



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA "ISIDRO ESPINOZA DE LOS REYES"
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LA PROTEÍNA CD45 EN
LINFOCITOS T NAIVE Y DE MEMORIA EN ADULTO Y NEONATO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

P R E S E N T A

ERIKA IVETTE YÉPEZ MÁRQUEZ

DIRECTOR DE TESIS
DRA. IRLES MACHUCA CLAUDINE LILIANE

ASESOR INTERNO
JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

MÉXICO D.F., 2010





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.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México porque me permitió llegar hasta aquí.

A mi facultad porque me apoyo para cumplir este sueño y por todo lo que aprendí en ella.

Al Instituto Nacional de Perinatología por abrirme sus puertas y brindarme el apoyo para realizar esta tesis.

A la Dra. Claudine Irlles quien me asesoro y apoyo incondicionalmente, por su paciencia y consejos. En ella encontré una excelente tutora y una gran amiga.

A I M. en C. Joel Arias por su apoyo en el laboratorio.

A Laura Correa por todo su apoyo en los tramites, por todas sus consejos y regaños en ella encontré una gran amiga.

Al Biólogo José Luis por su apoyo en el laboratorio.

Al Biólogo Miguel Palacios con quien compartí mi proceso de investigación en el Inper. Por toda su ayuda y su amistad incondicional.

A Aura por su amistad y ayuda en el laboratorio.

A mis amigas y compañeras del Imper Adriana y Laura.

A mi compañero Biólogo Luis Alberto quién me contacto con el Inper.

A mis profesores:

Químico Isaías Salgado por todos sus consejos.

A los maestros: Mandujano, Ramiro Díaz, Cristóbal Galindo por sus enseñanzas consejos y regaños.

A mis amigos de la Facultad: Miriam Martínez, Ipanema Pérez, Cristina Domínguez, Cinthia Cervantes, Sergio Reyes, Luis Cruz, Iván Martínez. Con quien compartí momentos muy felices.

A Jonathan Soria por comprenderme, por sus consejos y todos los momentos lindos que hemos pasado juntos.

A mi familia:

A la abuela Eva por sus consejos y regaños

A Susana Calva por su ayuda en lo académico y apoyo incondicional y porque siempre ha creído en mí.

A mi sobrino Balan Yépez porque todo momento lo hace maravilloso

A mis hermanos:

Gaby por todo su cariño

A Jessica por su cariño raro aunque a veces cuesta trabajo entendernos.

A Mario por su apoyo que aunque no me dice, sé que cuento con él para todo.

A mis padres Guadalupe Márquez y Mario Yépez, toda mi admiración respeto y amor. Por todo su apoyo, cariño y consejos quienes siempre están en mi corazón.

ÍNDICE

Abreviaturas	6
Resumen	7
Introducción	9
Activación del linfocito T	11
Maquinaria de señalización medida por TCR	16
Sinapsis inmunológica	18
La proteína CD45	19
Estructura de CD45	20
Función de CD45 en la activación del linfocito T	23
Mutaciones y enfermedades	25
Diferencias de activación en linfocito T del adulto y neonato	26
Planteamiento del problema	28
Justificación	29
Hipótesis	30
Objetivos	31
Objetivos generales	31
Objetivos particulares	31
Metodología	32
Obtención de células mononucleares a partir de sangre humana	32
Separación de poblaciones celulares por selección negativa con el sistema de MACS (MILTENYI)	32
Aislamiento de linfocitos T CD4 ⁺	33

Aislamiento de linfocitos T CD4 ⁺ , CD45RA ⁺ CD45RO ⁺ -----	33
Inmunofluorescencia y citometría de flujo (FACS) -----	34
Lisis celular. -----	35
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida. SDS (SDS_PAGE) y western blot -----	35
Análisis estadístico -----	37
Resultados -----	38
Expresión extracelular de CD45 en linfocitos T CD4 ⁺ naives de neonato y adulto -----	38
Co-expresión de las isoformas de CD45 en linfocitos T naives de neonato y adulto -----	48
Discusión de resultados -----	51
Conclusiones -----	56
Perspectivas -----	57
Bibliografía -----	58
Apéndice I -----	63

Abreviaturas

(CD45)	proteína tirosina fosfatasa
(TCR)	receptor de linfocitos T
(Ag)	antígeno
(MHC)	complejo mayor de histocompatibilidad
(PTK)	proteínas cinasas de tirosina
(CPA)	célula presentadora de antígeno
(GEM)	micro dominios lipídicos
(ITAM)	motivo de activación basado en tirosina
(GT)	proteínas adaptadoras y componentes de el citoesqueleto
(PTPIB)	fosfatasas PTP 1 B
(LCA)	antígeno común de leucocitos
(SCID)	inmunodeficiencia combinada severa
(IMF)	intensidad de fluorescencia media

RESUMEN

CD45 es una de las glicoproteínas transmembranales más abundantes en la superficie de las células hematopoyéticas. Esta fosfatasa juega un papel primordial en la respuesta funcional del linfocito T mediada por el TCR puesto que es responsable de los eventos tempranos de señalización que ocurren después de la interacción del TCR con el péptido-MHC en la célula presentadora de antígeno. Los exones 4, 5 y 6 (que corresponden a A, B y C en la proteína) son editados alternativamente para generar la familia de isoformas de CD45 que varían en la estructura de su ectodominio (secuencias de aminoácidos, tamaño y patrones de glicosilación) y que se expresan de manera diferencial en poblaciones celulares así como durante la activación y diferenciación.

La función del ectodominio de CD45 aún no está bien caracterizada sin embargo, existen datos que indican que cambios en este dominio son capaces de modular la activación del linfocito T. La población de linfocitos T de memoria (que expresan la isoforma de bajo peso molecular CD45RO) es más eficiente en generar respuestas funcionales (proliferación, aumento de expresión de marcadores de activación) que la población de linfocitos T naives (que expresan isoformas de alto peso molecular tales como CD45RA o RB. Sin embargo, aun no hay un consenso sobre los eventos tempranos de activación y su correlación con la funcionalidad de ambas poblaciones celulares.

Los linfocitos T del neonato han sido considerados como “inmaduros” en comparación con los del adulto en cuanto a sus respuestas funcionales sin embargo, trabajos recientes han demostrado que con un estímulo adecuado, estas células son capaces de responder de manera similar a las del adulto. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue observar si están presentes las isoformas de CD45, en linfocitos T neonatales, caracterizar primero la expresión total y de superficie de las distintas isoformas de CD45 en linfocitos T naives provenientes de neonatos y adultos.

Se obtuvieron muestras de sangre de cordón umbilical y de sangre periférica adulta. Se purificaron los linfocitos T CD4⁺ de neonatos y adultos por selección negativa (CD4⁺ >80%) con el sistema MACS de Miltenyi. La población de linfocitos T naives (isoformas de alto peso molecular de CD45) se obtuvo en la elución de dicha separación utilizando el kit de selección negativa de linfocitos T naives (Miltenyi). Para observar la expresión de CD45 en la superficie celular se utilizó la técnica de inmunofluorescencia con anticuerpos dirigidos contra CD45RA, RB, RC (Sánchez-Madrid, Hospital de la Princesa, Madrid, España) así como Multitest de naives (BD), anti-CD45 tail que reconoce todas las isoformas de CD45. Las muestras se leyeron en el FACScan (Dra. G. Soldevila, Dr. Carlos Castellano, Unidad de Citometría, IIB, UNAM). Para la expresión total celular de CD45 se solubilizaron las proteínas de la membrana y citoplasma con NP-40 al 1% y se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunoblot revelado mediante quimioluminiscencia en el equipo Typhoon (Amersham Biosciences).

Se observó que existen diferentes combinaciones de isoformas de CD45 solo en western blot que son distintas para los linfocitos T neonatales. Estos expresan CD45RA, CD45RB y CD45RC con niveles de expresión similares al adulto, las diferencias no fueron estadísticamente significativas para la citometría de flujo. La función de estas combinaciones de isoformas sería muy difícil de comprender, como CD45 desfosforila a su sustrato LCK, lo que se pretende investigar más adelante es la activación de LCK por fosforilación.

Por otro lado, la expresión de CD4 y CD3 es similar en el neonato y el adulto, lo que nos indica que las diferencias en la activación de los linfocitos T neonatales no se deben a niveles de expresión distintos de estas proteínas, moléculas clave en la cascada de activación.

INTRODUCCIÓN

La inmunología es el estudio de los mecanismos fisiológicos que los seres humanos y otros animales usan para defenderse de la invasión por otros organismos.

El propósito del sistema inmunitario de los vertebrados es reconocer los microorganismos extraños invasores, impedir su diseminación y finalmente eliminarlos del cuerpo. Este sistema consiste en miles de millones de células de varios tipos que interactúan con el agente infeccioso y entre sí para combatir la infección. Todas las células del sistema inmunitario se originan en la médula ósea, pero en algún momento de su vida la abandonan para circular en la sangre, entrar en otros tejidos y pasar a formar parte de los tejidos linfoides especializados (Abbas y Lichtman, 2001).

La respuesta del sistema inmunológico adaptado o adquirido es un mecanismo de defensa antígeno-específico, que por lo tanto se distingue del innato más primitivo, en que necesita de un proceso de reconocimiento antigénico mediado por receptores de superficie celular localizados en las células T y B. Los linfocitos T ofrecen protección en contra de patógenos y células malignas, contando con la capacidad de discriminar entre los antígenos (Ags) propios y los ajenos, estos últimos comprendiendo antígenos externos o anomalías en la expresión de antígenos de tejidos malignos (Abbas y Lichtman, 2001).

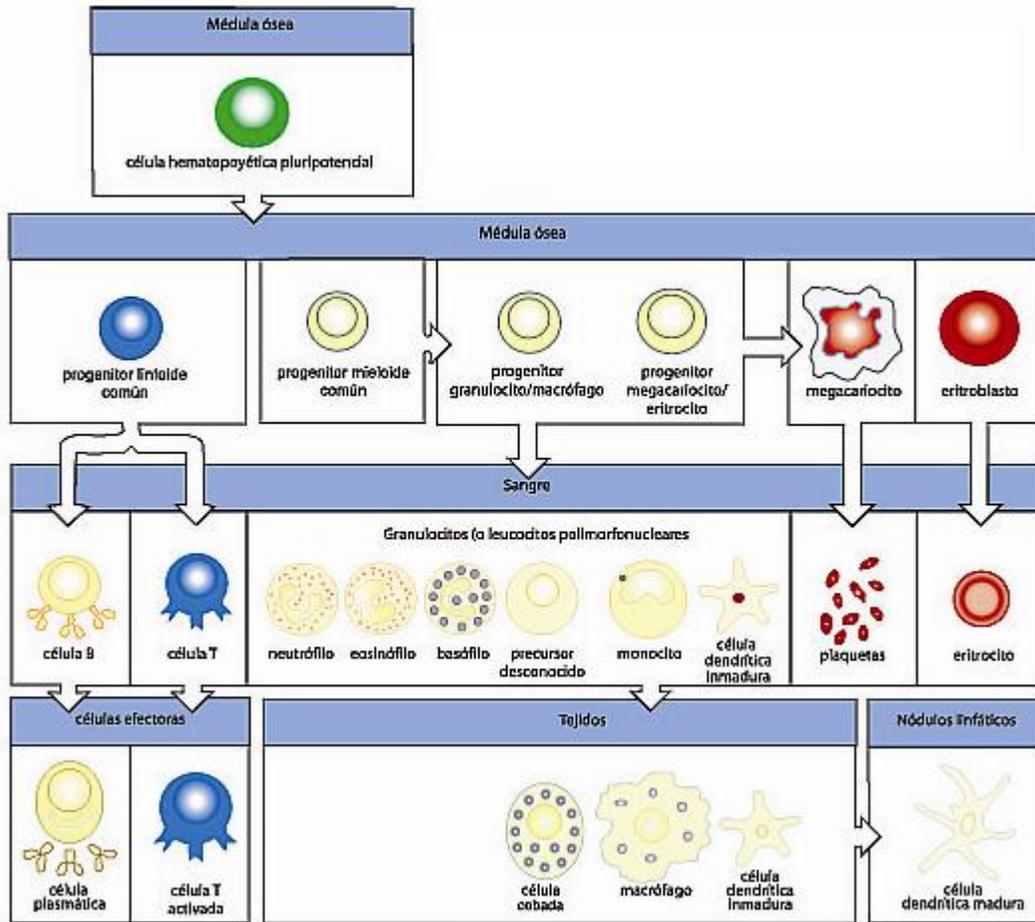


Figura 1. Origen de los glóbulos blancos. Todos los elementos celulares de la sangre, incluyendo a los linfocitos del sistema inmunológico, se derivan de las células hematopoyéticas pluripotenciales de la médula ósea. Estas células pluripotenciales se vuelven a dividir, para producir dos tipos de células multipotenciales más especializadas, un linfocito progenitor común del que a su vez se originan los linfocitos T, encargados de combatir en el sistema inmunológico adquirido, y un progenitor mieloide del que se originan los otros diversos tipos de leucocitos, los eritrocitos y los megacariocitos (tomado de Abbas y Lichtman, 2001).

Se ha postulado que CD45 (originalmente denominado antígeno leucocítico común) una glicoproteína de superficie celular con un dominio de tirosina fosfatasa citoplasmático, tiene una función en la activación de los linfocitos T estos expresan varias formas en los leucocitos inmaduros y maduros, incluidos linfocitos T y B, timocitos, fagocitos mononucleares y leucocitos polimorfonucleares.

La familia CD45 esta formada por 8 miembros que son producto de una edición alternativa de un único gen complejo. Las secuencias de aminoácidos predichas de los productos proteicos incluyen dominios externos de longitudes variables, una región transmembranal y su dominio citoplasmático, que es uno de los más grandes que se han identificado entre las proteínas de membrana. La mayor parte de linfocitos T vírgenes humanos expresan la forma CD45RA mientras que los linfocitos T de memoria expresan una isoforma diferente, denominada CD45RO. Sin embargo, estos patrones de expresión no son fijos y existen pocas pruebas de que las distintas isoformas de CD45 realicen funciones diferentes.

El dominio citoplasmático de CD45 contiene una región con actividad tirosina fosfatasa intrínseca, que cataliza la eliminación de los fosfatos de los residuos de tirosina de diferentes sustratos. Uno de estos sustratos es Lck, la tirosina cinasa que se asocia a las colas citoplasmáticas de CD4 y CD8. Algunos estudios con líneas de linfocitos T indican que la fosforilación mediada por CD45 puede permitir que se active Lck, evento esencial para la activación de linfocitos T, normales por los antígenos (Abbas y Lichtman, 2001; Roitt *et al.*, 2008)

Con el fin de caracterizar las respuestas funcionales de los linfocitos T neonatales y estudiar la influencia de las isoformas de la proteína CD45, molécula clave en la activación de dichas células, es indispensable caracterizar primero la expresión total y de superficie de las distintas isoformas de CD45 en linfocitos T naives y de memoria provenientes de neonatos y adulto (Abbas y Lichtman, 2001; Roitt *et al.*, 2008).

Activación del linfocito T

Avances importantes ocurridos durante las últimas décadas en la bioquímica y la biología molecular han contribuido al entendimiento de los mecanismos de regulación del sistema inmune.

Una propiedad general de los linfocitos B y T es que necesitan dos señales extracelulares diferentes para iniciar su proliferación y diferenciación hacia células efectoras. La primera señal es aportada por la unión del antígeno al receptor antigénico (TCR o receptor de linfocitos T) y es responsable de asegurar la especificidad de la posterior respuesta inmunitaria. En caso de los linfocitos T, la unión de los complejos péptido-CPA al TCR (y al receptor CD4 o CD8) suministra la señal inicial. La segunda señal de los linfocitos T procede de las moléculas que se denominan colectivamente coestimuladores. Los linfocitos T son dos proteínas relacionadas, llamadas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), que se expresan en las CPA profesionales estos coestimuladores B7 de las CPA son reconocidos por receptores específicos de los linfocitos T (Figura 2).

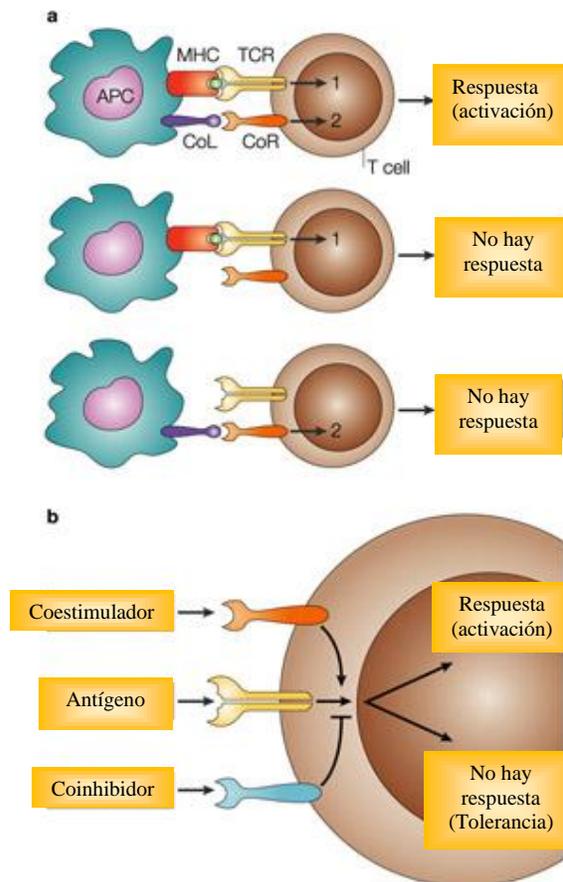


Figura 2. La activación óptima del linfocito T requiere de dos señales: (a) la activación de la señal de la membrana plasmática y (b) la célula presentadora de antígeno (adaptado de Abbas y Lichtman, 2001)

El reconocimiento del péptido antigénico (Ag) en el contexto de la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) por receptores clonotípicos de membrana, tales como el receptor de los linfocitos T (TCR), es requerido para la activación del linfocito y determina respuestas biológicas tales como la expansión clonal, la diferenciación a células efectoras y de memoria (Figura 3) o incapacita su respuesta volviéndolas “enérgicas” a través de mecanismos que implican la proliferación, la reprogramación genética o la muerte celular (Samelson, 2002). Los linfocitos T cooperadores (Th) activados se diferencian en Th1, Th2 y Th17. La principal función de los linfocitos Th1 radica en la defensa mediada por fagocitos contra las infecciones, especialmente frente a los microorganismos intracelulares. El IFN-gamma producido por los linfocitos Th1 estimula la actividad microbiana de los fagocitos, lo que favorece la destrucción intracelular de los microbios fagocitados y también estimula la síntesis de anticuerpos IgG opsonizantes y fijadores de complemento, que facilitan la fagocitosis de los microbios. Muchas enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano y algunas reacciones inflamatorias como los granulomas se deben a la activación excesiva de los linfocitos Th1.

La función efectora más importante de los linfocitos Th2 se observa en las reacciones inmunitarias mediadas por IgE y por eosinófilos/ mastocitos estas reacciones son iniciadas por IL-4, IL-5, IL-13. Los linfocitos Th2 son responsables de la defensa a las infecciones por helmintos artrópodos y de las reacciones alérgicas, los anticuerpos estimulados por las citocinas Th2 no estimulan la fagocitosis ni activan el complemento de una forma eficaz. Además varias citocinas sintetizadas por las células Th2 (en especial IL-4, IL-13 e IL-10) antagonizan las acciones de IFN-gamma e inhiben la activación de los macrófagos. Esta es la razón de que el desarrollo de Th2 se asocie a una IC deficiente frente a las infecciones por microorganismos intracelulares, como, *Leishmania* y microbacterias.

Las células Th17 fueron inicialmente descritas como una población implicada en la autoinmunidad, pero ahora se piensa que tienen sus efectores propios y funciones de regulación.

La activación del linfocito T es regulada por la fuerza de la interacción entre el complejo MHC y la acción cooperativa de otros receptores de membrana así como por un mecanismo intracelular que controla múltiples cascadas de señalización (Lanzavecchia y Sallusto, 2001). Las señales recibidas por el linfocito T de la APC se transmiten al interior de la célula mediante una cascada de eventos bioquímicos y biofísicos dentro de los cuales la fosforilación de proteínas, la redistribución de proteínas de membrana, la relocalización de proteínas en la membrana plasmática y la reorganización del citoesqueleto son algunos eventos críticos (Acuto y Cantrell, 2000). La transmisión de una señal se lleva a cabo por modificaciones químicas de proteínas intracelulares de manera rápida y extensa. La adición de un grupo fosfato a residuos tirosina en las proteínas, por las proteínas cinasas de tirosina (PTK) es la primera capa de una cascada de señalización inducida por la interacción del TCR. La fosforilación de proteínas en residuos tirosina tiene efectos mayores en las funciones celulares tales como modificaciones de actividades enzimáticas, localización de proteínas y es el evento central de la maquinaria de señalización intracelular (Figura 4) (Barrios, *et al.*, 1996a; Zhang y Samelson, 2000).

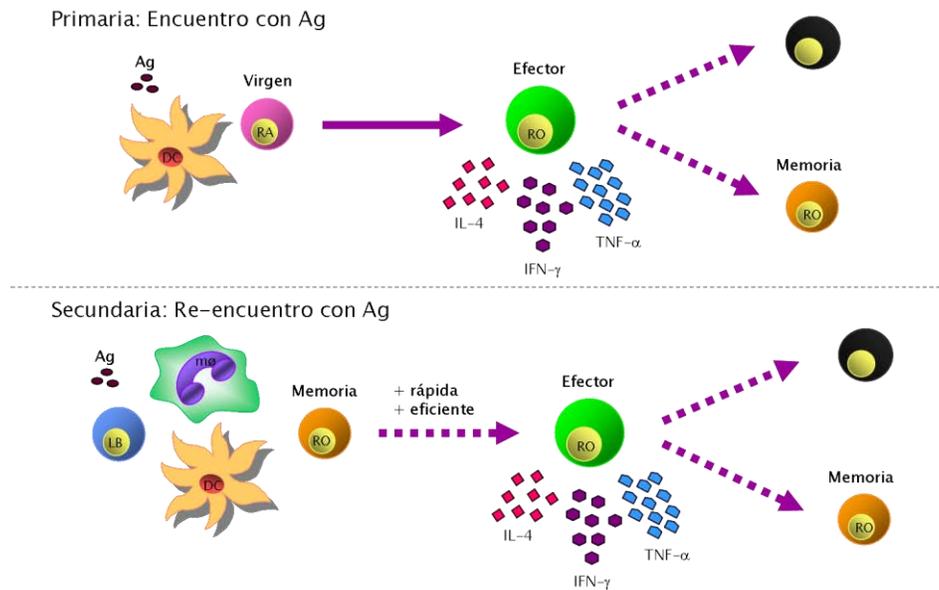


Figura 3. Respuestas biológicas de los linfocitos T (cortesía de Gabriela González Pérez, CINVESTAV).

Nuevos descubrimientos en las bases moleculares de la activación celular han enriquecido nuestra comprensión de la organización de la señal en la membrana plasmática de los linfocitos T. En este respecto, estudios recientes han subrayado la función crítica en la transducción de señales y en la formación de complejos de señalización de microdominios lipídicos especializados de la membrana, enriquecidos en glicoesfingolípidos y colesterol llamados “GEMs” (Brown y London, 1998; Bunnell *et al.*, 2002; Harder, 2001). Actualmente esta compartimentalización de la membrana plasmática permite comprender cómo se organiza eficazmente y de manera prolongada la maquinaria de transmisión de señales (Figura 4). Además estos microdominios juegan un papel central en varios procesos celulares incluyendo el tráfico y polarización celular, crecimiento y muerte celular así como la respuesta alérgica, en infecciones y en procesos inflamatorios que están presentes en muchas enfermedades. Recientemente se ha comprobado la importancia médica de estos microdominios ya que los microdominios lipídicos (GEMs) se encuentran involucrados en enfermedades tales como Parkinson, Alzheimer, distrofia muscular, diabetes, asma, enfermedades autoinmunes, hipertensión así como en infecciones causadas por virus, bacterias, parásitos y priones (Simons y Ehehalt, 2002).

Por otro lado, se descubrió que la señalización del linfocito T con la célula presentadora de antígeno (APC), da lugar a una dramática redistribución de receptores de membrana y de componentes de señalización para formar una “sinapsis inmunológica” altamente organizada (Grakoui *et al.*, 1999).

Maquinaria de señalización mediada por el TCR

De manera breve a continuación se hará la descripción de TCR. El TCR está compuesto por dos subunidades: las proteínas clonotípicas unidas por puentes disulfuro α y β (unidad de reconocimiento del péptido/MHC) y el complejo invariante CD3 que consiste de dos ϵ , una γ y un homodímero de cadenas ζ . Este último presenta en su dominio intracelular una subunidad de transducción de señal llamada motivo de activación-basado en tirosina del immunoreceptor (ITAM, del inglés immunoreceptor tyrosine-based activation motif) ($EX_2YX_2L/IX_7YX_2L/I$). En la transmisión o transducción de una señal iniciada por el TCR intervienen una multitud de proteínas intracelulares (tales como proteínas tirosin cinasas, serin-treonin cinasas, tirosin fosfatasas, fosfatasas lipídicas, intercambiadores de pequeñas GTPasas, proteínas adaptadoras y componentes del citoesqueleto) las cuales forman una compleja maquinaria bioquímica en la membrana plasmática y en el sitio de contacto linfocito T/APC (Figura 4). Las etapas iniciales de activación del linfocito T involucran al menos tres tipos de proteínas tirosin cinasas de las familias Src, Zap-70/Syk y Tec (Cantrell, 2002; Koretzky y Myung, 2001; Samelson, 2002; Zhang y Samelson, 2000).

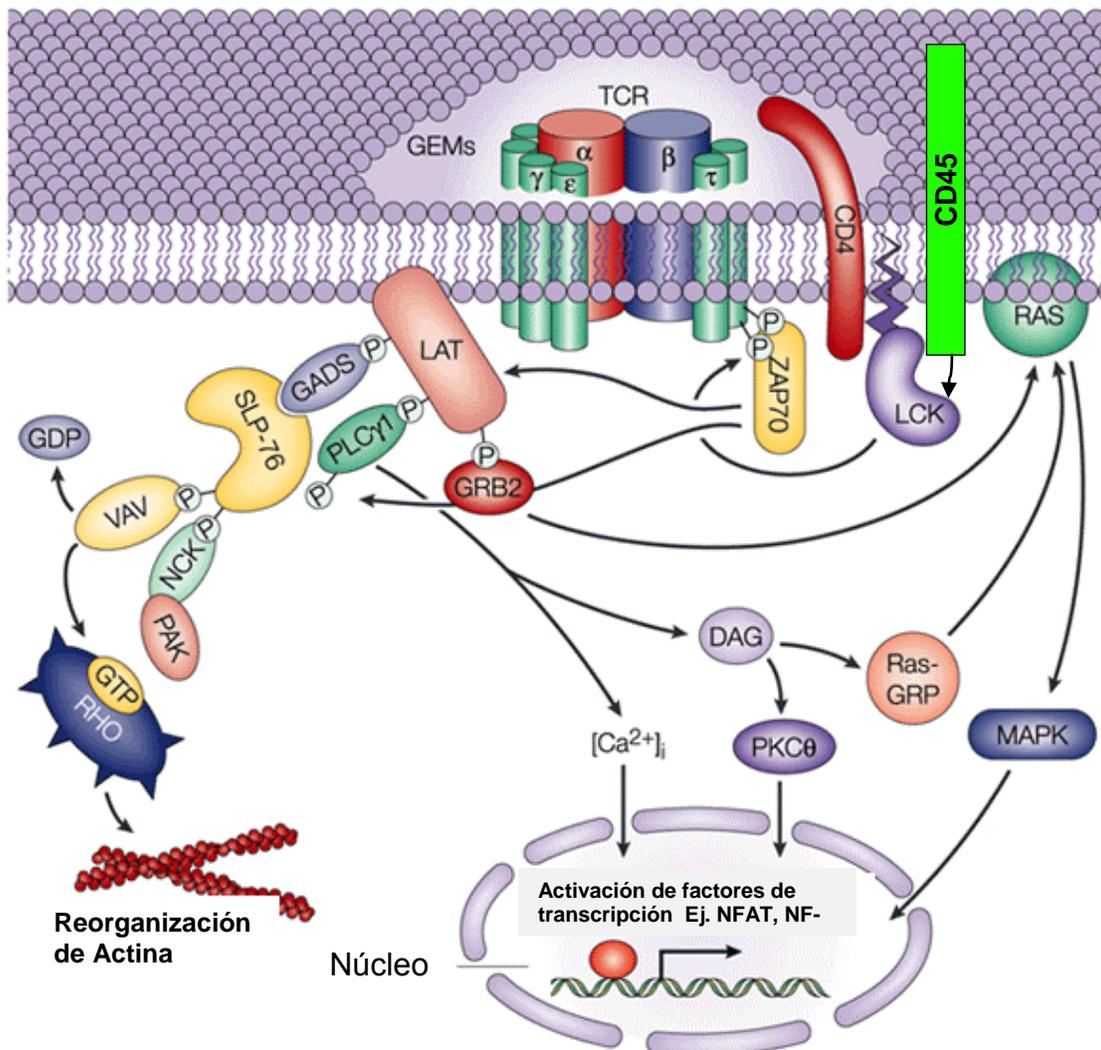


Figura 4. Los microdominios lipídicos (GEMs) son plataformas de activación (tomado de Zhang y Samelson, 2000).

Un evento inmediato después de la interacción del TCR con el péptido/MHC es la fosforilación de los ITAMs por las PTK de la familia Src, Lck y Lyn (Weiss y Littman, 1994) lo cual permite que se reclute y active la PTK Zap-70 (Chan y Shaw, 1996; Iwashima *et al.*, 1994; Wange y Samelson, 1996). Zap-70 activada fosforila a la proteína LAT residente de las GEMs y SLP-76, formando un andamio adaptador con múltiples sitios que funciona como una plataforma que recluta diferentes proteínas generando varias cascadas de señalización que regulan la capa de nivelación del TCR, rearrreglos del citoesqueleto así como la activación transcripcional de genes de citocinas (Figura 4) (Cantrell, 2002; Koretzky y Myung, 2001; Samelson, 2002; Zhang y Samelson, 2000).

Sinapsis Inmunológica

El modelo reciente de activación del linfocito T propone que al contacto del TCR con el péptido/MHC ocurren una serie de eventos temporalmente regulados se inicia con una redistribución supramolecular de la membrana plasmática llamada sinapsis inmunológica (SI) por su similitud con la sinapsis neurológica (Burack *et al.*, 2002; Grakoui *et al.*, 1999; Lanzavecchia y Sallusto, 2001; Monks *et al.*, 1998). En efecto, la SI madura presenta grupos de receptores de superficie tales como el TCR/CD3, CD28, CD4 y componentes de señalización (quinasas Src y PKC θ) en el centro del contacto linfocito T/APC (c-SMAC) rodeados por un aro periférico (p-SMAC) de moléculas de adhesión, como LFA-1 y talina (Schade y Levine, 2002; Montixi *et al.*, 1998; Sedwick y Altman, 2002).

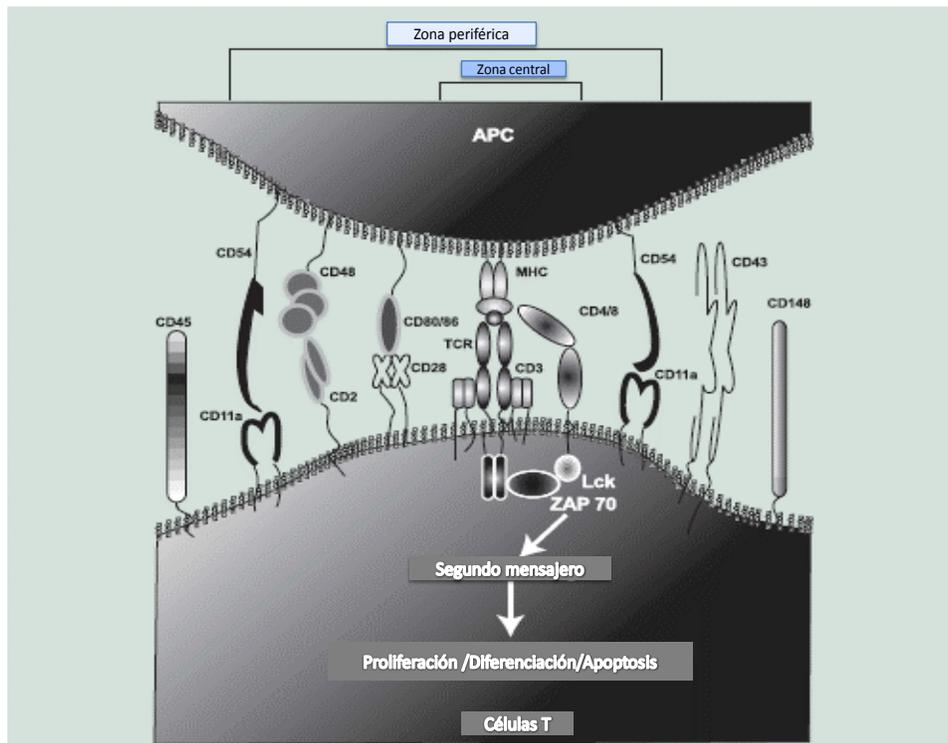


Figura 5. Sinapsis Inmunológica (adaptado de Vallejo *et al.*, 2004).

Así mismo, la interacción del TCR provoca la coalescencia de varios dominios lipídicos de la membrana plasmática GEMs que contienen a las cinasas Src y de esta manera se concentran en el c-SMAC estas cinasas y el complejo TCR/CD3 lo cual permite la fosforilación de los ITAMs. Se ha propuesto entonces que las GEMs compartimentalizan la membrana permitiendo organizar de manera óptima la cascada de señalización concentrando las moléculas clave de señalización únicamente después de la interacción del TCR con el péptido/MHC mientras que excluyen fosfatasa membranales tales como CD45, asegurando una señal sostenida de fosforilación (Figura 5) (Montixi *et al.*, 1998; Schade y Levine, 2002; Sedwick y Altman, 2002). Consistente con este modelo, la depleción del colesterol por agentes químicos causa un aparente aumento de la fosforilación (Kabouridis *et al.*, 2000). Sin embargo, este modelo debe ser reevaluado debido a nuevas evidencias que discutiremos más adelante.

La proteína CD45

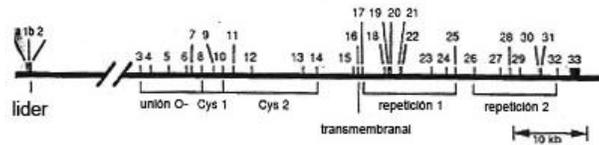
La comprensión de los mecanismos por los cuales la fosforilación de proteínas en tirosina regula la señalización del linfocito T a sido un área de intensa investigación durante los últimos diez años (Mustelin *et al.*, 2002). Sin embargo, el descubrimiento de las proteínas fosfatasa de tirosina (PTPasas) con la clonación de la PTP1B hace once años (Tonks *et al.*, 1998) ha adicionado más complejidad al proceso de señalización intracelular. Efectivamente, este mayor descubrimiento ha sugerido que la transmisión de la señal es regulada por un equilibrio dinámico de eventos de fosforilación y desfosforilación de proteínas. Este dato fue también crítico porque reveló que un receptor de superficie ya conocido, el antígeno común de leucocitos (LCA) CD45, era una fosfatasa (Tonks *et al.*, 1998) y de hecho, fue la primera PTPasa cuya función fue descrita en la activación del linfocito T. Evidencias genéticas y bioquímicas han demostrado los requerimientos del dominio citoplásmico de CD45 (responsable de la actividad catalítica) en la activación del linfocito T como un regulador positivo de las PTKs de la familia Src,

tales como Lck (Alexander, 2000). Este hallazgo fue algo inesperado ya que se creía que las PTPasas funcionaban como reguladores negativos de la transmisión de señales intracelulares. Además, las peculiares características moleculares del dominio extracelular (ectodominio) de CD45 sugieren mecanismos por los cuales las PTPasas de membrana regulan sutilmente la activación celular.

Estructura de CD45

La estructura CD45 esta formada por multiples miembros que son producto de un unico gen complejo. Este gen contiene 34 exones, de forma que transcritos primarios del ADN de 3 y de los exones denominados (A, B, C) y se unen de manera alternativa para generar hasta 8 ADN mensajero diferentes y 8 productos diferentes (Figura 6). Estudios recientes han demostrado a la ribonucleoproteina de tipo-L (hnRNPLL) como un regulador crítico inducible de la edición alternativa del gen de CD45 en linfocitos T activados (Oberdoerffer *et al.*, 2008). Las secuencias de aminoacidos predichas de los productos proteicos incluyen dominios externos de longitudes variables una region transmembranal y de dominio citoplasmatico de 705 aminoacidos que es uno de los mas grandes que se han identificado entre las proteinas de membrana. Las isoformas de la proteina CD45 que expresan un grupo restringido de tipos celulares se denominan CD45R. La mayor parte de los linfocitos T virgenes humanos expresan una isoforma CD45R.

A



B

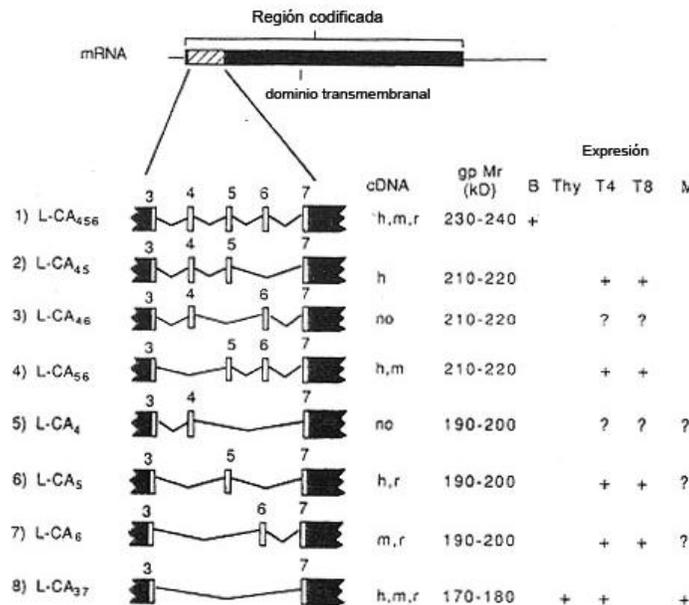


Figura 6. A. Estructura genómica para el gen de L-CA de ratón. Exones que codifican posibles subdominios se agrupan y etiquetados por debajo de la línea. B. Diagrama esquemático de la utilización diferencial de los exones L_CA. Exones 3-7 se indican con rectángulos abiertos. Los exones utilizados en cada formulario se indican en el subíndice L-CA. Las formas que han sido clonadas se indican en la columna cDNA. La especie de la que cada forma era aislada se indica por: h (humano), m (ratón), r (rata), y no indica que no se han aislado cDNAs de esa forma. Gp Mr indica el peso molecular aproximado de la glicoproteína de cada tipo de la L-CA. La columna de expresión indica los patrones de expresión posible para LCA diferentes (adaptado de Thomas, 1989).

El antígeno común de leucocitos LCA o CD45 es una de las glicoproteínas transmembranales más abundantes en la superficie de las células hematopoyéticas, constituye hasta un 10% de las proteínas totales de superficie (Thomas, 1989). La región intracelular con dos dominios fosfatasa responsables de la actividad catalítica está unida a través de una corta región transmembranal al ectodominio variable cuyo ligando es desconocido. El empalmado alternativo de

tres exones A, B y C da lugar a distintas isoformas de CD45 cuyos ectodominios poseen distintas dimensiones longitudinales y grados de glicosilación que varían durante la diferenciación y activación celular (Thomas, 1989). La expresión de las isoformas de CD45 es fascinante ya que una misma célula puede presentar a la vez varias isoformas y estas varían también durante el curso del desarrollo tímico así como en la diferenciación y activación celular (Figura 7) (Trowbridge y Thomas, 1994). Por ejemplo, los linfocitos T naives expresan las isoformas de alto peso molecular CD45RA, CD45RAB altamente O-glicosiladas mientras que los de memoria presentan la forma mínima y con menos carbohidratos, CD45RO (Thomas, 1989) Sin embargo, aún cuando se han propuesto distintas funciones para las diferentes isoformas de CD45 en la activación de los linfocitos T así como se ha negado su importancia, no existe un consenso.

La función del ectodominio de CD45 aún no está bien caracterizada sin embargo, existen datos que indican que cambios en este dominio son capaces de modular la activación del linfocito T. La población de linfocitos T de memoria (que expresan la isoforma de bajo peso molecular CD45RO) es más eficiente en generar respuestas funcionales (proliferación, aumento de expresión de marcadores de activación) que la población de linfocitos T naturales que expresan isoformas de alto peso molecular tales como CD45RA o RB (Figura 7) (Holmes, 2005; Thomas, 1989).

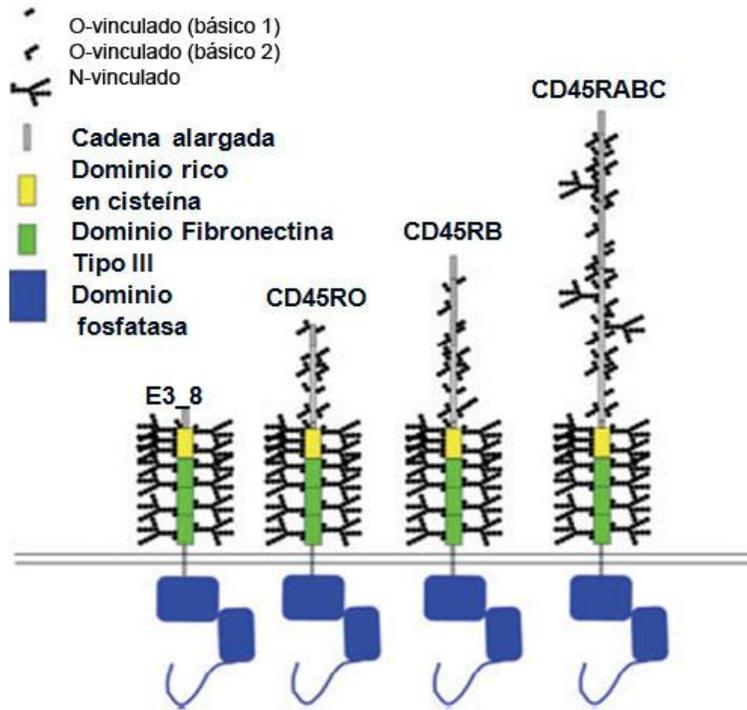


Figura 7. Isoformas de CD45 (adaptado de Holmes, 2005).

Función de CD45 en la activación de linfocitos T

Esta fosfatasa juega un papel primordial en la respuesta funcional del linfocito T mediada por el TCR puesto que es responsable de los eventos tempranos de señalización que ocurren después de la interacción del TCR con el péptido-MHC en la célula presentadora de antígeno.

Como ya se mencionó anteriormente, una de las primeras etapas en la transmisión de señales inducida por el TCR es la fosforilación de este receptor por la PTK Lck. En efecto, células que no expresan esta cinasa no son capaces de activarse y el desarrollo de los linfocitos también se encuentra impedido (Molina *et al.*, 1992). Esta PTK se encuentra constitutivamente localizada en las GEMs, anclada reversiblemente a la bicapa interna a través de S-acilaciones en su región N-terminal. La importancia de su localización en estos microdominios para su

función ha sido demostrado por mutantes de acilaciones de Lck que no pueden localizarse en las GEMs y en los cuales la activación TCR-dependiente es inexistente (Kabouridis *et al.*, 1997; Kosugi *et al.*, 2001).

Estudios genéticos, cristalográficos y bioquímicos han demostrado la importancia de dos residuos de tirosina en la actividad enzimática de Lck. La fosforilación de la Tyr-505 en el extremo C-terminal inhibe su actividad promoviendo una estructura cerrada mientras que la trans-(auto)-fosforilación de la Tyr-394 en el dominio catalítico induce una conformación abierta permitiendo una actividad catalítica óptima (Young *et al.*, 2001). Por lo tanto, la actividad de Lck se encuentra regulada de manera positiva por la PTPasa transmembranal CD45 que desfosforila el residuo Tyr-505 y de manera negativa por la fosforilación de este mismo residuo por la PTK citosólica Csk que se encuentra asociada a la proteína membranal PAG/Cbp residente de las GEMs (Hermiston y Weiss, 2002; Thomas y Brown, 1999). Pero es interesante mencionar que CD45 también ha sido propuesta como capaz de desfosforilar el residuo Tyr-394 de Lck promoviendo su inhibición (D'Oro y Ashwell, 1999).

En estado de reposo, PAG/Cbp se encuentra fosforilado lo cual permite su asociación con Csk manteniéndola presente en las GEMs (Figura 8) cerca de Lck para regularla negativamente. De esta manera, el equilibrio de los dos efectos opuestos de CD45 y Csk sobre Lck regula a su vez la reactividad o umbral de activación de los linfocitos T. Una vez que el TCR interactúa con el péptido/MHC, PAG/Cbp es desfosforilado lo cual provoca la liberación del control negativo de Csk sobre Lck y permite que CD45 pueda activarla (Brdicka *et al.*, 2000; Kawabuchi *et al.*, 2000; Torgersen *et al.*, 2001).

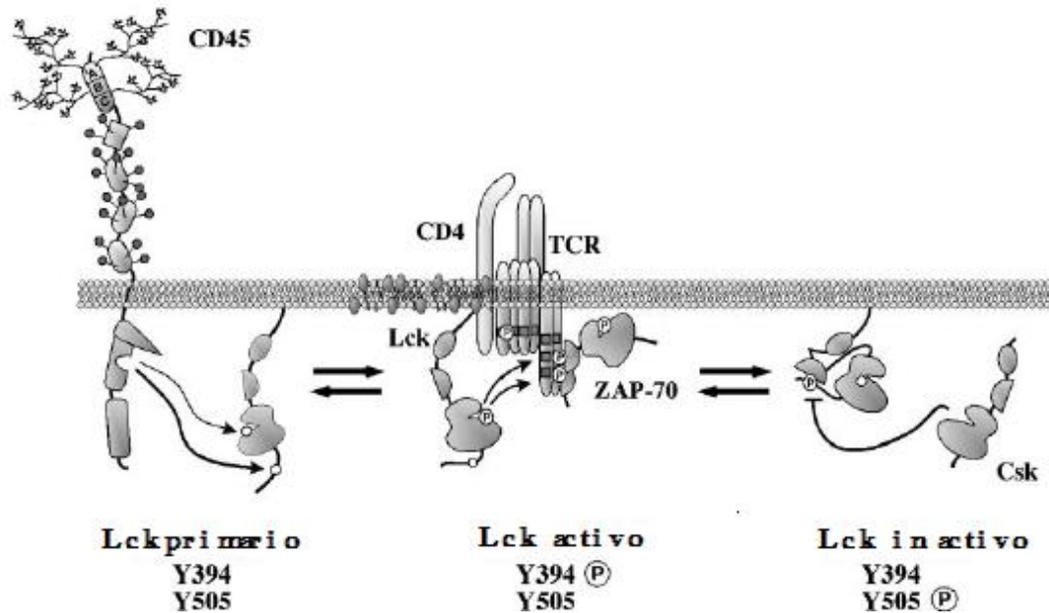


Figura 8. Mecanismo de activación de Lck por CD45 (adaptado de Holmes, 2006).

Mutaciones de CD45 y su asociación con enfermedades

Estudios han demostrado que las mutaciones en el gen PTPRC, que codifica para CD45, y anomalías en la expresión de CD45 en el empalme de variantes, causan una inmunodeficiencia combinada severa (SCID) en el ser humano, demostrando el papel crítico de esta enzima en la regulación de funciones inmunes en el hombre (Alexander, 2000; Kung et al., 2000, Tchilian *et al.*, 2001). En efecto, las células deficientes en CD45 no son capaces de activarse y esto correlaciona con una inhabilidad para activar a las cinasas Src (Trowbridge y Thomas, 1994). Sin embargo, aun no hay un consenso sobre los eventos tempranos de activación y su correlación con la funcionalidad de ambas poblaciones celulares.

La disminución en el número de células T y B provoca autoinmunidad e infecciones virales. Una edición alternativa defectuosa ha sido implicada en la

susceptibilidad a la esclerosis múltiple (EM) que proporciona la primera evidencia genética que las alteraciones en el empalme CD45 en los seres humanos pueden estar asociados con el desarrollo de la EM en algunas familias.

Diferencias de activación en linfocitos T del adulto y neonato

Los neonatos son más susceptibles que los adultos a todo tipo de infecciones y esto se debe en parte a la llamada “inmadurez” de su sistema inmunológico. El neonato se enfrenta a retos cuantitativos y cualitativos diferentes a los de la vida fetal. En particular, tiene que discriminar entre antígenos de microorganismos patógenos de los no dañinos como de animales domésticos, plantas, así como debe de desarrollar la capacidad de responder de manera apropiada a estos distintos antígenos. En caso de no desarrollar esta competencia inmunológica a tiempo después del nacimiento aumenta el riesgo de infecciones. Las respuestas específicas así como la memoria inmunológica están dadas por el sistema inmunológico adquirido o adaptativo y las células responsables de coordinar estas respuestas son los linfocitos T. La respuesta inmune que se despierta ante un desafío (ya sea infección o vacunación), determina el tipo de respuesta inmune, ya sea curar una enfermedad o crear una memoria inmunológica. Por lo tanto, es de suma importancia caracterizar los mecanismos moleculares de activación de los linfocitos T neonatales (Alexander, 2000; Kung *et al.*, 2000, Tchilian *et al.*, 2001).

La respuesta inmune neonatal no está aún bien caracterizada y en particular, se desconocen muchos aspectos de la activación de los linfocitos T. Se considera que esta respuesta es inmadura, por la baja proliferación y función efectora de los linfocitos T. La naturaleza exacta de la deficiencia en maduración del sistema inmunológico neonatal esta aún por determinarse, sin embargo al nacimiento parece existir un desajuste en el balance de la respuesta de linfocitos T (Th1/Th2) hacia funciones de tipo Th2 (Adkins y Du, 1998; Barrios *et al.*, 1996a y

1996b; Holt y Jones 2000; Wegmann *et al.*, 1993). Sin embargo, existen evidencias actuales que muestran que en respuesta a antígenos particulares, o condiciones fuertes de estimulación, los linfocitos T neonatales pueden montar respuestas celulares similares a las de células de adulto (Adkins *et al.*, 2004; Ridge *et al.*, 1996). Por lo tanto, el sistema inmune del neonato se debe de considerar como distinto al adulto y no inmaduro. Pero aún no queda claro si la capacidad funcional de linfocitos T neonatales humanos es debida a deficiencias de esta células o de la célula presentadora de antígeno o APC (Adkins y Du, 1999).

Como mencionamos anteriormente, la respuesta inmune adquirida está coordinada por los linfocitos T. Existen varias poblaciones de linfocitos T en circulación y en el neonato la población mayoritaria está formada por linfocitos T naives o vírgenes, que no han tenido contacto con antígenos extraños mientras que en el adulto alrededor de un 50% son linfocitos T vírgenes y el otro 50% linfocitos T de memoria (Adkins y Du 1999). Hasta la fecha, las respuestas funcionales de linfocitos T de memoria son más rápidas y de mayor intensidad que las respuestas de linfocitos T vírgenes y es por esta razón que se pensó que la capacidad de respuesta de los linfocitos T neonatales estaba disminuida, ya que en su gran mayoría son vírgenes. Una diferencia en ambas poblaciones de linfocitos consiste en la expresión de la molécula CD45 cuya isoforma cambia con la activación celular. Los linfocitos T vírgenes expresan CD45RA mientras que los linfocitos de memoria expresan CD45RO (Thomas, 1989).

Por otro lado, las APC del neonato también están consideradas como no maduras ya que tienen una menor expresión de marcadores importantes para poder estimular a los linfocitos T neonatales vírgenes (Goreli *et al.*, 2001; Langrish *et al.*, 2002).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La proteína CD45 es responsable de la regulación de funciones inmunes y en particular, su ausencia se asocia con una inmunodeficiencia severa adquirida y esto es debido a que es una molécula clave para el desarrollo y la activación del linfocito T. Trabajos previos han demostrado que la expresión de distintas isoformas de CD45 tiene una repercusión en la capacidad de activación del linfocito T. De hecho, los linfocitos T que nunca han visto antígenos expresan CD45RA mientras que los activados, cuya respuesta es más rápida y de mayor intensidad, expresan CD45RO. Se ha demostrado que el dominio extracelular de CD45 regula la cascada de señalización activada por el receptor de linfocitos T y esto repercute en la respuesta funcional de líneas celulares de linfocitos T jurkat (Irles *et al.*, 2003). En el laboratorio, resultados preliminares parecen mostrar diferencias en los niveles de fosforilación del sustrato de Lck entre linfocitos T naives neonatales CD45RA y linfocitos T de memoria adultos CD45RO.

De lo anterior las preguntas a resolver en este estudio son:

1. ¿Cuáles isoformas de CD45 están presentes en el neonato? y
2. ¿Cuáles son las diferencias con el adulto y que beneficios clínicos tendría?

JUSTIFICACIÓN

Hasta la fecha, los estudios de las diferencias de activación entre los linfocitos T neonatales y adultos no han llegado a un acuerdo. Sin embargo, se ha propuesto que los linfocitos T neonatales son inmunológicamente “inmaduros” ya que su proliferación y producción de citocinas se ha reportado ser menor a la de los linfocitos T del adulto. Además, durante un trasplante de sangre de cordón umbilical la respuesta del injerto contra el huésped es muy baja en comparación con un trasplante de médula ósea. Los autores han argumentado que esta pobre respuesta se debe al alto porcentaje de linfocitos T neonatales de fenotipo virgen; que no han tenido contacto previo con antígenos externos.

Los trasplantes de células de cordón tienen varias ventajas en comparación con las de médula ósea y es entonces de suma importancia estudiar las diferencias en los mecanismos de activación de linfocitos T neonatales y adultos, procesos regulados por las isoformas de CD45.

Con el fin de caracterizar las respuestas funcionales de los linfocitos T neonatales y estudiar la influencia de las isoformas de CD45 en la activación de dichas células es indispensable primero conocer que isoformas de CD45 están presentes en el neonato.

HIPÓTESIS

Los linfocitos T del neonato han sido considerados como “inmaduros” en comparación con los del adulto en cuanto a sus respuestas funcionales y estas respuestas dependen de las isoformas de CD45, ya que esta proteína juega un papel primordial en los eventos tempranos de señalización de la respuesta del linfocito T mediada por el TCR.

Por lo tanto nosotros esperaríamos que el neonato tuviera diferencias en las isoformas de CD45 expresadas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar la expresión total y de superficie de las distintas isoformas de CD45 así como de otras moléculas clave de la señalización (CD3 y CD4) en linfocitos T naives CD4⁺ provenientes de neonatos y adultos.

Esto nos permitirá conocer las respuestas funcionales de los linfocitos T y estudiar la influencia de las isoformas de CD45 en la activación de dichas células.

Objetivos particulares

- Caracterizar la expresión de superficie de las isoformas de CD45 en linfocitos T CD4⁺ naives provenientes de neonatos y adultos por citometría de flujo.
- Determinar la expresión total (extra e intra celular) de CD45 en linfocitos T CD 4⁺ naives provenientes de neonatos y adultos por western blot.
- Analizar los niveles de expresión de CD3 y CD4 en linfocitos T naives provenientes de neonatos y adultos por citometría de flujo.

METODOLOGÍA

Obtención de células mononucleares a partir de sangre humana

Todas las etapas se realizaron a temperatura ambiente y en condiciones estériles en una campana de bioseguridad tipo A2. La sangre de cordón umbilical (CB) proviene de muestras de neonatos sanos humanos de más de 38 semanas de gestación y la sangre periférica (PB) de donadores adultos humanos de 18 a 45 años, se obtuvieron de acuerdo con los lineamientos del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinoza de los Reyes”. Se desinfectó la bolsa de sangre con alcohol y se cortó por el tubo principal para colocar la sangre (obtenida el día anterior y almacenada temperatura ambiente) en tubos de 50 ml. Se centrifugaron ambas muestras a 3500 rpm para recuperar el concentrado leucocitario. Posteriormente se realizó un gradiente de Ficoll (15 ml de Ficoll) (Lymphoprep, Noruega) de la sangre diluida $\frac{1}{2}$ en solución salina (PBS), el cual se centrifugó inmediatamente a 2100 rpm, 40 min (sin freno, protocolo estandarizado para sangre de cordón umbilical (Dong 2006). Se recuperó el anillo blanquecino que corresponde a las células mononucleares y se lavó con PBS. Se resuspendió el botón celular en buffer de MACS y se contaron las células/ml.

Separación de poblaciones celulares por selección negativa con el sistema de MACS (marca Miltenyi Boston)

Se incubaron los leucocitos con una mezcla de anticuerpos que reconocen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD96, CD123, TCR gamma/delta y glicoforina A, acoplados a la molécula de biotina (marcaje primario). Posteriormente estas células marcadas se incubaron con anticuerpos anti-biotina acoplados a microbeads (marcaje secundario). Este marcaje indirecto (kit aislamiento de linfocitos T CD4⁺ II, Miltenyi, Boston, USA) nos permitió obtener por depleción una población de linfocitos T CD4⁺ de alta pureza y que no han sido “tocados”. Posteriormente los linfocitos CD45RA⁺ y CD45RO⁺ se separaron con el kit de aislamiento de linfocitos T CD4⁺ naives (Miltenyi II), en este caso se incuban

linfocitos TCD4⁺ con una mezcla de anticuerpos que reconocen CD8,CD19,CD15,CD16,CD19, CD25, CD34, CD56, CD123, CD45RO, glicofolina-A TCR gamma/delta de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

Aislamiento de linfocitos T CD4⁺

Se centrifugó la suspensión de células a 1200 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en el volumen adecuado de buffer MACS (40 ul de buffer para 10⁷ células). Se agregó el coctel de anticuerpos biotinilados (10 ul de reactivo para 10⁷ células), se mezcló e incubó durante 10 min a 4°C. Se agregó el buffer MACS (30 ul de buffer para 10⁷ células) y luego el anticuerpo anti-biotina acoplado a las microbeads (20 ul para 10⁷ células), se mezcló e incubó durante 15 min a 4°C. Se lavaron las células agregando 10-20 veces el volumen del marcaje con buffer MACS, y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min. Durante la centrifuga, se agregaron 3 ml de buffer MACS a la columna de afinidad (marca Miltenyi) LS (que está colocada en el imán) (marca Miltenyi). Para hidratarla. Se re-suspendió el botón celular en buffer MACS (10⁸ células en 500 ul de buffer) y se dejó fluir por gravedad a través de la columna de afinidad recuperando la fracción que se recupera correspondiente a los linfocitos T CD4⁺. Se lavó tres veces la columna con buffer MACS (3 ml) recuperando el eluato como linfocitos T CD4⁺. Las células se dejaron en cultivo una noche a 37°C/5%CO₂.

Aislamiento de linfocitos T CD4⁺ CD45RA⁺ y CD45RO⁺

Se centrifugaron los linfocitos T CD4⁺ y se les agregó anticuerpo anti-CD45RA acoplado a las microbeads (10 ul de reactivo para 10⁷ células) en buffer de MACS (40 ul de buffer para 10⁷ células), se incubaron durante 10 min a 4°C. Se lavaron las células agregando 10-20 veces el volumen del marcaje con buffer MACS, y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min. Durante la centrifuga, se

agregaron 3 ml de buffer MACS a la columna de afinidad LS (que está en el imán) para hidratarla. Se re-suspendió el botón celular en buffer MACS (10^8 células en 500 ul de buffer) y se dejó fluir por gravedad a través de la columna de afinidad recuperando la fracción que eluye correspondiente a los linfocitos T $CD4^+CD45RO^+$. Se lavó tres veces la columna con buffer MACS (3 ml) recuperando el eluato como linfocitos T $CD4^+ CD45RO^+$. Para recuperar los linfocitos T $CD4^+CD45RA^+$, se separó la columna del imán y se agregaron 3 ml de buffer MACS y utilizando el émbolo se recuperó el buffer que pasa por la columna con las células. Ambas poblaciones se lavan una vez con PBS y se cuentan.

Inmunofluorescencia y citometría de flujo (FACS).

Se colectaron las células en tubos FACS (un millón de células por tubo). Se hizo un lavado con buffer de FACS (1ml), centrifugando a 1500 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se agregó el primer anticuerpo en concentraciones saturantes: 1/20, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO en dilución 1/10 (donación del Dr. Sánchez-Madrid, Hospital de la Princesa, Madrid, España), así como el Multitest Naive 25 ul/tubo (CD4-perCP, CD3-APC, CD45RA-FITC y CD62L-PE, Becton Dickinson E.U) e incubar durante 30 minutos a 4°C. Se hizo un lavado con buffer de FACS. Se centrifugó, se quitó el sobrenadante y se agregó el segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón-FITC 1/50, BD) a los tubos para las isoformas de CD45. Se realizó un lavado con buffer, se centrifugó y se fijaron las células con paraformaldehído al 1% para su análisis en un citómetro FACSCAN ubicado en la unidad de citometría, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (Dra. Gloria Soldevila y Dr. Carlos Castellano responsables de la unidad).

Lisis celular

Todos los pasos se realizaron a 4°C. Primero se colocaron 1×10^6 células linfocitos T CD4⁺ naive de adulto y neonato, cada una por separado en un tubo eppendorf y se lavaron una vez con PBS. Se centrifugaron 5 min a 2000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se agregó solución de lisis fría (10 ul por cada millón de células), se homogenizaron en el vórtex y se incubaron durante 30 min a 4°C. Se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 min y 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se determinó la concentración de proteínas totales mediante el método de Bradford (Sigma, Australia) se les agrego buffer de Laemmli 2x con DTT se incubo 5mn a 100°C y se almacenaron a -70°C.

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y Western Blot

Se preparó el gel separador (ver apéndice I) al 10% de acrilamida/bisacrilamida (37.5/0.8), dejando polimerizar por 1 hora. El gel concentrador (ver apéndice I) se elaboró al 4% de acrilamida/bisacrilamida y se dejó polimerizar 30 minutos. El gel se colocó en la cámara de electroforesis (Biorad América Latina) la cual debe contener el buffer de corrida 1X. Las muestras, se pusieron en los carriles del gel durante 1hra, así como un marcador de pesos moleculares (Biorad, California, USA). Se colocaron 50 ug de proteínas/carril y se realizó la electroforesis a 14 mA con buffer de Corrida 1X. Después las proteínas se transfirieron del gel a la membrana de nitrocelulosa toda la noche a 30V con buffer de transferencia, a la membrana se le agrego rojo ponceau (Biorad) para ver la presencia de las proteínas. La membrana se bloqueó con buffer TBST y leche svelty durante 1 hora a temperatura ambiente, se incubó con el anticuerpo primario (CD45RA, CD45RB, CD45RC 1/20 y CD45 tail, D. Alexander 1/1000) durante 1 hora más a temperatura ambiente. Al terminar este tiempo se hicieron 6 lavados de 5 minutos con TBST, e inmediatamente, se incubó con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón-HRP, (Amersham Argentina) y

anti-IgG de rata-HRP, Sigma, Colombia) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron 6 veces las membranas con TBST y se revelaron mediante quimioluminiscencia con el sustrato de quimioluminiscencia Thermo Scientific Pierce ECL Western Blotting Substrate (Estados Unidos) acorde a las instrucciones de la compañía. Posteriormente en el cuarto oscuro se colocaron las membranas en el cassette de KODAK y se pone una placa de hyperfilm (Amersham) sobre las membranas para revelar la señal. Las placas se revelan mediante solución reveladora y fijadora (GBX, KODAK).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba de *Mann Whitney* (medición no paramétrica) para determinar si existen diferencias significativas entre donadores adultos y donadores neonatos, con un intervalo de confianza del 95% (nivel de significancia de 0.05).

RESULTADOS

Uno de los primeros objetivos del trabajo fue la obtención de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ a partir de sangre de cordón umbilical (neonato) y de sangre periférica (adulto) de humano con un alto grado de pureza, esto para poder tener resultados más confiables. Previamente se estandarizaron en el laboratorio las concentraciones de los anticuerpos para llegar a la saturación. Sin embargo, las poblaciones de linfocitos T naives o vírgenes tuvieron la mayor pureza (>90% de CD4⁺CD45RA⁺) por lo cual se reportan en extenso los resultados para los linfocitos T vírgenes de adulto y neonato. En cuanto a las poblaciones de linfocitos T de memoria para el neonato siempre tuvimos más problemas en la pureza ya que existen poblaciones CD45RO⁺ que co-expresan CD45RA y en principio no deberían de expresarla. Estamos estudiando en este momento más a fondo la expresión de estas células.

Expresión extracelular de CD45 en linfocitos T CD4⁺ naives de neonato y adulto

La citometría de flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (en este caso células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. Por lo tanto la CMF es capaz de identificar una célula por medio de sus características antigénicas y/o por sus características morfológicas de tamaño y complejidad, y fue la técnica utilizada para detectar la presencia de isoformas de CD45 en linfocitos T.

En la figura 9 se muestra una población de linfocitos T CD4⁺ naives de adulto (A) y neonato (B) sin incubación con anticuerpos primarios. Se muestra el tamaño (fsc) contra la complejidad (ssc) de las células nivelando de acuerdo a la medida de un linfocito (7 a 13 micrómetros) que corresponde a la región (R1) en el adulto y (R2) en el neonato.

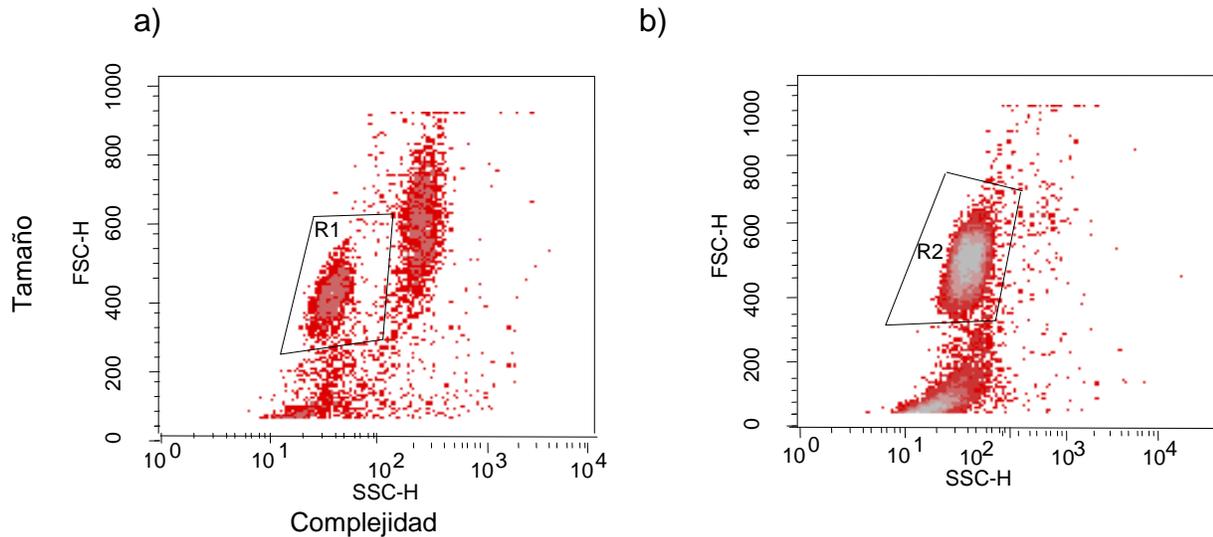


Figura 9. Parámetros correspondientes a Linfocitos T CD4⁺ naives de adulto (a) y neonato (b) una ventana para el adulto (R1) y otra para el neonato (R2).

Por lo tanto, por no corresponder al tamaño y complejidad de un linfocito T, en la gráfica a) podemos ver células que no son linfocitos T o podrían ser estas células activadas, con un valor de ssc mayor a 10² mientras que en la parte inferior son células muertas. Se puede observar que el neonato presenta una población más pura de linfocitos T en este experimento representativo.

Las células fueron marcadas con un coctel de anticuerpos (Multitest) utilizando una mezcla de 4 anticuerpos acoplados a 4 fluorocromos distintos (anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-CD45 RA-FITC y anti-CD62 ligando-PE).

La figura 10a y 10b, muestra los controles negativos de estas células, es decir células sin incubar con los anticuerpos primarios anti-CD3 y anti-CD4 que podríamos detectar en FL3-H y FL4-H, respectivamente. Con este control, se ubican las células en el cuadrante inferior izquierdo que corresponde al control negativo.

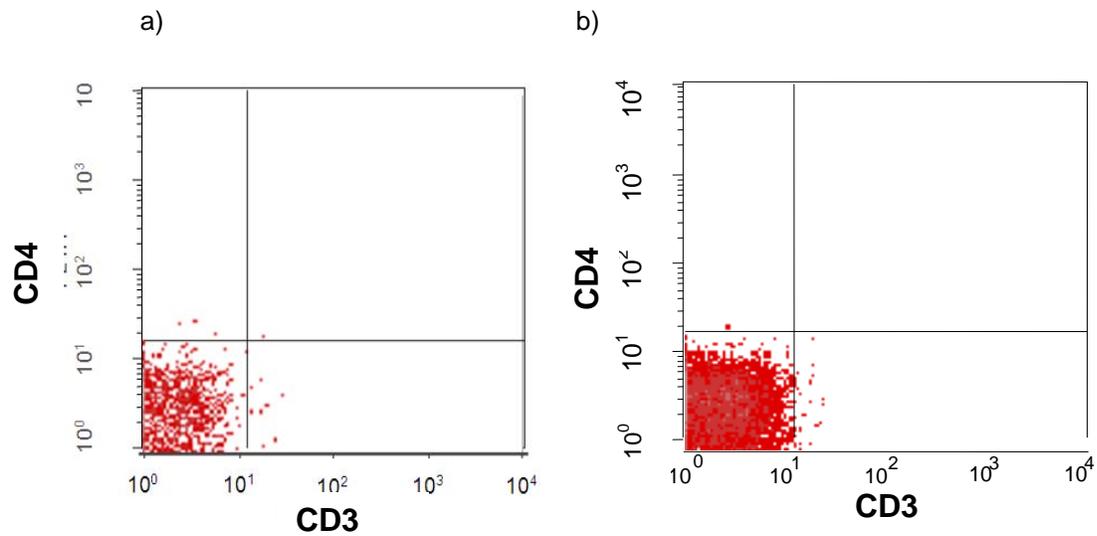


Figura 10. Control negativo de expresión de CD3 y CD4 en Linfocitos T CD4⁺ naives de adulto (a) y neonato (b) En la figura no se muestra el mismo número de puntos para a y b) sin embargo se adquirieron 10,000 eventos para cada una de las poblaciones.

Se comprobó entonces la pureza de co-expresión de CD3 (FL3-H) y CD4 (FL4-H) para las muestras de neonato y adulto, indicándonos la población de linfocitos T CD4⁺ obtenida después de la purificación (Figura 11).

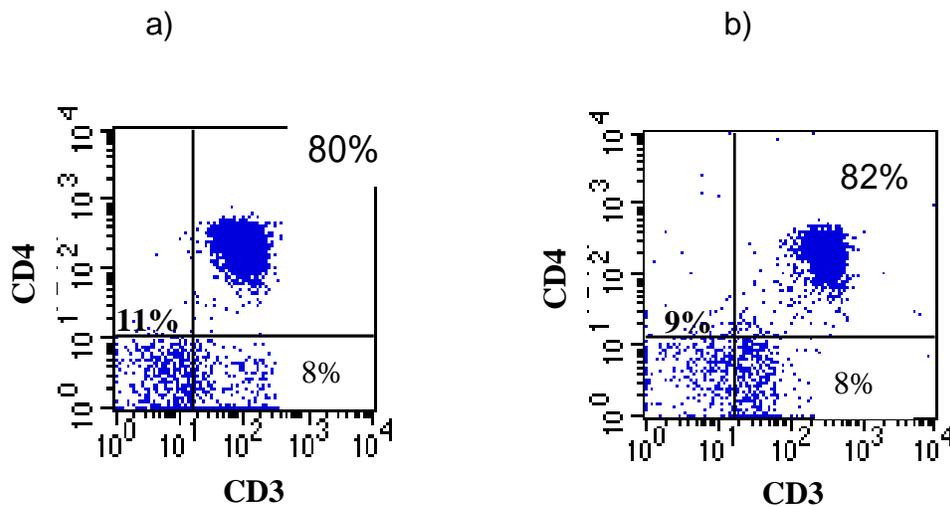


Figura 11. Co-expresión de CD3 y CD4 en Linfocitos T CD4⁺ naives de neonato (a) y adulto (b).

Se observa en el cuadrante superior derecho que el 82.0 % corresponde a linfocitos T CD4⁺ (que co-expresan CD3 y CD4) en el adulto mientras que en el neonato la expresión de éstas células es del 80%.

Para este experimento representativo, la media de intensidad de fluorescencia (IMF) para ambas poblaciones se muestra en la siguiente tabla:

CD3+/CD4+	IMF CD3	IMF CD4
Neonato	166	188
Adulto	104	230

En la figura 12 se muestran los resultados de la IMF de la co-expresión de CD3 y CD4 del promedio de 13 experimentos independientes.

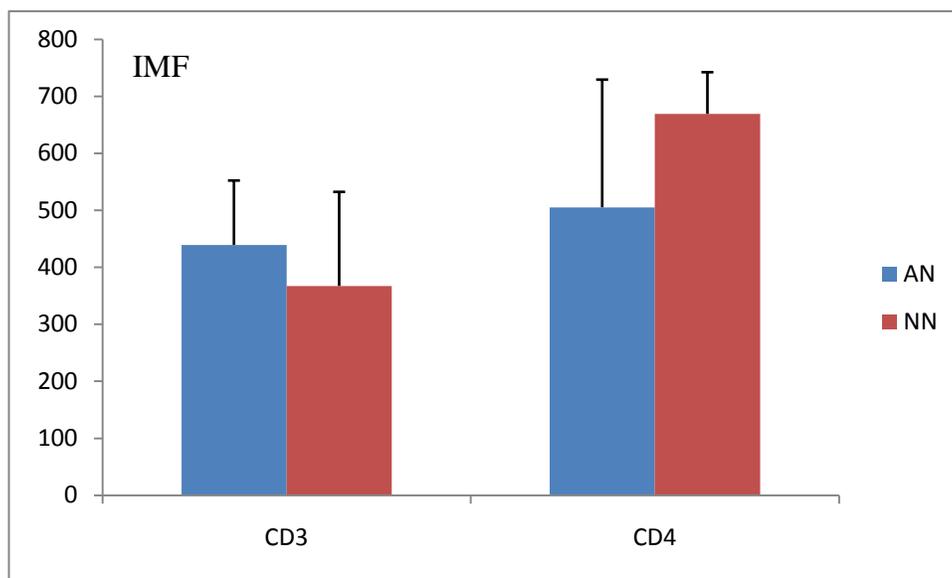


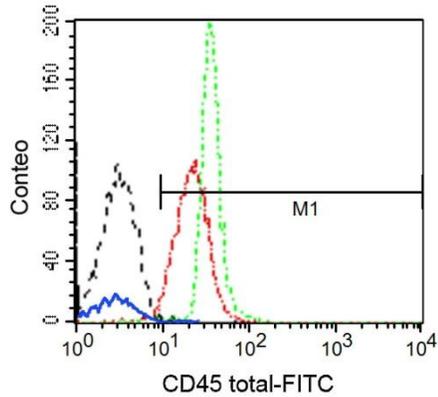
Figura 12. Promedio de intensidad media de fluorescencia (IMF) de 13 experimentos en total para la co-expresión de CD3 y CD4 en Linfocitos T CD4⁺ naives de adulto (AE) y neonato (NE).

Al utilizar la prueba no paramétrica de *Mann-Whitney*, para un intervalo de confianza de 95%, no encontramos diferencias estadísticamente significativas

entre la IMF de CD3 o CD4 en el cálculo de la medida conocida como **U** entre ambas poblaciones. Esto quiere decir que los valores de U calculados son mayores a la U_A teórica y menores a la U_B teórica, lo cual quiere decir que se cumple la hipótesis nula de que no hay diferencias en las IMF entre el adulto y el neonato. Sin embargo, analizando todos los experimentos y cómo se puede observar en la figura 12, los valores de la IMF de CD4⁺ fueron superiores en el neonato y los de CD3 ligeramente superiores en el adulto. Pero en todo caso, los linfocitos T CD4⁺ naives del neonato no expresaron menos CD3 o CD4 que los del adulto.

Posteriormente estudiamos la expresión de las isoformas de CD45 en linfocitos de adulto y neonato utilizando anticuerpos que detectan a CD45RA, CD45RB, CD45RC o CD45 total de manera independiente.

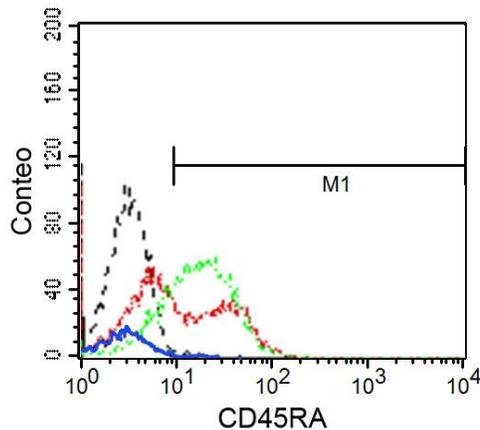
La figura 13 muestra que los linfocitos T naives del neonato expresan una mayor cantidad de CD45 total en comparación con los del adulto puesto que su IMF es mayor. Por otra parte, el histograma que corresponde a la expresión de CD45 en las células del neonato es muy estrecho lo cual significa que la mayoría de éstas células expresan niveles elevados y muy similares de CD45, entre cada célula. En cambio, el histograma de los adultos ocupa varios valores de logaritmos en la escala (desde 10^1 hasta 10^3), lo que quiere decir que los linfocitos T del adulto tienen una expresión muy heterogénea de CD45 con una mezcla de células que expresan niveles bajos, medios y altos de esta proteína.



NOMBRE	PARÁMETRO
AE NEGATIVO.001	FL2-H
NE NEGATIVO.015	FL2-H
AE MULTI.004	FL2-H
NE MULTI.018	FL2-H

Figura 13. Expresión de CD45 total en Linfocitos T CD4⁺ naives de adulto AE (línea roja) y neonato NE (línea verde). Controles negativos (Línea azul adulto línea negra neonato).

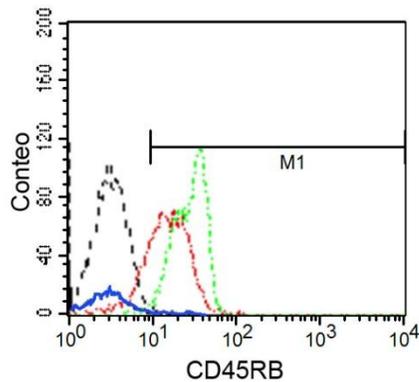
Al investigar que isoformas de CD45 están presentes en los linfocitos T CD4⁺ naives del neonato, observamos que en este experimento en particular CD45RA se expresa de manera similar al adulto tanto en porcentaje como en intensidad de fluorescencia (Fig. 14). Sin embargo, existen variaciones importantes entre los donadores y al tomar en cuenta varios experimentos (Fig. 17), podemos ver que la expresión de CD45RA es menor en el neonato en comparación del adulto, aún cuando no es significativo.



NOMBRE	PARÁMETRO
AE NEGATIVO.001	FL2-H
NE NEGATIVO.015	FL2-H
AE MULTI.005	FL2-H
NE MULTI.019	FL2-H

Figura 14. Expresión de CD45RA en Linfocitos T CD4⁺ naives de adulto AE (línea roja) y neonato NE (línea verde). Controles negativos (Línea azul adulto, línea negra neonato).

Para la expresión de CD45RB, representada en la Figura 15, observamos que hay una mayor cantidad de esta isoforma en el neonato, pero al analizar experimentos independientes la diferencia de expresión no fue significativa.

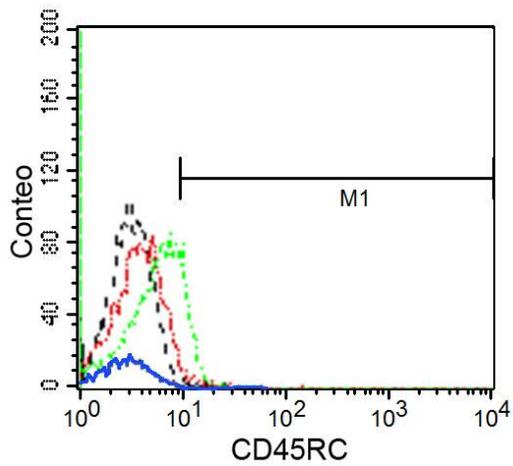


NOMBRE	PARÁMETRO
AE NEGATIVO.001	FL1-H
NE NEGATIVO.015	FL1-H
AE MULTI.006	FL1-H
NE MULTI.020	FL1-H

Figura 15. Expresión de CD45RB en Linfocitos T CD4⁺ naives de adulto AE (línea roja) y neonato NE (línea verde). Controles negativos (línea azul adulto, línea negra neonato).

Es interesante remarcar que al ver los histogramas de CD45RA y CD45RB, la expresión de CD45RB es más homogénea en linfocitos T de neonatos y adultos en comparación con la expresión de CD45RA.

Se muestra que para la isoforma CD45RC la cantidad de ésta proteína es muy similar entre el neonato y el adulto pero en realidad su expresión es casi indetectable para ambas poblaciones de linfocitos T (Figura 16). Al analizar los distintos experimentos podemos ver que la expresión de CD45RC siempre es muy baja en las células del neonato aún cuando no es estadísticamente diferente comparado con las muestras de adulto. Al parecer esta isoforma de CD45 es la menos expresada en la membrana de linfocitos T CD4⁺ naives del neonato.



NOMBRE	PARÁMETRO
AE NEGATIVO.001	FL1-H
NE NEGATIVO.015	FL1-H
AE MULTI.007	FL1-H
NE MULTI.021	FL1-H

Figura 16. Expresión de CD45RC en Linfocitos T CD4⁺ naives de adulto AE (línea roja) y neonato NE (línea verde). Controles negativos (Línea azul adulto, línea negra neonato).

En cuanto a la expresión de las isoformas de CD45RA, RB y RC al aplicar la prueba de *Mann Whitney* se cumplió la hipótesis nula de que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el neonato y el adulto para ninguna isoforma, esto sugiere que los niveles de expresión son iguales para estas proteínas entre el neonato y el adulto.

A continuación podemos ver los porcentajes y medias de otro experimento representativo para el neonato y el adulto (Cuadro I) así como del promedio de todos los experimentos (Figura17).

MUESTRAS	PROTEINAS	EXPRESION %	MEDIA. G
Adulto	CD3/CD4	94	72
Neonato	CD3/CD4	93	52
Adulto	CD45RA	46	26
Neonato	CD45RA	74	21
Adulto	CD45RB	79	18
Neonato	CD45RB	99	27
Adulto	CD45RC	2	12
Neonato	CD45RC	16	11

Cuadro I. Expresión de proteínas involucradas en la señalización a través del TCR en linfocitos T CD4+ naives de neonato y adulto. Experimento representativo.

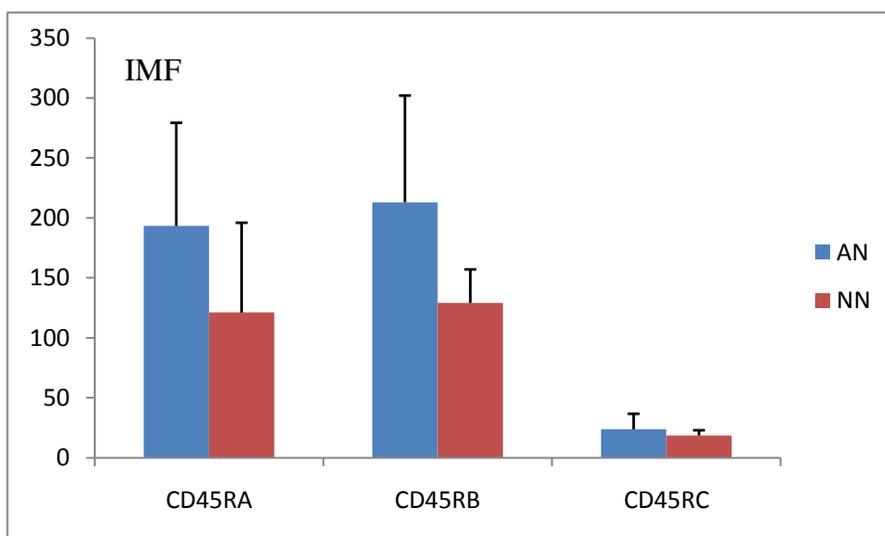


Figura 17. Representación del porcentaje de expresión y media de fluorescencia del neonato y adulto (promedio de los 8 experimentos).

En resumen podemos decir, que los linfocitos T CD4⁺ naives del neonato no expresan menos CD3, CD4, CD45RA, CD45RB y CD45RC en comparación con el adulto.

En cuanto al estudio de los linfocitos T CD4⁺ de memoria como se mencionó anteriormente, la pureza de las poblaciones varió mucho entre los donadores. Por ejemplo, en la figura 18 observamos una pureza de alrededor del 80% de CD45RO en estos linfocitos para el adulto y el neonato. Sin embargo, los linfocitos T de memoria que expresan adecuadamente CD45RO no deberían de expresar CD45RA y en particular para este donador, todas las células del neonato están también expresando este marcador. Se está investigando si estas células están co-expresando ambas moléculas al mismo tiempo lo cual significaría que son células que ya fueron activadas y están en proceso de diferenciarse en linfocitos T de memoria. Es decir que todavía no dejan de expresar CD45RA pero ya empiezan a expresar CD45RO. Estas células serían linfocitos T efectores y todavía no serían células de memoria.

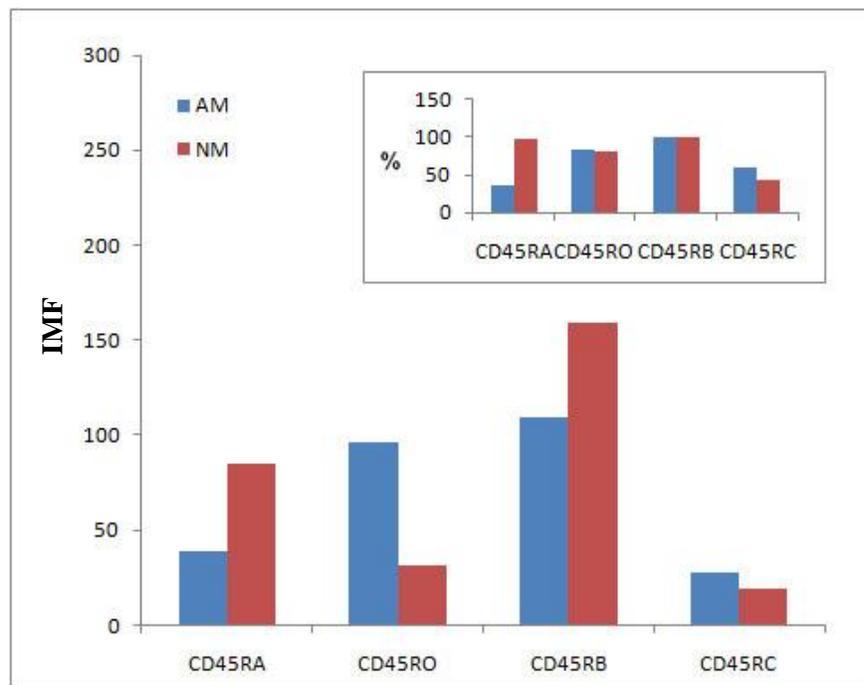


Figura 18. Representación del porcentaje de expresión y media de fluorescencia de las proteínas de linfocitos T CD4⁺ de memoria de adulto (AM) y neonato (NM).

Co-expresión de isoformas de CD45 en linfocitos T CD4⁺ naives de neonato y adulto.

Una vez que detectamos la presencia de las isoformas de CD45 en la superficie de los linfocitos T del neonato, utilizamos entonces la estrategia de separar estas isoformas por su peso molecular e investigar si existen diferencias en las isoformas expresadas en comparación con el adulto, ya que no observamos diferencias en la cantidad de cada isoforma. Utilizamos entonces la metodología de western blot para poder analizar la combinación de las isoformas de CD45 en ambas poblaciones.

El western blot es un método en [biología](#) molecular para la detección de [proteínas](#) en una muestra de un tejido homogeneizado o extracto. Implementa la electroforesis en gel de poliacrilamida para separar proteínas desnaturalizadas. Las proteínas son transferidas desde el gel hacia la membrana (de nitrocelulosa), donde son examinadas utilizando anticuerpos específicos para la proteína. Se sabe que los linfocitos T de adulto expresan en su superficie varias isoformas de CD45 al mismo tiempo (Tomas, 1989).

Realizamos primero una estandarización del western blot con los anticuerpos anti-CD45RA, RB y RC en linfocitos T inmortalizados de una célula llamada Jurkat. Se realizó un lisado celular el cual contiene a las proteínas de la membrana plasmática y del citosol de la célula Jurkat que se analizaron después de una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida-SDS y western blot con distintas concentraciones de anticuerpos (Figura 19).

Lisado total de Linfocitos T CD4+

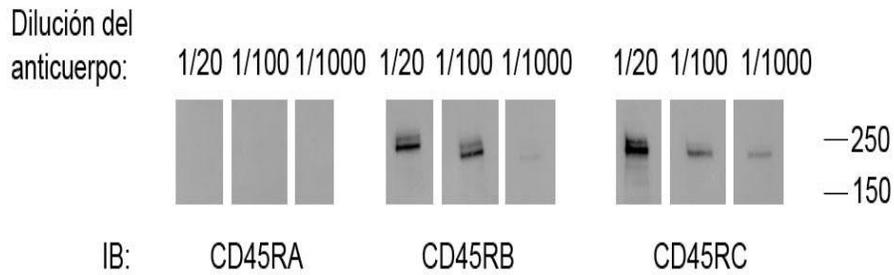


Figura19. Inmunoblot anti-CD45RA, anti-CD45RB y anti-CD45RC de un lisado de células Jurkat. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%.

Podemos observar que el anticuerpo anti-CD45RA utilizado para la inmunofluorescencia no es capaz de detectar a esta isoforma en forma desnaturalizada. Los anticuerpos anti-CD45RB y anti-CD45RC reconocieron a las regiones que corresponden a CD45RB y CD45RC en las isoformas de CD45 y la concentración en la cual el anticuerpo llega a saturación es 1/20 y es la que utilizaremos en los siguientes experimentos. Las bandas más intensas probablemente corresponden a CD45RB y CD45RC (205 kDa) mientras que las bandas de 220 kDa deben ser CD45AB, CD45AC o CD45BC.

Posteriormente, se realizó un lisado celular de una población pura (>90% de co-expresión de CD3 y CD4) de linfocitos T CD4⁺ naives de neonato y adulto cuyas proteínas fueron analizadas por electroforesis y western blot con un anticuerpo que detecta todas las isoformas de CD45. En la figura 20 podemos observar en ambos carriles la presencia de varias bandas que corresponden a la proteína CD45 con distintos pesos moleculares. Corroboramos que efectivamente existen varias isoformas de esta proteína presentes en ambas poblaciones de linfocitos T al mismo tiempo. Sin embargo, el patrón de expresión del neonato y del adulto es diferente. Los linfocitos T del adulto contienen por lo menos 3

bandas y de mayor intensidad que el neonato, lo cual significa que expresan más isoformas y con mayor concentración; mientras que el neonato contiene 2 bandas que corresponden a isoformas de CD45 distintas a las del adulto. Es decir que ambas células no expresan las mismas isoformas de CD45, aún cuando por citometría de flujo fuimos capaces de detectar de manera aislada la presencia de las regiones que corresponden a CD45RA, CD45RB y CD45RC en ambas poblaciones. Al detectar proteínas de pesos moleculares diferentes podemos concluir que existe una combinación de isoformas de CD45 que contienen distintas regiones de la proteína. Además, al utilizar esta misma membrana para revelarla con un anticuerpo que detecta solamente a la isoforma CD45RB podemos ver, por ejemplo, que los linfocitos T neonatales expresan dos proteínas de distinto peso molecular pero que las dos contienen la región CD45RB en su estructura. Una posibilidad es que sea CD45RAB la de mayor peso molecular ya que CD45RC casi no se expresa mientras que la de menor peso molecular podría ser CD45RB.

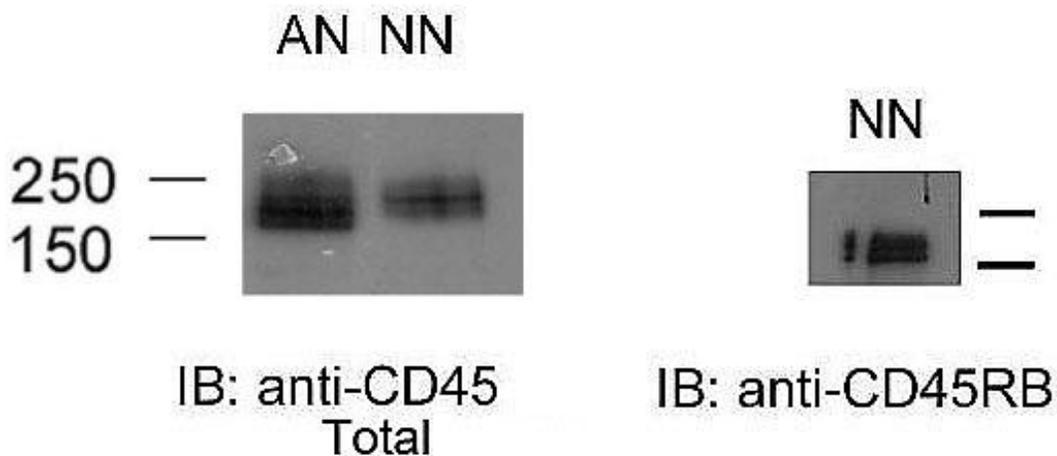


Figura 20. Expresión de las isoformas de CD45 en linfocitos T naives (N) de adultos (A) y neonatos (N) humanos. Inmunoblot anti-CD45 total de lisados totales celulares. Experimento representativo.

DISCUSIÓN

La respuesta específica a sí como la de memoria están dadas por el sistema inmunológico adquirido o adaptativo y las células responsables de activar esto son los linfocitos T.

La activación del linfocito T es regulada por la fuerza de la interacción entre el complejo MHC y la acción cooperativa de otros receptores de membrana así como por un mecanismo intracelular que controla múltiples cascadas de señalización (Lanzavecchia y Sallusto, 2001). Las señales recibidas por el linfocito T de la APC se transmiten al interior de la célula mediante una cascada de eventos bioquímicos y biofísicos dentro de los cuales la fosforilación de proteínas, la redistribución de proteínas de membrana, la re-localización de proteínas en la membrana plasmática y la reorganización del citoesqueleto son algunos eventos críticos (Acuto y Cantrell, 2000). Estas cascadas de señalización llevan a la transcripción de genes, como la interleucina-2, y a la proliferación celular, funciones de una célula efectora.

Se desconocen muchos aspectos de los mecanismos de activación del linfocito T neonatal pero en la literatura se ha demostrado que tiene baja proliferación y también tiene pocas células efectoras. Los neonatos son más susceptibles que los adultos a todo tipo de infecciones y esto se debe en parte a la llamada "inmadurez" de su sistema inmunológico, el neonato se enfrenta a retos diferentes a los de la vida fetal. En este trabajo se comparó entonces una parte del sistema inmunológico del neonato con el adulto ya que el del adulto es conocido.

Con la finalidad de caracterizar las respuestas funcionales de los linfocitos T neonatales y estudiar la influencia de las isoformas de CD45 en la activación de dichas células, en el presente estudio se investigó la expresión total de superficie de las distintas isoformas de CD45 en linfocitos T CD4⁺ naives aislados de sangre de cordón umbilical.

En los resultados, el neonato expresa CD45RA, CD45RB y CD45RC pero al parecer hay una menor intensidad de éstas isoformas de CD45, pero cuando se aplico la prueba estadística nos dimos cuenta que no es estadísticamente significativa. Sin embargo, la isoforma CD45RC es la menos representada en la membrana del linfocito T neonatal. Pero para tener resultados estadísticamente significativos para las distintas isoformas como son CD45 -RA, -RB, -RC, se necesitan hacer más experimentos y tener un tamaño de muestra mayor y actualmente se están realizando en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del INPER.

Por otro lado, la expresión de CD4 y CD3 es similar en el neonato y el adulto, lo que nos indica que las posibles diferencias en la activación de los linfocitos T neonatales no se deben a niveles de expresión distintos de estas proteínas, moléculas clave en la cascada de activación. Dependiendo del tipo de estímulo el neonato se activa o no de la misma manera que un adulto (Adkins *et al.*, 2004; Ridge *et al.*, 1996), por lo que es probable que las diferencias se lleven a cabo en otra parte de la cascada de señalización ya que comprobamos que en CD3 y CD4 no existen diferencias entre ambos. Estos resultados nos permiten proponer experimentos para investigar si existen diferencias en otras proteínas de la cascada como son las cinasas de tirosina.

En el adulto existe información de varias isoformas de CD45 creadas por corte y empalme alternativo de los exones 4, 5 y 6 del dominio extracelular (Thomas, 1989). La expresión de esta proteína específica puede influir y alterar la función biológica de señalización de eventos bioquímicos, ya que controla la señalización de varios receptores, tales como el TCR o receptores de citocinas. Aunque se conoce que en el adulto existen diferentes isoformas no se sabe cuál es la función de cada una de ellas.

En los experimentos de western blot, confirmamos para el adulto lo que especifica la literatura respecto a su peso molecular y que existen varias isoformas de la proteína CD45. Para las células T CD4⁺ del adulto se observan la isoforma CD45AB (peso molecular de 210 a 220 KDa), la isoforma CD45BC (de 210 a 220 KDa) y la isoforma CD45RB (de 190 a 200 KDa) mientras que el neonato expresa CD45RAB y CD45RB, ya que CD45RC casi no se expresa (ver Figura 20). Tenemos claro que hay diferencias en cuanto al peso molecular y número de isoformas de CD45 entre ambas poblaciones y podemos concluir que no existen diferencias significativas de intensidad.

En el neonato se observa una combinación de pesos moleculares lo que nos indica que son otras isoformas, y aunque la función de estas combinaciones de isoformas sería muy difícil de comprender, se pretende investigar más adelante la activación de LCK por la desfosforilación de CD45.

Actualmente se conocen algunos de los factores de transcripción involucrados en el cambio de expresión de CD45RA a CD45RO en linfocitos T activados (Oberdoerffer *et al.*, 2008). Sin embargo, en linfocitos T vírgenes se desconocen estos factores. Los neonatos expresan combinaciones distintas de isoformas a las del adulto como pudimos observar el western blot, por lo que sería importante estudiar si existen factores de transcripción distintos o una regulación de estos diferente a la del adulto que pudieran explicar las diferencias de isoformas expresadas.

Como se menciona anteriormente, la respuesta inmune adquirida está coordinada por los linfocitos T. Existen varias poblaciones de linfocitos T en circulación y en el neonato humano la población mayoritaria está formada por linfocitos T naives o vírgenes, que no han tenido contacto con antígenos extraños mientras que en el adulto alrededor de un 50% son linfocitos T vírgenes y el otro 50% linfocitos T de memoria (Harris *et al.*, 1992 y nuestros propios datos).

Hasta la fecha, las respuestas funcionales de linfocitos T de memoria son más rápidas y de mayor intensidad que las respuestas de linfocitos T vírgenes y es por esta razón que se pensó que la capacidad de respuesta de los linfocitos T neonatales estaba disminuida, ya que en su gran mayoría son vírgenes. Hasta la fecha, los linfocitos T neonatales vírgenes pueden ser activados y generar respuestas de tipo Th1 por estímulos tales como patógenos altamente infecciosos o el bacilo de Calmette y Guerin (BCG) ya que poseen factores que maduran a la célula presentadora de antígeno (APC) pero los mecanismos moleculares de activación de los linfocitos T neonatales no están bien caracterizados. Aún no queda claro si la capacidad funcional de linfocitos T neonatales humanos es debida a deficiencias de esta células o de la APC (Adkins, 1999). En efecto, las APC del neonato también están consideradas como no maduras ya que tienen una menor expresión de marcadores importantes para poder estimular a los linfocitos T neonatales vírgenes (Goreli *et al.*, 2001; Langrish *et al.*, 2002), lo cual es consistente con reportes sobre las respuestas neonatales de tipo Th1 disminuidas (Rowe *et al.*, 2000). Sin embargo, con el estímulo adecuado las APC neonatales humanas pueden presentar antígenos de la misma manera que los hacen estas células de adultos (Matthews *et al.*, 2007).

La importancia de este trabajo es que se sabe que en el adulto las señales recibidas por el linfocito T de la APC se transmiten al interior de la célula mediante una cascada de eventos bioquímicos y biofísicos dentro de los cuales la fosforilación de proteínas, la redistribución de proteínas de membrana, la relocalización de proteínas en la membrana plasmática y la reorganización del citoesqueleto son algunos eventos críticos (Acuto y Cantrell, 2000). La transmisión de una señal se lleva a cabo por modificaciones químicas de proteínas intracelulares de manera rápida y extensa. La adición de un grupo fosfato a residuos tirosina en las proteínas, por las proteínas cinasas de tirosina (PTK) es la primera capa de una cascada de señalización inducida por la interacción del TCR. La fosforilación de proteínas en residuos tirosina tiene efectos mayores en las funciones celulares tales como modificaciones de actividades enzimáticas,

localización de proteínas y es el evento central de la maquinaria de señalización intracelular. La proteína CD45 es responsable de la regulación de funciones inmunes y en particular, su ausencia se asocia con una inmunodeficiencia severa adquirida y esto es debido a que es una molécula clave para el desarrollo y la activación del linfocito T.

Existe poca bibliografía (Adkins, 1999) sobre las respuestas de neonatos humanos a vacunas y el conocimiento de los mecanismos de inmunidad adquirida y en particular de los mecanismos de activación de los linfocitos T neonatales es entonces de suma importancia para la generación de nuevas vacunas y estrategias de vacunación.

CONCLUSIONES

Se aisló y se caracterizó la expresión de superficie de las isoformas de CD45 en linfocitos T naives provenientes de neonatos y adultos por citometría de flujo y se corroboró que efectivamente existen las isoformas CD45RA, CD45RB y CD45RC presentes en ambas poblaciones de linfocitos.

Se determinó la expresión total y de distintas isoformas de la proteína CD45 en linfocitos T naives provenientes de neonatos y adultos por western blot

- Se analizaron los niveles de expresión de CD3 y CD4 en linfocitos T naives provenientes de neonatos y adultos por citometría de flujo y se encontró que la expresión de CD3 y CD4 parece ser similar en ambas poblaciones de linfocitos.

Estos resultados sugieren que las posibles diferencias de activación entre los linfocitos T neonatales y adultos, podría explicarse por las combinaciones distintas de isoformas de CD45 o por diferencias en eventos de la cascada de señalización por debajo de CD45

PERSPECTIVAS

Se observó CD45 total así como las isoformas RA, RB y RC de manera independiente; por lo que las expectativas son detectar las isoformas combinadas ya que se sabe que existen 8 combinaciones de esta isoforma, y es muy probable que se pueda observar cada una de estas combinaciones utilizando anticuerpos contra estas isoformas marcados con fluorocromos distintos.

También presentándole a un linfocito T de neonato un antígeno para que este desarrolle una respuesta y poder observar de manera mejor las combinaciones de las isoformas.

Para confirmar que la expresión de las distintas isoformas de CD45 tiene una repercusión en la capacidad de activación de linfocito T ya que con la citometría pudimos observar que el neonato expresa menos de la isoforma CD45RA que el adulto ya que sus linfocitos T nunca han estado en contacto con antígenos. Sería importante analizar la respuesta funcional de estas células, como por ejemplo estudiar la secreción de citocinas como la interleucina-2.

La transmisión de una señal se lleva a cabo por modificaciones químicas de proteínas intracelulares de manera rápida y extensa. La adición de un grupo fosfato a residuos tirosina en las proteínas, por las proteínas cinasas de tirosina (PTK) es la primera capa de una cascada de señalización inducida por la interacción del TCR. La fosforilación de proteínas en residuos tirosina tiene efectos mayores en las funciones celulares tales como modificaciones de actividades enzimáticas, localización de proteínas y es en evento central de la maquinaria de señalización intracelular. Por lo que mediremos la fosforilación total de proteínas en residuos de tirosina como reflejo de la capacidad de activación.

BIBLIOGRAFIA

- Abbas AK, Lichtman AH. 2001. *Inmunología celular y molecular*. Editorial Interamericana-McGraw Hill. 4Ed.
- Acuto O, Cantrell D. 2000. T cell activation and the cytoskeleton. *Annu Rev Immunol* 18: 165-184.
- Adkins B, Du RQ. 1998. Newborn mice develop balanced Th1/Th2 primary effectors responses *in vivo* but are biased to Th2 secondary responses. *J Immunol* 160: 4217-4224.
- Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. 2004. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol* 4: 553-564.
- Alexander DR. 2000. The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function. *Semin Immunol* 12: 349-359.
- Ashwell JD, D'Oro U. 1999. CD45 and Src-family kinases: and now for something completely different. *Immunol Today* 20(9): 412-416.
- Barrios C, Brandt C, Berney M, Lambert PH, Siegrist CA. 1996a. Partial correction of the Th2/Th1 imbalance in neonatal murine responses to vaccine antigens through selective adjuvant effects. *Eur J Immunol* 26: 2666-2670.
- Barrios C, Brawand P, Berney M, Brandt C, Lambert PH, Siegrist CA. 1996 b. Neonatal and early life immune responses to various forms of vaccine antigens qualitatively differ from adult responses: predominance of a Th2-biased pattern which persists after adult boosting. *Eur J Immunol* 26: 1489–1496.
- Brdicka T, Pavlistova D, Leo A, Bruyns E, Korinek V, Angelisova P, Scherer J, Shevchenko A, Hilgert I, Cerny J, Drbal K, Kuramitsu Y, Kornacker B, Horejsi V, Schraven B. 2000. Phosphoprotein associated with glycosphingolips-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds to the protein tyrosine kinase Csk and is involved in regulation of T cell activation. *J Exp Med* 191: 1591-1605

- Brown DA, London E. 1998. Structure and function of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol* 164: 103-105
- Bunnell SC, Hong DI, Kardon JR, Yamazaki T, McGlade CJ, Barr VA, Samelson LE. 2002. T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *J Cell Biol* 158(7): 1263-1269
- Burack WR, Burack WR, Lee K-H, Holdorf AD, Dustin ML, Shaw AS. 2002. Cutting edge: quantitative imaging of raft accumulation in the immunological synapse. *J Immunol* 169: 2837-2841.
- Cantrell DA. 2002. T cell antigen receptor signal transduction. *Immunology* 105: 369-364.
- Chan AC, Shaw A. 1996. Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Curr Opin Immunol* 8: 394-401.
- Dong S, Corre B, Foulon E, Dufour E, Veillette A, Acuto O, Michel F. Epub 2006 Oct 16 T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-230;203(11):2509-18.
- Goriely S, Vincart B, Stordeur P, Vekemans J, Willems F, Goldman M, De Wit D. 2001. Deficient IL-12 (p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes. *J. Immunol.* 166: 2141-2146.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285: 221-227.
- Harder T. 2001. Raft membrane domains and immunoreceptor functions. *Adv Immunol* 77: 45-92.
- Hermiston ML, Xu Z, Majeti R, Weiss A. 2002. Reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases. *J Clin Invest*, 109: 9-14.
- Holmes N. 2006. CD45: all is not yet crystal clear. *Immunology* 117: 145-155.
- Irles C, Cruz L, Yépez E, Ortega A. 2007. Differences in TCR signaling threshold occur in lipid rafts in naive and memory human T cells from umbilical cord and peripheral

blood. Collection of Free papers presented at the 13 Int. Congress of Immunology (Rio de Janeiro, August 21-25, 2007), Medimond, Bologna, 2007, 481-486. ISBN 978 -88-7587-380-6.

Irles C, Symons A, Michel F, Bakker TR, van der Merwe PA, Acuto O. 2003. CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling. *Nat Immunology* 4(2): 189-197.

Iwashima M, Irving BA, van Oers NS, Chan AC, Weiss A. 1994. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 263: 1136-1139.

Kabouridis PS, Janzen J, Magee A, Ley SC. 2000. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 30: 954-963.

Kabouridis PS, Kabouridis PS, Magee A, Ley, SC. 1997. S-acylation of Lck protein tyrosine kinase is essential for its signaling in T lymphocytes. *EMBO J*, 16: 4983-4998

Kawabuchi M, Satomi Y, Takao T, Shimonishi Y, Nada S, Nagai K, Tarakhovsky A, Okada M. (2000). Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src family kinases. *Nature* 404: 999-1003

Koretzky GA, Myung PS. 2001. Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins. *Nat Rev Immunol* 1: 95-107.

Kosugi A, Saeki K, Miura Y, Aki D, Kurosaki T, Yoshimura A. 2001. A pivotal role of cysteine 3 of Lck tyrosine kinase for localization to glycolipid-enriched microdomains and T cell activation. *Immunol Lett* 76: 133-138

Kung C, Pingel JT, Heikinheimo M, Klemola T, Varkila K, Yoo LI, Vuopala K, Poyhonen M, Uhari M, Rogers M, Speck SH, Chatila T, Thomas ML. 2000. Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. *Nat Med*, 6(3): 343-345

Langrish CL, Buddle JC, Thrasher AJ, Goldblatt D. 2002. Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th1 immune responses. *Clin. Exp. Immunol.* 128:118-123

- Lanzavecchia A, Sallust F. 2001. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat Immunol*, 2(6): 487-492
- Molina TJ, Kishihara K, Siderovski DP, van Ewijk W, Narendran A, Timms E, Wakeham A, Paige CJ, Hartmann KU, Veillette A, Davidson D, Mak TW. 1992. Profound block in thymocyte development in mice lacking p56^{lck}. *Nature* 357: 161-164.
- Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395: 82-86.
- Montixi C, Langlet C, Bernard AM, Thimonier J, Dubois C, Wurbel MA, Chauvin JP, Pierres M, He HT. 1998. Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent –insoluble membrane domains. *EMBO J* 17: 5334-5348.
- Mustelin T, Abraham RT, Rudd CE, Alonso A, Merlo JJ. 2002. Protein tyrosine phosphorylation in T cell signaling. *Front Biosci*, 7: d918.
- Oberdoerffer S, Moita LF, Neems D, Freitas RP, Hacohen N, Rao A. 2008. Regulation of CD45 Alternative Splicing by Heterogeneous Ribonucleoprotein, hnRNPLL. *Science* 1 2008: Vol.321. no. 5889, pp. 686-69.10
- Ridge JP, Fuchs EJ, Matzinger P. 1996. Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science* 271:1723-1726.
- Roitt IM, Delves PJ. 2003. *Inmunología fundamentos*. Editorial Médica Panamericana, 10° edición. Buenos Aires pag 534
- Rowe DS, Hug K, Forni L, Pernis B. 1973. Immunoglobulin d as a lymphocyte receptor. *J Exp Med* 1973 138: 965-972.
- Samelson LE. 2002. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu Rev Immunol*, 20: 371-394
- Sedwick CE, Altman A. 2002. Ordered just so: lipid rafst and lymphocyte function. *Scie STKE* 122: RE2.
- Shade AE, Levine AD. 2002. Lipid raft heterogeneity in human peripheral blood T lymphoblasts: a mechanism for regulation of the initial of TCR signal transduction. *J Immunol*. 168: 2233-2238

- Simons K, Eehalt R. 2002. Cholesterol, lipid rafts and disease. *J Clin Invest*, 110: 597-603
- Tchilian EZ, Wallace DL, Wells RS, Flower DR, Morgan G, Beverley PC. 2001. A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID. *J Immunol* 166(2): 1308-1313.
- Thomas ML, Brown EJ. 1999. Positive and negative regulation of Src-family membrane kinases by CD45. *Immunol Today* 20: 406-411.
- Thomas ML. 1989. The leukocyte common antigen family. *Annu. Rev Immunol* 7: 339-369.
- Tonks NK, Charbonneau H, Diltz CD, Fischer EH, Walsh KA. 1988. Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase. *Biochemistry* 27(24): 8695-8701.
- Torgersen KM, Vang T, Abrahamsen H, Yaqub S, Horejsí V, Schraven B, Rolstad B, Mustelin T, Taskén K. 2001. Release from tonic inhibition of T cell activation through transient displacement of C-terminal Src kinase Csk from lipid rafts. *J Biol Chem* 276: 29313-8.
- Trowbridge LS, Thomas ML. 1994. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 12:85.
- Vallejo AN, Davila E, Weyand CM, Goronzy JJ. 2004. Biology of T lymphocytes. *Rheum Dis Clin North Am* 30: 135-157.
- Wange RL, Samelson LE. 1996. Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity* 5: 197-205
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon. *Immunology today* 14: 353-356.
- Weiss A, Littman DR. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76 (2) 263-274.

Apéndice I

Soluciones para la electroforesis SDS-PAGE:

Buffer de Laemmli 2X contiene:

- 4% SDS
- 20% glicerol
- 10% 2-mercaptoetanol o DTT (Dititreitol)
- 0,004% azul de bromofenol
- 0,125 M Tris HCl

Preparación del buffer superior (0.5 M):

Para 500ml.

Tris Base-HCl 30.3g

SDS 20 ml.

Ajustar a pH de 6.8

Preparación del buffer inferior (1.5M):

Para 500ml.

Tris Base-HCl 90.8g

SDS 20 ml.

Ajustar a pH de 8.8

Preparación del gel concentrador: 10 ml.

Agua desionizada 3 ml.

Acilamida/Bis 30% 1.3 ml.

Buffer Superior 2.5 ml.

Persulfato de Amonio (APS) 30 μ l.

Temed	5 μ l.
-------	------------

Preparación del gel separador: 10 ml. Porcentaje 15%

Agua desionizada	2.4 ml.
Acrilamida/Bis 30%	5.0 ml.
Buffer Inferior	2.6 ml.
Persulfato de Amonio (APS)	30 μ l.
Temed	5 μ l.

Buffer de corrida 10X.

Tris Base	3.0g.	
Glicina	14.4g.	
SDS al 10%	10ml.	Aforar a 1lt.

Soluciones para Western Blot:

Buffer de transferencia

Buffer de corrida 10x	100ml.	
Etanol puro	200ml.	Aforar a 1lt.

Buffer TBS 10X

NaCl	80g.	
KCl	2g.	
Tris Base	30g.	Se ajusta el pH a 7.4

Buffer TBS-Tween 0.1%

TBS 10X 100ml.

Agua desionizada 895ml.

Tween 20 5ml.

Solución para aislar linfocitos T CD4+:

Solución de MACS (estéril)

Fosfato salino (PBS) 1X

0,5% de albúmina de suero bovino (p/v)

2 mM EDTA, pH 7.4

Filtrar