



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Tesis

Efecto de la deficiencia de la cinasa Jak3 en la morfología de células dendríticas bajo el estímulo de quimiocinas.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA

Cinthya Beatriz Ibarra Gómez.

MÉXICO, D.F.

AÑO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: López Macías Constantino III R.

VOCAL: Profesor: Ortega Soto Enrique.

SECRETARIO: Profesor: García Zepeda Eduardo.

1er. SUPLENTE: Profesor: Moreno Eutimio Mario Adán

2° SUPLENTE: Profesor: Mancilla Herrera Ismael

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Eduardo Alberto García Zepeda.

SUSTENTANTE:

Cinthy Beatriz Ibarra Gómez

Agradecimientos.

Agradezco al **Dr. Eduardo García zepeda** por darme la oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio y por todo su apoyo.

A la **Dra. Gloria Soldevila** gracias por su apoyo en los momentos difíciles del laboratorio.

Dra. Teresa Fortoul van der Goes por la beca que tan amablemente me ofreció.

Al **Dr. Horacio Zamudio Meza, Dra. Selene Meza Perez y QFB Erika Haide Méndez Enríquez**, gracias por su invaluable ayuda en la realización de mi tesis.

A la máxima casa de estudios, la **UNAM** que me permitió realizar uno de mis más grandes sueños y por abrirme las puertas a logra muchos otros.

A la **Facultad de Química**, lugar en donde aprendí grandes lecciones académicas y de vida, donde viví una de las etapas más hermosas de mi vida, siempre extrañare mi hermosa facultad.

Agradecimientos.

Quiero agradecer primero que a nadie, a **Dios** que me permitió concluir esta etapa de mi vida
Gracias por tu inmenso amor.

También quiero reconocer la ayuda a mis muy queridos compañeros de laboratorio **Fernando, Selene, Erika, Cynthia, Ana, Cecilia, Gloria, Ana, Oscar, Mayte, Gisela, Patty** y a mis compañeros del laboratorio hermano **Raxana, Carlos, Ramses, German, Xochitl, Nely, Ebzadrel y Horacio** a todos ellos gracias por haberme recibido sin ninguna condición, por brindarme su ayuda y hacer que el laboratorio fuera mi segundo hogar.

Agradezco a todas las personas que formaron parte de este sueño, desde los que fueron parte de mi vida un breve momento, hasta lo que gracias a Dios siguen siendo parte de mi vida. Reconozco a todos mis profesores, importantes piezas en mi formación.

A **Edith, Alma, Araceli, Lupita, Mercedes, Dulce, Lety, Tere, Laura, Karina, Ivan, Nezahulcoyoc, Samuel, Stephany, Imelda, Ricardo, Tania** etc, todos ellos amigos y compañeros gracias por vivir con migo alegrías, frustraciones, tristezas, desvelos, aventuras, por su apoyo, por todos esos maravillosos momentos, por las lecciones de vida que me dieron cada uno de ustedes, por crecer con migo, por mostrarme de una y mil maneras la belleza de tener un amigo.

A mi familia, tíos, primos y mi abuelita **Atonía Nicolás Pérez** por sus consejos y apoyo, por siempre haber creído en mí, por alentarme y confortarme con sus dulces palabras.

Por ultimo quiero reconocer a las personas que me han ayudado a crecer, pero que sobre todo, me han enseñado a vivir, ellos son, la más grande mujer de mi vida, mi madre **Sonia Teresa Gómez Ruiz**, una mujer admirable, y mi querido hermano **Israel Gómez Ruiz** un hombre con mucho temple, sin los cuales mi vida no habría sido la misma, mil gracias por su incondicional apoyo, comprensión, confianza, tolerancia y amor, por vivir conmigo las más inmensas alegrías y llorar con migo las más profundas penas, gracias por soportar conmigo estos años, GRACIAS, no existen las palabras que puedan expresar el agradecimiento, respeto y amor que por ustedes siento. Los amo.

ABREVIATURAS.

CDs	Células Dendríticas.
CDs Jak3^{-/-}	Células Dendríticas deficientes de la cinasa Jak3.
CDs Jak3^{+/+}	Células Dendríticas silvestres.
CPA	Células Presentadoras de Antígeno.
HEV	Vénulas del endotelio alto.
NK	Célula T Natural Killer.
INFs	Interferones.
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos.
LPS	Lipopolisacáridos.
PRR	Receptores de reconocimiento de patrón.
TLR	Receptores tipo toll.
MT	Microtúbulos.
GMCSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos.
SFB	Suero Fetal Bovino.
CHO	Células ováricas de hámster chino.

ÍNDICE.

I RESUMEN.....	1
II MARCOTEORICO.....	3
<u>2.1 Generalidades del Sistema inmune.....</u>	<u>3</u>
2.1. 1 Respuesta inmune innata.....	3
2.1. 2 Respuesta inmune adaptativa.....	4
<u>2.2 Células Dendríticas.....</u>	<u>6</u>
2.2 .1 Origen y Función.....	6
2.2.2 <i>Características Morfológicas de las Células Dendríticas (CDs)</i>	8
2.3 <u>Quimiocinas.....</u>	10
2.3.1 <i>Receptores de quimiocinas en CDs</i>	11
2.3.2 <i>Receptor CCR7</i>	15
2.3.3 <i>Las quimiocinas CCL19 y CCL21 en CDs</i>	16
2.3.4 <i>Quimiocinas y su papel en la morfología de células dendríticas</i>	17
2.4 <u>Quimiocinas CDs yJak3.....</u>	18
2.4.1 <i>Vía de señalización Jak/Stat</i>	20
2.4.2 <i>Jak3</i>	22

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
IV HIPÓTESIS.....	26
V. OBJETIVOS.....	26
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	26
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	26
VI DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
VII RESULTADOS.....	34
VIII DISCUSIÓN.....	43
IX CONCLUSIONES.....	50
X PERSPECTIVAS.....	51
XI BIBLIOGRAFIA.....	52
XII APÉNDICE.....	57

I. RESUMEN.

Las células dendríticas (CDs) son las células presentadoras de antígeno (CPA) más eficientes. Una característica importante, que favorece la actividad presentadora de antígeno de estas células, es la formación de dendritas, lo que aumenta la superficie de contacto para la posible interacción con linfocitos T, además de desempeñar papeles importantes en la inducción de tolerancia inmunológica. Los progenitores de las CDs presentes en médula ósea parten hacia los tejidos, en los cuales residen en un estado inmaduro pero con alta capacidad fagocítica, que les permite capturar el antígeno, para posteriormente migrar a los órganos linfoides, donde se da la presentación de antígeno procesado a los linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺.

En el proceso de maduración y/o migración de células dendríticas hacia los órganos linfoides secundarios, la expresión de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 en la membrana de las CDs se asocian con la alta capacidad de presentación de antígeno. Sin embargo, se requieren de señales solubles como las inducidas por las quimiocinas, por lo que aumenta la expresión del receptor de quimiocina CCR7, cuyos ligandos CCL19 y CCL21, que se expresan en vénulas del endotelio alto (HEV) y ganglios linfáticos permitiendo que dichas células, migren del sitio inicial de contacto antigénico hacia los órganos linfoides.

Nuestro grupo reportó que la estimulación de timocitos con los ligandos de CCR7, inducen la fosforilación de la cinasa Jak3, así mismo se observó una deficiente migración de timocitos y células dendríticas carentes de la cinasa Jak3 al estímulo

de CCL19 y CCL21 en ensayos de quimiotaxis *in vitro*, así como la llegada de estas células a ganglios linfáticos *in vivo*.

Adicionalmente otro grupo reportó que la quimiocina CCL19 induce la rápida extensión de dendritas en CDs murinas purificadas de bazo, sin embargo, se desconoce la participación de la cinasa Jak3 en este proceso.

En el presente trabajo se evaluaron las características morfológicas de las CDs bajo la estimulación de las quimiocinas CCL19 y CCL21 en células derivadas de médula ósea de ratones silvestres y deficientes en la cinasa Jak3. Los resultados obtenidos indican que existen diferencias entre las CDs carentes de la cinasa Jak3, ya que estas presentan diferencias morfológicas per se, comparadas con las células que poseen la cinasa Jak3. Así mismo, se observó que la quimiocina CCL19 promueve un mayor número de dendritas en células Jak3^{+/+} comparadas con las observadas en las CDs Jak3^{-/-}, en contraste con lo observado bajo el estímulo de CCL21, donde las CDs que presentan un mayor número de dendritas son las CDs Jak3^{-/-}.

Los resultados obtenidos en este trabajo, nos permiten sugerir que existen diferencias morfológicas inherentes a la estimulación con las quimiocinas CCL19 y CCL21 en las CDs derivadas de médula ósea de ratones Jak3^{-/-} y Jak3^{+/+} y dado que existen diferencias entre cada población, podríamos sugerir que la molécula Jak3 podría estar participando directamente o indirectamente en cambios morfológicos inducidos por estas quimiocinas.

II. Marco teórico.

5.1 Generalidades del Sistema inmune.

Los patógenos ambientales son una amenaza constante, por lo que diversos organismos han desarrollado un sistema de defensa al que se le conoce como sistema inmune, que les permite hacer frente a estas amenazas[1].

El sistema inmune depende de complejas interacciones entre los órganos, tejidos, células y moléculas que lo componen [2].

Los órganos donde se lleva a cabo gran parte de la respuesta inmune se denominan órganos linfoides, los cuales se distribuyen en todo el organismo, para su estudio se dividen en órganos linfoides primarios y secundarios, dentro de los órganos linfoides primarios, se encuentran la médula ósea y el timo. Por su parte los órganos linfoides secundarios (también llamados periféricos), son los ganglios linfáticos, el bazo y los tejidos linfoides asociados a mucosas, las adenoides y el apéndice[1].

2.1.1 Respuesta inmune innata.

La respuesta inmune innata es considerada como la primera línea de defensa del organismo contra microorganismos; se compone por varios elementos, entre los cuales encontramos inicialmente las barreras físicas como piel y mucosas, también cuenta con componentes solubles, como el sistema del complemento e interferones (INFs) así como células endoteliales, células NK, además de células fagocíticas, entre las que destacan los macrófagos, neutrófilos y las células

dendríticas , macrófagos y neutrófilos. Estas células fagocíticas reconocen de manera inespecífica patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), tales como lipopolisacáridos (LPS), carbohidratos, etc, que se encuentran conservados en diversos patógenos; este reconocimiento se da mediante de receptores de reconocimiento de patrón (PRR), tales como los receptores tipo toll (TLR), de este modo son capaces de reconocer y responder ante una diversa gama de patógenos [3].

2.1.2 Respuesta inmune adaptativa.

Por otra parte la inmunidad adaptativa, se caracteriza por un conjunto de moléculas efectoras y células, capaces de reconocer eficientemente y específicamente prácticamente cualquier antígeno, entre ellos patógenos.

Una vez que las células presentadoras de antígeno (CPA) de sistema inmune innato, han reconocido un antígeno este es procesado intracelularmente, lo que puede llevar a que las células migren a órganos linfoides secundarios y presenten el antígeno vía moléculas MHC I o II a células del sistema inmune adaptativo como los linfocitos T, que reconocen mediante el receptor (TCR) el antígeno procesado, promoviendo así su activación y por tanto expansión y diferenciación. Estos linfocitos activados se convierten en linfocitos efectoras que migran y pueden llegar al sitio donde inicialmente se reconoció el antígeno. Las células T CD4 activadas secretan citocinas, que permiten la activación de los macrófagos, NK y eosinófilos. Las células T CD8 provocan la muerte de células infectadas. Los linfocitos B se activan en los ganglios linfáticos después de tener contacto con los

linfocitos T vía moléculas como CD40 y CD80, que por un lado puede inducir la generación de linfocitos B de memoria o madurar en células plasmáticas productoras de anticuerpos que neutralizan el patógeno. Hasta ahora las evidencias muestran después de la interacción con los linfocitos, las CD80 mueren por apoptosis [3].

En mamíferos, la respuesta inmune adaptativa, tiene tres características muy importantes:

a) Poseen un amplio repertorio de linfocitos B y linfocitos T antígeno específicos, permitiendo así que el sistema inmune reconozca una gran variedad de antígenos con alta especificidad.

b) Memoria inmunológica que le permite al organismo responder eficientemente, ante la reinfección con el mismo agente y puede ser inducida por vía natural (infecciones) y/o de manera artificial (vacunación).

c) Tolerancia inmunológica que es un mecanismo de control para evitar la respuesta inmune pro inflamatoria hacia antígenos propios y antígenos inocuos como los alimentos etc [2].

2.2 Células Dendríticas

Las CDs son las CPA más eficientes que conectan al sistema inmune innato con el sistema inmune adaptativo.

Las CDs se pueden encontrar en tejidos no linfoides como piel y mucosas, entre ellas se encuentran las denominadas células de Langerhans, que se ubican en la epidermis y otros epitelios escamosos como en la vagina, ano, cuello uterino, faringe y esófago superior; las CD plasmacitoides, localizadas en sangre y órganos linfoides, CDs interdigitantes, en el área de linfocitos T, en los tejidos linfoides secundarios como bazo, ganglios linfáticos etc. CDs de médula tímica y CDs foliculares [4][5].

2.2.1 Origen y función.

Los progenitores de las CDs murinas provienen de células madre CD34⁺, que se encuentran en médula ósea, de aquí se pueden genera dos poblaciones (Tabla 1):

1) Las células dendríticas plasmacitoides, también conocidas como CD123⁺ (linfoides) o células productoras de IFN- tipo 1. En su estado inmaduro muestran baja capacidad endocítica y fagocítica, sin embargo, pueden producir 1000 veces más IFN- que cualquier otro tipo de célula, en respuesta a estímulos virales. Dado que los progenitores que dan lugar a esta población, tienen además el potencial de dar origen a los linfocitos T y a las células NK, se propuso anteriormente que las CDs CD8⁻ eran de origen mieloide, mientras que las

CD8⁺ de origen linfoide, pero se demostró que ambas poblaciones pueden originarse a partir de ambos precursores [6][7][8][9].

2) De las células dendríticas mieloides o convencionales, se pueden distinguir dos sub poblaciones de precursores que circulan en la sangre: un grupo de células mieloides CD14⁺,CD11c⁺, que pueden poblar tejidos como piel y bazo. Por su parte, las CD14⁻, CD11c⁺ se encuentran restringidas anatómicamente a la zona intersticial y a la epidermis, (son capaces de diferenciarse en células de Langerhans) [6][7][8][9].

Tabla 1. Marcadores fenotípicos de progenitores de CDs presentes en sangre periférica.			
Marcadores fenotípicos	Progenitores de CDs mieloides		Progenitores de CDs plasmacitoides.
	CD14 ⁻	CD14 ⁺	
HLA-DR	++	++	+
CD11c	+	+	-
CD11b	+	+	-
CD1a	+	N	
CD123	+/-	N	+++
TLR2	+	+	
TLR4	+	+	-
TLR9	-	-	+
TLR10	-	-	+

(n) No definido, tabla tomada y modificada de[9].

Los precursores de las CD salen de médula ósea hacia los distintos tejidos, donde residen como CD inmaduras. Las CD inmaduras se caracterizan por la expresión de CD11c, CD86^{low}, CD80^{low}, CD54^{low}, CD58^{low}, CD40^{low}, CD25^{low}, alta concentración intracelular de MHC II, además poseen alta capacidad fagocítica que les permite capturar antígenos; para posteriormente migrar a órganos linfoides secundarios y presentar antígenos en el contexto de moléculas de complejo principal de histocompatibilidad de clase (MHC) II o I a los linfocitos T cooperadores CD4⁺ y linfocitos T citotóxicos CD8⁺, respectivamente [3][10].

Durante el trayecto de las CD hacia a los órganos linfoides secundarios (el ganglio más cercano al sitio de contacto antigénico), las células llevan a cabo un proceso denominado de maduración, relacionado con que las CD reducen su capacidad fagocítica y expresen altos niveles de MHCII en la superficie celular, moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 y CD40 en la superficie, que se asocian con la alta capacidad de presentación de antígeno, así como la expresión diferencial de receptores de quimiocinas e integrinas[4].

2.2.2 Características morfológicas de las células dendríticas.

Una característica importante de las células dendríticas es que tienen una morfología clásica, definida por la presencia de numerosas y largas proyecciones citoplasmáticas denominadas dendritas (Figura 1), que proponen, puede aumentar la eficiencia en el contacto con el antígeno y/o en la interacción con linfocitos, sin embargo, existen poca información que apoye esta hipótesis. Los eventos

moleculares que determinan la morfología dendrítica aun no se entienden completamente. Diversos experimentos, donde se tomaron fotografías en un lapso de tiempo determinado, demuestran que las dendritas son estructuras extremadamente dinámicas, ya que hay contracción y retracción continua, de estas estructuras en diferentes direcciones[12].

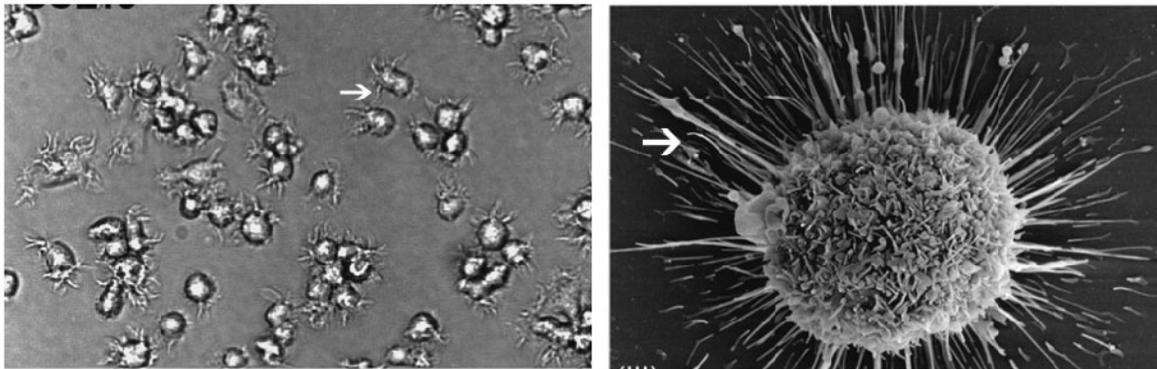


Figura 1. Células dendríticas de bazo en cultivo, la flecha indica una dendrita (izquierda), célula dendrítica derivada de médula ósea (derecha) la flecha indica una dendrita. Figura tomada de [13][11].

En cultivos *in vitro* de CDs con factor estimulante de colonias de macrófagos y monocitos (GM-CSF) e IL-4, se ha demostrado que la membrana de las CDs hace “*ruffling*”(ondulaciones de membrana) y muestra motilidad. Sin embargo, aunque muestren muchas de las características de CDs de tejido, estas células no forman prominentes dendritas, como las que se muestran *in vivo*, a pesar de esto los cultivos *in vitro*, siguen siendo la herramienta mas utilizada[14] [15] [16].

Para la formación de dendritas, se requiere la presencia de la integrina $\alpha 1$ -(CD29) en la superficie de CDs y de fibronectina como matriz extracelular. Esta interacción se produce en los contactos focales, conformados en las puntas de las dendritas, que contienen altas concentraciones de proteínas de unión al citoesqueleto, como $\beta 1$ -integrinas, actina, paxillina, vinculina y talina. Además, se sabe que las dendritas contienen una amplia red de microtúbulos (MT), que en presencia de colchicina (inhibidor de microtúbulos) estas se contraen, lo que sugiere que los MT son esenciales para la estabilidad de estas estructuras. Sin embargo, esta formación es transitoria, y se retraen rápidamente [12].

La formación de dendritas requiere también de la reorganización del citoesqueleto de actina, esta reorganización del citoesqueleto, ocurre gracias a la actividad coordinada de los miembros de la familia de Rho GTPasas, principalmente las Rho A, Rac1 y Cdc42, implicados en diversos procesos celulares, incluyendo la motilidad celular, la fagocitosis y la división celular [17][11].

Se ha reportado que existen quimiocinas que pueden promover la extensión de dendritas en células dendríticas maduras provenientes de bazo[11].

2.3 Quimiocinas.

Las quimiocinas participan activamente en el control de la migración de las células del sistema inmune. La movilización de las distintas poblaciones de CDs a los

tejidos y órganos linfoides, son fundamentalmente regulados por estas moléculas[18].

Las quimiocinas son citocinas que originalmente se descubrieron por sus propiedades quimioatrayentes. Son proteínas de peso molecular bajo (8-10 kDa) que se componen de un solo polipéptido, de una longitud de aproximadamente 70-100 amino ácidos. Tienen entre un 20 a un 95 % de similitud en las cadenas de amino ácidos entre si, incluyendo cuatro cisteínas 2 de ellas en la región amino terminal, que nos permite clasificarlas de acuerdo a su estructura en cuatro familias: C, CC, CXC y CX3C [19].

Diferentes tipos de células, incluidas las del estroma, epiteliales, leucocitos y las células endoteliales, secretan quimiocinas, en condiciones homeostáticas o bajo condiciones inflamatorias. En condiciones homeostáticas, las quimiocinas dirigen la migración, localización anatómica, coordinan el desarrollo y diferenciación de leucocitos este modo regulan la respuesta inmune innata y adaptativa. Hasta la fecha, se han identificado más de 50 diferentes quimiocinas y 21 receptores [19].

2.3.1 Receptores de quimiocinas y CDs.

Las quimiocinas inducen activación y migración mediante la unión con sus receptores de superficie celular los cuales son receptores de siete dominios transmembranales, acoplados a proteínas G (7TM-GPCR), estos receptores se

dividen en cuatro familias, de acuerdo a las características de sus ligandos específicos: CXCR (1-7), CCR(1-10), CXXXCR(1) y XCR(1-2) [19][20][21][22].

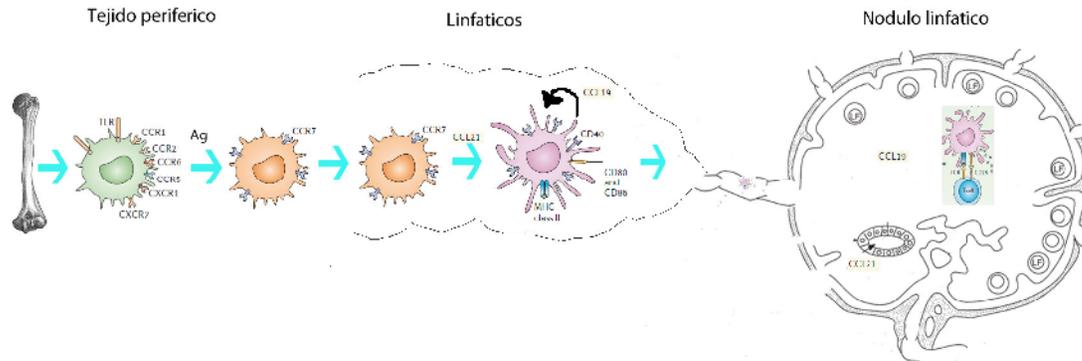


Figura 2. Las células dendríticas inmaduras expresan receptores de quimiocinas que aseguren su localización en los tejidos periféricos. Después de la exposición al antígeno las CD modifican la expresión de receptores de quimiocinas, particularmente el receptor CCR7 aumenta, favoreciendo la migración de estas células hacia los ganglios linfáticos. Los ligandos de CCR7 son CCL19 y CCL21 que se expresan constitutivamente en la zona de linfocitos T, CCL21 también es expresada por CD interdigitantes, vénulas de endotelio alto, y endotelio linfático. Figura tomada y modificada de [23][24].

Durante el proceso de maduración, las CD sufren cambios en la expresión de sus receptores de superficie, especialmente en la expresión de los receptores de quimiocinas. Las CD inmaduras expresan CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6 y CXCR4. Cuando las CD maduran disminuye la expresión de estos receptores (ver tabla 2) y aumentan la expresión del receptor CCR7. Estos cambios en la expresión de receptores permite a los precursores de las CD de médula ósea

migrar a tejido periférico y de aquí a órganos linfoides secundarios (Tabla 2 y Figura 2) [18].

Tabla.2 Receptores de quimiocinas expresados en CD en diferentes estados de maduración.

Receptor	Precursor de CD Mo	CD inmadura			CD madura			Ligando
		CD Mo	Mieloide	Plasmacitoide	CD Mo	Mieloide	Plasmacitoide	
CCR1	Si	Si	B/N	B/N	No	No	No	CCL3, CCL5, CCL7
CCR2	Si	Si	Si	Si	No	No	No	CCL2, CCL8, CCL13
CCR3	---	---	B/N	B/N	---	No	No	CCL11, CCL24
CCR4	---	---	B/N	B/N	---	No	No	CCL17, CCL22
CCR5	Si	Si	B	Si	No	No	No	CCL3, CCL4, CCL5
CCR6	Si	Si	B/N	B/N	No	No	No	CCL20
CCR7	No	No	No	No	Si	Si	Si	CCL19, CCL21.
CXCR1	Si	Si	B/N	B/N	No	No	No	CXCL1, CXCL6, CXCL7, CXCL8.
CXCR2	Si	Si	B/N	B/N	No	No	No	CXCL1, CXCL2, CXCL3
CXCR3	Si	Si	B	Si	No	No	No	CXCL9, CXCL10, CXCL11
CXCR4	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	CXCL12
CXCR5	No	No	B/N	B/N	Si	No	No	CXCL13

(CD Mo) CDs derivadas de *in vitro* a partir de monocitos utilizando las citocinas GMCSF e IL4, CDs mieloides y plasmacitoides de sangre periférica, (B/N) bajo a nula expresión, (B) Baja expresión, (---) no determinado. Tabla tomada y modificada de [25][26].

Como anteriormente se menciono los receptores de quimiocinas están acoplados a proteínas G, por lo que muchos eventos de señalización inducidos por quimiocinas son inhibidos por la toxina de pertusis, sugiriendo que los receptores de quimiocinas están ligados principalmente a proteínas G_i.

Las proteínas G heterotriméricas, están constituidas de 3 subunidades G_i, G_q y G₁₂; su activación consiste en la unión de GTP a G_i y liberación de GDP lo que lleva a una cascada de activación intracelular que incluye la generación de inositol trifosfato (IP3), liberación de calcio intracelular, activación de proteína cinasa C (PKC), además de activar proteínas GTPasas tales como Ras, Rac y Rho que participan activamente en la motilidad celular. Así, los receptores de quimocinas activan múltiple vías de señalización intracelular que regulan la maquinaria intracelular necesaria para promover la motilidad celular [27].

A nivel celular dos eventos principales se desencadenan cuando un receptor de quimiocina interacciona con su ligando:

1) La activación de integrinas que ocasiona la adhesión al endotelio, 2) la polarización del citoesqueleto que lleva a la migración, debido a la formación de gradientes quimiotácticos, Las quimiocinas organizan el tráfico celular provocando la migración ya sea dirigida o al azar [28].

Existen dos tipos principales de movimiento cuando las células se encuentran sobre una superficie en la cual se pueden adherir, haptoquinesis y Haptotaxis.

La haptoquinesis (del griego “haptesthai” que significa “tocar” y “quinesis” que significa “movimiento”) este es el movimiento que una célula realiza al azar a lo largo de una superficie y haptotaxis (donde “Taxis” significa orden”) pretende expresar movimiento direccional de una célula a lo largo de una superficie, donde la dirección puede ser dada por un gradiente de quimiocinas [29].

2.3.2 Receptor CCR7.

CCR7 es un receptor importante en el proceso de migración de las CD de tejido periférico a la zona de linfocitos T en los ganglios linfáticos. Los niveles del receptor CCR7 aumentan a medida que las CDs maduran. Se ha reportado que la estimulación *In vitro* con LPS promueve la maduración de CD y expresión del receptor CCR7 [25].

A pesar de que el aumento en la expresión de CCR7 suele estar relacionado con el incremento de moléculas co-estimuladoras en la superficie de las CDs, existen evidencias que muestran que la expresión de dicho receptor es independiente al proceso de maduración. Por ejemplo la fagocitosis de células apoptóticas opsonizadas con iC3b regula negativamente la expresión de MHCII y CD86 en CD inmaduras pero aumenta los niveles de CCR7 [30]. En el ratón deficiente de CCR7 no se encuentran células de Langerhans CD11c⁺ MHCII^{hi} CD40^{int}, CD80^{low}, CD86^{low} que son CD que han migrado a ganglios linfáticos sin estímulo pro inflamatorio previo, con el fin de mantener la homeóstasis, con lo cual se demuestra que CCR7 es esencial para la migración de CD en estado basal [31].

2.3.3 Las quimiocinas CCL19 y CCL21 en CD4s.

Al receptor CCR7 se le conocen como ligandos dos quimiocinas CCL19 (Epstein-Barr virus-induced receptor ligand chemokine [ELC]) y CCL21 (secondary lymphoid tissue chemokine [SLC])[18].

CCL19 y CCL21 se expresan constitutivamente en la zona de linfocitos T dentro de los órganos linfoides secundarios, por otra parte CCL21 también es expresada por CD4s interdigitantes, vénulas de endotelio alto, y endotelio linfático, donde promueve la adhesión y quimiotaxis de CD4s. Con respecto a la quimiocina CCL21 en ratón se encontraron dos genes denominados genes SLC-ser y SLC-leu de acuerdo con los productos que codifican, los cuales difieren en un solo aminoácido y en patrones de expresión, puesto que SLC-ser se expresa en tejido linfoide y SLC-leu en tejido no linfoide [32].

Se sabe que tanto CCL19 como CCL21 se unen al receptor CCR7 con una afinidad similar, aunque también difieren en su capacidad para unirse al heparán sulfato de sodio, esta diferencia se debe a una extensión de 40 aminoácidos en el carboxilo terminal de CCL21, que falta en CCL19; esta región inmoviliza a CCL21 al heparán sulfato mientras que CCL19 permanece en gran parte soluble [28].

La forma inmovilizada en la superficie de la quimiocina CCL21, anclada a heparán sulfato, causa movimiento al azar de CD4s, puesto que desencadena la adhesión mediada por integrinas. En contacto directo de las CD4s con CCL21 trunca los residuos de anclaje de CCL21, lo cual provoca la liberación de la quimiocina de la

fase sólida. Por lo tanto CCL19 y CCL21 solubles desencadenan movimiento quimiotácticos, pero no adherencia [29].

2.3.4 Quimiocinas y su papel en la morfología de células dendríticas.

Además de todas las funciones antes mencionadas acerca de las quimiocinas CCL19 y CCL21, cabe señalar que en presencia de dosis altas (100ng/ml) de CCL19 las CD de bazo, extienden sus dendritas a partir de los 30 min y se mantienen extendidas 24 horas post estímulo; por el contrario, bajo el estímulo con CCL21, se observan modestos cambios morfológicos después de dos horas de estímulo (figura 3). Los cambios inducidos por la quimiocina CCL19 son abatidos si las células se pre-tratan con toxina *pertussis*, la cual inhibe proteínas Gi / Go y dado que el receptor CCR7 esta acoplado a una proteína Gi, dicho tratamiento también inhibe la migración inducida por los ligandos de CCR7 [11].

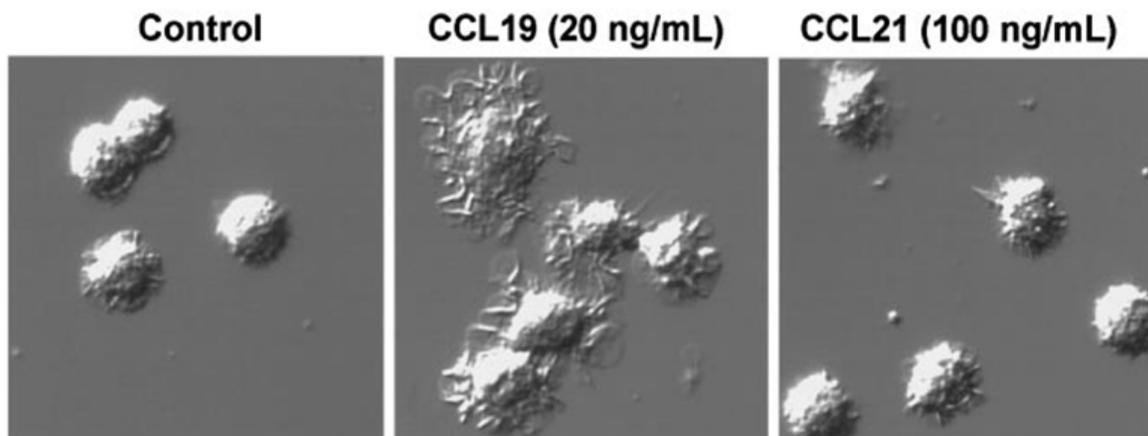


Figura 3. Línea celular de CDs BC1 provenientes de esplenocitos de BALB/c maduras y tratadas con CCL19 o CCL21. Figura tomada y modificada de[11].

Al tratar a las células con la toxina B de *Clostridium difficile* and que es un inhibidor de Rho GTPasas como Rac y Cdc42 se inhibe el efecto de CCL19 sobre la morfología celular, por lo cual se sigue que esas moléculas participan de forma positiva en la formación de dendritas[11].

Al tratar a las CDs con un inhibidor de Rho (Y-27632), se favorece la extensión de dendritas promovidas por el estímulo de CCL19, por lo cual se ha propuesto que la GTPasa Rho podría estar participando de manera negativa en la formación de dendritas en CD[11].

Por otra parte, Cdc42 es un fuerte activador de Rac, mientras que las acciones de Rac y Rho contrarrestan entre sí. Por lo tanto la morfología celular parece ser el resultado de acciones recíprocas de estas proteínas [11].

2.4 Quimiocinas, CDs y Jak3.

Trabajos anteriores en nuestro laboratorio, evidenciaron que las quimiocinas CCL19 y CCL21 inducen la fosforilación de la cinasa Janus 3 (Jak3) en timocitos y linfocitos T [22]. Así mismo se observó que CDs derivadas de médula ósea migran bajo el estímulo de las quimiocinas CCL19 y CCL21 tanto *in vivo* como *in vitro*. Contrariamente a lo observado en CDs derivadas de médula ósea de ratones knock-out de la cinasa Jak3 (Jak3^{-/-}) en las que tras ser estimuladas con dichas quimiocinas la migración se disminuye de forma significativa, aun cuando la expresión del receptor CCR7 es similar en ambos casos, lo cual corrobora que la cinasa Jak3 esta involucrada en la señalización del receptor CCR7 en CDs [21].

De forma adicional existen diversos reportes que muestran que los receptores de quimiocinas señalizan a través de la vía Jak / Stat como se resume en la Tabla 3 [22].

Tabla 3. Receptores de quimiocinas y la vía de señalización Jak/ Stat			
Receptor de quimiocina	Jak	Stat	Tipo celular
CCR1	Jak1	Stat1/3	Macrófagos sinoviales de rata.
CCR2/CCR2 B	Jak2	Stat3	HEK 293/línea de monocitos humanos
CCR2	Jak2	Stat1/3	Macrófagos sinoviales de rata
CCR2	Jak2	Stat3/5	Macrófagos de peritoneo
CCR5	Nd	Stat1/3	Linfocitos T humanos MOLT-4/Jurkat
	Jak2/3	Stat1/3	MPI células T humanas
	Jak2	ND	CHO/HEK293
	Jak1	Stat5	HEK 293
	Jak1	Stat1/3	Macrófagos sinovial de rata.
	Jak2/3	ND	Microglia humana
CCR7	Jak2	ND	Linfocitos T murinos
	Jak3	ND	Linfocitos T murinos, CDs.
CCR9	Jak3	ND	Timocitos murinos
CXR4	Jak2/3	Stat1,2,3,5b	Células T humanas (MOLT-4)
	Jak3	ND	Timocitos murinos
	Jak1/3, Tyk2	Stat 2/4	Lina de progenitores humanos(CTS)
CX3CR1	Jak3	Stat5	Células de endotelio humano

Tabla tomada y modificada de [22].

2.4.1 Vía de señalización Jak/Stat.

Las proteínas de Janus son proteínas cinasas con un peso aproximado de 120 a 140 KDa; estas proteínas se han descrito en *Drosophila melanogaster* (Mosca de la fruta), aves, peces y mamíferos, en estos últimos se han identificado cuatro miembros denominados Jak1, Jak2, Jak3 y Tyk2, todos estos se encuentran distribuidos de manera ubicua, excepto Jak3 que se localiza predominantemente en células de origen hematopoyético. Sin embargo, Jak3 también se ha encontrado en menor proporción en células de músculo liso y endotelio; a nivel celular estas moléculas están asociadas a receptores de citocinas. Jak1 y Jak3 se encuentran asociadas a los receptores de citocinas que tienen la cadena común (c) IL -2, IL-4, IL-7, IL-9, IL- 15 e IL-21[33].

Existe evidencia de que al unirse una citocina a su receptor, se induce un cambio conformacional en el receptor, que provoca que las Jaks (que se encuentran asociadas constitutivamente al dominio intracelular del receptor) se aproximen, lo que permite su fosforilación recíproca en residuos de tirosina. Una vez activadas las Jaks, van a fosforilar tanto al receptor como a las Stats, estas últimas se dimerizan a través de su dominio SH2 y se translocan al núcleo, donde se unen a elementos de respuesta específica, regulando la transcripción de genes [46].

En cuanto a los receptores de quimiocinas, existe evidencia de que la unión de la quimiocina a su receptor, induce la dimerización del receptor y con ello cambios conformacionales, que permiten el reclutamiento y activación de Jaks, las proteínas Stats se asocian al receptor y son fosforiladas por las Jaks, una vez

dimerizadas las Stats se translocan al núcleo e inducen la transcripción de genes. Algunos reportes señalan que la molécula Jak es requerida para la asociación de proteínas G a algunos receptores de quimiocinas. Las quimiocinas inducen disociación de proteínas G_i en sus subunidades G_o y G_i, G_i inhibe adenilato ciclasa y activa la tirosina cinasa Src, lo que lleva a la activación de MAP cinasa, PI3 cinasa.

La subunidad G_q induce la fosforilación de fosfolipasa C (PLC) activando la generación de IP₃ y diacil glicerol (DAG) que inducen la liberación de flujos de calcio intracelular y activación de proteína cinasa C (PKC) respectivamente; la subunidad G₁₂ también induce la activación de la PI3-cinasa que activa efectores río abajo involucrados en el rearrreglo del citoesqueleto, tales como las GTPasas Rho Rac y Cdc42, implicados en la adhesión y migración celular (figura 4) [22].

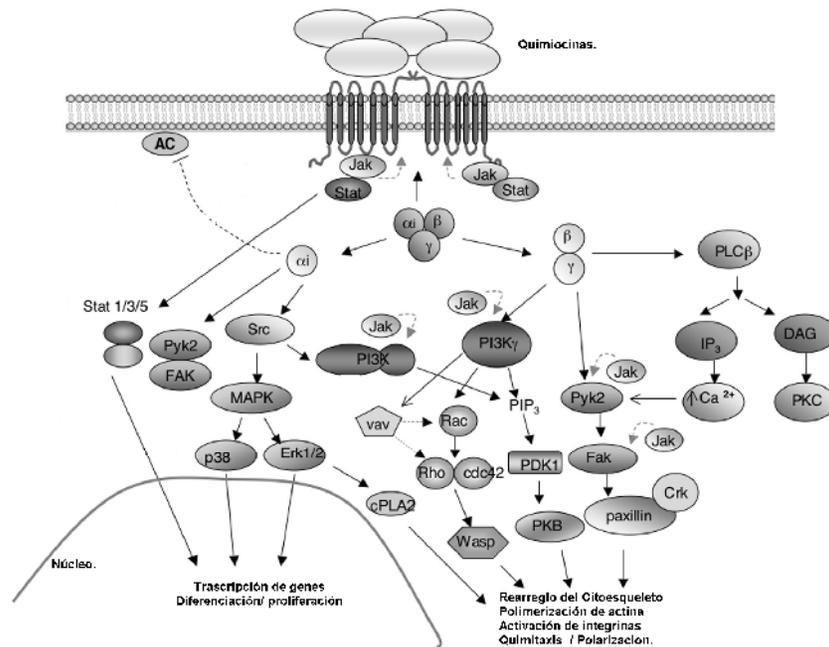


Figura 4. Vías de señalización de receptores de quimiocinas. Figura tomada y modificada de[22].

2.4.2 Jak3.

La molécula Jak3 es una tirosina cinasa importante en el desarrollo de células linfoides y CD8⁺ por lo que la ausencia de Jak3 puede afectar a algunas poblaciones de CD8⁺, CD11c⁺, y CD8 de bazo; sin embargo, Jak3 no es crucial para el desarrollo de CD8 derivadas de la médula ósea. Por otro lado las CD8 carentes de Jak3 producen más IL-12 e IL-10 en respuesta a la activación por TLR lo que aumenta la diferenciación Th1[34].

Como se mencionó anteriormente se ha reportado que el receptor de quimiocina CCR7 se encuentra asociado con Jak3, esta última molécula cuenta con un peso

de 120 KDa. El gen de Jak3 se localiza en el cromosoma 8 en ratón y consta de 23 exones, por otra parte en el humano se localiza en cromosoma 19 y cuenta con 19 exones y 18 intrones.[35]

Interesantemente se ha encontrado que aproximadamente del 67-74% de los casos de inmunodeficiencia severa combinada (SCID) en humanos, se deben a mutaciones en los genes de IL-7R, γ_c y Jak3 como anteriormente se mencionó Jak3 se asocia a la cadena γ_c de algunos receptores de citocinas, entre ellos IL-7R, por lo que una pérdida en la función de cualquiera de los tres, da como resultado la misma patología, y características inmunofenotípicas similares como son la ausencia de células T y NK, aunque poseen células B estas no son funcionales [36].

Existe un modelo murino deficiente de la cinasa Jak3 (Jak3^{-/-}) cuyo fenotipo es muy similar al de los pacientes con inmunodeficiencia severa combinada (SCID), este ratón se caracteriza por la ausencia de placas de Peyer y de ganglios linfáticos periféricos, a excepción del mesentérico. Desde el nacimiento se puede apreciar hipoplasia tímica ya que contienen aproximadamente de un 0.5% a 10 % del número normal de células que en los ratones silvestres Jak3^{+/+}. Sin embargo, a pesar del bajo número de timocitos totales, los números de linfocitos CD4 y CD8 en periferia son relativamente normales. Además existe una disminución dramática en los niveles de linfocitos B periféricos debido a un bloqueo en el desarrollo Pre B en médula ósea, y con una disminución en CD45R⁺/CD43⁻ y CD45R⁺/IgM⁺.

En periferia los linfocitos T están presentes en un número normal o aumentado sin embargo son funcionalmente incompetentes. Estos ratones también carecen de células T $\gamma\delta$, así como de células NK, puesto que la señalización a través de IL-7 es importante durante el desarrollo de estos linfocitos. En sangre periférica se observa un aumento en el número de neutrófilos y células de la estirpe monocítica; la celularidad en la médula ósea es similar a la de los ratones silvestres. Todos estos defectos confirman la importancia de Jak3 sobre el linaje hematopoyético [37] [35].

III. Planteamiento del problema.

La interacción de CCR7 con sus ligandos CCL19 y CCL21 induce la migración de CD4⁺CD25⁺ células T reguladoras (Tregs) maduras a órganos linfoides; un efecto de dicha interacción es la activación de la cinasa Jak3, por lo que las CD4⁺CD25⁺ células T reguladoras carentes de Jak3 tienen deficiente respuesta quimiotáctica hacia estas quimiocinas. Adicionalmente, se ha reportado que ambas quimiocinas inducen la formación de dendritas en CD4⁺CD25⁺ células T reguladoras, siendo el efecto de CCL19 mayor que el de CCL21 que sólo induce una pobre formación de dendritas, afectando su morfología.

Por lo anterior se infiere que, el efecto de dichas quimiocinas sobre la morfología de las CD4⁺CD25⁺ células T reguladoras, podría verse afectado en ausencia de Jak3.

Por lo tanto, este trabajo de investigación se plantea analizar la participación de la cinasa Jak3, en los cambios morfológicos inducidos por las quimiocinas CCL19 y CCL21 en las CD4⁺CD25⁺ células T reguladoras derivadas de médula ósea de ratones silvestres y deficientes para Jak3.

IV. Hipótesis:

Los cambios morfológicos inducidos por CCL19 y CCL21 en CD4s derivadas de médula ósea de ratones Jak3^{+/+}, se verán afectados en CD4s deficientes de Jak3, debido a que la participación de Jak3 es importante para el efecto de dichas quimiocinas sobre en la morfología de CD4s.

V. Objetivos:

1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si bajo el estímulo de las quimiocinas CCL19 y CCL21 se inducen cambios morfológicos en CD4s derivadas de médula ósea de ratones Jak3^{+/+} y CD4s derivadas de médula ósea de ratones Jak3^{-/-}.

2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

Analizar la morfología de CD4s derivadas de médula ósea de ratones Jak3^{+/+} y CD4s derivadas de médula ósea de ratones Jak3^{-/-} antes y después de la estimulación con CCL19 o CCL21 mediante video microscopía.

Determinar si bajo el estímulo de las quimiocinas CCL19 o CCL21 las CD4s derivadas de médula ósea de ratones Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-} son capaces de extender dendritas y si existe alguna diferencia entre las dos poblaciones celulares, mediante microscopía electrónica de barrido.

VI Diseño experimental.

Para todos los experimentos aquí descritos se utilizaron ratones hembras C57BL/6 de 8 a 12 semanas de edad silvestres y knock-out de la cinasa Jak3 (Jak3^{-/-}), adquiridos en Jackson Laboratories (Bar Harbour, ME, USA). Los ratones se mantuvieron con comida y agua *ad libitum* en condiciones de esterilidad en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Obtención y derivación de células dendríticas a partir de médula ósea.

Se obtuvieron CDs derivadas de médula ósea de ratones Jak3^{-/-} y Jak3^{+/+} de cada ratón por separado y se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se extrajo el fémur y la tibia de cada ratón, se removió el músculo completamente, con gasa estéril. Los huesos se lavaron con una solución de etanol al 70% (5 min) en condiciones de esterilidad, y posteriormente se lavaron con PBS estéril. Las epífisis de los huesos se cortaron con tijeras esterilizadas. Con una jeringa se pasaron 5 ml de medio RPMI sin suero por el interior del hueso para extraer todas las células de médula ósea. Se tomó una muestra de 100ul y se lisaron los eritrocitos con cloruro de amonio al 0.83 %, por 5 min para poder contar las células de médula ósea, las células se centrifugaron a 1800 rpm durante 5min. Se retiró el sobrenadante y resuspendió la pastilla en 5ml de medio RPMI con 10% suero fetal bovino (SFB).

Se colocaron 5 millones de células en una caja Petri de 100 mm, en un volumen final de 10ml de medio RPMI con 10% SFB y 15% de sobrenadante de células

CHO (células de ovario de hámster chino) productoras de GMCSF, es decir 8.5ml de medio RPMI con 10% SFB, 1.5ml de sobrenadante de células CHO productoras de GMCSF. Al día 3 de cultivo se agregaron 8ml totales de medio RPMI con 10% SFB y con 10% de sobrenadante de células CHO productoras de GMCSF: 6.8ml de RPMI con 10% SFB, 1.2ml de sobrenadante de células CHO productoras de GMCSF, al día 5 se agregó 1µg de LPS de *Escherichia coli* de (sigma)/ ml y se encubaron por 24horas, al sexto día de cultivo se obtuvieron CDs Maduras.

Análisis de expresión de moléculas de superficie de CDs.

Para analizar la expresión de marcadores en la superficie de las CDs se llevó a cabo una tinción con anticuerpos acoplados a distintos fluorocromos y se analizaron por citometria de flujo (FACS). Se tomaron CDs del día 5 (inmaduras) y del día 6 (maduras) tanto Jak3^{-/-} como Jak3^{+/+}. Para analizar el fenotipo del estado de maduración de las CDS se utilizaron los anticuerpos anti-CD11c, anti-MHC II, anti- CD80 , anti- CD86, anti-CCR7.

Se colocaron 250 000 células en tubos de microcentrifuga Eppendorf y se centrifugaron a 1800 rpm, se retiró todo el sobrenadante, y se añadieron los anticuerpos como sigue:

No de muestra	Anticuerpos
1	20 µl de PBS.

2	1 μ l de cada uno (anti-CD80+ anti- CD11c + anti- MHC II) y 17 μ l de PBS.
3	1 μ l de cada uno (anti- CD86+ anti- CD11c + anti- MHC II) y 17 μ l de PBS.
4	20 μ l de PBS.
5	1 μ l de (anti- CD80 o anti- CD86) y 19 μ l de PBS.
6	1 μ l de anti-CD11c y 19 μ l de PBS.
7	1 μ l de anti-MHC II y19 μ l de PBS.
8	20 μ l de anti-CCR7 durante 1 hora.

La reacción se incubó 20 min a 4°C, protegida de la luz, trascurridos los 20 min. se lavó 2 veces con de PBS 1 X y se centrifugaron 5 min. a 1500 rpm.

La segunda ronda de anticuerpos se realizó como sigue:

No. de muestra	Anticuerpos
1	20 μ l de PBS
2	1 μ l de estreptavidina APC +19 μ l de PBS
3	1 μ l de estreptavidina APC +19 μ l de PBS

4	1 µl de estreptavidina APC +19 µl de PBS
5	20 µl de PBS
6	20 µl de PBS
7	1 µl de estreptavidina APC +19 µl de PBS
8	20 µl de PBS

Se Incubaron por 20 min. a 4°C, protegidos de la luz , trascurridos los 20 min, se lavaron 2 veces con PBS 1X y se centrifugaron 5 min. a 1500 rpm. Por último se fijaron con 150µl de PBS, 50 µL de paraformaldehído al 4% en PBS.

El análisis se llevó a cabo usando un citómetro de flujo FACS Calibur (BD San José, USA) y se adquirieron 10 000 eventos por muestra. La cuantificación y análisis estadístico se realizó utilizando el programa FlowJo.

Ensayos de Quimiotaxis *in vitro*.

Estos ensayos se realizaron en una cámara de quimiotaxis modificada de Boyden, usando CDs maduras derivadas de médula ósea de ratones Jak3^{-/-} y Jak3^{+/+} maduras *in vitro* utilizando LPS. Se realizo cada condición por triplicado.

Previamente a la quimiotaxis, una membrana de nitrocelulosa, de 5µm de poro, se recubrió con fibronectina humana (20 µl / ml) en PBS estéril, por 30 min a 37 °C.

Se contaron las células posteriormente se centrifugaron las células a 1800 rpm, y se resuspendieron en 1 ml de medio HBSS (sin Ca^{++} , Mg^{++}) conteniendo un $1\mu\text{L}$ del fluorocromo calceina AM (1mg/mL), se mezcló y se incubó 15 min. a 37°C protegido de la luz.

Las células se centrifugaron a 1800 rpm, posteriormente se lavaron con 1 ml de medio HBSS (sin Ca^{++} , Mg^{++}). Subsecuentemente se resuspendieron en HBSS (con Ca^{++} , Mg^{++}) a un total de $50\mu\text{l}$ de medio con un total mil células por pozo.

Se cargaron $30\mu\text{l}$ de la dilución de quimiocina en cada pozo (que van de 10 a 1000 ng/ml) inferior de la cámara, estas diluciones se realizaron en solución tampón HBSS (sin Ca^{++} , Mg^{++}); inmediatamente se colocó la membrana de nitrocelulosa con la cara brillante hacia arriba evitando burbujas de aire, además de la plantilla de goma, tapa y tornillos en la cámara superior, se colocaron $50\mu\text{l}$ de la suspensión celular. Se incubaron durante 90 min a 37°C protegidos de la luz.

Transcurrido el tiempo de incubación, la membrana se lavó, se dejó secar perfectamente, se dispuso a analizar y cuantificar la fluorescencia en un fluorómetro Typhoon 9400. La imagen se analizó con el programa Image Quant del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Ensayos de video microscopía.

Estos ensayos se llevaron a cabo con células dendríticas obtenidas de ratones Jak3^{-/-} y Jak3^{+/+} por separado.

Se tomaron 100 000 CDs y se re suspendieron en medio RPMI sin SFB (en un volumen final de 100 µl), trascurrido ese tiempo se estimularon con CCL19 o CCL21 de tal manera que quedara en una concentración de 100 ng/ ml y un volumen final de 100 µL y se monitorearon durante 45 min. Todo se realizo a 37° C, y se tomaron fotografías cada 3 segundos.

Se utilizó un microscopio invertido de fluorescencia, marca Olympus, modelo X50, con platina térmica y acoplado a una cámara digital(Media Cybernetics). Los videos fueron capturados con el Software Image-Pro Plus Ver 5.0, utilizando un objetivo de 60X planapo seco, marca olympus. El análisis se realizó con el programa Image Pro Plus Ver 5.0 (Media Cybernetics, USA).

Microscopía de barrido.

Para estos ensayos se trataron cubre objetos con fibronectina (20 µl/ml) (previa limpieza con etanol 96% durante 24 horas).

Se realizó un citospin cargando 300 µl de una suspensión celular con una concentración de 6.7×10^2 células / mL, el cubreobjetos se colocó inmediatamente en un pozo de una placa de cultivo de 24 pozos con las células hacia arriba, se

adicionaron 250 μ l de medio RPMI sin SFB en cada pozo y se incubaron 15 min a 37 °C, trascurrido el tiempo se adicionó el estimulo con CCL21 o CCL19, ambas a 100 ng / ml. se incubaron durante 120 min a 37 C. Finalmente se retiró el sobrenadante y las células se fijaron con paraformaldehído al 4%.

El análisis se realizó mediante fotografías tomadas a 5000 aumentos en un microscopio de barrido Carl ZEISS modelo DSM-950 de fabricación alemana.

VII. Resultados

Análisis de expresión de marcadores de superficie celulares.

Como se mencionó anteriormente las CDs se originan a partir de precursores de médula ósea, por lo que para este trabajo se obtuvieron CDs *in vitro*, mediante el cultivo de precursores de médula ósea y GM-CSF, citocina que es capaz de conducir a la obtención de macrófagos y CDs. La población de interés se separó mediante adherencia.

Puesto que para todos los experimentos aquí descritos se utilizaron CDs derivadas de médula ósea de ratones Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-}, fue necesario realizar un análisis fenotípico, evaluando la expresión de las moléculas CD11c y MHC II, en la superficie celular, como marcadores de características de CDs, y la expresión de las moléculas CD80 y CD86 como marcadores de maduración de las CDs. Por lo que se realizó una tinción con anti-CD11c, anti-MHC II, anti-CD80 y anti-CD86 tanto antes de estimular a las CDs con LPS como después de adicionar dicho estímulo y se procedió a caracterizarlas mediante citometría de flujo.

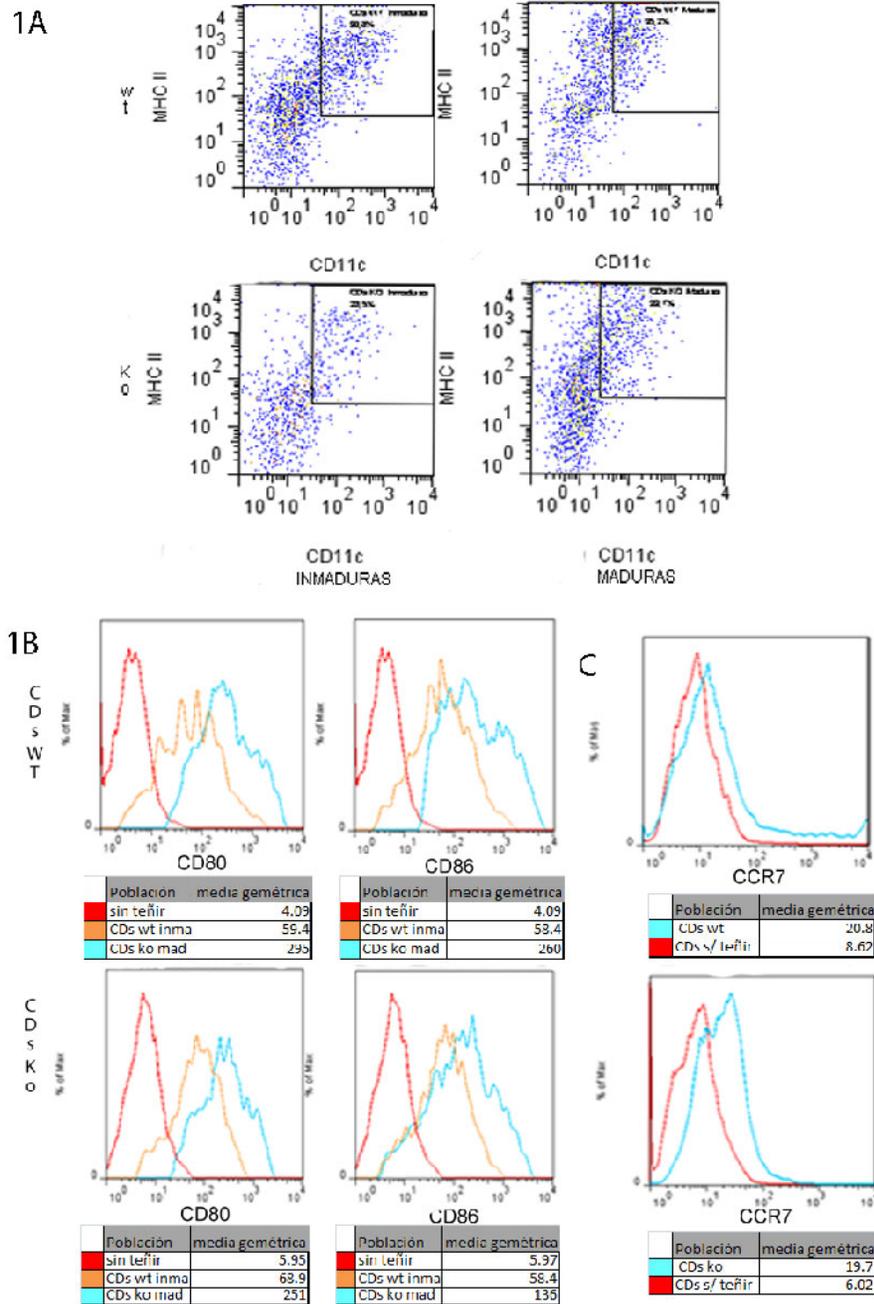


Figura 4. Análisis de la expresión de marcadores de superficie celular por FACS de las células dendríticas maduras derivadas de médula ósea de ratones $Jak3^{+/+}$ y $Jak3^{-/-}$. Los marcadores fueron caracterizados con anticuerpos anti-CD11c, anti-MHCII, anti-CD80, anti-CD86 y anti-CCR7. A) Expresión de

MHCII⁺ y CD11c⁺ en células Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-}. B) Análisis de los marcadores de maduración CD80 y CD86 en CDs derivadas de ratones Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-}. C) Niveles de expresión del receptor CCR7 en CDs maduras Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-}. Se muestran los datos representativos de 3 experimentos independientes.

Las células expresaron en su superficie las moléculas CD11c⁺ y MHC II⁺ (figura 4A) marcadores que nos indicaron que estas son CDs. Cabe señalar que no se observaron diferencias entre los porcentajes de CDs deficientes de Jak3 en comparación con las CDs que poseen la molécula Jak3.

Las CDs Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-}, cultivadas durante 24 horas con LPS, incrementaron los niveles de expresión de CD80 y CD86, (figura 4B), sin embargo se observó un menor aumento en las CDs Jak3^{-/-} comparado con Jak3^{+/+} [21].

Tanto las CDs del Jak3^{+/+} como las CDs del Jak3^{-/-}, expresaron el receptor CCR7 (figura 4C).

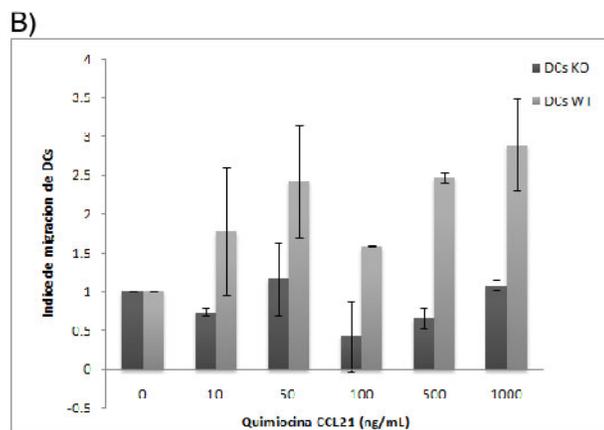
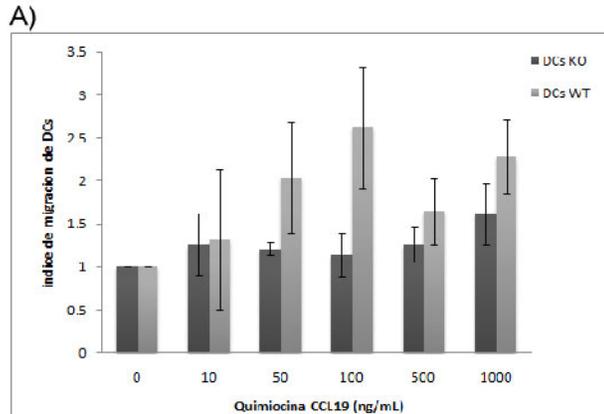


Figura 5 *CDs deficientes de Jak3 presentaron una deficiente migración. se muestra Índice de migración de quimiotaxis realizadas in vitro de CDs maduras Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-}, hacia las quimiocinas CCL19 y CCL21, a diferentes concentraciones. Como se indica en materiales y métodos. Figura representativa de 3 experimentos independientes. Se grafica el índice de migración.*

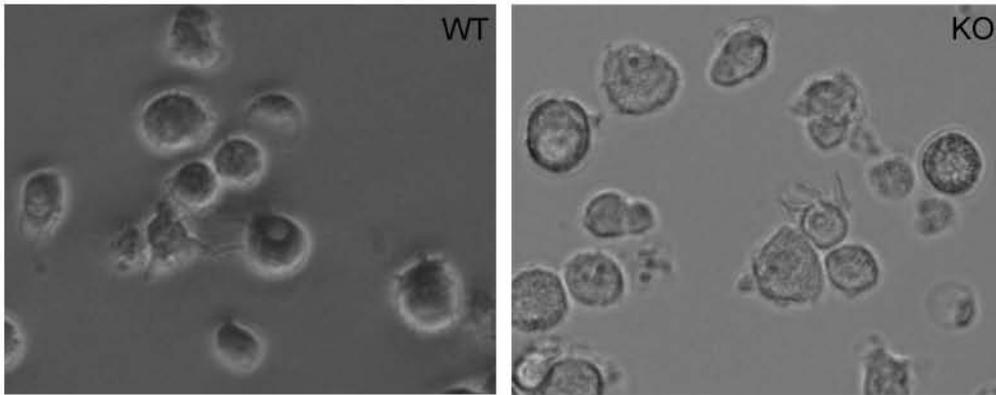
Se realizaron ensayos de quimiotaxis, hacia CCL21 y CCL19. En la figura 5, se observa que las CDs Jak3^{-/-} no migraron bajo el estímulo de CCL19 ó CCL21, por el contrario a lo observado en las CDs Jak3^{+/+}, en las cuales se observó migración hacia estas dos quimocinas, corroborando lo que se reporta en la literatura [21].

Efecto de las quimiocinas CCL19 y CCL21 sobre la morfología de CDs derivadas de médula ósea de ratones Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-}.

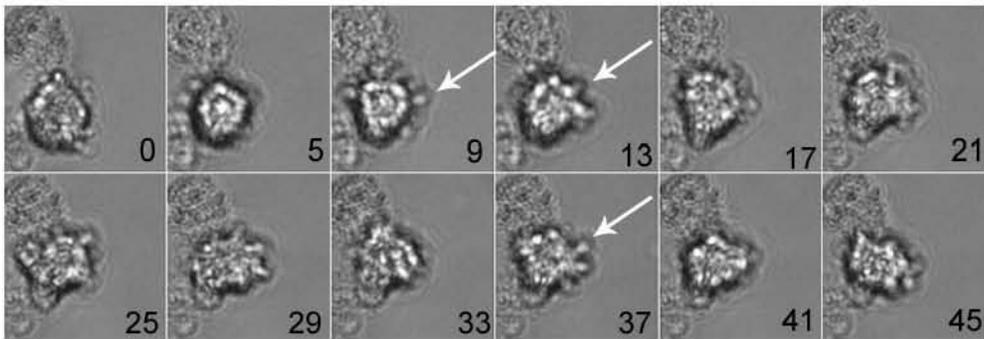
Para evaluar la participación de la cinasa Jak3 en la morfología de células dendríticas, se llevaron a cabo ensayos de video microscopía de CDs Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-} de manera independiente, estimulándolas con la respectiva quimiocina (como se detalla en materiales y métodos). Estos ensayos nos permitieron apreciar la morfología de CDs a lo largo de 45 min de registro.

Las diferencias observadas entre CDs Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-}, es en primera instancia la apariencia del citoplasma, ya que en las CDs Jak3^{-/-} se pudo apreciar una gran cantidad de vesículas. Por el contrario en las CDs Jak3^{+/+} el citoplasma no presentó estas vesículas, es importante mencionar que esta apariencia se observa en CDs Jak3^{-/-} con y sin estímulo de quimiocina y no varía a lo largo del tiempo (figura 6A).

3 A)



3 B)



3 C)

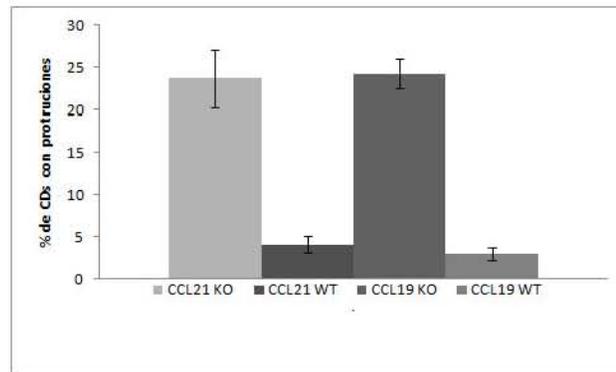


Figura 6. Las CD45+ maduras derivadas de médula ósea de ratones *Jak3*^{-/-} presentaron vesículas y protusiones con y sin estímulo de los ligandos de

CCR7. CDs sin estímulo de quimiocinas, videogravadas durante 45 min. 6A) CDs $Jak3^{-/-}$ derecha y 6A) $Jak3^{+/+}$ izquierda. 6B) CD $Jak3^{-/-}$ con protusiones, sin estímulo de quimiocina (flechas blancas indican la localización protusiones). 6C) porcentaje CD $Jak3^{+/+}$ y $Jak3^{-/-}$ que presentaron protusiones, bajo el estímulo de CCL19 y CCL21 en una concentración de 100 ng/ ml durante 45 min.

Las CDs derivadas de médula ósea de ratones $Jak3^{-/-}$, presentaron proyecciones de citoplasma que sugieren el inicio o intento de formación de dendritas, las cuales denominamos protusiones (figura 6B), dichas estructuras prácticamente no se observaron en las CDs $Jak3^{+/+}$. Se cuantificó el porcentaje de CDs $Jak3^{+/+}$ y $Jak3^{-/-}$, estimuladas con CCL19 o CCL21 que presentaron estas protusiones (figura 6C). El porcentaje de CDs $Jak3^{-/-}$ que presentaron protusiones, es de 24 % sin diferencias estadísticas entre las estimuladas con CCL21 o CCL19, por el contrario a lo observado en las CDs $Jak3^{+/+}$ cuyo porcentaje de células con esa morfología fue solo de 4 %.

Microscopía de barrido de CDs maduras derivadas de médula ósea de ratones *Jak3*^{+/+} y *Jak3*^{-/-}

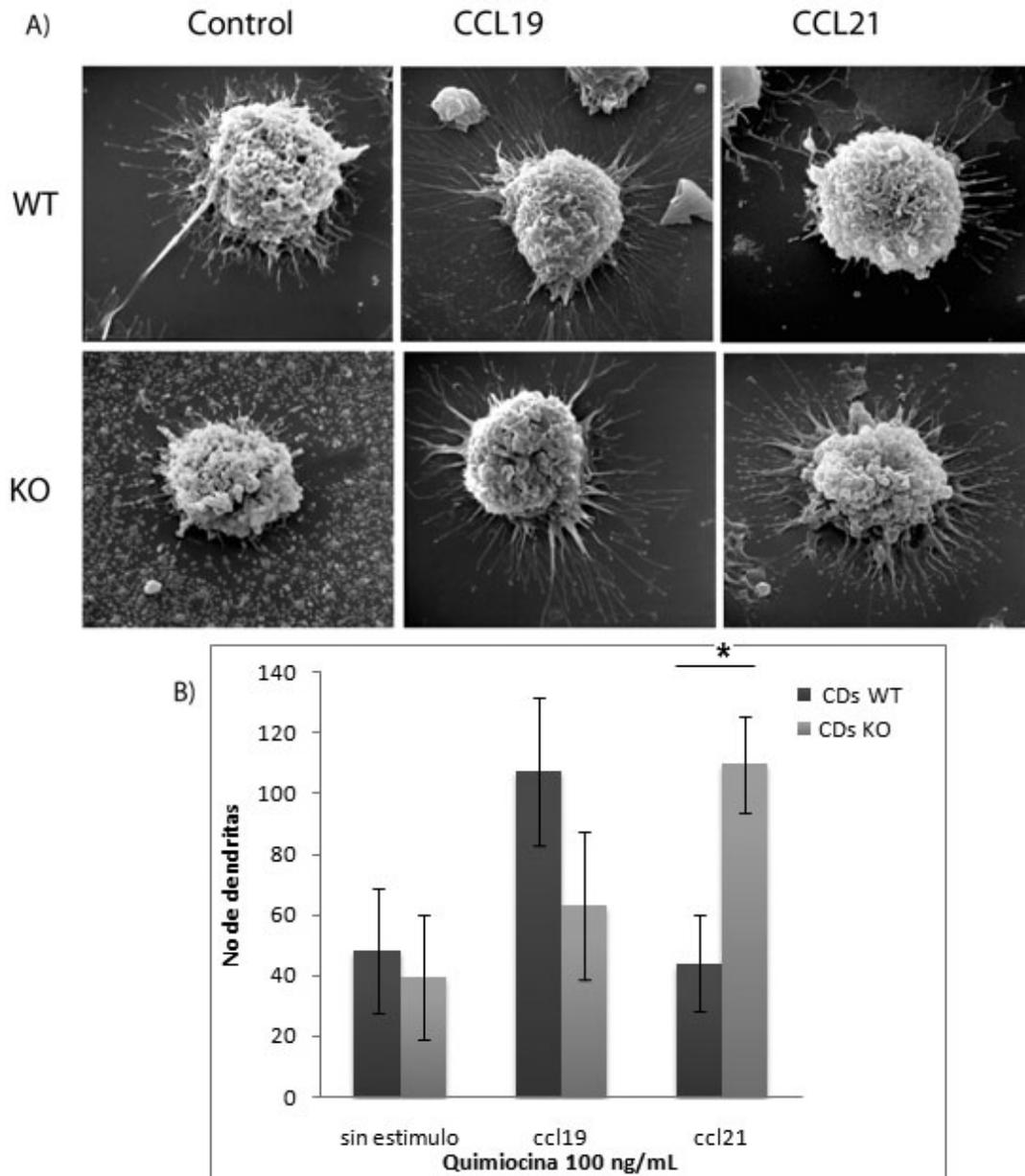


Figura 7. Las CDs deficientes de *Jak3* presentaron formación de dendritas bajo el estímulo de CCL19 y CCL21. 8) Microscopía de barrido de CDs maduras derivadas de médula ósea de ratones *Jak3*^{+/+} y *Jak3*^{-/-}, las cuales fueron

estimuladas con las quimiocinas CCL19 y CCL21 en una concentración de 100 ng/ml durante 120 min y fijadas con para formaldehído al 4 %, se contaron 6 células por cada condición. B) cuantificación de dendritas en células CDs Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-} (* P < 0.005).

Se sabe que si se colocan CDs en una matriz extracelular como fibronectina, se promueve la formación de dendritas, por lo cual se realizó microscopía de barrido para las CDs Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-} estimuladas con CCL19 ó CCL21 durante 120 min.

Las CDs Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-}, sin ningún estímulo, presentaron formación de dendritas, sin embargo las CDs Jak3^{-/-} presentaron un menor número de dendritas. (Figura 7).

Las CDs Jak3^{+/+} que fueron estimuladas con la quimiocina CCL19 presentaron un mayor número de dendritas comparadas con las células sin estimular, por el contrario las que fueron estimuladas con la quimiocina CCL21, no se observó en ellas un aumento importante en el número de dendritas formadas.

Se comparó el número de dendritas de CDs Jak3^{+/+} con las CDs Jak3^{-/-}, bajo el estímulo de CCL19, se observó un menor número de proyecciones en las CDs Jak3^{-/-}.

El número de extensiones de las CDs Jak3^{+/+} comparadas con las observadas en CDs Jak3^{-/-}, bajo el estímulo de CCL21, es mayor.

VIII. DISCUSIÓN.

Las células obtenidas de médula ósea de ratones silvestres y deficientes de la cinasa Jak3, que fueron sometidas a un proceso de diferenciación *in vitro* mediante cultivo con GMCSF, se diferenciaron a CDs, puesto que expresaron en su superficie, las moléculas CD11c y MHC II (figura 4A) marcadores que nos indicaron que estas eran CDs.

Las CDs cultivadas con LPS durante 24 horas, mostraron un aumento de los niveles de expresión de CD80 y CD86, lo cual indica que las CDs maduraron (figura 4B), sin embargo se observó un menor aumento en las CDs Jak3^{-/-} comparado con Jak3^{+/+}. Con estos resultados se ratifica lo reportado por Rivas *et al*, sobre que la deficiencia de la cinasa Jak3 no afecta la obtención de CDs *in vitro*, pero al inducir el proceso de maduración con LPS estas células deficientes, no incrementaron la expresión de moléculas co-estimuladoras, al mismo nivel que las CDs del ratón de la cepa silvestre[21].

Como se mencionó anteriormente, las quimiocinas CCL19 y CCL21 se expresan en órganos linfoides, y particularmente CCL21 es secretada por vénulas del endotelio alto y endotelio linfático, se sabe que dichas quimiocinas *in vitro* e *in vivo* inducen la migración de CDs maduras a través de la activación del receptor CCR7 expresado durante el proceso de maduración de las CDs, pero cuando estas células tienen una deficiencia en la cinasa Jak3 presentan una deficiente migración en respuesta a estas quimiocinas CCL19 y CCL21 (figura 6), corroborando lo que se reporta en la literatura, [21]. Esta deficiencia en la migración de CDs

carentes de la cinasa Jak3 hacia estas quimiocinas, nos sugiere que la molécula Jak3 es importante en la activación inducida por los ligandos del receptor CCR7. Postulamos que Jak3 podría también estar involucrada en el otro efecto observado de CCL19 y CCL21 sobre la morfología de CDs. Por lo tanto se evaluaron los cambios morfológicos en CDs derivadas de médula ósea de ratones Jak3 ^{+/+} y CDs derivadas de médula ósea de ratones Jak3 ^{-/-}, estimuladas con los ligandos de CCR7. Para cerciorarnos que las posibles diferencias, no se debieran a la probable ausencia del receptor CCR7, se evaluó la expresión del receptor CCR7 mediante citometría de flujo. Observamos que tanto las CDs Jak3 ^{+/+} como las CDs Jak3 ^{-/-}, expresaron el receptor CCR7 (figura 4C), por lo cual las dos poblaciones pudieron responder potencialmente al estímulo de los ligandos de dicho receptor.[21]

Para evaluar la participación de la cinasa Jak3 en la morfología de CDs, se llevaron a cabo ensayos de video microscopía de CDs Jak3 ^{+/+} y Jak3 ^{-/-} de manera independiente, estimulándolas con la respectiva quimiocina. Estos ensayos nos permitieron apreciar en primera instancia la apariencia del citoplasma. En las CDs Jak3 ^{-/-} se pudo apreciar una gran cantidad de vesículas, que no variaron a lo largo del tiempo, además que se presentaron con y sin estímulo de quimiocinas, es importante mencionar que no se observaron en las CDs Jak3 ^{+/+} (figura 6A).

Existe evidencia que muestra que en las CD_s murinas, las moléculas CD86 y MHC II se acumulan de forma selectiva en vesículas, estas vesículas son particularmente abundantes en CD_s en fases intermedias de maduración [38] y su desaparición correlaciona con la maduración de CD_s, así como la aparición de altas cantidades de MHC II y moléculas co-estimuladoras en la superficie celular [45] y puesto que se observó que las CD_s Jak3^{-/-} cultivadas con LPS durante 24 horas, tuvieron una menor expresión de las moléculas CD80 y CD86, en su superficie (comparado con CD_s Jak3^{+/+}) (figura 4B); corroborando antecedentes de nuestro laboratorio, que postulan que la ausencia de la cinasa Jak3 afecta negativamente el proceso de maduración de CD_s [21]. Las vesículas que se observaron en las CD_s deficientes de Jak3, podrían deberse a la acumulación de moléculas de MHCII y CD86, lo que nos lleva a sugerir que las CD_s pudieran estar en alguna etapa intermedia de maduración.[38]

Se sabe que si se colocan CD_s en una matriz extracelular como fibronectina, se promueve la formación de dendritas, por lo cual se realizó microscopía de barrido para las CD_s Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-} estimuladas con CCL19 ó CCL21 durante 120 min en una matriz de fibronectina.

Las CD_s Jak3^{+/+} que fueron estimuladas con la quimiocina CCL19 presentaron un mayor número de dendritas comparadas con las células sin estimular, por el contrario las que fueron estimuladas con la quimiocina CCL21, no se observó en ellas un aumento importante en el número de dendritas formadas, todo esto concuerda con lo reportado sobre que CCL19 induce un mayor número de

dendritas comparado con las inducidas por la quimiocina CCL21 en CDs de bazo [11].

Al comparar el número de extensiones de CDs Jak3 ^{+/+} con las CDs Jak3 ^{-/-}, bajo el estímulo de CCL19, se observó un menor número de proyecciones en las CDs Jak3 ^{-/-}, Yanagawa *et al* sugiere que el efecto de CCL19 sobre la formación de dendríticas en CDs, podría estar relacionado con la activación de las GTPasas Rac y Cdc42, favoreciendo de manera positiva la formación de dendríticas, también se sabe que la molécula Cdc42 regula la estabilidad temporal y espacial de protusiones de actina, puesto que puede reforzar una protrusión existente o suprimir el desarrollo de nuevas protusiones [39]; además se ha reportado que en CDs Cdc42 ^{-/-}, bajo el estímulo de CCL19 se favorece la formación de protusiones de actina, que posteriormente comienzan a retraerse, contrastando con lo observado en CDs que poseen la molécula Cdc42 cuyas protusiones son estables a lo largo del tiempo [39], aunado a esto se sabe que la cinasa Jak3 se activa a través de la interacción de CCL19 con su receptor CCR7 [21], lo cual podría sugerir que Jak3 activada a través de la interacción de CCL19 con su receptor, posiblemente interaccione con las GTPasas Rac y Cdc42 favoreciendo de este modo la formación y/o estabilidad de las dendritas. Por lo que al estar ausente la molécula Jak3, la activación de Rac y Cdc42 no podría llevarse a cabo, explicando de esta manera la disminución en el número de dendritas, bajo el estímulo de CCL19 en CDs carentes de Jak3 (figura 7) y la formación de protusiones observadas en CDs carentes de Jak3 (figura 6b, 6c), ya sea por que no se formen o no se mantenga la estabilidad de estas estructuras.

Diversos reportes indican que la GTPasa Rho A esta implicada en la regulación negativa de la extensión de dendritas, en CDs derivadas de monocitos de sangre periférica humana, y en CDs de bazo murino [12][11]. Sin embargo, en timocitos la quimiocina CCL21 es capaz de inducir la activación de Rho A [40], por lo cual se sugiere que CCL21 podría estar activando esta GTPasa en CDs derivadas de médula ósea, y aunado a que existe evidencia de que al interaccionar CCL21 con su receptor CCR7, se activa la cinasa Jak3 [21], se propone que esta última molécula juegue un papel importante en la vía de activación de Rho A, mediante la unión de CCL21 a CCR7. Por tal motivo, podría justificarse, que al estar ausente la molécula Jak3 en CDs, la activación de Rho A desencadenada por la unión de CCL21 a su receptor, no se lleve a cabo, resultando en la formación de dendritas, posiblemente por el simple contacto con fibronectina como matriz extracelular y la presencia de la integrina $\alpha 1$ -(CD29) en la superficie de CDs [12]. Sin embargo, se ha reportado que CCL21 es capaz de inducir una modesta y tardía extensión de dendritas (comparada con la inducida por la quimiocina CCL19) [11]. Este efecto podría ser independiente a Rho A, y estar involucradas otras moléculas como por ejemplo la tubulina, puesto que existe evidencia que demuestra que la cinasa de Janus puede asociarse directamente con tubulina (Jak2) o con microtubulos (Tyk2) [41][42], y es conocido que las dendritas contienen una amplia red de microtúbulos que son esenciales para la estabilidad de estas estructuras[12].

Todo lo anterior pudiera tener un efecto sinérgico y por tal motivo observamos un mayor número de proyecciones en células carentes de Jak3, cuando comparamos

con las CDs silvestres que fueron estimuladas con CCL21 y aun las deficientes de Jak3 estimuladas con CCL19 (figura 4).

Aunado a lo anterior se ha involucrado a la GTPasa Rho A, en las vías de transporte vesicular [17], que de alguna manera podría justificar la vesículas que se observaron en CDs Jak3^{-/-}, e indirectamente las deficiencias en la maduración de dichas células, puesto que podría verse afectado el transporte vesicular de moléculas como CD80,CD86 en incluso MHC II.

Es bien sabido que las células se mueven atreves de una reorganización dinámica del citoesqueleto de actina, que implican varios fenómenos para propiciar movimientos de retracción y protrusión, en estos procesos participan ampliamente las GTPasas como Rho A, la cual se ha descrito regula los procesos de contracción, formando filamentos de actina-miosina en el cuerpo de la célula.

Se ha reportado que Rac regula la polimerización de la actina, para la formación de redes octogonales de actina, en el frente de migración, para promover protusiones. Cdc42 por su parte es requerida en la parte frontal de la célula, para controlar la dirección, polimerizando polímeros paralelos de actina y reclutando una gran cantidad de receptores en respuesta a señales extracelulares formando proyecciones llamadas filopodios [17], así mismo se sabe que Cdc42 es un regulador molecular de la polaridad celular, particularmente en CDs se ha reportado que participa en la reorientación del centro organizador de microtúbulos hacia la célula T, durante la formación de sinapsis entre estas dos células; se observo que cuando se disminuye la expresión de dicha molécula disminuye

significativamente la polarización de centro de organización de microtúbulos de CDs modificando de esta forma la morfología de las CDs [43]. Estos efectos se han demostrado en CDs [39]. De esta manera también podría explicarse la deficiente migración así como las protrusiones que se observa en células carentes de Jak3, puesto que si durante el proceso de migración es importante mantener el equilibrio dinámico entre las GTPasas y al estar ausente la cinasa Jak3 una molécula que posiblemente interactúe directa o indirectamente con estas GTPasa a través de la activación de CCR7, el equilibrio podría alterarse resultando en una deficiente migración inducida por los ligandos de CCR7.

Se ha demostrado que la molécula Jak3 es importante en la migración de CDs a ganglios linfáticos, donde ocurre la presentación antigénica a linfocitos T [21], así mismo los resultados de esta tesis, sugieren que la participación de la cinasa Jak3, es igualmente importante en la morfología, inducida por los ligandos de CCR7 en CDs. La morfología de las CDs es importante, ya que durante la presentación antigénica en ganglios linfáticos, se cree que la formación de dendritas son de gran ventaja para interactuar con linfocitos T, a través de la molécula MHC II y TCR, esto podría afectar a la presentación de antígeno, lo cual concuerda con lo reportado, sobre que las células carentes Jak3 inducen menos linfoproliferación que las células Jak3 ^{+/+}[21].

IX. Conclusiones.

La ausencia de la molécula Jak3 en CD4s derivadas de médula ósea:

1. Promueve la aparición de vesículas citoplasmáticas y formación de protusiones del citoplasma.
2. Bajo el estímulo de CCL19 disminuyen el número de proyecciones citoplasmáticas comparadas con las observadas en CD4s Jak3^{+/+}.
3. Bajo el estímulo de CCL21 aumenta el número de proyecciones citoplasmáticas comparadas con las observadas en CD4s Jak3^{+/+}.

X. Perspectivas.

Tomando en cuenta que la ausencia de Jak3, en CDs bajo el estímulo de CCL19 disminuyen el número de proyecciones citoplasmáticas, y las CDs Jak3^{-/-} estimuladas con CCL21 aumentan el número de proyecciones citoplasmáticas, comparadas con las observadas en CDs Jak3^{+/+} y aunado a los antecedentes de la participación de las GTPasas Rho A, Cdc42, y Rac en la morfología de CDs. Se propone determinar la participación de las GTPasas Rho A, Cdc42, y Rac en la morfología de CDs Jak3^{-/-} y Jak3^{+/+} bajo el estímulo de las quimiocinas CCL19 y / o CCL21 mediante el uso de inhibidores específicos de dichas GTPasas.

Determinar el contenido de las vesículas observadas en CDs (derivadas de médula ósea) Jak3^{-/-} maduras, mediante una tinción intracelular utilizando anticuerpo anti-MHC II, anti-CD80 anti-CD86.

XI BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Moser and O. Leo, "Key concepts in immunology.," *Vaccine*, vol. 28 Suppl 3, Aug. 2010, pp. C2-13.
- [2] B. Pulendran, "Variegation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 174, Mar. 2005, pp. 2457-65.
- [3] J. Banchereau, F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka, "Immunobiology of dendritic cells.," *Annual review of immunology*, vol. 18, Jan. 2000, pp. 767-811.
- [4] R.M. Steinman and J. Idoyaga, "Features of the dendritic cell lineage.," *Immunological reviews*, vol. 234, Mar. 2010, pp. 5-17.
- [5] K. Liu and M.C. Nussenzweig, "Origin and development of dendritic cells.," *Immunological reviews*, vol. 234, Mar. 2010, pp. 45-54.
- [6] M.G. Manz, D. Traver, T. Miyamoto, I.L. Weissman, and K. Akashi, "Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors Plenary paper Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors," *Culture*, 2010, pp. 3333-3341.
- [7] D. Traver, K. Akashi, M. Manz, and I.L. Weissman, "Development of CD8⁺ Positive Dendritic Cells from a Common Myeloid Progenitor," *Science*, vol. 2152, 2010, pp. 10-13.
- [8] R.S. Tamez-guerra and C. Rodríguez-padilla, "Las células dendríticas en la inmunopatología de la infección por Mycobacterium tuberculosis," *Rev Mex Patol Clin*, vol. 55, 2008, pp. 72-78.
- [9] P. Andrea, V. Hernandez, M. Teresa, and R. López, "Células Dendríticas y su Papel," *Journal of Experimental Medicine*, 2003, pp. 40-47.
- [10] J. Banchereau and R.M. Steinman, "Dendritic cells and the control of immunity.," *Nature*, vol. 392, Mar. 1998, pp. 245-52.
- [11] Y. Yanagawa and K. Onoé, "CCL19 induces rapid dendritic extension of murine dendritic cells.," *Blood*, vol. 100, Sep. 2002, pp. 1948-56.

- [12] C. a Swetman Andersen, M. Handley, G. Pollara, A.J. Ridley, D.R. Katz, and B.M. Chain, "beta1-Integrins determine the dendritic morphology which enhances DC-SIGN-mediated particle capture by dendritic cells.," *International immunology*, vol. 18, Aug. 2006, pp. 1295-303.
- [13] Y.-C. Wang, X.-B. Hu, F. He, F. Feng, L. Wang, W. Li, P. Zhang, D. Li, Z.-S. Jia, Y.-M. Liang, and H. Han, "Lipopolysaccharide-induced maturation of bone marrow-derived dendritic cells is regulated by notch signaling through the up-regulation of CXCR4.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, Jun. 2009, pp. 15993-6003.
- [14] M. a West, a R. Prescott, E.L. Eskelinen, a J. Ridley, and C. Watts, "Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation.," *Current biology : CB*, vol. 10, Jul. 2000, pp. 839-48.
- [15] B.F. Sallusto and A. Lanzavecchia, "From the "Basel Institute for Immunology, CH-4005, Basel, Switzerland; and the *Department of Immunology, Istituto Superiore di SanitY, 1-00161, Rome, Italy," *Culture*, vol. 179, 1994.
- [16] Olga B. Matas Guadix, Dinámica de la actina y tráfico de membranas asociado al complejo de golgi: papel regulador de RhoA, Rac1 Y Cdc42. Tesis, Departamento de biología celular y anatomía patológica faculta de medicina Barcelona, Mayo del 2005.
- [17] S. Etienne-Manneville and A. Hall, "Rho GTPases in cell biology.," *Nature*, vol. 420, Dec. 2002, pp. 629-35.
- [18] H. Yoneyama, K. Matsuno, and K. Matsushima, "Chemokine Receptors and Dendritic Cell Trafficking," *Cell. The Receptors*, 2007, pp. 87-99.
- [19] M. Locati and P.M. Murphy, "Chemokines and chemokine receptors: biology and clinical relevance in inflammation and AIDS.," *Annual review of medicine*, vol. 50, Jan. 1999, pp. 425-40.
- [20] P.M. Murphy, M. Baggiolini, I.F. Charo, C. a Hébert, R. Horuk, K. Matsushima, L.H. Miller, J.J. Oppenheim, and C. a Power, "International

union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors.," *Pharmacological reviews*, vol. 52, Mar. 2000, pp. 145-76.

- [21] A. Rivas-Caicedo, G. Soldevila, T.I. Fortoul, A. Castell-Rodríguez, L. Flores-Romo, and E. a García-Zepeda, "Jak3 is involved in dendritic cell maturation and CCR7-dependent migration.," *PloS one*, vol. 4, Jan. 2009, p. e7066.
- [22] G. Soldevila and E. a García-Zepeda, "The role of the Jak-Stat pathway in chemokine-mediated signaling in T lymphocytes," *Signal Transduction*, vol. 7, Dec. 2007, pp. 427-438.
- [23] M.F. Bachmann, M. Kopf, and B.J. Marsland, "road signs," *Immunology*, vol. 6, 2006, pp. 159-164.
- [24] G.J. Randolph, V. Angeli, and M. a Swartz, "Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 5, Aug. 2005, pp. 617-28.
- [25] S. Sozzani, "Dendritic cell trafficking: more than just chemokines.," *Cytokine & growth factor reviews*, vol. 16, Dec. 2005, pp. 581-92.
- [26] P.D. Cravens and P.E. Lipsky, "Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases.," *Immunology and cell biology*, vol. 80, Oct. 2002, pp. 497-505.
- [27] G. Shi, S. Partida-Sánchez, R.S. Misra, M. Tighe, M.T. Borchers, J.J. Lee, M.I. Simon, and F.E. Lund, "Identification of an alternative G{alpha}q-dependent chemokine receptor signal transduction pathway in dendritic cells and granulocytes.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 204, Oct. 2007, pp. 2705-18.
- [28] K. Schumann, T. Lämmermann, M. Bruckner, D.F. Legler, J. Polleux, J.P. Spatz, G. Schuler, R. Förster, M.B. Lutz, L. Sorokin, and M. Sixt, "Immobilized Chemokine Fields and Soluble Chemokine Gradients Cooperatively Shape Migration Patterns of Dendritic Cells.," *Immunity*, vol. 32, May. 2010, pp. 703-713.
- [29] P.M. Murphy, "Double duty for CCL21 in dendritic cell trafficking.," *Immunity*, vol. 32, May. 2010, pp. 590-2.

- [30] I. Verbovetski, H. Bychkov, U. Trahtemberg, I. Shapira, M. Hareuveni, O. Ben-Tal, I. Kutikov, O. Gill, and D. Mevorach, "Opsonization of Apoptotic Cells by Autologous iC3b Facilitates Clearance by Immature Dendritic Cells, Down-regulates DR and CD86, and Up-regulates CC Chemokine Receptor 7," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 196, Dec. 2002, pp. 1553-1561.
- [31] L. Ohl, M. Mohaupt, N. Czeloth, G. Hintzen, Z. Kiafard, T. Blankenstein, G. Henning, and R. Fo, "CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions Max-Delbruck-Center for Molecular Medicine," *Cell*, vol. 21, 2004, pp. 279-288.
- [32] S. a Luther, H.L. Tang, P.L. Hyman, a G. Farr, and J.G. Cyster, "Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, Nov. 2000, pp. 12694-9.
- [33] K. Yamaoka, P. Saharinen, M. Pesu, V. Et, H. Iii, O. Silvennoinen, and J.J.O. Shea, "Protein family review The Janus kinases (Jaks)," *Genome Biology*, 2004.
- [34] A.S. Bharadwaj and D.K. Agrawal, "Transcription factors in the control of dendritic cell life cycle.," *Immunologic research*, vol. 37, Jan. 2007, pp. 79-96.
- [35] D.C. Thomis and L.J. Berg, "The role of Jak3 in lymphoid development, activation, and signaling.," *Current opinion in immunology*, vol. 9, Aug. 1997, pp. 541-7.
- [36] J.J. O'Shea, M. Husa, D. Li, S.R. Hofmann, W. Watford, J.L. Roberts, R.H. Buckley, P. Changelian, and F. Candotti, "Jak3 and the pathogenesis of severe combined immunodeficiency.," *Molecular immunology*, vol. 41, Jul. 2004, pp. 727-37.
- [37] W.J. Grossman, J.W. Verbsky, L. Yang, L.J. Berg, L.E. Fields, D.D. Chaplin, and L. Ratner, "Dysregulated myelopoiesis in mice lacking Jak3.," *Blood*, vol. 94, Aug. 1999, pp. 932-9.
- [38] S.J. Turley, "Transport of Peptide-MHC Class II Complexes in Developing Dendritic Cells," *Science*, vol. 288, Apr. 2000, pp. 522-527.

- [39] T. Lämmermann, J. Renkawitz, X. Wu, K. Hirsch, C. Brakebusch, and M. Sixt, "Cdc42-dependent leading edge coordination is essential for interstitial dendritic cell migration.," *Blood*, vol. 113, Jun. 2009, pp. 5703-10.
- [40] G. Bardi, "Rho kinase is required for CCR7-mediated polarization and chemotaxis of T lymphocytes," *FEBS Letters*, vol. 542, May. 2003, pp. 79-83.
- [41] X. Ma and P.P. Sayeski, "Identification of tubulin as a substrate of Jak2 tyrosine kinase and its role in Jak2-dependent signaling.," *Biochemistry*, vol. 46, Jun. 2007, pp. 7153-62.
- [42] C. Steindler, Z. Li, M. Algarté, A. Alcover, V. Libri, J. Ragimbeau, and S. Pellegrini, "Jamip1 (marlin-1) defines a family of proteins interacting with janus kinases and microtubules.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, Oct. 2004, pp. 43168-77.
- [43] J. Pulecio, J. Petrovic, F. Prete, G. Chiaruttini, A.-M. Lennon-Dumenil, C. Desdouets, S. Gasman, O.R. Burrone, and F. Benvenuti, "Cdc42-mediated MTOC polarization in dendritic cells controls targeted delivery of cytokines at the immune synapse.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 207, Nov. 2010, pp. 2719-2732.
- [44] M.B. Lutz, M. Schnare, M. Menges, S. Rössner, M. Röllinghoff, G. Schuler, and A. Gessner, "Differential functions of IL-4 receptor types I and II for dendritic cell maturation and IL-12 production and their dependency on GM-CSF.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 169, Oct. 2002, pp. 3574-80.
- [45] Michael *et al.* "Dendritic cells: biology and clinical applications" Thomson second edition p.225-224
- [46] Víctor M. Arce *et al.* "Endocrinología." edición técnica servicio de publicación e intercambio científico de la universidad de Santiago Compostela 2006. pp.50-52

XII. APÉNDICE.

PEPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA DERIVACION DE CELULAS DENDRITICAS

Medio de cultivo celular RPMI 1640

HEPES buffer(4 (2-hydroxyethyl) - ácido 1-piperazineethanesulfonic) 10 ml

Piruvato de sodio 10 ml

Antibióticos (Penicilina, Estreptomicina) 10 ml

Na HCO₃ de 15 g

 mercaptoetanol de 4 ml

SFB al 10 % (medio suplementado).

PBS

KCl 200mg/L

KH₂PO₄ 200mg/L

NaCl 8000mg/L

Na₂HPO₄ 1150mg/L

Agua desionizada

Medio F 12

Piruvato de sodio de 10 m L

Antibióticos(Penicilina, Estreptomicina) de 10 ml

Na HCO₃ de 15 g

mercaptoetanol de 4 ml

SFB al 10 % (medio suplementado)

PBS EDTA 10 X

NaCl 8 g

KCl 0.4 g

Dextrosa 1 g

EDTA Na 0.2 g

Agua desionizada 100 ml

PBS EDTA 1 X

PBS EDTA 10 X 10 ml

NaHCO₃. 0.8 ml 7.5 %

Células productoras de GMCSF.

Para la obtención de factor estimulante de macrófagos y granulocitos (GMCSF por sus siglas en ingles)[44], se utilizan células CHO (células ováricas de hámster chino) productoras de GMCSF, estas células requieren ser cultivadas en 10 ml de medio F12 con 10% de SFB mas, con 5µl/ ml de Geneticina G418 (american bioanalytical) de un stock de 100mg / ml en una caja adherente se incuban a 37°C. durante 3 días al tercer día se expanden las células (se despegan las células con PBS EDTA y se reparten las células en 2 cajas) y se cambia la mitad de medio de cultivo , esto se repite hasta tener un número considerables de cajas

(aproximadamente 24) . Para colectar e medio con GMCSF se retira el medio de cultivo y se adiciona 7 ml de medio F12 sin SFB y se incuban a 37 °C al tercer día, si ya se considera que se recuperaron las células y están creciendo se encuban a 37°C, durante 3 días, se recolecta el sobrenadante, se filtra y se guarda a -20 C.

Los anticuerpos utilizados en los experimentos de análisis de expresión de marcadores de superficie celulares por citofluorometría de flujo

(FACS) son:

- 1) anti- CD11c FITC, catálogo, 557401 Pharmigen (BD) uso 1/ 200
- 2) anti- MHCII (IA/IE), biotinilado, catálogo 553622 Pharmigen (BD) uso 1/ 200
- 3) anti- CD80 Pe, catálogo 553769 Pharmigen (BD) uso 1/ 200
- 4) anti- CD86 Pe, catálogo 553692 Pharmigen (BD) uso 1/ 200
- 5) anti- ccr7 Pe, catálogo 553692 Pharmigen (BD) uso 1/ 50
- 6) Estreptavidina APC, catalogo 554067 Pharminge (BD) uso 1/200