



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD43
POR TLRs**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO
ACADÉMICO**

DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ANA CITLALI MÁRQUEZ HERNÁNDEZ

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. YVONNE
ROSENSTEIN AZOULAY**



CUERNAVACA MORELOS 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay

COMITÉ TUTORAL

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay

Dra. Rosario Vera Estrella

Instituto de Biotecnología-UNAM

Dr. José Moreno

Instituto Nacional de Salud Pública

JURADO DE EXAMEN

Dra. Carmen Beltrán Núñez

Presidenta

Dra. Rosa María Uribe Villegas

Secretaria

Dra. Angélica Santana Calderón

Vocal

Dr. Ismael Hernández Lucas

Vocal

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente

Vocal

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioproses del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

- **El proyecto fue financiado parcialmente por los proyectos PAPIIT/UNAM (IN225310) y CONACyT (100275).**
- **Ana Citlali Márquez Hernández fue beneficiaria de una beca de posgrado por parte de CONACyT (Número de becario 329908)**
- **Los concentrados leucocitarios fueron proporcionados por el Banco de Sangre del Hospital de Zona del IMSS en Cuernavaca, Morelos**

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
RECEPTORES TIPO TOLL (TLRs)	4
TLRS EN LINFOCITOS T	7
CD43	1
ANTECEDENTES	4
HIPÓTESIS	7
OBJETIVO	7
OBJETIVOS PARTICULARES	7
METODOLOGÍA	8
1) PURIFICACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCs) Y OBTENCIÓN DE LINFOCITOS T	8
2) DIFERENCIACIÓN A LINAJES TH1 Y TH2	9
4)EXTRACCIÓN DE RNA Y RT	10
4.1 EXTRACCION DE RNA Y OBTENCION DE CDNA	10
4.2) PCR TIEMPO REAL	12
5) ESTÍMULOS CON AGONISTAS DE LPS	14
6) CITOMETRÍA.	14
6.1) TINCIÓN DE CD43	14
6.2) TINCIÓN INTRACELULAR DE CITOCINAS	15
RESULTADOS	16
<i>OBJETIVO 1: CARACTERIZAR LA EXPRESIÓN DE LOS TLRs EN DIFERENTES POBLACIONES DE LINFOCITOS T</i>	16
1.1 PURIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS T	16
1.2 EXPRESIÓN DE TLRs.	17
<i>OBJETIVO 2: DETERMINAR SI LA INTERACCIÓN DE LOS TLRs CON SUS LIGANDOS MODULA LA EXPRESIÓN DE CD43 DE MANERA DIFERENCIAL EN DISTINTAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T</i>	23
2.2 LOS NIVELES DE EXPRESION DE CD43 DISMINUYEN POR EL ESTIMULO DE LINFOCITOS T CON LIGANDOS DE TLRs	23
DISCUSIÓN	27
BIBLIOGRAFÍA	36

Índice de figuras

FIGURA 1. ESQUEMA DE LOS DIFERENTES TLRs Y SUS LIGANDOS, (ADAPTADO DE AKIRA, 2009).	4
FIGURA 2. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE TLRs, DEPENDIENTES DE MYD88 O TRIF (AKIRA, 2009)	5
FIGURA 3. PERFILES DE PUREZA POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LINFOCITOS T TOTALES Y SUBPOBLACIONES.	26
FIGURA 4. CURVAS ESTÁNDAR.	28
FIGURA 5. LA EXPRESIÓN DE LOS TLRs EN LINFOCITOS T TOTALES ES DIFERENCIAL DEPENDIENDO DEL TLR.	29
FIGURA 6. LA EXPRESIÓN DE LOS TLRs 5,6,9 Y 10 EN LINFOCITOS T CD4 ES MENOR QUE EN LINFOCITOS T TOTALES.	30
FIGURA 7. EXPRESIÓN DE LOS TLRs EN LINFOCITOS T Th1.	31
FIGURA 8. LA EXPRESIÓN DE LOS TLRs EN LINFOCITOS T CD8 ES SIMILAR A LA ENCONTRADA EN LINFOCITOS T TOTALES.	31
FIGURA 9. LOS NIVELES DE CD43 DISMINUYEN EN LINFOCITOS T TOTALES ESTIMULADOS CON LPS.	33
FIGURA 11. LOS NIVELES DE CD43 DISMINUYEN EN LINFOCITOS T CD8+ ESTIMULADOS CON LPS.	34
FIGURA 10. LOS NIVELES DE CD43 DISMINUYEN EN LINFOCITOS T CD4+ ESTIMULADOS CON LPS.	34
FIGURA 12. LOS NIVELES DE CD43 DISMINUYEN EN LINFOCITOS Th1 ESTIMULADOS CON LPS.	35

Índice de tablas

TABLA 1. EXPRESIÓN DE TLRs EN SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T HUMANOS _____	9
TABLA 2. SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE TLRs _____	13
TABLA 3. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TLRs 1-10 EN LINFOCITOS T TOTALES, CD4+, CD8+ Y TH1. _____	30

Abreviaturas

APC	Célula Presentadora de Antígenos
Ag	Antígenos
CTL	Lectinas tipo C
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ERM	Ezrina, Radixina y Moesina
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacárido
MAMP	Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NLR	Receptores tipo NOD (Nucleotide Oligomerization Domain)
NK	Natural Killer
PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PRR	Receptores de Reconocimiento de Patrones
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptasa Reversa
TCR	Receptor de los linfocitos T
TLR	Receptores Tipo Toll

Resumen

Los Receptores Tipo Toll (TLRs) son un grupo de proteínas tipo I involucradas en el reconocimiento de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPS por sus siglas en inglés). Inicialmente se pensaba que únicamente se expresaban en células del sistema inmune innato. Sin embargo, en años recientes se ha descubierto que también están presentes en células del sistema inmune adaptativo. En particular, se ha demostrado que pueden tener una participación directa o indirecta en diversas funciones de los linfocitos T, tales como su activación, diferenciación y migración. Sin embargo, el patrón exacto de expresión de los TLRs en linfocitos T no se ha definido, aunque se ha sugerido que los TLRs pueden actuar como moléculas co-receptoras en los linfocitos T y que su señalización puede modificar la expresión de otras moléculas de superficie. En este proyecto, se determinó por medio de RT-PCR cuantitativo el nivel de expresión de cada uno de los 10 TLRs que se sabe se expresan en humanos, en linfocitos T CD4 y CD8, así como CD4 diferenciados a linaje Th1. Todos ellos con un alto grado de pureza. Basándonos en su abundancia relativa, evaluamos la capacidad del TLR4 de modular la expresión de la molécula co-receptora CD43. CD43 es una mucina altamente glicosilada que se expresa abundantemente en la superficie de casi todas las células hematopoyéticas y está relacionada con múltiples funciones de los linfocitos T a través de su unión con sus ligandos naturales (ICAM-1, galectina 1, MHC I, E-selectina, Siglec-1, nucleolina y albúmina). Cuando se estimulan linfocitos T totales con LPS (ligando de TLR4), encontramos que el nivel de expresión de CD43 disminuye considerablemente. Cuando se analizan por separado las subpoblaciones de linfocitos T, podemos observar que a las seis horas de estímulo, los niveles de CD43 disminuyen considerablemente. En el caso de los linfocitos CD4 diferenciados a linaje Th1 pudimos observar dicho efecto desde una hora de estímulo con LPS. Si bien no se puede establecer una relación con respecto a la dosis del estímulo, estos resultados sugieren una conexión entre la señalización de los TLRs y la modulación de la expresión de CD43 en linfocitos T, además de que este efecto varía dependiendo de la subpoblación. El mecanismo de regulación de CD43 después del estímulo con LPS, así como las implicaciones funcionales de este efecto aún faltan por ser determinados.

Introducción

La respuesta inmune se define como la capacidad de un organismo de responder a sustancias ajenas a este. En vertebrados, se divide en dos grandes tipos, el innato y adaptativo (Abbas, 2006).

La inmunidad innata se caracteriza por ser una respuesta inmediata, para lo cual se vale de los tejidos epiteliales (tracto gastrointestinal, piel y tracto respiratorio) que funcionan como una barrera contra las infecciones; células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos, células asesinas naturales (Natural Killer; NK), polimorfonucleares y proteínas que se encuentran en el plasma, tales como las proteínas del complemento y citocinas. Esta respuesta no genera memoria (Abbas, 2006). La capacidad del sistema innato de identificar patrones moleculares microbianos recae en los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés Pattern Recognition Receptors) entre los cuales se encuentran receptores tipo Toll (TLRs), lectinas tipo C y los tipo NOD (NLR) (McGuinness et al., 2003). Todos estos receptores detectan patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs, del inglés Microbe Associated Molecular Pattern)/patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés Pathogen Associated Molecular Patterns) específicos de bacterias, parásitos, hongos o virus (Kabelitz, 2007) y son esenciales para la supervivencia de los microorganismos.

La familia de los receptores tipo NOD (NLRs) comprende varios miembros y, aunque sólo se han identificado algunos de sus ligandos, se sabe que tienen gran importancia en el reconocimiento de peptidoglicano, flagelina y toxinas en el citosol (Kabelitz, 2007). Las lectinas tipo C o dependientes de Ca^{2+} (CTLs), se expresan en macrófagos y células dendríticas y participan en la fagocitosis y presentación de antígenos (McGuinness et al., 2003). Los receptores tipo Toll se desarrollarán más adelante.

Los receptores del complemento también pueden funcionar como PRRs, en especial CR3 (receptor del complemento 3), el cual está involucrado en adhesión fagocítica, reconocimiento, migración, activación y eliminación de microorganismos, esto debido a su capacidad de unirse a una gran variedad de ligandos y desencadenar

diversas vías de señalización; la vía clásica, que culmina en desarrollo vascular y hematopoyesis, la vía de lectinas que genera proliferación celular, apoptosis o sobrevivencia, y la vía alternativa que también está involucrada en hematopoyesis y ciertas actividades de migración celular (McGuinness et al., 2003; Mastellos et al., 2002).

En lo que respecta a la respuesta inmune adaptativa, esta se divide principalmente en humoral y celular. La primera se vale de los anticuerpos producidos por los linfocitos B para eliminar a los microorganismos, mientras que la segunda corresponde a los linfocitos T y sus dos grandes subpoblaciones, es decir linfocitos CD8⁺ o citotóxicos y CD4⁺ o colaboradores, los cuales a su vez se diferencian hacia linajes Th1, Th2 o Th17, y linfocitos T reguladores (Akira et al., 2009). El reconocimiento de antígenos (Ag) por parte de los linfocitos T requiere del contacto del receptor de los linfocitos T (TCR) con el antígeno presentado por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de las células presentadoras de antígenos (Dustin et al., 2008). Las señales del TCR en respuesta al reconocimiento del Ag, en conjunto con las señales generadas por otras moléculas de la superficie celular (llamadas moléculas accesorias o coreceptoras), llevan a la célula a generar una respuesta inmune específica y que además genera memoria (McGuinness et al., 2003).

A pesar de que la respuesta innata y adaptativa se consideren dos grandes brazos efectores del sistema inmune, ambas formas se encuentran interconectadas y dependen una de otra. Por un lado, células tales como los macrófagos, polimorfonucleares y los linfocitos B, funcionan como células fagocíticas o productoras de anticuerpos opsonizantes respectivamente, esenciales para la respuesta inmune innata. Por otra parte, estas mismas células se convierten en células presentadoras de antígeno que estimulan específicamente a una clona de linfocitos T o de linfocitos B. De la misma manera que hay células que participan en ambas formas de inmunidad, hay moléculas compartidas entre las células. Así por ejemplo, receptores como CD8, un marcador considerado específico de una subpoblación de linfocitos T, se expresa en ciertas células NK. Otras moléculas, como CD43, se expresan en todas las células de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa (con excepción de los linfocitos B vírgenes), así como en

células no linfoides. Por otra parte, las células de la respuesta inmune adaptativa presentan distintas combinaciones de los PRRs y en particular de los receptores tipo Toll, considerados en un inicio como específicos de la respuesta inmune innata.

Receptores Tipo Toll (TLRs)

El descubrimiento de los TLRs es relativamente reciente; adoptan su nombre, “Toll like receptor” dada su homología con los receptores Toll que se encuentran en *Drosophila* y que se sabía participan en la inmunidad innata de las moscas adultas (Lemaitre, 1996; Medzhitov, 1997).

Los TLRs son proteínas transmembranales de tipo I con un dominio rico en repeticiones de leucina, el cual interactúa con MAMPs/PAMPs tanto extracelulares como endosomales y un dominio citoplásmico homólogo al dominio citoplásmico del receptor de interleucina (IL)-1 humana (TIR) (Medzhitov et al., 1997; Kabelitz, 2007) (figura 1). Actualmente, en ratones se conocen 13 miembros de la familia de los TLRs (TLR1-13). Sin embargo, aparentemente, en el genoma humano no se encuentran los TLRs 11,12 y 13, mientras que en el ratón, el TLR10 no es funcional (Kawai 2010). Los TLRs tienen una participación importante en la inducción de la inmunidad innata, inflamación e inmunidad adaptativa (Barton et al., 2009).

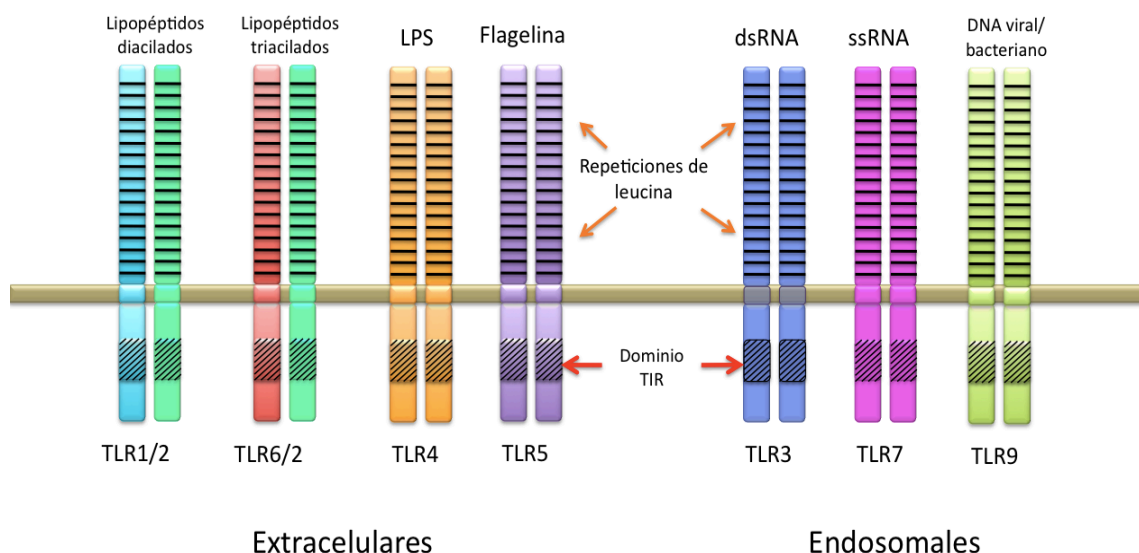


Figura 1. Esquema de los diferentes TLRs y sus ligandos, (adaptado de Akira, 2009).

La vía clásica de señalización de los TLRs comienza con el reclutamiento de las proteínas adaptadoras MyD88 y TIRAP (MAL) al dominio Toll/IL-1R (TIR) de los TLRs. MyD88 interactúa con la cinasa IRAK-4 y ésta a su vez recluta a otras cinasas de la familia IRAK, tal como IRAK-1, formando un complejo macromolecular que recluta y activa a la ubiquitin ligasa TRAF6. Este complejo activa a su vez al conjunto de cinasas conformado por TAK1, TAB1, TAB2 y TAB3, permitiendo que se active la vía de las MAP cinasas, en particular JNK, lo que dará lugar a la activación de las cinasas IKK, las cuales fosforilan la subunidad α de I κ B, inhibidor que se encuentra unido a NF- κ B en el citoplasma. Esta fosforilación promueve la poliubiquitinación y posterior degradación de IKK en el proteasoma (Israel, 2010) y la translocación de NF- κ B al núcleo y subsecuente activación de la transcripción de sus genes blanco (Akira, 2009, Brown et al. 2011).

En el caso de los TLRs 3 y 4, su señalización es independiente de MyD88, y requiere de la molécula adaptadora TRIF (en el caso de TLR4 se requiere que primero se una la molécula adaptadora TRAM a MyD88 para permitir la activación de TRIF), la cual se asocia con las ubiquitin ligasas TRAF3 y TRAF6. TRAF3 activa a las cinasas TBK1 e IKKi, que fosforilan a los factores de regulación IRF3 y/o IRF7, lo cual permite que se transloquen al núcleo y activen la transcripción de interferones tipo I. Por otro lado, la activación de TRAF6 y RIP1, dan lugar a la activación de NF κ B (Akira, 2009, Brown et al. 2011) (Figura 2).

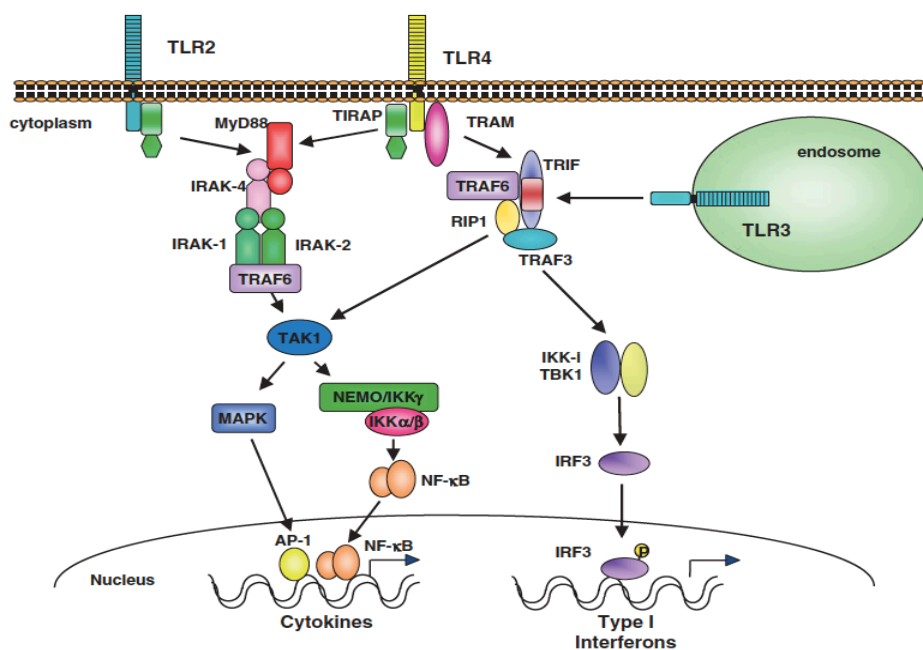


Figura 2. Vías de señalización de TLRs, dependientes de MyD88 o TRIF (Akira, 2009)

Los eventos de señalización iniciados por los TLRs culminan en la producción de citocinas, quimiocinas, péptidos antimicrobianos y otras moléculas de defensa (Iwasaki et al., 2004). Cada uno de los TLRs desencadena una respuesta diferente dependiendo de la naturaleza del ligando y, las respuestas generadas por cada uno de ellos no son del todo similares aún cuando comparten vías de señalización. Ejemplo de esto es el hecho de que en función de las citocinas inducidas por la interacción TLR/ligando, se favorece la diferenciación de linfocitos T hacia distintas sub-poblaciones. En macrófagos de ratón y células dendríticas de humano, el LPS, agonista del TLR4, induce la producción de IL-12p70, IP-10 e IFN- β , mientras que agonistas de TLR2, como lipopéptidos bacterianos y peptidoglicano, inducen la producción de IL-8, IL-10 e IL-23p19 (Kawai et al., 2001). Esta estimulación, también es capaz de bloquear la activación de genes de citocinas que son inducidas por los agonistas de los TLRs 3 y 4 (Re et al., 2004).

Los ligandos reconocidos por cada uno de los TLRs están parcialmente definidos, con excepción de los TLR10, TLR12 y TLR13, para los cuales hasta el momento no se han identificado ligandos. TLR4 reconoce al lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram-negativas; TLR2 en combinación con el TLR1 o TLR6 reconoce lipopéptidos diacilados o triacilados; TLR5 reconoce flagelina, TLR3, RNA de doble cadena, indicio característico de replicación viral (Alexopoulou et al., 2001); el TLR7 de ratón y TLR8 de humano reconocen RNA bacteriano de cadena sencilla y finalmente, el TLR9 reconoce secuencias de DNA viral y bacteriano ricas en motivos CpG no metilados (Iwasaki et al., 2004). Se piensa que el TLR11 reconoce fragmentos de bacterias uropatogénicas (Zhang et al., 2004). Aquellos TLRs que reconocen ácidos nucleicos (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9), se encuentran en compartimentos endolisosomales, mientras que el resto (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11) se encuentra en la superficie celular (Barton et al., 2009). Existe evidencia de que los TLRs también son capaces de reconocer ligandos endógenos. Tal es el caso de la proteína de choque térmico 60 (hsp60) que aparentemente es reconocida por los TLRs 2 y 4, y cuyo reconocimiento es capaz de estimular a los macrófagos (Ohashi et al., 2000; Zanin-Zhorov et al., 2003).

Los TLRs también colaboran con otros tipos de receptores que reconocen patrones moleculares. Dectina-1, un receptor de β -glucanos que se expresa en monocitos,

macrófagos y células dendríticas, contribuye a incrementar la capacidad de los TLRs de activar factores de transcripción como NFκB en macrófagos y células dendríticas (Gantner et al., 2003).

Por otro lado los TLRs son capaces de modular la expresión de receptores celulares, así como influir en la activación y diferenciación celular. Se ha observado que en macrófagos la estimulación con ligandos específicos de TLRs puede generar el aumento de la expresión de TREM-1 (Triggering Receptor Expressed on myeloid cells-1), receptor que participa de manera importante en la respuesta inflamatoria de las células mieloides activadas (Bouchon et al., 2000). Además también se observó que hay un aumento en la expresión y actividad de Notch cuando los macrófagos están activados (Palaga et al., 2008). En ambos casos, estas modificaciones dependen de MyD88 (Heng et al., 2009). El conocer los mecanismos moleculares que participan en esta modulación de la expresión de receptores celulares es un área de gran interés debido a sus implicaciones en el desarrollo de nuevos tratamientos contra enfermedades infecciosas y autoinmunes, así como de vacunas.

TLRs en linfocitos T

Datos recientes indican que los TLRs ejercen una profunda influencia en la respuesta de los linfocitos T, tanto directa como indirectamente. Por ejemplo, las células dendríticas expuestas a una combinación de diferentes ligandos de TLRs posiblemente aumentan la afinidad por el antígeno y una mejor respuesta por parte de los linfocitos T (Zhu et al., 2010). Asimismo, poco después del descubrimiento de los TLRs se observó que estos no participaban únicamente en la respuesta inmune local como receptores específicos de los epitelios y células inmunes tales como macrófagos, polimorfonucleares, células cebadas y linfocitos B (Akira et al., 2001; Barton et al., 2002), sino que se expresaban también en linfocitos T (Iwasaki y Medzhitov, 2004).

La mayoría de los TLRs se han descrito en las diferentes subpoblaciones de linfocitos T, aunque su nivel de expresión parece variar dependiendo del estado del desarrollo y etapa de activación en el que se encuentren las células. En la tabla 1 se

hace un resumen de la expresión de TLRs en linfocitos T humanos totales, CD4⁺, CD8⁺ y Th1. De la lectura de los artículos que se revisaron para elaborar esta tabla, se hace evidente que la capacidad de identificar los TLRs que se encuentran en los linfocitos T se ha visto mermada por la dificultad que implica la obtención de linfocitos T totalmente puros, es decir, sin otras células del sistema inmune que también expresen TLRs. Por otro lado, los niveles relativos de cada TLR expresados por los distintos subtipos celulares también ha sido objeto de controversia, en buena parte debido a que no hay una metodología estándar para esta determinación y por lo tanto existen discrepancias en los resultados obtenidos. En ocasiones, la cuantificación se hace con respecto a un gen normalizador (housekeeping gene), en otras con respecto a la expresión de los TLRs en otras células del sistema inmune tales como monocitos; algunos autores reportan los resultados de PCR en punto final (Hornung et al, 2002; Dolganiuc et al, 2006; Caron et al, 2005; Tabiasco et al 2006), otros los de PCR en tiempo real (Mansson et al, 2006; Komai-Koma et al, 2004; Zarembek et al, 2002; Reynolds et al, 2010), y otros mas inclusive proporcionan datos obtenidos por Northern Blot (Muzio et al, 2000). El resultado de esto es una incapacidad de unificar todos los resultados obtenidos. Finalmente, para el caso de las células Th1, la mayoría de los estudios se han enfocado en determinar que señales de los TLRs favorecen la diferenciación de los linfocitos a esta subpoblación celular (Srivastava et al, 2011; Fang et al., 2011), pero pocos grupos han buscado la expresión de TLRs en las células diferenciadas y no se tiene suficiente información de su perfil de expresión (Muzio et al., 2000; Reynolds et al., 2010). Además de los perfiles de expresión basal, éstos se ven modificados cuando las células son estimuladas, por ejemplo, en linfocitos T CD3⁺ activados, los niveles de TLR2 y TLR4 se incrementan considerablemente (Liu et al., 2006).

Las consecuencias de la activación de los TLRs presentes en linfocitos T aún se encuentran en estudio, y hasta el momento se sabe que las respuestas generadas son muy diversas. Los ligandos de los TLRs 5, 7 y 8 estimulan a los linfocitos T CD4⁺ y favorecen la producción de IL-8, IL-10 e IFN γ (Caron et al., 2005), sin la necesidad de APCs. La estimulación de linfocitos T CD8⁺ de neonato con agonistas de los TLRs 2 y 5 incrementa la proliferación y expresión de IL-2, IFN γ , TNF- α y granzima B. Así mismo, la estimulación de linfocitos T totales con agonistas del TLR2

favorecen la diferenciación de dichas células al linaje Th17 (Reynolds et al., 2010). La participación de los TLRs en las funciones de las células T reguladoras ha sido uno de los temas más estudiados, ya que se piensa que su expresión puede ser crucial en la modulación de la capacidad reguladora de estas células (Caramalho et al., 2003). Un ejemplo de esto es el TLR7, que al reconocer a su ligando, induce que la célula T reguladora incremente su función supresora (Forward et al., 2010). Se ha descrito la expresión de los TLRs del 1 al 9 en los linfocitos T reguladores, siendo los TLRs 4, 5, 7 y 8 los que se encuentran más expresados.

Tabla 1. Expresión de TLRs en subpoblaciones de linfocitos T humanos

	Totales	CD4⁺	CD8⁺	Th1
TLR1	+++	++± ^{3,4}	++ ^{4,7}	+ ^{8,10}
TLR2	+	+± ^{3,4,5}	+± ^{4,7}	+± ^{8,10}
TLR3	+	+± ^{3,4}	++± ^{4,7,9}	+ ¹⁰
TLR4	± ^{1,2}	+ ^{3,4,6}	+ ^{4,7}	+ ⁸
TLR5	+++	+ ^{3,4,6}	++± ^{4,7}	+ ⁸
TLR6	+	SE ^{3,4}	+± ^{4,7}	+ ¹⁰
TLR7	+	+ ^{3,4}	+ ^{4,7}	ND
TLR8	+	SE ^{3,4}	± ^{4,7}	ND
TLR9	+++	+± ^{3,4}	++ ^{4,7}	+ ¹⁰
TLR10	± ^{1,2}	+± ^{3,4}	+± ^{4,7}	ND
Referencia		Método de determinación		
1. Hornung V et al. J Immunol. 2002 May 1;168(9):4531-7.		PCR Punto final (células de humano)		
2. Dolganiuc A et al. World J Gastroenterol. 2006 Feb 28;12(8):1198-204.		PCR Punto final (células de humano)		
3. Caron G et al. J Immunol. 2005 Aug 1;175(3):1551-7.		PCR Punto final (células de humano)		
4. Mansson A et al. Respir Res. 2006 Feb 27;7:36.		PCR Cuantitativo (células de tonsila humana)		
5. Komai-Koma et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Mar 2;101(9):3029-34.		PCR Cuantitativo (células de cordón umbilical)		
6. Crellin NK et al. J Immunol. 2005 Dec 15;175(12):8051-9.		PCR Cuantitativo (células de humano)		
7. Zarembek KA and Godowski PJ. J Immunol. 2002 Jan 15;168(2):554-61.		PCR Cuantitativo (comparado contra expresión en monocitos)		
8. Muzio M et al. J Immunol. 2000 Jun 1;164(11):5998-6004.		Northern blot (células de humano)		
9. Tabiasco J et al. J Immunol. 2006 Dec 15;177(12):8708-13.		PCR Punto final (células de humano)		
10. Reynolds JM et al. Immunity. 2010 May 28;32(5):692-702.		PCR Cuantitativo (células de ratón)		
SE: sin expresión; ND: no disponible				

CD43

CD43 fue identificada por vez primera como gpL115 y se describió como una molécula faltante en los linfocitos T de pacientes con el síndrome de Wiskott Aldrich, una inmunodeficiencia asociada al cromosoma X (Parkman et al., 1981). Las funciones específicas de esta molécula aún continúan siendo debatidas y en ocasiones dan la impresión de generar respuestas contradictorias en las células. CD43, también llamada sialoforina o leucosialina, se caracteriza por ser una mucina altamente glicosilada muy abundante (5×10^5 copias/célula) en la superficie de células hematopoyéticas (Remold O'Donnell et al., 1986), que se extiende hasta 45nm por encima de la superficie celular (Cyster et al., 1991). Está compuesta por un dominio extracelular de 235 aminoácidos rico en serina, treonina y prolina, un dominio transmembranal de 23 aminoácidos y uno intracitoplásmico de 123 aminoácidos (Shelley et al., 1989). Se han identificado dos isoformas que difieren entre ellas a nivel de la O-glicosilación: la isoforma de 130 KDa que se expresa mayoritariamente en linfocitos T CD4 activados y linfocitos T CD8 no activados, linfocitos B, monocitos, neutrófilos y plaquetas, así como células tumorales, esta isoforma contiene a los tetrasacaridos NeuAc(a2-3)-Gal(b1-3[NeuAc(a2-3) 58 Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Gal-NAc (Piller et al., 1988), la isoforma, de 115 KDa se expresa en timocitos, linfocitos T CD4 no activados y monocitos y contiene el hexasacarido NeuAc(a2-3)-Gal(b1-3) 55 [(NeuAc(a2-6)]GalNAc(Remold O' Donnell et al., 1990). También se identificó una variante denominada 8B4/20 que se encuentra en timocitos inmaduros cuyo peso molecular es de 120 KDa y sus patrones tanto de glicosilación como de sialilación difieren con respecto a las otras dos isoformas, influyendo así en la maduración de los timocitos (Fabbi et al., 1999). Debido a que CD43 se encuentra altamente sialilada, tiene una carga altamente negativa, por lo que inicialmente se pensó que su principal función era de antiadhesión (Manjunath et al., 1993). Durante el reconocimiento del antígeno por parte del TCR, CD43 se excluye de la sinapsis inmunológica, localizándose en algunas ocasiones en el polo opuesto de la sinapsis inmunológica (Sperling et al., 1998). Por otra parte, CD43 es una molécula coestimuladora que participa en la proliferación de los linfocitos T así como en la modulación de la respuesta inmune.

El anticuerpo monoclonal L10 que reconoce a CD43 (Remold O'Donnell et al., 1984) induce la proliferación de linfocitos T (Mentzer et al., 1987) y la activación de monocitos de manera similar a IFN- γ (Nong et al., 1989). Además, los anticuerpos B1B6, que reconoce un epítipo de CD43 dependiente de ácido siálico y L10, que reconoce un epítipo distinto y que no depende de ácido siálico, inducen la adhesión homotípica de los linfocitos T, así como la producción de IL-2, y otras citocinas (Axelsson et al., 1988, Layseca-Espinosa et al., 2003, Fierro et al., 2006). En ausencia de CD28, la molécula coestimuladora por excelencia, CD43 es capaz de sustituir las funciones de CD28 y ayudar al TCR en la estimulación de linfocitos T, dando lugar así a una respuesta funcional (Sperling et al., 1995).

Al interactuar con sus múltiples ligandos, cada uno de los cuales a su vez tiene otros contra-receptores, CD43 funciona como una molécula multifuncional que parece ejercer una función reguladora (Aguilar Delfin et al., 2006). Se conocen varios contra-receptores para CD43: ICAM-1, a través del cual se regularía la adhesión de la célula T con las células presentadoras de antígeno y epitelios así como la activación de la célula (Rosenstein et al., 1991); galectina 1, que reconoce diferentes glicofomas de CD43, siendo este reconocimiento, crucial en la selección negativa de timocitos, (Barondes et al., 1994; Hernández et al., 2006); el complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC I), con el cual se piensa que ayuda a regular la unión del linfocito T con la célula presentadora de antígeno a través de la transactivación de la unión de CD2 a CD58 (Stöckl et al., 1996); E-selectina, la cual cumple una función en el reclutamiento de linfocitos Th1 durante un proceso inflamatorio (Alcaide et al., 2007); Siglec-1, que media el contacto célula-célula entre linfocitos T y macrófagos (van den Berg et al., 2001); nucleolina, que es un receptor que en macrófagos puede expresarse en membrana, además del citoplasma y núcleo, y reconoce células apoptóticas (Hirano et al., 2005) y finalmente la albúmina sérica humana, la cual se piensa evita que CD43 sea degradada y de esta manera funcione como un inhibidor de la extensión de los neutrófilos (Nathan, 1993). No se tiene aún conocimiento de cómo CD43 regula la interacción de cada una de estas moléculas con sus otros ligandos, ni de las funciones que se regulan a través de estas interacciones.

La vía de señalización inducida por CD43 en linfocitos T está bien caracterizada y depende del dominio intracelular de la molécula (Park et al., 1991). Cuando CD43 se entrecruza, se favorece la interacción de la región rica en prolinas del dominio intracelular de CD43 con el dominio SH3 de las tirosina cinasas Lck, y Fyn. Estas fosforilan las tirosinas de la cadena ζ , las cuales reclutan y activan a las tirosina cinasas Zap 70, que fosforilan las tirosinas del factor intercambiador de guaninas (GEF) Vav y a las moléculas adaptadoras LAT, SLP76, Shc y Grb-2. Éstas a su vez funcionan como proteínas de andamiaje y contribuyen a formar complejos macromoleculares que finalmente regulan los niveles de calcio intracelular, la activación de la vía de las MAP cinasas y el reclutamiento de factores de transcripción, entre los cuales se han identificado a AP-1, NF κ B y NF-AT (Alvarado et al., 1995, Pedraza-Alva et al., 1996; Pedraza-Alva et al., 1998; Pedraza-Alva et al., 2001; Santana et al., 2000; del Rio et al., 2004). Además, la región intracitoplásmica interactúa con elementos del citoesqueleto, tales como actina, a través de miembros de la familia ezrina, radixin y moesina (ERM) (Serrador et al., 1998; Yonemura et al., 1998). Las señales intracelulares de CD43 generan rearrreglos en el citoesqueleto y de adhesión intercelular (Layseca-Espinosa et al., 2003), expresión de genes que promueven la síntesis de citocinas y quimiocinas y progresión del ciclo celular modulando la activación del linfocito T a través del TCR, siendo una de las primeras células que interactúan con las APC (Fierro et al., 2006).

Existen varias evidencias de la relación de CD43 con ciertas patologías, la más antigua es con el síndrome Wiskott Aldrich mencionado anteriormente, por el cual se da el descubrimiento de la propia molécula. También se ha detectado la presencia de anticuerpos anti-CD43 en pacientes infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (HIV-1), los cuales reconocen una forma parcialmente sialilada de CD43 que se encontraría en linfocitos T circulantes (Ardman et al., 1990); además el entrecruzamiento de CD43 con el complejo TCR/CD3, promueve la actividad transcripcional y por lo tanto la producción del VIH-1 (Barat et al., 2002). Recientemente se ha reportado que CD43 no se expresa exclusivamente en células hematopoyéticas, sino que también está presente en células no hematopoyéticas, particularmente en células tumorales, en donde participan en el crecimiento celular y en la formación de colonias en células que

carecen de p53 o ARF, así como en la evasión de las señales de apoptosis del receptor FAS (Kadaja-Saarepuu et al., 2008).

En ratones diabéticos no obesos, se observó que un anticuerpo monoclonal anti-CD43, impedía el reclutamiento de los linfocitos T hacia los islotes pancreáticos inflamados y glándulas salivares, permitiendo así el retardo de la aparición de la enfermedad (Johnson et al., 1999). Esta observación se complementa con la evidencia encontrada de que las señales producidas por CD43 participan en la regulación del tráfico de linfocitos T CD4⁺ hacia los nodos linfáticos y que esto depende del patrón de fosforilación del fragmento intracitoplásmico de la molécula (Mody et al., 2007).

Finalmente, los linfocitos T de ratones deficientes en CD43 muestran un aumento en la adhesión homotípica a ICAM-1 y fibronectina, así como un incremento en la actividad proliferativa cuando son estimulados *in vitro* con concavalina A, anti-CD3, el superantígeno SEB y aloestimulación (Manjunath et al. 1995). La capacidad de los linfocitos T CD4⁺ de los ratones deficientes en CD43 para generar IFN- γ está disminuida y la producción de IL-4 exacerbada (Ford et al. 2003), además de que el entrecruzamiento de CD43 induce un patrón Th1 en linfocitos T humanos (Ramírez-Pliego et al. 2007). Los linfocitos T CD8⁺ ven afectada su capacidad de controlar la respuesta inmune, y por lo tanto montan respuestas exacerbadas que disminuyen la vida de los ratones. Esto indica que CD43 participa en la modulación de la respuesta inmune y por lo tanto en las enfermedades autoinmunes (Onami et al., 2002).

Antecedentes

Los TLRs inciden sobre el tipo y magnitud de la respuesta inmune. La capacidad de los TLRs de colaborar con receptores como Dectina-1, de modular la expresión de receptores como TREM-1 y Notch sugiere que otras moléculas podrían ser blanco de estos receptores, siendo CD43 un posible candidato. Hasta la fecha, hay poca evidencia sobre la existencia de alguna relación entre los TLRs y CD43. Sin embargo, en neutrófilos activados con Zymosan, una preparación de pared celular de levadura, se reportó que hay una disminución en los niveles de CD43 en la

membrana (Remold O'Donnell y Parent, 1995). En su momento, estos datos no tuvieron el impacto necesario en el campo, pues se desconocían por completo los mecanismos de reconocimiento de patrones moleculares. En la actualidad sabemos que Zymozan es reconocido por el TLR2/6, lo cual sugeriría una relación entre la disminución de CD43 y el reconocimiento del ligando de los TLRs.

Para comenzar a definir si existe una relación con los demás TLRs, recientemente en el laboratorio se observó que al activar linfocitos T humanos aislados de sangre periférica con Zymosan y/o con FSL1 (TLR6/2), la expresión de CD43 disminuye considerablemente en la superficie de la célula. Además, en células Jurkat (linfocito T de leucemia aguda), THP1 (células premonocíticas) y CEM (linfocitos T de leucemia), también se observa una disminución de CD43 no sólo ante el estímulo con Zymosan, sino también con LPS (agonista del TLR4), LTA (agonista del TLR2) y Poly I:C (agonista del TLR3) (Quevedo N, Tesis de Licenciatura, 2010).

Complementando lo anterior, se ha visto que la activación de granulocitos con PMA (acetato de forbol 12-miristato 13); así como de linfocitos T y de granulocitos con el anticuerpo monoclonal MEM-59, el cual reconoce un epítotope de CD43 sensible a neuraminidasa promueve la disminución de la expresión de CD43 en la superficie celular por un corte proteolítico que puede estar coordinado por metaloproteasas y serin proteasas, enzimas dependientes de cationes de metales pesados, su acción genera la liberación del fragmento extracelular de CD43, denominado Galpg y cuya presencia se ha observado en el suero humano, (Bazil y Strominger 1993; Bazil y Strominger 1994). En neutrófilos humanos, se ha propuesto que dicha disminución se debe por una serie de dos cortes proteolíticos que generan dos o tres fragmentos (Remold O'Donnell et al., 1994). Aunque el mecanismo exacto por el cual suceden dichos cortes aún no ha sido del todo esclarecido, se tienen evidencias de que puede deberse a la acción de Catepsina G, la cual cortaría el 50% de la molécula dejando disponible un sitio de corte para presenilina/ γ -secretasa, el cual a su vez liberaría un fragmento intracelular (Mambole et al., 2007). Este corte proteolítico por presenilina/ γ -secretasa también se ha descrito en células tumorales de carcinoma de colon y en líneas celulares derivadas de leucocitos (Andersson et al., 2005). Adicionalmente, se sabe que en estas células, el fragmento intracitoplásmico liberado, posee un sitio de localización nuclear (NLS), el cual a su vez interacciona

con β -catenina, generando un aumento en la regulación de los genes blanco de β -catenina, c-MYC y Ciclina D1 relacionando así el corte proteolítico de CD43 con proliferación celular (Andersson et al., 2004). Recientemente se observó que al inhibir la liberación del fragmento intracitoplásmico de CD43 en células murinas de médula ósea, se favorecía la apoptosis de dichas células, lo cual sugiere que este fragmento juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de las células, en particular en los mecanismos de apoptosis (Seo et al., 2009).

Hipótesis

La unión de los TLRs con sus ligandos modula la expresión de CD43 en la superficie de linfocitos T.

Objetivo

Determinar si los niveles de expresión de CD43 en la membrana de linfocitos T se modula a través de las señales de los TLRs.

Objetivos Particulares

1. Caracterizar la expresión de los TLRs en diferentes poblaciones de linfocitos T (CD4, CD8 y Th1).
2. Evaluar si las señales de los TLRs presentes en una subpoblación definida modulan la expresión de CD43.

Metodología

1) Purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y obtención de linfocitos T

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y los linfocitos T totales se obtuvieron a partir de concentrados leucocitarios de pacientes sanos, obtenidos del banco de sangre del Hospital Regional del Instituto Mexicano del Seguro Social, en Cuernavaca, Morelos. El protocolo descrito cuenta con la aprobación de los Comités de Bioética del Instituto de Biotecnología y del IMSS.

Para la purificación de PBMCs se utilizó el método de Ficoll-Hypaque el cual se basa en diferencias en las densidades de las células mononucleares de la sangre para poder separarlas por centrifugación (Ferrante and Thong, 1980). Para esto, la sangre o concentrado leucocitario se diluyó 1:2 con PBS; en un tubo cónico de 50 ml, se agregaron 3ml de Ficoll por cada 10ml de mezcla de sangre/PBS y se centrifugó a 400x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Del gradiente que se genera, se tomó la fase en donde se formó un anillo que es el que contenía las células mononucleares y se pasó a otro tubo de 50ml, se agregó PBS hasta un volumen de 50 ml y se centrifugó a 300xg durante 15 minutos. Después de la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular que se formó. En caso de ser necesario, se agregaron 2ml de agua para eliminar eritrocitos durante 30 segundos y se llenó el tubo con PBS para detener la reacción, se centrifugó de nuevo a 300xg durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se volvió a lavar el botón celular con PBS. Por último, se volvió a centrifugar por 7 minutos a 250xg (en este paso se eliminaron plaquetas) y el botón celular se resuspendió en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomicina y 2mM glutamina, finalmente se contaron y plaquearon 10 ml de células (5×10^6 /ml) en cajas Petri de 10 cm de diámetro, y se dejaron incubando toda la noche a 37°C, 5% CO₂ para permitir que las células adherentes se pegaran a las placas.

Al día siguiente se purificaron linfocitos T totales con el kit Pan T Cell Isolation Kit II (human) de Milteny Biotec, en el cual se eliminan las células que no sean linfocitos T (selección negativa) utilizando anticuerpos monoclonales

conjugados con biotina anti-CD14, -CD16, -CD19, -CD36, -CD56 y -CD123, los cuales son marcadores de linfocitos B, NK, células dendríticas, monocitos, granulocitos y eritrocitos respectivamente. Brevemente, las células no adherentes, se removieron de las cajas de Petri, se incubaron con la mezcla de anticuerpos durante 15 minutos a 4°C, pasado el tiempo se diluyeron en PBS suplementado con BSA y EDTA y se centrifugan para eliminar el exceso de anticuerpos, después de lo cual, se resuspendió el botón celular en 500 µl de PBS suplementado con BSA y EDTA, y se incubó con esferas magnéticas anti-biotina, durante 15 minutos a 4°C. Las células se centrifugaron a 300xg durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en el buffer. Finalmente, se pasaron por una columna, que al ser sometida a un campo magnético retiene todas las células que se unieron a alguno de los anticuerpos primarios, eluyendose aquellas que no fueron marcadas por los anticuerpos (selección negativa). Por este método se obtuvo una pureza de 99.4% para linfocitos T. Para los experimentos realizados con linfocitos CD4+, CD8+ o Th1/Th2, partir de la población de linfocitos T puros, se realizó un paso mas de purificación por selección negativa con anticuerpos anti-CD4 o anti-CD8, de manera semejante a la descrita para la purificación de linfocitos T totales.

2) Diferenciación a linajes Th1 y Th2

Se purificaron linfocitos T CD4⁺ y se cultivaron en cajas de 24 pozos a una densidad de 1X10⁶ células por pozo en un volumen de 1ml de medio RPMI suplementado con 10% suero fetal bovino (FCS). Se estimularon con αCD3 (1µg/ml), αCD28 (1µg/ml) y αIgG de raton (2µg/ml). En seguida, para cada una de las condiciones se agregó lo siguiente:

- Th1: 5 ng/ml IL-2 + 5 ng/ml de IL-12 + 5 ng/ml IFNγ + 5 ug/ml de αIL-4
- Th2: 5 ng/ml IL-2 + 5 ng/ml de IL-4 + 2 ug/ml de αIFNγ

EL tercer día se agregó 1 ml más de medio con las citocinas, después de lo cual se cambió el medio cada tercer día (o según se requiera) y se agregaron citocinas nuevamente hasta completar 7 días. Para evaluar la eficiencia de la diferenciación celular, se agrego PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato) (20ng/ml)/Ionomicina (0.5µg/ml) por 6 horas. El PMA es un análogo de diacilglicerol (DAG) y por lo tanto

potente activador de la vía de PKC, mientras que la ionomicina es un ionoforo que permite el incremento de calcio intracelular. Simultáneamente se agregó Brefeldina A (100ng/ml) por cuatro horas. La Brefeldina A es un antibiótico que inhibe el transporte de proteínas del retículo endoplásmico al aparato de Golgi. De tal manera que la combinación de PMA/Ionomycin favorece la síntesis de citocinas en las células ya diferenciadas y la Brefeldina A impide su liberación al espacio extracelular. Estos estímulos hacen más fácil la detección de las citocinas características de cada linaje que son IL-4 e IFN γ en el compartimento intracelular. La tinción intracelular se describe en la sección de citometría.

4) Extracción de RNA y RT

4.1 Extracción de RNA y obtención de cDNA

Para las reacciones de RT y PCR tiempo real se utilizó cDNA de linfocitos T totales, CD4⁺, CD8⁺ y Th1 obtenido a partir de RNA extraído con Trizol[®] (Invitrogen). Para esto se toman 10×10^6 células y se centrifugaron a 300xg por 10 minutos, el botón celular obtenido se resuspendió en 1ml de Trizol[®] frío y se pasa a un tubo de microcentrífuga de 1.5ml. Se agregaron 200 μ l del cloroformo frío para desnaturalizar las proteínas y se agitó en vortex por aproximadamente 1 minuto o hasta que la muestra estuvo homogeneizada. Posteriormente se centrifugó en frío (4°C) a 12000xg durante 15 minutos. De las tres fases que se formaron, la inferior contenía restos proteicos y lípidos, la intermedia DNA y la superior el RNA, por lo que esta fase se removió y se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga. Posteriormente se precipitó el RNA con isopropanol y se resuspendió con vortex para homogeneizar y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, se centrifugó el RNA en frío a 12000xg durante 10 minutos. Finalmente se lavó el RNA adicionando etanol frío al 75%. Se centrifugó de nuevo en frío a 7500xg por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar el botón. El RNA se resuspendió en 30 μ l de agua grado biología molecular y se cuantificó en un espectrofotómetro a una absorbancia de 260 nm (1 OD₂₆₀ equivale a 40 μ g de RNA).

Para eliminar el DNA genómico, las muestras se trataron con la enzima RQ1 RNase-Free DNase de Promega de la siguiente manera:

Reactivo	Volúmen
RNA en agua	1-8 μ l (1 μ g)
Buffer 10x	1 μ l
DNasa	1u/1 μ g RNA
Agua libre de nucleasas y RNAsas	Completar vol.
Volúmen total	10μl

La mezcla anterior se incubó durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se agregó con 1 μ l de RQ1 DNase Stop Solution y se incubó a 65°C durante 10 minutos para inactivar la DNasa.

Finalmente, se comprobó la integridad del RNA extraído por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% con buffer TAE (Tris acetato 40mM/EDTA 2mM a pH 8.5) teñidos con bromuro de etidio. En este gel se esperaba ver dos bandas que corresponden a los RNA ribosomales 28S y 18S en una proporción aproximada de 2:1 con un peso de 4.5 y 1.9kb respectivamente.

A partir del RNA obtenido, se realizó la síntesis del cDNA de cadena sencilla en dos pasos con el “First Strand cDNA Synthesis Kit” (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante y con las siguientes cantidades de reactivo y programa de RT:

Paso 1

Reactivo	Volúmen	Conc. Final
Muestra	1-10 μ l	1 μ g de RNA
Oligo (dT) ₁₈ primer 100 μ M	1 μ l	0.5 μ g/ μ l
Agua grado PCR	1-9 μ l	—
Volúmen total	11μl	

Se desnaturalizó la mezcla de oligonucleótidos molde calentando el tubo durante 5 minutos a 65°C en un termociclador, e inmediatamente se enfrió en hielo.

Paso 2

Se agrega al mismo tubo lo siguiente:

Reactivo	Volúmen	Conc. Final
Amortiguador 5x	4µl	1x (1mM MgCl ₂)
Inhibidor de protector de RNAsa 20U/µl	1µl	20U
Mezcla de dNTPs 10mM c/uno	2µl	1mM c/uno
Transcriptasa Reversa 20U/µl	2µl	10U
Volúmen total	20µl	

Se continuó la reacción incubando el tubo a 37°C durante 60 minutos para permitir la reacción de elongación y se finalizó calentando a 70°C por 5 minutos para detener la reacción. El cDNA obtenido se conservó a 4°C por periodos cortos o a -20°C para periodos más largos.

4.2) PCR Tiempo Real

El cDNA obtenido se utilizó para amplificar las secuencias de los TLRs del 1-10, así como del gen normalizador β2-microglobulina, por PCR tiempo real con oligonucleótidos reportados previamente, y cuyas secuencias se indican en la tabla 2.

Para la amplificación de los fragmentos se utilizó el reactivo *Power SYBR Green* de Applied Biosystems, con la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen
Enzima (Master Mix)	12.5µl
Mezcla de oligonucleótidos (10µM)	2µl
cDNA	2µl
Agua	8.5µl
Volúmen total	25µl

A continuación se programó en el termociclador un único programa que funciona para todos los oligonucleótidos:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
50°C	2min.	1
95°C	10min	1
95°C	15seg.	40
60°C	1min	
4°C	∞	—

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos de TLRs

TLR	Secuencia	Tamaño del fragmento	Referencia
TLR1	F GGTACCAGGCCCTCTTCCTCGTTAG R TAGGAACGTGGATGAGACCGTTTTT	258pb	Kanczkowski et al., 2008
TLR2	F TCGGAGTTCTCCAGTTCTCT R TCCAGTGCTTCAACCCACAA	175pb	Fazeli et al, 2007
TLR3	F TTCACGCAATTGGAAGATTATTTGG R TTCTAGTTGTGGAAGCCAAGCAAAG	263pb	Kanczkowski et al., 2008
TLR4	F CGTGGAGACTTGGCCCTAAA R TTCACACCTGGATAAATCCAGC	167pb	Fazeli et al, 2007
TLR5	F CACCAAACCAGGGATGCTAT R CCTGTGTATTGATGGGCAAA	111pb	Fazeli et al, 2007
TLR6	F CTATTGTTAAAAGCTTCCATTTTGT R ACCTGAAGCTCAGCGATGTAGTTC	186pb	Fumitaka H., 2003
TLR7	F CTCTCATGCTCTGCTCTTTCAACC R GAGTGACATCACAGGGCAGAGTTTT	178pb	Kanczkowski et al., 2008
TLR8	F AATCATTTCAAGGGCTGCAAAATCT R CAAACCAGAGGGTATTTGGGGTAAC	191pb	Kanczkowski et al., 2008
TLR9	F TGGTGTGAAGGACAGTTCTCTC R CACTCGGAGGTTTCCCAGC	90pb	Fumitaka, 2003
TLR10	F CTCCCAACTTTGTCCAGAAT R TGGTGGGAATGCAATAGAAT	132pb	Jin et al., 2008
β2M	F CTC CGT GGC CTT AGC TGT G R TTT GGA GTA CGC TGG ATA GCC T	69pb	Sudchada et al., 2010

Para realizar la curva de estandarización, se tomaron los valores de ciclo umbral (C_t) obtenidos de la muestra sin diluir así como de diluciones 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16, de cDNA de linfocitos T totales.. El C_t es el ciclo en el cual el aumento de la concentración del producto es exponencial; este al graficarse contra el logaritmo de la concentración a la que se encuentra la muestra da una recta que posteriormente permite determinar la concentración de las muestras problema de RNA. Esto se hizo para cada uno de los oligonucleotidos mencionados.

Finalmente, se determinó la cantidad de TLRs para dos donadores en cada una de las subpoblaciones, con excepción de la subpoblación de Th1 en donde por cuestiones de pureza, solamente se pudieron determinar para un donador.

5) Estímulos con agonistas de LPS

Para los estímulos con el agonista del TLR4 se utilizó LPS de *E.coli* K12 a las concentraciones que se indican en cada experimento, las cuales van desde 100ng hasta 1000ng). Las células (por lo general 1×10^6 /punto) fueron activadas en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100U/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomycin y 2mM glutamina, por los tiempos indicados, en placas de 48 o 24 pozos e incubadas a 37 $^\circ$ C 5% CO $_2$. Las condiciones particulares se especifican dependiendo del experimento del cual se trate.

6) Citometría.

6.1) Tinción de CD43

La tinción para CD43 se realizó con el sobrenadante de cultivo del hibridoma L10 el cual secreta un anticuerpo monoclonal contra CD43 como anticuerpo primario (dilución 1:4) y R α mig (Rabbit anti-mouse) Alexa 488 (dilución final 1:3600) como anticuerpo secundario. Cada uno de los anticuerpos se dejó incubar durante 30 minutos a 4 $^\circ$ C, lavando las células con solución de FACS (PBS 1x, Suero Bovino Fetal al 2% y azida de sodio 0.06M) para eliminar el exceso de cada uno de los anticuerpos. Al término del procedimiento, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 2%.

6.2) Tinción intracelular de citocinas

Se fijaron las células con PFA al 2% durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se bloquearon los receptores para Fc de la superficie de las células con suero humano (dilución 1:10) durante media hora, a temperatura ambiente, finalmente se permeabilizaron con solución de FACS suplementada con saponina al 0.3% durante media hora a 4°C; después se procedió a hacer la tinción con α IL-4 acoplado a ficoeritrina (PE) (BD Pharmingen, 1ul del anticuerpo concentrado) y α IFN γ acoplado a Alexa 488 (E Biosciences, 2 μ l del anticuerpo concentrado) o acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Pharmingen, 1ul del anticuerpo concentrado), se incubaron los anticuerpos durante 30 minutos a 4°C, finalmente las células se volvieron a fijar y se pasaron por citómetro.

Se utilizaron los citómetros FACSort de BD y el FACS Canto II para pasar las células y el análisis se realizó en los programas FlowJo v6.1.1 y FACS Diva Software.

7) Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los estímulos con LPS, se usó una muestra de 3 experimentos por condición. Se tomaron los valores normalizados de fluorescencia media de los niveles de CD43 y se hizo una prueba T de Student pareada con un límite de p de 0.05

Resultados

Objetivo 1: Caracterizar la expresión de los TLRs en diferentes poblaciones de linfocitos T

1.1 Purificación y diferenciación de linfocitos T

Para la caracterización de la expresión de los TLRs se aislaron linfocitos T totales a partir de concentrados leucocitarios de banco de sangre. En la figura 3 se observan los perfiles de pureza obtenidos, en los histogramas se grafican el número de eventos (eje X) contra la fluorescencia emitida por dichos eventos (eje Y).. La línea que divide cada una de las gráficas marca el punto en el que un evento es positivo o negativo para cada una de las tinciones. De esta manera podemos observar que en el caso de los linfocitos T totales se obtuvieron purezas superiores al 95% (Figura 3A). A partir de éstos, se obtuvieron linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, con purezas entre 90%. y 95% (Figura 3B). Los linfocitos con una pureza superior al 95% se diferenciaron hacia los linajes Th1 y Th2 de acuerdo a lo descrito en la metodología, para luego caracterizar la expresión de los distintos TLRs en las distintas subpoblaciones, En aquellos casos en los que la pureza era solo del 90%, las células no se diferenciaron y se utilizaron en otros ensayos.

Las gráficas de diferenciación están divididas en 4 cuadrantes, en los que cada uno de ellos corresponde a un valor positivo para las citocinas especificadas o la combinación de ellas, el cuadrante de la esquina inferior izquierda siempre corresponde al valor negativo de las tinciones. De esta manera, se puede ver que la eficiencia de diferenciación de las células hacia los linajes Th1 o Th2 fue distinta. En el caso de las condiciones Th1, el 76% de los linfocitos T CD4⁺, adquirió un fenotipo Th1, es decir que las células expresan altos niveles de IFN γ intracelular, y menos de 12 % son dobles positivas para IFN γ e IL-4, o solo positivas para IL-4. Aproximadamente el 12 % de la población original se caracterizo como doble negativa para IFN γ e IL-4. En el caso de las células Th2, como se observa en la misma figura, no se lograron diferenciar tan eficientemente, por lo que no se utilizaron para éste y los experimentos posteriores (Figura 3B). Por lo tanto, en la determinación de TLRs como de estímulos con LPS se utilizaron linfocitos T totales, CD4⁺, CD8⁺ y Th1 con altos grados de pureza.

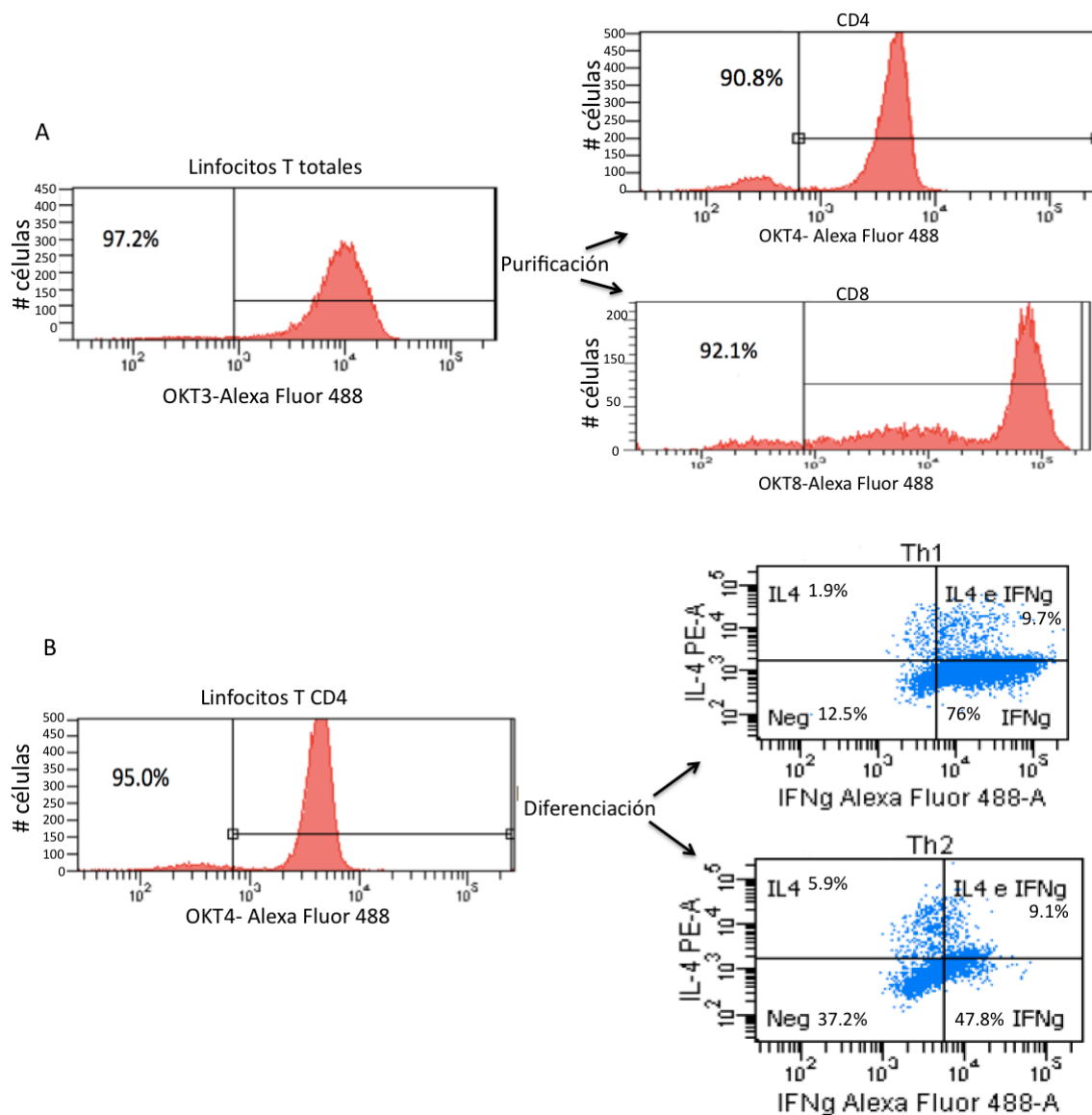


Figura 3. Perfiles de pureza por citometría de flujo de linfocitos T totales y subpoblaciones.
 A) Perfiles de pureza por citometría de flujo de linfocitos T totales y linfocitos T CD4+ y CD8+. B) Perfiles de diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia linajes Th1 y Th2. Esta gráfica es representativa de por lo menos 3 experimentos semejantes.

1.2 Expresión de TLRs.

En un principio habíamos propuesto que este objetivo se abordaría por PCR en punto final. Se sintetizaron los oligonucleótidos específicos para cada uno de los 10 TLRs humanos, y se amplificaron a partir del RNA de linfocitos T totales, usando el RNA de PBMCs como control positivo. Si bien los resultados que obtuvimos fueron

alentadores en el sentido de que se detectaron todos los TLRs a partir del RNA de linfocitos T (datos no mostrados), nos pareció que el PCR en tiempo real ofrecía un mayor poder resolutivo en el sentido de que permite identificar las diferencias de concentración de cada uno de los TLRs que se probaron en cada una de las muestras, dos características que nos permitirían tener una idea mas precisa de los TLRs expresados por distintas subpoblaciones de linfocitos T.

Para la cuantificación del RNAm de los TLRs a través de RT-PCR en tiempo real en las diferentes subpoblaciones de linfocitos T, primero se obtuvieron curvas estándar con cDNA de células polimorfonucleares (PBMCs) a partir de los C_t obtenidos para cada TLR y el gen normalizador, $\beta 2M$, así como del logaritmo de la concentración del RNA total puesto en cada reacción (Figura 4). Para poder considerar como control a las curvas realizadas, se tomó en cuenta que el valor de R^2 fuera superior a 0.90. Este valor indica la linealidad de la recta, es decir, qué tanto se conservan las proporciones con respecto a las diluciones. Mientras más cercano sea el valor de R^2 a 1, mejor conservada está esta proporción. Posteriormente, se utilizó el valor de la pendiente de la recta como base para determinar la concentración de RNA de cada uno de los TLRs en las muestras de linfocitos T.

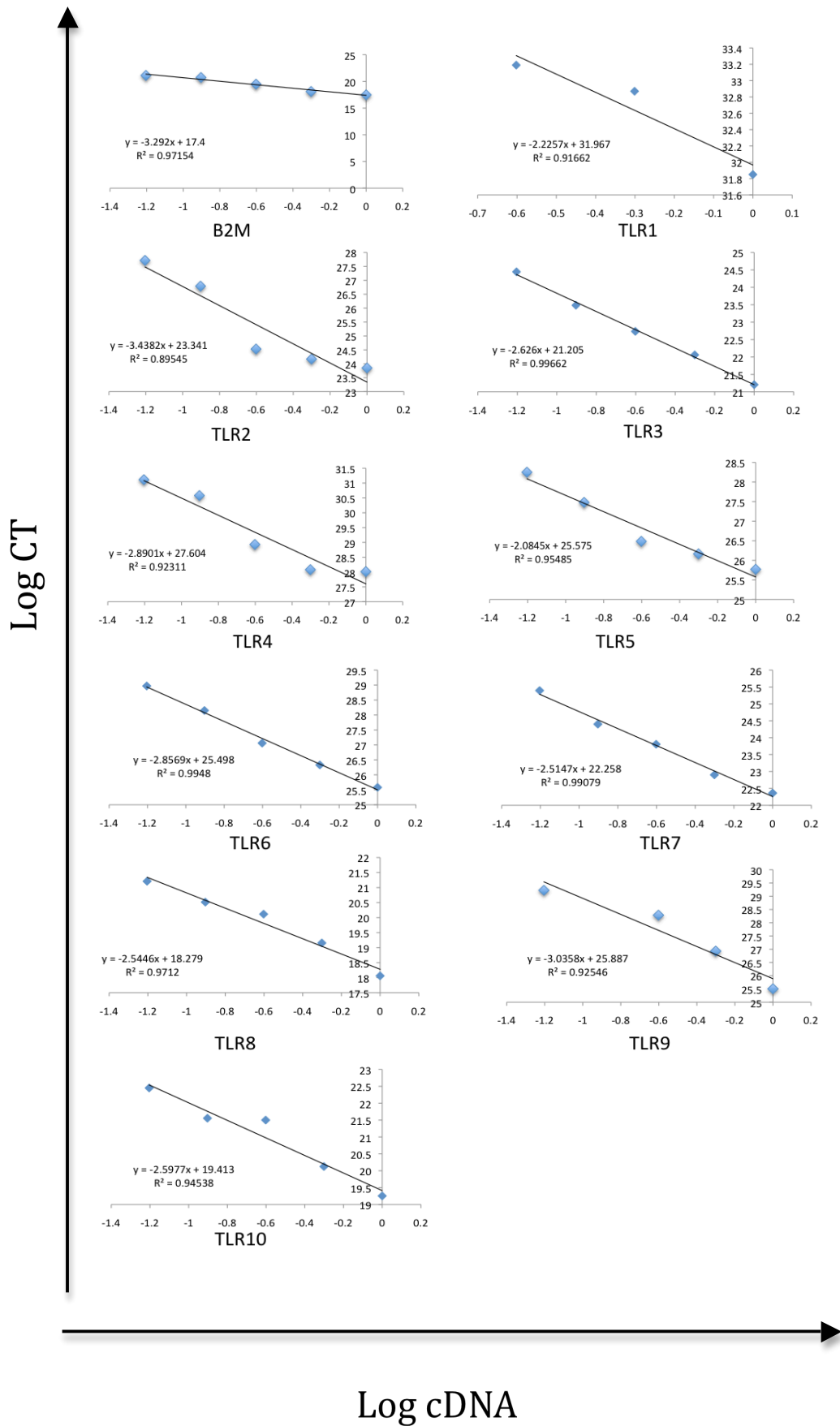


Figura 4. Curvas estándar.

Curvas estándar de cDNA de PBMCs para los TLRs 1 al 10 , así como para el gen normalizante β2M.

Una vez obtenidas las curvas de calibración se calculó la concentración a la cual se encuentran los TLRs en las diferentes subpoblaciones de linfocitos T. Esta concentración está expresada en unidades arbitrarias con respecto a la concentración del gen normalizador utilizado $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$).

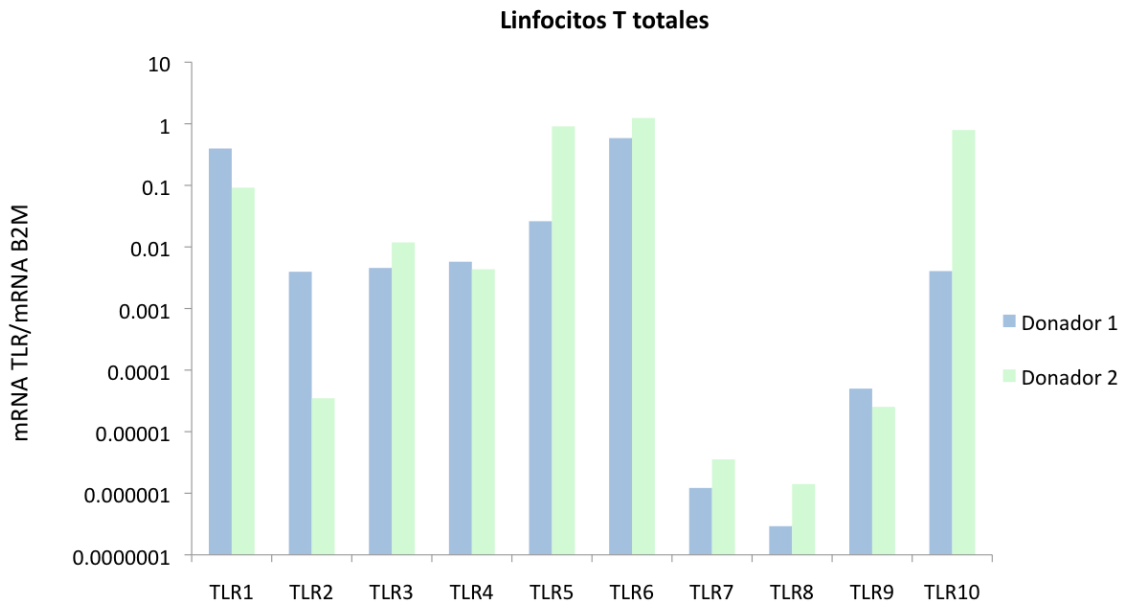


Figura 5. La expresión de los TLRs en linfocitos T totales es diferencial dependiendo del TLR.

Cuantificación de niveles de expresión de los TLRs 1 al 10 en linfocitos T totales humanos por PCR tiempo real para dos donadores. Valores expresados en unidades arbitrarias, en escala logarítmica, con respecto a la concentración del gen normalizador $\beta 2M$.

Como se puede observar en las figura 5, 6 y 7, la expresión de los TLRs es diferencial dependiendo de la subpoblación analizada. En el caso de los linfocitos T totales, los TLRs más expresados son el 1, 5, 6 y 10 seguido por el 2, 3 y 4, no siendo posible detectar los TLRs 7 y 8, mientras que en el caso del TLR9 su expresión fue muy baja. Para la subpoblación $CD4^+$, se observa la expresión de casi todos los TLRs con excepción del TLR8, en el caso del TLR 7, pudimos encontrarlo en uno de los donadores mas no en el otro, cabe destacar que en este caso se logró encontrar expresión del TLR9, el cual en el caso de los linfocitos T totales fue muy baja. En cuanto a las células diferenciadas hacia linaje Th1, se puede encontrar la mayor expresión de TLR1, pero el resto de los TLRs se encuentran en cantidades mucho menores a las de los linfocitos T $CD4^+$, con excepción de los TLRs 7 y 8 en donde nuevamente no se detectó expresión. Finalmente, en el caso de la subpoblación

CD8⁺ se encuentra más expresado el TLR1, seguido de los TLRs 2, 3, 4, 6, 9 y 10; nuevamente, el TLR 8, no pudo ser detectado, en caso del TLR7 se encontró en uno de los donadores pero no en el otro, y finalmente los niveles de TLR5 disminuyeron drásticamente, por lo que podría decirse que tampoco se encuentra presente.

Estos resultados concuerdan con datos de la literatura, como se muestra en la tabla 1, en el sentido de que los linfocitos T expresan diversos TLRs, en distintas proporciones en función de la subpoblación. La expresión diferencial de los TLRs en las subpoblaciones de linfocitos T puede ser tan marcada como para no poder determinar su presencia en alguna subpoblación y en otra si, como lo es el caso del TLR9, o también que a pesar de estar expresados en todas las subpoblaciones, las cantidades de TLRs varían entre cada una de ellas, como es el caso de los TLRs1, 2, 4,3, 5,6, 9 y 10.

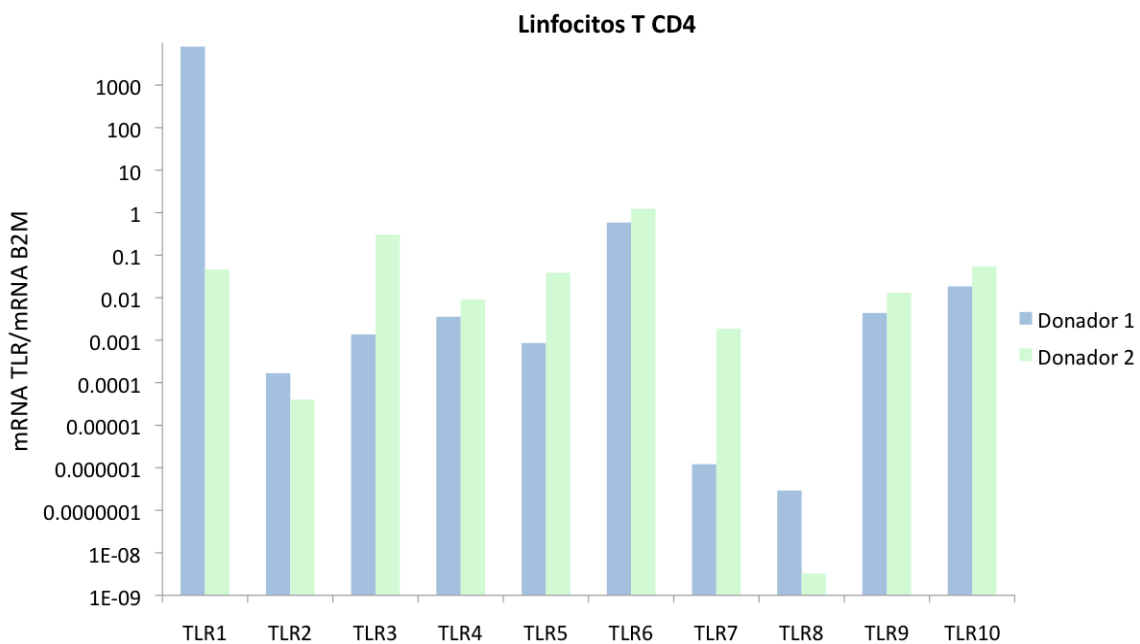


Figura 6. La expresión de los TLRs 5,6,9 y 10 en linfocitos T CD4 es menor que en linfocitos T totales.

Cuantificación de niveles de expresión de los TLRs en linfocitos T CD4 humanos por PCR tiempo real para dos donadores. Valores expresados en unidades arbitrarias, en escala logarítmica, con respecto a la concentración del gen normalizador β 2M.

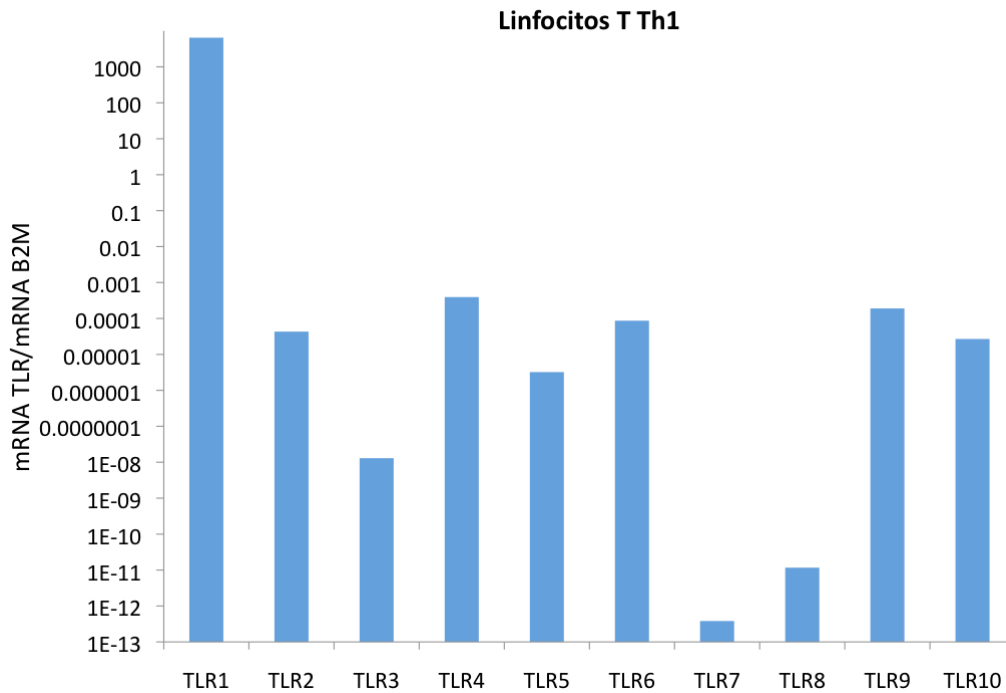


Figura 7. Expresión de los TLRs en linfocitos T Th1.

Niveles de expresión de los TLRs en linfocitos T Th1 por PCR tiempo real para un donador. Valores expresados en unidades arbitrarias, en escala logarítmica, con respecto a la concentración del gen normalizador $\beta 2M$.

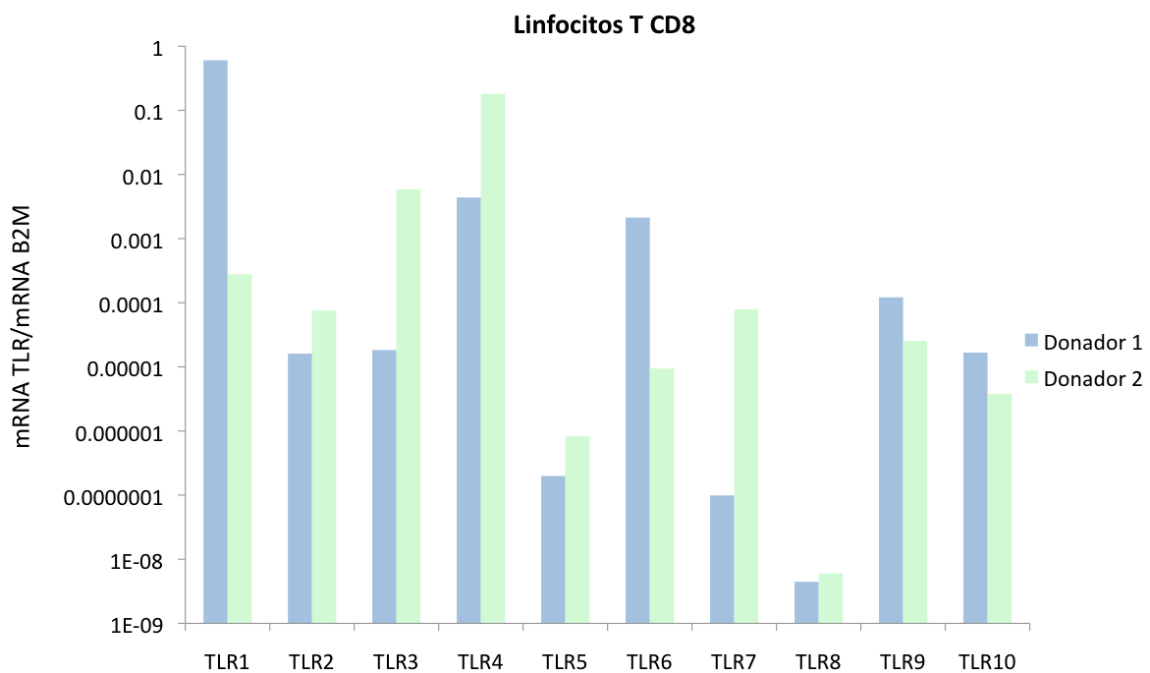


Figura 8. La expresión de los TLRs en linfocitos T CD8 es similar a la encontrada en linfocitos T totales.

Cuantificación de niveles de expresión de los TLRs 1 al 10 en linfocitos T CD8 humanos por PCR tiempo real para dos donadores. Valores expresados en unidades arbitrarias, en escala logarítmica, con respecto a la concentración del gen normalizador $\beta 2M$.

Objetivo 2: Determinar si la interacción de los TLRs con sus ligandos modula la expresión de CD43 de manera diferencial en distintas subpoblaciones de linfocitos T

2.2 Los niveles de expresión de CD43 disminuyen por el estímulo de linfocitos T con ligandos de TLRs

Nuestros resultados de PCR en punto final indicaron que cuando se analiza una población de linfocitos T totales, todos los TLRs están presentes en mayor o menor grado. En cambio, los resultados del PCR en tiempo real, con subpoblaciones de linfocitos T (CD4 y CD8) y linfocitos Th1 sugieren que los niveles de expresión de los distintos TLRs varía entre las distintas subpoblaciones. Se decidió abordar el segundo objetivo de este trabajo evaluando si la interacción del TLR4 con su ligando LPS es capaz de modular la expresión de CD43 en la superficie de linfocitos T. Se escogió este TLR ya que se encuentra en cantidades suficientes en cada una de las subpoblaciones, además de que es uno de los más estudiados y que a diferencia del TLR 1 (el cuál es el más abundante en todas las subpoblaciones), forma únicamente homodímeros, mientras que el TLR1 necesita unirse al TLR6 para poder activarse, con lo que en este caso el resultado de su activación es el conjunto de la activación de dos TLRs diferentes.

En un primer tiempo, se realizaron experimentos con linfocitos T totales de sangre periférica, que se incubaron en presencia de diferentes dosis de LPS por periodos de una o seis horas, después de lo cual se midió la cantidad de CD43 en la superficie celular por citometría de flujo, con el anticuerpo monoclonal L10. Los resultados mostrados en la Fig. 9A indican que si bien después de una hora en presencia de LPS parece haber una pequeña disminución en los niveles de CD43 a la dosis de 500 ng/ml de LPS, esto se observa de una manera mas clara a las 6 horas y 1 ug/ml de LPS. En la Fig. 9B se puede apreciar que aunque hay una gran variabilidad en la magnitud del efecto observado entre distintos donadores, este fenómeno es reproducible.

Para determinar si el efecto del LPS sobre la expresión de CD43 era semejante entre diferentes subpoblaciones de linfocitos T humanos, se purificaron linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, de los cuales, los primeros se diferenciaron además a la subpoblación Th1.

Tanto en linfocitos CD4+ como en linfocitos T CD8+, se observa que después de 6 horas en presencia de LPS, la expresión de CD43 en la superficie celular disminuye. En linfocitos T CD4+ (Fig. 10) la concentración óptima de LPS parece ser 100 ng/mL, mientras que en linfocitos CD8+ (fig. 11) es de 1 ug/mL .

Por último, se diferenciaron linfocitos T CD4+ hacia el linaje Th1(Figura 8). Estos linfocitos se estimularon, durante una hora con diferentes concentraciones de LPS para determinar si el cambio en la expresión de los TLRs en los linfocitos T, el cual depende de su estado de activación, modificaba el efecto del LPS sobre los linfocitos T CD4+. Como en las demás subpoblaciones, se observaron disminuciones ligeras en los niveles de CD43, de una manera general menores a las que se detectaron en linfocitos T CD4+. Este cambio sólo es significativo en ciertos estímulos y no se observa en las mismas concentraciones a diferentes tiempos (figura 12). Este resultado puede sugerir que el efecto del LPS sobre CD43 no sólo tiene que ver con el tipo de estímulo que se da, sino también con el estado de activación de las células y muy posiblemente con el número de moléculas de TLR4 presentes en la superficie de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T.

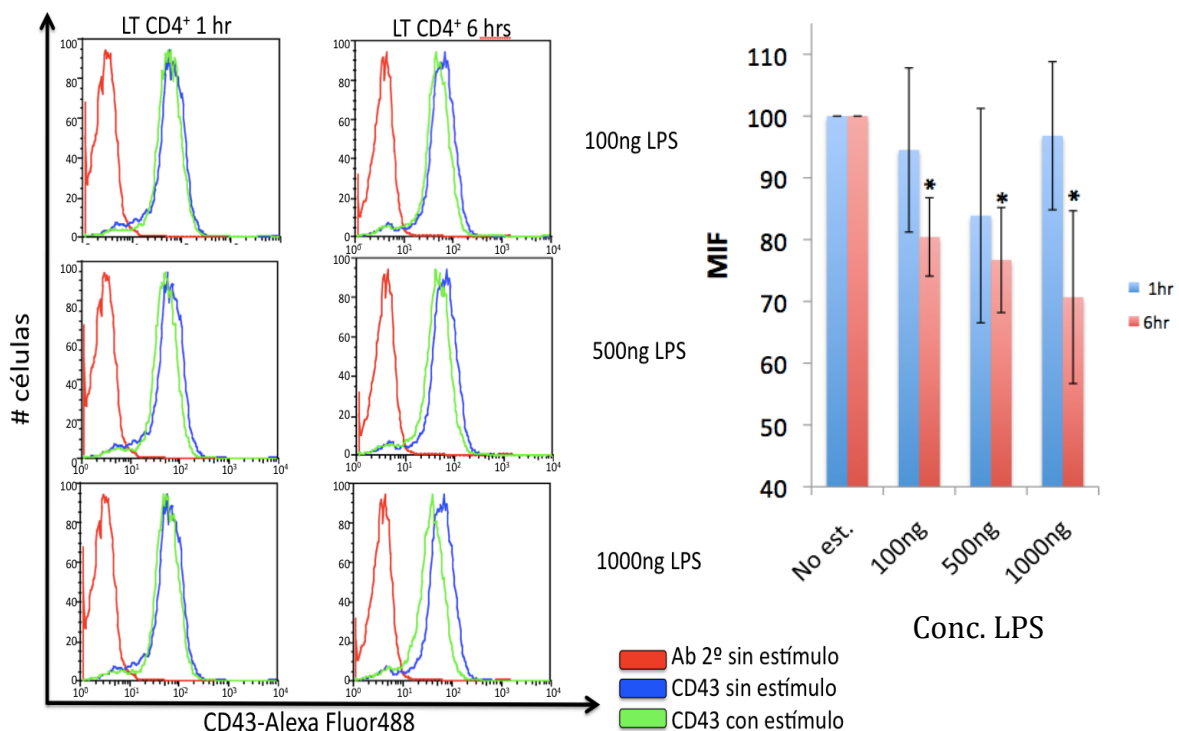


Figura 9. Los niveles de CD43 disminuyen en linfocitos T totales estimulados con LPS. Linfocitos T totales estimulados con 100, 500 1000 ng de LPS/mL durante 1 ó 6 horas. A) Histogramas de la expresión de CD43. B) Gráfica de los niveles de fluorescencia media (MIF) a 1 y 6 horas. n=3, *p<0.05.

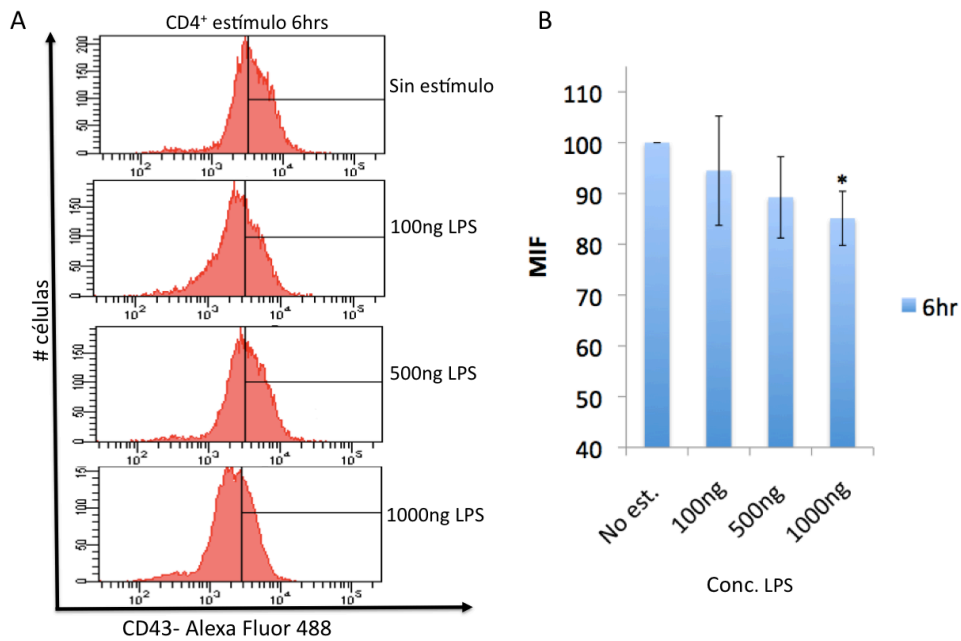


Figura 10. Los niveles de CD43 disminuyen en linfocitos T CD4+ estimulados con LPS. Linfocitos T CD4+ estimulados con 100, 500 y 1000ng de LPS durante 6 horas. A) Histogramas de la expresión de CD43 en las que se puede ver la disminución de CD43. B) Gráfica del porcentaje de fluorescencia media (MIF) vs. Concentración de LPS a las 6 horas. n=3, *p<0.05.

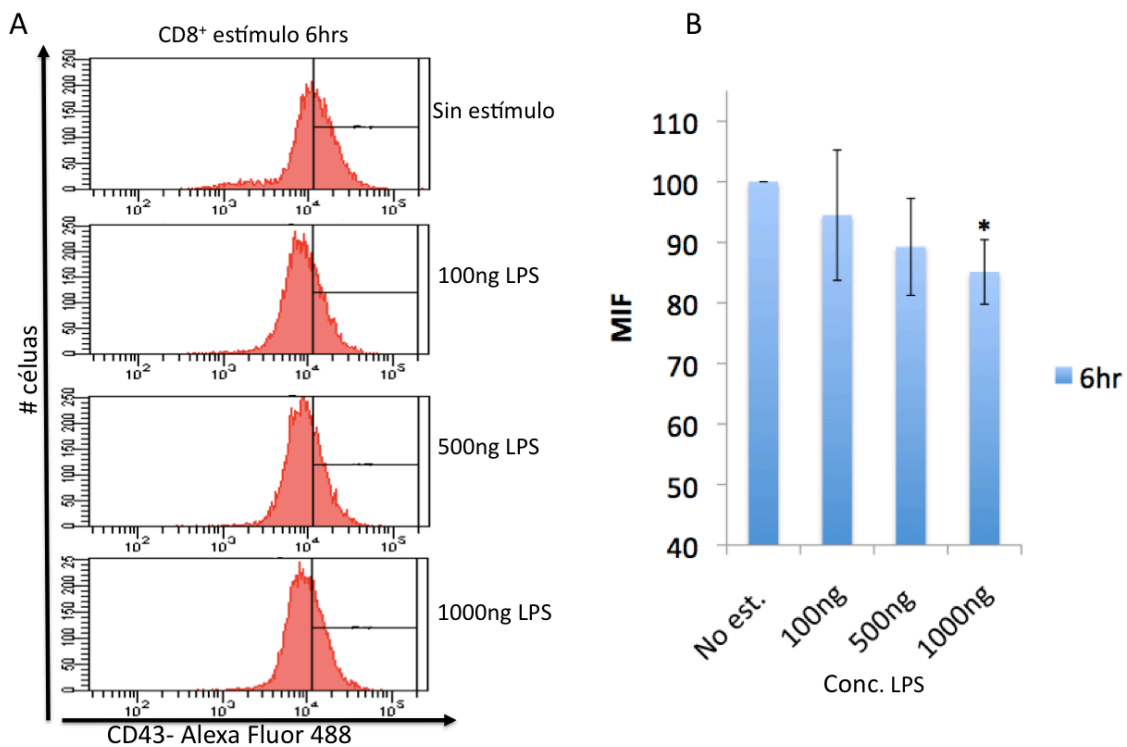


Figura 11. Los niveles de CD43 disminuyen en linfocitos T CD8+ estimulados con LPS. Linfocitos T CD8+ estimulados con 100, 500 y 1000ng de LPS durante 6 horas. A) Histogramas de la expresión de CD43 en las que se puede ver la disminución de CD43. B) Gráfica del porcentaje de fluorescencia media (MIF) vs. concentración de LPS a las 6 horas. n=3, r *p<0.05.

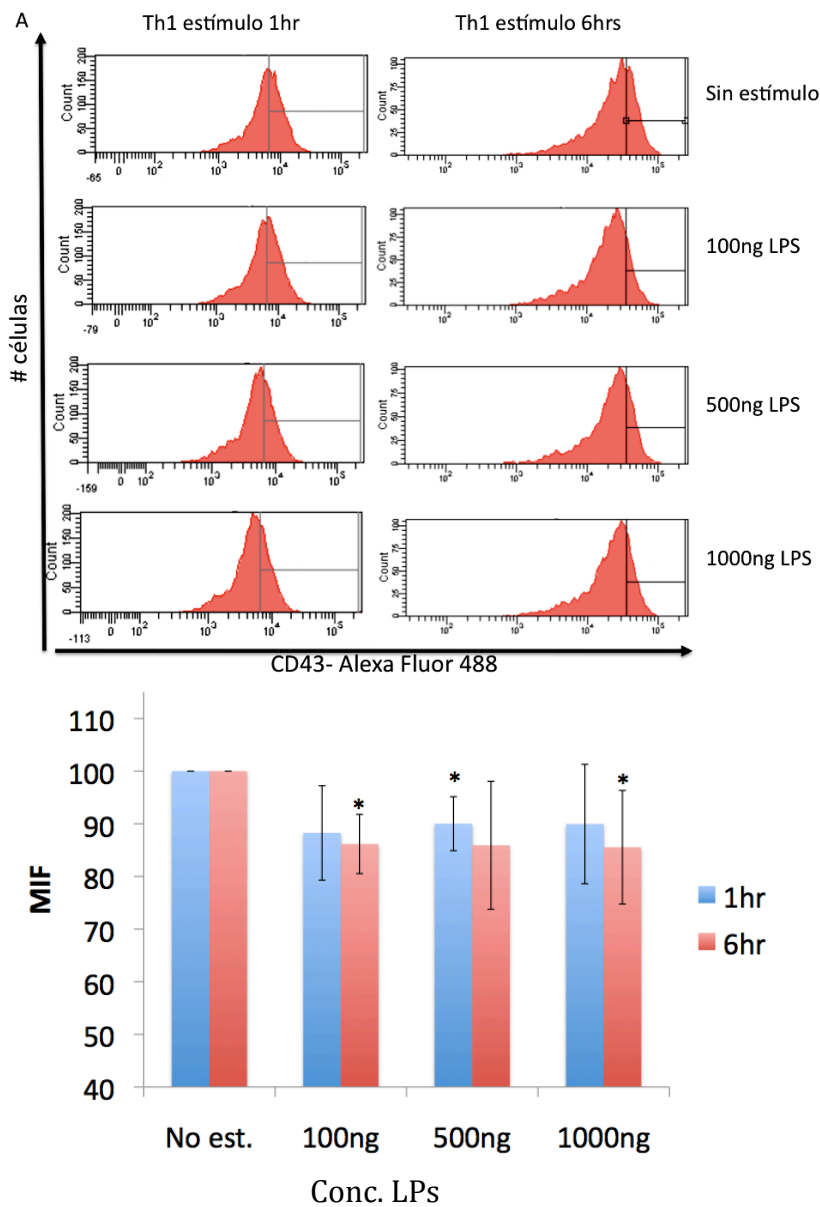


Figura 12. Los niveles de CD43 disminuyen en linfocitos Th1 estimulados con LPS.

Linfocitos T CD4⁺ diferenciados a linaje Th1 estimulados con 100, 500 y 1000ng de LPS durante 1 y 6 horas. A) Histogramas de la expresión de CD43. B) Gráfica del porcentaje de fluorescencia media (MIF) a 1 y 6 horas. n=3, *p0.05

Discusión

Hasta hace algunos años, la diferencia entre la respuesta inmune innata y la adaptativa parecía clara. Sin embargo, conforme se ha ampliado nuestro conocimiento acerca de la organización del sistema inmune, se ha vuelto evidente que definir las fronteras entre ambas ramas del sistema inmunológico no es tan simple. Un ejemplo muy claro sobre esto, es la expresión y funcionalidad de los TLRs en los linfocitos T. Los TLRs constituyen un grupo de 13 proteínas que en un principio se pensaba se expresaban únicamente en células del sistema inmune innato (Akira et al., 2001; Barton et al., 2002). Sin embargo, la identificación de estos receptores en células del sistema inmune adaptativo (Hornung et al., 2002) y el hecho de ser un grupo de proteínas altamente conservado entre mamíferos e inclusive otros organismos como insectos y plantas (Wlasiuk et al., 2010) trajeron la interrogante sobre si podrían estar cumpliendo las mismas funciones de reconocimiento de MAMPS/PAMPS, o bien si podían también haber adquirido nuevas funciones en otras células.

Los linfocitos T en particular, expresan también TLRs (Iwasaki et al., 2004). Sin embargo, a pesar de que se han hecho importantes avances en esta área, uno de los grandes retos consiste en la caracterización de la expresión de estos receptores en las diferentes subpoblaciones de linfocitos T. Lo anterior, debido a que la técnica más utilizada para medir la expresión de estas moléculas es la de RT-PCR en tiempo real, lo cual conlleva al problema de que en el caso de existir una mínima contaminación de la muestra con algún otro tipo celular que exprese TLRs, entonces los transcritos de las células contaminantes también serán amplificados dando lugar a falsos positivos.

En función de lo anterior, el primer objetivo del presente proyecto fue la caracterización de la expresión de los distintos TLRs en poblaciones de linfocitos T altamente purificados. Las subpoblaciones celulares que se caracterizaron fueron linfocitos T totales, CD4⁺, CD8⁺ y Th1; no se pudo trabajar con linfocitos Th2 debido a que no se lograron diferenciar eficientemente y por lo tanto no fueron adecuados

para este y los siguientes experimentos realizados. Pensamos que el hecho de que partamos de linfocitos T totales de donadores adultos que comprenden mayoritariamente linfocitos de memoria y relativamente pocos linfocitos T vírgenes puede ser una causa por la cual no logramos diferenciar adecuadamente las células hacia un perfil Th2. En futuros experimentos encaminados a identificar los diversos TLRs expresados por linfocitos T CD4⁺ Th2, será necesario partir de una población compuesta mayoritariamente de linfocitos T vírgenes, como por ejemplo linfocitos T recolectados de cordón umbilical de neonatos.

Las unidades utilizadas para la cuantificación de los datos obtenidos, se obtuvieron al hacer la comparación con el gen normalizador β 2M. Para facilitar el análisis y la comparación de nuestros resultados con los de la literatura generamos una nueva tabla en la que incluimos ahora nuestros datos (Tabla 3). Se observa que en general las tendencias sobre la expresión de los TLRs en una u otra subpoblación se conserva, con excepción del TLR 8 que no fue posible detectar. Otro aspecto a destacar es que se logró determinar el patrón de expresión de TLRs en linfocitos Th1, el cual hasta el momento no se conocía para los TLRs 7, 8 y 10 y que para el resto había sido detectado por Northern Blot en células de humano o por PCR Cuantitativo, en células de ratón.

Para hacer un análisis más adecuado de los resultados obtenidos, se debe tener en consideración que los datos reportados en la Tabla 1 (sección de introducción), fueron recolectados de numerosas fuentes bibliográficas, que como ya lo hemos mencionado, obtuvieron la información por metodologías tan diversos como PCR punto final hasta Northern Blot. Otro aspecto importante es que en la determinación de los TLRs de linfocitos T CD4⁺ no siempre se utilizaban células purificadas de sangre periférica humana, sino que eran obtenidas de otras fuentes tales como ganglios o cordón umbilical humanos. Todo lo anterior hace extremadamente complicado poder hacer una comparación de la expresión de TLRs en diferentes subpoblaciones de linfocitos T. Por lo tanto, la ventaja del método que utilizamos en este proyecto, fue que todas las células utilizadas son de humano y la determinación de las cantidades de TLRs se hizo con un mismo método, PCR tiempo real por lo que los resultados son comparables entre ellos.

Un aspecto importante a destacar, fue la variabilidad en términos cuantitativos mas no cualitativos que se observó entre las distintas muestras de la misma subpoblación. Este fenómeno ha sido reportado anteriormente (Crellin et al., 2005) y puede deberse a que el nivel de expresión de los TLRs en linfocitos T puede variar ampliamente dependiendo de los antígenos con los que se haya encontrado el donador (historia personal de exposición a agentes patógenos), así como el estado de activación de los linfocitos, y finalmente de la genética del individuo (Caron et al., 2005; Mansson et al., 2006). De esta forma podemos decir que los TLRs 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 10 son los que se expresan más consistentemente en las cuatro subpoblaciones analizadas, en el caso del TLR7 no se detectó su expresión en linfocitos T totales ni en células Th1, pero si en uno de los donadores de los linfocitos T CD4⁺ y CD8, mientras que la cuantificación del TLR 8 es tan baja, que podría decirse que no pudo ser detectado por este método o al menos no hay un producción de mRNA.

Como se puede observar, el TLR que se encuentra mayormente expresado en los linfocitos T y cualquiera de sus subpoblaciones es el TLR1, aunque también es uno de los que tiene mayor variabilidad entre donadores, mientras que el resto de los TLRs se encuentra considerablemente menos expresado y en ocasiones no pudieron ser detectados, como lo es el caso de los TLRs 7, 8 y 9; siendo que se detectaron transcritos de estos mismos TLRs cuando se probaron los oligos con PBMCs totales.

Una vez determinado el patrón de expresión de los TLRs en las diferentes poblaciones de linfocitos T, se procedió a determinar si estos TLRs tenían algún efecto sobre las molécula CD43. Esto por dos razones principales, la primera es que se ha observado que la unión de los TLRs con sus ligandos puede modificar la expresión de otras moléculas en las células en las que se expresan (Bouchon et al., 2000; Simone et al. , 2009), adicionalmente, se ha planteado que los TLRs podrían cumplir una función como moléculas coestimuladoras para los linfocitos T durante la activación de éstos (Komai-Koma et al., 2004). La segunda razón fue que en nuestro laboratorio se había observado con anterioridad que la expresión de los niveles de CD43 se ven disminuidos cuando se estimulan células Jurkat y linfocitos T totales con Zymosan (preparación de pared celular de levadura) (Quevedo, 2010),

sin embargo, debido a que el Zymosan también puede ser reconocido por otros receptores como Dectina-1 (Olynych et al., 2006), cabía la duda de si dicho efecto se debía únicamente al reconocimiento de su ligando por parte del heterodímero TLR1/6 o si estaba la influencia de otros receptores.

Tabla 3. Comparación de la expresión de TLRs 1-10 en Linfocitos T totales, CD4+, CD8+ y Th1.

	Totales		CD4+		CD8+		Th1	
	Literatura	Exp.	Literatura	Exp.	Literatura	Exp.	Literatura	Exp.
TLR1	++1	+++±	++±3,4	+++±	++4,7	+++±	+8,10	+++±
TLR2	+1	+±	+±3,4,5	+	+±4,7	±	+±8,10	±
TLR3	+1	++	+±3,4	+±	+++±4,7,9	+±	+10	+
TLR4	±1,2	++	+3,4,6	+±	+4,7	++	+8	+
TLR5	++1	+++±	+3,4,6	+±	+++±4,7	±	+8	±
TLR6	+1	+++±	SE ^{3,4}	++	+±4,7	++	+10	+
TLR7	+1	SE	+3,4	±	+4,7	+	ND	SE
TLR8	+1	SE	SE ^{3,4}	SE	±4,7	SE	ND	SE
TLR9	++1	±	+±3,4	+±	++4,7	++	+10	±
TLR10	±1,2	++	+±3,4	+±	+±4,7	+±	ND	±

Referencia	Método de determinación
1. Hornung V et al. J Immunol. 2002 May 1;168(9):4531-7.	PCR Punto final (células de humano)
2. Dolganiuc A et al. World J Gastroenterol. 2006 Feb 28;12(8):1198-204.	PCR Punto final (células de humano)
3. Caron G et al. J Immunol. 2005 Aug 1;175(3):1551-7.	PCR Punto final(células de humano)
4. Mansson A et al. Respir Res. 2006 Feb 27;7:36.	PCR Cuantitativo (células de tonsila humana)
5. Komai-Koma et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Mar 2;101(9):3029-34.	PCR Cuantitativo (células de cordón umbilical)
6. Crellin NK et al. J Immunol. 2005 Dec 15;175(12):8051-9.	PCR Cuantitativo
7. Zarembek KA and Godowski PJ. J Immunol. 2002 Jan 15;168(2):554-61.	PCR Cuantitativo (comparado contra expresión en monocitos)
8. Muzio M et al. J Immunol. 2000 Jun1;164(11):5998-6004.	Northern blot (células de humano)
9. Tabiasco J et al. J Immunol. 2006 Dec 15;177(12):8708-13.	PCR Punto final (células de humano)
10. Reynolds JM et al. Immunity. 2010 May 28;32(5):692-702.	PCR Cuantitativo (células de ratón)

SE: sin expresión; ND: no disponible

Tabla 3. Comparación de la expresión de TLRs 1-10 en Linfocitos T totales, CD4+, CD8+ y Th1. Tabla comparativa de los datos encontrados en la literatura contra la cuantificación realizada por PCR tiempo real, en células purificadas a partir de PBMCs de humano.

CD43 es una molécula de superficie muy abundante en linfocitos T, y que ocupa aproximadamente la tercera parte de la superficie celular, se le ha asociado con una gran variedad de ligandos y por lo tanto, con múltiples funciones. Como mencionamos en la sección de antecedentes, datos de la literatura y resultados de

nuestro laboratorio indican que los niveles de expresión de CD43 en la superficie de linfocitos T expuestos a ligandos de TLRs tales como Zymozan (TLR2/6) o LPS (TLR4) disminuyen. De tal modo, que habiendo mostrado que las distintas subpoblaciones de linfocitos T humanos expresan prácticamente todos los TLRs, nos avocamos a realizar un estudio mas sistemático de este fenómeno, tomando como prototipo de los TLRs al TLR4 y evaluando la expresión de CD43 en distintas subpoblaciones de linfocitos T humanos expuestos por una o seis horas a distintas dosis de LPS.

Determinar las condiciones exactas bajo las cuales CD43 cumple cada una de sus funciones se ha convertido en una tarea difícil de descifrar a pesar de que se conoce con exactitud la vía de señalización que sigue CD43 después del reconocimiento de sus ligandos. Las variantes que sufre esta vía dependiendo del ligando que reconoce CD43 son la clave para poder explicar la amplia gama de funciones que desempeña esta molécula.

En linfocitos T totales, se observa que después de una hora en presencia de LPS, se comienzan a observar tendencias a la disminución de los niveles de CD43; sin embargo, las diferencias en los niveles de CD43 son estadísticamente significativas hasta las 6 horas, en donde la disminución es evidente y constante (Figura 6). Existe cierta dependencia a la dosis de LPS, aunque la disminución de CD43 se aprecia desde las dosis más bajas (100ng/ml). El resultado obtenido con los linfocitos T totales es congruente con lo observado en los estímulos hechos con zymosan (Quevedo, 2010). Sin embargo, en el caso de estos estímulos la respuesta obtenida se da a tiempos más cortos (desde la media hora), y las disminuciones son más marcadas, aunque como ya se mencionó anteriormente, Zymosan no es reconocido únicamente por los TLRs 1/6 y es posible que parte del efecto se deba también al reconocimiento por Dectina-1, lo cual de hecho es interesante y extiende la observación a otros receptores de MAMPs.

Una vez comprobado que el efecto se observa en linfocitos T totales, se determinó si esta disminución en los niveles de CD43 es el resultado en conjunto de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ o si cada una por separado se comporta de manera diferente. Para esto, los linfocitos T CD4⁺ y se incubaron por 6 horas con

las concentraciones de LPS utilizadas anteriormente. Aunque la única dosis a la que se observó una disminución significativa en los niveles de CD43 fue con la dosis más baja (100ng/ml), en las demás dosis empleadas también se observó el mismo fenómeno. Esta inconsistencia tendrá que ser revisada en un futuro. En linfocitos T CD8⁺ observamos la misma tendencia a la baja en respuesta a LPS, la única dosis en la que la disminución es significativa, es con la dosis más alta (1000ng/ml), y dicha disminución es casi equivalente a la observada en los linfocitos T totales a la misma concentración y tiempo. El hecho de que las dosis a las cuales se ve la disminución de los niveles de CD43 sean tan variadas, nos hacen pensar que no existe una clara dependencia entre el efecto observado y la dosis de LPS utilizada y que más bien otros factores dependientes de cada linaje estimulado y de los receptores disponibles en la superficie de la membrana celular, son los que determinan el grado en el que se da la disminución de los niveles de CD43.

Otro escenario es el hecho de que el LPS es capaz de atravesar la membrana, y es probable que por esto en todos estos experimentos se observe una tendencia hacia la disminución de los niveles de CD43 después de 1 hora del estímulo, pero es hasta las 6 horas, cuando el LPS ha tenido tiempo suficiente de entrar al citoplasma, que se observa una disminución más marcada. O bien, la señal enviada por los pocos receptores expresados en la membrana de los linfocitos T naïve es suficiente para favorecer la translocación del resto de los receptores a la membrana. Sin embargo, con los datos que se tienen en este momento, no es posible saber cual de los dos escenarios es el que sucede. Para esto, se tendrán que hacer experimentos que permitan diferenciar, ya sea por citometría de flujo o microscopía, donde es que se encuentra el TLR4 antes y después del estímulo. Obtener esta información tiene relevancia ya que el TLR4 es el único de los TLRs que es capaz de señalizar tanto por la vía dependiente de MyD-88, como por la dependiente de TRIF y se ha sugerido que la vía que sigue este receptor depende de su localización celular (Kagan et al., 2008).

Para ahondar un poco más sobre el efecto del LPS en los linfocitos T CD4⁺, se diferenciaron estos linfocitos hacia el linaje Th1. Existe evidencia de que la señalización a través de los TLRs en células dendríticas, favorece la diferenciación

(o la inhibe), de los linfocitos T hacia el linaje Th1 o Th2 dependiendo del TLR que se active, pero poco se sabe sobre la influencia que tienen estos receptores sobre los linfocitos ya diferenciados (S. Agrawal et al., 2003; Re & Strominger, 2010; Redecke et al., 2004). A pesar de que aparentemente en estas células hay una concentración menor de TLR4, al ser células activadas, es posible que se necesite de un menor estímulo para que los linfocitos T se activen, por lo que decidimos evaluar los efectos del LPS a 1 y 6 horas con las concentraciones ya mencionadas. Efectivamente, encontramos que en los linfocitos Th1 se puede observar una disminución en los niveles de CD43 desde 1 hora de estímulo; esta disminución es significativa únicamente en la concentración de 500ng/ml. A las 6 horas, el efecto ya no se observa en esta concentración pero si en las otras dos, 1000ng/ml y 100ng/ml (la más alta y más baja respectivamente). Otro punto a destacar es que el porcentaje de disminución en estos estímulos, no es tan marcado como en las células no diferenciadas, aunque si lo es lo suficiente como para ser significativo y constante.

Hace falta identificar el mecanismo por el cual se logra disminuir los niveles de CD43 en rangos de tiempo que van desde 1 hora hasta las 6 horas. En neutrófilos estimulados con PMA, se da una disminución de CD43 gracias a un corte proteolítico de la parte extracelular de la molécula generado por γ - secretasa (Mambole et al., 2007), sin embargo este mismo mecanismo, u otro, no han sido descritos en linfocitos T. Actualmente en el laboratorio se busca identificar el mecanismo por el cual se da la disminución de CD43. Hasta el momento parece ser que se trata de un corte proteolítico, pero el mecanismo por el cual se da este corte aún falta por ser identificado. Sin embargo, otros escenarios como la inhibición de la transcripción de la molécula o que ésta sea endocitada, no se descartan.

En conjunto, estos resultados generan una serie de interrogantes que dan lugar a hipótesis que deben ser investigadas para lograr comprender las consecuencias funcionales de la relación existente entre la señalización de los TLRs y CD43.

Conclusiones y Perspectivas

Las funciones que cumplen los TLRs en los linfocitos T son aún poco entendidas y hasta la fecha su estudio se ha visto mermado por la necesidad de trabajar con poblaciones con alto grado de pureza. Esto debido a que la presencia de los TLRs en otras células del sistema inmune puede influir en la determinación de la expresión de TLRs en linfocitos T, además de que es sabido que el estímulo de los TLRs en células del sistema inmune innato puede influir indirectamente en algunas funciones de los linfocitos T como lo es su activación y diferenciación (Srivastava et al, 2011; Fang et al., 2011; Forward et al., 2010; Caramalho et al., 2003).

En el presente proyecto se logró cuantificar la presencia de los TLRs del 1 al 10 en linfocitos T humanos y las subpoblaciones CD4 y CD8, así como en los linfocitos T CD4 diferenciados a linaje Th1. A diferencia de lo reportado en la literatura, se utilizó una única técnica para esta determinación (PCR cuantitativo), lo cual permitió hacer comparaciones entre subpoblaciones. En particular los linfocitos Th1, de los cuales el momento no se encontraba reportado en la literatura para todos los TLRs.

A continuación, se hicieron estímulos para determinar si la señalización del TLR4 era capaz de modular la expresión de CD43 en la membrana de los linfocitos T. Se encontró que al hacerse estímulos con LPS, los niveles de CD43 disminuyen significativamente tanto en linfocitos T totales como en las subpoblaciones CD4, CD8 y Th1. Si bien no se puede decir que se observe una dependencia con respecto a la dosis de LPS utilizada, si se puede observar la una correlación entre los estímulos con LPS y la disminución en los niveles de CD43. Aún estamos lejos de identificar cómo es que la vía de señalización del TLR4 logra esta disminución en los niveles de CD43, así como las funciones fisiológicas de la disminución de CD43.

Es por esto que se necesitan hacer una serie de preguntas que nos ayuden a contestar las interrogantes faltantes. En primer lugar se debe determinar si otros TLRs solos o en combinación logran el mismo efecto. También es importante determinar el mecanismo por el cual se da la disminución de los niveles de CD43, ya sea por una serie de cortes proteolíticos de la molécula, inhibición de la

transcripción de CD43 o inclusive que sea endocitados. Finalmente, se necesita diferenciar células hacia el linaje Th2 y probar otras subpoblaciones celulares tales como células de memoria y T reguladoras, estas últimas son en las que se han visto efectos mas claros en cuanto a la influencia de los TLRs.

Bibliografía

- Aguilar-Delfin I, Fierro N.A., Rosenstein Y. UCSD-Nature Molecule Pages. doi:10.1038/mp.a000565.01 <http://www.signaling-gateway.org/molecule/query?afcsid=A000565>
- Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., & Dyke, T. V. Cutting Edge: Different Toll-Like Receptor Agonists Instruct Dendritic Cells to Induce Distinct Th Responses via Differential Modulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Fos. *The Journal of Immunology* 2003.
- Alcaide P, King SL, Dimitroff CJ, Lim Y, Fuhlbrigge RC, Luscinskas FW. The 130-kDa glycoform of CD43 functions as an E-selectin ligand for activated Th1 cells in vitro and in delayed-type hypersensitivity reactions in vivo. *J. Invest. Dermatol* 2007; 127(8): 1964-1972.
- Alvarado M, Klassen C, Cerny J, Horejsí V, Schmidt RE. MEM-59 monoclonal antibody detects a CD43 epitope involved in lymphocyte activation. *Eur. J. Immunol* 1995; 25(4): 1051-1055.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol* 2001; 2(8): 675-680.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413(6857): 732-738.
- Andersson CX, Fernandez-Rodriguez J, Laos S, Sikut R, Sikut A, Baeckström D, Hansson GC. CD43 has a functional NLS, interacts with beta-catenin, and affects gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2004;316(1):12-17.
- Axelsson B, Youseffi-Etemad R, Hammarström S, Perlmann P. Induction of aggregation and enhancement of proliferation and IL-2 secretion in human T cells by antibodies to CD43. *J. Immunol* 1988;141(9):2912-2917.
- Andersson CX, Fernandez-Rodriguez J, Laos S, Baeckström D, Haass C, Hansson GC. Shedding and gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis of the mucin-type molecule CD43. *Biochem. J* 2005;387(Pt 2):377-384.
- Ardman B, Sikorski MA, Settles M, Staunton DE. Human immunodeficiency virus type 1-infected individuals make autoantibodies that bind to CD43 on normal thymic lymphocytes. *J. Exp. Med* 1990;172(4):1151-1158.
- Barclay AN, Brown MH. Heterogeneity of interactions mediated by membrane glycoproteins of lymphocytes. *Biochem. Soc. Trans* 1997;25(1):224-228.
- Barat C, Tremblay MJ. Engagement of CD43 enhances human immunodeficiency virus type 1 transcriptional activity and virus production that is induced upon TCR/CD3 stimulation. *J. Biol. Chem* 2002;277(32):28714-28724.
- Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem* 1994; 269(33):20807-20810.
- Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat. Rev. Immunol* 2009; 9(8):535-542.
- Bazil V, Strominger JL. CD43, the major sialoglycoprotein of human leukocytes, is proteolytically cleaved from the surface of stimulated lymphocytes and granulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1993; 90(9):3792-3796.
- Bazil V, Strominger JL. Metalloprotease and serine protease are involved in cleavage of CD43, CD44, and CD16 from stimulated human granulocytes. Induction of cleavage of L-selectin via CD16. *J. Immunol* 1994; 152(3):1314-1322.
- Berger SB, Sadighi Akha AA, Miller RA, Garcia GG. CD43-independent augmentation of mouse T-cell function by glycoprotein cleaving enzymes. *Immunology* 2006; 119(2):178-186.
- Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *Cell* 2000; 20(4):875-881.
- Cannon, J L, Mody, P D, Blaine, K M, Chen, E. J., Nelson, A. D., Sayles, L. J., Moore, T. V. CD43 interaction with ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins regulates T-cell trafficking and CD43 phosphorylation. *Mol. Biol. of the Cell* 2008; 76.
- Cyster J, Somoza C, Killeen N, Williams AF. Protein sequence and gene structure for mouse leukosialin (CD43), a T lymphocyte mucin without introns in the coding sequence. *Eur. J. Immunol* 1990.
- Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med* 2003;197(4):403-411.
- Caron G, Duluc D, Frémaux I, Jeannin P, David C, Gascan H, Delneste Y. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin

- and R-848 up-regulate proliferation and IFN- γ production by memory CD4⁺ T cells. *J. Immunol* 2005;175(3):1551-1557.
- del Rio R, Rincón M, Layseca-Espinosa E, Fierro NA, Rosenstein Y, Pedraza-Alva G. PKC θ is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2004;325(1):133-143.
- Dustin ML. T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunol. Rev* 2008 Feb;221:77-89.
- Fabbi M, Geginat J, Tiso M, Ramarli D, Parent D, Bargellesi A, Remold-O'Donnell E. 8B4/20, a private CD43 epitope on developing human thymocytes, is involved in thymocyte maturation. *J. Immunol* 1999;163(11):5964-5970.
- Ferrante, A. and Thong, Y. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method. *J. Immunol. Methods* 1980; 36:109.
- Fierro NA, Pedraza-Alva G, Rosenstein Y. TCR-dependent cell response is modulated by the timing of CD43 engagement. *J. Immunol* 2006; 176(12):7346-7353.
- Forward NA, Furlong SJ, Yang Y, Lin T, Hoskin DW. Signaling through TLR7 enhances the immunosuppressive activity of murine CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J. Leukoc. Biol* 2010; 87(1):117-125.
- Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med* 2003; 197(9):1107-1117.
- Garcia GG, Miller RA. Age-related defects in CD4⁺ T cell activation reversed by glycoprotein endopeptidase. *Eur. J. Immunol* 2003; 33(12):3464-3472.
- Heng Z, Heiderscheidt C, Joo M, Gao X, Knezevic N, Mehta D, Sadikot R. MyD88-dependent and -independent activation of TREM-1 via specific TLR ligands. *European Journal of Immunology* 2009.
- Hernandez JD, Nguyen JT, He J, Wang W, Ardman B, Green JM, Fukuda M, Baum LG. Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death. *J. Immunol* 2006; 177(8):5328-5336.
- Hirano K, Miki Y, Hirai Y, Sato R, Itoh T, Hayashi A, Yamanaka M, Eda S, Beppu M. A multifunctional shuttling protein nucleolin is a macrophage receptor for apoptotic cells. *J. Biol. Chem* 2005; 280(47):39284-39293.
- Isolation of Whole Mononuclear Cells from Peripheral Blood and Cord Blood : Current Protocols in Immunology : Wiley InterScience [Internet]. [s.d.];[cited 2010 Jun 24] Available from:<http://mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780471142737/cp/cpim/article/im0701/current/html>
- Israël A. The IKK Complex, a Central Regulator of NF- κ B Activation [Internet]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2010; 2(3).
- Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol* 2004; 5(10):987-995.
- Jackson L, Cady CT, Cambier JC. TLR4-mediated signaling induces MMP9-dependent cleavage of B cell surface CD23. *J. Immunol* 2009; 183(4):2585-2592.
- Johnson GG, Mikulowska A, Butcher EC, McEvoy LM, Michie SA. Anti-CD43 monoclonal antibody L11 blocks migration of T cells to inflamed pancreatic islets and prevents development of diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol* 1999; 163(10):5678-5685.
- Kadaja-Saarepuu L, Laos S, Jäger K, Viil J, Balikova A, Lööke M, Hansson GC, Maimets T. CD43 promotes cell growth and helps to evade FAS-mediated apoptosis in non-hematopoietic cancer cells lacking the tumor suppressors p53 or ARF. *Oncogene* 2008; 27(12):1705-1715.
- Kabelitz D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol* 2007; 19(1):39-45.
- Kagan, J. C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., & Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- β . *Nature Immunology*, 9(4), 361-368.
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol* 2010; 11(5):373-384.
- Layseca-Espinosa E, Pérez-González LF, Torres-Montes A, Baranda L, de la Fuente H, Rosenstein Y, González-Amaro R. Expression of CD64 as a potential marker of neonatal sepsis. *Pediatr Allergy Immunol* 2002; 13(5):319-327.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86(6):973-983.
- Liu H, Komai-Koma M, Xu D, Liew FY. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2006; 103(18):7048-7053.
- Mambole A, Baruch D, Nusbaum P, Bigot S, Suzuki M, Lesavre P, Fukuda M, Halbwachs-Mecarelli L. The cleavage of neutrophil

- leukosialin (CD43) by cathepsin G releases its extracellular domain and triggers its intramembrane proteolysis by presenilin/gamma-secretase. *J. Biol. Chem* 2008; 283(35):23627-23635.
- Manjunath N, Johnson RS, Staunton DE, Pasqualini R, Ardman B. Targeted disruption of CD43 gene enhances T lymphocyte adhesion. *J. Immunol* 1993; 151(3):1528-1534.
- Mastellos D, Lambris JD. Complement: more than a 'guard' against invading pathogens? *Trends in Immunology* 2002; 23(10):485-491.
- McGuinness DH, Dehal PK, Pleass RJ. Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends Parasitol* 2003; 19(7):312-319.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388(6640):394-397.
- Mentzer SJ, Remold-O'Donnell E, Crimmins MA, Bierer BE, Rosen FS, Burakoff SJ. Sialophorin, a surface sialoglycoprotein defective in the Wiskott-Aldrich syndrome, is involved in human T lymphocyte proliferation. *J. Exp. Med* 1987; 165(5):1383-1392.
- Mody PD, Cannon JL, Bandukwala HS, Blaine KM, Schilling AB, Swier K, Sperling AI. Signaling through CD43 regulates CD4 T-cell trafficking. *Blood* 2007; 110(8):2974-2982.
- Kagan, J. C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., & Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- β . *Nature Immunology*, 9(4), 361-368.
- Nong YH, Remold-O'Donnell E, LeBien TW, Remold HG. A monoclonal antibody to sialophorin (CD43) induces homotypic adhesion and activation of human monocytes. *J. Exp. Med* 1989; 170(1):259-267.
- Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol* 2006; 6(3):173-182.
- Onami TM, Harrington LE, Williams MA, Galvan M, Larsen CP, Pearson TC, Manjunath N, Baum LG, Pearce BD, Ahmed R. Dynamic regulation of T cell immunity by CD43. *J. Immunol* 2002; 168(12):6022-6031.
- Ohashi K, Burkart V, Flohé S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol* 2000; 164(2):558-561.
- Olynych, T. J., Jakeman, D. L., & Marshall, J. S. Fungal zymosan induces leukotriene production by human mast cells through a dectin-1 - dependent mechanism. *Clinical Immunology* 2006.
- Palaga T, Buranaruk C, Rengpipat S, Fauq AH, Golde TE, Kaufmann SHE, Osborne BA. Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. *Eur. J. Immunol* 2008; 38(1):174-183.
- Park JK, Rosenstein YJ, Remold-O'Donnell E, Bierer BE, Rosen FS, Burakoff SJ. Enhancement of T-cell activation by the CD43 molecule whose expression is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Nature* 1991; 350(6320):706-709.
- Parkman R, Remold-O'Donnell E, Kenney DM, Perrine S, Rosen FS. Surface protein abnormalities in lymphocytes and platelets from patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 1981; 2(8260-61):1387-1389.
- Pedraza-Alva G, Koulis M, Charland C, Thornton T, Clements JL, Schlissel MS, Rincón M. Activation of p38 MAP kinase by DNA double-strand breaks in V(D)J recombination induces a G2/M cell cycle checkpoint. *EMBO J* 2006; 25(4):763-773.
- Pedraza-Alva G, Mérida LB, Burakoff SJ, Rosenstein Y. CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase. *J. Biol. Chem* 1996; 271(44):27564-27568.
- Pedraza-Alva G, Zingg JM, Jost JP. AP-1 binds to a putative cAMP response element of the MyoD1 promoter and negatively modulates MyoD1 expression in dividing myoblasts. *J. Biol. Chem* 1994; 269(9):6978-6985.
- Piller F, Piller V, Fox RI, Fukuda M. Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J. Biol. Chem* 1988 Oct;263(29):15146-15150.
- Re F, Strominger JL. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J. Immunol* 2004; 173(12):7548-7555.
- Redecke, V., Häcker, H., Datta, S. K., Pitha, P. M., Broide, D. H., Raz, E., Redecke, V., et al. (2011). Cutting Edge: Activation of Toll-Like Receptor 2 Induces a Th2 Immune Response and Promotes Experimental Asthma. *PRISM*.
- Remold-O'Donnell E, Davis AE, Kenney D, Bhaskar KR, Rosen FS. Purification and chemical composition of gpL115, the human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Biol. Chem* 1986; 261(16):7526-7530.
- Remold-O'Donnell E, Kenney DM, Parkman R, Cairns L, Savage B, Rosen FS. Characterization of a human lymphocyte surface

- sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Exp. Med* 1984 Jun;159(6):1705-1723.
- Remold-O'Donnell E, Parent D. Downregulation of neutrophil CD43 by opsonized zymosan. *Blood* 1995; 85(2):337-342.
- Rosenstein Y, Park JK, Hahn WC, Rosen FS, Bierer BE, Burakoff SJ. CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature* 1991;354(6350):233-235.
- Remold-O'Donnell E, Rosen FS. Proteolytic fragmentation of sialophorin (CD43). Localization of the activation-inducing site and examination of the role of sialic acid. *J. Immunol* 1990; 145(10):3372-3378.
- Reynolds JM, Pappu BP, Peng J, Martinez GJ, Zhang Y, Chung Y, Ma L, Yang XO, Nurieva RI, Tian Q, Dong C. Toll-like receptor 2 signaling in CD4(+) T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease. *Immunity* 2010; 32(5):692-702.
- Santana MA, Pedraza-Alva G, Olivares-Zavaleta N, Madrid-Marina V, Horejsi V, Burakoff SJ, Rosenstein Y. CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NFkappa B transcription factors in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem* 2000; 275(40):31460-31468.
- Shelley CS, Remold-O'Donnell E, Davis AE, Bruns GA, Rosen FS, Carroll MC, Whitehead AS. Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1989; 86(8):2819-2823.
- Seo W, Ziltener HJ. CD43 processing and nuclear translocation of CD43 cytoplasmic tail are required for cell homeostasis. *Blood* 2009 Oct;114(17):3567-3577.
- Serrador JM, Nieto M, Alonso-Lebrero JL, del Pozo MA, Calvo J, Furthmayr H, Schwartz-Albiez R, Lozano F, González-Amaro R, Sánchez-Mateos P, Sánchez-Madrid F. CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood* 1998; 91(12):4632-4644.
- Simone, R., Floriani, A., & Saverino, D. Stimulation of Human CD4 + T Lymphocytes via TLR3 , TLR5 and TLR7 / 8 Up-Regulates Expression of Costimulatory and Modulates Proliferation. *Microbiology* 2009; 1-8.
- Stöckl J, Majdic O, Kohl P, Pickl WF, Menzel JE, Knapp W. Leukosialin (CD43)-major histocompatibility class I molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation. *J. Exp. Med* 1996; 184(5):1769-1779.
- Sperling AI, Green JM, Mosley RL, Smith PL, DiPaolo RJ, Klein JR, Bluestone JA, Thompson CB. CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28. *J. Exp. Med* 1995; 182(1):139-146.
- Takeda K, Akira S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells* 2001; 6(9):733-742.
- van den Berg TK, Nath D, Ziltener HJ, Vestweber D, Fukuda M, van Die I, Crocker PR. Cutting edge: CD43 functions as a T cell counterreceptor for the macrophage adhesion receptor sialoadhesin (Siglec-1). *J. Immunol* 2001; 166(6):3637-3640.
- Yonemura S, Nagafuchi A, Sato N, Tsukita S. Concentration of an integral membrane protein, CD43 (leukosialin, sialophorin), in the cleavage furrow through the interaction of its cytoplasmic domain with actin-based cytoskeletons. *J. Cell Biol* 1993; 120(2):437-449.
- Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; 303(5663):1522-1526.
- Zhu Q, Egelston C, Gagnon S, Sui Y, Belyakov IM, Klinman DM, Berzofsky JA. Using 3 TLR ligands as a combination adjuvant induces qualitative changes in T cell responses needed for antiviral protection in mice. *J. Clin. Invest* 2010;120(2):607-616.