



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MEXICO  
CAMPUS CHIAPULTEPEC

---

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
INCORPORADA A LA UNAM

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA PARA EVALUAR LA EXPRESION DE  
LA MOLÉCULA ASOCIADA A LINFOCITOS T RESTRINGIDOS POR EL  
COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I (CRTAM) EN  
LESIONES DE LA PIEL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

BERENICE SÁNCHEZ ARELLANO.

DIR. DE TESIS: Q.F.B. JAVIER ARAIZA SANTIBÁÑEZ  
Dr. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE.



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.



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.

DIR. DE TESIS: Q.F.B JAVIER ARAIZA SANTIBÁÑEZ.  
DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE.

PRESIDENTE: DR. GUILLERMO DEL REY PINEDA

VOCAL: JUAN ANTONIO GIMÉNEZ SCHERER.

SECRETARIO: JAVIER ARAIZA SANTIBÁÑEZ.

1 er. SUPLENTE: GERARDO GARCÍA CAMACHO.

2 do. SUPLENTE: EDUARDO DEL REY PINEDA.

SITIO DONDE SE REALIZO EL PROYECTO;

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MEDICA EN INMUNOLOGÍA E Infectología.  
HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA",  
IMSS.

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR, CENTRO DE  
INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS. IPN MÉXICO DEPARTAMENTO  
DE BIOMEDICINA MOLECULAR.

---

Director de Tesis  
Q.F.B. Javier Araiza Santibáñez.

---

Director de Tesis  
Dr. Vianney Ortiz Navarrete

---

Sustentante  
Berenice Sánchez Arellano

## AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al **Cinvestav** y al **Departamento de Biomedicina Molecular** por las facilidades que me otorgaron y en general por haberme permitido el uso de sus instalaciones para la elaboración de mi tesis de Licenciatura.

Así mismo al **Dr. Vianney Ortiz Navarrete**, investigador de dicho departamento quien dirigió mi tesis.

A mi Mamá, por que gracias a ella soy quien soy, y esta tesis se la dedico con mucho amor a ella quien siempre se desvelaba para esperarme a que terminara aunque ya fuera muy noche y principalmente siempre creyó en mi.

A mi hermana por todos los momentos de desveladas contiguas, y por soportarnos mutuamente.

A mi Sobrino Iker por ser ese hermoso bebe, por el vale la pena cualquier esfuerzo.

A mi papá que me apoyo en lo que necesitara siempre que lo necesitara.

A todos los que me ayudaron a la realización de esta tesis que sin su ayuda no la hubiera podido concluir muchísimas gracias hermanos (Guille, Mely, Yu, Ángeles, Bernardo, Juan C).

A todos Muchas Gracias!!!

## ABREVIATURAS

<b>ACAID</b>	Desviación inmune asociada a la cámara anterior del ojo
<b>CRTAM</b>	Class-I Restricted T Cell Activation Molecule (Molécula Asociada a Linfócitos T Restringidos por MHC I)
<b>BCR</b>	B cell receptor. Receptor de células B
<b>CD3</b>	Cúmulo de diferenciación 3.
<b>CD4</b>	Cúmulo de diferenciación 4.
<b>CD8</b>	Cúmulo de diferenciación 8.
<b>CD28</b>	Cúmulo de diferenciación 28.
<b>CD80</b>	Cúmulo de diferenciación 80.
<b>CD86</b>	Cúmulo de diferenciación 86.
<b>DN</b>	Doble negativas, células que no expresan CD4 ni CD8.
<b>DP</b>	Dobles positivas, células que expresan tanto CD4 como CD8.
<b>DC</b>	Células dendríticas.
<b>DD</b>	Dominios de muerte.
<b>ICAM</b>	Molécula de adhesión inter-celular
<b>IL-4</b>	Interleucina 4, molécula de bajo peso molecular producida por los leucocitos, que ejerce su efecto sobre los leucocitos.
<b>IL-5</b>	Interleucina 5 molécula de bajo peso molecular producida por los leucocitos, que ejerce su efecto sobre los leucocitos.
<b>IL-10</b>	Interleucina 10 molécula de bajo peso molecular producida por los leucocitos, que ejerce su efecto sobre los leucocitos.
<b>IL-13</b>	Interleucina 13 molécula de bajo peso molecular producida por los leucocitos, que ejerce su efecto sobre los leucocitos.
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón Gama.
<b>JAM</b>	Moléculas de Adhesión.

<b>KD</b>	Kilo Daltones
<b>LRC</b>	Región de control largo
<b>MAG</b>	Glucoproteína asociada a mielina nectinas
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos.
<b>MIP1<math>\alpha</math></b>	Proteína inflamatoria de macrófagos.
<b>Nectl-2</b>	Nectin like-2.
<b>N-CAM</b>	Molécula de adherencia a neuronas
<b>NT</b>	No transfectadas
<b>NK</b>	Natural killer. Asesinas Naturales.
<b>NKT</b>	Linfocitos con marcadores característicos de células T y de células Natural Killer, productores de grandes cantidades de citocinas inmunomoduladoras.
<b>PMA</b>	Esteres de forbol
<b>RANTES</b>	Regulated upon activation normal T cell excreted and presumible secreted
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensajero
<b>SS</b>	Secretaría de Salud.
<b>TC2</b>	Células T citotóxicas tipo 2
<b>Th1</b>	T helper 1
<b>T CD8</b>	Linfocitos T CD8.
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral alfa
<b>V-CAM</b>	Molécula de adherencia vascular

## ÍNDICE

1.	Resumen	7
2.	Introducción	8
2.1	La piel	8
2.2	Anatomía	8
2.3	Histología	8
2.4	Epidermis	9
2.5	Dermis	10
2.6	Hipodermis	10
2.7	Fisiología de la piel	10
2.8	Los desmosomas	12
2.9	Características estructurales de CRTAM	16
2.10	CRTAM es una molécula de adhesión	17
2.11	Patrón de expresión de CRTAM	17
2.12	Función de las NKT	18
2.13	Cinética de expresión de CRTAM	20
2.14	CRTAM como marcador temprano de activación	21
2.15	Análisis de la secuencia proteica de CRTAM	23
3.	Justificación	24
4.	Planteamiento del problema	24
5.	Hipótesis	24
6.	Objetivos.	25
6.1	Objetivo general	25
6.2	Objetivos específicos	25
7.	Diagrama de Flujo	26
8.	Material y Métodos	27
8.1	Muestras	27
8.2	Reactivos	27
8.3	Reactivos para blanqueo de tejido	27
8.4	Para el método de inmunohistoquímica	28
8.5	Anticuerpos	28
8.6	Tinción Hematoxilina Eosina	28
8.7	Inmunohistoquímica y blanqueo del tejido	29
8.8	Análisis morfométrico	30
8.9	Procesamiento de los datos	30
9.	Resultados	30
9.1	Morfología topográfica con H/E	30
9.2	Morfología de los hallazgos inmunohistoquímicos	30
9.3	Análisis morfométrico de los hallazgos inmunohistoquímicos	33
10.	Discusión de resultados	34
11.	Conclusiones	38
12.	Perspectivas	39
13.	Figuras	40
14.	Bibliografía	52



## 1. RESUMEN.

**INTRODUCCIÓN.** La molécula CRTAM (class-I restricted T cell activation molecule) es miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, se expresa en células T CD8 y NKT activadas. Estudios recientes de nuestro laboratorio demostraron que CRTAM también se expresa en cerebelo, particularmente en neuronas Purkinjes y por análisis de bioinformática lo identificamos como un miembro nuevo de la familia de las proteínas de adhesión nectín-like (Necis). Además se identificó a Necl-2 como uno de sus ligandos y a su vez nosotros identificámos que Necl-2 se expresa en cerebelo. Estos resultados sugieren que la unión de CRTAM con Necl-2 contribuye a la interacción neuronal. Por otro lado, en estudios preliminares demostramos que CRTAM se expresa de manera constitutiva en la región de uniones intercelulares de células epiteliales. Debido a que en las lesiones de la piel se afectan de manera importante este tipo de interacciones celulares, resulta interesante estudiar la expresión de CRTAM en piel de individuos con afecciones dermatológicas. Para ello se requiere como primer paso, la estandarización de la técnica para evaluar la expresión de CRTAM en piel sana y en diferentes lesiones de la piel. **OBJETIVO.** Estandarizar la técnica para analizar la expresión de la proteína CRTAM en piel sana y en diversos tipos de lesiones de piel. **MATERIALES Y MÉTODOS.** Se evaluó la expresión de CRTAM mediante inmunohistoquímica a partir de bloques de parafina de piel sana y de diferentes lesiones de la piel, utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-CRTAM. Posterior a la inmunotinción se realizó un análisis semicuantitativo de la expresión, así como la localización celular de la expresión de esta proteína. **RESULTADOS.** Se observaron diferencias en la expresión de CRTAM los diferentes casos de lesiones de la piel estudiados, principalmente a nivel membrana celular y citoplasma. Las células que mostraron mayor expresión fueron células de la dermis, así como linfocitos y macrófagos presentes en infiltrados inflamatorios. **CONCLUSIONES.** Se estandarizó la técnica de inmunohistoquímica y con ello se mostró por primera vez la expresión de CRTAM en células epiteliales de piel, y los resultados sugieren que la molécula, además de participar en las uniones intercelulares, podría estar involucrada durante el reclutamiento de las células T CD8 y NKT en el sitio de la lesión.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 La piel.**

La piel es la cubierta exterior que reviste todo el cuerpo y se insinúa en los orificios naturales, no es como se cree una simple envoltura inerte, sino un órgano, complejo anatómico y funcional ligado a la fisiología y patología de todo el organismo.

### **2.2 Anatomía.**

La extensión del órgano cutáneo es variable según la talla y la complexión del individuo. Es pues el órgano más extenso y de mayor peso y volumen. La piel es continua, lisa, suave, resistente, flexible, elástica, extensible, tersa, turgente, húmeda, estas son apenas algunas de sus características que por supuesto varían de una persona a otra y aún en la misma persona.

Se puede decir que la piel tiene dos caras, la externa que nos separa del mundo exterior o macrocosmos y la interna, íntimamente unida al organismo, al medio interno y está por tanto, sujeta a agresiones del medio interno y externo. El color de la piel depende fundamentalmente de la cantidad de pigmento melánico que contiene y de la red vascular existente, en ocasiones intervienen otros pigmentos como los carotenos.

### **2.3 Histología**

Dos láminas embrionarias forman la piel, el ectodermo que origina la epidermis y los anexos y el mesodermo que forma la dermis, no es una línea recta sino que presenta una serie de entrantes de la dermis hacia la epidermis que se llaman papilas, a su vez la epidermis coloca entre las papilas los procesos interpapilares. En las papilas van los vasos y nervios de la piel, ya que la epidermis no presenta

estos anexos y se nutre a partir de los vasos papilares. A las papilas se debe más que nada los dermatoglifos.

## 2.4 Epidermis

Está constituida por varias capas de células que forman en conjunto un epitelio poliestratificado. Todas las células proceden de una sola hilera de células llamadas individualmente *queratinocitos* que van a originar, por sus divisiones a todas las demás, terminando con la muerte de la célula llena de queratina, esta última capa caerá, renovándose continuamente, este proceso que llamamos *queratopoyesis* y tiene una duración promedio de 21 días.

*Capas de la epidermis:*

- Estrato basal o germinativo; es una sola hilera de células cilíndricas de núcleos muy basófilos, dispuestas perpendicularmente a la dermis, con mitosis frecuentes y que están en constante reproducción.
- Estrato espinoso o de Malpighi; Está formado por varias hileras de células poliédricas, dispuestas en mosaico y que tienen como característica especial la presencia entre ellas de puentes intercelulares que unen una célula con otra dando cohesión a la epidermis, pero dejando espacio entre las células para la circulación de la linfa que las nutre.
- Estrato granuloso; a medida que se acercan a la superficie, las células se aplanan y empiezan a presentar en su interior unos gránulos de color azul oscuro que están formados del precursor de la queratina
- Estrato córneo; Variable en su espesor de 0.02mm hasta 0.5mm se observan así varias hileras de laminillas puestas unas sobre las otras.
- Unión dermoepidérmica; esta membrana da cohesión a la unión entre la dermis y la epidermis.

## 2.5 Dermis.

Está constituida por un armazón de tejido conjuntivo sobre el cual asientan los vasos y nervios y los anexos de la piel.

Las fibras que forman este armazón son de 3 clases, las colágena, que son las más abundantes, las reticulares y elásticas, estas fibras dan resistencia, cohesión y elasticidad a la piel.

## 2.6 Hipodermis

Inmediatamente situada bajo la dermis profunda, está constituida por células grasas o adipocitos, separados por tabiques de tejido conjuntivo que forman lóbulos. <sup>(1)</sup>

## 2.7 Fisiología de la piel

*Órgano de protección;* la piel es una barrera que protege al individuo de las agresiones externas.

*Órgano sensorial;* su intensa inervación lo hace ser el órgano receptor de la sensibilidad por excelencia, tanto del tacto como de la temperatura y del dolor.

*Función de termorregulación;* la capa córnea, el sebo superficial y el tejido celular subcutáneo son malos conductores del calor y por tanto muy buenos aislantes para evitar pérdidas del organismo.

*Función queratogena;* la capa córnea y las faneras están constituidas por queratina que es una proteína fibrosa formada de cadenas polipeptídicas paralelas y alargadas de lo cual depende su elasticidad y flexibilidad, cualidades que aumentan con el agua, esta proteína es insoluble y resistente a la digestión por enzimas y ácidos.

*Función melanogena;* en la piel existen dos clases de pigmento, la melanina y los pigmentos sanguíneos.

La melanina es una proteína compleja, de color apizarrado, derivada de sustancias aminadas, principalmente de la tirosina que mediante una reacción química muy complicada y la intervención de tirosinasa y otras enzimas da origen a dioxifenilalanina (DOPA) y ésta a su vez a melanina.

La melanogénesis depende también de la intervención de otros factores como el cobre que actúa sobre la tirosina, los radicales sulfhidrilo y el ácido ascórbico que impiden la acción de esta enzima.

Este pigmento se forma en los melanocitos situados entre las células basales de donde lo toman los melanóforos o melanófagos para repartirlo.

El pigmento de la sangre es la hemoglobina, también intervienen los carotenos en la piel amarilla, la tricosterina que da color rojo al cabello y un pigmento mal conocido llamado melanoide. <sup>(1)</sup>

**Carcinoma escamoso (epidermoide);** se forma a partir de epitelio escamoso metaplásico de los bronquios. Se caracteriza por pleomorfismo citológico muy manifiesto, puentes intercelulares (desmosomas) entre las células tumorales y queratinización del citoplasma.

**Morfea;** Padecimiento benigno de origen desconocido; ocurren a cualquier edad; predominan en mujeres; se caracterizan por áreas esclerosas únicas o múltiples, redondeadas o lineales, más o menos limitadas, asintomáticas y de evolución crónica. Puede ser autoinmunitaria.

**Liquen;** Dermatitis de origen desconocido, tal vez relacionada con factores genéticos e inmunitarios, caracterizada por pápulas poligonales, brillantes y algo umbilicadas, que casi siempre curan solas y a veces dejan zonas de atrofia; puede afectar mucosas, pelos y uñas.

**Liquen nitidus:** Erupción rara de aspecto miliar sin predilección por sexo, edad o raza. Se caracteriza por pápulas brillantes de 1 a 2 mm, de color de la piel, de evolución crónica en dorso de manos, brazos, abdomen o pene, o puede ser generalizada. Histológicamente puede haber queratosis y engrosamiento de la basal, infiltrado linfocítico en nidos pegados a la epidermis, la que emite una prolongación que abraza el infiltrado; es posible que haya células gigantes tipo Langhans.

**Esporotricosis;** Micosis subcutánea granulomatosa de evolución subaguda o crónica, localizada preferentemente a cara y extremidades; afecta piel, vasos linfáticos y, raras veces, pulmones, huesos, articulaciones u otros órganos; la causa es el hongo dimorfo *Sporothrix schenckii*.

La principal fuente de infección son los vegetales verdes o secos, como paja y zacate; algunos animales, como roedores e insectos, actúan como vectores pasivos, afecta a individuos de ambos sexos y cualquier edad. Se observa más en campesinos, jardineros, floristas y carpinteros. Penetra por la piel a través de pequeñas heridas

**Eczema;** Síndrome caracterizado por vesículas o ampollas, erosiones, costras melicéricas y hemáticas sobre un fondo eritematoso, lo cual le da a la piel un aspecto lloroso. El aspecto eczematoso se observa en las fases agudas de la dermatitis <sup>(2)</sup>

## 2.8 Los desmosomas

Son estructuras dependientes de calcio localizadas en la superficie de las células que promueven la adhesión de las células epidérmicas y la resistencia a estrés mecánico. Presentan una estructura central amorfa de unos 20-30 nm de grosor, llamada desmoglea, que separa las membranas plasmáticas de las dos células vecinas. En su porción citoplasmática el desmosoma consiste en unas placas densas submembranosas de un grosor de 10 a 40 nm que a veces aparecen divididas en una placa rígida primaria de 10 a 20 nm y otra placa secundaria más distal. Los filamentos intermedios o tonofilamentos se insertan en estas placas dirigiéndose después hacia el interior de la célula y alrededor del núcleo, formando una red de filamentos que se extienden de un desmosoma a otro, y también a los hemidesmosomas del polo basal de la célula.

Existen diversas proteínas y glicoproteínas a nivel de los desmosomas, se les puede clasificar en:

1.-Proteínas desmosómicas no glicosiladas de la placa intracelular: a) desmoplaquinas I y II, proteínas de 250 y 120 kD, respectivamente. La primera en

todos los tejidos, la segunda se le encuentra principalmente en epitelios planos estratificados. Forman parte de la porción mas interna de la placa citoplasmática del desmosoma. Juegan un papel importante en la unión de filamentos intermedios con la superficie celular a nivel de los desmosomas. El pénfigo paraneoplásico presenta anticuerpos circulantes contra las desmoplaquinas I y II.

b) placoglobina, de 83 kD, existe en dos formas, una soluble dentro del citoplasma y otra insoluble (20-30%) unida a las placas desmosómicas. Puede unirse a las cadherinas, desmogleinas. Su unión es por puentes disulfuro (uniones covalentes) o uniones no covalentes responsables de la coprecipitación no inmunológica observada en el pénfigo foliáceo y vulgar conjuntamente con el antígeno respectivo en cada una de estas entidades. <sup>(3)</sup>

2.- Otras proteínas desmosómicas de la placa intracelular: a) desmoioquina (680 kD), se localiza en la periferia de las placas desmosómicas. b) desmocalmina (240 kD) puede unirse a la calmodulina y a las citoqueratinas. c) polipéptido de la banda 6 (75 kD) localizado en las placas de los desmosomas de las células suprabasales de los epitelios estratificados. Se une de forma específica con las citoqueratinas ácidas (tipo I).

3.- Glicoproteínas desmosómicas transmembrana (cadherinas): presentan una región extracelular (con 5 dominios que incluyen secuencias de unión con el calcio), una región transmembrana y otra citoplasmática. Se unen a los microfilamentos de actina. Presentan una localización específica y reciben su nombre en función de ésta (cadherina E en epitelios, N en tejido neural, P en placenta). a) desmogleínas, tres proteínas 1, 2 y 3. Se localizan a nivel de la desmoglea. Su gen sintetizador esta en el cromosoma 18. La desmogleína 1 (160kD) localizada en todos los epitelios, se considera específica de los desmosomas. La desmogleína 2 se ha aislado a partir de los desmosomas de un carcinoma de colon. La desmogleína 3 (130kD) solo se expresa en los desmosomas de epitelios escamosos estratificados a nivel suprabasal. Las desmogleínas 1 y 3 interacciona de forma estrecha con la placoglobina en la placa citoplasmática. b) desmocolinas, son proteínas transmembrana de las que los tipo I, II. y III corresponden a las proteínas bovinas, mientras que las desmocolinas humanas homologas serian las desmogleínas IV y V (para la desmocolina I) y desmogleína II y III (para la desmocolina III). El gen dsc3 es el responsable de la síntesis de las desmogleínas II y III, se haya localizado en el

cromosoma 9p, expresándose a nivel de las células de los estratos basales. El gen *dsc1*, responsable de la síntesis de las desmogleínas IV y V, se haya localizado en el cromosoma 18, se expresa en la superficie de los estratos suprabasales.<sup>(3,4,5)</sup>



## **CRTAM**

CRTAM (Class I Restricted T Cell Associated Molecule), es una proteína que se expresa en linfocitos NKT y CD8 de ratón activados con ésteres de forbol (PMA) y pertenece a la super familia de las inmunoglobulinas.

En forma general están implicadas en fenómenos de reconocimiento antigénico (TCR, BCR), de coestimulación (CD28, CD80, CD86, etc), o de adhesión celular (VCAM, ICAM, N-CAM, JAM y nectinas). Muchas de estas proteínas se expresan constitutivamente en la superficie celular en diversos tejidos y tipos celulares, sin embargo algunas de ellas se expresan en estadios específicos del desarrollo o de la fase efectora de las células del sistema inmune adaptativo.

Recientemente se ha encontrado que CRTAM se expresa en las células NKT después de su activación y en paralelo a la desregulación de CD3 y V $\alpha$ 24, dicha expresión es temprana y transitoria ya que después de las 36 hr empieza a disminuir. Hecho que también ocurre en los linfocitos CD8<sup>(6)</sup>

Nuestro grupo de trabajo evaluó por la expresión del RNA mensajero (RNAm) "Northern Blot", que además del bazo, se expresa de manera muy abundante en testículo y cerebro. Buscando comprobar la expresión de la proteína se generó un anticuerpo monoclonal contra CRTAM de ratón, y se demostró que la expresión se restringe a células NKT y CD8 activadas. Utilizando como sonda la secuencia del ratón identificaron la expresión del RNAm para CRTAM humano en células activadas, mientras que en los tejidos se detectó en sangre periférica, bazo, timo, intestino delgado y colon. Con el propósito de conocer más detalles relacionados con la biología de las células NKT, Kennedy y cols. trataron de identificar los transcritos más abundantes producidos por células NKT DN activadas; para ello utilizaron técnicas de hibridación sustractiva con genotecas de cDNA, encontrando que dichas células presentan un patrón de expresión génica similar al de las células T citotóxicas tipo 2 (TC2), ya que tienen una expresión abundante de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, granzimas, linfotactina y en menor proporción IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , MIP1 $\alpha$  y RANTES<sup>(8,9)</sup>

## 2.9 Características estructurales de CRTAM.

El análisis de la secuencia de nucleótidos mostró que tiene 72.4 % de homología con el de ratón y codifica para una proteína de 393aa, con peso molecular teórico de 42.7 KD, una secuencia líder de 17aa y una porción extracelular de 269aa, con 5 sitios potenciales de glucosilación y 2 dominios de inmunoglobulina (uno de tipo variable y otro de tipo constante), un probable dominio transmembranal de 25aa, con un dominio citoplasmático que contiene 3 probables sitios de fosforilación. Además, CRTAM presentó 24% de identidad con la glucoproteína asociada a mielina (MAG) y 23% con VCAM-1.

El análisis de la secuencia de CRTAM con las herramientas de predicción de estructura secundaria y terciaria permitió identificar las cadenas que conforman los dominios de inmunoglobulina, aquí se observa que las cisteínas se localizan en las cadenas B y F, característica muy conservada dentro de la familia, por otro lado la separación entre las primeras 2 cisteínas es de 60aa, además de que se encuentra un ácido aspártico (D) 6 posiciones antes de la segunda cisteína, aquí se observa además la glicina (G) conservada entre las cadenas A y B, todas estas son propiedades estándar para dominios variables, la separación en el segundo par es de 55aa, rasgo característicos de los dominios C1. Después de los dominios de Ig se reconoce una secuencia hidrofílica de aproximadamente 70aa, que de acuerdo con la predicción presenta estructura de giros y 2 hojas Beta, esta secuencia no conserva homología con ninguna proteína reportada en las bases de datos publicadas. Después de ésta se observa la secuencia transmembranal y de dominio citoplasmático.

Cuando se sometió la secuencia de CRTAM al programa Swiss-model para contar con un modelo de la estructura tridimensional se obtuvo una estructura similar a la de JAM-A en el arreglo tridimensional, aunque son evidentes algunas diferencias por ejemplo en las alfa hélices presentes en JAM, mientras que en CRTAM son regiones expuestas, probablemente hidrofílicas pero no forman alfa hélices, salvo la correspondiente al dominio constante.<sup>(10)</sup>

## 2.10 CRTAM como molécula de adhesión

Para determinar si CRTAM participa en adhesión celular, nuestro grupo de trabajo desarrollo un ensayo de transfección de células Jurkat en el cual se encontró que hay un mayor porcentaje de células adheridas en la mezcla de células Jurkat transfectadas (T) 17.05% comparada con la adhesión de la mezcla de transfectadas y no transfectadas (NT) 12.78% y el obtenido en la mezcla de NT-NT 10.8%. Se observó un aumento en la cantidad de células doble positivas al combinar las células transfectadas con CRTAM, lo que sugiere la posible participación de la molécula en interacciones homotípicas. <sup>(6)</sup>

## 2.11 Patrón de expresión de CRTAM

El patrón de expresión de CRTAM en diferentes poblaciones celulares de sangre periférica se investigó mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta utilizando células en reposo y activadas con ionomicina y PMA. Se encontró que, CRTAM se expresa únicamente sobre células activadas. Cuando se analizaron las diferentes poblaciones celulares se observó la expresión en linfocitos CD3<sup>+</sup>, y al subdividir éstos en CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, la expresión se observó en los linfocitos CD8<sup>+</sup> (como se demostró con anterioridad)<sup>(6)</sup> mientras que en los linfocitos CD4<sup>+</sup> se observó la expresión solamente en una pequeña subpoblación que podría corresponder a las células NKT. Para determinar si efectivamente esas células corresponden a las NKT activadas se hizo una tinción con anticuerpos anti V $\alpha$ 24<sup>+</sup> y anti CD3<sup>+</sup> analizando 10<sup>6</sup> eventos para lograr identificar con precisión a las NKT, se encontró que efectivamente hay expresión de la proteína sólo en los linfocitos NKT activados. Al analizar las diferentes poblaciones celulares como CD3<sup>+</sup>\_CD8<sup>+</sup> (Linfocitos T CD8), CD3<sup>+</sup>\_CD8<sup>-</sup> (Linfocitos T CD4), CD3<sup>-</sup>\_CD8<sup>+</sup> (Células NK), CD3<sup>-</sup>\_CD8<sup>-</sup> (Linfocitos B y NK CD8<sup>-</sup>) se encontró que dentro de los linfocitos convencionales, sólo los CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> activados expresan CRTAM. Por lo tanto con estos resultados se muestra que la proteína CRTAM de humano es una molécula de activación sólo de linfocitos NKT y CD8<sup>+</sup>, de la misma manera que fue mostrado por Kennedy y cols<sup>(11)</sup> en el año 2000 para la expresión de la molécula de origen murino.<sup>(6)</sup>

## 2.12 Función de las células NKT

El rango de acciones atribuidas a las células NKT es muy amplio, muchos estudios han dado evidencias de que la función principal de estas células es la protección de los tejidos contra las respuestas inmunes inflamatorias que podrían alterar su funcionamiento, además existen muchas evidencias de que pueden controlar la respuesta inmune a ciertas infecciones y para algunos tumores. Sin embargo, el desconocimiento de los ligandos para las NKT en condiciones fisiológicas ha complicado la determinación de sus funciones, la mayoría de los avances se obtuvieron al dilucidar que un compuesto antitumoral derivado de una esponja marina denominado  $\alpha$ -galactosil-ceramida ( $\alpha$ GalCer) <sup>(12,13)</sup> y más recientemente su homólogo sintético KRN7000 <sup>(14)</sup>, se une de manera específica a CD1d y es reconocido por el TCR de las células NKT del ratón <sup>(15)</sup> y del humano <sup>(16)</sup>.

Mediante estudios con anti-CD3 (tanto *in vitro* como *in vivo*) se demostró que la producción temprana de IL-4, principalmente depende de las células NKT <sup>(17,18)</sup>, por lo que se ha propuesto que participan en la polarización de la respuesta Th2. Sin embargo, éstas células no son indispensables para la inducción de todas las respuestas de ese tipo, ya que no tienen relevancia en la secreción de IgG1 e IgE posterior a la administración de anticuerpos monoclonales anti IgD <sup>(19)</sup>; tampoco participan en la respuesta secundaria ante la administración de KLH <sup>(20)</sup> (ambos modelos bien establecidos de respuesta Th2), no obstante, se ha demostrado que en algunos casos puede inhibir las respuestas mediadas por Th1 mediante la producción de IL-4, IL-10 y TGF  $\beta$  <sup>(21)</sup>.

En este sentido se ha demostrado que las NKT son indispensables para la desviación inmune asociada a la cámara anterior del ojo (ACAID), fenómeno asociado a la protección del daño que se generaría en el ojo ante una respuesta inflamatoria <sup>(22)</sup>.

También se ha reportado que estas células son citotóxicas contra algunas líneas celulares tumorales *in vitro* <sup>(23)</sup> y se ha demostrado que son responsables de la eliminación de tumores indicada por IL-12 *in vivo* <sup>(24)</sup>.

Por lo tanto, resultados *in vitro* apoyan un papel antitumoral directo por estas células. Sin embargo, *in vivo* la actividad antitumoral probablemente esté ligada a la capacidad de las células NKT de producir cantidades importantes de IFN  $\gamma$  <sup>(25)</sup>, lo que llevaría a la activación de otras poblaciones, entre ellas las NK o la activación de células dendríticas para la producción de IL-12 <sup>(26,27)</sup>; Además se ha demostrado que las células NKT también producen IL-2, IL-5 e IL-10 entre otras, lo que apoyaría su papel en el establecimiento de las condiciones para la respuesta inmune adaptativa <sup>(28,29)</sup>.

En humanos también se ha descrito que el desarrollo de diabetes mellitus insulina-dependiente (IDDM) y de esclerosis múltiple, correlaciona con la disminución numérica o funcional de las células V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q productoras de IL-4 <sup>(30,31)</sup>.

Al parecer la capacidad de las células NKT para polarizar la respuesta hacia Th1 o Th2 podría jugar un papel muy importante en la resistencia o susceptibilidad a ciertas infecciones, así como también en el desarrollo de algunas enfermedades auto inmunes o en la protección contra el desarrollo de tumores, sin embargo aún no se conoce con certeza el papel fisiológico de esta población celular.

Recientemente utilizando tetrámeros de CD1 que presentan la molécula  $\alpha$ GalCer <sup>(32,33,34)</sup>, combinando con la presencia de los marcadores comúnmente utilizados se han definido 4 tipos de células NKT.

**Tipo I (V $\alpha$ 14i).**- Es la población que se expresa en ratón V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 (V $\alpha$ 14i) (inicialmente llamada J $\alpha$ 281) apareada con V $\beta$ 8, V $\beta$ 7 o V $\beta$ 2, es restringida por CD1 y genera una respuesta muy frecuente contra  $\alpha$ GalCer; usualmente expresan NK1.1 y otros receptores característicos de células NK, son poblaciones DN o CD4<sup>+</sup>. En el humano corresponde a las células V $\alpha$ 24J $\alpha$ 15 (inicialmente llamada J $\alpha$ Q), expresan CD161 y también responden fuertemente contra  $\alpha$ GalCer en el contexto de CD1, son menos frecuentes que en el ratón y se ha reportado que pueden ser CD8<sup>+</sup>.

**Tipo II.-** En esta categoría de células NKT se incluyen poblaciones tanto del ratón como del humano que son reactivadas a CD1 pero el TCR que expresan es más variable, presentando una población  $V\alpha 3.2-J\alpha 9/V\beta 8$  o  $V\alpha 8/V\beta 8$ .

**Tipo III.-** La tercera categoría incluye células  $NK 1.1^+ TCR^+$  que no son restringidas por CD1, el repertorio de TCR que expresan es muy variable y pueden ser  $CD8^+$ ,  $CD4^+$  o DN, estas células son más abundantes en bazo y médula ósea, en el humano la frecuencia de células  $CD161^+ TCR^+$  es mucho mayor que la de  $V\alpha 24i$  (tipo 1), algunas de estas son restringidas por CD1, pero al igual que en el ratón, el repertorio de TCR es mayor y se cree que podrían ser células T convencionales.

**Tipo IV.-** Esta población se define por la expresión de CD49b (integrina  $\alpha 2$ ) que es reconocida por el anticuerpo DX5 (marcador de células NK), hay poca relación entre esta población y las  $V\alpha 14i$  <sup>(35)</sup>.

A pesar de la ventaja que podría representar el uso de los tetrámeros de CD1, puesto que están conjugados al antígeno mejor caracterizado de las NKT, se ha demostrado que tienen un elevado nivel de pegado inespecífico y menor resolución que la combinación de  $V\alpha 24-V\beta 11$ . Por lo que el uso de los tetrámeros tampoco identifica al 100 % las células NKT; Aunque actualmente aún no se han determinado funciones para las diferentes células clasificadas por los tetrámeros, las mejor caracterizadas corresponden a las tipo I. <sup>(7)</sup>

### **2.13 Cinética de expresión de CRTAM.**

La expresión de CRTAM es muy temprana y transitoria puesto que se observa en la superficie de ambas estirpes celulares desde las 4hrs de activación, y después de las 24 hrs. de activación, disminuye de manera muy evidente para las células NKT, mientras que para las  $CD8^+$  es más claro después de las 36 hrs. Hacia las 48 hrs. de activación en ambas poblaciones ya casi no se detecta la proteína CRTAM <sup>(6)</sup>.

## 2.14 CRTAM como marcador temprano de activación.

Al comparar la expresión de CRTAM con la de CD69, molécula marcadora de activación temprana presente en todas las células hematopoyéticas, se observa una curva similar, aunque la intensidad de la expresión de CD69 es mayor que la de CRTAM, queda por aclarar el significado del nivel de expresión, de su importancia funcional y el hecho de que sea transitoria, pero dado que se expresa en estado de activación de esos linfocitos se ha sugerido que CRTAM participa en la fase efectora de las células NKT y de los linfocitos CD8+. Mediante análisis bioinformático de la secuencia proteica de CRTAM se ha encontrado homología con las Nectinas y Nectin-like, que son proteínas de adhesión implicadas en la formación y organización de las uniones adherentes y estructuras de las células epiteliales, además de que participan en conjunto o independientemente de cadherinas en la formación de otras uniones intercelulares, tales como las sinapsis entre neuronas y en la unión espermátide-célula de Sertoli en el testículo, entre otros tejidos.

Al realizar alineamiento de CRTAM con las nectinas se ha observado que la homología se distribuye a todo lo largo de la proteína, siendo los puntos de mayor parecido los correspondientes a los dominios de inmunoglobulina. Las nectinas son una familia de 4 miembros, nectina 1-4, con al menos dos isoformas para cada una de ellas, nectina 1 $\alpha$ , nectina 1 $\beta$ , nectina 1 $\gamma$ , nectina 2  $\alpha$ , nectina 2  $\gamma$ , nectina 3  $\alpha$ , nectina 3  $\beta$ , nectina 3  $\gamma$ , nectina 4 sólo se conoce una forma; todas excepto nectina 1  $\gamma$ , presentan región extracelular con 3 dominios de inmunoglobulina (1 variable y 2 constantes), una región transmembranal y una citoplásmica que contiene un "motif" conservado de 4aa en el extremo COOH terminal que se une al dominio PDZ de afadina, una proteína de unión al citoesqueleto de actina.

Las proteínas "Nectin-like" hasta la fecha son cinco, presentan la misma organización de 3 dominios de inmunoglobulina, región transmembranal y región citoplásmica en la que se identifica el dominio de unión a PDZ, se postula que estas proteínas aun no bien caracterizadas tengan funciones relacionadas a las descritas para las nectinas. Los dominios PDZ son secuencias de 80-90aa

conformados por 6 cadenas  $\beta$  que se arreglan en dos hojas  $\beta$  antiparalelas por 2  $\alpha$ -hélices que pueden expresarse en múltiples copias en una misma proteína, aunque se encuentran en diferentes estructuras, las proteínas que contienen estos dominios generalmente se encuentran en dominios celulares particulares tales como sinapsis, contactos intercelulares en la superficie basal, lateral o apical de las células epiteliales. Por esta razón se ha propuesto que estas proteínas tienen la función de organizar los dominios de la membrana plasmática además de conectar los receptores de superficie con elementos de señalización río abajo. <sup>(36,37)</sup>

A diferencia de las nectinas CRTAM sólo presenta dos dominios de inmunoglobulina, sin embargo en su región extracelular cuenta con una región de aproximadamente 80aa que no presenta homología con ninguna proteína reportada, esta región presenta características hidrofílicas y probablemente le confiera alguna propiedad funcional a CRTAM diferentes de las conocidas para las nectinas. <sup>(38,39)</sup> De acuerdo a la predicción del peso molecular de CRTAM sería de 42.7 KDa, sin embargo en los linfocitos activados se induce la expresión de una proteína de aproximadamente 80 KDa, esto puede conciliarse al considerar que la proteína cuenta con cinco sitios potenciales de glucosilación, esto implicaría que efectivamente se trata de una glicoproteína y que esos sitios son funcionales, además por la capacidad de formar dímeros es probable que tenga alguna función de adhesión <sup>(40)</sup>.



## 2.15 Análisis de la secuencia protéica de CRTAM

Realizando un análisis bioinformático se encontró que CRTAM está relacionado (homologías del 36 al 51%) con una familia de moléculas de adhesión denominadas Nectinas y "Nectin-Like proteins" y en menor grado con unas proteínas denominadas "Junction Adhesión Molecule" JAM (homologías del 34-36%)

Proteína	Identidad (%)	Homología (%)
Nectin 1	27 (25/90)	50
Nectin 2	18(27/149)	36
Nectin 3	21 (43/198)	37
Nectin-Like1	30 (62/201)	50
Nectin-Like2	30(55/183)	51
Nectin-like3	26 (50/190)	40
Nectin like4	28(46/161)	46
PVR (CD155)	27(38/139)	39
JAM-A	32(53/221)	36
JAM-B	25(47/184)	34
JAM-C	-	-

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

La estandarización de la técnica para evaluar la expresión de CRTAM permitirá identificar su participación en la patogenia de las enfermedades de la piel que permanecen con una fisiopatología desconocida.

### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Es CRTAM una molécula de adhesión y activación en fase temprana de los linfocitos T CD8+ y de las células NKTs.

La expresión aumenta en condiciones de inflamación.

Experimentos recientes preliminares demostraron la expresión de esta molécula en uniones intercelulares. La piel es el mejor modelo para estudiar la posible participación de CRTAM en dichas uniones.

Para contestar esta pregunta como primer paso se debe estandarizar la técnica para evaluar la expresión de CRTAM en piel sana y en diversas patologías de la piel.

### **5. HIPÓTESIS**

- ◆ Mediante la técnica de inmunohistoquímica será posible evaluar la presencia de la molécula CRTAM, en la piel detectar diferencias entre piel sana y enferma.
- ◆ Las diferencias mayores se observarán en las uniones intercelulares epiteliales.

### **HIPOTESIS NULA**

- ◆ CRTAM no se expresara en piel.
- ◆ CRTAM no se modificara en piel sana y enferma.

## 6. OBJETIVOS

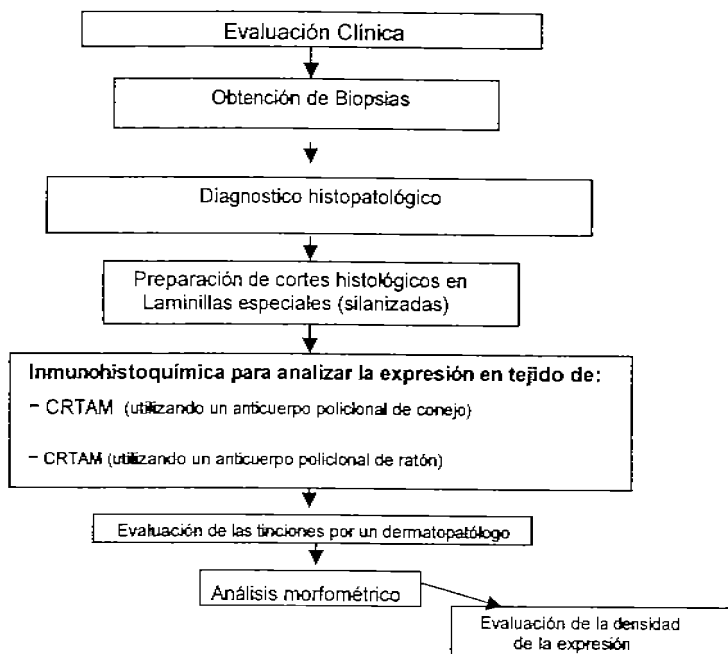
### 6.1 GENERAL.

1. Estandarizar la técnica para evaluar la expresión de CRTAM a partir de bloques de parafina de piel sana y de diferentes lesiones de la piel, mediante la técnica de inmunohistoquímica.
2. Evaluar la expresión de CRTAM en piel sana y con lesión.

### 6.2 ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la técnica de inmunohistoquímica para CRTAM en tejido parafinado de biopsia de piel sana y en biopsias de diferentes lesiones de la piel.
2. Evaluar la densidad de la expresión de CRTAM en las inmunohistoquímicas de piel sana y de las diferentes lesiones de la piel mediante análisis morfométrico.
3. Evaluar el tipo de células que expresan CRTAM en las inmunohistoquímicas de piel sana y de las diferentes lesiones de la piel mediante análisis morfométrico.

## 7. Diagrama de Flujo



## **8. MATERIAL Y METODOS**

### **8.1 Muestras.**

Se obtuvieron bloques de parafina de biopsias de diferentes lesiones de la piel, de los archivos de Patología del Hospital Central Militar. Se seleccionaron casos con diagnóstico de Esporotricosis, Ca. epidermoide *in situ*, Morfea, Eczema Crónico, *Liquen Nitidus*. Se incluyeron aquellos que tuvieron mejor calidad y cantidad de tejido, con un total final de 5 casos de procesos inflamatorios. Las biopsias de piel sana fueran obtenidas de donadores voluntarios (del hospital militar) las cuales incluyeron antebrazo, cadera, hombro y axila.

Con los bloques de parafina correspondientes se practicaron cortes de 4 a 8  $\mu$  de espesor para tinción de rutina con Hematoxilina-Eosina (H/E), y de 2 a 4  $\mu$  de espesor para las tinciones inmunohistoquímicas.

### **8.2 Reactivos para H/E**

- Para la tinción de H/E:
- Grenetina Bacteriológica CTR SCIENTIFIC (Monterrey N.L. México).
- Hematoxilina de Harris, Merck (Naucalpan de Juárez, Edo de Mex.).
- HCl 1%-Alcohol amoniacal al 1%.
- Eosina B Merck (Naucalpan de Juárez, Edo de Mex.).
- Xileno.
- Eosina Y Merck (Naucalpan de Juárez, Edo de Mex.).
- Resina sintética Goleen Bell (Zapopan Jal. México).

### **8.3 Reactivos para el blanqueo del tejido.**

- Acido Oxálico (3%)
- Permanganato de potasio

#### **8.4 Para el método de inmunohistoquímica:**

- Silane (Sigma, Cal. USA).
- Peróxido de hidrógeno al 3%.
- Bloqueador Suero de Cerdo 2% (DAKO corporation).
- Biotina (Link, DAKO LSAB + kit, DAKO Corporation).
- Sustrato DAB (diamino benzidina) (DAKO LIQUID DAB + Substrate-Chromogen Solution). (DAKO corporation).
- Permanganato de potasio
- Ac. Sulfúrico
- Ac. Oxálico

#### **8.5 Anticuerpos.**

- Anti-CRTAM. Anticuerpo policlonal hecho en conejo. (Laboratorio del Dr. Vianney Ortiz Navarrete, Cinvestav IPN).
- Anti-CRTAM. Anticuerpo policlonal hecho en ratón. (Laboratorio del Dr. Vianney Ortiz Navarrete, Cinvestav IPN).
- Streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR) (DAKO LSAB + kit, DAKO corporation).

#### **8.6 Tinción de H/E.**

En los portaobjetos con grenetina bacteriológica se montaron los cortes del tejido para la tinción de rutina H/E. Las laminillas fueron desparafinadas en un horno a 60° C e hidratadas mediante un tratamiento con alcohol a concentraciones decrecientes. Posteriormente el tejido fue teñido por 8 minutos con Hematoxilina de Harris, se enjuagó con agua corriente y el color fue virado con HCl 1%-Alcohol amoniacal al 1% en agua. Después el tejido fue contrateñido con Eosina, finalmente deshidratado en alcohol a concentraciones crecientes y xileno e inmediatamente cubiertos con resina sintética. Las muestras enseguida fueron analizadas mediante microscopia de campo claro.

## 8.7 Inmunohistoquímica y blanqueo del tejido.

Con la finalidad de disminuir las variaciones entre experimentos, la reacción para cada marcador se realizó en un solo tiempo en todos los grupos. Los cortes se montaron en laminillas cubiertas con silane. Se mantuvieron en una estufa bacteriológica a 62°C por 1 hora, para desparafinar con el siguiente procedimiento se procedió a hidratar la muestra: 3 baños en xileno, con duración de 8 minutos cada uno, 2 baños en etanol al 100%, un baño en etanol al 90%, un baño en etanol al 70% y un baño en agua destilada, cada uno de ellos con duración de 5 minutos.

Para el blanqueo de los tejidos después de desparafinar, e hidratar la muestra se hizo el blanqueo con Permanganato de potasio y Ac. Oxálico. Posteriormente se realizó la reacción de oxidación con Permanganato de potasio por 5 min, y por último el tejido fue decolorado con ácido oxálico al 3% durante 20 seg. Después de esto se hicieron 2 lavados con PBS y se continuó con la Inmunohistoquímica. Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 15 minutos dos veces. Se bloqueó la unión no inmunológica de los anticuerpos al tejido, sumergiéndolos durante 60 minutos en Suero Normal de Cerdo al 2%.

Posteriormente las secciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en cámaras húmedas, con los anticuerpos anti- CRTAM diluido 1:750. Después de lavar las secciones de tejido se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado a Biotina link, con streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR), por último el color se generó mediante la adición del substrato DAB (diamino benzidina) durante 1 minuto 20 segundos; se detuvo la reacción con agua de la llave y se contratiñó con hematoxilina 15 seg.

Después el tejido se deshidrató bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y Xileno en baños de 5 minutos cada uno. Finalmente las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

## **8.8 Análisis morfométrico**

Las laminillas se analizaron en un microscopio (Olimpus, BX-40) y las células positivas (color café) se cuantificaron en 4 campos para cada laminilla, utilizando un analizador de imágenes con el programa Imagen-Pro® Plus de Media cybernetics®, Silver Spring, MD. USA.

## **8.9 Procesamiento de los datos.**

Se elaboró una base de datos y la información se procesó utilizando el programa de análisis estadístico Prisma® de GraphPad Software, Inc., San Diego, CA. Los datos se presentaron mediante medias aritméticas de cada grupo y desviación estándar. La evaluación de la diferencia en el número de células positivas y la densidad de expresión de las reacciones inmunohistoquímicas se realizó mediante ANOVA de una vía. Fue utilizado análisis de comparación múltiple de Tukey para identificar las diferencias entre grupos;  $p \leq 0.05$  fue considerada como significativa.



## **9. RESULTADOS.**

### **9.1 Morfología topográfica con HE.**

Con el análisis HE se confirmaron los diagnósticos de Morfea, Carcinoma epidermoide *in situ*, Eczema crónico, Liquen Nitidus y Esporotricosis de los casos estudiados además se establecieron los grupos.

### **9.2 Morfología de los hallazgos Inmunohistoquímicos.**

Como primer punto se estandarizó la técnica de inmunohistoquímica para evaluar la expresión de CRTAM en piel sana y diferentes lesiones de la piel.

Se realizaron diversos experimentos para probar la concentración adecuada del anticuerpo anti-CRTAM así como diferentes condiciones en la inmunotinción.

En la FIGURA 1 se muestra los hallazgos inmunohistoquímicos de la expresión de CRTAM en una biopsia proveniente de un paciente con Lepra indeterminada. La tinción en esta muestra se realizó con el anticuerpo policlonal hecho en conejo anti-CRTAM a una dilución 1:750 y se observa que la tinción fue muy abundante en las células epiteliales de la epidermis a nivel citoplásmico y a nivel membrana células. Sin embargo, se puede observar también una muy ligera positividad en los controles negativos. Esto se atribuye a que la melanina presente normalmente en la piel es de color café.

En la FIGURA 2 se muestra el mismo tejido de lepra indeterminada en el cual se realizó la inmunotinción para CRTAM, utilizando el anti-CRTAM hecho en conejo a una dilución 1:750, sin embargo, este tejido fue previamente blanqueado como se comentó en materiales y métodos. Los resultados demostraron que desaparece el color café de la melanina y además se puede observar claramente la tinción específica para CRTAM. Esta tinción fue principalmente en la membrana y citoplasma de células epiteliales presentes en la epidermis y en la dermis.

También se probó el anti-CRTAM hecho en ratón. La FIGURA 3, muestra los resultados del experimento utilizando del anti-CRTAM de ratón a una dilución 1:750 en tejido que no fue blanqueado. Se puede observar una tinción muy abundante, sin embargo también se observó la presencia de la melanina en los controles negativos. Por lo que se realizó también en este experimento la técnica previa de blanqueado del tejido.

La FIGURA 4 muestra los resultados de esta tinción, la cual se observa principalmente en citoplasma y membrana de células epiteliales de la dermis y epidermis.

Procedimos a realizar las inmunotinciones en piel sana y en diferentes lesiones de la piel, con la concentración de anticuerpo CRTAM evaluada y blanqueando previamente los tejidos.

A partir de las inmunotinciones se realizó la descripción inmunohistológica de cada una de las patologías.

La FIGURA 5 presenta los resultados de la inmunotinción para CRTAM en una muestra de piel sana (axila). Se observó positividad intensa en la epidermis, la cual presentó un patrón segmentario alterno con zonas negativas. Este marcaje es mayor a nivel de los núcleos de los queratinocitos, núcleos de células endoteliales y musculares. El epitelio folicular se observó positivo en todas sus capas, con una tinción mas intensa de los núcleos.

En la segunda muestra de piel sana (brazo) la positividad estuvo presente en la epidermis, pero aquí el patrón de expresión fue con un marcaje más intenso a nivel del citoplasma del queratinocito y sólo algunos núcleos marcaron positivos, además la tinción fue más fuerte a nivel del estrato granuloso. Otras estructuras marcadas fueron las glándulas ecrinas y apócrinas. En la última muestra de piel sana (brazo) la epidermis se mostró positiva a nivel de los núcleos de los queratinocitos con patrón alterno de expresión, ya que existieron queratinocitos no marcados adyacentes a otros positivos, las áreas de tinción más intensas predominaron a nivel basal y en áreas del estrato granuloso. También se observaron células endoteliales y linfocitos muy positivos (no se muestran resultados de estas dos inmunotinciones).

En la muestra de tejido con diagnóstico de carcinoma epidermoide *in situ*, ilustrado en la FIGURA 6, se observó tinción muy positiva en la epidermis no afectada adyacente a la neoplasia y con un nivel menor de expresión en áreas de displasia, con predominio de la tinción a nivel de los núcleos y nucleolos. También los linfocitos de la dermis y algunos macrófagos se marcaron positivos.

La FIGURA 7, representa la inmunotinción de un tejido diagnosticado como esporotricosis, donde se observaron queratinocitos positivos en todo el espesor de la epidermis, con una tinción de predominio nuclear, otras células marcadas fueron las plasmáticas, algunos grupos de linfocitos y los macrófagos donde forman granulomas, así como las células endoteliales.

El espécimen con diagnóstico de morfea, FIGURA 8, reveló la epidermis marcada en toda su extensión y epitelio folicular, alternando con queratinocitos no marcados. La mayoría de los linfocitos en el infiltrado inflamatorio y el endotelio

vascular se observaron positivos, además se observa positividad en las células de estos infiltrados con características no linfocíticas.

El eczema crónico agudizado, representado en la FIGURA 9, mostró tinción positiva en la epidermis con predominio a nivel de los queratinocitos y sus núcleos especialmente en zonas donde se observó espongiosis, con marcaje de los desmosomas, aunque no lo es en todas las zonas donde se apreciaron los desmosomas. Las células endoteliales y los linfocitos fueron positivas en su mayoría.

En la tinción para CRTAM del tejido marcado como *liquen nitidus*, representado en la FIGURA 10, se observaron positivos de forma heterogénea los queratinocitos con una intensidad de marcaje mayor a nivel de los núcleos y los desmosomas en áreas focales. En la dermis la tinción fue positiva para algunos linfocitos y células endoteliales.

### **9.3 Análisis morfométrico de los hallazgos inmunohistoquímicos.**

La determinación de la densidad de la expresión de CRTAM en las diferentes patologías, se presentan en la FIGURA 11. La gráfica muestra la densidad de expresión de cada patología comparada con las muestras de piel sana.

Se observa un aumento significativo con respecto al control sano, en todas las muestras analizadas; morfea (muestra número 1), carcinoma epidermoide *in situ* (muestra 2), eczema crónico (muestra 3), liquen nitidus (muestra 4) en todas ellas con valor de  $P=0.0286$  y en la esporotricosis (muestra 5) el valor de  $P=0.0159$  significativo.

## **10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron una adecuada estandarización de la técnica de inmunohistoquímica para evaluar la expresión de CRTAM en piel sana y diferentes lesiones de la piel.

Los experimentos para probar la concentración adecuada del anticuerpo anti-CRTAM así como diferentes condiciones en la inmunotinción que se muestran en la FIGURA 1 se observa la expresión de CRTAM en una biopsia proveniente de un paciente con Lepra indeterminada, era importante que se estandarizara la técnica en alguna patología de la piel, y no en piel sana, pues el procedimiento que utilizamos para las inmunohistoquímicas incluye diversos lavados y la incubación con diferentes amortiguadores, así como también una incubación del tejido a temperatura de ebullición. Lo anterior puede ocasionar que se pierda el tejido y como es de esperarse el tejido con alguna patología es menos resistente que el tejido sano. Por esa razón era más adecuado no utilizar piel sana para los experimentos iniciales. La tinción en esta muestra se realizó con el anticuerpo policlonal hecho en conejo anti-CRTAM a una dilución 1:750 y se observa que la tinción fue muy abundante en las células epiteliales de la epidermis a nivel citoplásmico y a nivel membrana celular. Sin embargo se puede observar también una muy ligera positividad en los controles negativos. Esto se debe a que la melanina presente normalmente en la piel es de color café, lo cual resulto muy inconveniente para nuestros experimentos, pues podía confundirse con la expresión de CRTAM. Por esa razón se decidió utilizar la técnica histológica llamada blanqueo del tejido. En la FIGURA 2 se muestra el mismo tejido de lepra indeterminada en el cual se realizó la inmunotinción para CRTAM, utilizando el anti-CRTAM hecho en conejo en tejido previamente blanqueado. Los resultados demostraron que desaparece el color café de la melanina, y además la tinción específica para CRTAM se observa con claridad. Esta tinción fue principalmente en la membrana y citoplasma de células epiteliales presentes en la epidermis y en la dermis.

Con la finalidad de identificar cual de los anticuerpos con los que contábamos era el más adecuado para inmunohistoquímica, se procedió a realizar el mismo experimento en el mismo tejido en el cual utilizamos el anti-CRTAM hecho en conejo, pero se probó el anti-CRTAM hecho en ratón para identificar cual era el

mas adecuado para la inmunotinción. La FIGURA 3, muestra los resultados del experimento utilizando una dilución del anti-CRTAM de ratón a una dilución 1:750 en tejido que no fue blanqueado. Se puede observar una tinción muy abundante, sin embargo también se observó la presencia de la melanina en los controles negativos. Por lo que se realizó también en este experimento la técnica previa de blanqueado del tejido. La FIGURA 4 muestra los resultados de esta tinción, la cual se observa principalmente en citoplasma y membrana de células epiteliales de la dermis y epidermis. Se decidió utilizar el anticuerpo anti-CRTAM hecho en conejo debido a que contamos con mayor cantidad de este.

En este estudio se realizó por primera vez la evaluación de la expresión de CRTAM en piel sana (controles, n=3) y con patología (n=5), se seleccionaron los diferentes grupos de patología mas frecuentes de enfermedades de la piel: enfermedades tumorales, liquenoides, infecciosas, inmunológicas y reaccionales, El motivo de esta búsqueda está en función de la relación inmunogénica entre ésta molécula y las "Nectin-like", ya que ambas son consideradas moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas y están presentes en los tejidos epiteliales, formando parte de las uniones adherentes de los epitelios entre si y entre los queratinocitos con las células inflamatorias. Esto en tejidos con patología y en base a estudios previos donde CRTAM participa como molécula de coestimulación y adhesión de linfocitos T CD8+ y células NKT, formando parte de los estadios inflamatorios.

La expresión de CRTAM en este estudio fue muy semejante en las tres muestras obtenidas de piel sana, donde se observó su presencia a nivel de toda la epidermis con excepción del estrato córneo donde fue negativa, un dato muy interesante es que la positividad más intensa fue a nivel de los núcleos tanto de la epidermis como del epitelio folicular, así mismo al igual que otras moléculas de adhesión estudiadas en piel a CRTAM se le encuentra en glándulas ecrinas y apócrinas (FIGURA 5).

Con respecto al carcinoma de células escamosas, existen dos muestras en este estudio, el primero es un carcinoma *in situ* que expresa de forma moderada la proteína CRTAM a nivel de los queratinocitos con predominio en los sitios adyacentes a la neoplasia, siendo menor en el área afectada (FIGURA 6). En la

segunda muestra el grado de expresión en los queratinocitos epidérmicos neoplásicos es menor con respecto al anterior, pero el infiltrado que se encuentra junto a la neoplasia es intensamente positivo, lo que guarda relación con lo descrito para E-cadherina y nectina-1 $\alpha$  a nivel epidérmico en estudios previos. Sin embargo en dichos estudios no muestran cómo se encuentra la expresión de E-cadherina y nectina-1 $\alpha$  en los infiltrados inflamatorios.

La esporotricosis es otra de las patologías de interés, se trata de una enfermedad de origen infeccioso causada por el hongo dimorfo *Sporothrix schenckii*. En ella se pudo observar la positividad para CRTAM dentro de todo el epitelio hiperplásico en los queratinocitos con predominio de la tinción en los núcleos, y en los sitios donde el granuloma inflamatorio es visible se observaron un grupo de células positivas, pero no fue posible definir si corresponden a linfocitos o alguna otra estirpe celular (FIGURA 7).

La expresión de CRTAM en las inmunotinciones de piel con patología se encontró aumentada en la mayoría de éstas. Sin embargo, el patrón de expresión fue muy diverso. La morfea es una patología de gran interés, ya que forma parte de las hasta ahora denominadas enfermedades autoinmunes. Esta fue la entidad patológica que presentó la densidad de expresión de CRTAM más alta aunque existen muy pocas células inflamatorias en la dermis, la mayoría fueron positivas (FIGURA 8). Este grado de expresión probablemente se relacione con la actividad de factores pro inflamatorios que tengan como blanco colágena, y queratinocitos.

En el eczema crónico y se observó infiltrado inflamatorio escaso pero con áreas de espongirosis. La expresión de CRTAM (FIGURA 9) en estas zonas fue significativamente mayor con respecto a la piel sana. El hecho de identificar a CRTAM en los desmosomas apoya la hipótesis que formulamos en este estudio, pues sugiere que CRTAM participa en las uniones intercelulares formando heterodímeros con otras moléculas de adhesión celular que posiblemente sean más fuertes.

La presencia de CRTAM en los queratinocitos de la epidermis en la muestra de *liquen nitidus* esta en relación con la inflamación que se observa en la dermis superficial, ya que existe un estímulo al epitelio a partir de las células inflamatorias. La característica de tinción nuclear en los queratinocitos tendrá que ser estudiada con detalle en el futuro (FIGURA 10)

Queda por aclarar que estirpes celulares presentan expresión de CRTAM en estas patologías, así como el significado de la expresión a nivel nuclear en los queratinocitos.

Se demostró un incremento en la densidad de la expresión de CRTAM estadísticamente significativo en las cinco patologías de la piel estudiadas, comparando con la expresión en piel sana (FIGURA 11). Estos resultados sugieren la participación de esta molécula en la fisiopatogenia de las enfermedades dermatológicas.



## 11. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró estandarizar la técnica para inmunohistoquímica, para anticuerpos anti-CRTAM hechos en conejo y en ratón en biopsias de piel sana y con lesiones.

CRTAM se expresa en piel sana. Forma parte de la estructura epidérmica, en las uniones intercelulares, se encuentra en los núcleos de los queratinocitos.

Las glándulas ecrinas, apócrinas y folículos pilosos presentan CRTAM tanto en piel sana como en piel enferma.

La expresión de CRTAM fue intensa en aquellas enfermedades donde predominan los infiltrados linfocitarios periféricos a las neoplasias o procesos infecciosos crónicos. La morfea presentó, la mayor densidad de expresión de CRTAM, de todas las patologías estudiadas.

CRTAM se encuentra en el endotelio de aquellas patologías que presentan abundante extravasación de células inflamatorias.

La presencia de CRTAM en linfocitos, en aquellas patologías donde se sabe que predominan los linfocitos CD4+, sugiere que, contrario a lo que reporta la literatura, la expresión no se limita a linfocitos NKT y CD8+, sino que existen otras poblaciones celulares que expresan la proteína.

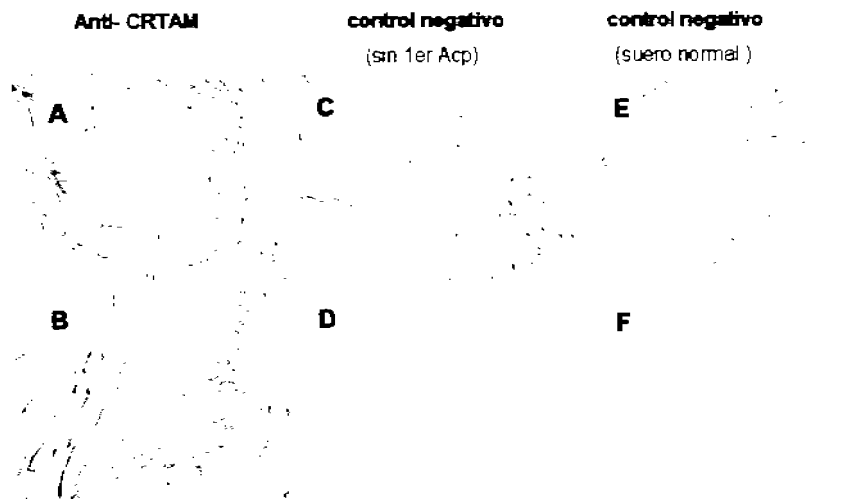
La expresión de CRTAM se manifestó en células endoteliales además de linfocitos NKT, CD8+ (que es la reportada en la literatura).

## **12. PERSPECTIVAS**

Seria interesante determinar el papel de CRTAM en la fisiopatología de las enfermedades de la piel. Para ello se requiere analizar la expresión de esta proteína en un número mayor de muestras con una determinada patología, por ejemplo Morfea o Esporotricosis en donde la expresión de CRTAM fue muy intensa y un mayor grupo de controles sanos. Posteriormente realizar la tinción por Inmunoquímica y el análisis morfométrico y así determinar si CRTAM está implicado en la fisiopatología de la enfermedad.

## 13.-FIGURAS

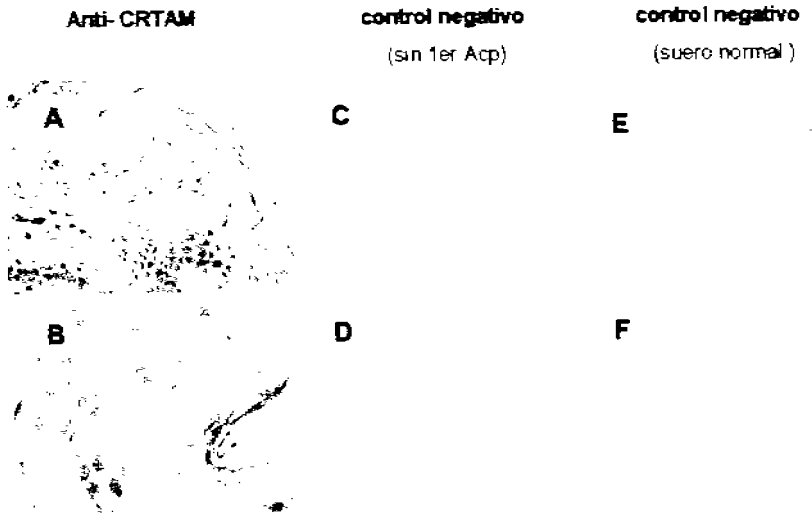
**FIGURA 1**  
**HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LA EXPRESIÓN DE CRTAM**  
**UTILIZANDO EL ANTICUERPO HECHO EN CONEJO Y SIN BLANQUEO**  
**DEL**  
**TEJIDO**



Tejido sin blanqueo Lepra indeterminada

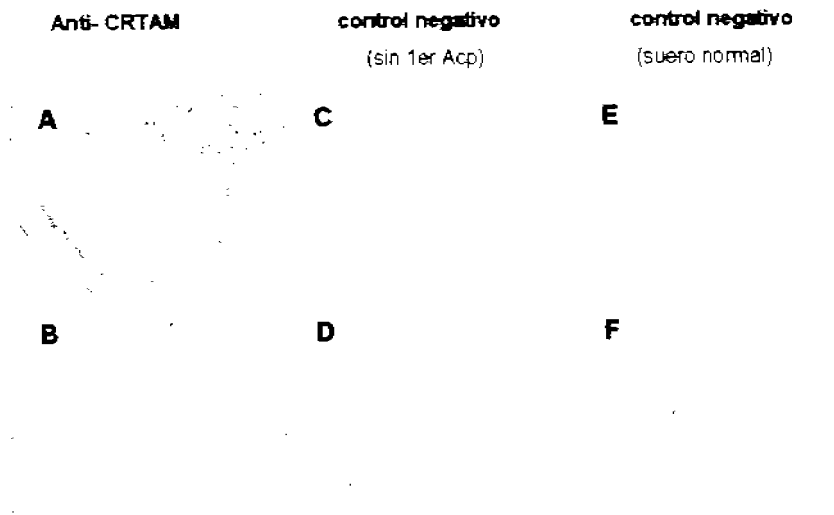
Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos para la estandarización de la evaluación de la proteína CRTAM, en tejido proveniente de un paciente con lepra indeterminada. Como primer anticuerpo se utilizó un anticuerpo policlonal anti-CRTAM hecho en conejo a una dilución 1:750 y para el segundo anticuerpo se utilizó un anti-conejo conjugado a biotina, y después streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR). El color se generó mediante la adición de sustrato DAB (diamino benzidina).

**FIGURA 2**  
**HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LA EXPRESIÓN DE CRTAM**  
**UTILIZANDO EL ANTICUERPO HECHO EN CONEJO Y CON EL**  
**BLANQUEO DEL TEJIDO**



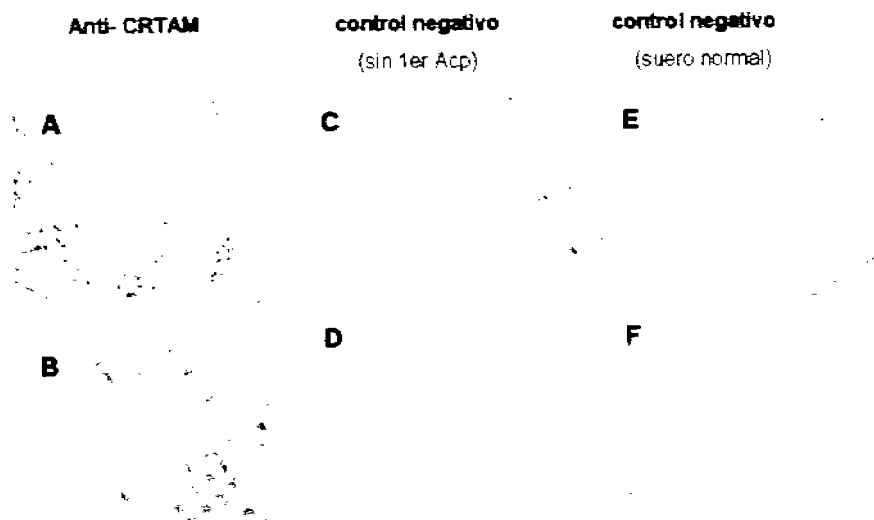
Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos para la estandarización de la evaluación de la proteína CRTAM, en tejido proveniente de un paciente con lepra indeterminada previamente blanqueado como se menciona en Materiales y Métodos. Como primer anticuerpo se utilizó un anticuerpo policlonal anti-CRTAM hecho en conejo a una dilución 1:750, y para el segundo anticuerpo se utilizó un anti-conejo conjugado a biotina, y después streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR). El color se generó mediante la adición de substrato DAB (diamino benzidina).

**FIGURA 3**  
**HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LA EXPRESIÓN DE CRTAM**  
**UTILIZANDO EL ANTICUERPO HECHO EN RATÓN Y SIN BLANQUEO DEL**  
**TEJIDO**



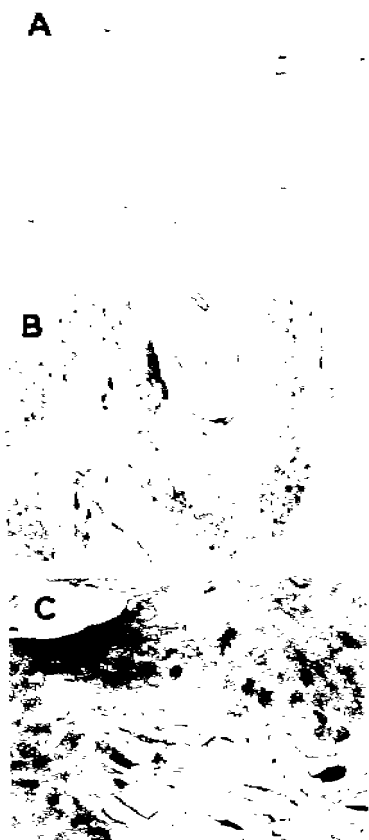
Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos para la estandarización de la evaluación de la proteína CRTAM, en tejido proveniente de un paciente con lepra indeterminada. Como primer anticuerpo se utilizó un anticuerpo policlonal anti-CRTAM hecho en ratón a una dilución 1:750 y para el segundo anticuerpo se utilizó un anti-conejo conjugado a biotina, y después streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR). El color se generó mediante la adición de sustrato DAB (diamino benzidina).

**FIGURA 4**  
**HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LA EXPRESIÓN DE CRTAM**  
**UTILIZANDO EL ANTICUERPO HECHO EN RATÓN Y CON BLANQUEO**  
**DEL**  
**TEJIDO**



Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos para la estandarización de la evaluación de la proteína CRTAM, en tejido proveniente de un paciente con lepra indeterminada previamente blanqueado como se menciona en **Materiales y Métodos**. Como primer anticuerpo se utilizó un anticuerpo policlonal anti-CRTAM hecho en ratón a una dilución 1:750, y para el segundo anticuerpo se utilizó un anti-conejo conjugado a biotina, y después streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR). El color se generó mediante la adición de substrato DAB (diamino benzidina).

**FIGURA 5**  
**EXPRESIÓN DE CRTAM EN PIEL SANA**



Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos de la expresión de CRTAM. A. Control negativo (sin primer anticuerpo, 40x). B. Expresión de CRTAM a lo largo de la epidermis, obsérvese el estrato córneo negativo (40x). C. A mayor aumento se observan positivos los queratinocitos con tinción nuclear y algunas células inflamatorias de la dermis (100x).



**FIGURA 6**  
**CARCINOMA EPIDERMÓIDE *in situ***

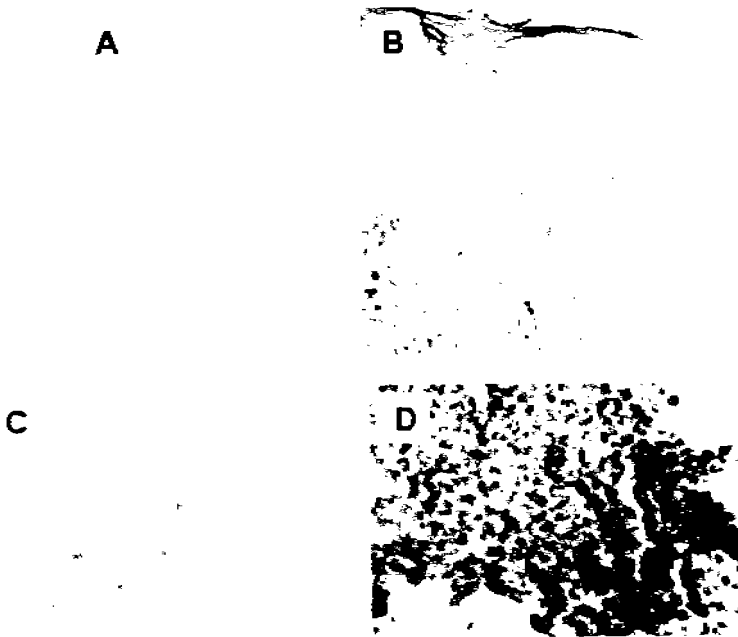
**A**

**B**

**C**

Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos de la expresión de CRTAM. A. Control negativo (sin primer anticuerpo, 40x). B. Expresión de CRTAM en la epidermis con predominio citoplásmico y solo algunos núcleos teñidos (40x). C. Queratinocitos adyacentes al sitio de neoplasia que expresan CRTAM en el núcleo (100x). D.

**FIGURA 7**  
**ESPOROTRICOSIS**



Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos de la expresión de CRTAM. A. Control negativo (sin primer anticuerpo, 40x). B. Expresión de CRTAM en epidermis, células inflamatorias y endoteliales de la dermis (40x). C. A mayor aumento se observan positivos los núcleos y nucleolos de los queratinocitos (100x). D. Detalle del granuloma inflamatorio con células inflamatorias positivas (100x).

**FIGURA 8**  
**MORFEA**



Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos de la expresión de CRTAM. A. Control negativo (sin primer anticuerpo, 40x). B. Epidermis y algunos linfocitos de la dermis positivos para CRTAM (40x). C. Obsérvese la alternancia marcada de los queratinocitos que expresan CRTAM a nivel nuclear (100x).

**FIGURA 9  
ECZEMA CRÓNICO**



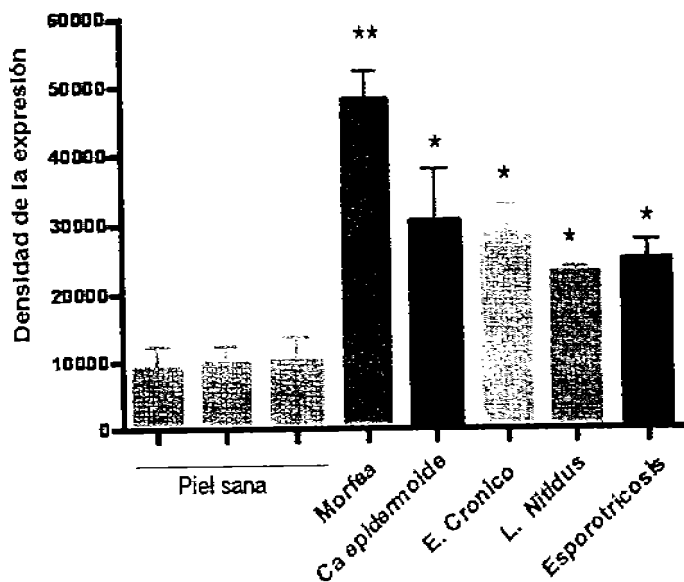
Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos de la expresión de CRTAM. A. Control negativo (sin primer anticuerpo, 40x). B. Expresión de CRTAM en la epidermis, con predominio a nivel de los núcleos de los queratinocitos, obsérvense algunas células inflamatorias en la dermis que expresan CRTAM (40x). C. A mayor aumento se observa expresión de la proteína en los desmosomas del estrato espinoso, adyacente a queratinocitos y desmosomas negativos (100x).

**FIGURA 10**  
**LIQUEN NITIDUS**



Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos de la expresión de CRTAM. A. Control negativo (sin primer anticuerpo, 40x). B. Expresión de CRTAM en queratinocitos de la epidermis (40x). C. A mayor aumento se observa expresión de molécula en los núcleos y citoplasma de los queratinocitos (100x).

FIGURA 11  
EXPRESIÓN DE CRTAM EN LESIONES DE LA PIEL



La gráfica muestra la densidad de expresión de cada patología comparada con las muestras de piel sana. Se observa un aumento significativo con respecto al control sano, solo en los casos de morfeaa (muestra número 1), carcinoma epidermoide *in situ* (muestra 2), eczema crónico (muestra 3), liquen nitidus (muestra 4) en todas ellas con valor de  $P=0.0286$  y en la esporotricosis (muestra 5) el valor de  $P=0.0159$ .

#### 14. REFERENCIAS.

- 1.- Amado Saúl; lecciones de Dermatología 1977, 9ª Ed. Pág. 5-19.
- 2.- Dermatología Diagnostico y tratamiento Atlas,1990, 2ª Ed, editorial McGraw-Hill Interamericana. Págs.113, 307, 311, 349, 351-354,507-562,
- 3.- Mascaró J, Giudice G, Díaz L. Desmosomas y hemidesmosomas en enfermedades ampollares autoinmunes. Med Cut I L A1994; XXII: 193-205.
- 4.- Yin T, Green K. Regulation of desmosoma assembly and adhesion. Seminars in Cell and Developmental Biology. 2004; 15: 665-677.
- 5.-Hsu T, Know P-Y. Advances in molecular medicine. J Am Acad Dermatol 2001; 44: 847-855.
- 6.- Genaro Patiño-López, Peter Hevezi, Jerry Lee, Dorian Willhite, Gail M. Verge, Sandra M. Iechner, Vianney Ortiz-Navarrete, Albert Zlotnik. Human class-I restricted T cell associated molecule is highly expressed in the cerebellum and is a marker for activated NKT and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. J Neuroimmunol 171 2006; 145-155.
- 7.-Metelitsa, L.S. Flow Cytometry for natural killer T cells: multi-parameter methods for multifunctional cells. Clinical immunology. 2004; 110:267-276
- 8.- Williams, A.F. and Barclay, A.N. The immunoglobulin superfamily domains for cell surface recognition. Ann. Rev. Immunol. 1988; 6:381-405.
- 9.- Wang, J.H. and Springer, T.. Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. Immunol. Rev. 1998; 163:197-215.
- 10.- Du Pasquier, L The phylogenetic origin of antigen-specific receptors Curr Top Microbiol Immunol. 2000; 248:160-185.

- 11.-Jacqueline Kennedy, Alain P. Vicari, Vicki Saylor, Sandra M. Zurawski, Neal G. Copeland, Debra J. Gilbert, Nancy A. Jenkins, and Albert Zlotnik. A molecular analysis of NKT cells: identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM). *J.Leukoc. Biol.* 67:725-734
- 12.- Wilson, M.T., Avneesh, K.S. and Kaer, L. 2002. Immunotherapy with ligands of natural killer T cells. *Trends in Molec. Med.* 8:225-231.
- 13.- Morita, M., Motoki, K Akimoto, K., Natori, T., Sakai, T., Sawa, E., Yamaji, K., Koezuka, Y., Kobayashi, E and Fukushima, H. 1995 Structure-activity relationship of alphasgalactosylceramides against B-16 bearing mice *J. Med. Chem.* 38:2176-2187.
- 14.- Kobayashi, E, Motoki, K., Uchida, T., Fukushima, H. and Koezuka, Y. KRN7000 A novel immunomodulator, and its antitumor activities *Oncol. Res.* 1995; 7:529-534.
- 15.-Kawano, T., Cui, J., Koezura, Y., Taura, I., Kaneko, Y., Sato, H., Kondo, E., Harada, E., Koseki, H., Nakayama, T., Tanaka, Y. and Taniguchi M. Natural killer nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand activated va14 NKT cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95:5690-5693.
- 16.- Brossay, L., Chioda, M., Burdin, M., Koezuka, Y., Casorati, G., Dellabona, P. And Kronenberg, M. CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J. Exp.Med.* 1998; 188:1521-1528.
- 17.-Zlotnik, A., Godfrey, D.I., Fischer, M and Suda, T. Cytokine production by mature and immature CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> T cells,  $\alpha\beta$  T cell receptor CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T cells produce IL4. *J. immunol.* 1992; 149:1211-1215.



- 18.-Arase, H., Arase, N., Nakagawa, K., Good, R.A. and Onoe, K.. NK1.1+ CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> Thymocytes with specific lymphokine secretion. *Eur. J. immunol.* 1993; 23:307-10.
- 19.- Denkers, E.Y., Schariton-Kersten, T., Barbieri, S., Caspar, P and Sher, A. A role for CD4<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> T lymphocytes as major histocompatibility complex class II-independent helper cells in the generation of CD8<sup>+</sup> effector function against intracellular infection *J. exp. Med.* 1996; 184:131-139.
- 20.- Chen, Y.H., Chiu, N.M., Mandal, M., Wang, N and Wang, C.R.. Impaired NK1.1 T cell development and early IL-4 production in CD1 deficient mice. *Immunity.* 1997; 6:459-467.
- 21.-Hammond, K.J.I., Poulton, L.D., Palmisano, L.J. silveira, P.A., Godfrey, D.,I. and Baxter A.g.  $\alpha\beta$  T cell receptor (TCR<sup>+</sup>) CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> (NKT) thymocytes prevent insulin dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD/Lt) mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10 *J.Exp. Med.* 1998; 187:1047-1056.
- 22.- Wang, \_Y.F., Goldschneider, I., Foss, D., Wu, D.Y., O'Rourke, J and Cone, R.E. Direct thymic involved in anterior chamber-associated immune deviation-evidence for a nondeletion mechanism of centrally induced tolerance to extrathymic antigens in adult mice. *J. Immunol.* 1997;158:2150-2155.
- 23.- Smyth, M.J., Thia, K.Y. T., Street, S.E.A., Cretney, E., Trapani, J.A., Tianiguchi, M., Kawano, T., Pelican, S.B., Crowe, N.Y. and Godfrey D.I. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells *J. Exp.Med.* 2000; 191:661-668.
- 24.-Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M & Taniguchi, M requirement for V $\alpha$ 14 NKT cells in IL-12 mediated rejection of tumors. *Science.* 1997; 278, 1623-1626.

- 25.-Smyth, M.J., Crowe, N.Y., Pellicci, D.G., Kyparissoudis, K., Kelly, J. M., Takeda, K., Yagita, H and Godfrey, D.I.. Sequential production of interferon- $\gamma$ -by NK1.1 T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of  $\alpha$ -galactosylceramide. *Blood* 2002; 99:1259-1266.
- 26.-Tomura, M., Yu, W.G., Ahn, H.J Yamashita, M., Yang, Y., Ono, S., Hamaoka, T., Kawano, T., Taniguchi, M., Koezuka, Y. and Fujiwara, H. A novel function of V $\alpha$ 14+ CD4+ N cells: stimulation of IL-12 production by antigen-presenting cells in the innate immune system. *J. immunol.* 1999; 163:93-101.
- 27.- Kitamura, H., Iwakabe, K., Yahata, T., Nishimura, S., Ohta, A., Ohmi, Y., Sato, M., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., Kawano, T., Taniguchi, M. and Nishimura, T.. The natural killer (NKT) cell ligand  $\alpha$ -galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J.Exp.Med.* 1999; 189:1121-1128.
- 28.- Bendelac, A. and Schwartz, R.H. 1991. CD4+ and CD8+ T cells acquire specific lymphokine secretion potentials during thymic maturation. *Nature.* 353:68-71.
- 29.- Hayakawa, K., Lin, B.T. and Hardy, R.R. . Murine Thymic CD4+ T cell subsets: a subset (Th0) that secretes diverse cytokines and over expresses the V $\beta$ 8 T cell receptor gene family. *J. Exp. Med.* 1992; 176:269-74.
- 30.-Sumida, T., Sakamoto, A., Murata, H., Makino, Y., Takahashi, H., Yoshida, S., Nishioka, K., Iwamoto, I and Taniguchi, M. Selective reduction of T cells bearing invariant V $\alpha$ 24 J $\alpha$ Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis. *J.Exp.Med.* 1995; 182:1163-68.

- 31.-Wilson, S.B., Kernt, S.C., Patton, K.T., Orban, T., Jackson, R.A., Exley, M., Porcellii, S., Schatz, D.A., Atkinson, M.A., Balk, S.P., Strominger, J.L. and Hafler, A.D. Extreme Th1 bias of invariant V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells in type 1 diabetes. *Nature*. 1998; 391:177-181
- 32.-Bengalagha, K., Weiss, A., Beavis, A., Teyton, L. and Bendelac, A. *in vivo* identification of glycolipid antigen specific T cells using fluorescents CD1d tetramers *J.Exp.Med.* 2000; 191:1895-1903.
- 33.-Matsuda, J.L., Naidenko, O.V., Gapin, L., Nakayama, T and Taniguchi, M. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J.Exp.Med.* 2000; 192:741-754.
- 34.- Karadimitris, A., Gadola, S., Altamirano, M., Brown, D., Woolfson, A., Klenerman, P., Chen, J.L.Koezuka, Y., Roberts, I.A., Price, D.A. Dusheiko, G., Miolistein, C., Fersht, A.,Luzzatto, L and Cerundolo, V.. Humman CD1d-glycolipid tetramers generated by *in vitro*, oxidative refolding chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98:3294-3298.
- 35.-Kronenberg, M. and Gapin, L.. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat. Rev Immunol.* 2002; 2:557-568.
- 36.- Pawson, T and Scott, J.D. 1997. Signaling Through Scaffold, Anchoring, and Adaptor proteins. *Science* 278:2075-2080.
- 37.-Fanning, A.S and Anderson, J.M. PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complex at the plasma membrane. *J Clin. Invest.* 1999; 103:767-772.
- 38.-Miyahara, M. Nakanishi, H., Takahashi, K., Satoh- Horikawa, K., Tachibana, K and Takai Y Inetraction of nectin with afadin is necessary for it's clustering at cell-cell contact sites but not for its cis dimerization or trans interaction *J. Biol. Chem.* 2000; 275:613-618

39.- Momose, Y., Honda, T., Inagaki, M., Shimizu, K., Irie, K., Nakanishi, H and Takai, Y. Role of the Second immunoglobulin-like loop of nectin in cell-cell adhesion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 293:45-49

40.-Yasumi,M., Shimizu, K., Honda, T., Takeuchi, M and Takai, Y. Role of each Immunoglobulin-like loop of nectin for its cell-cell adhesion activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 302:61-66.



SOCIEDAD MEXICANA DE INMUNOLOGIA, A.C.

Dr. César González-Berthia  
Presidente  
Dra. Iris Estrada Guerra  
Vicepresidenta  
Dr. Cristóbal López-Macías  
Secretaría-Tesorería  
Dra. Gloria Salceda Méndez  
Sub-Secretaría-Tesorería

México D.F. a 20 de marzo de 2006

Estimado Autor(a):

Por medio de este documento le permito informar a usted que el comité científico del XVII Congreso Nacional de Inmunología, que se celebrará en la Ciudad de Chihuahua Chih. del 5 de mayo de 2006, ha decidido aceptar su trabajo que quedó registrado de la siguiente manera:

Con número de resumen 04-13, Taller 4.4, Presentación oral. Será discutido en la comida académica, en la mesa 08.10. Deberá presentarse en la sesión de carteles 3.1 del 3 de mayo de 2006 de 11:30 a 13 hrs.

**EVALUACION DE LA EXPRESION DE LA PROTEINA CRTAM EN LESIONES DE LA PIEL**

Sánchez-Estrada E<sup>1</sup>, López-Gómez M<sup>1</sup>, Nogaño-Ramírez M<sup>2</sup>, Posño-López G<sup>1</sup>, Hernández-Cuezo A<sup>1</sup>, Brey-Guzmán G<sup>1</sup>, Hernández-Cuezo O<sup>1</sup>, Vega-Paredes M<sup>1</sup>, González-Bonilla O<sup>1</sup>, Huerta-Apéc S<sup>1</sup>, Ortiz-Llavonete V<sup>1</sup>

1. Departamento de Bioquímica Molecular, CIN-NESTAV 2. Servicio de Dermatología, Hospital Central Militar, 3. Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología CMF, "La Raza", IMSS, México, D.F., 4. Experimental Immunology Branch, National Cancer Institute, NIH, Bethesda USA

Las comidas académicas se llevarán a cabo sólo si se reúne el financiamiento necesario. Le recomendamos verificar en el portal del congreso [www.congronacional2006.com](http://www.congronacional2006.com) que su resumen no contenga errores así como las fechas de presentación en cartel, y en su caso de presentación en taller y comida académica.

La presentación del trabajo estará sujeta a que al menos uno de los autores se encuentre inscrito en el Congreso.

A su vez, le hacemos extensa la invitación para que asista al simposio sobre "Inmunidad y Tolerancia" el día 6 de mayo en El Divisadero de las Barranicas del Cobre.

Agradecemos,

Dr. César González-Berthia  
Presidente Sociedad Mexicana de Inmunología  
Jefe de la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología  
Centro Médico "La Raza" IMSS  
[smi@prociq.net.mx](mailto:smi@prociq.net.mx) Tel. 57246600 ext. 24521

2006, año del Bicentenario del natalicio del Benemérito de las Américas  
Don Benito Juárez García"

17 de Agosto de 2006

Ciudad de México, DF 06 66 28007

**Berenice Sánchez Arellano**  
IMSS

Estimado Investigador(a):

Tengo el agrado de informarle que La Coordinación de Investigación en Salud recibió 752 resúmenes para el XV Foro Nacional de Investigación en Salud. La selección de los trabajos se llevó a cabo después de un cuidadoso proceso de evaluación por pares, siendo elegidos 450 de ellos con las calificaciones más altas en cada uno de los campos del conocimiento de nuestros grupos de Investigación.

Me permito felicitarle porque su trabajo fue aceptado con número de cartel 16, y le informo que se presentará en la sesión No. 1 que se llevará a cabo del día Miércoles 20 de las 9:30 a las 11:30 hrs.

Como es de su conocimiento, el Foro se llevará a cabo del 15 al 22 de septiembre del presente año en el Centro Vacacional Oaxtepec, Huixtla. Los Investigadores con trabajo aceptado, contarán con hospedaje y alimentos durante todo el evento, así como transportación Co. de México - Oaxtepec - Cd. de México en autobuses que saldrán del CHN Siglo XXI.

Le recordamos que es necesario que registre su asistencia a este evento en la siguiente dirección de Internet: <http://bury.con.com.mx/congresos/2006/imsssalud2006/>

Así mismo, le informamos que la fecha límite para el registro es el 25 de agosto del presente año y que la fecha límite para cancelar o hacer cambios es el 05 de septiembre.

Atentamente,



**DR. JOSÉ DANTE AMATO MARTÍNEZ**  
Coordinador de Investigación en Salud  
Presidente del Comité Organizador

DAM:GG-KTT/mrp