



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**IDENTIFICACIÓN DE UNA POBLACIÓN RESIDENTE DE PULMÓN CON
CARACTERÍSTICAS DE TRONCALIDAD QUE EXPRESA ISTMÍN 1**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

PRESENTA

CAROLINA ABIGAIL MARTINEZ MENDIOLA



CDMX MÉXICO, ENERO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: SANCHEZ NIETO SOBEIDA
VOCAL: Profesor: ORTEGA SOTO ENRIQUE
SECRETARIO: Profesor: VALLE RIOS RICARDO
1er. SUPLENTE: Profesor: MALDONADO JIMENEZ PERLA DEYANIRA
2° SUPLENTE: Profesor: GARZA AGUILAR SARA MARGARITA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO “FEDERICO GOMÉZ”**

**ASESOR DEL TEMA:
RICARDO VALLE RIOS**

**SUSTENTANTE (S):
CAROLINA ABIGAIL MARTÍNEZ MENDIOLA**

“La ciencia aún no ha podido demostrar si la locura es o no es la sublimidad de la inteligencia”- Edgar Allan Poe

“En el mundo de las ideas todo depende del entusiasmo, en el mundo real todo depende de la perseverancia”.- Johann Wolfgang von Goethe

AGRADECIMIENTOS

Gracias al proyecto IA207117 de PAPIIT por el apoyo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	6
RESUMEN	7
MARCO TEÓRICO	
1.1 EL SISTEMA INMUNOLÓGICO	8
1.2 POBLACIONES LINFOIDES EMERGENTES	11
1.3 ONTOGÉNESIS Y HEMATOPOYESIS	14
1.4 ISTHMIN	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 ANIMALES	18
2.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS	18
2.3 TINCIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA	20
2.4 CITOMETRÍA DE FLUJO	21
2.5 MODELO DE INFECCIÓN	22
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIÓN	42
PERSPECTIVAS	42
ANEXOS	43
REFERENCIAS	45

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1	Ontogenia de ILCs. 13
Fig. 2	Detección de ISM1 por citometría en células con morfología linfoide en diferentes tejidos. 23
Fig. 3	Expresión de ISM1 en células CD45+. 23
Fig. 4	Expresión de ISM1 en células con diferentes marcadores de linaje. 25
Fig. 5	Frecuencia de células ISM1+ en poblaciones de epitelio y endotelio. 27
Fig. 6	Frecuencia de ISM1 en las poblaciones linaje positivo y linaje negativo. 28
Fig. 7	Expresión de marcadores de ILCs en la población LIN-CD45+ ISM1+. 29
Fig. 8	Expresión de ISM1 en células c-Kit+. 30
Fig. 9	Expresión de CD127 en la población ISM1+ CD45-. 31
Fig. 10	Expresión de ISM1 en células CD34+CD45-. 32
Fig. 11	Expresión de ISM1 en células Sca-1+CD45-. 32
Fig. 12	Expresión de CD34 en células ISM1+Sca-1+c-Kit+. 33
Fig. 13	Expresión de ISM1 en células c-Kit+Sca-1+CD45-. 34
Fig. 14	Expresión de ISM1 en células c-Kit+CD34+CD45-. 34
Fig. 15	Expresión de integrinas en la población ISM1+. 35
Fig. 16	Frecuencia de ISM1 en ratón control y ratón infectado con <i>Pseudomonas aureginosa</i> . 36

RESUMEN

Isthmin-1 (ISM1) es una proteína identificada en el istmo del cerebro de *Xenopus sp.*, recientemente se mostró su capacidad proapoptótica y antiangiogénica mediada a través de sus receptores GRP78 y $\alpha v\beta 5$ que son expresados por células tumorales y células endoteliales respectivamente. En mamíferos ISM1 se expresa en piel, mucosas y en poblaciones linfoides CD3+ DX5+. Adicionalmente en experimentos no publicados se ha encontrado disminuida la expresión de ISM1 en células de pulmón ante retos antigénicos *in vitro* lo que apunta a un papel potencial de ISM1 en el sistema inmunológico; sin embargo, la caracterización fenotípica detallada de las células productoras de ISM1 no se ha llevado a cabo.

En este trabajo, se realizó una fenotipificación de las células ISM1+ obtenidas de pulmón, mediante tinciones de inmunofluorescencia y análisis de citometría de flujo, con el fin de conocer en qué células del sistema inmunológico está expresada. No se encontró expresión de ISM1 en células diferenciadas pero se encontró relación con marcadores como c-Kit, Sca-1 y CD34 los que apuntan a que la expresión de ISM1 se asocia a células con características de pluripotencia y autorenovación, así mismo, las células ISM1+ expresan los marcadores CD49a y CD49b, que apuntan a que estas células son residentes de tejido. Finalmente se implementó un modelo *in vivo* de infección con *Pseudomonas aeruginosa* para indagar los cambios de expresión de ISM1 encontrando una disminución de la población ISM1+ CD45-.

Considerando los antecedentes y resultados, la proteína ISM1 podría tener un papel en la biología de las células progenitoras que podría ser clave

durante la hematopoyesis y la diferenciación de progenitores mesenquimales en pulmón.

MARCO TEÓRICO.

SISTEMA INMUNOLÓGICO

La inmunidad innata está presente tanto en vertebrados como en invertebrados y es responsable de lo que comúnmente se denominan respuestas no específicas llevadas a cabo mediante receptores codificados en línea germinal denominados receptores de reconocimiento de patrones moleculares o PRRs. Estos reconocen a una amplia gama de moléculas que son compartidas por diferentes patógenos, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).

La participación de la inmunidad innata en la protección contra infecciones es fundamental, constituye la primera defensa que se interpone a patógenos y antígenos generando una respuesta rápida (Alberts, 2002). Se consideran como elementos de la inmunidad innata a la piel y mucosas que recubren el cuerpo, ya que mediante uniones epiteliales estrechas, péptidos antimicrobianos (defensinas) y moco, actúan como barrera contra la entrada de bacterias, parásitos y virus.

Las células que participan en la inmunidad innata son las células asesinas naturales (NKs), células dendríticas (DCs), neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y basófilos (Dranoff, 2004) que expresan receptores como Receptores tipo-Toll (TLRs) y Receptores tipo-NOD (NLRs). Los TLRs al reconocer PAMPs, como lipopolisacáridos (LPS), islas CpG, glucopéptidos, DNA de cadena sencilla entre otros, desencadenan la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-8, TNF-alfa, e IL-12 (Moreno y Sánchez-Ibarrola, 2013), necesarias para la regulación de la respuesta contra patógenos. Los NLRs poseen un dominio tipo NOD, que se encarga de la unión

a nucleótidos, que es común en esta familia de receptores cuya función es el reconocimiento de PAMPs a nivel intracelular y por tanto cooperan con los TLRs para lograr una señalización proinflamatoria (Franchi et. al., 2009). Otro elemento del sistema inmunológico innato es el sistema del complemento, un conjunto de alrededor de 20 proteínas solubles que median la muerte patógenos extracelulares y al mismo tiempo dirigen la fagocitosis de moléculas exógenas y bacterias por células del sistema inmunológico como neutrófilos y macrófagos (Alberts, 2002).

El tracto gastrointestinal y el sistema respiratorio están recubiertos por un tejido no queratinizado rico en mucopolisacáridos denominado mucosa, que recubre el epitelio luminal, este tejido constituye una protección contra microorganismos patógenos y participa en la tolerancia hacia la microbiota (Alberts, 2002), adicionalmente se ha descrito la presencia de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) que es definido como un órgano linfoide de estructura difusa, el principal se encuentra en el tracto gastrointestinal, comúnmente llamado GALT, y también el tejido linfoide asociado a bronquio (BALT), localizado en pulmón; ambos tienen contacto con un número alto de antígenos por lo que contribuye a la generación de linfocitos T y B activados por lo que intestino y pulmón se denominan como sitios efectores de la inmunidad (Vega-López, 2007). El BALT tiene contacto con diferentes antígenos proveniente de las vías aéreas e inicia respuestas inmunes locales y mantiene una correcta función inmunológica en pulmón (Randall, 2010). Específicamente, el pulmón es un tejido altamente vascularizado y está compuesto por un epitelio pseudoestratificado, en donde las células alveolares tipo 1 que recubren los alveolos junto con los capilares permiten un eficiente intercambio gaseoso; las células alveolares tipo 2 que componen aproximadamente 10% de la superficie alveolar son responsables de la producción de lípidos y proteínas surfactantes necesarias para la función pulmonar; También se encuentran las células neuroendocrinales que conectan

el sistema nervioso con el sistema endocrino, todos estos componentes funcionales se originan a partir de endodermo y los componentes vasculares y linfáticos, como células endoteliales y linfocitos respectivamente, se originan a partir de mesodermo (Cardoso y Whitsett, 2008).

Entre los componentes linfáticos en el pulmón se encuentran diversos tipos celulares como neutrófilos, eosinófilos, linfocitos B y T, DCs, y macrófagos; los neutrófilos y eosinófilos son las primeras células que arriban al sitio de la inflamación donde liberan moléculas citotóxicas con fin de eliminar al patógeno así como quimiocinas para el reclutamiento de otras células, como las DCs y macrófagos que son denominadas células profesionales presentadoras de antígeno (APCs) encargadas de reconocer y procesar antígenos que son presentados en el contexto del Complejo Principal de Histocompatibilidad tipo 1 y tipo 2 (MHC-I y MHC-II), en los nódulos linfáticos a los linfocitos T y comienzan los procesos de la selección y expansión clonal. Adicionalmente, los nódulos linfáticos son sitios en donde los linfocitos B activados por células dendríticas foliculares y linfocitos T foliculares dan origen a células plasmáticas que secretan anticuerpos. Los linfocitos B también activan a linfocitos T críticos en la defensa contra virus, hongos y bacterias, y participan en mantener la homeostasis pulmonar (Abbas y Lichtman, 2012). Las células TCD4+ son polarizadas a diferentes subpoblaciones como Th1, Th2 y Th17, T reguladores (FOXP3+) y también se generan linfocitos T citotóxicos (CD8+), para orquestar la respuesta inmunológica y lograr la resolución de la infección.

POBLACIONES LINFOIDES EMERGENTES

Con el avance tecnológico aplicado al estudio de las diferentes estirpes celulares linfoides como linfocitos B, linfocitos Th1, Th2, Th17, T reguladoras, NKs, DCs, macrófagos, etc., se ha podido describir de manera más exhaustiva a estas poblaciones y han surgido subpoblaciones recién descritas de linfocitos, antes ignoradas por su poca abundancia en sangre periférica, que poseen un papel que no resulta trivial en el sistema inmunológico, estas denominadas poblaciones linfoides emergentes tienen funciones distintas a aquellas poblaciones principales a pesar de la similitud fenotípica en cuanto a la expresión de proteínas de superficie, así como de factores de transcripción y citocinas.

Dentro de este grupo de poblaciones emergentes se encuentran los Linfocitos Inductores de Tejido (LTis), las Células Linfoides Innatas (ILCs) y las Células linfoides Tipo-innato (Tipo-ILC), aunque el papel que tienen todas estas poblaciones en el sistema inmunológico aún queda por ser establecido a detalle. Por otro lado, el descubrimiento de estas células retó los conceptos del desarrollo que se tienen de las estirpes celulares ya conocidas que derivan de la médula ósea, pues algunos tipos de ILCs poseen marcadores fenotípicos como como CD117 (c-Kit) o Sca-1, expresados en células pluripotentes (Walker y McKenzie, 2013).

LTis

Los LTis se describen inmunofenotípicamente como LIN⁻ CD45⁺ CD127⁺ (Anexo 1), dependientes de ROR γ T (Receptor nuclear Huérfano gamma asociado a Ácido retinoico) y se sabe que son esenciales para el desarrollo de placas de Peyer, nódulos linfáticos y a la generación de memoria inmunológica de linfocitos T CD4⁺ (Lane et. al., 2012); Las placas de Peyer son folículos linfoides que contienen linfocitos T, B, DCs y macrófagos que contribuyen a la

inmunovigilancia del tracto gastrointestinal, así como los nódulos linfáticos que se encuentran en diferentes puntos del sistema linfático y albergan, al igual que las placas de Peyer, células T y B, donde pueden ser activadas con el objetivo de mediar respuestas efectoras.

ILCs

Las ILCs se definen con marcadores LIN⁻ CD127⁺ CD117⁺ CD25⁺ y dependientes del factor de transcripción Inhibidor de Unión a DNA 2 (Id2); Las ILCs se descubrieron gracias a que tienen características similares a células T cooperadoras en términos de su producción de de citocinas, pues son capaces de producir IFN γ , IL-4 e IL-17. Las células T cooperadoras son linfocitos importantes ya que la secreción de citocinas de estas células pueden activar o suprimir la respuesta inmunológica y son necesarias para el cambio de isotipo en células B, sin embargo, las ILCs a diferencia de las T cooperadoras carecen de TCR o BCR por lo que no pueden activarse mediante la presentación de antígeno.

Las ILCs se han clasificado en subgrupos: ILC de grupo 1 (ILC1), dentro de este grupo también se han clasificado las células NK (Eberl, Colonna y Di Santo, 2015)., ILC de grupo 2 (ILC2) e ILC de grupo 3 (ILC3), debido a la similitud de citocinas secretadas que comparten con las células T cooperadoras Th1, Th2 y Th17 respectivamente. Cada uno de estos subgrupos es dependiente de un factor de transcripción diferente para su desarrollo, Factor de transcripción de T-box (T-bet) en ILC1, Proteína de unión a GATA-3 (GATA-3) en ILC2 y ROR γ T en ILC3. Estas células se han descrito en humano y en ratón (Fig. 1) ubicadas preferentemente en tejidos barrera (piel y mucosas), de manera funcional tienen un papel en la activación y reclutamiento de diferentes células, mantienen la integridad de tejidos, tienen actividad antitumoral y contribuyen al desarrollo de enfermedades autoinmunes (Shikhagaie et. al, 2017).

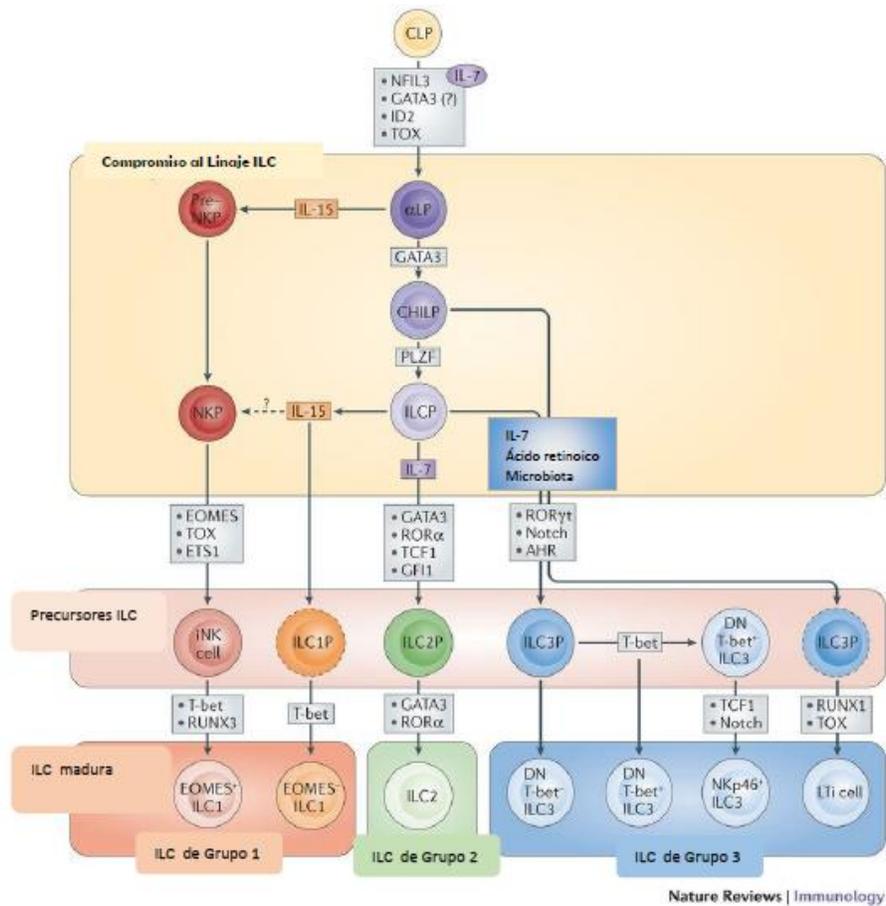


Figura 1. Ontogenia de ILCs Origen de los diferentes grupos de ILC y sus principales marcadores y factores de transcripción. Modificado de Serafini, Vosshenrich y Di Santo, 2015.

Células Tipo ILC

Adicionalmente a las ILCs existen otras poblaciones con las cuales comparten características fenotípicas aunque también poseen diferencias en cuanto a expresión antigénica y en propiedades funcionales (Godfrey, Stankovic y Baxter, 2010), Dentro de esta clasificación se incluyen las Células Asesinas invariante (iNKTs), el grupo más abundante de células T innatas, en su superficie expresan receptores típicos de células NKs y un Receptor de Célula T alfa (TCR α) de cadena invariante Va14Ja18 que se acopla a cadenas TCR β V β 2, V β 7 y V β 8.1-8.2 en ratón. En humano la cadena invariante es Va24Ja18

(homólogo de la cadena de ratón) y se acopla preferentemente a V β 11, este TCR invariante reconoce antígenos glicolipídicos presentados por la molécula CD1D, que pertenece a la familia de MHC-I pero no es polimórfico (Lantz y Bendelac, 1994). Otro grupo celular tipo innato de células que no usan presentación antigénica mediada por MHC-I son las Células T invariantes asociadas a mucosas (MAIT) que están restringidas a la Molécula asociada a MCH-I (MR-1) con la cadena invariante de TCR α Va19Ja33 (Va7.2Ja33 en humano) que reconocen metabolitos de vitamina B, células T $\gamma\delta$ V γ 1.1V δ 6.3 sin ligando conocido y células T CD8+ tipo innato de función desconocida (Weinreich et. al., 2010).

ONTOGÉNESIS Y HEMATOPOYESIS

El desarrollo de un organismo pluricelular se da a partir de múltiples divisiones celulares que deben ser organizadas y coordinadas para asegurar la correcta estructura y diversidad celular, a este proceso se le conoce como ontogénesis o morfogénesis. Este proceso comienza en el huevo fecundado, continúa durante la formación de órganos y cesa casi en su totalidad cuando el organismo llega a la vida adulta (Gilbert, 2000). La ontogénesis comienza con una célula troncal embrionaria (ESCs) que es capaz de diferenciarse a cualquiera de las tres líneas germinales, endodermo, mesodermo y ectodermo; a partir de mesodermo se originan dos estirpes celulares importantes, células troncales mesenquimales (MSCs) y células troncales hematopoyéticas (HSCs), las MSCs son células capaces de dar origen a diferentes tipos celulares incluyendo osteocitos (células óseas), condrocitos (células del cartílago), adipocitos (células grasas) y fibroblastos (células musculares) tanto *in vivo* como *in vitro* (Wakitani, 2007) dando origen a la mayoría de los tejidos que conforman a un organismo.

Adicionalmente, en sangre existen diferentes tipos de células con funciones específicas como intercambio gaseoso, coagulación y defensa contra infecciones, la generación de estas células es a partir de una única célula progenitora se llama hematopoyesis y es un proceso que ocurre continuamente durante toda la vida de un organismo pluricelular, una HSC da origen a células de linaje eritroide ,como eritrocitos y plaquetas, de linaje mieloide, tal como granulocitos y monocitos, y linaje linfoide que está conformado por los linfocitos. Durante el desarrollo embrionario la hematopoyesis ocurre en hígado fetal y saco vitelino; este proceso ocurre posteriormente en medula ósea donde existe el microambiente adecuado compuesto de osteoblastos, células mesenquimales y vasos sinusoidales, a lo que se conoce como un nicho hematopoyético.

Las HSCs se definen por su multipotencialidad y autorenovación, la multipotencialidad es la habilidad de generar células funcionales de diferentes linajes, y la autorenovación es definida como la obtención de células con las mismas características que la célula madre mediante división celular. Las HSCs se caracterizan por tener un tiempo de vida media prolongado, y expresan marcadores de superficie como Sca-1, c-Kit, CD34 y Stro-1.

Los procesos de sobrevivencia, proliferación y diferenciación en HSCs están modulados por citocinas, principalmente eritropoyetina (EPO), Factor Estimulante de Colonias de granulocitos (G-CSF), Factor Estimulante de Colonia de Macrófagos-Granulocitos (GM-CSF) e IL-5 (Metcalf, 2008) los cuales coordinan el compromiso hacia los linajes mieloide, linfoide o eritroide.

ISTHMIN

Isthmin es una proteína de 464 aminoácidos y peso molecular de aproximadamente 52 KDa que es codificada por el gen *ISM1*, fue descrita por primera vez en 2002 como una proteína secretada en la región cerebral del Istmo encefálico de *Xenopus laevis*. Durante el desarrollo embrionario del mesodermo es coexpresada con el Factor de Crecimiento de Fibroblastos-8 (Fgf-8) (Pera et. al 2002). Existen ortólogos de ISM1 en humano, ratón y gallo, además existe un homólogo del gen ISM1 denominado ISM2, cuya expresión está restringida al tejido placentario.

ISM1 está expresada preferencialmente en piel, tráquea, pulmón y otras mucosas. Adicionalmente se observó que algunas poblaciones de linfocitos T CD3+ DX5+ localizadas en el pulmón expresan ISM1 (Valle-Rios y Montero, 2014). Isthmin-1 posee un dominio de adhesión Asociado a MUC-4 y Otras Proteínas (AMOP) y un dominio de Repetidos de Trombospondina (TSR) además de un péptido señal para ser transportada al exterior de las células. El dominio TSR se encuentra presente en la familia de las proteínas de las trombospondinas ; en general, su presencia se ha asociado con actividad antiangiogénica y su función podría estar ligada a migración celular y remodelación tisular. El dominio AMOP está relacionado con procesos de adhesión celular y es mediante el cual ISM1 disminuye la proliferación celular, induce apoptosis y aumenta la adhesión de células endoteliales además de poseer actividad antiangiogénica *in vitro* (Xiang et. al., 2011). Isthmin-1 interacciona con el receptor $\alpha\beta 5$ logrando un efecto antiangiogénico y proapoptótico en células endoteliales. Otro receptor conocido de ISM1, GRP78, media la endocitosis de ISM1 para inducir apoptosis en células tumorales con expresión alta de GRP78 en membrana (Chen et. al., 2014).

Se ha descrito que ISM1 es capaz de inducir la permeabilidad endotelial en pulmón, mediante su interacción con GRP78 y la activación de la cinasa proto-

oncogénica Src que conlleva a la disrupción de uniones de VE-cadherina y B-catenina (Shruthi et. al., 2015). Por otro lado, hay evidencia que indica que las células que expresan ISM1 en el pulmón surgen de una población linfoide que no lleva a cabo los procesos de recombinación somática característicos de la inmunidad adaptativa, sugiriendo que guardan características innatas (Valle-Rios y Montero, 2014).

Además de su actividad biológica, el hecho de que ISM1 sea expresada preferentemente en tejidos barrera como piel y mucosa, adicional a las poblaciones linfoides, apunta a que ISM1 posee un papel propio de inmunovigilancia.

HIPÓTESIS

La población linfoide que expresa ISM1 comparte características con los ILCs, con un potencial papel efector en la respuesta inmune innata.

1.2 OBJETIVOS

Objetivo general

- Caracterizar la población linfoide que expresa Isthmin-1 mediante citometría de flujo.

Objetivos particulares.

- Caracterizar fenotípicamente las células que expresan Isthmin-1 con marcadores de linaje linfoide y mieloide.
- Identificar las subpoblaciones de linfocitos innatos que expresan Isthmin-1.
- Evaluar los cambios en la expresión de Isthmin-1 en un modelo de infección murino.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES.

Se utilizaron ratones de la cepa C57-BI/6J de 6 a 8 semanas de edad mantenidos en condiciones libre de patógenos específicos. Todos los ratones fueron manipulados conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y fueron sacrificados mediante dislocación cervical o cámara de CO₂ para posteriormente obtener los pulmones.

OBTENCIÓN DE CÉLULAS

a) Fundamento: Para analizar poblaciones celulares mediante citometría de flujo es necesario generar una suspensión donde existan células libres de matriz extracelular y de forma individual, así que dependiendo del tejido de origen se deben de procesar, existen órganos sólidos como corazón, riñones, hígado y pulmones los cuales deben ser sometidos a una digestión enzimática con el fin de liberar las células. En tejidos como médula ósea no es necesaria la digestión enzimática y basta un método físico para obtener células independientes.

b) Metodología:

Suspensión celular de pulmón: Cada ratón fue sacrificado y diseccionado. Se inyectaron lentamente 3 mL de PBS en el ventrículo izquierdo del corazón, esto con el propósito de eliminar células de sangre periférica, se extrajeron los pulmones y se cortaron en trozos de aproximadamente 5 mm, posteriormente se colocaron en el siguiente medio de digestión: 20 mL de medio DMEM suplementado con SFB 5% con 20 mg de colagenasa (Sigma) y 8 µL de DNAsa (Sigma), la mezcla se incubó a 37°C con una agitación constante a 150 rpm durante 11

min, posteriormente se filtró la suspensión celular a través de una malla de 70 μm y se obtuvo el botón celular mediante centrifugación a 4°C 1500 rpm durante 5 min. De ser necesario se añadió buffer de lisis de eritrocitos y finalmente se resuspendió en 1 mL de medio DMEM para contar las células con azul tripano en cámara de Neubauer.

Suspensión celular de lámina propia: Se realizó la disección de un ratón y se extrajo el intestino delgado realizando un corte desde el ciego hasta el píloro, se enjuagó con PBS y se retiraron las heces, se separaron las placas de Peyer y el tejido sobrante se cortó de forma transversal y en pedazos de 2 cm de largo, posteriormente se colocaron en solución de Hanks con EDTA 0.5 mM y se filtró la mezcla final para conservar el tejido que se digirió en medio de digestión con 1.25 mg/mL colagenasa y 8 μL de DNAasa en agitación durante 20 minutos. Finalizado este proceso, la mezcla se filtró por una malla de 70 μm y se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos para obtener el botón celular, finalmente se resuspendió en medio medio DMEM.

Suspensión celular de Médula Ósea: Se diseccionó un ratón C57-BI/6J y se realizó un corte en las patas traseras para exponer los músculos, se extrajo el fémur realizando un corte debajo de los ligamentos de la rodilla para remover la tibia y limpia de tejido muscular y conectivo, se realizó un corte en ambos extremos del fémur y se insertó en un extremo una jeringa para insulina con 1 mL de PBS y se recolectó el contenido del hueso en un tubo o placa con 1 mL de medio DMEM estéril para realizar cuenta celular.

Suspensión celular de sangre periférica: Se realizó punción cardiaca de un ratón C57-BI/6J anestesiado con cloroformo, se puncionó el esternón del ratón hacia el corazón con una jeringa de 3 mL, una vez recolectada

la sangre se incubó con solución de lisis de eritrocitos, se centrifuga a 1500 rpm por 5 minutos y se resuspendió el botón celular con 1 mL de medio DMEM, y se realizó cuenta celular.

TINCIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA

- a) Fundamento: Esta técnica está basada en el reconocimiento de determinantes antigénicos por anticuerpos marcados con moléculas fluorescentes, estos anticuerpos tienen una alta especificidad hacia la molécula a la que están dirigidos, por lo que si se detecta la fluorescencia del fluorocromo con el que está marcado en anticuerpo se puede demostrar de manera indirecta la presencia del antígeno.
- b) Metodología: Se colocó la suspensión celular en buffer FACS, compuesto de buffer fosfato salino (PBS) con suero fetal bovino (SFB) al 2%, en tubos para citometría se ajustó la concentración celular a 1 millón de células por 200 μ L de buffer FACS donde posteriormente se añadieron los anticuerpos para cada tinción de superficie con la dilución adecuada (Anexo 1) y se incubaron durante 25 minutos en hielo y en oscuridad, se eliminó el exceso de anticuerpo mediante un lavado con 3mL de buffer FACS y las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min en hielo. Las células se permeabilizaron con dos lavados de 1 mL de buffer de permeabilización (marca Biolegend), las células se resuspendieron en 100 μ L de buffer FACS, y se añadieron los anticuerpos para tinción intracelular a la concentración necesaria (Anexo 1), se incubó 25 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron y fijaron. Para el marcador ISM1 se incluyeron controles con anticuerpo de control de isotipo, que es un anticuerpo con el mismo isotipo (IgG2a) y conjugado con el mismo fluorocromo (PE) que el anticuerpo ISM1, pero sin especificidad

antigénica y se utiliza como control para conocer la unión inespecífica que puede tener el anticuerpo.

CITOMETRÍA DE FLUJO

a) Fundamento: La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico, en la que una suspensión celular es captada mediante un sistema de fluidos, el propósito del sistema de fluidos es lograr que las células fluyan de tal manera que puedan atravesar individualmente el punto de cuestionamiento, este punto es exactamente donde los láseres inciden a través del flujo y cada evento que lo cruza es excitado y por tanto emite señales detectadas y filtradas por el sistema óptico para ser analizadas mediante software.

Los dos parámetros principales que detecta el equipo son tamaño (FSC) y complejidad (SSC) lo que permite agrupar las células que tienen características similares de tamaño y granularidad para estudiarlas como una población.

Posteriormente la población de interés puede ser analizada para otros parámetros de fluorescencia mediante gráficas de puntos (Dot plot) o histogramas, en los Dot plot en ambos ejes se grafica Intensidad de Fluorescencia Media (MFI) de dos canales (donde se detectan los fluorocromos) diferentes, por lo que resulta en un análisis bidimensional donde cada punto representa un evento analizado, el cual puede resultar positivo para uno, para dos o para ninguno de los fluorocromos de interés.

De manera general si el área de la gráfica lo consideramos como un plano cartesiano, en el primer cuadrante se encuentran todos aquellos eventos que resultan positivos para la señal de fluorescencia en ambos canales denominados doble positivos (DP), en el segundo cuadrante

aquellos que solo presentan señal en el canal seleccionado en el eje de las abscisas, en el tercer cuadrante los eventos únicamente positivos para el canal seleccionado en el eje de las ordenadas y en el cuarto cuadrante los que no presentan señal alguna considerados dobles negativos (DN); En los histogramas se grafica el canal de interés contra la cuenta del número de eventos.

- b) Metodología: Las suspensiones celulares fueron adquiridas en el citómetro CytoFlex LX y analizadas con el software CytExpert con excepción de algunos experimentos donde se usó el sorter MoFlo Beckman Coulter y los resultados fueron analizados en software Summit 2.3765.

MODELO DE INFECCIÓN MURINO

- a) Fundamento: *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria gram negativa causante de diversas infecciones entre ellas neumonía y en pacientes con fibrosis quística representa un agente causal de infecciones recurrentes. La infección causa infiltrados de neutrófilos y macrófagos en pulmón, se ha caracterizado con un respuesta predominante de Th2, con la expresión de citocinas IL-4, IL-13 y bajos niveles de IFN- γ .
- b) Metodología: Se inyectó vía intraperitoneal a ratones de la cepa C57-BI/6J con 1×10^6 Unidades Formadoras de Colonias (CFU) de *Pseudomonas aeruginosa* diluidas en 25ul de PBS o bien se inyectó vehículo (PBS) como control. Después de 24 horas post infección los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se confirmó la presencia de la bacteria en pulmón mediante cuenta de CFU, los pulmones se usaron para el protocolo de obtención de células.

CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA

Como primer acercamiento se evaluó la expresión de ISM1 a partir de suspensiones celulares obtenidas de diferentes tejidos lámina propia, sangre periférica y medula ósea, observándose que estos tejidos presentan una menor proporción de células ISM1+ comparados con el pulmón cuando es evaluado mediante citometría (Fig. 2). A partir de una selección en un gráfico de FSC contra SSC que nos permite analizar las células con morfología linfoide, se evaluaron a células obtenidas de pulmón que expresan la tirosinfosfatasa CD45, un panmarcador leucocitario y a las células ISM1+, encontrando que las células que coexpresan ISM1 y CD45 representan alrededor del 10% y la población CD45- que expresa ISM1 representa el 90% (Fig. 3).

Para definir con más detalle el fenotipo las células CD45+ISM1+, se evaluó la población de interés con marcadores de linaje de manera individual (CD3e, CD4, CD8a, CD11b, CD11c, CD19, TER119, Ly6G y FcRe1) (Fig. 4). Se observó que las poblaciones con linaje mieloide definidas con los marcadores: CD11c, TER119, CD11b, FcRe1 y Ly6G, en conjunto contienen el menor porcentaje de células ISM1+, con excepción de CD11b cuyo porcentaje es de 0.47%. Las células linfoides definidas con los marcadores: CD3, CD4, CD8 y CD19 contienen a un mayor porcentaje de células ISM1, alrededor del 1% en su conjunto, coincidiendo con lo previamente reportado por Valle-Rios y Montero.

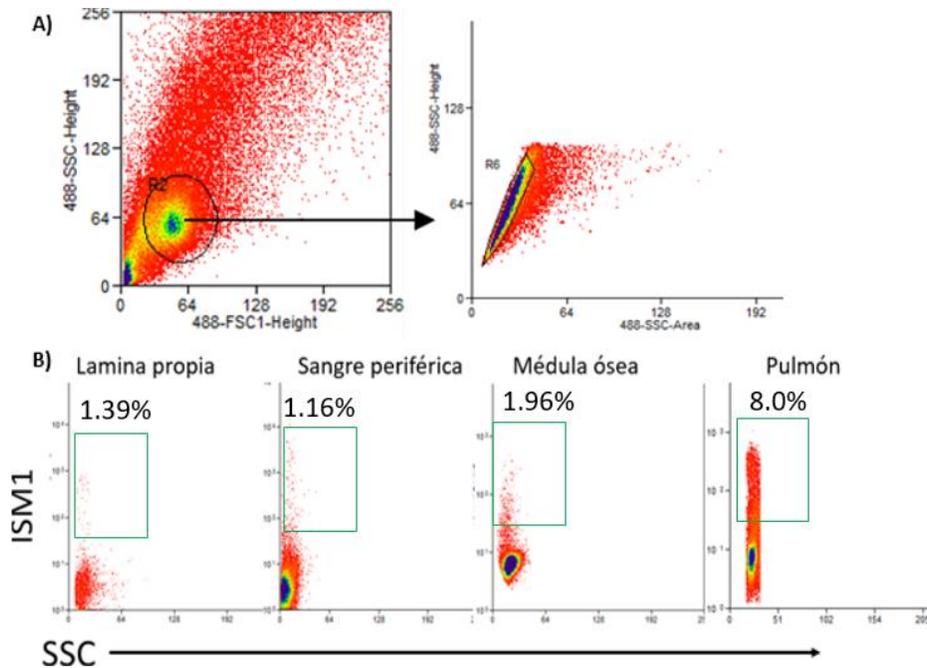


Figura 2. Detección de ISM1 por citometría en células con morfología linfoide en diferentes tejidos. A) Estrategia de selección de morfología linfoide, B) Frecuencia de células ISM1+ en Lámina propia (1.39%), sangre periférica (1.16%), médula ósea (1.96%) y pulmón (8%). Analizados en Summit 2.3756. Citómetro MoFlo Astrios BC. (Resultados representativos de 2 experimentos de una mezcla de células obtenidas de 2 ratones).

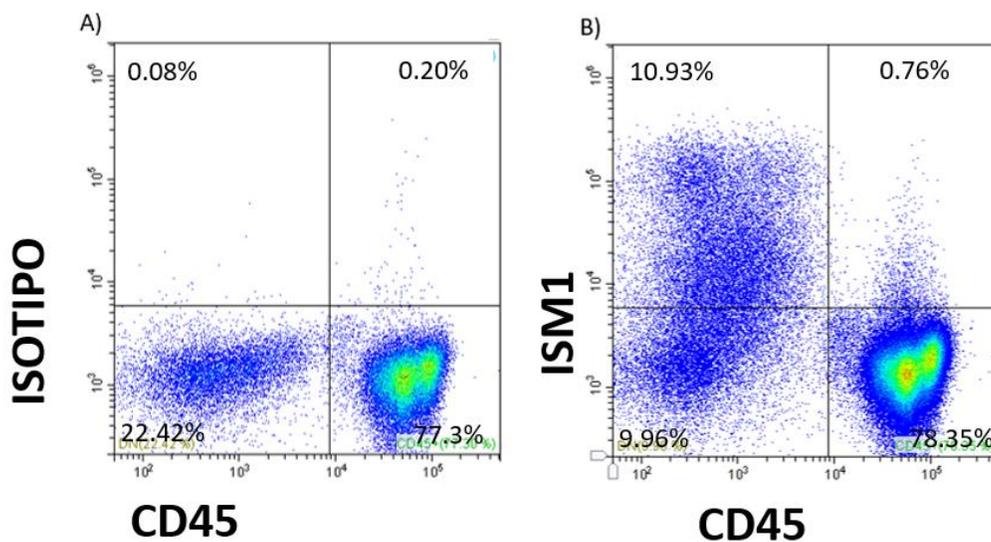


Figura 3. Expresión de ISM1 en células CD45 en pulmón. A) Control de Isotipo (CD45- 0.08% y DP 0.20%), B) Frecuencia de células ISM1+ en células CD45- (10.93%) y CD45+ (0.76%). (Resultados representativos de 3 experimentos utilizando una mezcla de células obtenidas de 3 ratones)

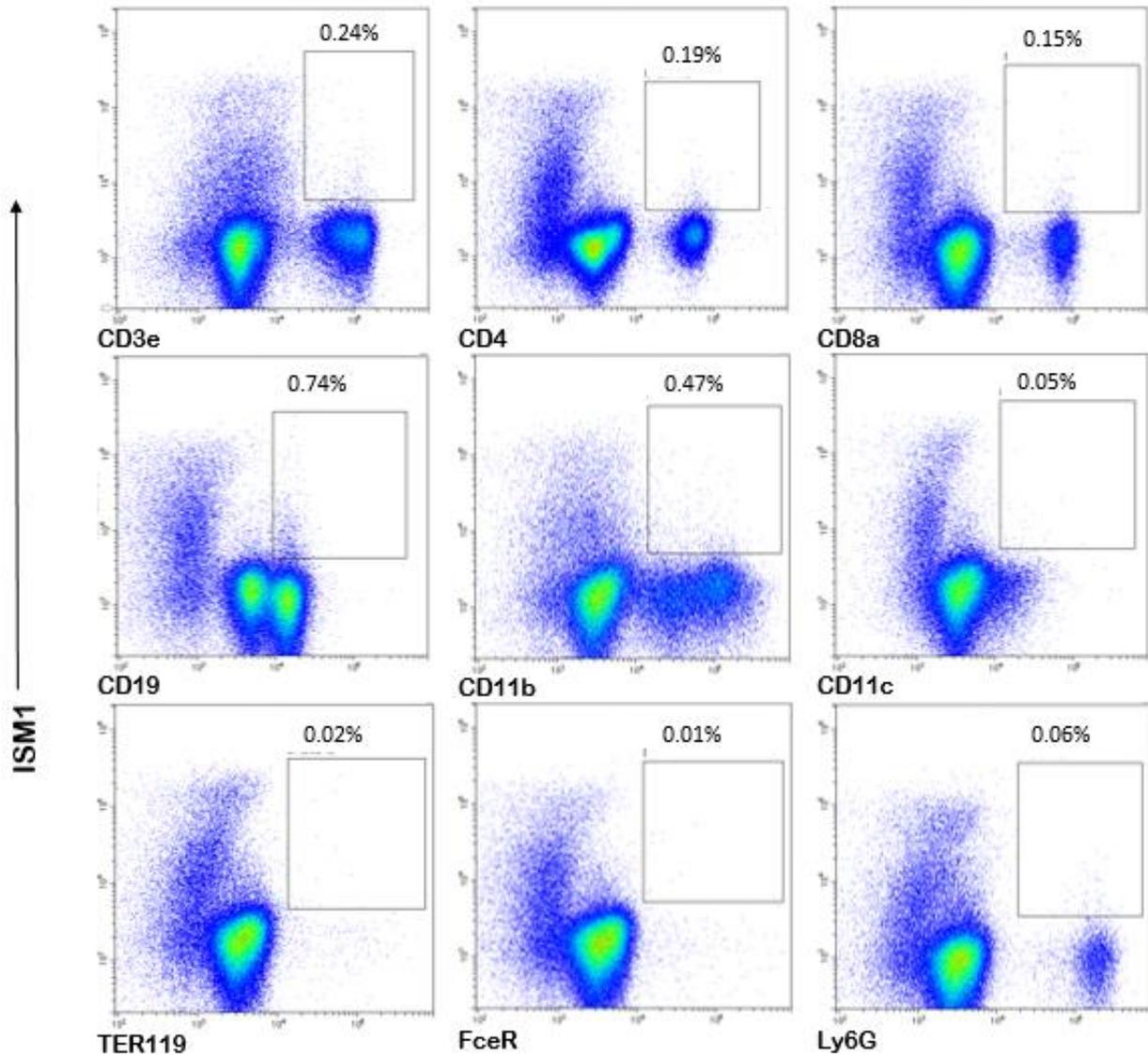


Figura 4. Expresión de ISM1 en células con diferentes marcadores de linaje. CD3e+ (17.96%) DP (0.24%). CD4+ (8.61%) DP (0.19%), CD8a+ (5.52%) DP (0.15%), CD19+ (22.37%) DP (0.74%), CD11b+ (27.28%) DP (0.47%), CD11c+ (1.23%) DP (0.05%), TER119+ (0.08%) DP (0.02%), FceR+ (0.38%) DP (0.01%), Ly6G+ (9.77%) DP (0.61%). Control de Isotipo CD3e (0.04%), CD4 (0.7%), CD8a (0.01%), CD19 (0.15%), CD11b (0.14%), CD11c (0.01%), TER119 (0.0%), FceR (0.01%), Ly6G (0.03%), (resultados representativos de 3 experimentos, utilizando una mezcla de células obtenidas de 5 ratones).

Considerando que la mayoría de las células ISM1 carecen del marcador CD45 y no se encontró una correlación evidente con alguna población leucocitaria diferenciada y tomando en cuenta la alta expresión de ISM1 en tejido epitelial particularmente en piel (Valle-Rios y Montero, 2014), nos preguntamos si estas células podrían provenir del epitelio pseudoestratificado que compone el tejido pulmonar. Esto se verificó utilizando un anticuerpo contra Ep-Cam, una proteína transmembranal de adhesión dependiente de calcio presente en células epiteliales. Así mismo, considerando que algunas células endoteliales podrían presentarse debido al proceso de digestión celular del pulmón, evaluamos la presencia de VEGFR2, un receptor para el factor de crecimiento endotelial, sin embargo no se encontró expresión significativa de ISM1 en ninguno de estos tipos celulares (Fig. 5).

Descartando el origen epitelial o endotelial de ISM1, retomamos la caracterización usando un coctel de anticuerpos que contiene todos los marcadores antes mencionados para linaje con el fin de verificar si la población ISM1 se localiza en la porción LIN-. Se confirmó la baja presencia de ISM1 en la población LIN+ ya que en esta población el 4.7% de las células es positiva para la expresión de ISM1, mientras que en la población LIN- el 18.53% de estas células son positivas para ISM1 (Fig. 6), concluyendo que la población ISM1+ se encuentra enriquecida en la población que carece de marcadores de linaje y de acuerdo con los datos anteriores también carece de la expresión de CD45 (Fig. 3).

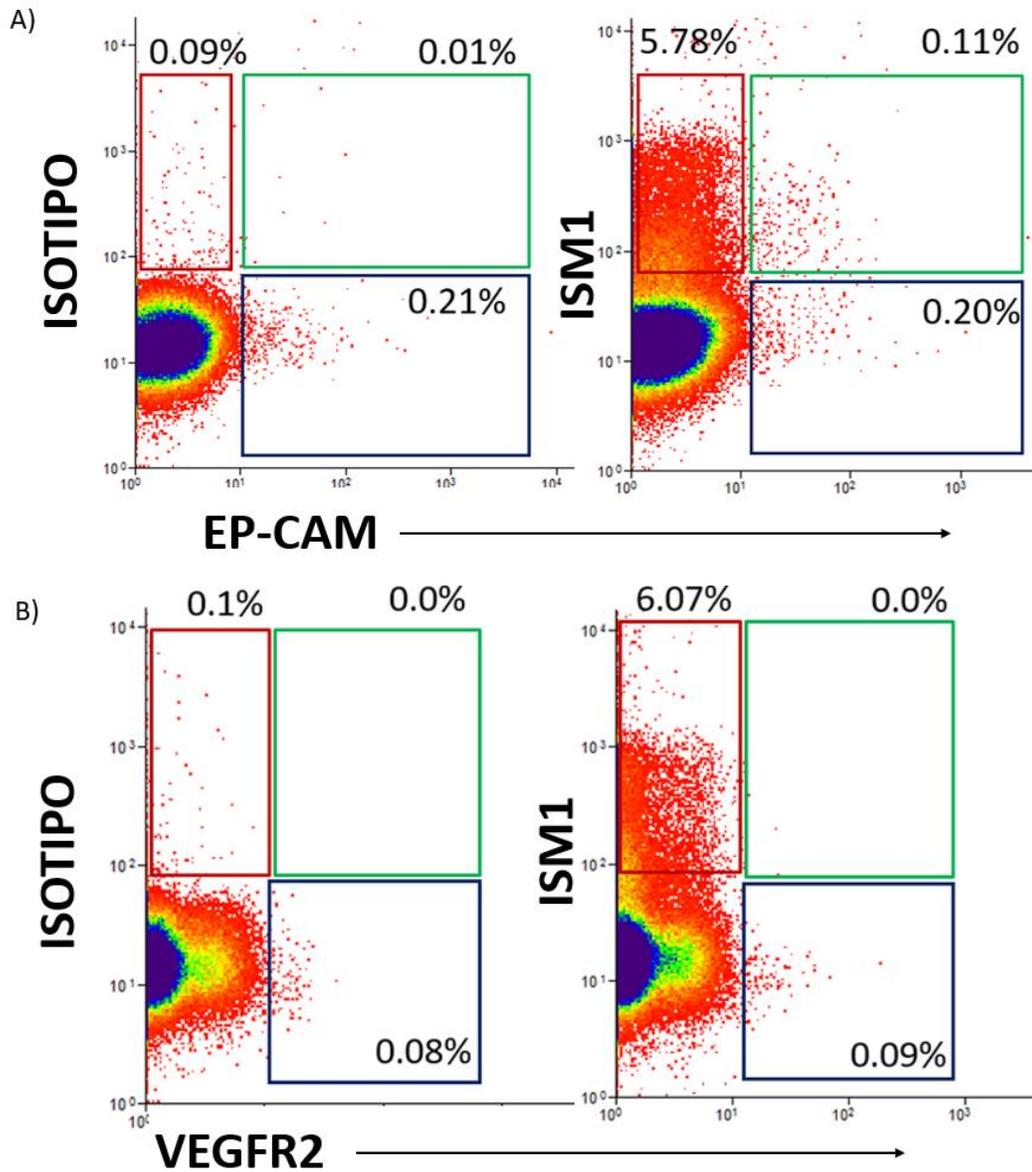


Figura 5. Frecuencia de células ISM1+ en poblaciones de epitelio y endotelio. A) Control de Isotipo (0.1%), EpCAM (0.20%) ISM1+ EpCAM- (5.78%) DP (0.00%) B) Control de Isotipo (0.1%), VEGFR2 (0.09%) ISM1+ VEGFR2- (6.07%) DP (0.0%) (Resultados representativos de 2 experimentos, utilizando una mezcla de células obtenidas de 2 ratones).

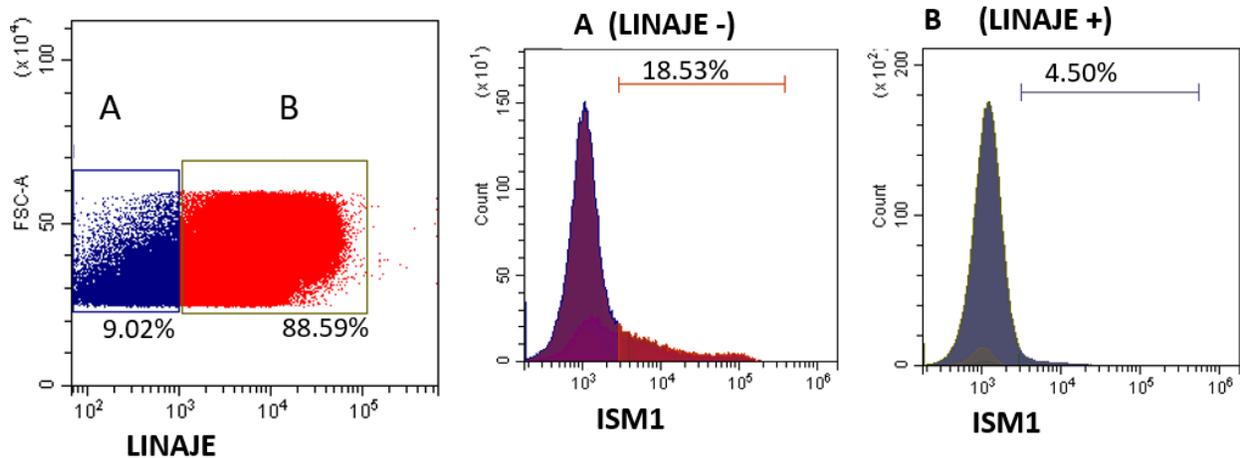


Figura 6. Frecuencia de ISM1 en las poblaciones linaje positivo y linaje negativo. A) Frecuencia de la expresión de ISM1 en la población LIN- 18.53% (Isotipo 0.63%, no mostrado) y B) Frecuencia de la expresión de ISM1 en la población LIN+ 4.50% (Isotipo 0.56%, no mostrado) (Resultados representativos de 2 experimentos, utilizando una mezcla de células obtenidas de 3 ratones).

Dado que una porción de las células ISM1+ es LIN-CD45+ (Figs. 3-4,6), lo cual correlaciona con marcadores globales de ILCs, implementamos una tinción multiparamétrica que incluyera los principales marcadores de ILCs: CD117 (receptor de IL-7), CD127 (c-Kit), CD161 (marcador de células NK conocido como NK1.1) y ST2 (receptor de IL-33), los resultados obtenidos demuestran que la población CD45+ LIN- carece de la expresión de CD127 un marcador característico de ILCs, así como NK1.1 un marcador de ILC1 y ST2 marcador de ILC2, indicando que no es una población ILC canónica, sin embargo sí expresan c-Kit (CD117) un receptor para Factor de Células Troncales (SCF), un ligando importante para la hematopoyesis (Fig. 7).

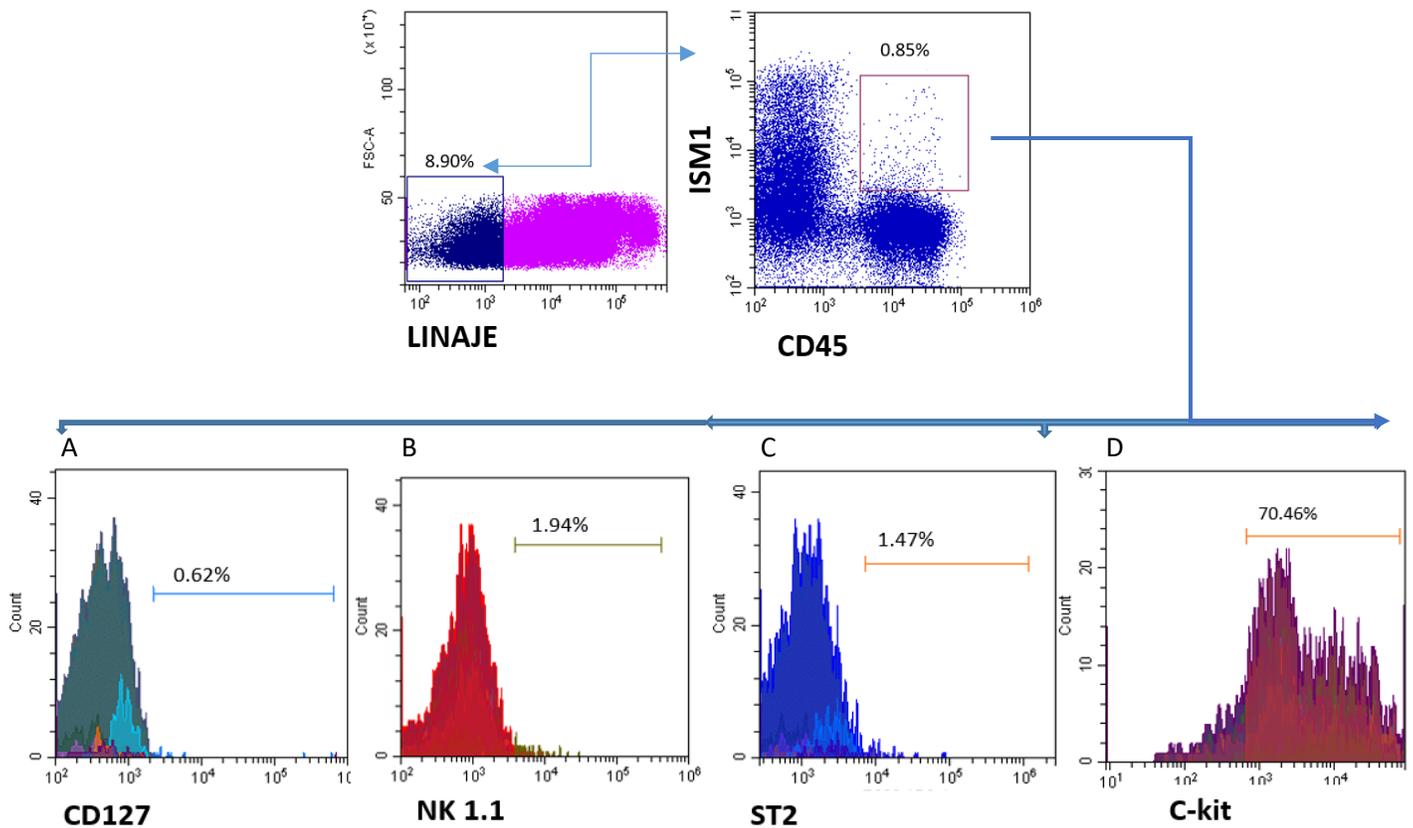


Figura 7. Expresión de marcadores de ILCs en la población LIN-CD45+ ISM1+. Frecuencia células ISM1+ CD45+ LIN- 0.85 % (Isotipo 0.37%, no mostrado), A) Frecuencia de CD127 (0.62%) , B) Frecuencia de NK 1.1 (3.48%), C) Frecuencia de ST2 (1.47%) y D) Frecuencia de c-Kit (70.46%). (Resultados representativos de 3 experimentos, utilizando una mezcla de células obtenidas de 3 ratones).

El receptor c-Kit es expresado por células precursoras; en este contexto, parte de la población precursora de ILC, los CLP (progenitor linfoide común), carecen de la expresión de CD45 manteniendo la expresión de c-Kit y CD127. En vista que la mayoría de las células ISM1+ son CD45-, analizamos la expresión de c-Kit e ISM1 en la población CD45-, confirmando una frecuencia de células dobles positivas ISM1+ c-Kit+ del 30.47% (isotipo 0.17%) y encontramos en la población CD45+ un porcentaje de dobles positivas ISM1+ c-Kit+ de 0.59% (isotipo 0.05%) (Fig.8). Consistente con esto la totalidad de la población ISM1 expresa c-Kit en un 76.92%, confirmando la correlación del

marcador c-Kit con ISM1 (Fig. 8). Mientras que para CD127 no se encontró expresión en las células ISM1+CD45- (Fig. 9) descartando el fenotipo de ILCs o de células linfoides que requieren de la presencia de IL-7.

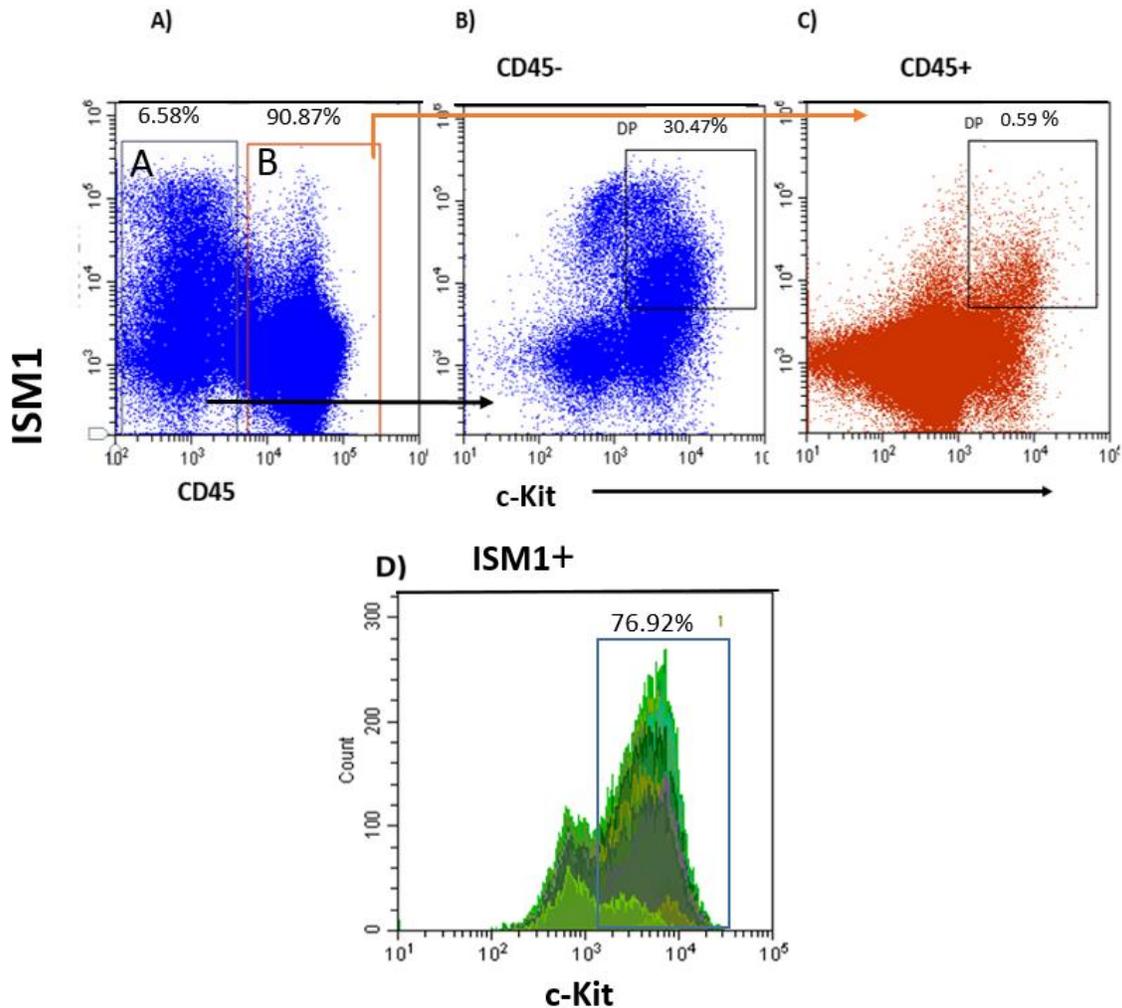


Figura 8. Expresión de ISM1 en células c-Kit+. A) Selección de células CD45+ (90.87%) y CD45- (6.58%), B) Expresión de ISM1 por células c-Kit+ en población CD45- (30.47%), C) Expresión de ISM1 por células c-Kit+ en población CD45+ (0.59%), D) Frecuencia de la expresión de c-Kit en la población ISM1+ (76.92%). (Resultados representativos de 3 experimentos, utilizando una mezcla de células obtenidas de 3 ratones).

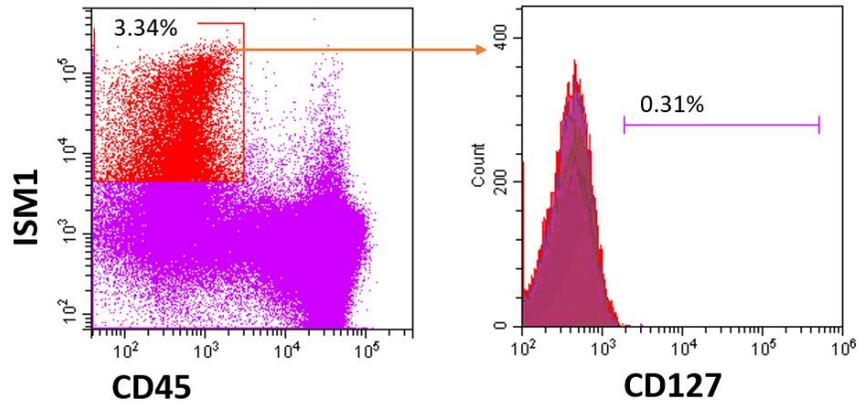


Figura 9. Expresión de CD127 en la población ISM1+ CD45-. Frecuencia de células CD127+ en la población ISM1+ CD45- (3.34%) (Isotipo 0.31%, no mostrado) (Resultados representativos de 3 experimentos, utilizando una mezcla de células obtenidas de 3 ratones).

Considerando la expresión de c-Kit, se planteó la posibilidad de que ISM1 pudiera estar presente en progenitores hematopoyéticos localizados en el pulmón. Por lo tanto, se llevó a cabo un análisis de los marcadores CD34 y Sca-1 que en conjunto con c-Kit identifican poblaciones troncales hematopoyéticas (HSCs). CD34 es una fosfoglicoproteína monomérica que se expresa selectivamente en las células progenitoras hematopoyéticas mieloides y linfoides, y Sca-1 es un miembro de la familia de Ly6 y es una proteína anclada a glicosilfosfatidilinositol cuya expresión se ve favorecida en progenitores mesenquimales (MSCs). Encontramos que la gran mayoría de las células CD34+ de pulmón expresan ISM1+ (ISM1+CD34+) en la población CD45- (Fig. 10) y sorprendentemente, las células que expresan ISM1 también son Sca-1+ (Fig. 11). Estas poblaciones Sca-1+ISM1+ y CD34+ISM1+ no son excluyentes ya que dentro de la población CD45-c-Kit+ISM1+Sca-1+ existe la expresión de CD34 (Fig. 12).

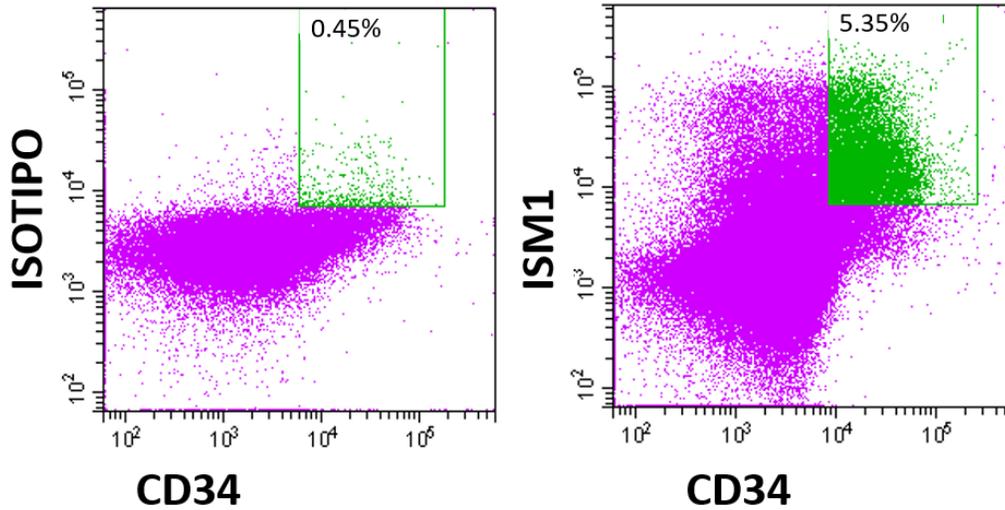


Figura 10. Expresión de ISM1 en células CD34+CD45-. La frecuencia de células doble positivas CD34+ISM1+ en la población CD45- (5.35%). Isotipo (0.45%).(Resultados representativos de 2 experimentos, utilizando una mezcla de células obtenidas de 2 ratones)

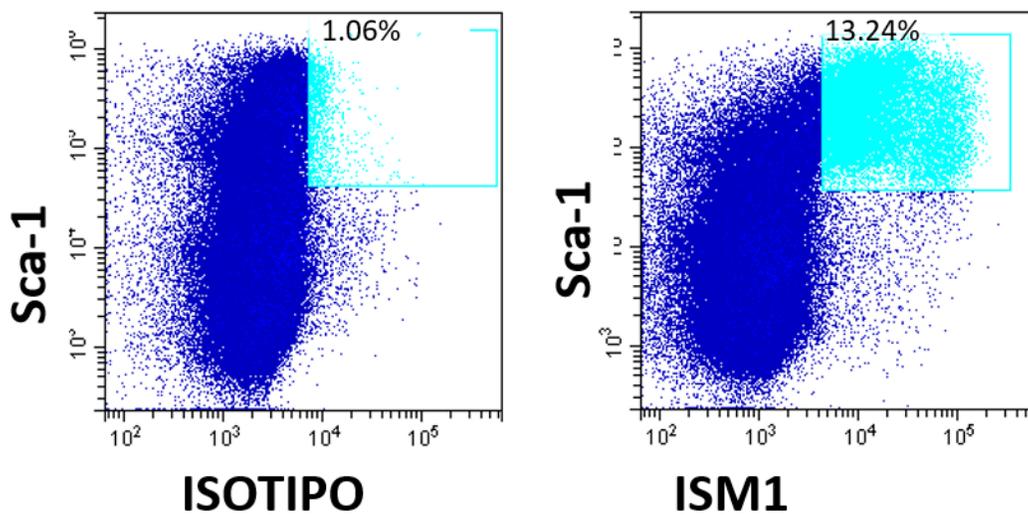


Figura 11. Expresión de ISM1 en células Sca-1+CD45-. Frecuencia de células dobles positivas Sca-1+ISM1+ en la población CD45- (13.14 %). Isotipo (1.08%). (Resultados representativos de 2 experimentos, utilizando una mezcla de células obtenidas de 2 ratones)

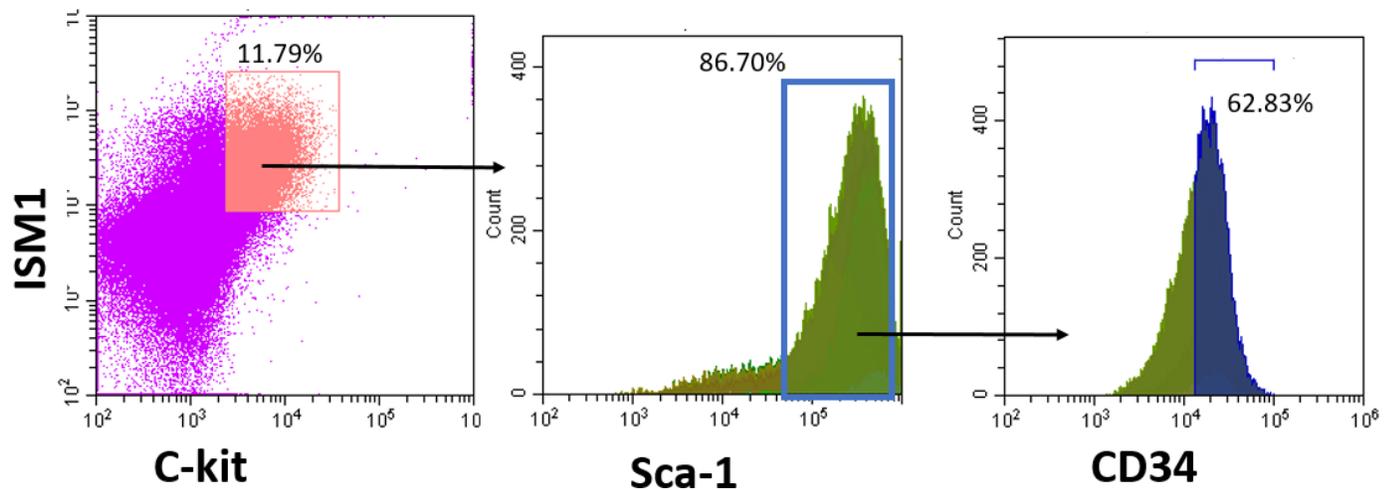


Figura 12. Expresión de CD34 en células ISM1+Sca-1+c-Kit+. Frecuencia de CD34+ en células ISM1+c-Kit+Sca-1+ (62.83%) (Resultados representativos de 2 experimentos, utilizando una mezcla de células obtenidas de 2 ratones)

Finalmente nos propusimos saber si podiamos encontrar una población ISM1 enriquecida con las tres moléculas analizadas, por lo que usamos combinaciones de marcadores con esta finalidad donde la población doble positiva para Sca-1 y c-Kit es 62% ISM1+ (Fig. 12) mientras que la población doble positiva para CD34 y c-Kit es 85% positiva para ISM1 (Fig. 13). Indicando que una porción de las células ISM1+ es CD34+c-Kit+Sca1+.

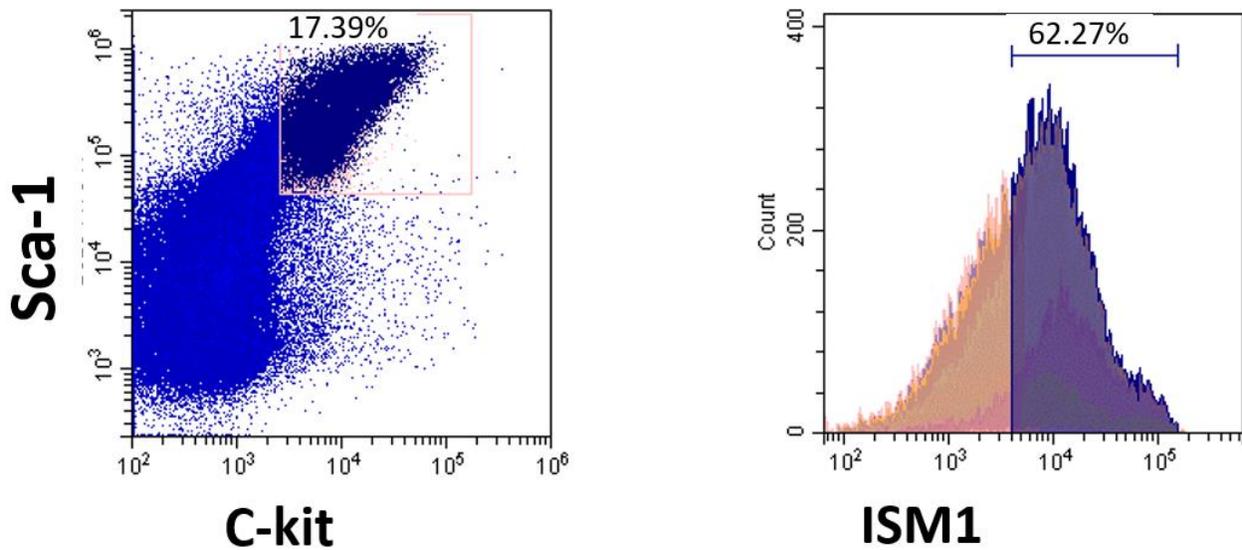


Figura 13. Expresión de ISM1 en células c-Kit+Sca-1+CD45-. Frecuencia de ISM1 en células c-kit+ Sca-1+CD45- (62.27 %) (Isotipo 1.43%, no mostrado) (Resultados representativos de 2 experimentos, utilizando una mezcla de células obtenidas de 2 ratones)

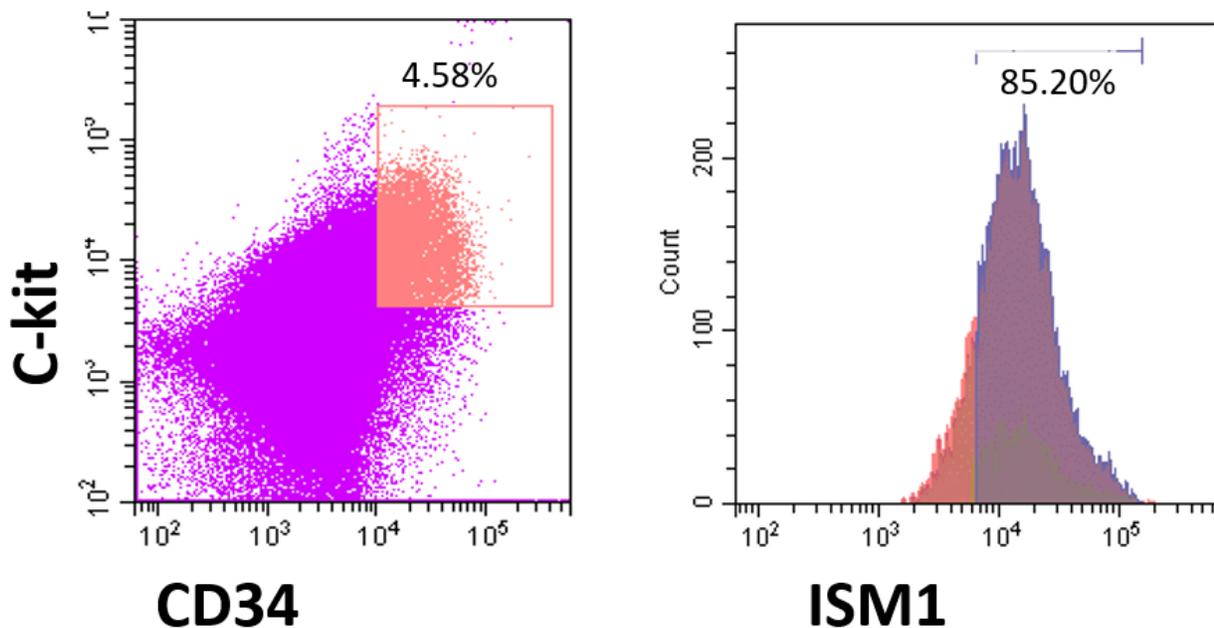


Figura 14. Expresión de ISM1 en células c-Kit+CD34+CD45-. Frecuencia de ISM1 en células c-kit+ CD34-CD45- (85.20%) (Isotipo 2.30% no mostrado) (Resultados representativos de 2 experimentos, utilizando una mezcla de células obtenidas de 2 ratones).

Valle-Rios y Montero previamente mostraron que la población CD3 low DX5+ expresa ISM1, Dx5 o CD49b es una integrina que en conjunto con las integrinas CD49a y CD49d pueden mediar la interacción con proteínas de matriz extracelular importante para el establecimiento de nichos de residencia celular. Al analizar la presencia de células ISM1+ que co-expresaran las integrinas mencionadas encontramos que tanto CD49b y CD49a son expresadas en la población ISM1 pero no así CD49d (Fig. 15).

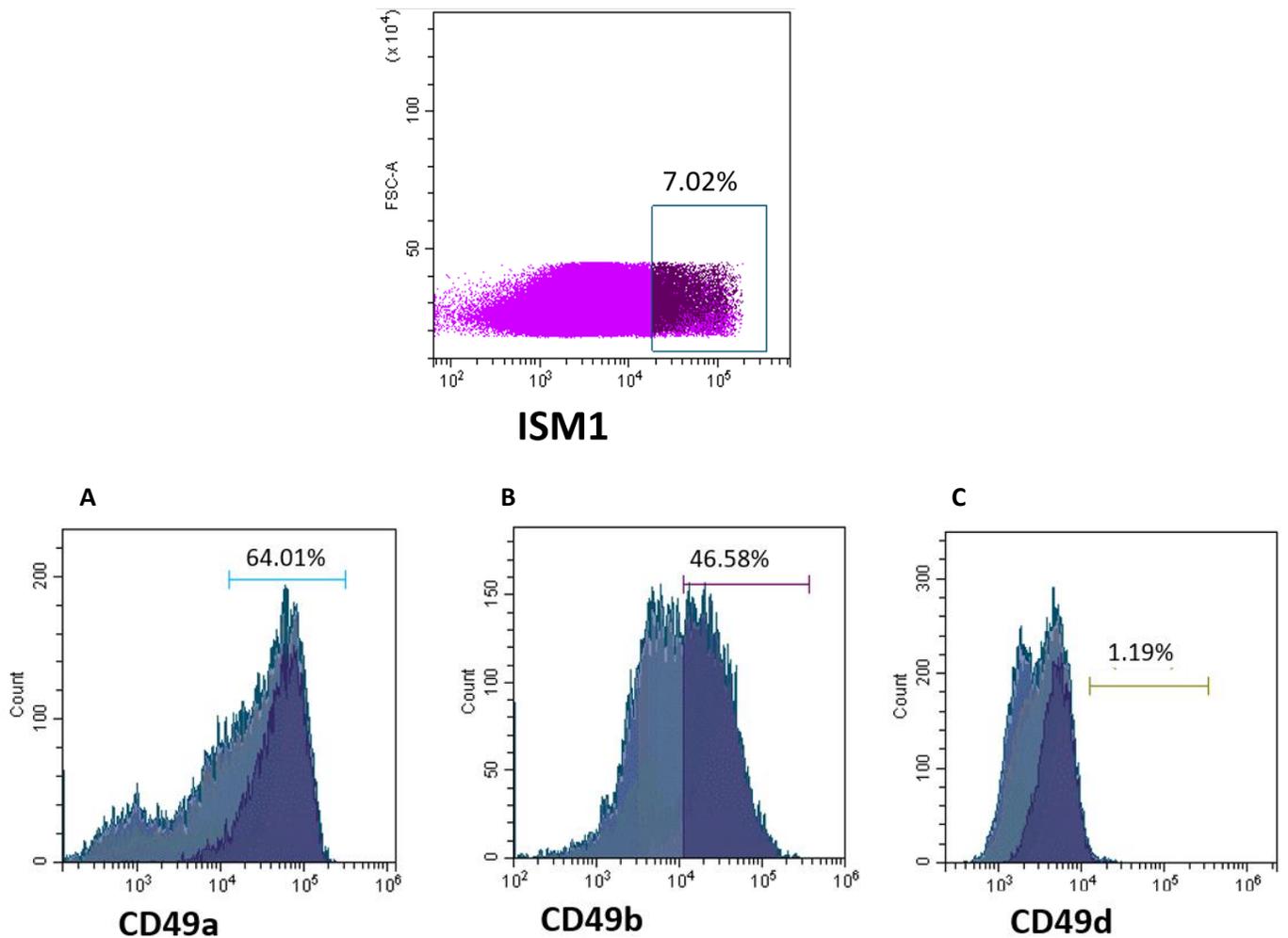


Figura 15. Expresión de integrinas en la población ISM1+. A) Frecuencia de CD49a (64.01%), B) Frecuencia de CD49b (46.58%) y C) Frecuencia de CD49d (1.19%). (Resultados representativos de 2 experimentos, utilizando una mezcla de células obtenidas de 2 ratones).

Se ha reportado que células con fenotipo de células troncales localizadas en la médula ósea son capaces de incrementar el número de células de tipo linfoide ante ciertos retos antigénicos (Takizawa, 2017). Para verificar si este fenómeno podría estar impactando sobre las células ISM1+ decidimos observar los cambios en el porcentaje de células ISM1+ en un ambiente no homeostático, de tal forma que se implementó un modelo de infección con *Pseudomonas aureginosa*, una bacteria capaz de infectar el pulmón. Se observó que a 24 h post-infección, existe un aumento en la frecuencia de la población de ISM1+ CD45+, mientras que existe un decremento en la población CD45- ISM1+; de manera interesante la MFI de la población ISM1 aumenta lo que significa que existen células que expresan una mayor cantidad de ISM1 que sólo se observa en el ratón infectado (Fig. 16).

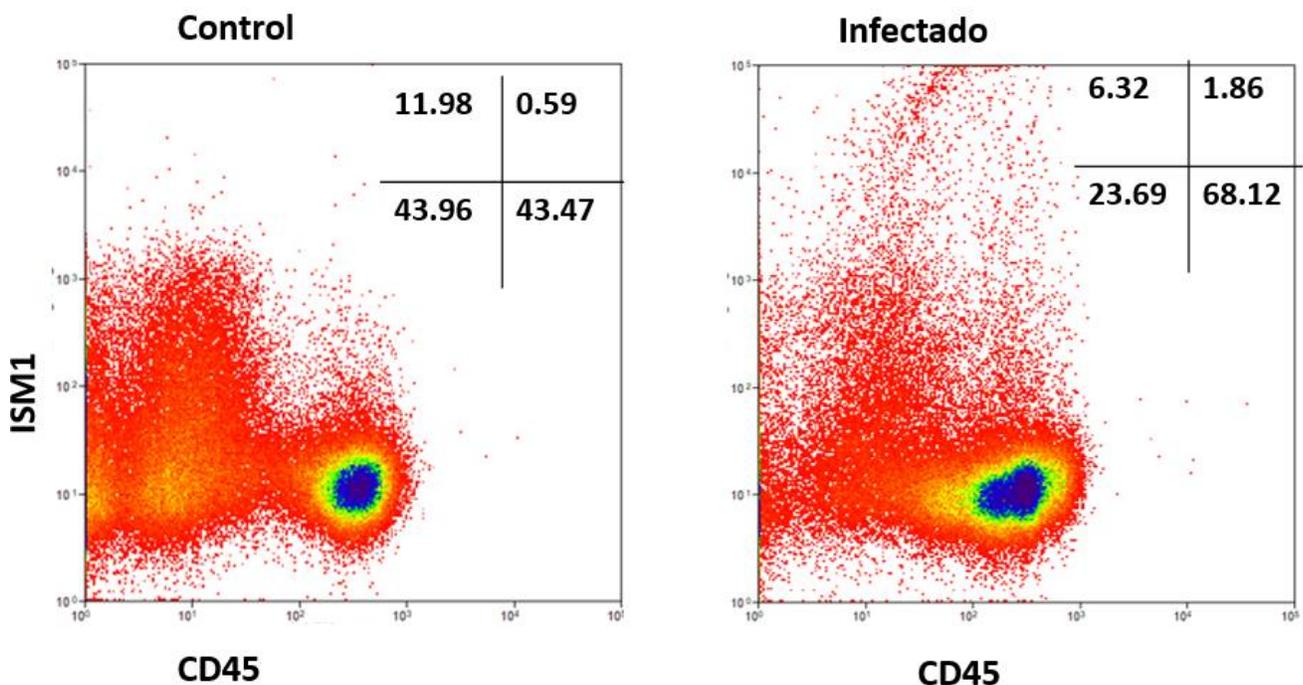


Figura 16. Frecuencia de ISM1 en ratón control y ratón infectado con *Pseudomonas aureginosa*. Ratón control: Porcentaje de células ISM1+CD45+ (0.59%) isotipo (0.05%) y ISM1+CD45- (11.98%) (Isotipo 0.3%, no mostrado). Ratón infectado: porcentaje de células ISM1+CD45+ (1.86%) Isotipo (0.06%) y ISM1+CD45- (6.32%) (Isotipo 0.2%, no mostrado) (Datos de un experimento, utilizando una mezcla de células obtenidas de 2 ratones)

DISCUSIÓN

El primer enfoque de la caracterización fenotípica fue encontrar un nicho celular donde se favoreciera la expresión de ISM1, consistente con otros reportes (Valle-Rios y Montero, 2014) uno de los tejidos con mayor expresión de ISM1 es el pulmón (Fig. 2), que es un tejido vascularizado y expuesto constantemente a antígenos, donde la protección otorgada por las células del sistema inmunológico es clave, por lo que decidimos indagar más acerca la relación que pudiera existir entre ISM1 y las poblaciones de linfocitos.

Nuestro análisis por citometría de flujo demuestra que la mayoría de células con características de tamaño y complejidad similares a linfocitos que expresan ISM1 son CD45- con una pequeña población CD45+ (Fig. 3), considerando estos hallazgos, se evaluaron diferentes marcadores de linaje de manera individual esperando encontrar una población celular de linfocitos con expresión preferencial de ISM1, sin embargo la mayor abundancia de células ISM1+ correlacionó con la exclusión de los marcadores de linaje seleccionados (Fig. 4) lo cual hace sentido, pues las células LIN+ son CD45+, por lo tanto concluimos que la contribución de células diferenciadas de origen mieloide o linfoide en función de la expresión de ISM1 en pulmón es baja comparada con las células CD45-. Por otro lado corroboramos que la fuente de ISM1 no proviene fundamentalmente de células epiteliales o endoteliales (Fig. 5).

En vista de que una fracción de células ISM1+ se encuentra en células CD45+ y LIN-, que concuerda con el fenotipo de células tipo ILC, nos avocamos a caracterizarlas, sin embargo al analizar las células CD45+ LIN- ISM1+ (Fig. 7) no se observó expresión de CD127 un marcador característico de ILCs, ni

de NK 1.1, o ST2 (Constantinides et. al., 2014), pero sí existe un porcentaje de células c-Kit⁺ en esta población negativa para marcadores de linaje pero CD45⁺ siendo posibles precursores linfoides comprometidos o incluso ILCs no convencionales; por lo que se corroboró la expresión de c-Kit en la población CD45⁻ y CD45⁺ (Fig.8) donde observamos que existe una mayor frecuencia de células dobles positivas (c-Kit + ISM1⁺) en la población CD45⁻.

Dado que el fenotipo CD45⁻ c-Kit⁺ corresponde con precursores hematopoyéticos (Rieger, 2012), comenzamos con una caracterización de los progenitores linfoides comunes así como de Progenitores Innatos Linfoides (ILCP) que carecen de CD45 pero expresan c-Kit y CD127, así, en la población CD45⁻ ISM1⁺ no observamos expresión relevante de CD127 (Fig. 9), lo cual sugirió que la principal población que expresa ISM1 no se encuentra dentro de la población de precursores ILCs.

Existen otros marcadores de células progenitoras de origen más temprano como CD34 y Sca-1 que son usados para describir poblaciones de células troncales, Sca-1 es un marcador de células mesenquimales pero no así de células troncales epiteliales, mientras que CD34 permite hacer una distinción general entre HSCs y MSCs, aquellas células CD34⁺ se asocian a HSCs y la población CD34⁻ con MSCs (Raiser, 2011). Nuestros datos indican que en la población CD45⁻ existe la población ISM1⁺CD34⁺ (Fig.10), y la población ISM1⁺Sca-1⁺ (Fig. 11), que contiene células CD34⁺ (Fig.12), sin embargo estas poblaciones expresan c-kit (Fig. 13-14) lo que sugiere que ISM1 identifica a una población mayoritariamente de tipo hematopoyético, sin embargo es muy probable que una población mesenquimal también la esté produciendo ya que ISM1 se ha observado en el mesodermo de diversos modelos animales durante su desarrollo (Xiang et. al, 2011) Estas aseveraciones se ven reforzadas con la expresión de ISM1 que ha sido

detectada en células de pulmón e hígado fetal (datos no mostrados), así como en un modelo murino doble knockout Rag-/- γ C-/- (Valle y Montero, 2014), y a nivel transcripcional durante el desarrollo embrional desde las etapas de gastrulación, formación de notocorda y mesodermo ventral (Pera et. al, 2002), en este sentido nuestros datos apuntan a que la función de ISM1 está relacionada con su origen a partir del mesodermo y a la capacidad de multipotencia y autorenovación que comparten estas poblaciones HSCs y MCSs derivadas de esta capa embrionaria.

Por otro lado, una población progenitora descrita en riñón por Dekel et. al en 2006 caracterizada a partir de la expresión de Sca-1 y la ausencia de CD45 empata con lo descrito en la población ISM1+, ya se trata de células que carecen de marcadores de linaje hematopoyético, que son células pequeñas, habitan el espacio intratisular y plástico-adherente; Adicionalmente esta población tiene potencial osteogénico, adipogénico y neurogénico bajo los estímulos correctos y tras una lesión isquémica estas células contribuyen a la reparación tisular. Sin embargo esta población no expresa c-kit ni CD34, por lo que la expresión de ISM1 podría delimitar a un progenitor más temprano o conservarse en los progenitores tanto mesenquimales como hematopoyéticos.

Un estudio realizado en tumores adrenocorticales con mutaciones en *CTNNB1*, el gen de β catenina, demostró que uno de los 5 genes que se encuentran regulados a la alta en estos tejidos con catenina deficiente es ISM1, lo que potencialmente asocia a ISM1 con la vía molecular de Wnt- β catenina relacionada a la capacidad de autorenovación y multipotencia en la hematopoyesis (Kim et. al., 2009).

Otra característica de la población ISM1+ es que va acompañada con la co-expresión de las integrinas CD49a ($\alpha 1\beta 1$) y CD49b ($\alpha 2\beta 1$) (Fig. 15), estos datos sugieren que las células ISM1+ son residentes de tejido, ya que las

integrinas son receptores para ligandos de matriz extracelular como colágeno, laminina y fibronectina (Chen et. al., 2014) y pueden contribuir al estado de quiescencia que caracteriza a las células multipotentes.

Las integrinas con cadena $\beta 1$ tienen afinidad por el motivo de aminoácidos RGD encontrado en proteínas como Trombospondina y Fibronectina. ISM1 contiene un dominio TSR relacionado a Trombospondina, (Chen Mo, 2014) así como un motivo KDG en el dominio AMOP que está relacionado con adherencia celular dependiente de integrinas o inhibición de la agregación plaquetaria (Xiang et. al., 2011). Debido a que ISM1 es transportada al exterior de la célula, podría señalizar de manera autocrina o paracrina mediante estas integrinas. Se conoce que si ISM1 se encuentra en su forma soluble o unida a componentes de la matriz extracelular, es capaz de enviar señales de sobrevivencia o de apoptosis, respectivamente (Xiang, et. al., 2011).

Las poblaciones precursoras son encargadas de mantener la homeostasis celular y generar a los demás componentes sanguíneos mediante la hematopoyesis, un proceso bastante regulado, cuyo equilibrio se rompe durante infecciones bacterianas (Zhang et. al., 2008)., por lo tanto, para conocer la dinámica de las células productoras de ISM1 durante un proceso patológico, implementamos un modelo preliminar de infección con *Pseudomonas aeruginosa* y observamos una disminución del porcentaje de células ISM1+ en la población CD45- (Fig. 15), que puede relacionarse con la disminución de la población LIN-c-Kit+Sca-1- que en médula ósea disminuye hasta en un 40% a partir de 12 horas post infección (Zhang et. al., 2008), o puede corresponder a que la proteína está siendo transportada al espacio extracelular, o simplemente es degradada. De manera interesante, se encontró un aumento de la frecuencia de la población CD45+ISM1+ que puede atribuirse a progenitores linfoides comprometidos ISM1+ o bien a que

durante el proceso de diferenciación se adquiere la expresión de CD45+ previo a la degradación de la reserva de ISM1 intracelular por el proceso de recambio proteico propio de una célula en diferenciación (Anders, Joerg y Leonard, 2013).

Otra observación es la aparición de una población que expresa mayores niveles de ISM1 con relación al control sin infección, es decir, una MFI alta en células ISM1+, lo cual se traduce en una población con una mayor cantidad de ISM1, que podría ser la parte de la población precursora autorenovada que deriva de la división asimétrica requerida para dar origen a células diferenciadas, sin embargo, estos datos deberán ser corroborados con la ejecución de más experimentos.

El pulmón es un tejido que tiene una proliferación celular baja y sobrevivencia alargada de células residentes, pero ante una infección, herida o en situaciones de inflamación este tejido es capaz de lograr una proliferación rápida y extensa de células epiteliales. Las células troncales en el pulmón son capaces de migrar y proliferar para reparar el daño, por lo que los programas de señalización y de transcripción que median la quiescencia y el comportamiento de las células progenitoras y troncales son de interés para comprender la patogénesis de los desórdenes pulmonares e incluso tumorigenesis (Cardoso y Whitsett, 2008) y consideramos que un estudio más profundo de ISM1 y de las células que la producen, podría arrojar un mayor entendimiento en la regulación de la homeostasis de este órgano.

CONCLUSIÓN

La producción de ISM1 es preferencial en poblaciones poco diferenciadas, que corresponden a células que carecen de marcadores de linaje incluyendo el marcador CD45; así mismo expresan marcadores asociados a células troncales Sca-1, CD34 y c-Kit. La expresión espacio temporal durante el desarrollo embrionario de ISM1 en mesodermo corresponde con el fenotipo aquí descrito de células HSCs y MSCs residentes de tejido debido a la expresión de CD49a y CD49b.

Postulamos que Isthmin-1 podría ser importante para procesos de multipotencia y autorenovación en células HSCs y MSCs debido a su relación con la vía de señalización Wnt-catenina, que permite mantener la homeostasis celular en pulmón.

Nuestros resultados sugieren fuertemente que ISM1 representa una novedosa molécula asociada con células con fenotipo de troncalidad localizadas en un nicho no clásico, el pulmón. Los estudios acerca de la función de ISM1 relacionados con su efecto en la regulación de células troncales y su impacto en la respuesta inmune, serán necesarios para dilucidar su importancia en la recuperación de la homeostasis durante un proceso infeccioso.

PERSPECTIVA

Nuestra hipótesis debe ser comprobada mediante el enriquecimiento y cultivo de células ISM1+ y confirmar si pueden dar origen a componentes hematopoyéticos y mesenquimales, así como un análisis del transcriptoma completo de estas células para conocer que programas de expresión están asociados a ISM1. Finalmente se pretende administrar ISM1 exógeno y anticuerpos neutralizantes contra ISM1 a ratones C57-BI/6J y estudiar los cambios hematopoyéticos y fisiológicos que puedan ocurrir.

ANEXOS

ANEXO 1 ANTICUERPOS

Categoría	Marcador	Población Blanco	Clona	Dilución	Compañía
LINAJE	CD45-AF700	Panmarcador linfoide	30F11	1:200	BIOLEGEND
	CD3e- PERCPCY5.5	Células T	145- 2C11	5:200	TONBO
	CD19- PERCPCY5.5	Células B	1D3	5:200	BIOLEGEND
	TER119- PERCPCY5.5	Células Eritroides	TER- 119	5:200	BIOLEGEND
	CD11c- PERCPCY5.5	Células Dendríticas	N418	5:200	TONBO
	CD8a- PERCPCY5.5	Células T citotóxicas	53-6.7	5:200	BIOLEGEND
	Ly6G- PERCPCY5.5	Monocitos/ Granulocitos	1A8	5:200	TONBO
	CD11b- PERCPCY5.5	Macrófagos	M1-70	5:200	TONBO
	FceR1a- PERCPCY5.5	Células cebada y basófilos	MAR-1	5:200	BIOLEGEND
TRONCALIDAD	Sca-1- FITC	HSCs y MSCs	E13- 161.7	3:200	BIOLEGEND
	CD34- PERCPCY5.5	HSCs Y MSCs	HM34	5:200	BIOLEGEND
	CD117 (C-kit) - PECY7	Células Progenitoras	2B8	3:200	BIOLEGEND

ILC	CD127-VF450	Células B y T inmaduras	A7R34	3:200	TONBO
	ST2-APC	Th2 e ILC2	DIH9	3:200	BIOLEGEND
	NK1.1-APCCY7	NKs	PK136	3:200	BIOLEGEND
EPITELIAL	EP-CAM-PERCPCY5.5	Células Epiteliales	G8.8	3:200	BIOLEGEND
ENDOTELIAL	VEGFR2-PB	Células Endoteliales	89B3A5	3:200	BIOLEGEND
ADHESIÓN	CD49d-FITC		R1-2	2:200	BIOLEGEND
	CD49a-APC		HMA1	3:200	BIOLEGEND
	CD49b-PECY7		HMA2	2:200	BIOLEGEND
	ISM1-PE	NA	B054B6	1.5:50	BIOLEGEND
	IgG2B ISOTIPO-PE	NA	MPC-11	1.5:50	BIOLEGEND

REFERENCIAS

- Abbas AK, Lichtman AHH (2012) Cellular and Molecular Immunology. Elsevier Health Science 7th edition. 853-977
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002) Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science. 25:1394-1455
- Cardoso WV and Whitsett JA (2008) Resident Cellular Components of the Lung Developmental Aspects. Proc Am Thorac Soc Vol 5: 767-771.
- Chen M, Zhang Y, Yu VC, Chong YS, Yoshioka T, Ge R. (2014) Isthmin targets cell-surface GRP78 and triggers apoptosis via induction of mitochondrial dysfunction Cell Death Differ. 5:797-810.
- Constantinides, McDonald, Verhoef y Bendelac (2014) A committed precursor to innate lymphoid cells. Nature 508: 397-401.
- Eberl G, Colonna M, Di Santo JP. (2015) Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology. Science 348(6237): 879
- Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G (2009). "Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense.". Immunol Rev. 1: 106-28.
- Gilbert SF (2000). Developmental Biology. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 14: 968-1121
- Glenn Dranoff (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. Nature Reviews Cancer 4: 11-22
- Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. (2010) Raising the NKT cell family. Nat Immunol. ;11:197-206.
- Hazenberg MD and Spits H (2014) Human innate lymphoid cells Blood 124:700-709
- Takizawa H., Fritsch K., Kovtonyuk L., Yasuyuki S., Yakkala, C., Jacobs L., Ahuja, AK, Lopes M., Hausmann A., Hardt W., Gomariz A., Nombela-Arrieta C. Markus G. Manz. (2017). Pathogen-Induced TLR4-TRIF Innate Immune Signaling in Hematopoietic Stem Cells Promotes Proliferation but Reduces Competitive Fitness, Cell Stem Cell
- Hoffmann, N., Rasmussen, T. B., Jensen, P., Stub, C., Hentzer, M., Molin, S., ... Høiby, N. (2005). Novel Mouse Model of Chronic Pseudomonas aeruginosa Lung Infection Mimicking Cystic Fibrosis . Infection and Immunity, 73(4), 2504-2514.
- Kim JA, Kang YJ, Park G, Kim M, Park YO (2009) Identification of a stroma-mediated Wnt/beta-catenin signal promoting self-renewal of

hematopoietic stem cells in the stem cell niche. *Stem Cells*. Jun;27(6):1318-29.

- Kristensen AR, Gsponer J, Foster LJ (2013) Protein synthesis rate is the predominant regulator of protein expression during differentiation *Molecular Systems Biology* 9:689
- Lane PJ, Gaspal FM, McConnell FM, Kim MY, Anderson G. (2012) Lymphoid tissue inducer cells: innate cells critical for CD4+ T cell memory responses *Ann N Y Acad Sci*. 1247:1-15.
- Lantz O, Bendelac A. (1994) An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med*. ;180:1097-1106.
- Metcalf D. (2008) Hematopoietic cytokines. *Blood Journal* 111:485-491
- Moreno, C.; Sánchez-Ibarrola, A. (2003) Receptores tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. *Rev Med Univ Navarra* 47 (3): 29-33.
- Nicolas Serafini, Christian A. J. Vosshenrich y James P. Di Santo (2015) Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate *Nature Reviews Immunology* 15: 415-428
- Pera EM, Kim JI, Martinez SL, Brechner M, Li SY, Wessely O, De Robertis EM. (2002) Isthmin is a novel secreted protein expressed as part of the Fgf-8 synexpression group in the *Xenopus* midbrain-hindbrain organizer. *Mech Dev*. 116(1-2):169-72.
- Raiser, D. M., y Kim, C. F. (2009). Sca-1 and Cells of the Lung: A Matter of Different Sorts. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 27(3), 606-611.
- Randall, T. (2010) Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (BALT): Structure and Function. *Advances in Immunology*. Academic Press, Volume 107:187-241
- Rieger MA1, Schroeder T. (2012) Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Dec 1;4(12)
- Shikhagaie MM, Germar K, Bal SM, Ros XR, Spits H. (2017) Innate lymphoid cells in autoimmunity: emerging regulators in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 3:164-173.
- Shruthi Venugopal, Mo Chen, Wupeng Liao, Shi Yin Er, Wai-Shiu Fred Wong, and Ruowen Ge (2015) Isthmin is a novel vascular permeability inducer that functions through cell-surface GRP78-mediated Src activation. *Cardiovascular Research* 107: 131-142

- Valle-Rios, R. y Montero, J. M. (2014). Isthmin 1 Is a Secreted Protein Expressed in Skin, Mucosal Tissues, and NK, NKT, and Th17 Cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 34(10): 795-802.
- Vega López (2007) *Inmunobiología de las mucosas, un nuevo enfoque de la protección y la adaptación al medio de nuestro organismo*. CINVESTAV. 26-1: 55-59
- Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H. (2007) Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees *J Tissue Eng Regen Med*1(1):74-9.
- Walker, J. A., y McKenzie, A. N. (2013). Development and function of group 2 innate lymphoid cells. *Current Opinion in Immunology*, 25(2), 148–155.
- Weinreich MA, Odumade OA, Jameson SC, Hogquist KA. (2010) T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8+ T cells. *Nat Immunol.* ;11:709–716
- Xiang Wei, Zhiyuan Ke, Yong Zhang, Grace Ho-Yuet Cheng (2011) Isthmin is a novel secreted angiogenesis inhibitor that inhibits tumour growth in mice *J Cell Mol Med.* 2: 359–374.
- Zhang, P., Nelson, S., Bagby, G. J., Siggins, R., Shellito, J. E. and Welsh, D. A. (2008), The Lineage–C-Kit+Sca-1+ Cell Response to *Escherichia coli* Bacteremia in Balb/c Mice. *Stem Cells*, 26: 1778–1786.