



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PURIFICACIÓN Y ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS
T CD4⁺ HUMANOS: CARACTERIZACIÓN
DE PUREZA, VIABILIDAD Y EXPRESIÓN
DE MARCADORES DE SUPERFICIE**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

P R E S E N T A:

ALEJANDRA VERÓNICA SILVA CASTRO



**DIRECTORA DE TESIS
DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Silva
Castro
Alejandra Verónica
63653497
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309325084

2. Datos del tutor

Dra.
Leonor
Huerta
Hernández

3. Datos del sinodal 1

M. en C.
Erasmus
Martínez
Cordero

4. Datos del sinodal 2

Biol.
Saúl
Cano
Colín

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Benito
Estrada
Mena

6. Datos del sinodal 4

M. en IBB.
Diana Elodia
Aguilar
León

7. Datos del trabajo escrito

Purificación y activación de linfocitos T CD4⁺ humanos
Caracterización de pureza, viabilidad y expresión de marcadores de superficie
74 p
2017

Agradecimientos

A la Dra. Leonor Huerta Hernández por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su tiempo y su paciencia, por el apoyo que me ha brindado y por su atención como mi tutora.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada a través del proyecto 238931

A la Dirección General de Asuntos del personal académico de la UNAM, proyecto PAPIIT IN211716.

Al Q.F.B. Carlos Castellanos por su capacitación en el uso del citómetro de flujo.

Al banco de sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y al Q. Alonso Ramírez, por los paquetes leucocitarios que me brindaron para el presente trabajo.

A mis hermanos Edith, Eduardo, Denis y Rodolfo, que sin su compañía, apoyo y afecto no hay motivación ni ejemplos para seguir.

A mis abuelos Jorge y Guillermina, por la crianza y educación que me brindaron y que sin ellos no sería la persona que hoy soy.

A mis tíos Norberto y Alejandra, que siempre se han preocupado y velado por mis hermanos y por mí y son un gran apoyo moral.

A mi madre Guadalupe, que sin los sacrificios tan grandes que ha hecho yo no estaría aquí.

A mi padre Rodolfo, que donde quiera que se encuentre siempre me ha dado la fuerza para seguir adelante.

A Joel y mi Jillian, que son hoy por hoy los pilares que me impulsan a seguir luchando por mis objetivos personales y profesionales.

A David, Mirna, Onasis, Memo e Isabel, que sin su compañía, enseñanzas y buenos momentos esto no sería igual.

A mis mejores amigos, Ulises, Melissa y Carlos, por haber estado conmigo a lo largo de la carrera apoyándonos mutuamente y hacerlo más ameno.

A la señora Gabriela, el señor Evaristo y sus familias, que sin el apoyo que me brindaron no hubiera logrado concluir mis estudios, así como a Erik por todo lo que vivimos y por ayudarme con algunas ilustraciones en el presente trabajo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
1. Activación de los linfocitos T CD4 ⁺	8
2. Activación <i>in vitro</i>	13
3. Marcadores de superficie que se estudiaron en este trabajo	15
3.1 CD3	16
3.2 CD4	18
3.3 CD25 (IL-2R α)	20
3.4 CD54 (ICAM-1)	21
3.5 CD184 (CXCR4)	22
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO	25
OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
METODOLOGÍA	26
1. Anticuerpos utilizados	26
2. Paquetes leucocitarios	27
3. Obtención de PBMCs por gradiente de Ficoll y su cultivo posterior.....	27
4. Obtención de Linfocitos T CD4 ⁺ (selección negativa)	28
5. Aumento de la pureza	30
6. Activación de los linfocitos con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas.....	31
7. Detección de los marcadores de superficie.....	32
9. Cambios morfológicos celulares.....	34
RESULTADOS.....	36

1. Rendimiento y pureza de los linfocitos T CD4 ⁺ purificados por selección negativa	36
2. Activación de linfocitos T CD4 ⁺ con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas	39
2.2 Efecto de la activación sobre la expresión de CD25 (IL-2R α) y CD54 (ICAM-1)	43
2.3 Efecto de la activación sobre la expresión de CD3, CD4 y CD184 (CXCR4)	45
DISCUSIÓN	52
PERSPECTIVAS.....	61
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63

ABREVIATURAS

Ac: Linfocitos T CD4⁺ activados

Anti-CD3: Anticuerpo monoclonal que se une a CD3 en la superficie de los linfocitos T

Anti-CD28: Anticuerpo monoclonal que se une a proteínas de la familia B7 proporcionando una señal auxiliar durante la activación del linfocito T

APC: Fluorocromo alofocianina

APCs: Células presentadoras de antígeno (por sus siglas en inglés)

B7: Familia de glucoproteínas de estructura similar (B7.1 o CD80, y B7.2 o CD86) que actúan como receptores presentes sobre la membrana de las células presentadoras de antígeno

BSA: Albúmina Sérica Bovina (por sus siglas en inglés)

c-Fos, c-Myc, c-Jun, NFAT y NF- κ B.

CD11a/CD18: Integrina β 2 (denominadas así porque su cadena beta es el CD18), cuya cadena α es el CD11a (o α L). Se expresa en todas las células hematopoyéticas y participa en su adhesión al endotelio por medio de su unión a las moléculas ICAM-1 e ICAM-2. Asimismo participa en las interacciones entre linfocitos T y B y monocitos. También se denomina LFA-1

CD11b/CD18: Integrina β 2, cuya cadena α es el CD11b (o α M). Se trata de una molécula de adhesión propia de monocitos y neutrófilos, capaz de interactuar con la molécula ICAM-1, induciendo de este modo la adhesión de dichos tipos

celulares al endotelio, con su consiguiente extravasación. También recibe el nombre de CR3, por su capacidad de unir iC3b

Citofluorometría: Tecnología biofísica basada en la utilización de luz láser sobre células que se emplea en su recuento y clasificación según sus características morfológicas, presencia de marcadores, y en la ingeniería de proteínas.

Dynabeads: Microperlas magnéticas acopladas a los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 utilizadas para la activación de linfocitos T

Fas (CD95): Proteína de superficie de 36 kDa con un dominio citoplasmático de muerte celular conservado

FasL: Proteína de membrana de 40 kDa, es el ligando de Fas.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (por sus siglas en inglés)

FSC-H: Dispersión frontal de un haz de luz al incidir sobre una partícula (tamaño)

ICAM-1: Molécula de Adhesión Intercelular-1 (CD54)

IFM: Índice de Fluorescencia Media

IL-2: Es una citocina que estimula la proliferación y diferenciación de células T y B

IL-2R α : Cadena α del receptor de IL-2

ITAM: Immuno-receptor Tyrosine Activation Motif

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

NA: Linfocitos T CD4⁺ no activados correspondiente al día 0

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica (por sus siglas en inglés)

PE: Ficoeritrina (por sus siglas en inglés)

PFA: Paraformaldehído

RPMI: Medio de cultivo celular

SFB_i: Suero Fetal Bovino inactivado

SSC-H: Dispersión lateral de un haz de luz al incidir sobre una partícula (granularidad)

TCR-CD3: Es un complejo de membrana requerido para la estable interacción de células T con células presentadoras de antígeno, así como de la comunicación intracelular mediada por TCR

Th1: Subpoblación de linfocitos T cooperadores que regulan la respuesta inmunitaria contra agentes patógenos intracelulares

Th2: Subpoblación de linfocitos T que regulan la respuesta inmunitaria contra agentes patógenos extracelulares

TNF: Tumor Necrosis Factor

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

Durante la activación de los linfocitos T mediante la presentación de antígeno, el linfocito T virgen sufre cambios en su ciclo celular, en la dinámica y composición de la membrana ya que cambia la expresión de los marcadores de superficie, y además en la producción de citocinas. Con el propósito de determinar la respuesta a la activación de linfocitos T CD4⁺ con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas, un estímulo que simula la presentación de antígenos, se determinaron algunas características como pureza, viabilidad, morfología celular y expresión de marcadores de superficie. Se dejó el estímulo por 3 y 6 días y, al término, se determinó la expresión de marcadores inducibles con la activación, como CD25 (IL-2R α) y CD54 (ICAM-1); así como la expresión de CD3, CD4 y CD184 (CXCR4), a través del uso de citofluorometría. La activación provocó la expresión muy alta de CD25 y CD54 al tercer día, mientras que para CD3 y CD184 provocó una disminución muy marcada de su expresión, la cual continuó hasta el sexto día. Por otra parte, CD4 disminuyó sólo al sexto día de activación. En la viabilidad celular, se encontró una marcada disminución (entre 25 a 55%) en todos los casos al tercer día, debida al efecto de muerte celular inducida por activación (AICD). Por lo tanto, en nuestras condiciones experimentales, la activación a través de éste modelo fue óptima después de 3 días de activación, a la vez que generó una disminución considerable en la proporción de células viables.

INTRODUCCIÓN

Los linfocitos son las células del sistema inmunitario encargadas de la respuesta inmune adaptativa porque son capaces de reconocer diversos determinantes antigénicos y de distinguirlos específicamente. Esta respuesta de reacción frente a una infección es lenta ya que se adapta (como lo indica su nombre) para reconocer, eliminar y memorizar al agente patógeno invasor. Existen distintas subpoblaciones de linfocitos, caracterizadas por las funciones que llevan a cabo y por sus características fenotípicas. Tal es el caso de los linfocitos T, que son los mediadores de la inmunidad celular y que migran de la médula ósea hacia el timo para madurar allí. A su vez, las subpoblaciones de linfocitos T se clasifican gracias a sus proteínas de membrana en linfocitos T cooperadores (CD4) y T citotóxicos (CD8). Se le denomina “cúmulo de diferenciación” (Cluster of Differentiation por sus siglas en inglés) a las proteínas que se encuentran en la superficie celular utilizadas como marcador de diferenciación linfocítica. Los linfocitos T maduros que nunca se han expuesto a un antígeno se llaman vírgenes, y los linfocitos T que han sido estimulados por un antígeno y que han sobrevivido, se diferencian en células de memoria que desencadenarán futuras respuestas inmunitarias más rápidas e intensas. Los linfocitos vírgenes y de memoria son denominados conjuntamente como células en reposo y morfológicamente son indistintos y pequeños (8-10 μm) con un gran núcleo y heterocromatina densa, un borde de citoplasma delgado y pocos organelos. Los linfocitos en reposo se encuentran en la fase G_0 del ciclo celular y una vez estimulados entran en la fase G_1 . En este momento son denominados linfocitos activados y morfológicamente son más grandes (10-12 μm), aumentan el tamaño

del citoplasma y de organelos, así como de RNA citoplasmático, por lo que son denominados como linfoblastos (Abbas, A., et al/2008).

En sangre periférica existen aproximadamente 2,000 linfocitos/mm³ para ser un total de 10¹¹ linfocitos circulantes. Durante la infección aguda, el recuento de linfocitos aumenta cuatro veces o más. La supervivencia de un linfocito activado depende de la unión de los receptores al antígeno, de los propios antígenos y de las citocinas tales como la IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-16 e IL-17 (Owen et al, 2014).

1. Activación de los linfocitos T CD4⁺

El inicio de las respuestas inmunitarias celulares precisa que los linfocitos T CD4⁺ vírgenes y los antígenos que van a reconocer estén en el mismo tejido linfático. Estos linfocitos se encuentran en los órganos linfáticos secundarios (ganglios linfáticos y tejido linfoide asociado a mucosas) y para ser activados deben reconocer a su antígeno a través de las células presentadoras de antígeno (APCs) que son un subgrupo de leucocitos caracterizados por expresar en su membrana el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). El MHC es un conjunto de glicoproteínas unidas a la membrana celular y son capaces de presentar antígenos cargados en surcos formando complejos estables con ligandos peptídicos. Estos complejos son desplegados sobre la superficie celular para ser reconocidos por las células T a través del receptor de célula T (TCR). Existen dos tipos principales de MHC: clase I y clase II. El MHC clase I se encuentran en todas las células nucleadas del cuerpo y presentan antígenos

originados a partir del citosol de las células. Éstos antígenos son presentados a células T CD8⁺ encargadas de reconocer y matar a las células que expresan los antígenos intracelulares. En cambio, el MHC clase II se encuentra casi exclusivamente sobre las APCs, como células dendríticas, y presentan antígenos provenientes de espacios extracelulares que han sido fagocitados o endocitados por estas células (Figura 1). El antígeno es procesado por la célula y, posteriormente el MHC clase II presenta el péptido antigénico a las células T CD4⁺ que quedan activadas y estimulan la inmunidad para destruir a los invasores extracelulares. Como resultado, se obtiene la expansión de linfocitos específicos para un antígeno y la posterior diferenciación de linfocitos efectores y de memoria (Goldsby, R., *et al* 2005; Abbas, A., *et al* 2008; Owen *et al*, 2014).

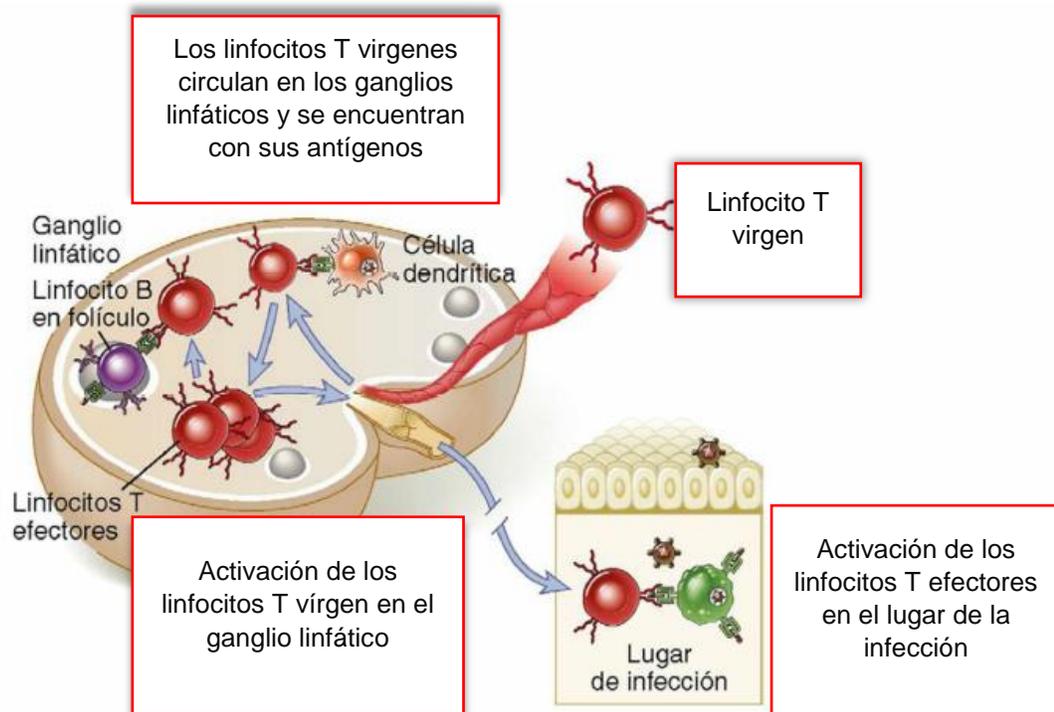


Figura 1. Esquema general y topológico de la activación de linfocitos T vírgenes y efectores por un antígeno. Los antígenos son transportados por la célula dendrítica a través de su internalización mediante fagocitosis o endocitosis, y después son procesados y presentados por el MHC clase II. La célula dendrítica llega a los ganglios linfáticos y comienza la presentación de

antígeno a los linfocitos T vírgenes que circulan en estos ganglios. La activación de estas células produce la diferenciación en células efectoras y de memoria que pueden quedarse en el ganglio o viajar a los tejidos infectados donde las células efectoras se activan de nuevo por el antígeno. (Imagen tomada y modificada de Abbas 2012).

Existe otra subpoblación de linfocitos CD4⁺ denominada T cooperadores (T_H) y son muy importantes porque guían la actividad de otras células inmunitarias y son esenciales para seleccionar la vía que tomará la respuesta inmunitaria. La activación de éstos linfocitos es a través de la interacción complejo TCR-CD3 con el MHC clase II en la célula dendrítica. Para lograr la completa activación se requiere de la participación del correceptor CD4 (señal 1) así como de una señal coestimuladora (señal 2), proveída por la APCs a través de la interacción de proteínas de la familia B7 (CD80, CD86) con CD28 en la célula T_H (Abbas, A., *et al* 1999; Owen *et al*, 2014). A este conjunto de moléculas esenciales en la sinapsis inmunológica se le conoce como complejo de activación supramolecular central (cSMAC, por sus siglas en inglés) (Owen, J., *et al* 2014).

Por otro lado, la afinidad del TCR hacia su péptido es muy baja, lo que sugiere que durante la presentación de antígeno, otras interacciones ligando-receptor pueden ser necesarias para aumentar la eficiencia de la activación como es el caso de la integrina LFA-1 en las células T y su ligando ICAM-1 (CD54) en la APCs (Dubey, C., *et al*, 1996) (Figura 2). Estas moléculas se encuentran en la periferia del cSMAC para estabilizar la señal 1, por lo que a este conjunto secundario se le conoce como complejo de activación supramolecular periférico (pSMAC, por sus siglas en inglés) (Owen, J., *et al* 2014).

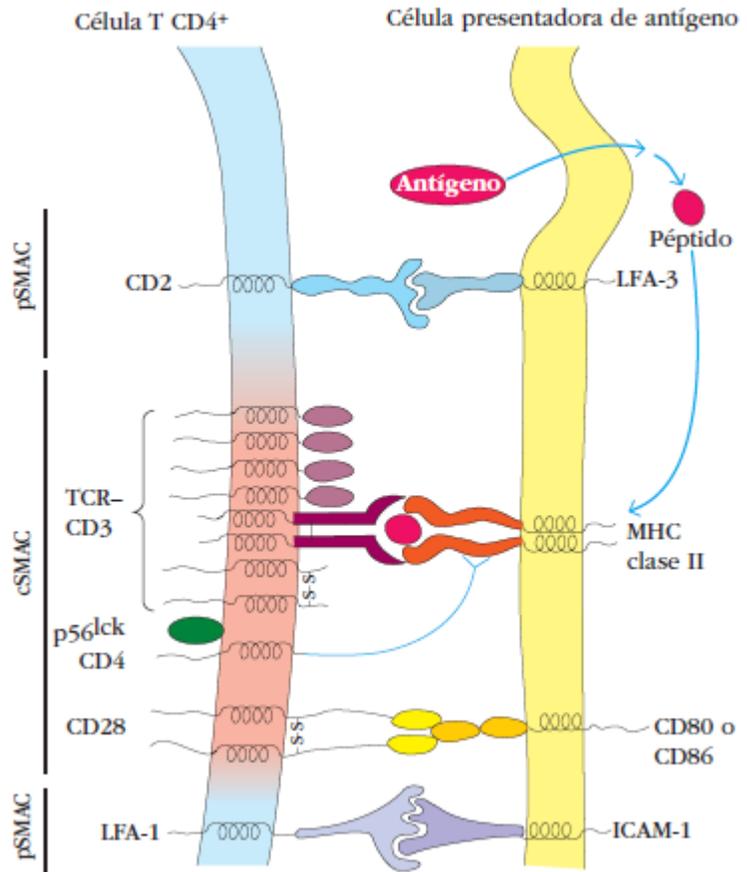


Figura 2. Sinapsis inmunológica entre célula T CD4⁺ y APCs. La activación es iniciada a través del complejo TCR-CD3 y el CD4 en el linfocito T_H con el MHC clase II en la APCs (señal 1) y se completa a través de la interacción de CD28 (T_H) con moléculas de la familia B7 (APCs) (señal 2) y las moléculas de adhesión (LFA-1 - ICAM-1). cSMAC (complejo de activación supramolecular central), pSMAC (complejo de activación supramolecular periférico) (Imagen tomada de Owen, J., et al/2014).

Diversas observaciones de investigadores han propuesto que el encuentro entre una célula T virgen y una dendrítica se da en tres etapas: 1) un periodo inicial de 1 a 2 horas cuando las células hacen contactos seriados breves (de 5 a 15 minutos) con las dendríticas, seguido de 2) un periodo de 2 a 14 horas de uniones más estables (>6 horas) de la célula T con la dendrítica que, a su vez, es seguido de 3) un periodo durante el cual las células se desunieron y volvieron unirse unas con otras, mostrando una conducta de “arremolinado” alrededor de las

dendríticas. Estas tres etapas precedieron a los primeros signos de proliferación, que empezaron 24 a 36 horas después del encuentro inicial con antígeno y continuaron hasta el cuarto y quinto día después de la introducción de antígeno (Owen, J., et al/2014).

La proliferación de los linfocitos T como resultado de la activación, depende de una combinación de señales provenientes del receptor para el antígeno, los coestimuladores y los factores de crecimiento, principalmente la IL-2. Los linfocitos T CD4⁺ producen IL-2 y responden preferentemente a ella de manera autócrina (secreción de una citocina por una célula que ella misma recibe en sus receptores), parácrina (secreción de una citocina que actúa sobre células cerca de la célula secretora) y endócrina (secreción de una citocina que actúa sobre otras células y tiene que viajar a través del torrente sanguíneo), asegurando así que los linfocitos T antígeno-específicos sean los que proliferen más. Este proceso es conocido como expansión clonal. Durante la activación también ocurre una cascada de señalización dentro del linfocito T provocando la transcripción de genes. Estos genes se clasifican en tres categorías:

- Los genes inmediatos, que se expresan en el transcurso de media hora tras el reconocimiento de antígeno, y constituyen varios factores de transcripción.
- Los genes tempranos, que se expresan en más de dos días después del reconocimiento de antígeno, y constituyen la IL-2, IL-2R, IL-3, IL-6, IFN- γ , entre otros.

- Los genes tardíos, que se expresan más de dos días después del reconocimiento de antígeno, y constituyen varias moléculas de adhesión.

Unas 48 horas después de la activación, el linfocito T virgen crece y se convierte en un blastocito que comienza a experimentar ciclos de división celular dos o tres veces por día durante cuatro a cinco días, creando así una extensa clona de células progenitoras, que se diferencian en subpoblaciones de células T de memoria o efectoras (Goldsby, R., et al 2005)

Una vez eliminados los antígenos, aproximadamente 90% de linfocitos T activados mueren por apoptosis, y el otro 10% sobreviven para diferenciarse en linfocitos T de memoria y efectores (Abbas, A., et al 2008; Owen et al, 2014). La muerte celular es un evento normal durante la activación inmunológica y se conoce como AICD (activation induced cell death). Es un mecanismo homeostático de gran importancia, ya que contribuye en la disminución del fondo común de células T activadas, una vez erradicado el antígeno y elimina células T autorreactivas solitarias, estimuladas por antígenos propios. Este fenómeno es inducido por la activación celular a través del receptor de células T (TCR) e involucra los receptores de muerte en la membrana, incluyendo a Fas (CD95) y Fas ligando (FasL) (Owen, J. et al 2014).

2. Activación *in vitro*

Los linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica en estado de reposo (fase G₀ del ciclo celular) producen bajos niveles de citocinas, por lo que su estimulación *in vitro* se usa para facilitar la expansión y principalmente el estudio de su función

celular. Existen moléculas mitogénicas como lectinas y anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 que promueven la proliferación policlonal, mientras que el antígeno específico produce una expansión monoclonal u oligoclonal (Munck Petersen C., et al 1992; Trickett A., et al 2003).

Si la estimulación es producida con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas, esto da como resultado una activación más parecida a la fisiológica (figura 3). De esta manera, las células T pueden expandirse eficientemente usando los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 inmovilizados (Levine B., et al 1996).

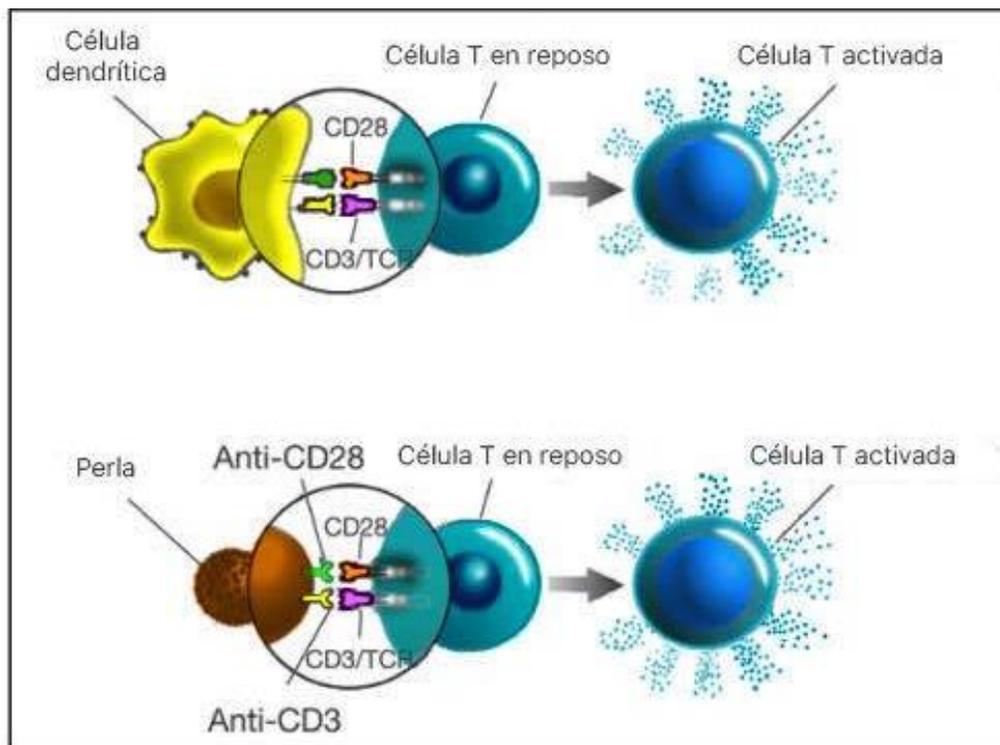


Figura 3. Diagrama de activación in vitro de los linfocitos T con perlas magnéticas acopladas a anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Se hace la comparación entre la activación *in vivo* (parte superior) y la activación *in vitro* (parte inferior). (Imagen tomada y modificada del inserto de Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 con permiso de Thermofisher).

La activación *in vitro* es un procedimiento muy usado para diversos estudios, como la expresión de marcadores de superficie (fenotipo), estudios de funciones de las células como migración, producción de citocinas, efectos citotóxicos y replicación de virus como el VIH y tiene varias ventajas; entre ellas destaca la activación de las células T sin necesidad de APCs, las células activadas se mantienen *in vivo*, existe una máxima reproducibilidad sin contaminación por anticuerpos solubles y la expansión de células activadas es de 100 a 1000 veces. En cuanto a aplicaciones posteriores, las células T activadas pueden ser analizadas ya sea para transfecciones de DNA, transducción de señales extracelulares, intracelulares o intercelulares o para el estudio de señalización del TCR, proteómica, expresión génica, etc. Además, las células T pueden dejarse en cultivo para que puedan diferenciarse en subpoblaciones de linfocitos T cooperadores o expandirlos policlonalmente o mediante especificidad de antígeno (Langsdorf, C., et al; Aarvak, T., et al).

3. Marcadores de superficie que se estudiaron en este trabajo

Como se sabe, los linfocitos en reposo expresan distintos receptores en la superficie de sus membranas, lo que permite clasificarlos ya sea dentro de una subpoblación u otra, dependiendo del repertorio expresado. Sin embargo, se sabe que la activación produce un cambio en la expresión génica que regula el cambio en el fenotipo de una célula, como en el caso de la expresión de la cadena α del receptor de IL-2 (Owen, J., et al, 2014). En la siguiente tabla se describen brevemente, los marcadores de superficie que fueron analizados antes y después

de la activación *in vitro* de los linfocitos T CD4⁺ con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas:

Marcador celular	Función
CD3	Asociado con el TCR es requerido en la superficie celular para la transducción de señales
CD4	Es el correceptor para las moléculas del MHC clase II y es el receptor principal de la gp120 del VIH-1 y VIH-2
CD25	Es la cadena α del receptor de IL-2
CD54	Es una molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) que se une a la integrina CD11a/CD18 (LFA-1) y a la integrina CD11b/CD18 (Mac-1), receptor de rinovirus
CD184	También llamado CXCR4, actúa como cofactor para la fusión y entrada del VIH-1 a la línea celular T. Es receptor de la quimiocina CXCL12 que retiene y activa linfocitos T

Tabla 3. Marcadores analizados y su función general. (Información adquirida de Janeway's Immunology 2012)

3.1 CD3

Este receptor es un complejo hexamérico formado por las moléculas CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ , y la cadena ζ con un dominio extracelular corto (figura 3.1). Está asociado al TCR en células T y es el encargado de iniciar la transmisión intracelular de las señales que se producen por el reconocimiento del ligando por

el receptor (Owen, J., et al, 2014). Tiene un par de dominios citoplasmáticos largos con múltiples copias de sitios de activación del inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM, por sus siglas en inglés). La fosforilación de residuos de ITAM-tirosina permite el acoplamiento de moléculas adaptadoras, que dan lugar a las cascadas de señalización para la activación celular (Murphy, 2012).

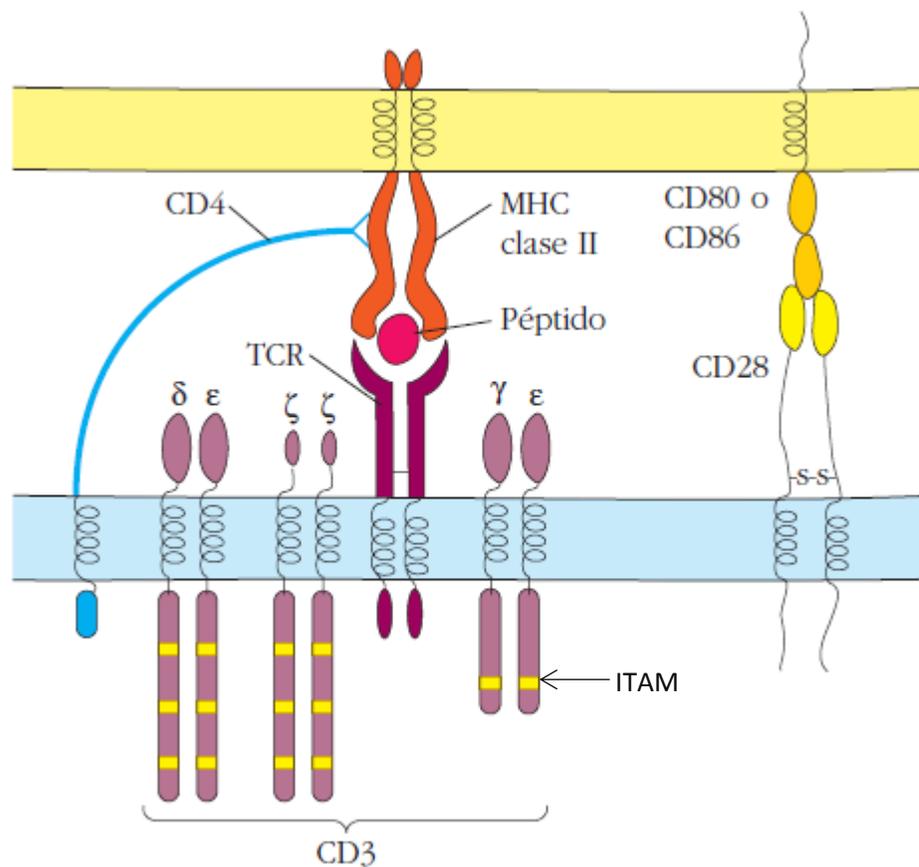


Figura 3.1. Cadenas γ , δ , ϵ y ζ del CD3 asociadas al TCR. En la imagen se muestran los dímeros $\delta\epsilon$, $\gamma\epsilon$ y $\zeta\zeta$ (dominios extracelulares cortos), las barras en amarillo que componen los dominios citoplasmáticos de los dímeros son ITAM (motivos de activación de inmunorreceptor basados en tirosina). En el esquema están señalados el TCR, el CD4 y la interacción de éstos con el MHC clase II en la APCs. También se muestran el receptor CD28 en la célula T y su ligando CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2) en la APCs. Se señalan también los puentes disulfuro. (Imagen tomada y modificada de Owen, J., et al/2014).

3.2 CD4

Es una glicoproteína monomérica de membrana de 55 kDa que contiene cuatro dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (D1 a D4), un dominio transmembranal hidrofóbico, y un dominio citoplasmático largo que contiene tres residuos de serina que pueden ser fosforilados (figura 3.2) (Owen, J., et al, 2014). Sus dominios extracelulares se unen a regiones conservadas de moléculas del MHC clase II. Esta interacción aumenta la avidéz de la unión de la célula T a su blanco. También ayuda al acercamiento de los dominios citoplasmáticos del TCR/CD3 y su correceptor respectivo, para así iniciar la cascada de señalización de activación de la célula.

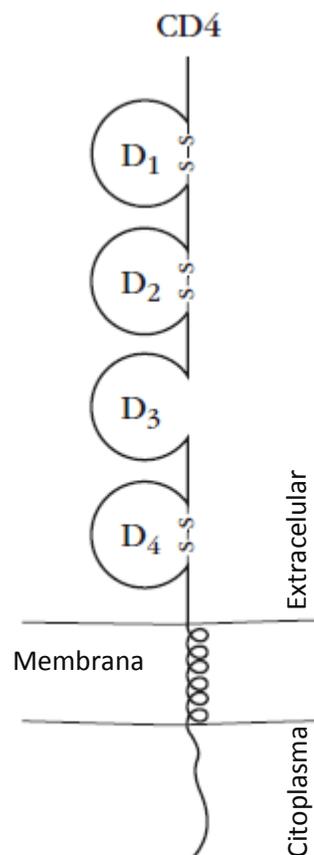


Figura 3.2. Receptor CD4. Se ilustran los cuatro dominios (D1-D4) extracelulares de tipo inmunoglobulina, así como los puentes disulfuro. (Imagen tomada y modificada de Owen, J., et al 2014).

Por otra parte, es el principal receptor para que se una el VIH (Levy, J., 2007) ya que algunos estudios indican que la región D1 del CD4 interactúa con la glicoproteína gp120 viral (DeRossi et al, 1991). Esta unión provoca cambios conformacionales tanto en CD4 como en gp120 teniendo como consecuencia la exposición del receptor de quimiocina CXCR4 (CD184) que funciona como correceptor para la unión del virus en linfocitos T CD4⁺ (Myszka, D., et al 2000). A su vez, se expone el dominio de fusión de la proteína viral gp41, que actúa como un arpón (Moore, J., et al 1990) acercando ambas membranas y provocando la fusión de la bicapa lipídica viral con la bicapa celular y de esta manera pueda introducirse al citosol de la célula la cápside viral quedando infectada la célula (Chan, D., et al 1998) (figura 3.2.1).

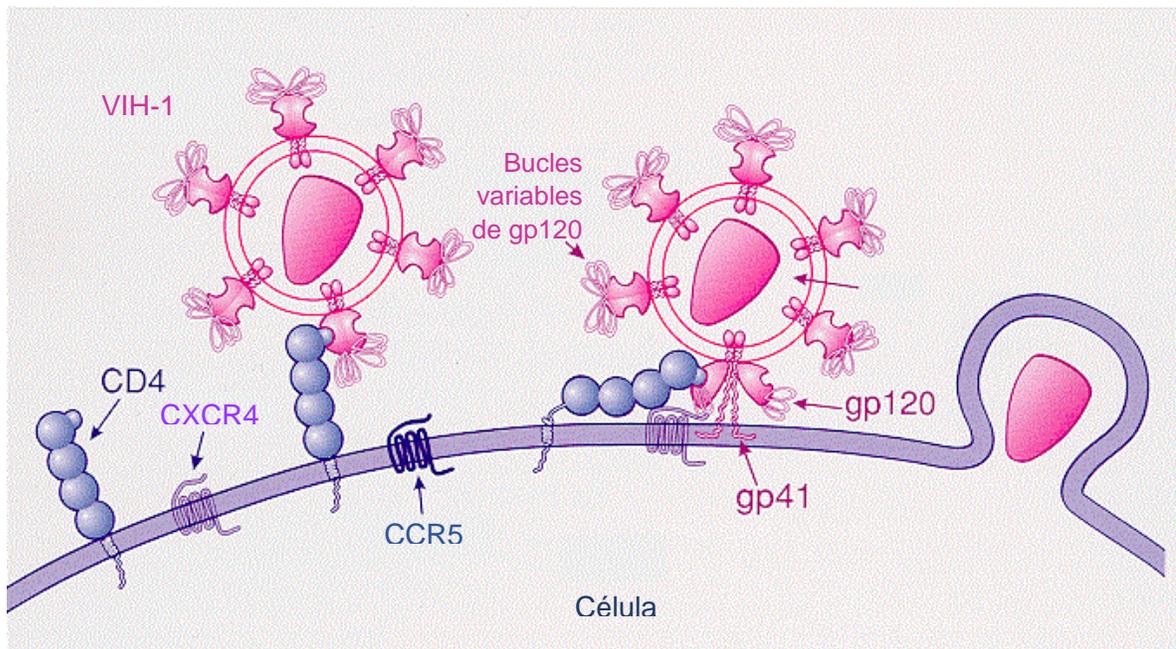


Figura 3.2.1. Entrada del VIH a la célula. (Fuente: US National Institutes of Health-National Institute of Allergy and Infectious Diseases).

3.3 CD25 (IL-2R α)

Es el receptor de superficie de la IL-2. La cadena α es monomérica y tiene baja afinidad, es decir, puede unirse a la IL-2, pero es incapaz de transducir una señal desde ella. Al estar presente, contribuye a contactos adicionales con el ligando de IL-2 (Owen et al, 2014). Por otra parte, el IL-2R $\beta\gamma$ dimérico es de afinidad intermedia, es decir, puede transducir una señal y el IL-2R $\alpha\beta\gamma$ trimérico es de alta afinidad, del cual depende casi toda la señalización fisiológica (figura 3.3).

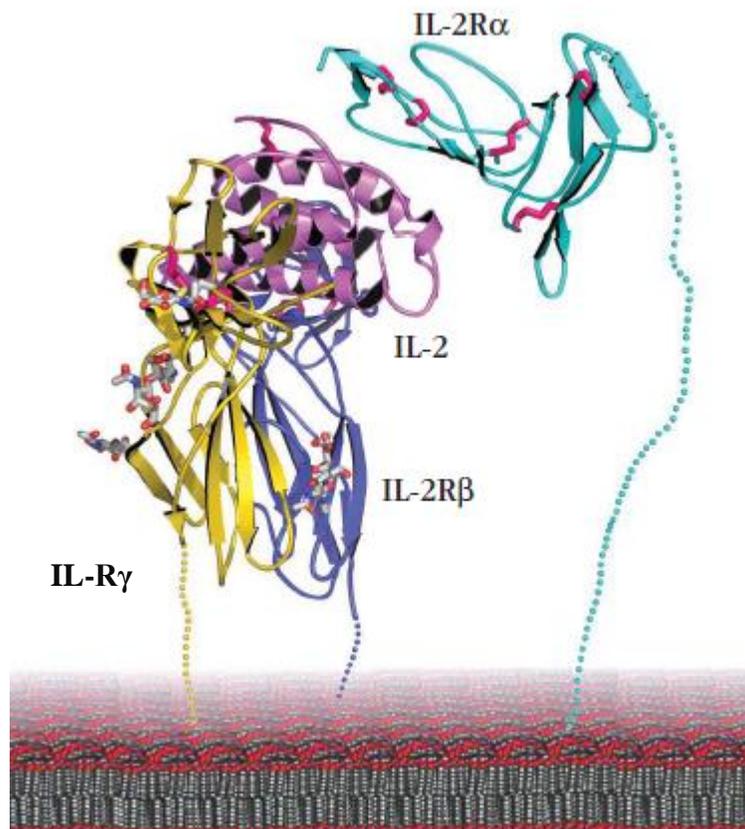


Figura 3.3. Comparación de las tres formas del receptor de IL-2. Estructura tridimensional de la forma de tres cadenas del receptor de IL-2, con IL-2 unida. (Imagen tomada de Wang, X. et al 2005).

3.4 CD54 (ICAM-1)

Es una molécula de adhesión que pesa 75 a 115 kDa. Se compone de un dominio citoplasmático, uno transmembranal y cinco dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina (figura 3.4). Funciona como ligando para CD11a/CD18 o CD11b/CD18, así como también es un receptor para rinovirus y para eritrocitos infectados con parásitos del paludismo. Promueve el desarrollo, la adhesión celular y la activación de células T por presentación de antígeno (Owen et al, 2014). Ayuda a sostener las señales generadas porque permite las interacciones celulares a largo plazo. Como se encuentra alrededor del cSMAC, forma parte del complejo de activación supramolecular periférico. En células T en reposo, se expresa en un nivel bajo y tiene avidez por LFA-1 (molécula asociada a función leucocitaria) (Buckle, A., et al 1990).

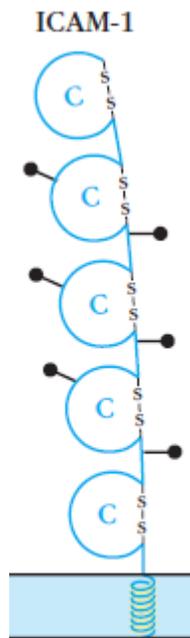


Figura 3.4. Estructura de ICAM-1. Las asas azules representan los dominios tipo inmunoglobulina y la letra C quiere decir que son regiones constantes. (Imagen de Owen, J., et al 2014).

3.5 CD184 (CXCR4)

También llamada CXCR4, es una glicoproteína de ~40 kDa que funciona como receptor de quimiocina CXCL12, promueve la apoptosis durante la mielopoyesis y es el principal correceptor en las células T para la entrada del VIH (Owen et al, 2014). Contiene siete dominios transmembranales y señala a través de proteínas G (Berger, E., et al 1999). La región amino terminal en el dominio extracelular está involucrada en la unión al VIH (Potempa, S., et al 1997) (figura 3.5).

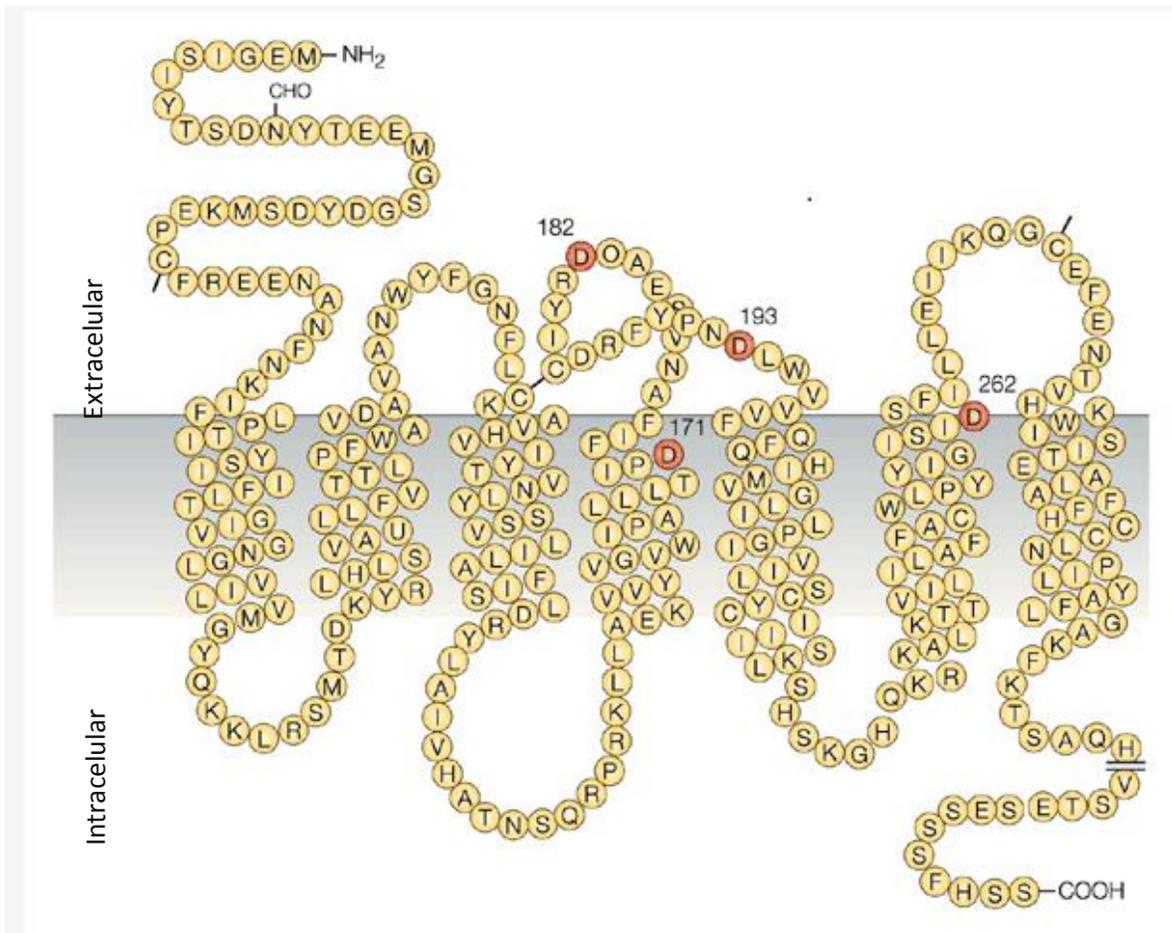


Figura 3.5. Receptor CXCR4. (Imagen tomada de De Clercq, E. 2003)

La quimiocina CXCL12, también llamada factor derivado de células estromales (SDF1) es expresada constitutivamente por células del estroma de la médula ósea, timo, corazón, pulmón, hígado y bazo y uno de sus roles es retener células precursoras en este microambiente (Murphy, K. 2012). Es una molécula fuertemente quimiotáctica para los linfocitos (Bleul, C., et al, 1996). Los factores derivados de las células estromales 1- α y 1- β son citocinas pequeñas que activan leucocitos y son inducidos por estímulos proinflamatorios tales como lipopolisacáridos, TNF o IL-1. Esta activación se da cuando un linfocito al ser extravasado migra y durante el proceso de rodamiento se alenta la célula, lo cual permite interacciones entre quimiocinas presentadas sobre la superficie del endotelio y los receptores sobre el leucocito. Los eventos de transducción de señal causados por esas uniones dan cambio a la conformación y agrupación de integrinas (p. ej., LFA-1) sobre el leucocito (Owen et al, 2014). A medida que un linfocito entra en la fase G₁ del ciclo celular, deja de expresar CXCR4 para poder migrar a otras partes del cuerpo (Murphy, K. 2012).

JUSTIFICACIÓN

Particularmente, la investigación *in vitro* sobre los factores que influyen en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) debe considerar las variaciones del fenotipo de las células T CD4⁺, tanto en condiciones basales como en respuesta a la activación, dado que la infección *in vitro* por el VIH-1 es óptima en células activadas. Es relevante conocer la variabilidad en el fenotipo de los linfocitos causada por el procedimiento de activación específico, en este caso, el uso de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas.

En este trabajo se caracterizaron los linfocitos T CD4⁺ humanos obtenidos a partir de paquetes leucocitarios, determinando: rendimiento, pureza, viabilidad y expresión de marcadores de activación antes y después de su estimulación a través del receptor de células T (TCR) y de una molécula coestimuladora (CD28).

Los marcadores de superficie investigados corresponden a aquellos que definen al subtipo de células T cooperadoras, a los receptores al VIH-1 y a dos importantes marcadores de activación. El conocimiento de la variación de estos factores apoya el planteamiento de protocolos experimentales sobre el VIH-1.

HIPÓTESIS

La respuesta a la activación de los linfocitos T CD4⁺ de paquetes leucocitarios es diferente entre diferentes individuos y durante distintos tiempos de activación.

OBJETIVO

Determinar la respuesta a la activación de los linfocitos T aislados de paquetes leucocitarios de diferentes individuos y a distintos tiempos de activación, analizando la expresión de los marcadores de activación CD25 (cadena alfa del receptor para la IL-2) y de la molécula de adhesión CD54 (ICAM-1), así como de los receptores CD3, CD4 y CD184.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Purificar linfocitos T CD4⁺ provenientes de 6 paquetes leucocitarios mediante selección negativa utilizando el Kit CD4⁺ T Cell Isolation human MACS® Miltenyi Biotec
- Determinar el rendimiento de la purificación
- Activar los linfocitos T CD4⁺ durante 3 y 6 días
- Determinar la viabilidad celular
- Determinar el nivel de expresión de los marcadores CD3, CD4, CD25, CD54 y CD184

METODOLOGÍA

La activación de los linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica se evaluó mediante la expresión de los marcadores CD25 (IL-2R α) y CD54 (ICAM-1), así como la viabilidad celular por medio del método de exclusión por azul de tripano en dos diferentes tiempos de activación (3 y 6 días) elegidos con base en el tiempo que tarda la expresión del IL-2R α sobre la célula, así como el tiempo en que tardan en dividirse los blastocitos (cuatro a cinco días). Como grupo control se utilizaron linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica no activados que corresponden al día 0. Para determinar los niveles de expresión de los marcadores CD3, CD4 y CD184 (CXCR4) se pusieron en los linfocitos diferentes anticuerpos acoplados a los fluorocromos APC, FITC y PE dirigidos contra los marcadores mencionados, mediante el análisis por citometría de flujo. Una vez identificada la población de linfocitos T CD4⁺, en el software Attune® Cytometric se seleccionarán las células dobles positivas (CD25⁺/CD54⁺) y en estas células se evaluarán los niveles de expresión de los marcadores.

1. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Marca	No. de catálogo	Fluorocromo acoplado	Control de isotipo
CD3	BD Pharmingen	555342	APC	APC Mouse IgG2a, κ
CD4	BD Pharmingen	555349	APC	APC Mouse IgG1, κ
CD25	BD Pharmingen	555431	FITC	FITC Mouse IgG1, κ
CD54	BD Pharmingen	555511	PE	PE Mouse IgG1, κ
CD184	BD Pharmingen	555976	APC	APC Mouse (BALB/c) IgG2a, κ

Tabla 1. Anticuerpos utilizados. Estos anticuerpos se usaron para marcar los linfocitos T CD4⁺ aislados de los paquetes leucocitarios. Posteriormente, se analizaron éstos linfocitos a través de un citofluorómetro.

2. Paquetes leucocitarios

Seis paquetes leucocitarios fueron proporcionados por el Servicio de Medicina Transfusional del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán provenientes de donadores sanos. Se determinó que los individuos fueran sanos basado en la serología proporcionada por el mismo instituto, es decir, que las pruebas reactivas fueron negativas para agentes patógenos. El número de experimentos se determinó de acuerdo al tiempo que llevó la realización de cada ensayo (aproximadamente 2 semanas cada uno).

3. Obtención de PBMCs por gradiente de Ficoll y su cultivo posterior.

En un tubo BD Falcon de 50 ml se colocaron 20 ml de PBS 1X y 10 ml de sangre previamente atemperada a 37°C resuspendiendo el contenido. En otro tubo BD Falcón de 50 ml se colocaron 15 ml de Ficoll-Paque™ PLUS (temperatura ambiente) y posteriormente se le añadieron 30 ml de la mezcla de PBS/sangre inclinando el tubo y colocando la pipeta en posición perpendicular con velocidad lenta para mantener separadas ambas fases (sangre/ficoll). Se centrifugó este tubo (centrífuga marca eppendorf mod. 5804 R) a 1000 × g por 30 min, 20°C, sin freno ni acelerador (0). Una vez formadas las diferentes fases en el tubo (Figura 1), se retiró la mayoría del plasma sanguíneo y con una micropipeta de 1000 µl se extrajo el anillo de PBMCs (aprox. 4 ml) y se colocó en 20 ml de PBS 1X en un

tubo de 50 ml, para luego llevarlo a un volumen de 45 ml resuspendiendo para homogenizar. Se centrifugó el tubo a $350 \times g$ por 10 min con freno y acelerador normal (9) y, posteriormente se decantó el sobrenadante. Se disgregó el botón celular, se añadieron 45 ml de PBS 1X y se resuspendió para luego centrifugar en las mismas condiciones, repitiendo estos pasos por cuatro veces más. Se disgregó nuevamente el botón celular para luego añadir 10 ml de PBS 1X y resuspender para hacer una dilución 1:50 de células y azul de tripano, respectivamente y contar las PBMCs obtenidas en un hemocitómetro. Se apartaron 2×10^6 de PBMCs en un tubo eppendorf estéril y se centrifugó a 1500 rpm por 5 min, decantando el sobrenadante y resuspendiendo el botón celular en 1 ml de medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) inactivado durante 30 minutos a $56^\circ C$; al medio se le adicionó 100 U/ml de penicilina (Gibco) y 100 $\mu g/ml$ de estreptomicina (Gibco). Se incubaron estas PBMCs a $37^\circ C$, con 5% de CO_2 (95% de oxígeno) durante toda la noche y se fijaron las células con 500 μl de PFA al 4% y 500 μl de PBS 1X al día siguiente.

4. Obtención de Linfocitos T $CD4^+$ (selección negativa)

Se empleó el kit $CD4^+$ T Cell Isolation Kit human (descrito en la Tabla 2) para obtener linfocitos T $CD4^+$ mediante selección negativa (las células que presentaron el fenotipo $CD3^+CD4^+CD8^-$ no se marcaron con anticuerpos acoplados a perlas magnéticas), para lo cual se utilizaron 80×10^6 PBMCs de las recién obtenidas después de su aislamiento con ficoll centrifugándolas a $300 \times g$ por 10 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 320

µl de buffer MACS® Rising Solution (PBS, pH 7.2, 0.5% de albúmina de suero bovino (BSA) y EDTA 2 mM por dilución del Stock BSA MACS® (cat: 130-091-376) 1:20 con la solución de lavado autoMACS® (cat: 130-091-222)) mantenido a 2-8°C. Se le añadieron 80 µl de CD4 + T Cell Biotin-Ab Cocktail incubando a 2-8°C durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 240 µl de buffer MACS Rising Solution y 160 µl de CD4⁺ T Cell Microbead Cocktail, se resuspendió y se incubó a 2-8°C durante 10 minutos. Se colocó una columna magnética LS (marca MACS Miltenyi Biotec cat: 130-042-401) previamente enfriada en el congelador en un imán acoplado a una base de metal especial y se humedeció con 3 ml de buffer MACS Rising Solution desechando los residuos. Después se colocaron las células para obtener mediante selección negativa los linfocitos T CD4⁺ (Figura 2) y se lavó la columna con 3 ml de buffer MACS Rising Solution para obtener el sobrenadante enriquecido. Se descartó la columna, se centrifugó el sobrenadante enriquecido (compuesto por linfocitos T CD4⁺) durante 5 minutos a 1500 rpm y se decantó, manteniendo el botón celular. Se resuspendió el botón celular en 2 ml de medio AIM-V (Gibco) y se hizo una dilución con azul de tripano de 1:10 para contar éstos linfocitos en el hemocitómetro.

Nombre del Kit	Componentes	Descripción
CD4⁺ T Cell Isolation Kit human MACS® Miltenyi Biotec cat: 130-096-533	1 ml de coctel de anticuerpo anti-Biotina de célula T CD4 ⁺ humana	Coctel de anticuerpos monoclonales humanos conjugados con biotina contra CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ y CD235a (glicoforina A)

2 ml de coctel de microperlas de célula T CD4 ⁺ humana	Microperlas conjugadas al anticuerpo monoclonal antibiotina (isotipo: IgG1 de ratón) y al anticuerpo monoclonal anti-CD61 (isotipo: IgG1 de ratón)
---	--

Tabla 2. Kit utilizado para el aislamiento de linfocitos T CD4⁺.

5. Aumento de la pureza

Se ajustó el sobrenadante enriquecido a 2×10^6 células/ml de medio AIM-V y se adicionaron 10 ml a las botellas adherentes. Se incubaron a 37°C y un ambiente de 5% de CO₂ y 95% de aire, durante 2 horas para favorecer la adherencia de los monocitos contaminantes a la superficie de la botella. Se recuperó el sobrenadante lavando las paredes de las botellas y se transfirió a tubos de 15 ml (Corning cat: 430055), se centrifugaron a 1600 rpm por 5 min para resuspender el botón celular en 2 ml de PBS 1X. Se hizo una dilución 1:10 con azul de tripano, se contaron las células en un hemocitómetro. Se centrifugó nuevamente el tubo, se decantó el sobrenadante y se ajustó la suspensión celular a 1×10^6 células/ml en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de SFB_i, se transfirieron en botellas de cultivo de 25 cm² (Corning cat: 430168) e incubaron a 37° C con 5% de CO₂ durante toda la noche.

6. Activación de los linfocitos con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas

Se centrifugó a 1500 rpm por 5 min el sobrenadante enriquecido después de permanecer en incubación toda la noche, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 2 ml de medio RPMI, se tomaron 10 μ l del botón celular y se diluyeron en 90 μ l de azul de tripano. Se tomó de esta dilución 10 μ l y se colocaron en el hemocitómetro para contar los linfocitos viables. Se ajustó la suspensión celular a 2×10^6 células/ml de PBS 1X. Posteriormente, se reservaron 1.4×10^6 linfocitos T CD4⁺ y el resto se colocaron 1 ml en una placa de 24 pozos de fondo plano en las coordenadas B3 y B4. En el resto de los pozos se colocaron 2 ml de PBS 1X para evitar la evaporación de los pozos importantes a lo largo del tiempo de activación celular.

Posteriormente, se lavaron las Dynabeads acopladas a los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Gibco cat: 11131D) resuspendiendo el vial durante 30 segundos en el vortex, transfiriendo después 300 μ l a un tubo eppendorf de 1 ml para mantener una relación 1:3 célula-perla (el volumen total del vial de Dynabeads es de 2 ml con un total de 80×10^6 Dynabeads). Luego se añadió un volumen igual de PBS 1X para mezclarlo en el vortex durante 5 segundos. Se colocó el tubo dentro de un campo magnético de un imán durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Se retiró el tubo del imán y se resuspendieron las perlas en el mismo volumen inicial con medio de cultivo RPMI. A los pozos B3 y B4 se les añadieron 150 μ l, respectivamente, de las perlas lavadas, resuspendiendo para homogenizar toda la superficie del pozo.

Se dejó el estímulo por 3 días (pozo B3) y por 6 días (B4), para luego comparar la expresión de los marcadores de interés contra la expresión de los linfocitos T CD4⁺ no activados (día 0). En los días 3, 4 y 5 de activación, se añadieron 250 µl de medio de cultivo RPMI sin mover las células del fondo del pozo B4.

7. Detección de los marcadores de superficie

Se utilizaron los anticuerpos de la Tabla 1 para hacer inmunofenotipificaciones directas de los marcadores de superficie a través de la técnica de citometría de flujo, dividiendo en tres categorías celulares (células no activadas (día 0), células activadas 3 días y células activadas 6 días) como se describe a continuación.

Se centrifugaron las células no activadas a 1500 rpm a 4°C por 3 min y se decantó el sobrenadante, se lavaron con 1 ml de PBS 1X/Azida de sodio (0.1%) mantenido a 4° C y se resuspendieron en 100 µl de PBS 1X/Azida de sodio (0.1%) por cada 1 x 10⁶ células. A las células activadas 3 días y 6 días se les quitaron las perlas recolectándolas de los pozos en tubos eppendorf y se colocaron dentro del campo magnético de un imán durante 2 min; se recuperó el sobrenadante en nuevos tubos eppendorf y se centrifugaron a 1500 rpm a 4°C por 3 min. Se decantó el sobrenadante y se lavaron y ajustaron igual que las células no activadas (ver arriba).

Para las células no activadas se etiquetaron 14 tubos eppendorf. Como controles: células sin anticuerpo (1), anti-CD3 (1), anti-CD25 (1), anti-CD54 (1); isotipos: isotipo anti-CD3/CD184, isotipo anti-CD4, isotipo anti-CD25 e isotipo anti-

CD54; muestras: anti-CD3 + anti-CD25 + anti-CD54 (2), anti-CD4 + anti-CD25 + anti-CD54 (2), anti-CD184 + anti-CD25 + anti-CD54 (2) y para las células activadas durante 3 y 6 días se etiquetaron 14 tubos (controles: células sin anticuerpo (1), anti-CD4 (1), anti-CD25 (1), anti-CD54 (1); isotipos: isotipo anti-CD3/CD184, isotipo anti-CD4, isotipo anti-CD25 e isotipo anti-CD54; muestras: anti-CD3 + anti-CD25 + anti-CD54 (2), anti-CD4 + anti-CD25 + anti-CD54 (2), anti-CD184 + anti-CD25 + anti-CD54 (2)). Para las tres categorías se les añadió a cada tubo 10 µl de las células ajustadas. Todos los tubos fueron colocados en una cama de hielo para añadirles 2 µl del respectivo anticuerpo e incubarlos a 4°C durante 30 min en oscuridad.

Acabada la incubación, se lavaron todas las células con 1 ml de PBS 1X/ Azida de sodio (0.1%) y se resuspendieron las células en 500 µl de PBS 1X con 500 µl de PFA 4% incubándolas durante 20 min en hielo y oscuridad y resuspendiéndolas cada 5 min. Se lavaron nuevamente y se resuspendieron en un volumen final de 1 ml de PBS 1X frío. Para evaluar la expresión de los marcadores, se utilizó el citómetro de flujo (marca Attune® Acoustic Focusing Cytometer Blue/Red) con el software Attune® Cytometric v1.2.5.

En los distintos dot plots obtenidos de tamaño contra granularidad se delimitó la región de interés R1 y de ésta se obtuvieron otros dot plots hijos que mostraban en el eje horizontal el marcador CD25 y en el eje vertical el marcador CD54. Estos dot plots se dividieron en cuatro regiones (R2-R5) y sólo se tomaron como células activadas aquellas que estuvieran dentro de la región R3, es decir, que fueran positivas para ambos marcadores (dobles fluorescentes). De la región

R3 se obtuvieron distintos histogramas que muestran la intensidad media de fluorescencia para cada marcador por día de activación y ésta se utilizó para calcular el índice de fluorescencia media basado en la siguiente fórmula:

$$IFM = \frac{\textit{Intensidad media de fluorescencia del anticuerpo}}{\textit{Intensidad media de fluorescencia del control de isotipo}}$$

De esta manera se obtuvieron los gráficos de los resultados.

8. Pruebas estadísticas

Se realizó la prueba t-Student para saber si existían diferencias significativas entre las medias del porcentaje de expresión de cada marcador para cada día de activación, los índices de fluorescencia media, la viabilidad y el rendimiento.

También se empleó el análisis de correlación lineal para saber si el efecto de la activación sobre la viabilidad se asoció con el IFM, es decir, si hay alguna relación directa o inversa entre las células sobrevivientes frente a la expresión de los marcadores CD25 y CD54.

9. Cambios morfológicos celulares

Otra característica importante a evaluar fue si la activación contribuía al cambio morfológico celular, para lo cual se tomaron fotografías de las células en la placa de cultivo, partiendo de las células en estado basal, luego a las que se les añadieron las perlas magnéticas a un día de activación, a los 3 días de activación y finalmente hasta el día 6 de activación, utilizando un microscopio invertido. Se retiraron las perlas magnéticas del cultivo el cual fue colocado en tubos eppendorf

estériles de 2 ml y utilizando un magneto durante 2 min. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugaron los tubos para lavar las células en PBS 1X/Azida de sodio (0.1%). Se tiñeron las células con los fluorocromos acoplados a los anticuerpos anti-CD25 y anti-CD54 durante 30 min. Se lavaron los pellets y se fijaron las células con PFA al 4% para analizar la morfología mediante citometría de flujo. A través de dot plots de tamaño contra granularidad se determinó la morfología celular partiendo del estado basal o de reposo (día 0), al día 3 de activación y al día 6 de activación (figura 10a). En ellos se dibujó una región poligonal (R1, en rojo) que indica la población de interés y se puede observar que el tamaño y la granularidad aumentan conforme cambian los diferentes tiempos experimentales, así como un incremento en los restos celulares (parte inferior izquierda). Para distinguir que el aumento en el tamaño y granularidad de las células era debido a la activación, se hicieron nuevos dot plots basados en la región R1 de tamaño vs granularidad en donde se evalúan los canales de emisión de dos fluorocromos: en el eje horizontal se encuentra el canal BL-1 en donde se lee el fluorocromo FITC correspondiente a CD25 y en el eje vertical se encuentra el canal BL-2 donde se lee el fluorocromo PE correspondiente a CD54. Se dividieron los distintos dot plots en cuatro regiones y se tomó como células activadas únicamente a las que cayeron en la región de dobles positivas (CD25 y CD54) ubicadas dentro de la región R3 (figura 10b). Las distintas regiones o cuadrantes se establecieron de acuerdo a las células no activadas (día 0) y a las células teñidas con los respectivos isotipos.

RESULTADOS

1. Rendimiento y pureza de los linfocitos T CD4⁺ purificados por selección negativa

Se obtuvieron linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica mediante la separación de PBMCs por gradiente de ficoll y posteriormente se realizó la purificación linfocitaria a través del marcaje de células con un coctel de anticuerpos (ver tabla 2) acoplados a perlas magnéticas que no presentaban el fenotipo CD3⁺CD4⁺CD8⁻ (selección negativa). Estas células se colocaron dentro de una columna magnética y de esta forma atravesaron la columna aquellas células que presentaban el fenotipo CD3⁺CD4⁺CD8⁻. Después se analizaron las PBMCs para distinguir las distintas poblaciones celulares de acuerdo al tamaño y granularidad (parámetros obtenidos del software) y los linfocitos T mediante citometría de flujo (figura 4).

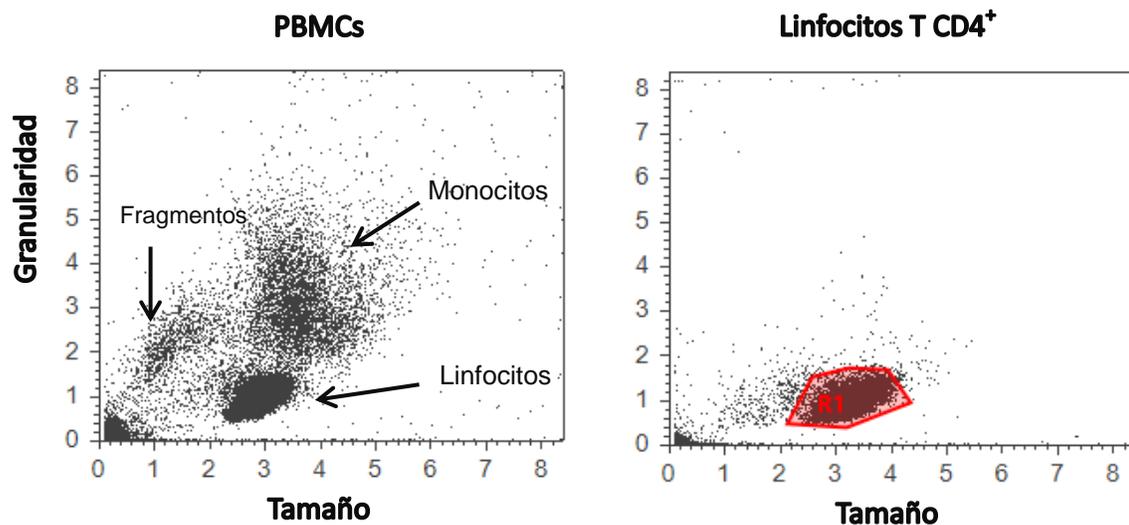


Figura 4. Tamaño contra granularidad de PBMCs y linfocitos T CD4⁺. En la gráfica de la izquierda se ilustra la distribución de las distintas subpoblaciones de células mononucleares de sangre periférica obtenidas mediante separación por centrifugación en gradiente de ficoll. En la gráfica de la derecha dentro de la región poligonal se muestra la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ obtenidos por selección negativa.

Para saber que la región R1 de la figura 4 efectivamente eran linfocitos T CD4⁺, se obtuvo un histograma de esa región (figura 5) en el cual se muestra la intensidad media de fluorescencia del anticuerpo anti-CD4 (azul) comparada con la intensidad media de fluorescencia del control de isotipo (rosa). En el eje x está representado el canal de emisión RL1 para el fluorocromo APC al que están acoplados ambos anticuerpos y en el eje y está representado el número de células. En la esquina superior derecha está representado el porcentaje de células positivas para CD4 y el IFM.

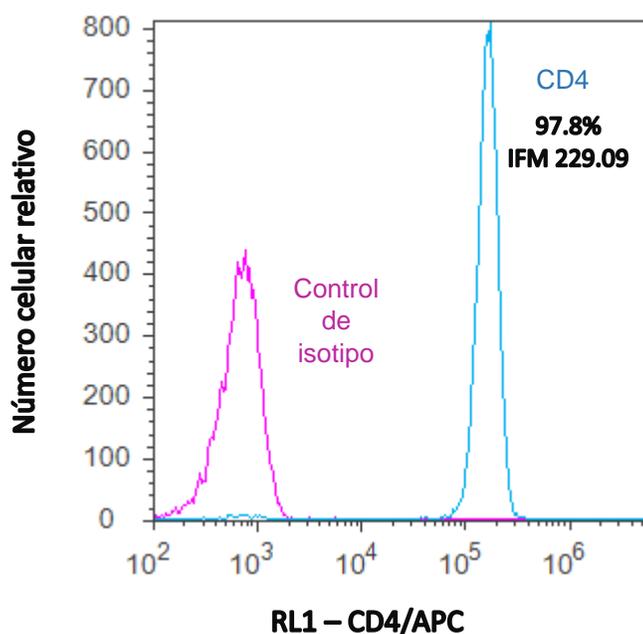


Figura 5. Intensidad media de fluorescencia de CD4.

Para la selección negativa se utilizaron un máximo de 8×10^7 PBMCs de las cuales se obtuvieron linfocitos T CD4⁺ purificados en rangos de las 8×10^6 a 18.8×10^6 células (figura 6). El gráfico del rendimiento consiste en el número de PBMCs usadas comparado contra el número de linfocitos promedio obtenido de

un total de seis experimentos independientes. Posteriormente, se realizó la prueba t-Student y se encontró una diferencia significativa entre las medias de PBMCs obtenidas respecto al número de linfocitos T CD4⁺.

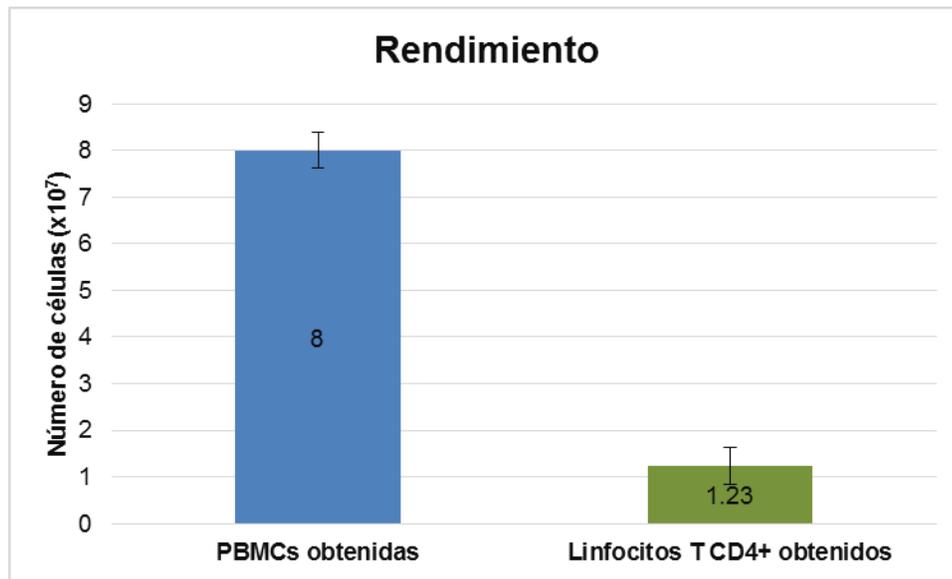


Figura 6. Rendimiento celular. En todos los casos, se utilizó como número base 80×10^6 PBMCs de los cuales sólo el 30% son linfocitos (T y B) y de estos el 80% son linfocitos T. Datos obtenidos de seis experimentos. La barra representa la media \pm desviación estándar ($p < 0.0001$)

Para saber si las células obtenidas tenían la pureza suficiente (>90%) para trabajar con ellas, se tomaron en cuenta las células marcadas con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4 que cayeron dentro de la zona de células positivas en los dot plots proporcionados por el software del citómetro de flujo. Para establecer esa zona se comparó el histograma del control de isotipo contra el histograma de células positivas (datos no mostrados). Con los números arrojados por los dot plots se estableció el porcentaje de pureza promedio de los seis experimentos (figura 7).

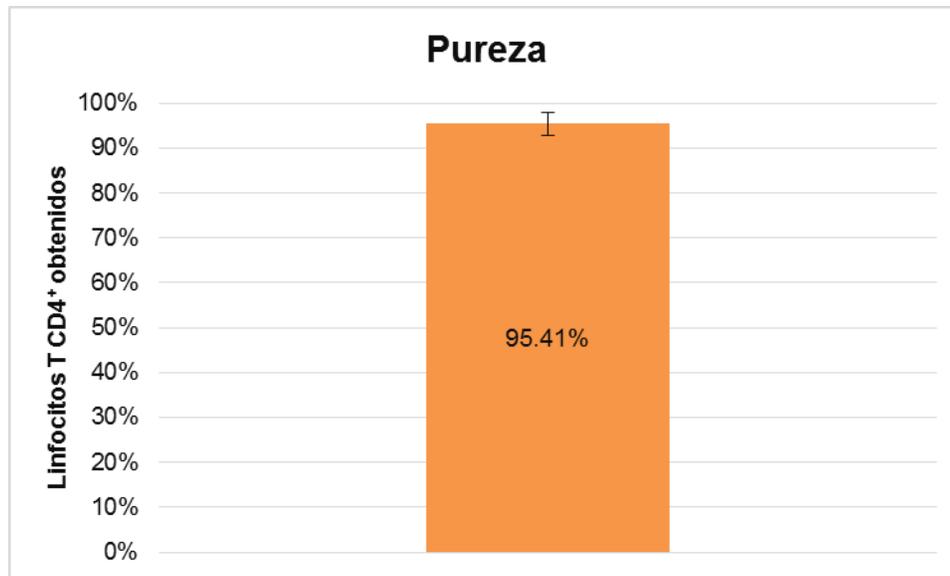


Figura 7. Pureza de linfocitos T CD4⁺. Las células fueron teñidas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4. Datos obtenidos de seis experimentos. La barra representa la media \pm desviación estándar.

2. Activación de linfocitos T CD4⁺ con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas

Para saber si la activación afectó la viabilidad celular se cuantificó el número de células vivas por el método de exclusión por azul de tripano en diluciones de 1:10 durante los diferentes tiempos experimentales y se obtuvo la media (figura 8). Se realizó la prueba t-Student para determinar si existían diferencias estadísticas significativas entre las células no activadas frente a las células activadas 3 y 6 días, así como la comparación entre las medias de las células activadas durante 3 y 6 días. Se encontraron diferencias significativas entre todas las comparaciones, por lo que se pudo observar que la viabilidad celular fue alta cuando los linfocitos se encuentran en reposo (NA) comparada con la viabilidad de las células activadas a los 3 días (A 3 días), ya que ésta se ve

disminuida. Sin embargo, se logra una recuperación al sexto día de activación (A 6 días).

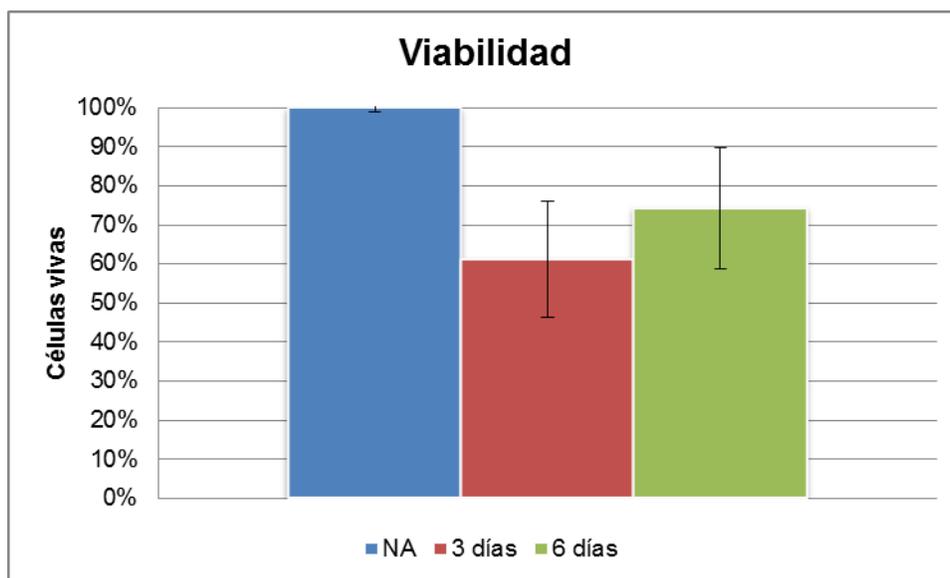


Figura 8. Viabilidad celular. En el eje horizontal están representados los tiempos de activación (NA: No activados (día 0); A 3 días: Activados 3 días; A 6 días: Activados 6 días) y en el eje vertical está representado el porcentaje de células vivas. Las barras representan la media \pm desviación estándar ($p < 0.0022$)

Las siguientes fotografías muestran el cambio morfológico que sufrieron los linfocitos T CD4⁺ al ser activados por los anticuerpos anti-CD3 y antiCD28. La figura 9a muestra las células en estado basal y luego a las que se les añadieron las perlas magnéticas (figura 9b, día 1 de activación), a los 3 días de activación (figura 9c) y finalmente hasta el día 6 de activación (figura 9d).

Morfología de los linfocitos T CD4⁺ no activados

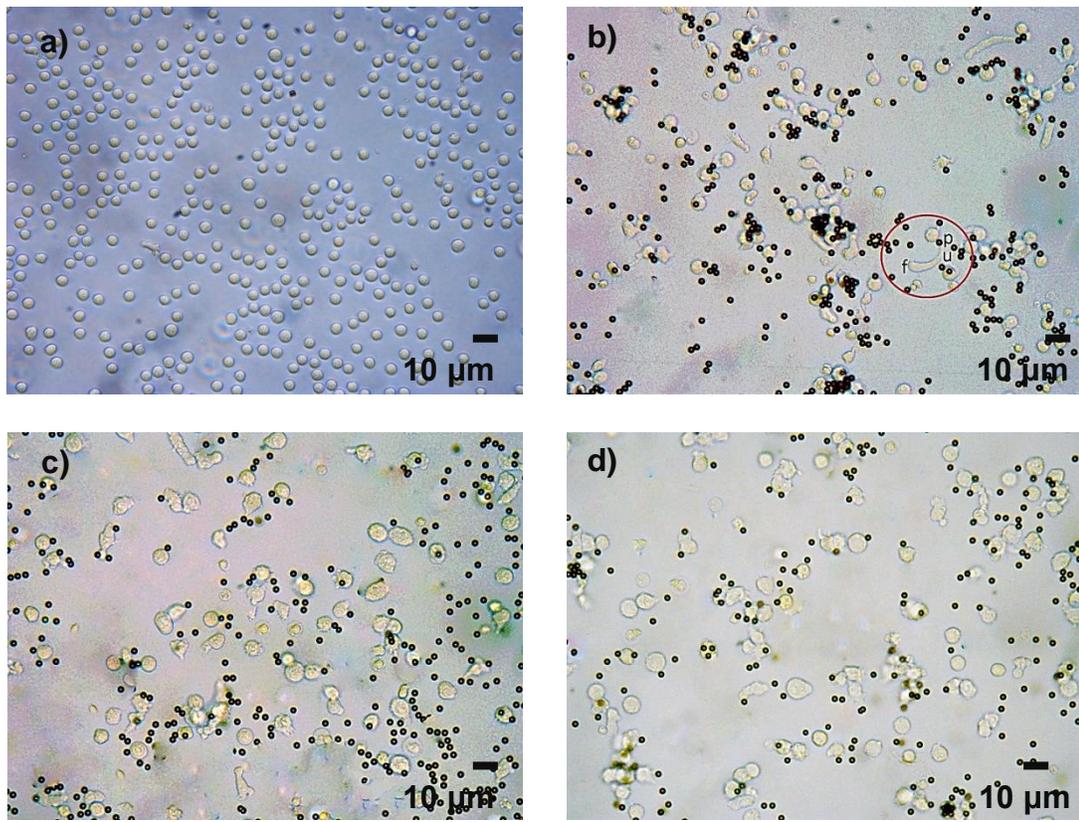
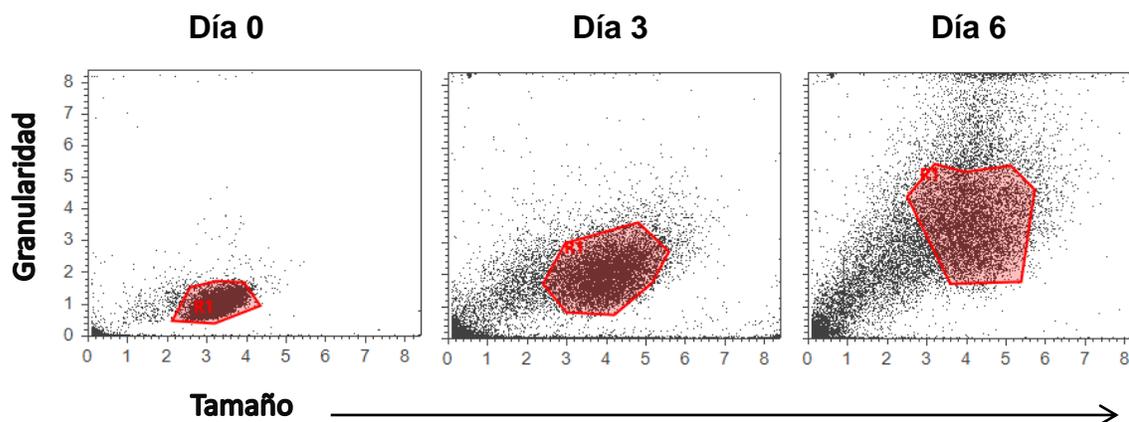


Figura 9. Cultivos de linfocitos T CD4⁺ con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas. a) linfocitos purificados no activados; b) linfocitos estimulados 1 día. La morfología de las células en estado activado cambia y se vuelven alargadas ya que comienza la migración celular. La polarización destacada en el círculo rojo está conformada por el pseudópodo o frente de migración (f), el urópodo posterior o cola (u) y los puntos oscuros son las perlas magnéticas (p); c) linfocitos a los 3 días. A este tiempo las células han crecido y puede apreciarse la complejidad citoplasmática debida a la activación así como proyecciones membranales; d) linfocitos a los 6 días. La morfología se mantiene durante el tiempo de activación. Aumento 400x.

Después de observar el cambio morfológico en los linfocitos T CD4⁺ activados, como se mencionó en la sección de metodología, se determinaron las distribuciones de las células en dot plots de tamaño y granularidad por día de activación (figura 10a). Se observó el aumento de tamaño y complejidad a través del tiempo, así como la expresión de los marcadores CD25 y CD54 mediante citofluorometría (figura 10b).

a)



b)

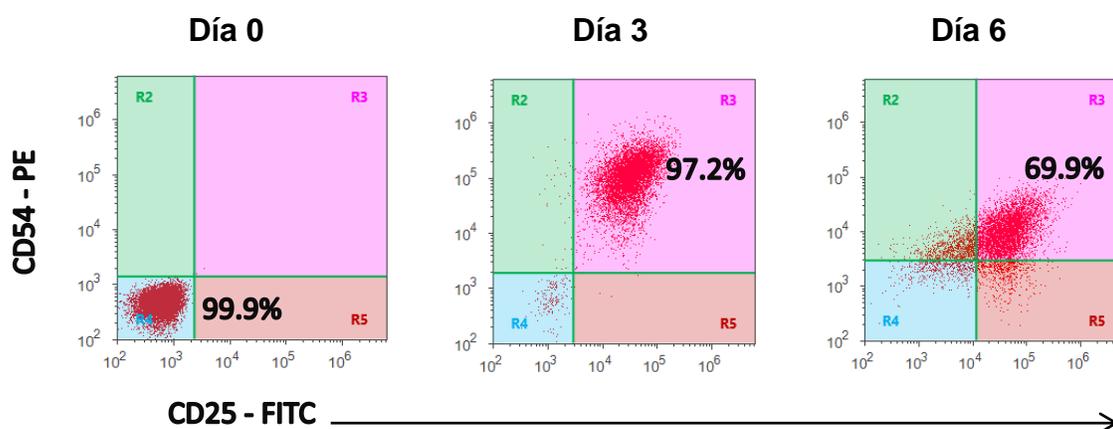
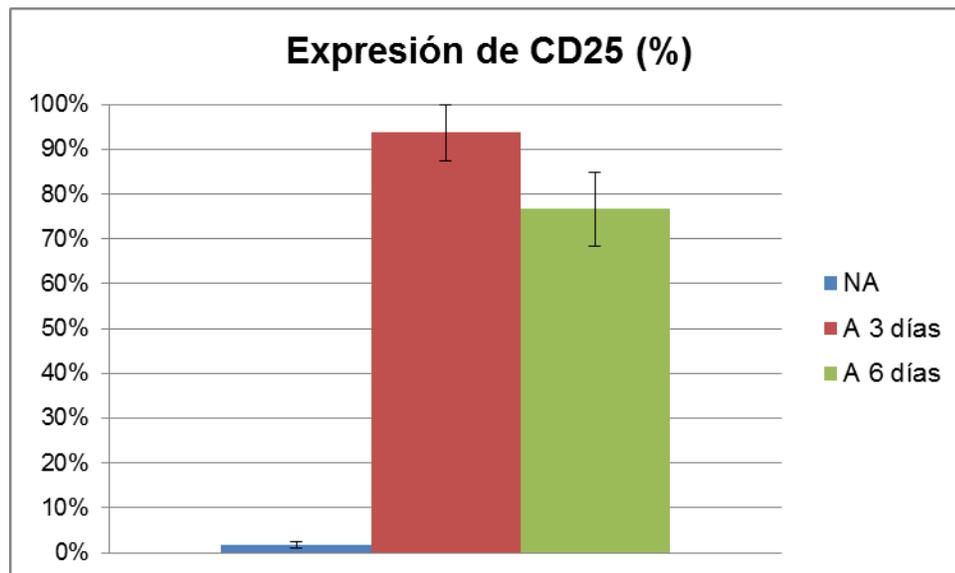


Figura 10. Dot plots de linfocitos T CD4⁺ en estado basal (Día 0) y activados con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas durante 3 y 6 días. a) se representa el tamaño contra la granularidad característicos de los linfocitos T CD4⁺ no estimulados (Día 0) encerrados en la región poligonal R1 (en rojo) y después de ser activados durante 3 y 6 días; b) dot plots basados en la región R1 divididos en cuatro regiones (R2-R5) que muestran las células en estado de reposo en la región R4 (en azul) y las células dobles positivas que expresan los marcadores de superficie que denotan activación (CD25-FITC y CD54-PE) en la región R3 (en rosa). El porcentaje en todos los casos se refiere al número de células dentro de cada región.

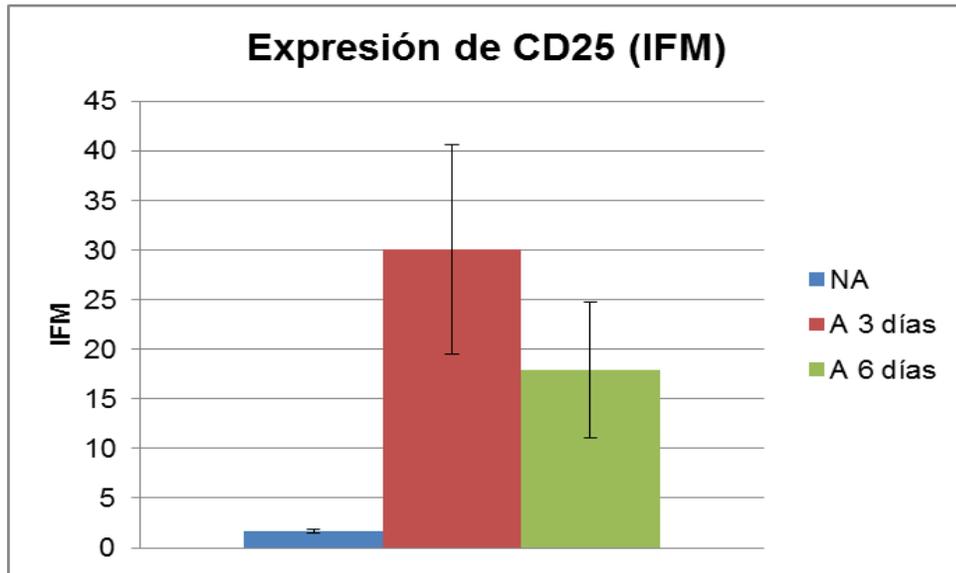
2.2 Efecto de la activación sobre la expresión de CD25 (IL-2R α) y CD54 (ICAM-1)

Una de las características de los linfocitos T CD4⁺ es que la expresión de los receptores CD25 y CD54 son inducibles con la activación celular. Los resultados de la tinción por cada marcador se graficaron en porcentaje promedio (figuras 11a y 11c). También se graficaron los índices de fluorescencia media promedio (figuras 11b y 11d). En ambos casos se realizó la prueba t-Student para distinguir diferencias significativas entre las medias de células NA frente a los 3 y 6 días de activación, y con esto, se determinó que el número de células que expresaron los marcadores de activación CD25 y CD54 fue del 80 al 100% a los 3 días de activación, mostrando que la activación se logró de manera eficiente. El nivel de expresión de los marcadores de activación, mostrado como la intensidad media de la fluorescencia respecto al control de isotipo, mostró una variabilidad considerable y decayó significativamente al sexto día.

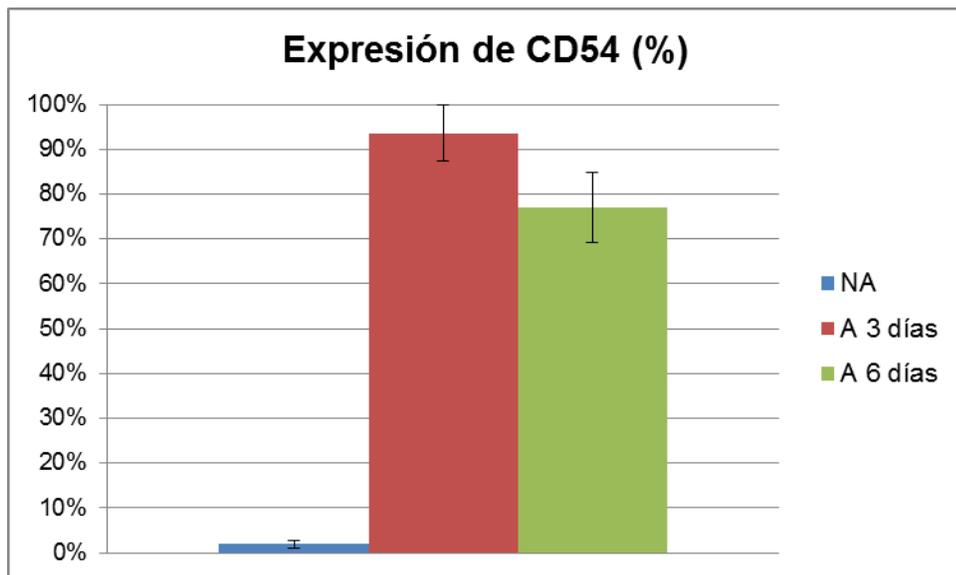
a)



b)



c)



d)

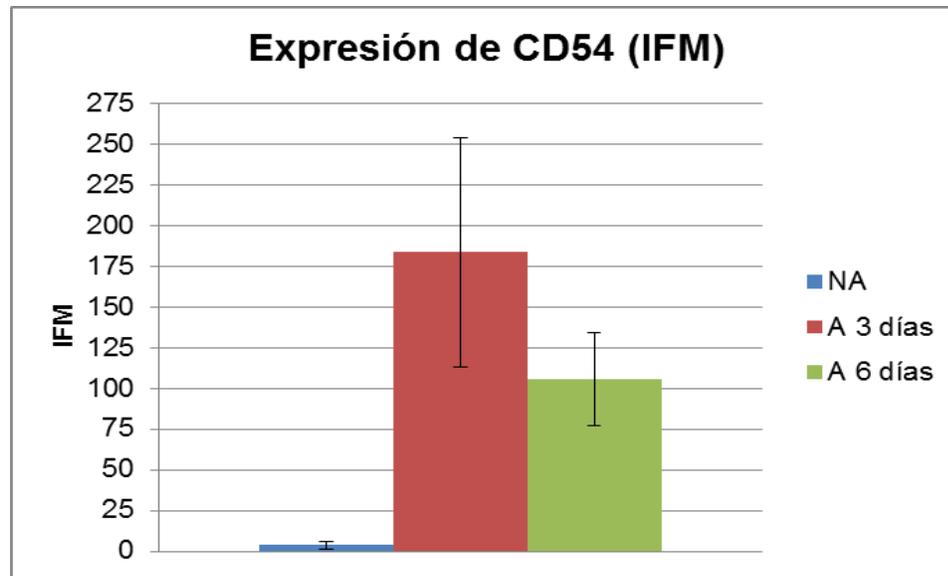


Figura 11. Expresión de CD25 y CD54. Los linfocitos T CD4⁺ fueron obtenidos por selección negativa y estimulados con los anticuerpos durante 3 y 6 días. Se detectaron los marcadores de activación al retirar el estímulo, mediante la fluorescencia de los fluorocromos. a y c) Media del porcentaje de células que expresan el marcador de activación CD25 (IL-2R) y CD54 (ICAM-1) respectivamente; b y d) Media del índice de fluorescencia media por día de activación (azul: no activadas (día 0); rojo: activadas 3 días; verde: activadas seis días) de los marcadores CD25 y CD54, respectivamente. Las barras representan la media \pm desviación estándar ($p < 0.0001$),

2.3 Efecto de la activación sobre la expresión de CD3, CD4 y CD184 (CXCR4)

Una vez confirmada la activación celular, tanto morfológica como semicuantitativamente (expresión de marcadores de activación), el siguiente paso fue determinar si la activación influyó en los niveles de expresión de los marcadores de superficie característicos de los linfocitos T CD4⁺, de sangre periférica: CD3, CD4 y CD184 (CXCR4), para lo cual se analizaron las células tanto en estado basal (no activados) correspondientes al día 0 como activadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas durante 3 y 6 días como está descrito en la metodología. Se obtuvieron los resultados mediante

el uso de citometría de flujo tomando en cuenta el IFM y el porcentaje de células positivas para el marcador en cuestión (figura 12). En ellos se traslapa la curva de intensidad media de fluorescencia del control de isotipo (rosa) y la curva de intensidad media de fluorescencia del marcador evaluado (azul) para observar el cambio a lo largo del tiempo.

La figura 12a ilustra los resultados para el marcador CD3 donde en estado de reposo el IFM es de 227.3 y el porcentaje de células positivas es de 96.4%, mientras que para el día 3 el porcentaje es de 97.8% y el IFM es de 7.96. En el día 6 de activación el porcentaje es de 70.3% y su IFM es de 0.6. La figura 12b muestra el marcador CD4 en reposo con un porcentaje de 96.5% y un IFM de 229.09, al día 3 de activación tiene un porcentaje de 97% y un IFM de 298.58 y al día 6 de activación tiene un porcentaje de 70.3% y un IFM de 27.62. La figura 12c representa la fluorescencia para el marcador CD184 con un porcentaje de 97.8% y un IFM de 191.44 para el día 0, mientras que para el día 3 de activación el porcentaje es de 97.8% y el IFM es de 7.6. En el día 6 de activación, el IFM para CD184 fue de 2.21 y el porcentaje fue de 71.9%.

Para cada marcador de superficie se hicieron gráficas, en las cuales se determinó la media del porcentaje de células positivas (figuras 13a, c y e) y la media del IFM (figuras 13b, d y f). Se realizó la prueba t-Student para comparar las medias de células NA frente a las activadas durante 3 y 6 días, así como la comparación entre las medias de las células activadas durante 3 y 6 días. Los casos en donde hubo diferencias significativas ($p < 0.0001$) fueron: porcentaje de CD3 (Na vs A 6 días; A 3 días vs A 6 días), IFM de CD3 (Na vs A 3 días; Na vs A

6 días; A 3 días vs A 6 días); porcentaje de CD4 (Na vs A 6 días; A 3 días vs A 6 días), IFM de CD4 (Na vs A 6 días); porcentaje de CD184 (Na vs A 6 días; A 3 días vs A 6 días), IFM de CD184 (Na vs A 3 días; Na vs A 6 días; A 3 días vs A 6 días). Basado en lo anterior, se pudo apreciar una clara disminución a lo largo del tiempo sólo en el nivel de expresión en CD184 y en CD3. En los casos restantes, la disminución en ambos parámetros sólo se apreció al sexto día de activación.

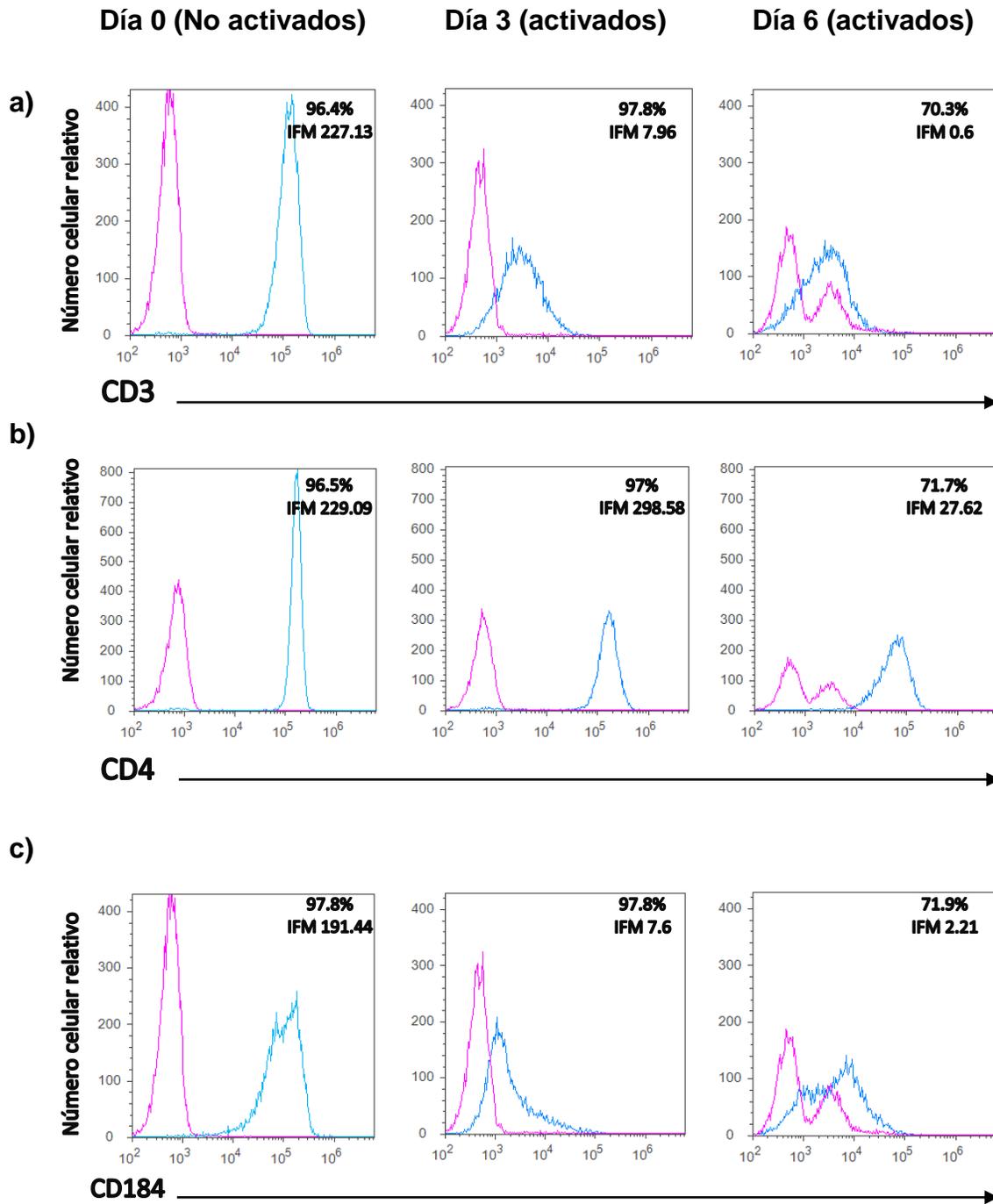
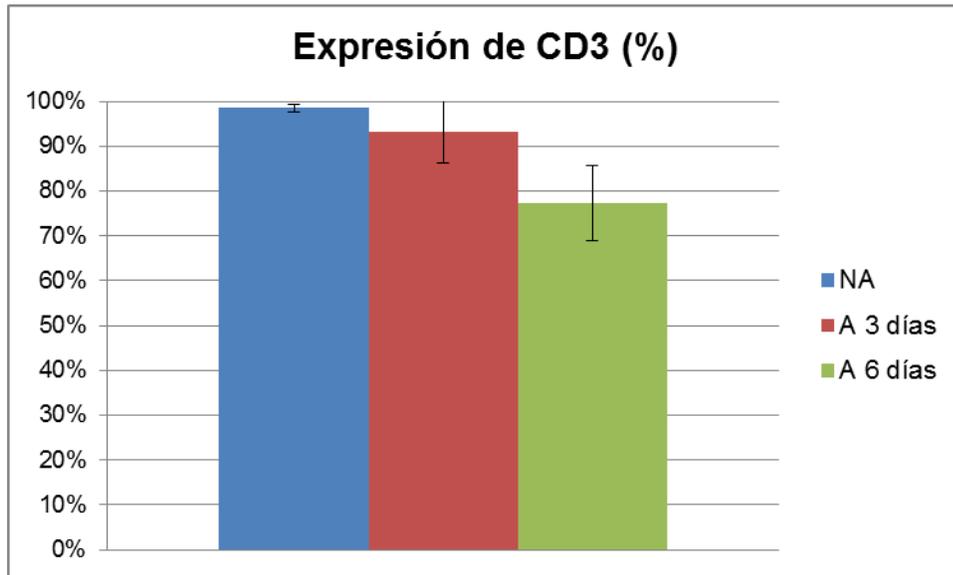
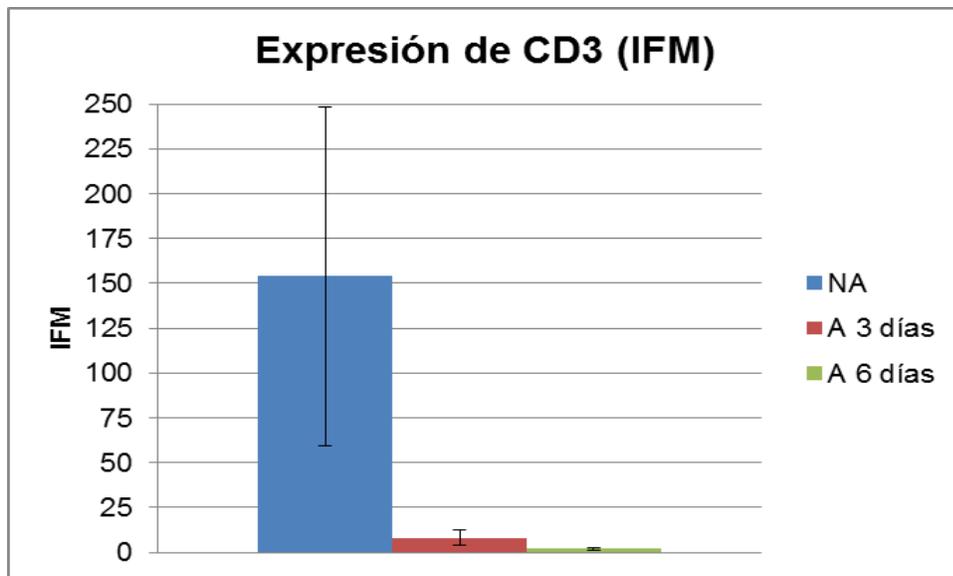


Figura 12. Efecto de la activación de los linfocitos T CD4⁺ sobre la expresión de marcadores de superficie. Se representan los histogramas de los linfocitos no activados (Día 0) y los linfocitos activados durante 3 y 6 días. La curva azul representa las células marcadas con el anticuerpo correspondiente acoplado a un fluorocromo (APC) y la curva rosa representa el control de isotipo. En la parte superior derecha se encuentran los porcentajes de células positivas y el índice de fluorescencia media para cada curva. Los histogramas son representativos.

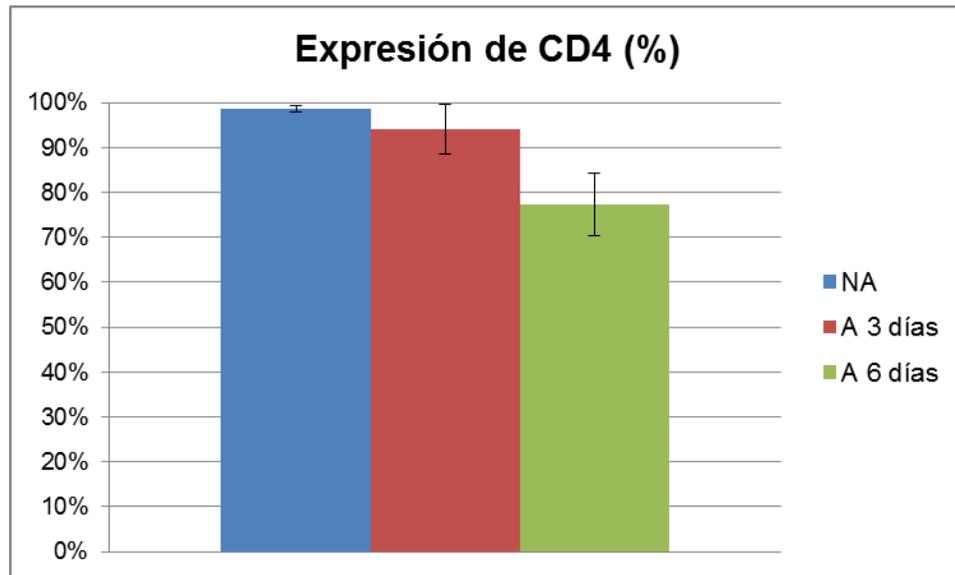
a)



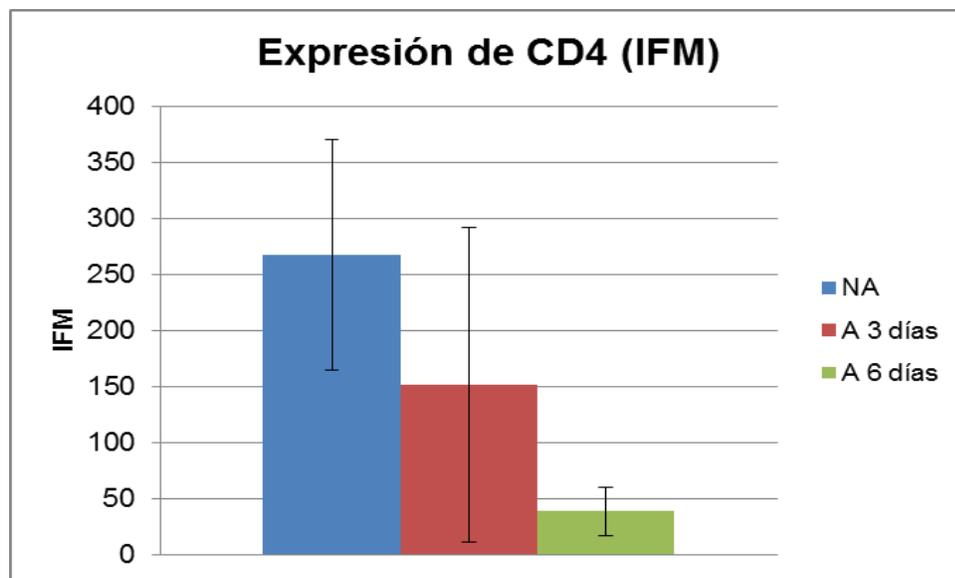
b)



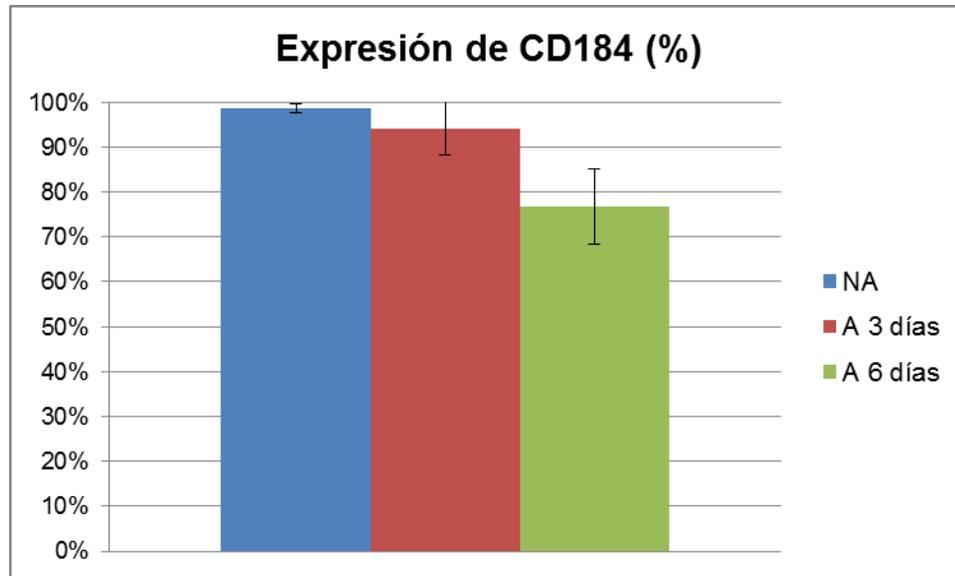
c)



d)



e)



f)

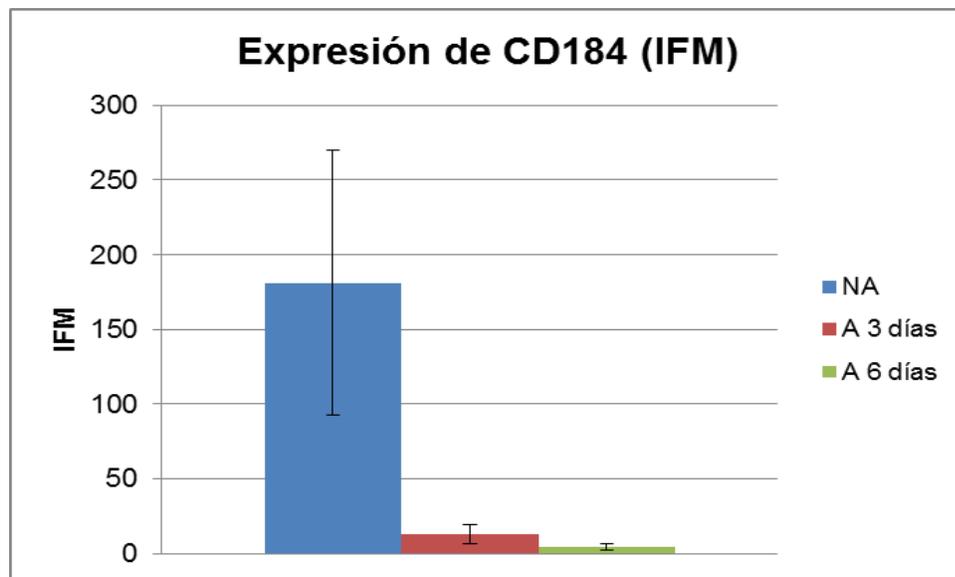


Figura 13. Efecto de la activación de los linfocitos T CD4⁺ sobre la expresión de CD3, CD4 y CD184 en los diferentes donadores. Los linfocitos T CD4⁺ fueron obtenidos por selección negativa y estimulados con las perlas durante 3 y 6 días durante los cuales se mantuvieron en incubación con medio RPMI suplementado con 10% de SFB_i a 37°C con 5% de CO₂. Se retiró el estímulo y se detectaron los marcadores por citometría de flujo. Las gráficas muestran los porcentajes de células positivas y su media (a, b, e, f, i, j) y el Índice de Fluorescencia media y su media (c, d, g, h, k, l). La barra representa la media ± desviación estándar. NA (No activados, en azul), A 3 días (activados 3 días, en rojo) y A 6 días (activados 6 días, en verde).

DISCUSIÓN

Los paquetes leucocitarios de banco de sangre son productos secundarios que se desechan por las instituciones de salud, por lo cual son una fuente excelente de leucocitos para fines experimentales, debido a que se puede obtener un alto número de células humanas primarias y funcionales.

Este trabajo muestra el establecimiento de las técnicas para purificar, activar y fenotipificar los linfocitos T CD4⁺ humanos, obtenidos a partir de dichos paquetes en donde se determinó: rendimiento, pureza, viabilidad y expresión de marcadores de superficie, en condiciones activadas y no activadas. Los resultados pueden apoyar el planteamiento de protocolos experimentales con el conocimiento de la variación de estos factores, ya que en nuestro laboratorio el modelo celular básico para realizar investigaciones son los linfocitos T CD4⁺, y la activación celular influye en los resultados que se esperarían obtener si los marcadores de superficie aquí estudiados fueren el blanco de investigación.

Estas observaciones son relevantes para nuestro grupo de investigación, en el cual actualmente se estudia el efecto de la activación de linfocitos T por medio de citocinas y no por medio del TCR. La activación por citocinas se conoce como activación colateral (“bystander”), y una de sus características distintivas es que la regulación negativa de CD3 no se lleva a cabo. Así, junto con otros análisis, el mantenimiento de la expresión de CD3 servirá como criterio de activación colateral.

Se ha demostrado que la activación de los linfocitos con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 es más parecida a la producida *in vivo*, por lo que se decidió usar este modelo, acoplándolos a perlas magnéticas, de modo que los anticuerpos pudieran ser retirados después de pasado el tiempo de activación. La activación con los anticuerpos se efectuó durante 3 y 6 días.

La purificación con el CD4⁺ T Cell Isolation Kit human MACS (Miltenyi) produjo una obtención muy eficiente de estas células, con porcentajes mayores a 94% de células T CD4⁺ en 5 de 6 casos, lo cual fue coincidente con lo reportado por la empresa que elaboró el kit, asegurando una pureza $\geq 90\%$, estándar mínimo utilizado para realizar investigación con células purificadas.

Un requisito importante durante la purificación, fue comprobar el rendimiento celular, por lo cual se comparó el número de células obtenido por μl de sangre con parámetros normales en sangre. La media de linfocitos en sangre periférica es de 2500/ μl y en proporción son 2:1 de CD4⁺:CD8⁺ (Owen et al., 2013). Se encontró también, que el rendimiento de linfocitos T CD4⁺ fue en promedio de 14×10^6 células con una viabilidad del 100%, a partir de 10 ml de suspensión leucocitaria original. De acuerdo a los valores de referencia de la tabla 4, se comprobó que los valores linfocitarios obtenidos estuvieron dentro de los rangos normales encontrados en individuos sanos (Abbas, A., et al 2012).

Cifras normales de células sanguíneas		
	Número medio por microlitro	Límites normales
Leucocitos	7.400	4.500-11.000
Neutrófilos	4.400	1.800-7.700
Eosinófilos	200	0-450
Basófilos	40	0-200
Linfocitos	2.500	1.000-4.800
Monocitos	300	0-800

Tabla 4. Hemograma normal. Valores de cifras de células sanguíneas normales para humanos adultos. (Tomado y modificado de Inmunología celular y molecular, Abbas 2012).

Los linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica se mantienen como células en reposo, es decir, en fase del ciclo celular G₀, y una vez que se da el encuentro con su antígeno específico, cambian de fase en el ciclo celular y se denominan linfocitos T CD4⁺ activados. En este estado cambian de tamaño, complejidad y producen citocinas, así como se ve afectada su supervivencia. La activación de las células con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas produjo el cambio morfológico esperado en las células, con aumento de tamaño y signos de polarización (Alberts, B. 2010).

La activación produjo siempre una disminución de la viabilidad celular, aunque de manera muy variable, reduciéndola a valores de entre el 90 y el 40%, con un promedio general del 61.2% al tercer día de activación, mientras que, para el sexto día, el promedio fue de 74.3%. La reducción en la viabilidad podría explicarse por apoptosis producida por AICD, la cual es muy común cuando se involucra la activación por TCR (Owen, J. et al 2014).

La estimulación de las células T CD4⁺ con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 indujo expresión de los marcadores de activación CD25 y CD54 en la mayoría de las células, después de 3 y 6 días de activación, mostrando la efectividad de las condiciones experimentales utilizadas. Sin embargo, es interesante notar que las células de los distintos individuos tuvieron niveles distintos de intensidad de la fluorescencia para estos marcadores, es decir, su nivel de expresión fue variable en las mismas condiciones experimentales. Esto indica que las células de diferentes individuos pueden tener distinta susceptibilidad a la activación, pero posiblemente ligadas a susceptibilidad a enfermedades autoinmunes, por ejemplo, debido a que los individuos con mayor resistencia a AICD podrían mantener un número mayor de células activadas por más tiempo (Zhang, J. et al 2004).

La activación, medida como la expresión de CD25 y CD54 fue mayor a los 3 días de la incubación con los anticuerpos, y decayó a los 6 días. La viabilidad celular en cambio, fue mejor en el día 6 que en el día 3, lo cual es congruente con AICD (figura 14).

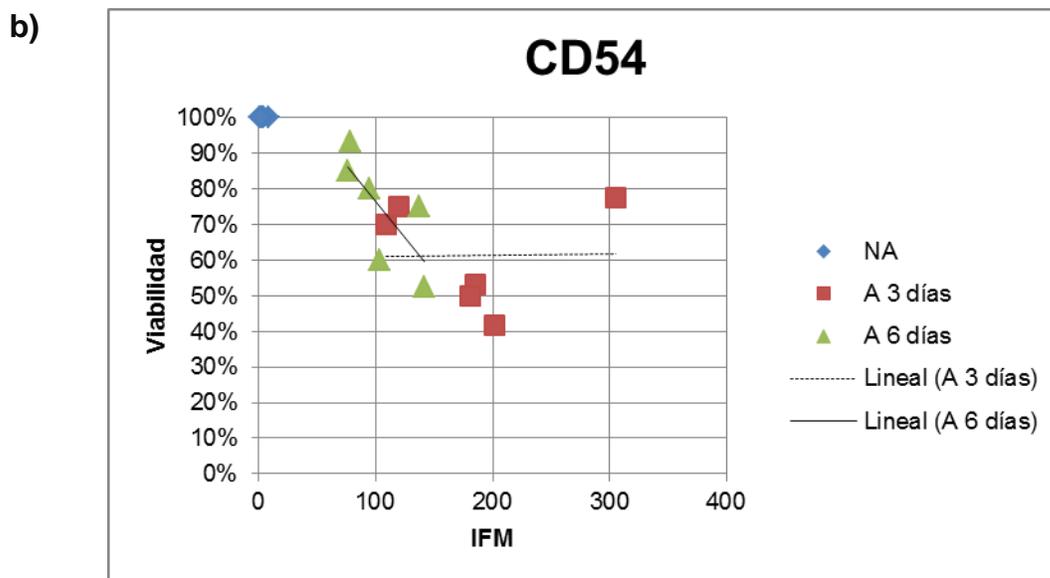
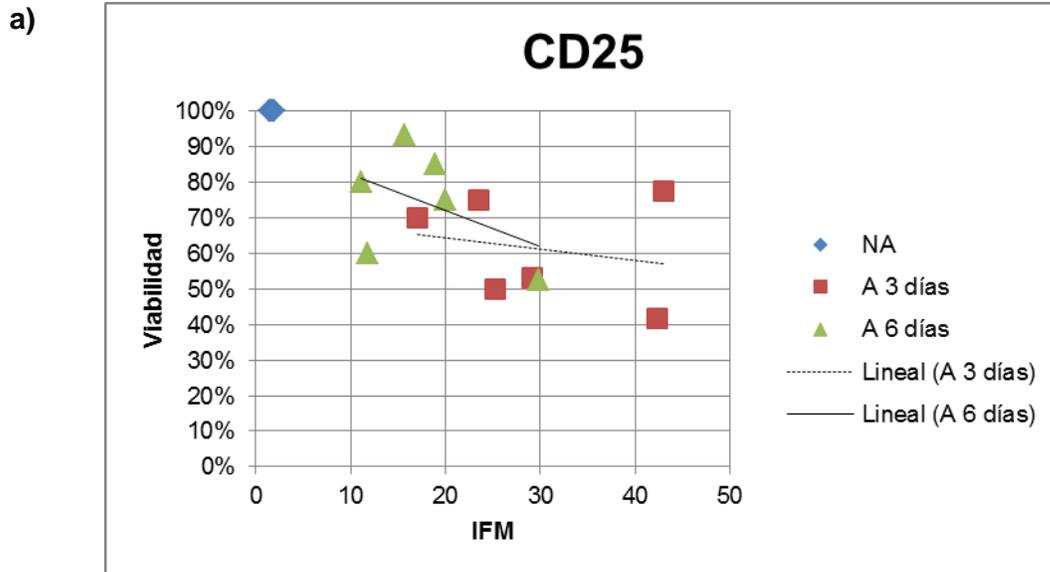


Figura 14. Viabilidad vs IFM. Los marcadores mostrados son: a) CD25 y; b) CD54, ambos al día 0 (NA), día 3 y 6 de activación. Las líneas continuas y punteadas representan la relación entre la viabilidad y la activación de las células.

Dado lo anterior, cabría suponer que las diferencias en la viabilidad celular pueden ser producidas por diferentes niveles de activación en diferentes experimentos. La figura 14a muestra que el nivel de expresión de CD25 tuvo una

relación inversa con la viabilidad celular después de 3 días de activación, de modo que a mayor nivel de activación se observó una menor viabilidad ($p < 0.0018$), congruente nuevamente con AICD. La viabilidad de estas células incrementó al día seis de activación ($p < 0.0001$) y el IFM disminuyó, lo que podría ser resultado de la expansión de las células sobrevivientes aunado a la producción y el consecuente aumento en la concentración de IL-2, aunque para corroborar esto, hacen falta experimentos para medir las concentraciones de IL-2. Budd menciona que las células T en reposo, una vez que encuentran a su antígeno vía TCR comienzan a expandirse clonalmente y es en este momento que son parcialmente dependientes de IL-2 y si en estas condiciones la citocina es una limitante, las células comenzarán a morir. Por otro lado, si la citocina está presente, las células serán sensibles a AICD vía Fas (Algeciras-Schimnich, et al/1999; Van Parijs, et al/1999). La relación inversa entre la viabilidad y la activación también se observó para el marcador ICAM-1 (CD54) durante los 3 y 6 días de activación, solamente cuando se realizó la prueba t-Student comparando la media entre viabilidad y el IFM ($p < 0.0019$). Esta relación posiblemente se puede explicar porque la función de CD54, es mantener la sinapsis inmunológica durante la presentación de antígeno entre el linfocito T y las perlas magnéticas acopladas a anti-CD3 y anti-CD28, y, entre más moléculas de CD54 se expresen en la célula, mayor será el tiempo de unión a la perla, asegurando así la activación completa del linfocito T CD4⁺, llevándose a cabo las tres etapas de uniones transitorias y estables.

El aumento en la viabilidad pudo deberse a la proliferación de las células activadas y a la aparición de las células T de memoria que reposan en la etapa G₀

del ciclo celular (Owen, J., et al 2014) con el consecuente cambio en la proporción perlas:célula.

El porcentaje de células que expresaron CD3, CD4 Y CXCR4 (CD184) fue mayor al 90%, antes de la activación, en todos los individuos. Sin embargo, para CD4⁺ no se observaron cambios significativos en el porcentaje de células y en el IFM después de 3 días de activación, pero sí para 6 días de activación. Por otra parte, el porcentaje de células CD3⁺ y CD184⁺ decayó en 2 de los 6 individuos a los 6 días de activación. Aunque el porcentaje de células positivas para estos últimos marcadores fue alto, la intensidad media de fluorescencia mostró una variación considerable entre los individuos, y decayó drásticamente con el tiempo de activación, lo cual hace pensar que la activación afecta la expresión de CD3 y CD184 disminuyéndolos al producirse la activación.

La intensidad de la fluorescencia para CD3 mostró que la expresión de este marcador decayó con el tiempo de activación. Este evento es típico de la activación mediada por el receptor de las células T (TCR) durante la presentación de antígenos. Tal como en el estudio realizado por Diehn, M., et al los productos de los genes implicados en el reconocimiento del TCR fueron reprimidos por efecto de la activación de las células T. Los genes involucrados fueron PLC, LAT, LCK, TRIM y CD3 ζ , al igual que los genes que codifican para las subunidades del TCR. Minami, Y., et al también concuerdan con la rápida internalización y degradación del TCR. Algunos estudios sugieren que el complejo TCR:CD3 se recicla (Krangel, M., 1987; Minami et al, 1987), mientras que otros han encontrado evidencia de su internalización, pero no de su reciclaje (Tax, W., et al, 1987).

La inhibición en la expresión de CD3 y CD4 es congruente con un mecanismo regulador de las células, después de la activación mediada por el TCR, como se describe en el párrafo anterior (Cai, Z., et al 1997). La inhibición y la degradación de receptores de membrana es común en los receptores que están asociados a la actividad de proteínas tirosina cinasas (PTK) y en muchos casos, se ha demostrado que estos procesos están controlados por la actividad de tirosina cinasa (Dumont, C., et al 2002).

Por otro lado, el decremento del nivel de expresión de CXCR4 debido a la activación por el TCR coincide con el trabajo de Murphy (2012), en el que éste decremento se dio debido al cambio de fase en el ciclo celular, aunado a la activación de linfocitos debida al rodamiento durante la extravasación para dar por resultado la liberación de las células activadas a la circulación (Owen, J., et al 2014). En un estudio realizado por Secchiero et al., se demostró que la activación de linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica vía CD3 disminuye la expresión de CXCR4 y que muy por el contrario, cuando se utiliza CD28 para activar las células, la expresión de CXCR4 aumenta. Por otro lado, al utilizar ambos anticuerpos acoplados a perlas magnéticas, se observó una expresión del marcador intermedia entre ambos anticuerpos por separado.

La disminución de la expresión de CD4 al día 6 de activación reportada aquí contrasta con un estudio previo efectuado en nuestro grupo, en el cual se observó que la expresión de CD4 aumentó después de la activación con el mismo tipo de estímulo (Cortés, C., 2013). Esta diferencia pudo deberse a que en el trabajo previo, el índice de fluorescencia media (IFM) se calculó con base en la unión del

control de isotipo a las células no activadas. En cambio, en el presente estudio el IFM se calculó respecto a la unión del control de isotipo determinada en paralelo en las células activadas. Como se observa en la figura 10, la unión del control de isotipo aumentó en las células activadas durante 6 días, por lo cual es necesario corregir la lectura de unión del anticuerpo anti-CD4 respecto a este control. Si esta corrección se realiza, entonces se obtiene que la expresión de CD4 no aumenta. El incremento en la unión de ambos anticuerpos (isotipo y anti-CD4) a las células activadas puede ser producto del incremento del volumen celular y a cambios en la composición de la membrana plasmática (Harder, T., 2012).

PERSPECTIVAS

Para experimentos futuros de infección de linfocitos T CD4⁺ con el VIH-1 se puede considerar que los linfocitos T CD4⁺ purificados de banco de sangre con los procedimientos descritos aquí, se encuentran en reposo.

Se recomienda infectar los linfocitos antes de los 3 días de activación, ya que a ése tiempo se detectó un nivel óptimo de expresión de marcadores de activación y un nivel alto (aunque muy variable) de expresión de CD4, con un nivel moderado de expresión de CD184.

Se debe considerar que la presencia de una cantidad considerable de células no viables podría interferir en los procedimientos experimentales, por ejemplo, causando la unión inespecífica de virus o de citocinas, reduciendo su disponibilidad neta en el cultivo.

Para caracterizar adicionalmente el efecto de la activación de los linfocitos con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, es preciso determinar el perfil de citocinas que producen.

El procedimiento de activación utilizado aquí se puede complementar con la adición de citocinas específicas que inducir la polarización de las células hacia diferentes subtipos (Th1, Th2, Th17, y otros).

CONCLUSIONES

Los linfocitos T CD4⁺ purificados presentaron ausencia de expresión de CD25 y CD54, así como un perfil de tamaño y granularidad compatible con células en estado de reposo.

La purificación con el CD4⁺ T Cell Isolation Kit human MACS (Miltenyi) permitió obtener linfocitos T CD4⁺ con alta pureza, así como un rendimiento promedio de 14×10^6 con 100% de viabilidad a partir de 10 ml de suspensión leucocitaria original.

La activación:

- indujo el cambio morfológico esperado en las células
- indujo la expresión de los marcadores CD25 e ICAM-1 en la mayoría de las células después de 3 días de activación.
- produjo la disminución de la viabilidad celular, y el aumento del nivel de expresión de CD25 y CD54, a partir de 3 días de activación.
- provocó cantidades variables de células no viables (25-55% y 10-40%, después de 3 y 6 días de activación, respectivamente).
- no produjo cambios en el nivel de expresión de CD4 después de 3 días, pero sí después de 6 días.
- produjo el decaimiento de la expresión de CD3 y CD184 a lo largo del tiempo de activación.

APÉNDICE

CITOCINA	FUNCIÓN
IL-1	Los efectos <i>in vivo</i> son inducción de inflamación local y efectos sistémicos, como fiebre, la respuesta de la fase aguda, y estimulación de la producción de neutrófilos
IL-2	Estimula la proliferación y diferenciación de células T
IL-3	Factor de crecimiento para células hematopoyéticas
IL-4	Promueve la diferenciación de células T vírgenes hacia células Th2. Promueve respuestas alérgicas
IL-5	Induce la formación y diferenciación de eosinófilos. Estimula el crecimiento y la diferenciación de células B
IL-6	Regula funciones de células B y T. Induce inflamación y la respuesta de fase aguda
IL-9	Estimula la proliferación de linfocitos T y precursores hematopoyéticos
IL-12	Induce la diferenciación a células Th1
IL-13	Está implicada en respuestas Th2; suprime respuestas inflamatorias
IL-16	Quimioatrayente para células T CD4 ⁺ ,

	monocitos y eosinófilos. La unión de IL-16 por CD4 inhibe la infección de células CD4 ⁺ por VIH
IL-17	Promueve la inflamación al aumentar la producción por células epiteliales, endoteliales y fibroblastos de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, TNF y quimiocinas que atraen monocitos y neutrófilos
INF γ	Induce diferenciación de Th1, activa macrófagos, incrementa la expresión de moléculas del MHC I y II; aumenta la presentación de antígeno
CXCL12	Quimiocina derivada de células del estroma
TNF	Factor de necrosis tumoral. Interviene en la inflamación y la apoptosis

BIBLIOGRAFÍA

- Aarvak, T., Bonyhandi, M., Lien, E. and Åmellem, Ø. Dynabeads CD3/CD28 CTS for T cell isolation, activation and expansion. Disponible en https://tools.thermofisher.com/content/sfs/posters/Dynabeads_CD3-CD28_Poster.pdf
- Aloia, R., Tian, H., and Jensen, F. (1993). Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:5181-5185.
- Abbas, A., and Sharpe, A. (1999). T cell stimulation: an abundance of B7's. *Nature Medicine.* 5:1345-1346.
- Algeciras-Schimmich, A., Griffith, T., Lynch, D. and Paya, C. (1999). Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 162:5205-5211.
- Bachmann, M., Oxenius, A., Speiser, D., Mariathasan, S., Hengartner, H., Zinkernagel, R. and Ohashi, P. (1997). Peptide-induced T cell receptor down-regulation on naïve T cells predicts agonist/partial agonist properties and strictly correlates with T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 27, 2195-2203.
- Ballestas, M., and Benveniste, E. (1995). Interleukin 1-beta and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of ICAM-1 gene expression in astrocytes requires protein kinase C activity. *Glia.* 14:267-278.
- Barbeau, B., Fortin, J., Genois, N., and Tremblay, M. (1998). Modulation of Human Immunodeficiency Virus type 1 induced syncytium formation by the conformational state of LFA-1 determined by a New Luciferase Based Syncytium Quantitative Assay. *Journal of Virology.* 72(9):7125-7136.

- Berger, E., Murphy, P. and Farber, J. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17:657-700.
- Bleul, C., Fuhlbrigge, R., Casasnovas, J., Aiuti, A., Springer, T. (1996). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *The Journal of Experimental Medicine.* 184(3): 1101–9.
- Borroto, A., Lama, J., Niedergang, F., Dautry-Varsat, A., Alarcon, B. and Alcover, A. (1999). The CD3 epsilon subunit of the TCR contains endocytosis signals. *J. Immunol.* 163, 25-31.
- Buckle, A. and Hogg, N. (1990). Human memory T cells express intercellular molecule-1 which can be increased by interleukin 2 and interferon- γ . *Eur. J. Immunol.* 20:337-341.
- Cai, Z., Kishimoto, H., Brunmark, A., Jackson, M., Peterson, P. and Sprent, J. (1997). Requirements for peptide-induced T cell receptor downregulation on naïve CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 185, 641-651.
- Cantrell, D., Davies, A., Londei, M., Feldman, M. and Crumpton, M. (1987). Association of phosphorylation of the T3 antigen with immune activation of T lymphocytes. *Nature.* 325, 540-542.
- Chan, D. and Kim, P. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell.* 93(5):681-684.
- Chowdhury, L., Koyanagi, Y., Kobayashi, S., Hamamoto, Y., Yoshiyama, H., Yoshida, T., and Yamamoto, N. (1990). The phorbol ester TPA strongly

inhibits HIV-1 induced syncytia formation but enhances virus production: possible involvement of protein kinase C pathway. *Virology*. 176:126-132.

- Cobb, R., Felts, K., Parry, G., and Mackman, N. (1996). Proteasome inhibitors block VCAM-1 and ICAM-1 gene expression in endothelial cells without affecting nuclear translocation of nuclear factor-kappa B. *Eur. J. Immunol.* 26:839-845.
- Cortés, C. (2013). Efecto de la activación sobre la fusión de linfocitos T inducida por las proteínas de la envoltura del VIH (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- De Clercq, E. (2003). The bicyclam AMD3100 story. *Nat. Rev.* 2:581-587.
- DeRossi, A., Pasti, M., Mammano, F., Ometto, L., Giaquinto, C. y Chieco-Bianchi, L. (1991). Perinatal infection by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): relationship between proviral copy number in vivo, viral properties *in vitro*, and clinical outcome. *J. Med. Virol.* 35:283-289.
- Diehn, M., Elizadeh, A., Rando, O., Long, C., Stankunas, K., Bostein, D., Crabtree, G., and Brown, P. (2002). Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(18):11796-11801.
- Dietrich, J., Hou, X., Wegener, A. and Giesler, C. (1994). CD3 γ contains a phosphoserine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell. *EMBO J.* 13, 2156-2166.
- Dietrich, J. and Geisler, C. (1998). T cell receptor zeta allows stable expression of receptors containing the CD3 gamma leucine-based receptor-sorting motif. *J. Biol. Chem.* 273, 26281-26284.

- Doyle, C. and Strominger, J. (1987). Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature*. 330:256-259.
- Dubey, C., and Croft, M. (1996). Accessory molecule regulation of naïve CD4 T cell activation. *Immunol. Res.* 15:114-125.
- Dumont, C., Blanchard, N., Bartolo, V., Lezot, N., Dufour, E., Jauliac, S. and Hivroz, C. (2002). TCR/CD3 Down-modulation and ζ degradation are regulated by ZAP-70. *J. Immunol.* 169:1705-1712.
- Ghera, P., Hooft van Huijsduijnen, R., Whelan, J., Cambet, Y., Pescini, R., and DeLamar, J. (1994). Inhibition of E-selectin gene transcription through a cAMP-dependent protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 269:29129-29137.
- Golding, H., Manischewitz, J., Vujcic, L., Blumenthal, R. and Dimitrov, D. (1994). The phorbol ester Phorbol Myristate Acetate inhibits Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope mediated fusion by modulating an accessory components in CD4 expressing cells. *Journal of Virology*. 68 (3):1962-1969.
- Goldsby, R., Kindt, T., Osborne, B. and Kuby, J. (2005). *Inmunología*. Mc Graw Hill, México.
- Gowda, S., Stein, B., Mohaghehpour, N., Benike, C., and Engleman, E. (1989). Evidence that T cell activation is required for HIV-1 entry in CD4+ lymphocytes. *The Journal of Immunology*. 142 (3):773-780.
- Harder, T. (2012). The T cell plasma membrane lipid bilayer stages TCR-proximal signaling events. *Frontiers in Immunology*. 3(50):1-3.

- Hemmer, B., Stefanova, I., Vergelli, M., Germain, R. and Martin, R. (1998). Relationships among TCR ligand potency, thresholds for effector function elicitation, and the quality of early signaling events in human T cells. *J. Immunol.* 160, 5807-5814.
- Hou, D., Cenciarelli, C., Jensen, J., Nguyen, H. and Weissman, A. (1994). Activation-dependent ubiquitination of a T cell antigen receptor subunit on multiple intracellular lysines. *J. Biol. Chem.* 269, 14244-14247.
- Hviid, L., Felsing, A., and Theander, T. (1993). Kinetics of human T-cell expression of LFA-1, IL-2 receptor, and ICAM-1 following antigenic stimulation *in vitro*. *J. Clin. Lab. Immunol.* 40:163-171.
- Itoh, Y., Hemmer, B., Martin, R. and Germain, R. (1999). Serial TCR engagement and down-modulation by peptide:MHC molecule ligands: relationship to the quality of individual TCR signaling events. *J. Immunol.* 162, 2073-2080.
- Jobin, C., Hellerbrand, C., Licato, L., Brenner, D., and Sartor, R. (1998). Mediation by NF-kappa B of cytokine induced expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in an intestinal epithelial cell line, a process blocked by proteasome inhibitors. *Gut.* 42:779-787.
- Johnson, K. and Kornfeld, S. (1992). The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi. *J. Cell Biol.* 119, 249-257.
- Konig, R., Fleury, S., and Germain, R. (1996). The structural basis of CD4-MHC class II interactions: coreceptor contributions to T cell receptor antigen

recognition and oligomerization-dependent signal transduction. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 205:19-46.

- Krangel, M. (1987). Endocytosis and recycling of the T3-T cell receptor complex. The role of T3 phosphorylation. *J. Exp. Med.* 165, 1141-1159.
- Lauritsen, J., Christensen, M., Dietrich, J., Kastrup, J., Odum, N. and Geisler, C. (1998). Two distinct pathways exist for down-regulation of the TCR. *J. Immunol.* 161, 260-267.
- Langsdorf, C., Bradford, J., Buller, G., Liu, J., Bantly, A., Kang, H. and Gee, K. A comparison of three techniques to induce efficient *ex vivo* T cell expansion. Disponible en: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/posters/CYTO-Poster-484-Proliferation-with-CellTrace-Violet2.pdf>
- Levy, J. (2007). HIV and the pathogenesis of AIDS. Third ed. Washington, D.C.: ASM Press.
- Liu, H., Rhodes, M., Wiest, D. and Vignali, D. (2000). On the Dynamics of TCR:CD3 complex: cell surface expression and downmodulation. *Immunity.* 13, 665-675.
- Louis, R., Shute, J., Biagi, S., Stanciu, L., Marrelli, F., Tenor, H., Hidi, R. and Djukanovic, R. (1997). Cell infiltration, ICAM-1 expression, and eosinophil chemotactic activity in asthmatic sputum. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155:466:472.
- Luo, B., Carman, C., and Springer, T. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 25:619-647.

- Marsh, M., and Pelchen-Matthews, A. (1996). Endocytic and exocytic regulation of CD4 expression and function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 205, 107-135.
- Minami, Y., Samelson, L., and Klausner, R. (1987). Internalization and Cycling of the T Cell Antigen Receptor: Role of Protein Kinase C. *The Journal of Biological Chemistry.* 262 (27):13342-13347.
- Mohagheghpour, N., Chakrabarti, R., Stein, B., Gowda, S., and Engleman, E. (1991). Early activation events render T cells susceptible to HIV-1 induced syncytia formation. *The journal of Biological Chemistry.* 266(11):7233-7238.
- Moore, J., McKeating, J., Weiss, R. and Sattentau Q. (1990). Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science.* 250:1139-1142.
- Munck, C., Christenen, E., Andresen, B., and Moller, B. (1992). Internalization, lysosomal degradation and new synthesis of surface membrane CD4 phorbol ester-activated T-lymphocytes and U937 cells. *Exp. Cell Res.* 201:160-173.
- Murphy, K. (2012). *Janeway's Immunobiology.* Ed. Garland Science. USA.
- Myszka, D., Sweet, R., Hensley, P., Brigham, M., Kwong, P., Hendrickson, W., Wyatt, R., Sodroski, J. and Doyle, M. (2000). Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:9026-9031.
- Novak, E., Masewicz, S., Liu, A., Lernmark, A., Kwok, W., and Neporn, G. (2001). Activated human epitope-specific T cells identified by class II tetramers reside within a CD4 high, proliferating subset. *International Immunology.* 13(6):799-806.

- Owen, J., Punnett, J., Stranford, S. y Jones, P. (2014). *Kuby Inmunología*. 7^a ed. McGraw-Hill, México, D.F.
- Pelchen-Matthews, A., Boulet, I., Littman, D., Fagard, R., and Marsh, M. (1992). The protein tyrosine kinase p56^{lck} inhibits CD4 endocytosis by preventing entry of CD4 into coated pits. *J. Cell Biol.* 117, 279-290.
- Pelchen-Matthews, A., Parsons, I.J., and Marsh, M. (1993). Phorbol ester-induced down-regulation of CD4 is a multi-step process involving dissociation from p56^{lck}, increased association with clathrin-coated pits and altered endosomal sorting. *J. Exp. Med.* 178, 1209-1222.
- Pelchen-Matthews, A., da Silva, R., Bijlmarkers, M., Signoret, N., Gordon, S., and Marsh, M. (1998). Lack of p56^{Lck} expression correlates with CD4 endocytosis in primary lymphoid and myeloid cells. *Eur. J. Immunol.* 28:3639-3647.
- Potempa, S., Picard, L., Reeves, J., Wilkinson, D., Weiss, R. and Talbot, S. (1997). CD4 independent infection by human immunodeficiency virus type 2 strain ROD/B: The role of the N-terminal domain of CXCR4 in fusion and entry. *J. Virol.* 71:4419-4424.
- Salio, M., Valitutti, S., and Lanzavecchia, A. (1997). Agonist-induced T cell receptor down-regulation: molecular requirements and dissociation from T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 27, 1769–1773.
- Secchiero, P., Zella, D., Curreli, S., Mirandola, P., Capitani, S., Gallo, R., and Zauli, G. (2000). Engagement of CD28 modulates CXC chemokine receptor 4 surface expression in both resting and CD3-stimulated CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 164:4018-4024.

- Sippy, B, Hofman, F., Wright, A., Wang, J., Gopalakrishna, R., Gundimeda, U., He, S., Ryan, S., and Hinton, D. (1996). Induction of intercellular adhesion molecule-1 by tumor necrosis factor-alpha through the 55-kDa receptor is dependent on protein kinase C in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:597-606.
- Stanciu, L., and Djukanovic, R. (1998). The role of ICAM-1 on T-cells in the pathogenesis of asthma. *European Respiratory Journal.* 11:949-947.
- Tamura, D., Moore, E., Johnson, J., Zallen, G., Aiboshi, J., and Silliman, C. (1998). p38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates intercellular adhesion molecule-1 up-regulation on human pulmonary microvascular endothelial cells. *Surgery.* 124:403-407.
- Tax, W., van der Heijden, H., Capel, P. and Koene, R. (1987). Internalization (but no recycling) of T cell receptor, T3 antigen, and other T cell antigens. *Transplant. Proc.* 19, 273-276.
- Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E. and Lanzavecchia, A. (1995). Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375, 148–150.
- Valitutti, S., Muller, S., Salio, M. and Lanzavecchia, A. (1997). Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *J. Exp. Med.* 185, 1859–1864.
- Van de Stolpe, A., and Van der Saag, P. (1996). Intercelular adhesión molecule-1. *J. Mol. Med.* 74:13-33.

- Van Parijs, L., Ibraghimov, A., and Abbas, A. (1996). The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity*. 4(3):321-328.
- Van Parijs, L., and Abbas, A. (1998). Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science*. 280(5361):243-248.
- Van Parijs, L., Refaeli, Y., Lord, J., Nelson, B., Abbas, A. and Baltimore, D. (1999). Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity*. 11:281-288.
- Wang, X., Rickert, M. and García, K. (2005). Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its α , β and γ_c receptors. *Science*. 310:1159.
- Weiss, A., and Littman, D. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76, 263–274.
- Yamaguchi, Y., Matsumura, F., Wang, F., Akizuki, E., Liang, J., Matsuda, T., Okabe, K., Ohshiro, H., Horiuchi, T., Yamada, S., Mori, K., and Ogawa, M. (1998). Neutrophil elastase enhances intercellular adhesion molecule-1 expression. *Transplantation*. 65:1622-1628.
- Zaitseva, M., Romantseva, T., Manischewitz, J., Wang, J., Goucher, D., and Golding, H. (2005). Increased CXCR4 dependent HIV-1 fusion in activated T cells: role of CD4CXCR4 association. *Journal of Leucocyte Biology*. 78(6):1306-1317.
- Zhang J, Xu X, Liu Y. (2004), Activation-Induced Cell Death in T Cells and Autoimmunity. *Cell Mol Immunol*. 1(3):186-92