yoduro de propidio

Un método más sensible para medir la proliferación celular consiste en teñir el DNA en el núcleo con yoduro de propidio, el cual se intercala en los ácidos nucleicos de doble cadena. Siendo éste un compuesto fluorescente, es posible evaluar la fluorescencia de las células como una medida de dicha unión. La intensidad de la fluorescencia es proporcional al contenido de DNA en las células, aumentando durante la fase de síntesis y duplicado durante la fase G₂+M. Sin embargo, es necesario utilizar RNasa A para degradar el RNA de doble cadena que también podría incorporar el yoduro de propidio; de esta forma se garantiza que el yoduro de propidio se una sólo al DNA (Current Protocols in Immunology, Volumen 1, National Institutes of Health, 2001). En la Figura 10 se muestra la cantidad de DNA a lo largo del ciclo celular (Fig. 10A), así como el histograma (Fig. 10B) que se espera obtener de la tinción con yoduro de propidio.

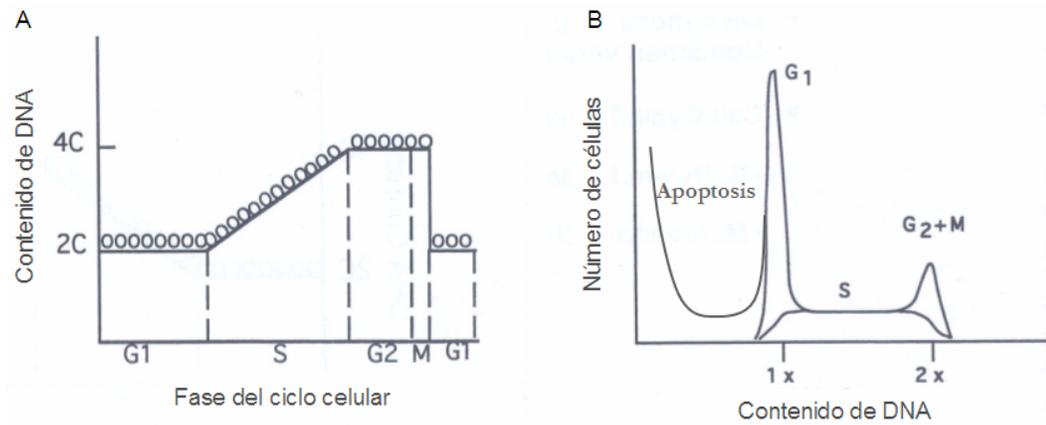


Figura 10. **A**, Cantidad de DNA durante las diferentes fases del ciclo celular. **B**, Histograma de la fluorescencia del DNA en las diferentes fases del ciclo celular (FACS Training Manual).

Para realizar este ensayo, se trabajó con 5×10^4 células por pozo, las cuales se mantuvieron en cultivo en cajas de 96 pozos. Las células permanecieron en medio de cultivo con 10% de suero fetal bovino y se estimularon con HSA 10 mg/ml o con PMA/ionomicina durante diferentes períodos de tiempo. Una vez concluido el tiempo de estimulación, las células se cosecharon y se lavaron dos veces con solución de FACS. Las células se incubaron durante 30 minutos, a 4°C y en la oscuridad, con 100 μl de la solución hipotónica que contiene Tritón X-100 para romper las membranas de las células y generar así una suspensión de núcleos. Posteriormente, se agregaron 100 μl de la solución hipertónica para restablecer la isotonicidad a la solución. Al finalizar, las células se pasaron inmediatamente por el citómetro, sin ser fijadas. Los datos se analizaron con el programa Flow Jo.

4.5 Activación celular

La activación se llevó a cabo incubando a las células (5×10^6 células por condición, en 0.5 ml de RPMI 0% FCS) con HSA en solución (10mg/ml), durante diferentes períodos

de tiempo a 37°C. La reacción se detuvo con PBS frío y se centrifugó durante 10 segundos a 10,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se lisaron las células con 100 µl buffer de lisis durante 30 minutos, a 4 °C, en agitación. Posteriormente, los lisados de las células se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C para eliminar el material insoluble y el sobrenadante se conservó a -20 °C hasta ser analizado.

Los lisados totales se analizaron por SDS-PAGE e inmunoblot, visualizando distintas proteínas por quimioluminiscencia. De una manera general, la técnica que se siguió fue la siguiente: en primer lugar se llevó a cabo una electroforesis con geles de SDS-poliacrilamida al 10%, utilizando el sistema de buffer de Laemmli (Laemmli et al., 1970) y sometiendo los geles a una corriente de 50 mAmp, seguida de la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa usando la cámara para transferencia semi-seca aplicando una corriente de 15 V durante una hora. La membrana con las proteínas se bloqueó con 5% de leche descremada en polvo disuelta en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó la incubación con anticuerpos dirigidos contra las proteínas de interés, diluidos a las concentraciones adecuadas (entre 0.1 y 1.0 µg/ml) en leche descremada 5% en TBS-T. Se realizaron tres lavados con TBS-T y se incubó con el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (1:5000 en la solución de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo y se visualizaron las proteínas en film utilizando la técnica de quimioluminiscencia (ECL, Amersham). Para verificar que las diferencias en los niveles de fosforilación fueran reales, se observó por medio de inmunoblot que los niveles de proteínas control fueran comparables en cada uno de los carriles correspondientes a las distintas condiciones experimentales.

Se evaluó la activación celular al nivel de las MAPKs y PI-3K/Akt. Todos estos experimentos se corrieron en paralelo con células activadas con PMA como controles positivos de activación.

5. RESULTADOS

5.1 Unión de HSA a linfocitos T y neutrófilos

Uno de los puntos esenciales de la hipótesis del proyecto se refiere a la unión de HSA en la superficie de los linfocitos T. Al suceder esto, se podrían desencadenar eventos de señalización hacia el interior de las células. Por lo tanto, resultaba esencial determinar si los linfocitos tienen la capacidad de unir HSA en su superficie, y si esto se lleva a cabo a través de CD43. Para verificar la unión de HSA a las células se realizaron estudios de citometría de flujo incubando a las células durante diferentes períodos de tiempo con HSA acoplada a FITC en dosis de 5 ó 10 mg/ml, dosis a la cual se reportó un efecto anti-apoptótico en linfocitos B de leucemia linfocítica crónica (Moran et al., 2002).

5.1.1 Asociación de HSA a neutrófilos

En primer lugar se evaluó la unión de HSA a neutrófilos, ya que la interacción entre HSA y CD43 fue descrita originalmente en estas células (Nathan et al., 1993). Los neutrófilos extraídos de sangre periférica de un donador sano fueron tratados con HSA-FITC 5 mg/ml. En la Figura 11A se observa que después de 30 minutos de incubación, un 32% de las células unieron HSA-FITC. El perfil de expresión de diversos epítopes de CD43 que se observa generalmente en los neutrófilos se muestra en la Figura 11B, donde se utilizaron diferentes anticuerpos anti-CD43.

Al comparar los perfiles de fluorescencia de las Figuras 11A y 11B se observa que en aquellos neutrófilos positivos para HSA-FITC, la intensidad de la fluorescencia es mucho menor que la de la expresión de CD43, lo que sugiere que, si es que HSA-FITC se asocia

realmente a CD43, sólo una fracción de las moléculas de CD43 que se expresan en la superficie de los neutrófilos tienen la capacidad de interactuar con HSA. Alternativamente, estos resultados indican solamente que HSA se puede unir a la superficie celular, a través de su interacción con alguna otra molécula de la membrana, probablemente menos abundante que CD43.

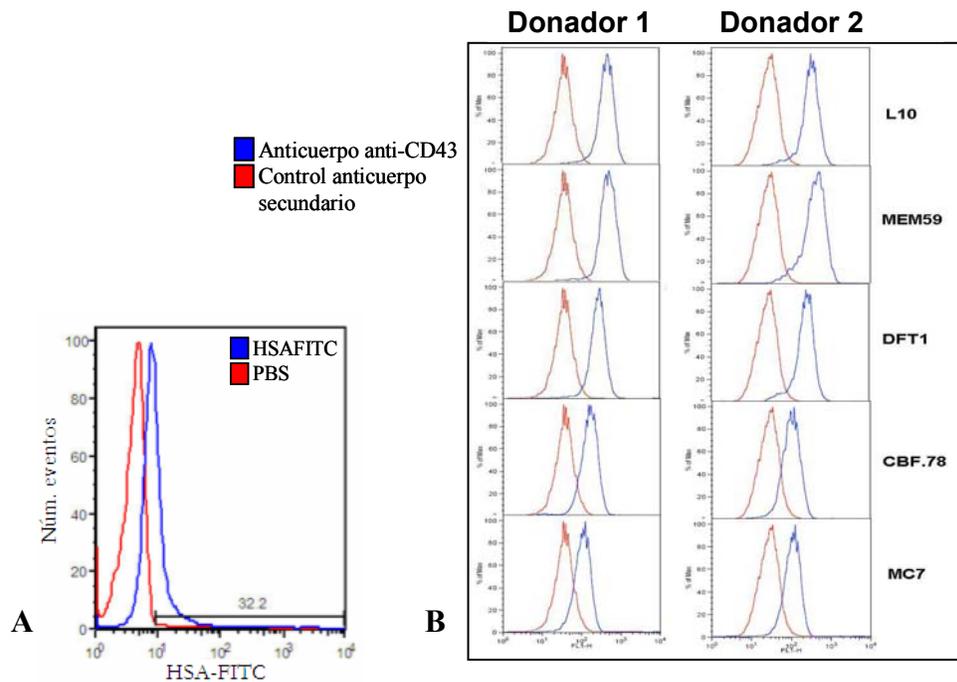


Figura 11. Unión de HSA-FITC a los neutrófilos. **A**, Unión de HSA-FITC 5mg/ml a los 30 min. **B**, Perfil de expresión de diferentes epítopes de CD43 en neutrófilos, reconocidos por diferentes anticuerpos anti-CD43: L10, MEM59, DFT1, CBF.78, MC7 (Samadhi Moreno Campuzano). Los donadores de B son distintos al donador de A.

5.1.2 Asociación de HSA a linfocitos T

En linfocitos T, se observó que la unión de HSA a las células aumenta con el tiempo de incubación, alcanzando los niveles más altos a las 2 horas (datos no mostrados). En la Figura 12 se muestra la unión de HSA-FITC (10 mg/ml) a los linfocitos a las 2 horas, así

como el perfil de expresión de CD43 en estas células (indicado por la unión del anticuerpo anti-CD43, L10). De manera similar a los resultados obtenidos con neutrófilos, el grado de unión de HSAFITC a linfocitos T es menor a la expresión de CD43 en estas células, lo que sugiere que, de asociarse a CD43, HSA no está asociada con todas las moléculas de CD43.

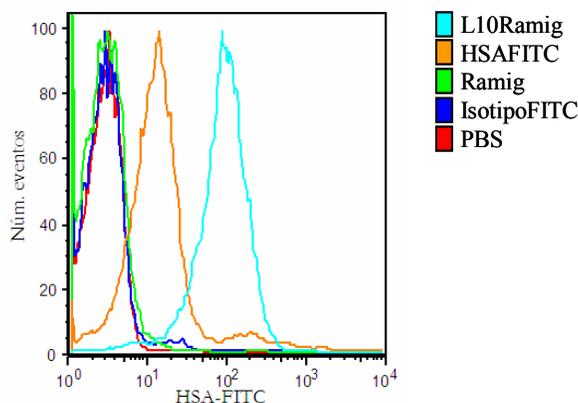


Figura 12. Unión de HSA-FITC 10mg/ml y perfil de expresión de CD43 en linfocitos T. El resultado que se muestra en la figura es representativo de tres experimentos realizados con donadores independientes.

Habiendo observado la unión de HSA a los linfocitos T, y dado que la HSA se ha descrito como un ligando de CD43, se evaluó la posibilidad de que la unión de HSA pudiera verse comprometida por un anticuerpo anti-CD43 que compitiera con HSA para unirse al mismo epítoto. Se evaluó por una parte la unión de HSA-FITC en presencia de L10 (un anticuerpo monoclonal anti-CD43), y por otra parte la unión de L10 en presencia de HSA no marcada. En la Figura 13A se observa una disminución importante en la unión de HSA-FITC cuando las células se incuban por 30 minutos con el anticuerpo L10 después de la incubación con HSA-FITC durante 2 horas, lo cual sugiere que, debido a su alta afinidad por el ligando, el anticuerpo es capaz de desplazar a la HSA que ya se ha unido a

la superficie celular, presumiblemente a CD43. En la Figura 13B se observa que la unión del anticuerpo L10 a la superficie celular es menor cuando las células se preincubaban durante dos horas con HSA no marcada, lo cual podría deberse a que la albúmina está ocupando sitios en las moléculas de CD43 que también son reconocidos por el anticuerpo L10 y por lo tanto impide una unión completa del anticuerpo.

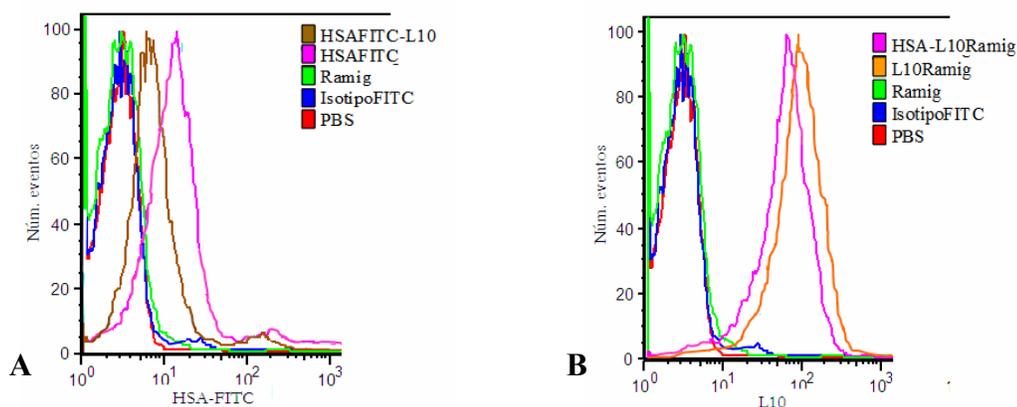


Figura 13. Ensayos de competencia entre HSA 10mg/ml y L10 en linfocitos T. **A**, Unión de HSA-FITC. **B**, Unión de L10.

Asimismo, la unión de HSA-FITC a linfocitos T disminuyó 50% en células que fueron incubadas simultáneamente con un exceso de HSA no marcada (100 mg/ml), sugiriendo una competencia entre las moléculas de HSA para unirse a su receptor (Figura 14A y 15A). Al igual que el anticuerpo L10, el anticuerpo anti-CD43 MEM59 desplazó en un 40% la unión de HSA en células preincubadas con HSA-FITC durante dos horas. De manera recíproca, las células que fueron preincubadas con HSA no marcada mostraron una disminución del 30% en la unión del anticuerpo MEM59. En la Figura 14 se muestra la reducción en el grado de unión de HSA-FITC (A) y de MEM59 (B) que resulta de las diferentes condiciones de competencia.

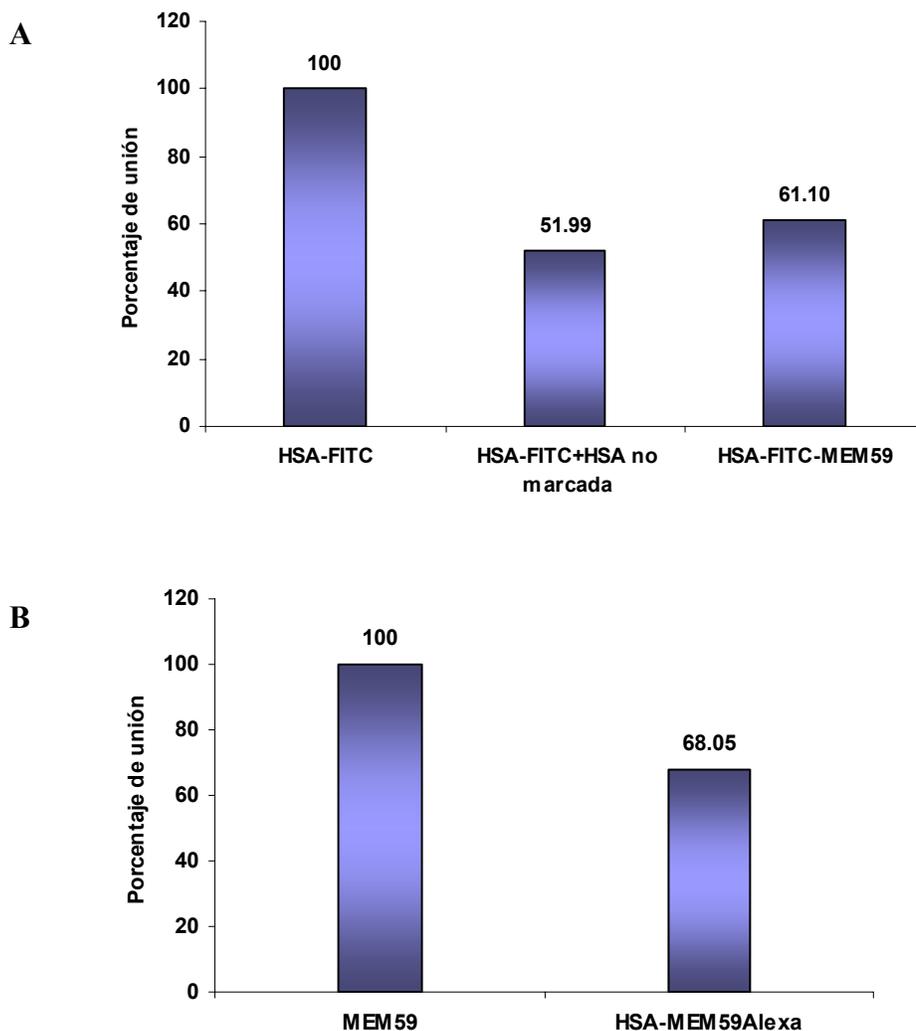


Figura 14. Competencia de HSA-FITC 10mg/ml con HSA no marcada y con MEM59 en linfocitos T. **A**, Unión de HSA-FITC sola y competida con HSA no marcada, así como con el anticuerpo MEM59. **B**, Unión de MEM59 sola y competida con HSA no marcada.

Para determinar si la unión de HSA-FITC a las células era una propiedad específica de la albúmina humana, se evaluó la unión de HSA-FITC en presencia de suero fetal bovino no marcado (FCS), así como la unión de FCS marcado con FITC (FCS-FITC) en presencia de HSA no marcada. Como se observa en la Figura 15A, la unión de HSA-FITC se redujo solo

por HSA no marcada, pero no así por FCS. Sin embargo, la unión de FCS-FITC a los linfocitos que se observa en la Figura 15B fue inhibida en un 80% por la presencia de HSA no marcada, lo que sugiere que los linfocitos T de humano unen preferentemente albúmina humana y no albúmina bovina.

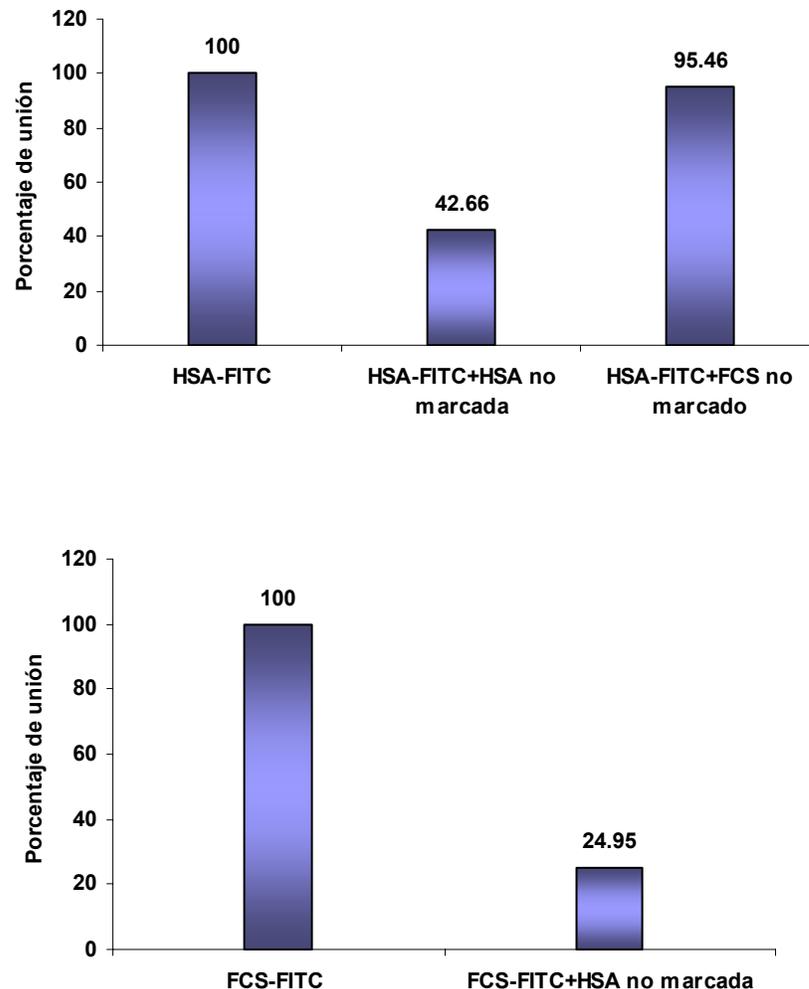


Figura 15. Competencia de HSA-FITC 10mg/ml con HSA no marcada y con FCS en linfocitos T. **A**, Unión de HSA-FITC sola y competitiva con HSA no marcada y con FCS no marcado. **B**, Unión de FCS-FITC sola y competitiva con HSA no marcada.

Estos resultados sugieren una vez más que HSA interactúa con alguna molécula de la superficie celular de neutrófilos y linfocitos T. La competencia entre HSA y dos distintos anticuerpos anti-CD43 para unirse a linfocitos T, sugiere que la unión de HSA a las células podría ocurrir a través de CD43.

5.2 Evaluación de la proliferación celular

5.2.1 Ensayo de proliferación celular con MTT

Dado que las señales de CD43 preparan a las células para entrar a procesos de proliferación, y considerando que HSA podría unirse a la superficie celular, presumiblemente a CD43, se evaluó la capacidad de HSA de inducir la proliferación celular de linfocitos T aislados de sangre periférica de donadores de banco de sangre. Para todos los ensayos se utilizó una concentración de HSA de 10 mg/ml, concentración a la cual se observó la unión de HSA a las células. Los linfocitos fueron estimulados con HSA o con PMA (50ng/ml)-ionomicina (0.5 μ M) como control positivo, durante diferentes períodos de tiempo.

En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de MTT para medir la proliferación celular, donde se considera que los valores de absorbancia son directamente proporcionales al número de células en cada condición. El estímulo de linfocitos con PMA-ionomicina indujo la proliferación de las células como se esperaba, detectando los valores más elevados de absorbancia a las 120 horas de estimulación. Las células que no fueron estimuladas, pero que permanecieron en cultivo, presentaron valores de absorbancia que se redujeron durante el transcurso del experimento, lo cual podría deberse a una reducción en

la viabilidad celular hacia el final del experimento. Sin embargo, las células que fueron tratadas con HSA mostraron una duplicación de los valores de absorbancia a partir de las 24 horas, después de lo cual los valores se mantuvieron constantes lo largo de los 5 días. Estos resultados sugieren que las células podrían estar proliferando en respuesta a HSA, o bien, que la viabilidad de los linfocitos es mayor cuando se incuban en presencia de HSA por tiempos prolongados de cultivo. Como era de esperarse, en presencia de PMA-ionomicina, la absorbancia es mucho mayor, reflejando una decidida proliferación celular en respuesta a este estímulo.

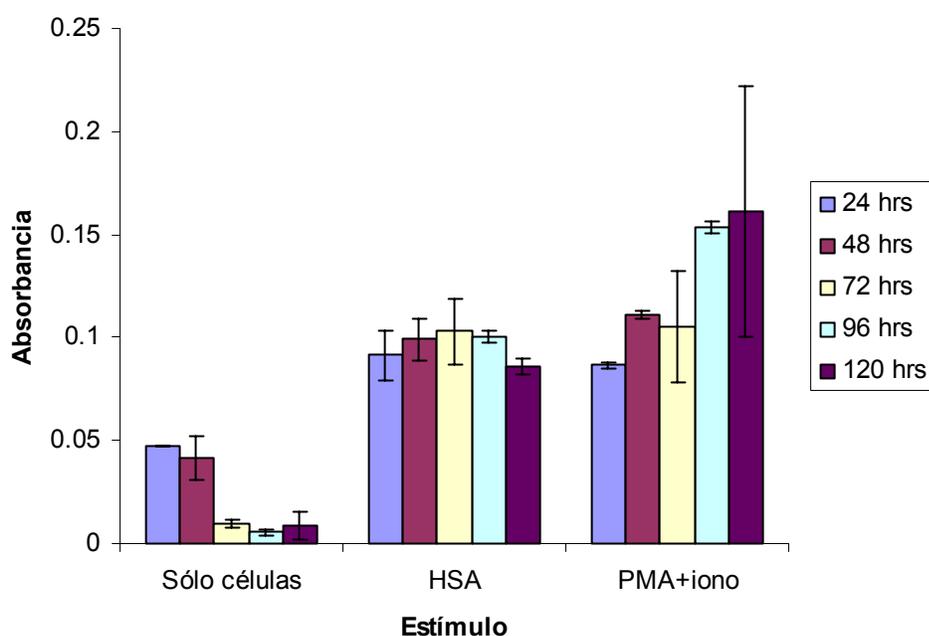


Figura 16. Proliferación de linfocitos T en respuesta al estímulo con HSA 10mg/ml. El resultado que se muestra en la figura es representativo de tres experimentos realizados con donadores independientes.

5.2.2 Análisis de ciclo celular por tinción con yoduro de propidio

La capacidad proliferativa de las células en respuesta a los HSA se midió también con una tinción con yoduro de propidio, lo cual permite evaluar, al medir la cantidad de DNA, la entrada de las células al ciclo celular. En la Figura 17 se muestra el perfil de tinción de yoduro de propidio de los linfocitos que fueron incubados en presencia de HSA o PMA-ionomicina por diferentes períodos de tiempo.

Un estímulo fuerte como PMA-ionomicina produce señales intracelulares que inducen a las células a entrar en el ciclo celular. Como se puede observar en la Figura 17A, a partir de las 72 horas se detectó una proporción importante de células en fase de síntesis de DNA, y el número de células en fase G2-M aumentó más aún a las 96 y 120 horas. Sin embargo, ante un estímulo tan fuerte, la proliferación celular está también asociada a la muerte de un gran número de células, como se observa en la misma figura. Mientras más pasó el tiempo después del estímulo inicial, más muerte celular por apoptosis se observó.

En la población de células que no fueron estimuladas, pero que se mantuvieron en cultivo por los mismos períodos de tiempo, si bien no se observó proliferación, como era de esperarse, sí se observó la muerte de una proporción importante de células (muerte por negligencia) (Figura 17B). En cambio, la adición de HSA, al parecer previno esta muerte por negligencia, aunque bajo este esquema experimental, no pudimos detectar células en fase de síntesis de DNA, y un número muy reducido de células en fase G2-M.

Este resultado sugiere que el efecto positivo que detectamos a nivel de la reducción de MTT, se debe más bien a que la HSA podría proteger a las células para no sufrir

apoptosis en tiempos prolongados de cultivo, es decir, favorecería la supervivencia y no la proliferación de los linfocitos.

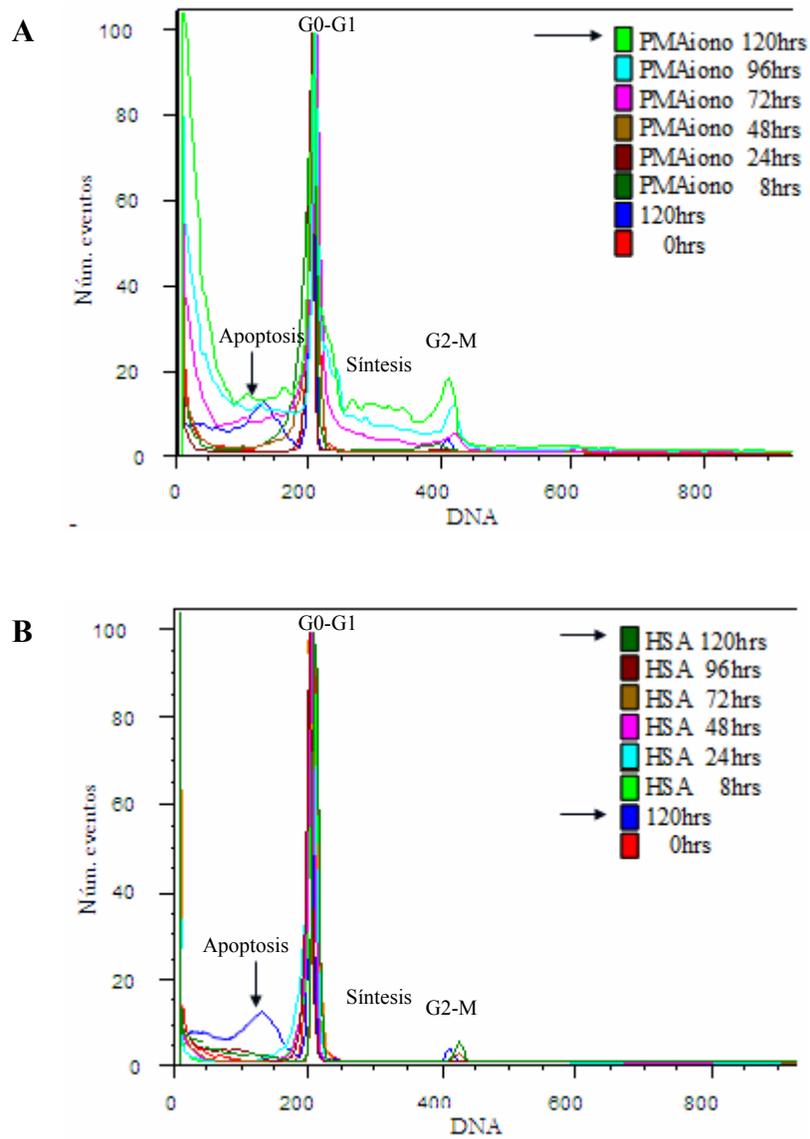


Figura 17. Tinción con yoduro de propidio para evaluar la proliferación de linfocitos T en respuesta al estímulo con PMA-ionomicina (**A**) y con HSA 10mg/ml (**B**). El resultado que se muestra en la figura es representativo de tres experimentos realizados con donadores independientes.

5.3 Activación de vías de señalización en respuesta a HSA

Los resultados descritos en las secciones anteriores sugieren que HSA, más que inducir una proliferación celular, tiene un efecto antiapoptótico en linfocitos T. En función de estos resultados, se evaluó la activación de dos cinasas que participan en vías de señalización importantes para la sobrevivencia de las células: ERK y Akt, las cuales también son activadas en respuesta a las señales de CD43. La vía de las MAPK y la de PI-3K/Akt favorecen la sobrevivencia de las células mediante la activación de señales de sobrevivencia y proliferación celular como ERK, Akt, mTOR, Bcl-2 y Bcl-xL, así como por la regulación negativa de factores apoptóticos como Bad, Bax y GSK-3, entre otros (Scheid et al., 1999; Datta et al., 1997; Brunet et al., 1996).

5.3.1 Efecto de HSA sobre la vía de las MAPK

Para evaluar la activación de ERK se buscó la forma fosforilada de esta cinasa (pERK). Los linfocitos T se incubaron durante 3 horas en medio de cultivo RPMI sin suero (0% FCS) para eliminar la albúmina bovina del medio de cultivo y reducir la actividad de las células a su estado basal. Con el propósito de disminuir posibles condiciones de estrés para las células durante la activación, las células (5×10^6 células por condición, en 0.5 ml de RPMI 0% FCS) se activaron con HSA (10 mg/ml) en placas de 48 pozos, manteniéndolas en la incubadora a 37°C, 5% CO₂, durante diferentes períodos de tiempo, permitiendo un intercambio gaseoso adecuado. Como se observa en la Figura 18, el tratamiento de las células con HSA indujo la fosforilación de ERK cuando las células fueron estimuladas por tiempos largos, de 24 horas, mientras que en las células que no fueron expuestas a HSA (RPMI 0% FCS) pero que estuvieron en las mismas condiciones de cultivo, no se observó

que ERK estuviera activo. El estímulo con PMA representa un control positivo, el cual funcionó como se esperaba. El blot anti-ERK deja ver que en todos los carriles se colocaron cantidades equivalentes de proteína, por lo que las diferencias a nivel de pERK son reales.

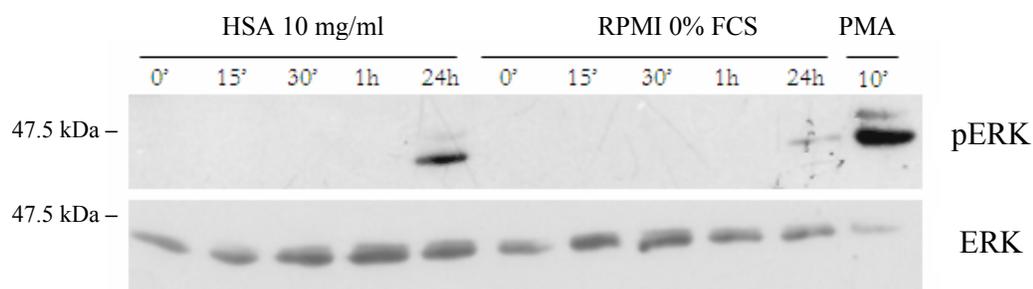


Figura 18. Fosforilación de ERK en respuesta a HSA 10 mg/ml. El resultado que se muestra en la figura es representativo de tres experimentos realizados con donadores independientes.

5.3.2 Efecto de HSA sobre la vía de PI-3K/Akt

Debido a que la vía de PI-3K/Akt tiene un papel muy importante en la regulación de la sobrevivencia y la muerte de las células, se evaluó la activación de Akt en respuesta al estímulo con HSA en linfocitos T. Para ello se realizaron experimentos estimulando a las células con HSA 10mg/ml durante diferentes períodos de tiempo en condiciones semejantes a las descritas para pERK, y se buscó la forma fosforilada de esta cinasa (pAkt) por medio de inmunoblot. En la Figura 19 se muestra que la fosforilación de Akt en respuesta a HSA fue inmediata y se mantuvo constante durante las 24 horas de estimulación. A diferencia de las células que fueron tratadas con HSA, en los linfocitos que se mantuvieron en cultivo durante 24 horas sin ningún estímulo (RPMI 0% FCS) no se detectó fosforilación de Akt. En el blot anti-ERK se muestra que la cantidad de proteína en las diferentes condiciones es

equivalente, y por lo tanto las diferencias que se observaron en la fosforilación de Akt reflejan la respuesta a los estímulos a los que las células fueron sometidas.

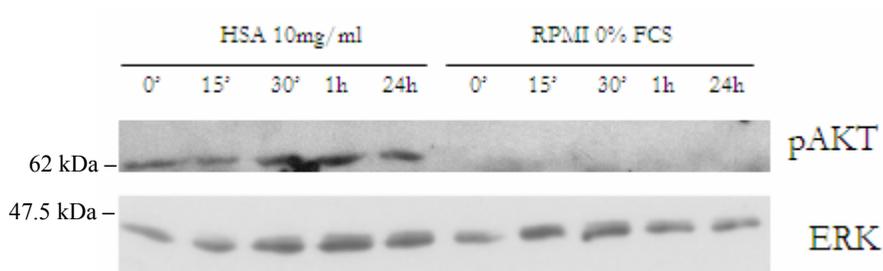


Figura 19. Fosforilación de Akt1 en respuesta al HSA 10mg/ml. El resultado que se muestra en la figura es representativo de tres experimentos realizados con donadores independientes.

Resultados previos del laboratorio mostraron que las señales que se generan a través del entrecruzamiento de CD43 con anticuerpos anti-CD43 conducen a la activación de PI-3K (Layseca et al., 2003). Partiendo de este antecedente, se evaluó la fosforilación de Akt en linfocitos tratados con HSA, así como en células estimuladas con el anticuerpo anti-CD43, L10. En la Figura 20 se muestra que la fosforilación de Akt se indujo en las células que fueron estimuladas con HSA 10 mg/ml durante 15 minutos, a diferencia de aquellas que no recibieron estímulo (RPMI 0% FCS), y en las cuales no se observó fosforilación de esta cinasa, como se esperaba. Asimismo, se muestra la fosforilación de Akt en respuesta a las señales generadas por el entrecruzamiento de CD43 con el anticuerpo L10 durante 15 minutos, mientras que en las células que permanecieron 15 minutos con el anticuerpo entrecruzador (anti-IgG₁) no se observó fosforilación. En el blot anti-Akt se muestran cantidades equivalentes de esta proteína en las diferentes condiciones, lo cual indica que los

diferentes grados de fosforilación de Akt se deben a una respuesta de las células ante los diferentes estímulos.

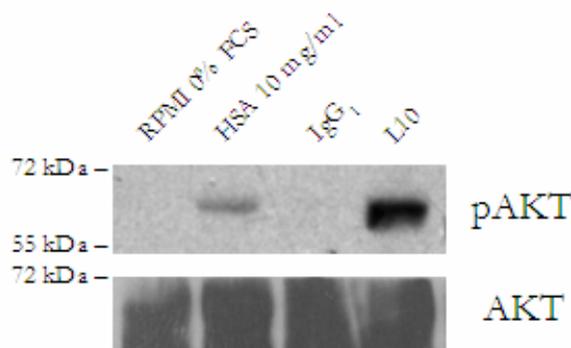


Figura 20. Fosforilación de Akt1 en respuesta al estímulo con HSA 10mg/ml y a L10 durante 15 minutos. El resultado que se muestra en la figura es representativo de tres experimentos realizados con donadores independientes.

Estos resultados confirman que la estimulación de los linfocitos con HSA induce señales hacia el interior de la célula que conducen a la activación de ERK y Akt. Resulta interesante que las señales generadas a partir del entrecruzamiento de CD43 con el anticuerpo monoclonal L10, también inducen la fosforilación de Akt, lo cual permite especular que la unión de HSA podría inducir la fosforilación de esta cinasa a través de un mecanismo dependiente de su asociación con CD43, así como de las señales generadas a partir de este receptor.

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La sobrevivencia y/o la proliferación de los linfocitos, es decir, la homeostasis, es necesaria para la persistencia de la memoria inmunológica y para mantener un repertorio de linfocitos vírgenes que puedan responder a diferentes antígenos (Jaleco et al., 2003). Las señales específicas que regulan la homeostasis de los linfocitos T se desconocen en su gran mayoría, pero se piensa que dependen del estado de activación y diferenciación de los linfocitos T (Tanchot et al., 1997). Se considera que los linfocitos maduros tienen un tiempo de vida relativamente largo, pero la longevidad de cada clona varía de acuerdo a su habilidad para competir por señales basales que promuevan su viabilidad (Cancro MP, comunicación personal). Se ha sugerido que las células podrían recibir señales de coestimulación para el TCR a través de otros receptores, y/o una señal pasiva de sobrevivencia (Tan et al., 2001; Takeda et al., 1996; Tanchot et al., 1997; Schluns et al., 2000; Mullbacher A, 1994; Murali-Krishna et al., 1999; Hu et al., 2001).

Como se mencionó anteriormente, CD43 puede funcionar como un co-receptor en los linfocitos T proporcionando señales de coestimulación para el TCR, aunque es capaz de inducir señales hacia el interior de la célula de manera independiente del TCR al unirse con sus ligandos (Sperling et al., 1995; Pedraza-Alva et al., 1996, 1998; Cruz-Muñoz et al., 2003; Layseca et al., 2003; Fierro et al., 2006; Santana et al., 2000; Del Río et al., 2004; Mattioli et al., 2004). Considerando la abundancia de CD43 en la superficie de los linfocitos T, así como la abundancia de uno de sus ligandos, la albúmina sérica humana, estudiamos los efectos en linfocitos T que resultan de esta interacción.

En primer lugar evaluamos la unión de HSA a neutrófilos y linfocitos T. En ambos casos, encontramos que HSA-FITC era capaz de asociarse a la superficie celular. En linfocitos T, cambios en la intensidad de fluorescencia que se observaron en los ensayos de competencia con anticuerpos anti-CD43, sugiere que la HSA compite con los anticuerpos por un sitio de unión en CD43, y que la HSA que se encuentra unida al receptor puede ser desplazada por los anticuerpos anti-CD43.

Como se mencionó anteriormente, las señales de CD43 conducen a la activación de vías de señalización en las que participan las MAPK, PKC y la vía de calcio, lo cual induce la activación de factores de transcripción que estimulan la expresión de genes que son necesarios para la expansión clonal de los linfocitos. Por lo tanto, considerando que CD43 genera señales que preparan a las células para la proliferación, se evaluó esta respuesta en linfocitos T estimulados con HSA 10 mg/ml. La reducción del MTT mide la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa; por lo tanto, la formación de cristales de formazán depende de la actividad mitocondrial, y por consiguiente, refleja el nivel del metabolismo de una célula. El hecho de que los linfocitos tratados con HSA mostraran una reducción significativa del MTT desde las 24 horas y hasta los 5 días, sugiere que las células mantuvieron un metabolismo constante y activo cuando estaban en presencia de HSA, a diferencia de los linfocitos que permanecieron en el medio de cultivo sin ningún estímulo adicional, y por lo tanto que tuviera un efecto positivo sobre la sobrevivencia de los linfocitos, más que sobre su entrada al ciclo celular. La tinción con yoduro de propidio del DNA de linfocitos T, confirmó que las células que fueron tratadas con HSA durante cinco días no sufrieron apoptosis, a diferencia de aquellas que permanecieron sin estímulo y las que se activaron con PMA-ionomicina. Esta prevención de muerte parece ser una respuesta

específica a HSA, ya que las células sin estímulo que se mantuvieron en medio de cultivo con albúmina sérica bovina (BSA), procedente del suero fetal bovino, comenzaron a sufrir apoptosis en tiempos prolongados de cultivo. Estos datos en conjunto sugieren que HSA participa en mantener la viabilidad celular, previniendo la apoptosis de linfocitos T en reposo.

La inhibición de apoptosis por tratamientos con HSA ya ha sido reportada. La unión de HSA a linfocitos B de pacientes con leucemia linfocítica crónica confiere a las células una protección contra la apoptosis inducida por tratamientos con droga o radiación, lo cual está asociado a la activación de Akt en respuesta a HSA (Jones et al., 2003). Sin embargo, existe también la posibilidad de que la protección contra apoptosis inducida por droga se deba a la unión de albúmina a la droga. Nuestros resultados son también congruentes con estudios realizados en células endoteliales humanas de cordón umbilical, donde se observó que las células tratadas con HSA no sufren apoptosis (Zoellner et al., 1996).

Con el propósito de indagar en las señales inducidas por la unión de HSA que permitirían prevenir la apoptosis de linfocitos T, se evaluaron moléculas clave en vías de señalización anti-apoptóticas. Las vías de ERK y de PI-3K/Akt, las cuales pueden ser activadas por las señales de CD43, favorecen la sobrevivencia de las células mediante la activación de señales de sobrevivencia y proliferación celular como mTOR, Bcl-2, Bcl-xL, así como por la regulación negativa de factores apoptóticos como Bad (Scheid et al., 1999; Datta et al., 1997; Brunet et al., 1996) (Figura 21). Encontramos que en linfocitos T tratados con HSA, ERK 1 y 2 se fosforila a tiempos largos de estimulación, mientras que la fosforilación de Akt se inicia desde tiempos cortos y se mantiene durante al menos 18

horas, lo que sugiere que la unión de HSA mantiene activas ambas vías de señalización, y a través de ellas, previene la apoptosis de las células.

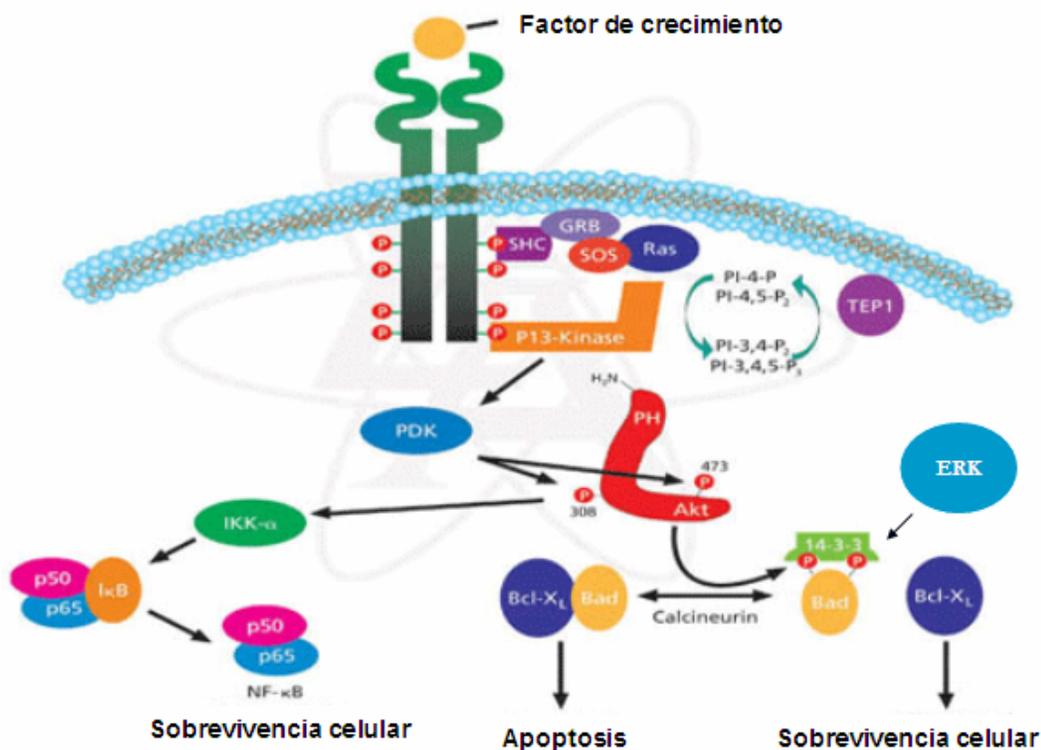


Figura 21. Regulación de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas por Akt y ERK. (http://www.sigmaldrich.com/img/assets/6460/akt_sig.gif)

6.1 Conclusiones

Nuestros resultados muestran que la HSA se une a linfocitos T y es capaz de influenciar su actividad. Los datos sugieren que la HSA se une a CD43 en la superficie de las células y apuntan hacia un papel positivo de HSA en la supervivencia de los linfocitos T en reposo. En linfocitos T no activados, observamos que el tratamiento con HSA previene la apoptosis espontánea de las células, e induce la activación de vías de señalización en las que participa la MAPK ERK, así como la cinasa Akt, lo cual coincide con reportes previos

que sugieren un efecto anti-apoptótico de la albúmina en otros tipos celulares con la participación de estas vías de señalización. En conjunto, los datos obtenidos hasta el momento sugieren un papel importante de HSA en el mantenimiento del repertorio de linfocitos circulantes.

6.2 Perspectivas

Hemos observado que la unión de HSA a la superficie de neutrófilos y linfocitos T puede ser competida con anticuerpos anti-CD43, lo que sugiere que la asociación de HSA a las células podría ocurrir a través de su unión con CD43. En linfocitos T, la HSA previene la muerte celular por negligencia en tiempos prolongados de cultivo, mediante la inducción de señales intracelulares que conducen a la activación de ERK y Akt. Sin embargo, aún hace falta determinar si estos efectos están realmente mediados por CD43. Hemos comenzado a abordar este punto utilizando células Jurkat (una leucemia T CD43+), y JLN (células derivadas de Jurkat, y que no expresan CD43). En un experimento piloto con células JLN no se observó fosforilación de ERK en respuesta a HSA, lo cual es congruente con la hipótesis de que la albúmina ejerce su efecto en los linfocitos a través de CD43. Posteriormente, será interesante evaluar la activación de ERK en células JLN retransfectadas con CD43 WT y con mutantes de CD43 que carecen de diferentes porciones del dominio intracelular, lo cual permitiría identificar la región del dominio intracelular que es responsable de la transducción de señales en respuesta a HSA.

De manera paralela, nos proponemos utilizar RNA de interferencia (RNAi) para silenciar la expresión de CD43 en linfocitos T y en células Jurkat con el propósito de determinar si los efectos de HSA están mediados por CD43. En experimentos preliminares

en células Jurkat, una ligera disminución en la expresión de CD43 correlaciona con una disminución de la unión de HSA-FITC a las células, lo cual podría sugerir que HSA se une a estas células a través de CD43. El silenciamiento de CD43 en linfocitos T con RNAi nos permitirá determinar si la unión de HSA a las células, así como sus efectos en apoptosis y señalización, se deben a la interacción de HSA con CD43. Asimismo, será necesario confirmar estos resultados, evaluando la capacidad de distintos anticuerpos anti-CD43, que reconocen diferentes epítopes de la molécula, de competir con el pegado de HSA-FITC a la superficie celular. Asimismo, estos experimentos permitirán determinar si HSA se une preferentemente a una de las isoformas de CD43. Para estos ensayos se vuelve imprescindible un anticuerpo control que no reconozca a CD43, pero que reconozca a otra molécula de superficie.

Para confirmar si el efecto de HSA se debe a la inhibición de apoptosis, será necesario evaluar la participación de moléculas que regulan positiva y negativamente la apoptosis. Las vías de MAPK (Raf/MEK/ERK) y PI-3K/Akt son un punto de convergencia de las señales de supervivencia celular, ambas vías llevan a la fosforilación e inactivación de proteínas proapoptóticas como Bad. Además, Akt activa proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL, IAP y mTOR, y se ha sugerido que Bcl-2 podría estar involucrada en la sobrevivencia de linfocitos T vírgenes y de memoria (Schluns et al., 2000). En experimentos futuros será interesante determinar si las señales de HSA favorecen la fosforilación de Bad como resultado de la activación de ERK y Akt, y/o el aumento en la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL. Estos experimentos habrán de realizarse también con HSA desnaturalizada.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002. *Inmunología Celular y Molecular*. 4a. Edición. McGraw-Hill. España.
- Abramson JS, Hudnor HR. 1995. *Blood* 85(6): 1615.
- Agrawal B, Gendler SJ, Longenecker BM. 1998. *Mol Med Today* 4: 397.
- Aguilar-Delfin I, Fierro NA, Rosenstein Y. UCSD-Nature Molecule Pages. doi: 10.1038/mp.a000565.01
<<http://www.signaling-gateway.org/molecule/query?afcsid=A000565>>
- Allenspach EJ, Cullinan P, Tong J, Tang Q, Tesciuba AG, Cannon JL, Takahashi SM, Morgan R, Burkhardt JK, Sperling AI. 2001. *Immunity* 15: 739.
- Amano J, Morimoto C, Irimura T. 2001. *Microbes Infect* 3(9): 723.
- Andersson CX, Fernandez-Rodriguez J, Laos S, Baeckström D, Haass C, Hansson GC. 2005. *Biochem J* 387: 377.
- Andersson CX, Fernandez-Rodriguez J, Laos S, Sikut R, Sikut A, Baeckström D, Hansson GC. 2004. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 12.
- Ardman B, Sikorski MA, Settles M, Staunton DE. 1990. *J Exp Med* 172: 1151.
- Baeckstrom D, Zhang K, Asker N, Ruetschi U, Ek M, Hansson GC. 1995. *J Biol Chem* 270: 13688.
- Baeckstrom D, Zhang K, Asker N, Ruetschi U, Ek M, Hansson GC. 1995. *J Biol Chem* 270(23): 13688.
- Barat C, Tremblay MJ. 2002. *J Biol Chem* 277(32): 28714.
- Baum LG, Pang M, Perillo NL, Wu T, Delegeane A, Uittenbogaart CH, Fukuda M, Selhamer J. 1995. *J Exp Med* 181: 877.
- Bazil V, Brandt J, Tsukamoto A, Hoffman R. 1995. *Blood* 86(2): 502.
- Bazil V, Strominger JL. 1993. *PNAS USA* 90: 3792.
- Bian ZM, Elnor VM, Yoshida A, Kunkel SL, Elnor SG. 2001. *Invest Ophthal Vis Sci* 42(7): 1660.
- Brockhausen I, Montreuil J, Vliegenthart JFG, Schachter H. 1995. *In Glycoproteins* Elsevier Science. New York.
- Brown TJ, Shuford WW, Wang WC, Nadler SJ, Bailey TS, Marquard H, Mittler RS. 1996. *J Biol Chem* 271: 27686.
- Brunet A, Ovni A, Zignmond MJ. 1999. *Cell* 96: 857.
- Brunskill NJ, Tobin A, Nahorski S, Walls J. 1998. *J Clin Invest* 101: 2140.
- Brunskill NJ. 2004. *J Am Soc Nephrol* 15: 504.
- Burton CJ, Combe C, Wallas J, Harris KPG. 1999. *Nephrol Dial Transplant* 14: 2628.
- Call ME, Wucherpfennig KW. 2004. *Mol Immunol* 40: 1295.
- Campanero MR, Pulid R, Alonso JL, Pivel JP, Pimentel-Muiño FX, Fresno M, Sánchez-Madrid F. 1991. *Eur J Immunol* 21: 3045.
- Carraway KL, Ramsauer VP, Haq B, Carrothers Carraway CA. 2003. *Bioessays* 25: 66.
- Cheng CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA, Miceli MC. 2000. *J Immunol* 165: 3722.

- Christensen EI, Birn H. 2001. *Am J Physiol* 280: F562.
- Cooper MD, Chase HP, Lowman JT, Krivit W, Good RA. 1968. *Am J Med* 44: 499.
- Cruz-Muñoz ME, Salas-Vidal E, Salaiza-Suazo N, Becker I, Pedraza-Alva G, Rosenstein Y. 2003. *J Immunol* 171: 1901.
- *Current Protocols in Immunology*. 2001. Volumen 1. National Institutes of Health.
- Cyster J, Shotton DM, Williams AF. 1991. *EMBO J* 10: 893.
- Cyster J, Somoza C, Killeen N, Williams AF. 1990. *Eur J Immunol* 20: 875.
- Cyster JG, Williams AF. 1992. *Eur J Immunol* 22: 2565.
- Da Silva N, Bharti A, Shelley CS. 2002. *Blood* 100(10): 3536.
- Daniels MA, Hogquist KA, Jameson SC. 2002. *Nat Immunol* 3(10): 903.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu HA, Gotoh Y, Greenburg ME. 1997. *Cell* 91: 231.
- De Smet W, Walter H, Van Hove L. 1993. *Immunology* 76: 46.
- Del Río R, Rincón M, Layseca-Espinosa E, Fierro NA, Rosenstein Y, Pedraza-Alva G. 2004. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 133.
- Delon J, Kaibuchi K, Germain RN. 2001. *Immunity* 15: 691.
- Diamond MS, Staunton DE, De Fougerolles AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, Springer TA. 1990. *J Cell Biol* 111: 3129.
- Dixon R, Brunskill NJ. 1999. *J Am Soc Nephrol* 10: 1487.
- Dixon R, Brunskill NJ. 2000. *Clin Sci* 98: 295.
- Donadelli R, Zanchi C, Morigi M, Buelli S, Batani C, Tomasoni S, Corna D, Rottoli D, Benigni A, Abbate M, Remuzzi G, Zoja C. 2003. *J Am Soc Nephrol* 14: 2436.
- Dragone LL, Barth RK, Sitar KL, Disbrow GL, Frelinger JG. 1995. *PNAS* 92: 626.
- Eddy AA. 2004. *Nephrol Dial Transplant* 19: 277.
- Ellies LG, Jones AT, Williams W, Ziltener HJ. 1994. *Glycobiology* 4: 885.
- Ellies LG, tao W, Fellingner W, The HS, Ziltener HJ. 1996. *Blood* 88: 1725.
- *FACS Training Manual*. 1995. Becton Dickinson Immunocytometry Systems.
- Farokhzad OC, Teodoridis JM, Park H, Arnaout A, Shelley CS. 2000. *Nucleic Acids Res* 28(11): 2256.
- Fernandez-Rodriguez J, Andersson CX, Laos S, Baeckstrom D, Sikut A, Sikut R. 2002. *Tumour Biol* 23: 193.
- Fierro NA, Pedraza-Alva G, Rosenstein Y. 2006. *J Immunol* 176(12): 7346.
- Ford ML, Onami TM, Sperling AI, Ahmed R, Evavold BD. 2003. *J Immunol* 171: 6527.
- Fratazzi C, Manjunath N, Arbeit RD, Carini C, Germen TA, Ardman B, Remold-O'Donnell E, Remold HG. 2000. *J Exp Med* 192(2): 183.
- Fukuda M. 1989. *Ciba Found Symp* 145: 257.
- Gekle M. 2005. *Annu Rev Physiol* 65: 573.
- Giordanengo V, Fuzibet JG, Fox RI, Fukuda M, Lefebvre JC. 1999. *AIDS* 13: 1141.
- Hartshorn KL, Liou LS, White MR, Kazhdan MM, Tauber JL, Tauber AI. 1995. *J Immunol* 154: 3952.
- Hartshorn KL, White MR. 1999. *J Leukoc Biol* 65 (5): 614.
- Hattori Y, Kakishita H, Akimoto K, Matsumura M, Kasai K. 2001. *Biochem Biophys Res Commun* 281: 891.
- He P, Curry FE. 1993. *Am J Physiol* 265: H74.
- He YW, Bevan MJ. 1999. *J Exp Med* 190: 1903.

- Hernandez JD, Nguyen JT, He J, Wang W, Ardman B, Green JM, Fukuda M, Baum LA. 2006. *J Immunol* 177: 5328.
- Higai K, Shimamura A, Matsumoto K. 2006. *Clin Chim Acta* 367: 137.
- Higgins EA, Siminovitch KA, Zhuang DL, Brockhausen I, Dennis JW. 1991. *J Biol Chem* 266: 6280.
- Hirano K, Miki Y, Hirani Y, Sato R, Itoh T, Hayashi A, Yamanaka M, Eda S, Beppu M. 2005. *J Biol Chem* 280(47): 39284.
- http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/6460/akt_sig.gif
- Hu H, Huston G, Duso D, Lepak N, Roman E, Swain SL. 2001. *Nat Immunol* 2: 705.
- Ichiki T, Funakoshi Y, Ito K, Takeshita A. 2000. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 666.
- Jaleco S, Swainson L, Dardalhon V, Burjanadze M, Kinet S, Taylor N. 2003. *J Immunol* 171: 61.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2001. *Immunobiology*. 5a. Edición. Garland Science. USA.
- Jin Y, Mazza C, Christie JR, Giliani S, Fiorini SG, Mella P, Gandellini F, Stewart DM, Zhu Q, Nelson DL, Notarangelo LD, Ochs HD. 2004. *Blood* 104(13): 4010.
- John TA, Vogel SM, Tiruppathi C, Malik AB, Minshall RD. 2003. *Am J Physiol* 284: L187.
- Jones AT, Federspiel B, Ellies LG, Williams MJ, Burgener R, Duronio V, Smith CA, Takei F, Ziltener HJ. 1994. *J Immunol* 153: 3426.
- Jones DT, Ganeshaguru K, Anderson RJ, Jackson TR, Bruckdorfer KR, Low SY, Palmqvist L, Prentice HG, Hoffbrand V, Mehta AB, Widkremasinghe RG. 2003. *Blood* 15: 3174.
- Kadaja L, Laos S, Maimets T. 2004. *Oncogene* 23: 2523.
- Kadaja L, Laos S, Maimets T. 2004. *Oncogene* 23: 2523.
- Kenney D, Cairns L, Remold-O'Donnell E, Peterson J, Rosen FS, Parkman R. 1986. *Blood* 68: 1329.
- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. 2007. *Kuby Immunology*. 7a. Edición. W. H. Freeman and Company. USA.
- Kishimoto H, Sprent J. 1999. *J Exp Med* 190: 65.
- Kudo S, Fukuda M. 1991. *J Biol Chem* 266(13): 8483.
- Kudo S, Fukuda M. 1995. *J Biol Chem* 270(22): 13298.
- Kuijpers TW, Hoogerwerf M, Kuijpers KC, Schwartz BR, Harlan JM. 1992. *J Immunol* 149: 998.
- Laemmli UK. 1970. *Nature* 227(5259): 680.
- Lampinen M, Hakansson LD, Venge P. 2006. *Int Arch Allergy Immunol* 140(2): 113.
- Lan HY. 2003. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12: 25.
- Larson RS, Springer TA. 1990. *Immunol Rev* 114: 181.
- Layseca-Espinosa E, Pedraza-Alva G, Montiel JL, Del Río R, Fierro NA, González-Amaro R, Rosenstein Y. 2003. *J Leukoc Biol* 74: 1083.
- Leheste JR, Melsen F, Wellner M, Jansen P, Schlichting U, Renner-Muller I, Andreassen TT, Wolf E, Bachmann S, Nykjaer A, Willow T. 2003. *FASEB J* 17: 247.
- Lum LG, Tubergen DG, Corash L, Blaese RM. 1980. *N Engl J Med* 502: 892.
- Mandl-Weber S, Haslinger B, Schalkwijk CG, Sitter T. 2001. *Perit Dial Int* 21: 487.
- Manjunath N, Correa M, Ardman M, Ardman B. 1995. *Nature* 377: 535.

- Matsumoto M, Atarashi K, Umemoto E, Furukawa Y, Shigeta A, Miyasaka M, Hirata T. 2005. *J Immunol* 175(12): 8042.
- Matsuo A, Walker DG, Terai K, Mc Geer PL. 1996. *J Neuroimmunol* 71(1-2): 81.
- Mattioli I, Dittrich-Breiholz O, Livingstone M, Kracht M, Schmitz ML. 2004. *Blood* 104(10): 3302.
- McEvoy LM, Sun H, Frelinger JG, Butcher EC. 1997. *J Exp Med* 185(8): 1493.
- Minshall RD, Tirupathi C, Vogel SM, Niles WD, Gilchrist A, Hamm HE, Malik AB. 2000. *J Cell Biol* 150: 1057.
- Misawa Y, Nagaoka H, Kimoto H, Ishii Y, Kitamura K, Tsunetsugu-Yakota Y, Shibuya M, Takemori T. 1996. *Eur J Immunol* 26: 2573.
- Moran EC, Kamiguti AS, Cawley JC, Pettitt AR. 2002. *Br J Haematol* 116: 316.
- Morigi M, Macconi D, Zoja C, Donadelli R, Buelli S, Zanchi C, Ghilardi M, Remuzzi G. 2001. *J Am Soc Nephrol* 13: 1179.
- Mukasa R, Homma T, Hosono O, Yoshino S, Nishioka K, Fukuda M, Morimoto C. 1999. *Immunol Lett* 67(2): 117.
- Mullbacher A. 1994. *J Exp Med* 179: 317.
- Murali-Krishna K, Lau LL, Sambhara S, Lemonnier F, Altman J, Ahmed R. 1999. *Science* 286: 1377.
- Nakajima H, Takenaka M, Kaimori J-Y, Hamano T, Iwantani H, Sugaya T, Ito T, Hori M, Imai E. 2004. *J Am Soc Nephrol* 15: 276.
- Nathan C, Xie QW, Mecarelli-Hawlbachs L, Jin WW. 1993. *J Cell Biol* 122: 243.
- Onami TM, Harrington LE, Williams MA, Galvan M, Larsen CP, Pearson TC, Manjunath N, Baum LG, Pearce BD, Ahmed R. 2002. *J Immunol* 168: 6022.
- Ostberg JR, Barth RK, Frelinger JG. 1998. *Immunol Today* 19: 546.
- Ostberg JR, Dragone LL, Driskell T, Moynihan JA, Philipps R, Barth RK, Frelinger JG. 1996. *J Immunol* 57: 4876.
- Pallant A, Eskenazi A, Mattei MG, Fournier RE, Carlsson SR, Fukuda M, Frelinger JG. 1989. *PNAS USA*. Feb 86(4): 1328.
- Park JK, Rosenstein Y, Remold-O'Donnell E, Bierer BE, Rosen FS, Burakoff SJ. 1991. *Nature* 350: 706.
- Parkman R, Remold-O'Donnell E, Kenney D, Perrine S, Rosen FS. 1981. *Lancet* 2: 1387.
- Pedraza-Alva G, Merida LB, Burakoff SJ, Rosenstein Y. 1996. *J Biol Chem* 271: 27564.
- Pedraza-Alva G, Mérida LB, Burakoff SJ, Rosenstein Y. 1998. *J Biol Chem* 273: 14218.
- Perillo NL, Pace KE, Seihamer JJ, Baum LG. 1995. *Nature* 378: 736.
- Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT, Baum LG. 1997. *J Exp Med* 185: 1851.
- Piller F, Piller V, Fox RI, Fukuda M. 1988. *J Biol Chem* 263(29): 15146.
- Polet H, Spieker-Polet H. 1975. *J Exp Med* 142: 949.
- Rabinovich GA, Ariel A, Hershkori ZR, Hirabayoshi J, Kasai KI, Lider O. 1999. *J Exp Med* 190: 385.
- Rabinovich GA, Modesti NM, Castagna LF, Landa CA, Riera CM, Sotomayor CE. 1997. *J Biochem* 122(2): 365.
- Reich H, Tritchler D, Herzenberg AM, Kassir Z, Zhou X, Gao W, Scholey JW. 2005. *J Am Soc Nephrol* 16: 1266.
- Reiner SL. 2007. *Cell* 129: 33.
- Remold-O'Donnell E, Davis AE, Kenney D, Bhaskar KR, Rosen FS. 1986. *J Biol Chem* 261 (16): 7526.

- Remold-O'Donnell E, Parent D. 1995. *Blood* 85(2): 337.
- Remold-O'Donnell E, Rosen FS. 1991. *Immunodef Rev* 2: 151.
- Remold-O'Donnell E, Zimmerman C, Kenney D, Rosen FS. 1987. *Blood* 70: 104.
- Remold-O'Donnell E. 1994. *J Immunol* 152: 3595.
- Remold-O'Donnell, Rosen FS. 1990. *Immunodef Rev* 2: 151.
- Retinongrum DS, Cleary PP. 1994. *Infect Immun* 62: 2387.
- Rieu P, Porteu F, Bessou G, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. 1992. *Eur J Immunol* 22: 3021.
- Rosenstein Y, Park JK, Hahn WC, Rosen FS, Bierer BE, Burakoff SJ. 1991. *Nature* 354: 233.
- Rosenstein Y, Santana A, Pedraza-Alva G. 1999. *Immunologic Research* 20: 89.
- Rothwell SW, Wright DG. 1994. *J Immunol* 152: 2358.
- Roumier A, Olivo-Marin JC, Arpin M, Miche F, Martin M, Mangeat P, Acuto O, Dautry-Varsat A, Alcover A. 2001. *Immunity* 15(5): 715.
- Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA. 2001. *Science* 291: 2370.
- Rudd PM, Wormald MR, Stanfield RL, Huang M, Mattsson N, Speir JA, DiGennaro JA, Fetrow JS, Dwek RA, Wilson IA. 1999. *J Mol Biol* 293: 351.
- Santana MA, Pedraza-Alva G, Olivares-Zavaleta N, Madrid-Marina V, Horejsi V, Burakoff SJ, Rosenstein Y. 2000. *J Biol Chem* 275: 31460.
- Scheid MP, Schubert KM, Duronio V. 1999. *J Biol Chem* 274(43): 31108.
- Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrançois L. 2000. *Nat Immunol* 1(5): 426.
- Schnitzer JE, Carley WW, Palade GE. 1988. *PNAS USA* 85 : 6773.
- Schnitzer JE, Sung A, Horvat R, Bravo J. 1992. *J Biol Chem* 267: 24544.
- Shaw AS, Dustin ML. 1997. *Immunity* 6: 361.
- Shelley CS, Remold-O'Donnell E, Davis III AE, Bruns GAP, Rosen FS, Carroll MC, Whitehead AS. 1989. *PNAS USA* 86: 2819.
- Shelley CS, Remold-O'Donnell E, Rosen FS, Whitehead AS. 1990. *Biochem J* 270: 569.
- Sikut R, Nilsson O, Baeckstrom D, Hansson GC. 1997. *Biochem Biophys Res Commun* 238: 612.
- Silverman LB, Wong RC, Remold-O'Donnell E, Vercelli D, Sancho J, Terhorst C, Rosen F, Geha R, Chatila T. 1989. *J Immunol* 142: 1455.
- Sperling AI, Green JM, Mosley RL, Smith PL, DiPaolo RJ, Klein JR, Bluestone JA, Thompson CB. 1995. *J Exp Med* 82: 139.
- Spieker-Polet H, Polet H. 1976. *J Biol Chem* 251(4): 987.
- Springer TA, Dustin ML, Kishimoto TK, Martin SD. 1987. *A Rev Immun* 223.
- Stillman BN, Hsu DK, Pang M, Brewer CF, Johnson P, Liu FT, Baum LG. 2006. *J Immunol* 176: 778.
- Stöckl J, Majdic O, Kohl P, Pickl WF, Menzel JE, Knapp W. 1996. *J Exp Med* 184: 1769.
- Takeda S, Rodewald HR, Arakawa H, Bluethmann H, Shimizu T. 1996. *Immunity* 5: 217.
- Tan JT, Dudl, E, Le Roy E, Murray R, Sprent J, Weinberg KI, Surch CD. 2001. *PNAS USA* 98(15): 8732.
- Tanchot C, Rosado MM, Agenes F, Freitas AA, Rocha B. 1997. *Science* 276: 2057.
- Tang S et al., 2002. *Kidney Int* 61: 1655.
- Tang S, Leung JC, Abe K, Chan KW, Chan LY, Chan TM, Lai KN. 2003. *J Clin Invest* 111: 515.

- Thomas ME, Schreiner GF. 1993. *Am J Nephrol* 13(5): 385.
- Thurman EC, Walker J, Jayaraman S, Manjunath N, Ardman B, Green JM. 1998. *Int Immunol* 10: 691.
- Tiruppathi C, Finnegan A, Malik AB. 1996. *PNAS USA* 93: 250.
- Tiruppathi C, Song W, Bergenfeldt M, Sass P, Malik AB. 1997. *J Biol Chem* 272: 25968.
- Todeschini AR, Nunes MP, Pires RS, Lopes MF, Previsto JO, Mendonça-Previato L, DosReis GA. 2002. *J Immunol* 168: 5192.
- Torres JM, Geusken SM, Uriel J. 1992. *Eur J Cell Biol* 57: 222.
- Tsuboi S, Fukuda M. 2000. *BioEssays* 23(1): 46.
- Van den Berg TK, Nath D, Ziltener HJ, Vestweber D, Fukuda M, Van Die I, Crocker PR. 2001. *J Immunol* 166: 3637.
- Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. 1998. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33: 151.
- Vogel SM, Minshall RD, Pilipovic M, Tiruppathi C, Malik AB. 2001. *Am J Physiol* 281: L1512.
- Wang Y, Rangan GK, Tay Wang Y, Harris DCH. 1999. *J Am Soc Nephrol* 10: 1204.
- Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. 2006. *Immunity* 24: 677.
- Wherry EJ, Barber DL, Kaech SM, Blattman JN, Ahmed R. 2004. *PNAS USA* 101(45): 16004.
- Wiskott A. 1937. *Monatsschr Kinderheilkd* 68: 212.
- Wohlfarth V, Drumm K, Mildemberger S, Freudinger R, Gekle M. 2003. *Kidney Int* 63(Suppl 84): S103.
- Woodman RC, Johnston B, Hickey MJ, Teoh D, Reinhardt P, Poon BY, Kubes P. 1998. *J Exp Med* 188(11): 2181.
- Yang J, Liu Y. 2001. *Am J Pathol* 159: 1454.
- Yard BA, Chorionopoulos E, Herr D, van der Woude FJ. 2001. *Nephrol Dial Transplant* 16: 1769.
- Ziprin P, Alkhamesi NA, Ridgway PF, Peck DH, Darzi AW. 2004. *Biol Chem* 385: 755.
- Zoellner H, Höfler M, Beckmann R, Hufnagl P, Vanyck E, Bielek E, Wojta J, Fabry A, Lockie S, Binder BR. 1996. *J Cell Sci* 109: 2571.
- Zoja C, Donadelli R, Colleoni S, Figliuzzi M, Bonazolla S, Morigi M, Remuzzi G. 1998. *Kidney Int* 53: 1608.