



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Papel del dominio ITIM del receptor CD5 en la activación del linfocito T”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

QFB JUAN MIGUEL CHAVIRA TAPIA

TUTOR PRINCIPAL

Dra María Gloria Soldevila Melgarejo
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra Claudia González Espinosa
Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV)

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva
Instituto de Biotecnología, UNAM.

Ciudad de México. Marzo, 2021



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.

El presente trabajo fue realizado con apoyo del proyecto Conacyt-Ciencia Básica con número de proyecto 253274 (convocatoria CB-2015). También se contó con el apoyo de una beca nacional Conacyt al alumno Juan Miguel Chavira Tapia durante la realización de su proyecto de maestría con No. CVU 925468. El proyecto se realizó en el Laboratorio A009 del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) y con apoyo del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (IIB, UNAM).

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE

Enrique Ortega Soto

VOCAL

Carlos Rosales Ledezma

VOCAL

Rodolfo Pastelín Palacios

VOCAL

Constance Auvynet

SECRETARIO

Paula Licona Limón

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

TUTOR PRINCIPAL

María Gloria Soldevila Melgarejo

SUSTENTANTE

Juan Miguel Chavira Tapia

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	v
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
Activación del linfocito T.....	10
Vías de transducción de señales involucradas en la activación del linfocito T.	13
Sinapsis inmunológica y efectos de la activación del linfocito T.	18
CD5, estructura, función y regulación genética.	23
CD5 como regulador positivo y negativo del linfocito T.	29
CD5 y su relación con las interacciones entre el TCR y moléculas del MHC.	34
Dominios intracelulares de CD5 y su papel sobre la función de CD5.	38
JUSTIFICACIÓN.....	42
HIPÓTESIS.....	44
OBJETIVOS.....	44
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
Animales de experimentación.....	45
Genotipificación de ratones por PCR.....	45
Obtención de linfocitos T de órganos linfoides secundarios.....	48
Ensayo de activación celular <i>in vivo</i> con α CD3 soluble.....	49
Ensayo de activación y proliferación celular <i>in vitro</i> con α CD3/ α CD28.....	49
Anticuerpos y citometría de flujo.	50
Análisis estadístico.	52
RESULTADOS.....	52
Determinación de poblaciones de linfocitos T en MLNs, PLNs y Bazo de ratones CD5 ITIM-KI <i>ex vivo</i>	52

Expresión de CD5 en poblaciones de linfocitos T de ratones CD5 ITIM-KI <i>ex vivo</i>.	56
Evaluación de la activación y muerte celular en ratones CD5 ITIM-KI tras administración de α-CD3 en un modelo <i>in vivo</i>.	59
Evaluación de la activación y proliferación celular de linfocitos T naive CD4+ tras estimulación con αCD3 y αCD28 <i>in vitro</i>.	73
DISCUSIÓN	78
CONCLUSIONES	87
PERSPECTIVAS	87
REFERENCIAS	88
ANEXO I	99

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar conmigo a cada paso que doy, y por rodearme de grandes personas que contribuyeron de gran manera a mi formación

A la UNAM por ser mi alma máter desde mi educación preparatoria, por darme una carrera universitaria y ahora un posgrado. Sangre azul y piel dorada.

A la Dra. Gloria Soldevila, por creer en mí y permitirme formar parte de su grupo de trabajo en el que aprendí mucho, no solo de inmunología, sino de la vida. Aprender a ser una persona crítica, analista y que busca siempre soluciones a los problemas que se presenten. Gracias por compartirnos su pasión por la ciencia y por el apoyo que siempre nos brindó.

A los integrantes de mi comité tutorial, la Dra. Claudia González y el Dr. Gustavo Pedraza, por todo el apoyo, las críticas, comentarios, sugerencias. Por plantearme problemas y dudas en mi cabeza que me hicieron investigar más y más, enriqueciendo más este trabajo. Gracias por su guía en todo este proceso.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM, por formar parte importante de este proceso, por siempre estar pendientes de los alumnos, y por brindarme apoyo en todo momento.

Al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo del IIB, UNAM, por todo su apoyo para instruirme en el uso de los citómetros de flujo, por su ayuda al momento de adquirir mis muestras y el sorting celular, así como en ocasiones su apoyo para el análisis de mis resultados. Especialmente quiero agradecer a la Dra. Roxana porque me brindó mucho apoyo durante todo el desarrollo de este proyecto, desde la parte experimental hasta la parte de análisis de resultados y a formarme un criterio objetivo.

A todos mis compañeros del 'Soldelab', por su guía, su apoyo, sus enseñanzas, su retroalimentación, gracias por las risas, las pláticas, los buenos momentos, su compañía cuando estábamos muy estresados, ¡y muchos momentos más que compartimos juntos! Gracias a mi equipo estrella, CD5 ('Give me five!'), a Frida, Dinorah y Samuel, por ser mi pequeña familia durante mi paso en el laboratorio y por todo lo que aprendimos juntos, lo que sufrimos juntos, pero también por todos esos buenos momentos. Al equipo de Tregs, Ari, Saúl y Nad, por esas buenas pláticas y enseñanzas tanto teóricas como prácticas. Al equipo de inhibinas, los más intensos, Selina, el profesor Adrián, San y Alexandra. A las chicas de CaMa, que siempre estuvieron pendientes de mi desde que llegué al laboratorio y aprendí mucho de ellas, Nara, Cynthia, Aleida y Flor. A Óscar, por contribuir a mi enseñanza en el manejo de ratones, en su mantenimiento, así como por siempre estar al pendiente de nosotros como alumnos. A Gisela por las buenas pláticas que teníamos y su apoyo en la organización del laboratorio. A Alicia, Marco y Rafa.

A la Dra. Gina por toda la ayuda brindada en el mantenimiento y cuidado de nuestros ratones.

Y finalmente, al CONACYT, por el apoyo brindado durante el posgrado, sin este hubiera sido complicado lograr este trabajo.

DEDICATORIAS

A mi mamá, Dulce, por siempre estar conmigo, por todo el apoyo y amor que me ha dado, porque sin ella no sería la persona que soy ni estaría donde estoy ahora. Gracias por todo, por estar en cada paso a mi lado, por creer en mí y apoyarme en todas mis decisiones y locuras.

A mi papá, Rafael, por su compañía, su cariño y por sus enseñanzas. Por creer siempre en mí y su apoyo incondicional.

A mis hermanos, Rafa y Uri, por siempre estar, por ser siempre mi apoyo y mi guía, por todos los momentos que hemos vivido y los que nos faltan. Porque son siempre un gran ejemplo para mí.

A toda mi familia, por su confianza, por estar pendientes de mí y por su compañía y sus ánimos siempre para seguir adelante. Ustedes saben quiénes son.

Y finalmente y no menos importante, a todos mis amigos. Por su enorme amistad, por ser esa segunda familia que todos necesitamos, por siempre estar para mí. Va por ustedes también, por todos esos grandes momentos vividos, esas enseñanzas, alegrías, tristezas... ¡cuántas cosas no hemos vivido! Porque siempre han creído en mí. A mis amigos incondicionales Juan, Omar, Erik, Marianita, Johnny, Gooooo, Bruno, Chay, Mau, Javo... ¡Y todos los que me faltan! Ustedes saben quiénes son y quiénes siempre han estado y están conmigo.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Los linfocitos T recirculan a través de los ganglios linfáticos.....	8
Figura 2: Reconocimiento de antígenos presentados por APCs a linfocitos T naive.	11
Figura 3: Esquema general de señalización del TCR tras reconocimiento del complejo péptido-MHC.....	16
Figura 4: Expresión de CD5 a través del desarrollo y maduración de los linfocitos T	24
Figura 5: Esquema de la estructura de CD5 y sus interacciones extracelulares e intracelulares.....	25
Figura 6: CD5 y CD3 se co-localizan en la sinapsis inmunológica de células humanas y de ratón.....	33
Figura 7: Efecto de CD5 como regulador negativo de la señal del TCR en la selección tímica y tolerancia central.....	35
Tabla 1: Mezcla de reacción de la PCR para genotipificación del transgén CD5 ITIM- KI.....	46
Tabla 2: Mezcla de reacción de la PCR para genotipificación del transgén FoxP3- eGFP.....	47
Tabla 3: Panel de anticuerpos utilizados para la evaluación de poblaciones linfocitarias en el modelo ex vivo.....	50
Tabla 4: Panel de anticuerpos utilizados para la evaluación de poblaciones linfocitarias y muerte celular en el modelo de activación in vivo.....	51
Tabla 5: Panel de anticuerpos utilizados para los ensayos de activación y proliferación en el modelo de activación in vitro.....	51
Figura 8: Estrategia de análisis para la selección de poblaciones linfocitarias en modelo ex vivo.....	52

Figura 9: La celularidad total de órganos linfoides secundarios, así como frecuencias y números absolutos de linfocitos T CD4+ y CD8+ del ratón CD5 ITIM-KI se mantienen similares respecto al ratón WT.....	54
Figura 10: El dominio ITIM de CD5 no altera las poblaciones celulares de linfocitos T CD4+ en órganos linfoides secundarios ex vivo.....	55
Figura 11: El dominio ITIM de CD5 no altera las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ en órganos linfoides secundarios en modelo ex vivo	56
Figura 12: El dominio ITIM de CD5 regula los niveles de expresión de CD5 en linfocitos T CD4+.....	57
Figura 13: El dominio ITIM de CD5 regula los niveles de expresión de CD5 en linfocitos T CD8+.....	58
Figura 14: Estrategia de análisis para la selección de poblaciones linfocitarias para análisis de la activación y muerte celular de linfocitos T en un modelo de activación in vivo.....	60
Figura 15: Activación de linfocitos T in vivo en MLNs tras el tratamiento con αCD3 61	61
Figura 16: La administración de αCD3 a los ratones, tanto WT como CD5 ITIM-KI provoca un decremento en linfocitos T CD4+ y CD8+.....	62
Figura 17: Los linfocitos T CD4+ del ratón CD5 ITIM-KI muestran una mayor activación tras administración de αCD3 respecto a los provenientes del ratón WT..	63
Figura 18: Los linfocitos T CD8+del ratón CD5 ITIM-KI se activan más tras administración de αCD3 que los provenientes del ratón WT.....	64
Figura 19: Incrementos relativos de las frecuencias de las poblaciones de linfocitos T CD4+ de MLN muestran mayor activación tras la administración de αCD3 en los provenientes de ratones CD5 ITIM-KI respecto a su contraparte WT	66
Figura 20: Incrementos relativos de las frecuencias de las poblaciones de linfocitos T CD8+ en ratones CD5 ITIM-KI versus WT	67
Figura 21: CD25 funciona como marcador de activación de linfocitos T, y los linfocitos T CD8+ de PLNs y bazo del ratón CD5-ITIM expresan mayores niveles de CD25 tras la administración de αCD3, respecto a su contraparte WT	68
Figura 22: Los linfocitos T provenientes de ratones WT y de ratones CD5 ITIM-KI muestran el mismo patrón de muerte en MLNs tras administración de αCD3	70

Figura 23: Los linfocitos T provenientes de ratones WT y de ratones CD5 ITIM-KI muestran el mismo patrón de muerte en PLNs tras administración de αCD3	71
Figura 24: Los linfocitos T provenientes de ratones WT y de ratones CD5 ITIM-KI muestran el mismo patrón de muerte en bazo tras administración de αCD3	72
Figura 25: Estrategia para el análisis de marcadores de activación y proliferación de linfocitos T naive CD4+ tras activación in vitro	74
Figura 26: Análisis de la cinética de activación de linfocitos T CD4+ naive del ratón CD5 ITIM-KI y WT. tras activación in vitro con αCD3/ αCD28.....	75
Figura 27: Los linfocitos T CD4+ naive provenientes de ratones CD5 ITIM-KI presentan menor proliferación celular tras 120 h de activación in vitro con αCD3/ αCD28.....	77
Figura 28: Tipaje para el gen de CD5 en el ratón CD5 ITIM-KI FoxP3.....	99
Figura 29: Tipaje para el gen de FoxP3-eGFP en el ratón CD5 ITIM-KI FoxP3.....	100

ABREVIATURAS

ZAAD: 7-aminoactinomicina D (*7-aminoactinomycin D*).

ACK: Buffer de lisis de amoníaco, cloruros y potasio (*Ammonium-chloride-potassium buffer*).

AICD: Muerte celular inducida por activación (*Activation-induced cell death*).

APC: Células presentadora de antígeno (*Antigen presenting cell*).

Bcl-2: Proteína de linfoma de células B 2 (*B cell lymphoma 2*).

BCR: Receptor de linfocito B (*B cell receptor*).

CCL: Ligandos de quimiocinas CC (*CC-chemokine ligand*).

CD: Cluster de diferenciación (*Cluster of differentiation*).

CFSE: Éster de succinimidil-carboxifluoresceína (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*).

CK2: Caseína cinasa 2 (*Casein-kinase 2*).

cSMAC: Cluster de activación supramolecular central (*Central Supramolecular Activation Cluster*).

CTLA-4: Antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico (*Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4*).

CTV: *Cell Trace Violet*.

DAG: Diacilglicerol (*Diacylglycerol*).

dSMAC: Cluster de activación supramolecular distal (*Distal Supramolecular Activation Cluster*).

Foxp3: *Forkhead box P3*.

GFP: Proteína verde fluorescente (*Green fluorescent protein*).

GITR: Proteína asociada al receptor TNF inducida por glucocorticoides (*Glycocorticoid-Induced TNFR Related*).

Grb2: Proteína unida a receptor de factor de crecimiento (*Growth factor receptor-bound protein*).

HA: Ácido hialurónico (*Hyaluronic acid*).

HEV: Vénulas de endotelio alto (*High endothelial venules*).

PNA_d: Adresina del ganglio linfático (*Peripheral Node Adressine*).

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular (*Intercellular adhesion molecule*) 1.

ICOS: Coestimulador inducible de linfocito T (*Inducible T-cell costimulator*).

IgSF: Superfamilia de inmunoglobulinas (*Immunoglobulin superfamily*).

IL: Interleucina.

IP3: Inositol trifosfato.

ITAM: Motivos de activación de inmunoreceptor basados en tirosinas (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*).

ITIM: Motivos de inhibición de inmunoreceptor basados en tirosinas (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*).

ITK: Cinasa inducible por IL-2 (*Interleukin-2-inducible kinase*).

LAT: Conector para la activación del linfocito T (*Linker for activation of T cell*).

Lck: Tirofín cinasa específica de linfocitos (*Lymphocyte-specific protein kinase*).

LFA1: Antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (*Lymphocyte function-associated antigen 1*)

LPS: Lipopolisacárido.

MADCAM1: Molécula de adhesión celular adresina de mucosa vascular (*Mucosal vascular adressin cell adhesion molecule 1*).

MAPK: Proteín-cinasas activadas por mitógeno (*Mitogen-activated protein kinases*).

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad (*Major histocompatibility complex*).

MLN: Ganglios linfáticos mesentéricos (*Mesenteric lymph nodes*).

mTOR: Blanco de rapamicina en mamíferos (*Mammalian target of rapamycin*).

NFAT: Factor nuclear de linfocitos T activados (*Nuclear factor of activated T cells*).

NFκB: Factor nuclear *kappa* B (*Nuclear factor kappa B*).

NK: Asesina natural (*Natural killer*).

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógeno (*Pathogen associated molecular patterns*).

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*).

PBS: Buffer de fosfatos salino (*Phosphate-Buffered Saline*).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

PD-1: Proteína de muerte programada 1 (*Programmed Death 1*).

PIP2: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (*Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate*).

PKC θ : Proteín cinasa C theta (*Protein kinase C theta*).

PLC γ : Fosfolipasa C gamma (*Phospholipase C gamma*).

PLN: Ganglios linfoides periféricos (*Peripheral lymph nodes*).

pSMAC: Cluster de activación supramolecular periférico (*Peripheral Supramolecular Activation Cluser*).

RasGRP: Proteína liberadora de guanilo RAS (*RAS guanyl-releasing protein*).

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute (*Roswell Park Memorial Institute*).

S1P: Esfingosina-1-fosfato (*Sphingosine-1-phosphate*).

S1PR: Receptor de esfingosina-1-fosfato (*Sphingosine-1-phosphate receptor*).

SFB: Suero fetal bovino.

SMAC: Cluster de activación supramolecular (*Supramolecular activation cluster*).

SRCR: Receptores basurero ricos en cisteína (*Scavenger receptor cysteine rich*).

TCR: Receptor de linfocitos T (*T cell receptor*).

TNF: Factor de necrosis tumoral (*Tumor necrosis factor*).

TNFRSF: Superfamilia de receptores de TNG (*TNF receptor superfamily*).

ZAP70: Proteín cinasa asociada a cadena zeta de 70 kDa (*Zeta-chain associated protein kinase*).

RESUMEN

CD5 es una glicoproteína de 67 kDa expresada en timocitos, linfocitos T y un subtipo de linfocitos B (B1a). Se le ha atribuido un papel de regulador negativo de la señal del TCR y se sabe que los niveles de expresión de esta molécula se correlacionan con la intensidad de la señal del TCR. CD5 posee una región extracelular con tres dominios tipo "scavenger" SRCR y una región intracelular con distintas regiones susceptibles a ser fosforiladas en residuos de tirosina y que pueden tener interacciones con proteínas intracelulares. Siendo una de estas regiones aquella denominada como dominio ITIM, que comprende a la secuencia Y429-Y441. Sin embargo, no se conoce del todo la participación de este dominio en la regulación de la señal del TCR. Como antecedentes directos del laboratorio se ha encontrado que podría estar regulando procesos de muerte celular en timocitos, así como favoreciendo la selección positiva, pero en linfocitos T periféricos no se ha estudiado la relevancia que este dominio posee.

En este trabajo se estudió el papel del dominio ITIM de CD5 en linfocitos T periféricos en un modelo murino *knock-in* para el dominio ITIM de CD5 (CD5 ITIM-KI). Se encontró que la ausencia de este dominio no altera las frecuencias ni números absolutos de las diferentes poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+, sin embargo, aquellos linfocitos CD5 ITIM-KI expresan mayores niveles de CD5 en superficie en comparación con aquellos provenientes del WT, esto en condiciones de homeostasis.

Se evaluó la activación del linfocito T en un modelo *in vivo* tras la administración de α -CD3 vía intraperitoneal, y sorprendentemente se encontró en los linfocitos T de ratones CD5 ITIM-KI un incremento de la población de linfocitos T efectores/activados CD4+ y CD8+, aunado a una disminución de la población de linfocitos T naive CD4+ y CD8+ en nódulos linfáticos mesentéricos, periféricos y en bazo respecto a los controles silvestres. Además, se encontró que los linfocitos T CD8+ del ratón CD5 ITIM-KI activados con este modelo expresaron mayores niveles de CD25, a comparación de aquellos de ratones silvestres. Estos resultados

sugieren que el dominio ITIM de CD5 participa en la regulación negativa de la señal del TCR.

Igualmente, en este modelo de activación celular *in vivo*, se evaluó la muerte celular (apoptosis y necrosis) inducida por la activación sin embargo, no se encontraron diferencias en la muerte observada entre ratones WT y CD5 ITIM-KI, por lo que se concluye que el dominio ITIM de CD5 no está involucrado en la regulación de la sobrevivencia de los linfocitos T periféricos.

En resumen, estos resultados sugieren que el dominio ITIM de CD5 regula la expresión de CD5 de los linfocitos T periféricos en condiciones de homeostasis, así como la activación del linfocito T tras un estímulo con α -CD3, pero no regula procesos de muerte celular o supervivencia del linfocito T, lo cual confirma su papel en la función de CD5 como regulador negativo de la señal del TCR.

ABSTRACT

CD5 is a 67kDa glycoprotein expressed in thymocytes, T cells and B cell subtype B1a. CD5 plays a key role in the TCR signaling pathway as negative regulator. Also, the expression levels of this molecule are related to TCR signaling intensity.

CD5 protein has an extracellular and an intracellular region. The extracellular region possesses three SRCR type B domains, on the other hand the intracellular region has distinct regions of tyrosines which are susceptible to phosphorylation and can interact with other intracellular proteins.

One of these regions is identified as ITIM domain, which comprises the Y429-Y441 sequence. However, it is not fully understood how this domain takes part in TCR signaling regulation. Previous reports from our lab suggest that this domain might be regulating cellular death processes in thymocytes, as well as favoring the positive selection in the thymus, but there is lack of evidence about the importance of the ITIM domain on peripheral T cells.

In the present work, the role of CD5 ITIM's domain was studied in peripheral T cells from CD5 ITIM domain knock-in (CD5 ITIM-KI) mice. It was found that the absence of this domain does not affect the frequencies nor the absolute numbers of the different CD4⁺ and CD8⁺ T cells populations. However, it was found that in homeostasis conditions, T cells from CD5 ITIM-KI mice expressed larger levels of surface CD5 in comparison with those from WT mice.

T cell activation was evaluated in an in vivo model after α -CD3 intraperitoneal administration, and it was found a larger increase in the effector/activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells from CD5 ITIM-KI mice, together with a decrease of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells in mesenteric and peripheral lymph nodes and the spleen, in comparison to WT controls. In addition, activated CD8⁺ T cells from CD5 ITIM-KI mice expressed higher levels of CD25, in comparison to T cells coming from WT controls. These results suggest that the CD5 ITIM domain is involved in the negative regulation of TCR's signal. In the same way, the activated induced cell death (apoptosis and necrosis) was assessed, but no differences were found in the cell

death between WT and CD5 ITIM-KI T cells. Therefore, we concluded that the CD5 ITIM domain is not involved in peripheral T cell survival.

In conclusion, these results suggest that the CD5 ITIM domain controls CD5 expression on peripheral T cells in homeostatic conditions, as well as T cell activation after α -CD3 stimuli, but it does not control T cell death processes or survival, which confirm its contribution to the role of CD5 as a negative regulator of TCR's signal.

INTRODUCCIÓN

Los linfocitos T naive tienen como una de sus principales funciones el reconocimiento de antígenos extraños presentados por moléculas del MHC (*major histocompatibility complex*) pero también reconocen antígenos propios que proveen señales para su mantenimiento y supervivencia, que potencian su funcionalidad, así como que promueven la inducción de mecanismos de tolerancia en condiciones de homeostasis ^{1,2}. Sin embargo, principalmente reconocen antígenos extraños para su posterior activación, proliferación y generación de un fenotipo efector. Este proceso que se lleva a cabo en los ganglios linfáticos, sitio anatómico en el que se facilita el encuentro de linfocitos T y B con sus antígenos; sin embargo, la diversidad del repertorio de linfocitos T es tan grande que solo bajas proporciones de linfocitos son capaces de reconocer un antígeno con la afinidad suficiente para sobrepasar su umbral de activación, dándole muy alta especificidad a dicho repertorio ³.

Las moléculas del MHC que presentan los antígenos a los linfocitos T se pueden clasificar en aquellas denominadas de Clase I, que son reconocidas por linfocitos T citotóxicos (CD8+) y que presentan péptidos presentes en citoplasma, los cuales son generados por el proteasoma; y aquellas de Clase II que presentan péptidos provenientes de antígenos extracelulares que fueron tomados por la célula a través de procesos de endocitosis y procesados por la células presentadoras de antígenos a los linfocitos T cooperadores (CD4+) ⁴. De manera adicional, se ha descrito la presentación cruzada de antígenos exógenos por moléculas de MHC-I ⁵, así como la presentación por moléculas MHC no convencionales ⁶ o de antígenos no peptídicos, como la presentación de glucolípidos por CD1d ⁷.

Los linfocitos T naive están en recirculación continua a través de los diferentes órganos linfoides secundarios (como lo son el bazo, los ganglios linfáticos y tejidos asociados a mucosas), así como por la sangre y vasos linfáticos, en búsqueda del antígeno hacia el cual su TCR (*T cell receptor*) es específico. Esta recirculación es de gran importancia para el encuentro del linfocito T con aquellos antígenos raros o que se encuentran en bajas concentraciones. Por otro lado, este “tránsito” difiere

entre linfocitos T CD4+ y CD8+, siendo su tiempo de residencia en ganglio de 10-12 h y de 19-21 h, respectivamente ^{3,8}. Así mismo, los linfocitos T recirculan a través de la linfa, la cual drena los fluidos intersticiales de todos los tejidos, para limitar o prevenir la distribución de patógenos, asegurando que los antígenos tomados por APCs (*antigen-presenting cells*) sean presentados a los linfocitos T ⁸.

Para que se lleven a cabo los procesos de presentación antigénica por parte de una APC a los linfocitos T, es necesario un contexto anatómico que de alguna manera provea un ambiente propicio para estas interacciones ⁹. El ganglio linfático provee el contexto anatómico idóneo para favorecer los procesos de presentación antigénica por parte de una APC a los linfocitos T, facilitando así una interacción física entre estas dos células. En el ganglio se encuentran tanto componentes estromales, que proveen la estructura a este, así como factores solubles, incluidas la citocina IL-7 y las quimiocinas como CCL19, CCL21, entre otras, que favorecen la migración y posicionamiento del linfocito T en la zona T del nódulo linfático. Por otro lado, las células presentes en el ganglio pueden ser de origen mieloide, principalmente células dendríticas residentes o migratorias, así como macrófagos especializados ^{8,9}. Estos macrófagos se dividen de acuerdo con su posicionamiento dentro del ganglio: 1) macrófagos residentes del seno que están en contacto directo con la linfa; 2) macrófagos parenquimales presentes en los folículos de linfocitos B, en la zona T y en los cordones medulares; 3) macrófagos del seno subcapsular; y 4) macrófagos del seno medular ¹⁰. Por lo tanto, estos macrófagos y células dendríticas son esenciales en el proceso de defensa contra patógenos al establecer interacciones entre sí, así como con los linfocitos T, para el correcto desarrollo de una respuesta inmune ¹¹. También puede haber células de origen linfoide, además de los linfocitos T circulantes, se encuentran linfocitos B y células NK o NKT ⁸.

Para un buen funcionamiento del sistema inmune, es imprescindible que se lleve a cabo el proceso de migración dirigida (“homing”), así como la recirculación de los linfocitos T a través de todo el organismo. La entrada de los linfocitos T a los ganglios linfáticos es un proceso ampliamente controlado que se lleva a cabo a través de las vénulas del endotelio alto (HEVs. [*High endothelial venules*]) o por

vasos linfáticos aferentes (de un ganglio río arriba) ⁸. Los linfocitos T llevan a cabo diferentes interacciones con el endotelio donde intervienen selectinas, integrinas, y receptores de quimiocinas. Inicialmente, a través de las selectinas CD62L y PNA_d, se lleva a cabo el proceso de “rolling” (rodamiento/rodadura) y “tethering” (contacto/anclaje), lo cual favorece la interacción de CCL21 (inmovilizado en células endoteliales) con CCR7 (presente en el linfocito T) ¹². Cabe destacar que CCL19 también es ligando de CCR7, sin embargo, esta quimiocina no se expresa en las células endoteliales de las HEV ¹³. El reconocimiento de CCL21 por CCR7 lleva a la activación de moléculas de adhesión como lo son las integrinas LFA-1 y VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$), que interactúan con ICAM-1, o la interacción de la integrina $\alpha 4\beta 7$ con la adhesina MAdCAM1 en las células endoteliales, que detienen al linfocito y favorecen su trans migración a través del endotelio (**Figura 1**) ^{12,13}.

El proceso de migración de los linfocitos T está también regulado por la molécula S1P (esfingosina-1-fosfato), que es una molécula quimioatrayente para linfocitos que se encuentra presente en sangre y linfa, pero no en órganos linfoides secundarios, que favorece su egreso de ganglios a la recirculación a través de los senos corticales ^{8,12}.

Si el linfocito T naive encuentra su antígeno en los órganos linfoides secundarios, se regulan al alza las moléculas CCR7 y CD69, principalmente. CD69 es un marcador que se expresa de manera temprana en la superficie del linfocito T (1-2 h después de la estimulación del TCR) y llegándose a encontrar incluso hasta tres días después ¹⁴. Este marcador (CD69) es importante para la retención del linfocito T en los ganglios linfáticos, para favorecer la activación y proliferación celular posterior a la activación, así como para regular procesos de diferenciación a fenotipos Th17 o Tregs ¹⁵.

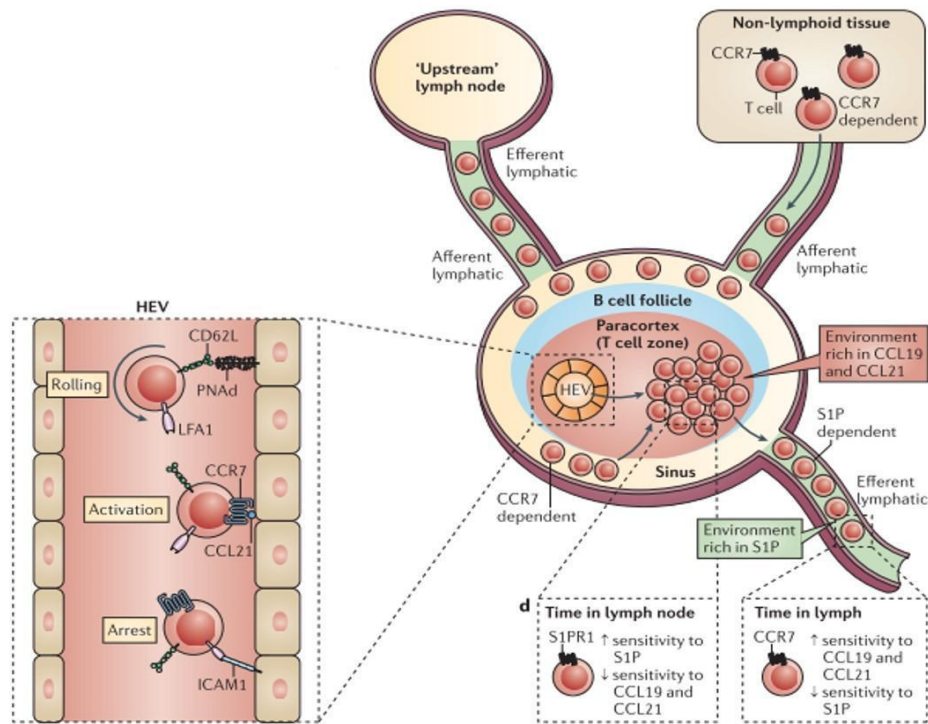


Figura 1: Los linfocitos T recirculan a través de los ganglios linfáticos. Los linfocitos T entran a los ganglios linfáticos a través de las vénulas del endotelio alto (HEVs, por sus siglas en inglés). Las células endoteliales de estas vénulas expresan moléculas de "homing" (alojamiento) que favorecen el rodamiento, el arresto y la migración del linfocito al ganglio. Los linfocitos T también pueden entrar a través de la linfa, ya sea provenientes de otros ganglios o a partir de tejidos no linfoides. Sin importar por dónde lleguen, su migración a la zona de T (paracorteza) es dependiente de CCR7 y la gran cantidad de sus ligandos (CCL19 y CCL21) presentes en esta zona. Mientras que otra molécula, S1P (esfingosina-1-fosfato) se encuentra en grandes cantidades en sangre y linfa, favoreciendo el egreso de los linfocitos T que, al estar expuestos a altas cantidades de CCL19, sensibilizan a CCR7 y comienzan a expresar S1PR. Un mecanismo similar ocurre para la llegada a ganglio, donde se sensibiliza S1PR y se expresa a la alta CCR7.

Tomado de Masopust, David; Schenkel Jason M. (2013) ¹².

La expresión de estas moléculas en la superficie de los linfocitos T que han reconocido su antígeno (como CD69 y CCR7), favorecen el tiempo de residencia del linfocito T en el órgano linfoide secundario, donde el microambiente de citocinas, y las señales de coestimulación provenientes de las células presentadoras de antígeno presentes en los órganos linfoides promueven su proliferación ¹². Una vez

que estos se diferencian a linfocitos T efectores, estas disminuyen la expresión de CD62L y CCR7, y sobre-expresan moléculas de "homing" y/o migración (tales como CD69, CXCR3, PSGL-1, LFA-1 entre otros ¹⁶⁻¹⁸; además de CD44 del que se hablará más adelante) que las dirigen a tejidos no linfoides para ejercer sus distintas funciones ^{12,19}.

Es importante mencionar que los linfocitos T con mayor afinidad al antígeno reconocido permanecen más tiempo dentro del ganglio linfoide que aquellos con menor afinidad a este antígeno, favoreciendo así su proliferación ¹². Por lo mencionado anteriormente, también cabe mencionar que el balance entre CCR7 y S1P1R es importante para el linfocito T y su tiempo de residencia en órganos linfoides secundarios. Mandl y cols. ¹³ en una serie de experimentos para conocer estos tiempos de residencia de linfocitos T, encontraron que los linfocitos T CD4+ egresan más rápido de los ganglios linfáticos con tiempos de residencia promedio de 12.2 horas; mientras que los linfocitos T CD8+ se demoran en salir de éstos, con un tiempo de residencia promedio de 21.2 horas, esto sin alterar ni su localización o movimiento dentro del órgano, ni expresión de marcadores de superficie.

Otra molécula importante para la migración de los linfocitos T tras su activación es CD44, un receptor de componentes de la matriz extracelular (como puede ser fibronectina, osteopontina, colágeno, entre otros), siendo el ligando más conocido el ácido hialurónico (HA) o hialuronano ²⁰. Tras la estimulación del TCR, la expresión de esta molécula aumenta y se mantiene en linfocitos T de memoria ²⁰⁻²². CD44 es importante en los procesos de migración del linfocito T, junto con VLA-1 ($\alpha 4\beta 1$), contribuyendo a la extravasación de los linfocitos T a los sitios de inflamación ^{21,22}, y también se ha postulado su participación en el reclutamiento de los precursores linfocitarios a timo ²¹. Además, se ha asociado su expresión al desarrollo de una respuesta tipo Th1 ^{20,22}.

Posterior a la resolución de una infección, la mayoría de los linfocitos T efectores que llevaron procesos de expansión clonal llegan a una fase de contracción donde la mayoría de ellos sufren procesos de muerte por apoptosis, probablemente por

falta de señales de receptores de citocinas y del TCR. Sin embargo, una fracción de las células efectoras se diferencian a células quiescentes denominadas linfocitos T de memoria ^{19,23}, las cuales se caracterizan por tener una mayor capacidad de respuesta a un segundo reto antigénico ²⁴. Las fases de activación, expansión, contracción y generación de memoria de linfocitos T se repiten con cada reto antigénico ²³.

Activación del linfocito T.

Como se ha mencionado la migración del linfocito T es crucial para el proceso de activación y diferenciación funcional del linfocito T. Ante un estímulo antigénico, el linfocito T puede seguir distintos destinos: la activación funcional, la inducción de tolerancia o la muerte (por exceso o insuficiente señal de activación). La integración de todas las señales recibidas modulará la fuerza y el tipo de respuesta y las funciones efectoras que tendrá el linfocito T ²⁵. De igual forma, la supervivencia del linfocito T es afectada por el microambiente donde se encuentre, el contexto de interacción TCR-pMHC, las señales coestimuladoras, presencia de citocinas, pero también hay otras señales de supervivencia, como lo pueden ser interacciones de adhesión con la matriz extracelular ²³.

Igualmente, se conoce que son necesarias interacciones constantes del TCR con autoantígenos o péptidos propios cargados en moléculas del MHC para el mantenimiento y supervivencia de las poblaciones de linfocitos T ¹⁹. Además, estos contactos de los linfocitos T con pMHC proveen ciertas señales de retención de esta célula en ganglios linfáticos, ya que en ratones con ausencia de moléculas del MHC-II se encontró que los linfocitos T CD4+ egresan más rápido de los órganos linfoides secundarios, es decir, su tiempo de residencia es menor ¹³.

En su artículo de revisión, Gasteiger y cols ⁸, hablan de un paradigma clásico de activación de un linfocito T desde el contexto de una APC, siendo este en diferentes etapas y a grandes rasgos: 1) Adquisición del antígeno por una APC y maduración

de esta por presencia de estímulos inflamatorios; 2) sobreexpresión de CCR7 y migración a ganglios linfáticos a través de los vasos linfáticos aferentes; 3) llegada a ganglios linfáticos y posicionamiento en la zona interfolicular del ganglio; e 4) interacción y activación de linfocitos T naive. Por lo tanto, los linfocitos T requieren de contacto con células acarreadoras de antígeno para poder activarse, diferenciarse (a un fenotipo efector) y posteriormente disparar respuestas efectoras ¹² (Figura 2).

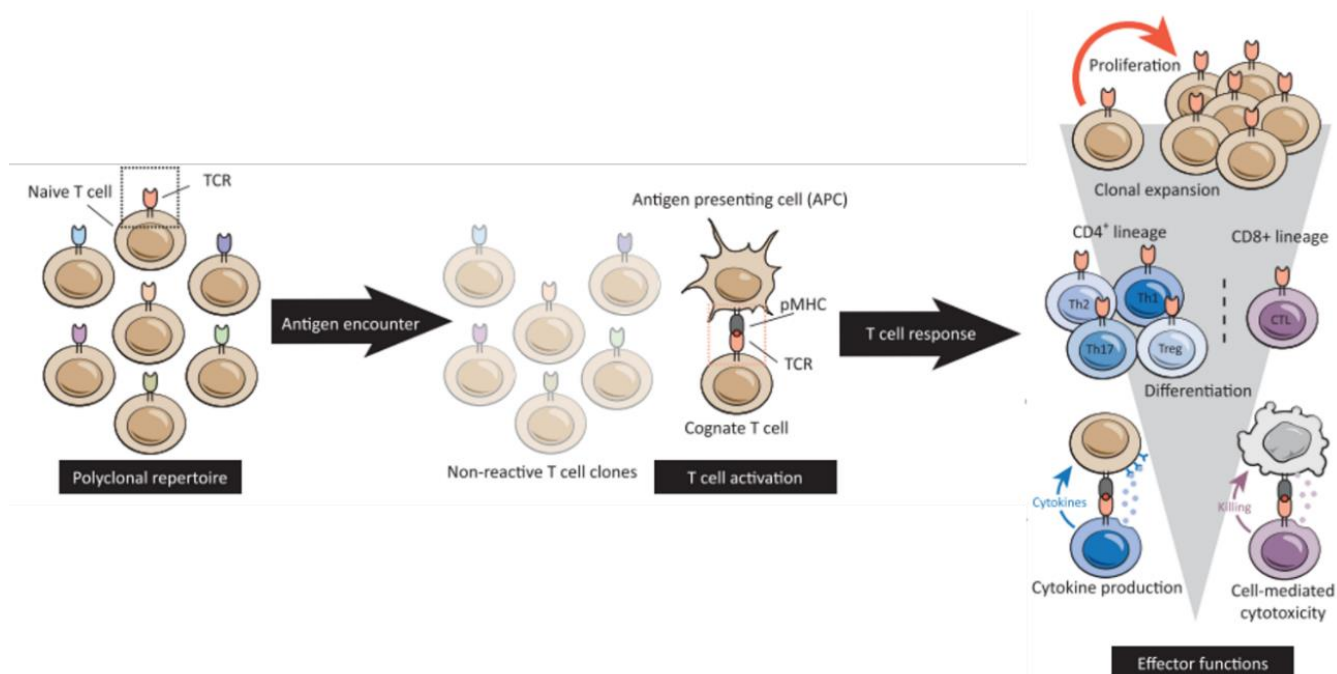


Figura 2: Reconocimiento de antígenos presentados por APCs a linfocitos T naive.

Los linfocitos T poseen un TCR que reconoce un péptido-MHC (pMHC), dando así un repertorio policlonal, es decir, una población de linfocitos T con distintas especificidades del TCR, donde cada una es específica a un complejo pMHC (péptido agonista). Sin embargo, se ha demostrado que un mismo TCR podría reconocer péptidos similares, aunque con menor afinidad llevando a distintas respuestas funcionales parciales. El encuentro, reconocimiento y posterior unión del linfocito T a través de su TCR a un complejo pMHC presente en una APC, lleva a la activación del linfocito T, y junto a otras señales, lleva al inicio de una respuesta celular. La activación de un linfocito T naive, lo lleva a una fase de expansión clonal, a la posterior diferenciación a una subpoblación efectora, y como consecuencia, a que se genere una función efectora. Cabe resaltar que aquellos linfocitos T con un correceptor CD4, interactúan con moléculas del MHC de clase II presentes en la APC, mientras que aquellos con un correceptor CD8, interactúan con moléculas de clase I presentes en todas las células nucleadas, pero la activación inicial solo es dada cuando interactúan con una APC. Tomado de Courtney, Adam H.; et. al. (2017) ²⁶.

Heinzel y cols.²⁵ mencionan dos fases de activación del linfocito T: la primera, dada por un gran número de cambios celulares consecuencia del estímulo inicial, llevando a una gran proliferación celular; mientras que la segunda la denomina una fase de control, que es regulada por diferentes señales coestimuladoras, de citocinas y quimiocinas. Mientras que los linfocitos T CD8+ necesitan una exposición breve al antígeno para llevar a cabo esta proliferación, los linfocitos T CD4+ necesitan un mayor tiempo²⁵. Posiblemente, esto es debido a que los linfocitos T CD4+ escanean a mayor velocidad los ganglios linfáticos en búsqueda del antígeno, en comparación de los linfocitos T CD8+, pudiendo perder aquellos antígenos que se encuentren en bajas cantidades ya que el escaneo realizado no es tan meticuloso como el realizado por los linfocitos T CD8+ que permanecen más tiempo dentro de los ganglios linfáticos¹³.

Una vez que los linfocitos T naive se diferencian a un fenotipo efector, adquieren una cinética de respuesta más rápida, son más sensibles al antígeno (ya que pueden activarse con bajas dosis de estos), además de que la avidéz de un linfocito T efector hacia el complejo pMHC es entre 20-50 veces mayor que la de su contraparte naive²⁷, lo cual hace que dependan en menor medida de señales de coestimulación para adquirir funciones efectoras.

Kimachi y cols²⁸ determinaron que se requiere un mayor número de complejos TCR-pMHC para activar un linfocito T naive (≈ 400) comparado con los necesarios para activar a un linfocito T efector (≈ 40). Sin embargo, esta cantidad de moléculas del MHC requeridas para estimular un linfocito T naive, solo representan un 0.2-1.0% del total de moléculas del MHC en una APC. Estos mismos autores, en otro trabajo, determinaron que la cantidad necesaria de péptidos de alta antigenicidad que reconoce un linfocito T naive para alcanzar respuestas proliferativas similares a las de aquellos linfocitos T efectores es 10 veces mayor, y 100 veces mayor para péptidos de baja antigenicidad²⁷.

Las interacciones estables entre el TCR y el complejo p-MHC ayudan a mantener una señalización sostenida en el linfocito T, también contribuyen a la generación de señales de supervivencia y/o proliferación homeostática. Dorfman y cols.¹ encontraron que esta señalización basal se mantiene activa a través de la fosforilación de la cadena ζ del complejo TCR/CD3, además de las interacciones de CD4 o CD8 con las moléculas MHC-II y MHC-I presentes en la APC, respectivamente.

Vías de transducción de señales involucradas en la activación del linfocito T.

La fuerza de la señal del TCR determina en gran medida la respuesta final de una población, y aunque células estimuladas levemente se expanden poco, muchas aún pueden llegar a poseer fenotipos efectoros y diferenciarse a un fenotipo de memoria¹². La fuerza de la señal del TCR viene determinada por la cantidad y la calidad de la misma, siendo la primera principalmente influenciada por la cantidad de complejos pMHC presentes en la célula presentadora de antígeno; mientras que la calidad se refiere por la potencia o fuerza de interacción entre un TCR y el pMHC al que este reconoce²⁹. La señalización dada por el TCR es un evento muy importante para el mantenimiento de las poblaciones de linfocitos T periféricos, además de ser fundamental para el desarrollo de respuestas inmunes eficientes³⁰.

La especificidad de un linfocito T está definida por su TCR, lo que le provee una identidad clonal. CD3 y las cadenas ζ del llamado complejo TCR/CD3, son requeridas para que los eventos de señalización se lleven a cabo. Inicialmente, se lleva a cabo el reconocimiento del complejo pMHC de las APCs facilitado por los correceptores CD4 o CD8 que se unen los dominios proximales del MHC²⁶; CD4 interactúa con el dominio $\alpha 2$ y $\beta 2$ de las moléculas MHC-II, mientras que CD8 interactúa con el dominio $\alpha 3$ de las moléculas MHC-I^{31,32}. Estos correceptores son de suma importancia, ya que se ha encontrado que la presencia de CD4 en el linfocito T incrementa la sensibilidad del TCR al pMHC, disminuyendo hasta 100 veces la cantidad de antígeno requerida, favoreciendo el ensamblaje del TCR-pMHC³³.

Una cinasa importante para el inicio de la transducción de señales es Lck. Se sabe que Lck posee dos tirosinas que se encuentran relacionadas con su actividad: Y394 y Y505; la fosforilación de la primera lleva a un incremento en la actividad de cinasa, mientras que Y505 lleva a una inhibición de dicha actividad ³⁴. Este inicio de la señalización por parte del TCR está altamente regulado para evitar que Lck se encuentre activa todo el tiempo. La cinasa Csk fosforila la Y505, y tras ligación del TCR, la fosfatasa CD45 defosforila Y505, favoreciendo la activación de Lck, la cual puede fosforilar otras moléculas de Lck o transfosforilarse en la Y394 ³⁵. Mientras que a largos tiempos, se ha descrito que CD45 es capaz de defosforilar Y394 para regular a la baja su actividad ³⁴.

Lck se une a la región citoplasmática del correceptor CD4 o CD8, y al ligarse el TCR y el correceptor correspondiente con el pMHC (TCR:pMHC), la cinasa Lck es reclutada a los dominios intracelulares del TCR ²⁶ y fosforila los dominios ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) presentes en CD3 y las cadenas ζ del TCR ³⁰. Esta fosforilación crea sitios de unión de alta afinidad para los dominios SH2 de la cinasa ZAP-70 que es reclutada y fosforilada por Lck, dicha fosforilación estabiliza a ZAP70 ya que comúnmente se encuentra en el citoplasma en una conformación inactiva ³⁶. Ya que el TCR no posee una actividad enzimática, se necesita de otras proteínas para iniciar toda la cascada de señalización, siendo así, Lck y ZAP70 las proteínas encargadas de disparar esta señal.

ZAP70 propaga la señal de activación del TCR fosforilando múltiples blancos, incluyendo a la proteína de andamiaje membranal LAT que posee diversas tirosinas que son susceptibles a fosforilarse: Y132, Y171, Y191 y Y226 ²⁶. Para llevar a cabo esta fosforilación, ZAP70 se disocia del complejo del TCR, dejando sitios libres que pueden ser ocupados por más moléculas de ZAP70 para que se amplifique aún más la señal, y se recluta hacia balsas lipídicas donde se encuentra LAT ³⁷. Pero también ocurre otro evento que implica la formación de un complejo transitorio LAT-Lck-ZAP70, para favorecer la fosforilación de LAT al reclutarse al complejo de señalización del TCR ³⁰.

LAT recluta a otra proteína de andamiaje: SLP76. SLP76 es fosforilada por ZAP70, y junto a LAT funcionan como proteínas adaptadoras, amplificando la señal al reclutar diferentes proteínas como PLC γ 1 que se asocia a la Y132 de LAT ³⁸. Las tirosinas Y171, Y191 y Y226 de LAT reclutan a Grb2, y otros adaptadores que, después, pueden unir a Sos, ITK (cinasa de linfocitos T inducible por IL-2), Gads, entre otras proteínas ^{26,36}. Se ha encontrado que Vav se une a SLP76, y tiene relación con el rearreglo del citoesqueleto de linfocitos T una vez activados ³⁸

Inclusive se ha encontrado que a LAT se unen distintos reguladores negativos de la señal como lo es c-Cbl ³⁸, que está involucrado en la regulación de la señalización vía ubiquitinación de proteínas involucradas en la activación del linfocito T y se ha descrito su papel en la degradación de ZAP70, Vav, algunas MAPKs, así como un papel en la ubiquitinación de PI3K ^{39,40}.

Toda esta cascada de señalización lleva a la propagación de la señal inicial por distintas vías (**Figura 3**), por ejemplo, la mediada por PLC γ . La unión de PLC γ a LAT lleva a su activación, además de acercar físicamente a esta cinasa a su sustrato (PIP2) en membrana ³⁸. Esta enzima hidroliza PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato), produciendo DAG (diacilglicerol) asociado a membrana y de manera soluble IP3 (inositol trifosfato) ³⁸. IP3 provoca un aumento de Ca²⁺ liberado del retículo endoplasmático, provocando además una entrada de Ca²⁺ extracelular (mediado por canales iónicos). La unión de Ca²⁺ a la calmodulina activa a la calcineurina, la cual defosforila a NFAT (factor nuclear de linfocitos T activados) permitiéndole su translocación a núcleo ³⁶. Mientras tanto, el otro metabolito generado, DAG, recluta diferentes proteínas adaptadoras a membrana, incluyendo PKC θ y RasGRP. PKC θ activa un complejo proteico CARMA1, BCL-10 y MALT1, que promueve la activación de la cinasa I κ B (IKK), que fosforila al inhibidor de NF κ B, permitiendo su traslocación al núcleo y la posterior transcripción génica que controla ^{26,36}

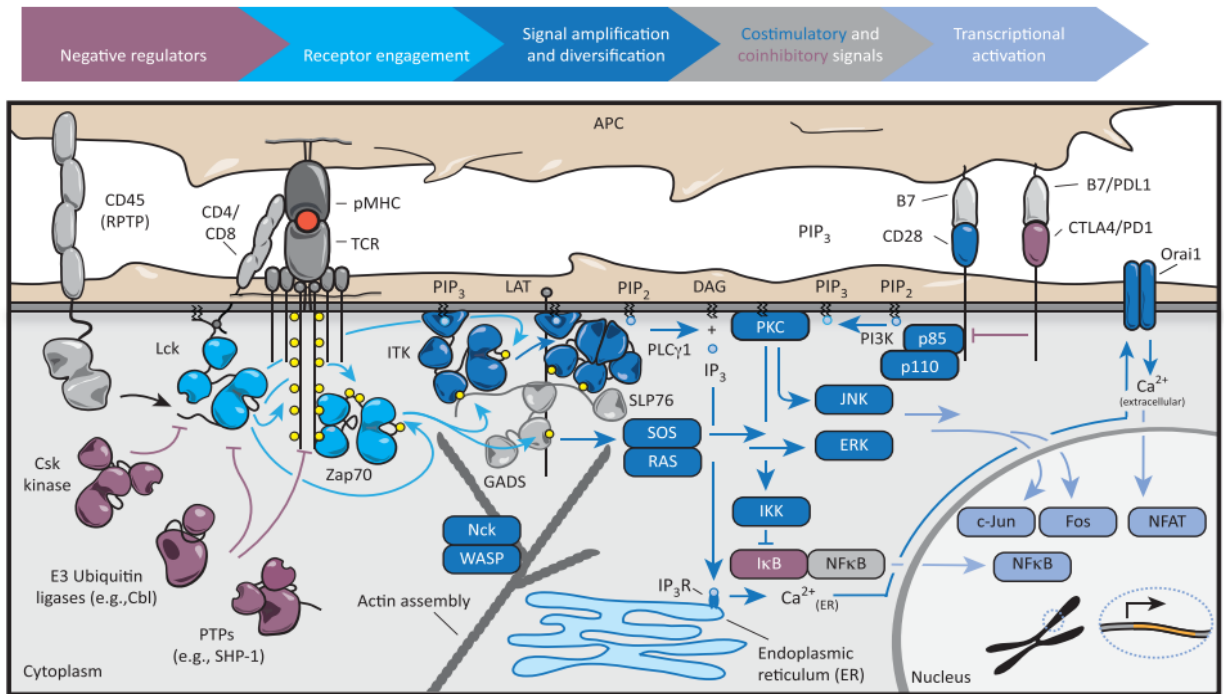


Figura 3: Esquema general de señalización del TCR tras reconocimiento del complejo péptido-MHC. Cuando la unión del TCR con el complejo pMHC se lleva a cabo, se lleva a cabo una transducción de señales a través de la membrana del linfocito T. Como eventos iniciales de esta cascada de señalización, el complejo TCR es fosforilado en sus dominios ITAM por Lck, que posteriormente lleva al reclutamiento de la cinasa ZAP70, que es fosforilada por Lck, provocando su activación. ZAP70 fosforila a la proteína adaptadora LAT, que recluta un gran número de moléculas efectoras que se activarán, activando diversas vías de señalización, como la de PLC γ , vía de las MAPK, NFAT, NF κ B, rearrreglo del citoesqueleto, entre otras. Esto, junto a la señal dada por moléculas co-estimuladoras como CD28 que lleva principalmente a la activación de PI3K, llevan a eventos de activación del linfocito T. Y esta activación se va a la baja al expresarse moléculas co-inhibitorias, como CTLA-4 o PD1; así como ubiquitinación de proteínas adaptadoras, o presencia de fosfatasa.

Tomado de Courtney, Adam H.; et. al. (2017) ²⁶.

Otra proteína importante en estas vías de señalización es Ras, que es activada por RasGEFs tras la estimulación del TCR, y ésta activa posteriormente a ERK ²⁶. Dependiendo del tipo de señal y la calidad de esta, habrá diferentes respuestas reguladas por esta vía. Por ejemplo, en el desarrollo de los linfocitos T en timo, se ha encontrado que interacciones débiles TCR-spMHC no permiten la supervivencia de timocitos (muerte por negligencia), mientras que una interacción fuerte lleva a la

muerte del timocito (selección negativa), y una interacción media lleva a la maduración del timocito. En esta última interacción, se ha descrito una activación suave y sostenida de ERK, promoviendo la supervivencia del timocito ⁴¹.

El reconocimiento de péptidos que son presentados por moléculas del MHC dispara la señalización por parte del TCR, como fue descrito anteriormente, pero son necesarias también diferentes señales coestimuladoras y co-inhibitorias que dirigen la función del linfocito T y definen su destino. Estas señales son detectadas por moléculas “co-señalizadoras” (o co-receptoras), las cuáles han sido ampliamente definidas como moléculas de superficie celular que pueden transducir señales al linfocito T y son requeridas para modular positivamente (coestimuladoras) o negativamente (co-inhibitorias) la señal del TCR, teniendo una expresión muy versátil ⁴². Estas moléculas regulan diversas funciones como la activación, diferenciación, supervivencia, proliferación y funciones efectoras.

La mayor parte de las moléculas “co-señalizadoras” pertenecen a dos superfamilias: la de las inmunoglobulinas (IgSF: immunoglobulin superfamily) y la de los receptores del TNF (TNFRSF: TNF receptor superfamily), encontrando entre las más descritas a CD28 y B7, pertenecientes a IgSF; y a OX40, GITR y CD27 pertenecientes a TNFRSF ⁴². La activación a través del TCR induce la expresión de muchas moléculas coestimuladoras y co-inhibitorias. Se ha propuesto el modelo de la “marea”. Este modelo habla de una marea inicial que viene con una abundancia de moléculas co-estimuladoras en linfocitos T naive y activados, llevando a la célula a ser responsiva, pero se llega a un momento donde hay un pico de esta marea, con gran expresión de moléculas co-estimuladoras pero también de moléculas co-inhibitorias. Y finalmente, la marea se desvanece, y hay una gran expresión de moléculas co-inhibitorias que funcionan para suprimir la activación del linfocito T ⁴².

Cabe resaltar a CD28, ICOS, CCR7, CTLA-4 y PD-1, las primeras dos como moléculas co-estimuladoras, CCR7 como una proteína a la que recientemente se le atribuye un papel como molécula co-estimuladora, y las últimas dos, clasificadas como moléculas co-inhibitorias.

- CD28 se une a CD80/86 en APCs, y esto favorece su asociación con PI3K (fosfoinositol-3-cinasa). Esta asociación lleva a la activación de la vía de AKT, que promueve proliferación y supervivencia a través de la activación NF κ B, NFAT, BCL-XL, mTOR, entre otras. Además, puede reclutar PKC θ a la sinapsis inmunológica (término que se abordará más adelante) de manera indirecta y llevar a su subsecuente activación que prenderá la vía de Ras ^{7,26,42,43}.
- De igual manera, ICOS activa PI3K, induciendo una transducción de señales de manera similar a CD28, resultando principalmente en la activación de AKT. ICOS no se expresa en linfocitos T naive, se expresa tras la activación del linfocito T, y se une a ICOSL expresado en APCs ^{7,42}.
- Recientemente se ha encontrado que CCR7, además de su papel como receptor de quimiocinas importante para procesos de migración, es capaz de fungir como una molécula coestimuladora. CCR7, en presencia de sus ligandos (CCL19 y CCL21), se puede co-localizar en la sinapsis inmunológica, y tras interacción con ZAP-70, favorecer el reclutamiento de LFA-1, que al unirse a ICAM-1, favorece la estabilidad de la sinapsis ⁴⁴.
- Respecto a CTLA-4, este es un receptor co-inhibitorio que compite con CD28 por la unión a CD80/86, además de que está descrito que puede llevar a la transendocitosis de CD80. Esta molécula también reduce la señal del TCR al reclutar a la sinapsis a SHP-2, que actúa desfosforilando a diversas moléculas efectoras como el complejo CD3/TCR, ZAP70, LAT, entre otras. Por otro lado PD-1, también recluta a su dominio ITIM e ITAM a SHP-2, ejerciendo un efecto inhibitorio similar al descrito para CTLA-4 ^{7,42}.

Sinapsis inmunológica y efectos de la activación del linfocito T.

La gran mayoría de las moléculas encargadas del inicio de la transducción de señales que llevan a la activación del linfocito T se ha encontrado que co-localizan en la sinapsis inmunológica donde sinergizan la señal del TCR. Esta sinapsis está

compuesta por tres tipos de moléculas distintas: TCR y moléculas asociadas a este, moléculas “co-señalizadoras” y moléculas de adhesión ^{7,42}.

Tras el contacto del TCR con moléculas del MHC cargadas con péptido, inicia un proceso de reorganización de proteínas membranales e intracelulares en la región de contacto, así como el rearrreglo del citoesqueleto que es necesario para la formación de una sinapsis inmunológica madura (aprox. 5-30 minutos) ^{45,46}. El inicio de la señalización se da por el reclutamiento de cinasas como Lck, fosforilación de los dominios ITAM del complejo CD3/zeta, permitiendo el reclutamiento y la hiperfosforilación de ZAP-70 (puede observarse desde los 15 segundos) y la posterior fosforilación de LAT; también ocurre la activación de PLC-gamma, que lleva a la movilización de Ca^{2+} intracelular y a la activación de PKC ⁴⁵. Otro evento de señalización intracelular que lleva al rearrreglo del citoesqueleto es la fosforilación de LAT que recluta a SLP76 que, al fosforilarse, recluta a Vav y Nck. Vav activa a las Rho GTPasas Rac y Cdc42, y Nck a WAVE2 y WASP, las cuales al asociarse a Arp2/3, favorecen la polimerización y ramificación de los filamentos de actina ^{47,48}.

Una sinapsis es una estructura especializada que se forma entre las membranas de dos células que se encuentran muy próximas, y este contacto les permite la transmisión de diferentes señales entre ellas ⁴⁹. El término de sinapsis inmunológica (IS, por sus siglas en inglés) mencionado anteriormente, fue acuñado tras los trabajos realizados por Monks y cols. ⁵⁰ donde describen en los linfocitos T un proceso de segregación de proteínas membranales en dominios de contacto, denominándose “clusters de activación supramolecular” o SMACs. En estos clusters se muestra que en el sitio de interacción TCR-pMHC, hay receptores y proteínas intracelulares (Lck, Fyn, PKC θ , entre muchas otras) involucradas en la activación del linfocito T organizadas en dominios espaciales, lo cual explica los numerosos sucesos que se llevan a cabo durante la activación del linfocito T.

Las SMACs se dividen en central, periféricas y distales, cSMAC, pSMAC y dSMAC, respectivamente. El dSMAC funciona como lamelipodio y lleva ciclos de protrusión y retracción. pSMAC es rico en LFA-1 y la integrina talina que se une al citoesqueleto

y a otras proteínas o moléculas de adhesión, y en conjunto forman el “lamellum”. Mientras que las interacciones TCR-pMHC son formadas en el dSMAC pero tras señales de activación, se mueven a cSMAC ⁷.

La estimulación del TCR se lleva previo a la formación de la sinapsis inmunológica, por lo que dicha sinapsis no es necesaria para la activación inicial del linfocito T ⁴⁹, pero si es importante para la organización espacial de interacciones superficiales, componentes de señalización citoplasmática y andamiajes ⁴² que llevan a una activación completa del linfocito T. La sinapsis inmunológica es una estructura dinámica: en los primeros tiempos tras el contacto entre el TCR y pMHC, las moléculas de TCR-CD3 se encuentran en la periferia de la sinapsis, y en los 15-30 minutos posteriores al contacto, las moléculas de TCR se encuentran totalmente en el cSMAC, asociándose su presencia a la maduración de dicha sinapsis ^{51,52}.

Lee y cols ⁵² demostraron que el reclutamiento de Lck ocurre a tiempos cortos, encontrándose en su forma activa (fosforilada) desde los 2 minutos, con un pico máximo a los 5-7 minutos, mientras que para ZAP-70 su forma activa, medida por la fosforilación de tirosinas, tiene un pico máximo a los 10 minutos y disminuye su presencia en la sinapsis a los 60 minutos de la formación de ésta, disminuyendo su intensidad conforme la sinapsis madura. En este mismo artículo, los autores demuestran que la mínima duración de la sinapsis inmunológica para que estas señales induzcan una proliferación del linfocito T es de 2 horas ⁵².

Cabe señalar un evento de regulación negativa de suma importancia para la regulación de la señal dada tras la ligación del TCR que es la desfosforilación de tirosinas tanto en el complejo TCR-CD3 como de otras moléculas río abajo del TCR. Una proteína muy importante en esta regulación es la fosfatasa SHP-1, la cual se expresa en células de origen hematopoyético y tiene un papel de regulador negativo de la señal del TCR, lo cual contribuye a establecer el umbral de activación del linfocito T, repercutiendo así en el desarrollo de los linfocitos T y en la capacidad de respuesta de aquellos linfocitos T maduros ⁵³.

Tras toda esta cascada de señalización dada por el TCR, así como por las señales dadas por las moléculas co-estimuladoras, se lleva a transcripción y traducción de citocinas, receptores de citocinas, la expresión de algunos genes que favorezcan la activación del linfocito T ⁵⁴, entre otras funciones. Esta activación lleva a que el linfocito T inicie un proceso de proliferación, una etapa importante en la cual se induce la expresión de IL-2 y CD25 (cadena α del receptor de IL-2), moléculas necesarias para el inicio de la respuesta proliferativa del linfocito T, e incluso para su diferenciación hacia un fenotipo efector ^{55,56}.

La expresión de CD25 es necesaria para la generación de un receptor de alta afinidad a IL-2, incrementando la afinidad por esta interleucina hasta 100 veces ⁵⁵. El estímulo de CD28, principalmente, es el que da señales que tienen como consecuencia la producción de IL-2, la cual controla procesos de supervivencia, expansión clonal, así como la diferenciación del linfocito T. Además, la IL-2, junto con la señal dada por CD28, induce la entrada de la célula al ciclo celular, regulando el tránsito de la fase G a la S ^{54,57}, tras el aumento de la expresión de las ciclinas así como del factor de transcripción E2F dependiente de PI3K; además activa la vía de las MAPK y activa STAT3 y STAT5, vías que llevan a la regulación de las respuestas mitogénicas por esta citocina ⁵⁷.

De manera interesante, en un estudio desarrollado por Colombetti y cols ⁵⁸, se ha descrito un mecanismo por el cual, tras una estimulación prolongada de TCR/CD28, el linfocito T es capaz de proliferar en ausencia de IL-2, dependiente de señales dadas por PI3K y mTOR, pero la proliferación es lenta y no tan eficiente. Esta estimulación prolongada se traduce en que el antígeno hacia el cual el linfocito T es específico debe persistir durante todo el proceso de proliferación.

Además, hay un juego importante en la regulación de diversos factores de transcripción, como aquellos relacionados con la activación, proliferación, maduración/diferenciación, homeostasis, entre otras funciones. Por ejemplo, un factor relacionado con la activación y proliferación de los linfocitos T lo es GRAIL (miembro de la familia E3-ubiquitin ligasas), expresado desde linfocitos T CD4+ SP.

Su presencia impide la proliferación del linfocito, y tras activación del linfocito T, su expresión disminuye permitiendo al linfocito T proliferar ⁵⁹, siendo la señal dada por CD28 y por IL-2R la responsable de la disminución de la expresión de GRAIL mediado por la activación de mTOR.

Otro de los factores de transcripción que pueden estar involucrados en la maduración del linfocito T en timo y cuya actividad se pueda ver reflejada en periferia, es Runx1. Se ha encontrado que la ausencia de Runx1 lleva a una disminución de linfocitos T CD4+ periféricos, dada por una eliminación activa de estos por el sistema del complemento ⁶⁰. Otro factor de transcripción relevante es ThPOK, el cual es necesario para la generación de linfocitos T CD4+, dirigiendo a los timocitos hacia este linaje; mientras que uno de los factores encargados de dirigir hacia un linaje CD8 es Runx3, llevando a un silenciamiento del gen de *Cd4*, que a su vez, Runx3 es regulado a la baja en presencia de altas cantidades ThPOK ⁶¹.

Incluso hay factores de transcripción relacionados con la regulación de las respuestas de los linfocitos T, como lo son aquellos de la familia Ets, entre ellos, GABP, necesario para el mantenimiento de la homeostasis periférica, ya que se encontró que este regula procesos asociados a la replicación y reparación del DNA, el ciclo celular, así como genes asociados a apoptosis y senescencia en linfocitos T, entre otros ⁶².

Todas estas diferentes señales mencionadas juegan un papel fundamental en la activación del linfocito T regulando uno o más parámetros que llevarán a la respuesta final de los linfocitos ¹², pero también encontramos diversas moléculas que pueden colocalizarse en la sinapsis inmunológica y llevar distintas funciones de regulación de la señal del TCR. Todas estas señales transducidas por el TCR deben estar controladas y reguladas, y comúnmente se establece un balance entre moléculas que ejerzan efectos positivos y efectos negativos, y una molécula muy importante para esta regulación es la glicoproteína CD5 ⁶³.

CD5, estructura, función y regulación genética.

CD5, es una glicoproteína monomérica con un peso molecular de 67 kDa, originalmente conocida como Lyl-1 en ratón y codificada en el cromosoma 9; y originalmente conocida como Leu-1 en humano y codificada en el cromosoma 11q12.2 ⁶⁴. La expresión de CD5 está regulada durante todo el desarrollo de los linfocitos T en timo, aumentando conforme el timocito madura, siendo, finalmente, los linfocitos T en periferia los que expresan mayores niveles de CD5, y entre estos, los linfocitos T CD4+ poseen niveles mayores de CD5 que los linfocitos T CD8+ ⁶⁵ (**Figura 4**).

CD5 fue uno de los primeros marcadores utilizados para la identificación de los linfocitos T y se le llegó incluso a denominar marcador pan-T linfocitario ⁶⁶, cuya expresión aumenta en la maduración de timocitos a la par de la expresión del complejo TCR/CD3, expresándose desde el estadio de dobles negativas (DN) a la par con el pre-TCR. CD5 aumenta en el estadio de dobles positivas (DP), y se ha hallado que la señalización a través del TCR lleva al aumento de esta expresión de CD5 ⁶⁵, siendo máxima en los linfocitos T periféricos que expresan (**Figura 4**), incluso, 10 veces más CD5 que los linfocitos B ⁶⁶.

CD5 también se encuentra expresado en una subpoblación particular de linfocitos B periféricos, B1-a. Esta población de linfocitos B se encuentra asociada a la producción de autoanticuerpos o anticuerpos de baja afinidad polirreactivos, y se encuentra expandida en algunas enfermedades autoinmunes y también está sobre expresado en algunos tipos de leucemias linfocíticas ⁶⁴⁻⁶⁷. Interesantemente, el gen de CD5 posee un 90% de homología entre humanos y ratones, indicando que probablemente la función de esta molécula se encuentre conservada entre especies a través del tiempo ⁶⁸.

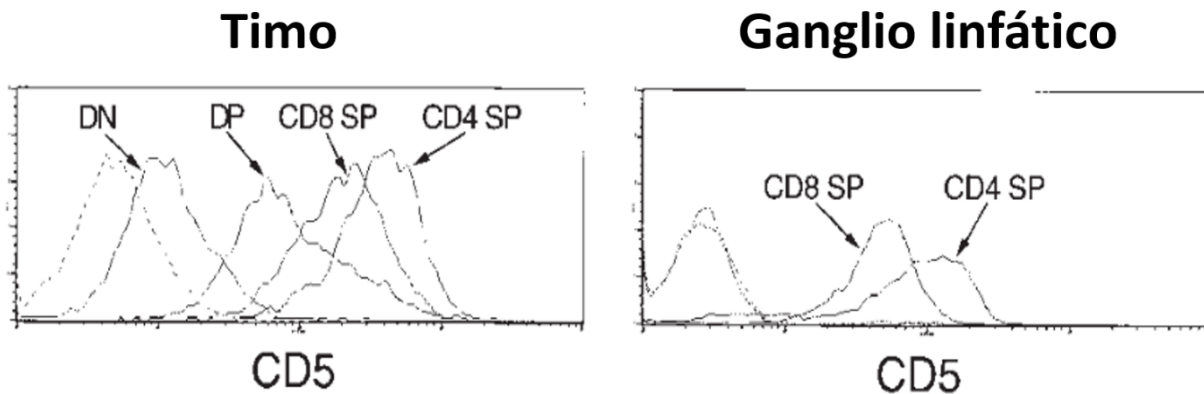


Figura 4: Expresión de CD5 a través del desarrollo y maduración de los linfocitos T. Los niveles de expresión superficial de CD5 cambian de manera gradual y correlacionan con el estado de desarrollo de los linfocitos T. Se encuentran bajos niveles en timocitos DN (dobles negativos), seguido de un incremento de hasta 6 veces en timocitos DP (dobles positivos), y un incremento de 3 a 5 veces tras la selección positiva al pasar a ser timocitos SP (simples positivos). En esta población de timocitos SP, hay una mayor expresión en aquellos timocitos CD4+ SP. Una vez que los timocitos maduros emigran del timo, como linfocitos T periféricos, poseen altos niveles de CD5 siendo los linfocitos T CD4+ los de mayores niveles de CD5 en superficie, respecto a aquellos linfocitos T CD8+.

Modificado de Azzam; et. al. (1998) ⁶⁵.

También se ha encontrado una población de células dendríticas (DCs) que expresa CD5 ⁶⁹, particularmente la población de DCs CD11c+. Además, la expresión de CD5 por esta población puede inhibir la producción de citocinas proinflamatorias pero no es necesaria para su desarrollo, pero sí puede tener un papel sobre la regulación de la función de las DCs en la activación y estimulación de los linfocitos T ⁷⁰.

Estructuralmente, CD5 pertenece al tipo B de la superfamilia de receptores scavenger ricos en cisteína (SRCR: *Scavenger Receptor Cysteine-Rich*), una familia antigua y altamente conservada de dominios proteicos ricos en cisteína. CD5 posee en su región extracelular 3 dominios SRCR del tipo B codificados en un solo exón (D1, D2 y D3), contando con ocho cisteínas en cada dominio ^{71,72}. A esta misma familia pertenece CD6, teniendo una alta homología con CD5 y ambas proteínas son codificadas por genes adyacentes, por lo que se cree derivaron de un

gen ancestral común ⁷³. Como tal, la glicoproteína CD5 no posee actividad catalítica/enzimática por sí misma, y sus propiedades de glicoproteína reguladora observadas son dadas por su interacción con otras proteínas a través de sus diferentes regiones citoplasmáticas ⁷⁴ (**Figura 5**).

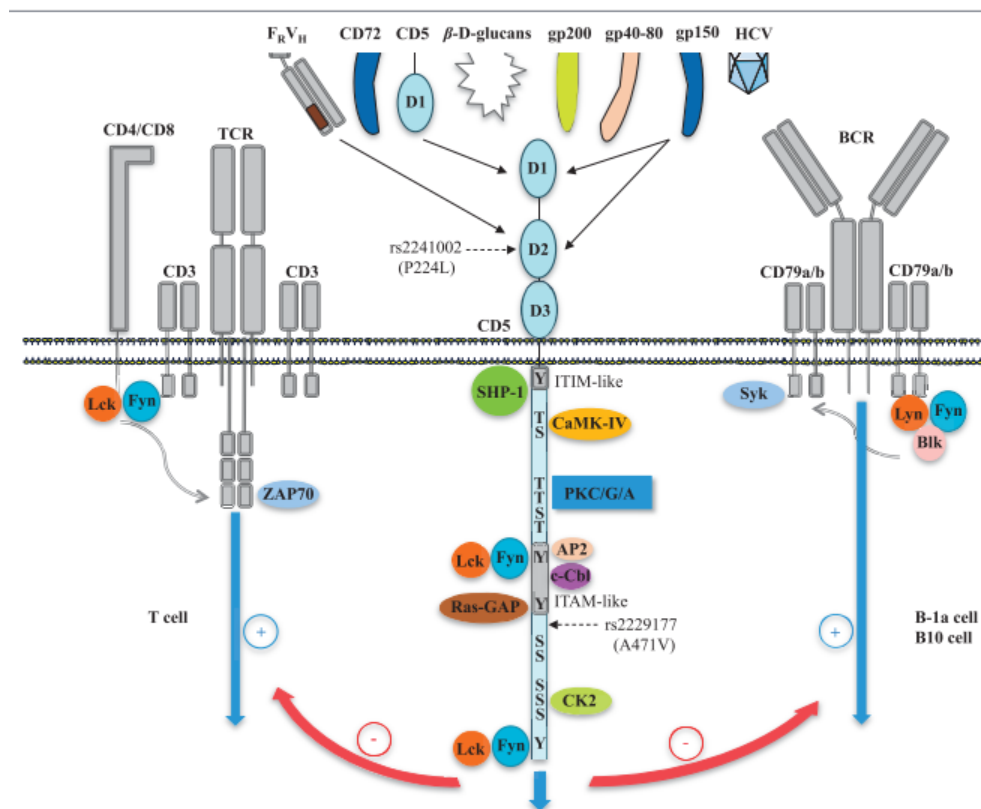


Figura 5: Esquema de la estructura de CD5 y sus interacciones extracelulares e intracelulares.

La estructura de CD5 la podemos dividir en dos: la porción extracelular que contiene tres dominios tipo de SRCR, donde se pueden unir los potenciales ligandos; y una porción intracelular o citoplasmática, donde se pueden encontrar sitios de unión a diversas moléculas, así como tres dominios importantes de fosforilación de tirosinas, un dominio pseudo-ITIM próximo a membrana (Y378), un dominio pseudo-ITAM (ahora pseudo-ITIM (Y429-Y441), y un dominio Y463 distal, próximo al extremo CTD. Además, hay una gran comunicación de CD5 con un gran número de moléculas, tanto extracelulares (como potenciales ligandos), como lo son distintos PAMPs; o intracelulares, con moléculas adaptadoras (que reclutan o unen proteínas que contribuyen a la transducción de señales como lo son cinasas, fosfatasa, etc). Además, podemos observar cómo regula negativamente la transducción de señales, ya sea por el TCR como por el BCR.

Modificado de Consuegra-Fernández, M; et. al. (2015) ⁷⁵.

De los 67 kDa de peso molecular de CD5, aproximadamente 12 kDa se atribuyen a los patrones de glicosilación en sus dominios extracelulares, ya que no se ha encontrado glicosilación en los dominios que se encuentran de manera intracelular ⁷⁶. Además, se ha encontrado que la región extracelular de CD5 es capaz de formar homodímeros ⁷⁷.

Aún no se conoce el ligando fisiológico de CD5, pero se han sugerido diferentes moléculas que se unen a este receptor. Una de ellas es CD72, una lectina tipo C expresada en linfocitos B cuya ligación puede estar asociada a proliferación de los linfocitos B ⁷⁸, y recientemente se ha descrito el contacto entre CD5 y CD72 como necesaria para la interacción entre Tregs y Bregs, respectivamente ⁷⁹. Otros ligandos descritos son gp35-37, gp37-80 ^{67,71}, e incluso se ha encontrado que CD5 es ligando de CD5 ⁸⁰. Sin embargo, no se ha dilucidado completamente cuál es el ligando “específico” o fisiológico de CD5.

Se ha demostrado que CD5 es capaz de unirse a superficies fúngicas llevando a la agregación de estas (cuyo objetivo es disminuir la diseminación del patógeno y facilitar su eliminación), particularmente une a β -glicanos, entre ellos, el zymosan, e incluso CD5 protege de la generación de choque séptico inducido por zymosan ⁷³. Adicionalmente, un trabajo demuestra la unión de CD5 (tanto en forma membranaral como forma recombinante soluble) a componentes del tegumento del parásito *Echinococcus granulosus sensu lato* ⁸¹. Se ha encontrado también que CD5 puede contribuir a la entrada del virus de la hepatitis C (HCV) a los linfocitos T humanos y a células Jurkat ⁸². Todas estas evidencias le dan importancia al papel de CD5 como receptor tipo scavenger.

Así mismo, se ha encontrado la presencia de CD5 de manera soluble en el suero humano en contextos de activación del linfocito T, así como tras estimulación con α CD3 y PMA, esto como consecuencia de la escisión de la forma membranaral mediada por proteasas. Esta forma soluble de CD5 aún conserva sus propiedades de unión a algunos de los ligandos reportados (CD72 y gp 40-80) ⁸³.

La expresión de CD5 se encuentra altamente regulada a nivel transcripcional. De los primeros reportes del estudio de factores de transcripción involucrados en esta regulación, en 1996, se encontró que en el gen de CD5 hay sitios de unión del factor de transcripción E2A⁸⁴. Posteriormente se describieron sitios de unión conservados de E-box en la región regulatoria del promotor de CD5, además en esta secuencia de E-box se une E2A y HEB, y se ha encontrado que la expresión de CD5 en timocitos es dependiente de la dosis de estos factores de transcripción⁸⁵. También se han encontrado sitios de unión a factores de transcripción pertenecientes a la familia *Ets*, a los que se les atribuyen funciones relacionadas con proliferación celular, activación y diferenciación de linfocitos T, y que estos factores son fosforilados tras activación del linfocito T; y de igual manera se han encontrado sitios de unión de proteínas relacionadas a *Gata*, sin embargo, no se ha demostrado su presencia en el gen de CD5⁸⁴.

Al estudiar el promotor del gen de CD5 en células de timoma EL4, se encontró una región de 43 pb (-175 – -215 pb, arriba del codón de inicio) donde se une Ets-1 (factor de transcripción que es linfoide específico) y es capaz de regular la transcripción de CD5⁸⁶, incluso los niveles de Ets1 en un linfocito T correlacionan con los niveles de expresión de CD5. Se ha encontrado también que los niveles de mRNA de Ets-1 correlacionan con los de CD5 durante el desarrollo tímico; y en linfocitos T maduros Ets-1 se encuentra en células en reposo y disminuye sus niveles tras activación, y de manera contrastante Ets-2 se encuentra en linfocitos T activados, encontrándose niveles incrementados de Ets-2 tras estimulación antigénica⁸⁵.

Tung y cols.⁸⁶ encontraron dos regiones altamente conservadas evolutivamente en la región reguladora del promotor de CD5 murino, cerca del sitio de unión de Ets-1, que denominaron como CD5X y CD5Y, que son importantes para la transcripción de CD5, pero no se ha identificado qué moléculas se unen a estos sitios.

De igual manera, debe haber una regulación negativa de la transcripción de CD5. En el gen de CD5, en la región regulatoria del promotor hay un sitio κ E2, a donde

se unen las proteínas E47/E12, y esta unión regula negativamente la transcripción de CD5, además de que los niveles de E47 correlacionan inversamente con la expresión de CD5 en superficie celular. Se ha visto que tras ligación del TCR en timocitos, disminuyen los niveles de E47 y a la par aumentan los niveles de CD5, encontrando que los niveles de E47 disminuyen conforme los timocitos maduran, al inverso que la expresión de CD5 ⁸⁷.

En linfocitos T periféricos se ha descrito que la ligación de HVEM por BTLA presente en DCs, induce incrementos en la expresión de CD5 a través del aumento de ETS1 y disminución de E2A (E47), e incluso esta sobre expresión puede promover la generación de Tregs ⁸⁸. Adicionalmente, en linfocitos B periféricos se ha encontrado que tras activación con anticuerpos anti-IgM, se induce expresión de CD5 de manera independiente a una interacción con linfocitos T ⁸⁹.

Los niveles de CD5 son susceptibles de ser afectados en respuesta a diferentes estímulos. Se ha encontrado que activadores de la proteína cinasa C (PKC), como lo son los ésteres de forbol, aumentan los niveles de expresión de CD5 y esta activación de PKC también depende de la presencia de DAG ⁹⁰, que como se mencionó anteriormente, PKC puede ser reclutada por DAG producido por PLC γ y activada tras interacción con Lck, iniciando una vía de señalización que lleva a la activación del linfocito ⁹¹, y en este caso, a la sobreexpresión de CD5. Este incremento ocurre tanto a nivel de proteína como a nivel de mRNA, encontrándose este incremento desde las 3-6 h, y un pico de máxima expresión de CD5 a las 72 h post-activación ^{90,92}. De igual manera, el entrecruzamiento con α CD3, lleva al aumento de la expresión de CD5 ^{65,92}, de manera proporcional a la intensidad de la señal provocada, lo cual permite a CD5 regular/modular la transducción de señales tras la ligación del TCR.

CD5 posee dominios de fosforilación de tirosinas, así como múltiples dominios potenciales de fosforilación de serinas (11) y treoninas (4) en su cola citoplasmática, que pueden activar o iniciar la transducción de señales que pueden ser dependientes o independientes de la señalización del TCR ^{67,93}. De esta manera,

se han localizado 4 principales regiones en esta región citoplasmática: 1) la tirosina Y378, que se encuentra junto a la región transmembranal de CD5; 2) dominio anteriormente conocido como “pseudo-ITAM”, ahora dominio ITIM: comprende las tirosinas Y429-Y441, siendo susceptibles a fosforilación por cinasas de la familia Src ⁶⁷; 3) Dominio de unión a CK2: S458-S461; y 4) Residuo distal Y463 ⁹⁴.

Las tirosinas de estos dominios son fosforiladas por cinasas de la familia Src, llevando al reclutamiento de gran número de proteínas señalizadoras, amplificando la señal, ya sea de activación o inhibición, llevando a la generación de distintas funciones celulares ⁹⁵.

Los eventos tempranos de la transducción de señales del TCR son dependientes de eventos de fosforilación de tirosinas, la cual ocurre de manera rápida tras la estimulación del TCR, siendo importante el balance de fosforilación y desfosforilación de estas en la activación del linfocito T ⁶⁸. Estudios han encontrado en linfocitos T de rata, que en estos eventos tempranos de estimulación del TCR, se forma un complejo multimolecular que involucra a: TCR, CD3, CD4 o CD8, CD2 y CD5, en asociación con Lck y Fyn ⁹⁶.

En un estudio realizado por Davies y cols. ⁶⁸, utilizando la línea celular Jurkat, los autores demuestran que se fosforilan los diferentes residuos de tirosina de CD5 tras la ligación del TCR. Estos mismos resultados los observaron Burgess y cols. ⁹⁷, al estimular el complejo TCR/CD3 en células Jurkat, los residuos de tirosina de CD5 se fosforilan rápidamente, siendo incluso más rápida dicha fosforilación que la del propio TCR.

CD5 como regulador positivo y negativo del linfocito T.

Los primeros estudios realizados en linfocitos T sobre la señalización mediada por CD5 postularon a CD5 como un regulador positivo de la señal de activación del linfocito, principalmente regulando la producción de IL-2 en respuesta al

entrecruzamiento de CD3 y CD5 en linfocitos T maduros y en líneas tumorales de linfocitos T (como las células Jurkat).

De los primeros hallazgos se encontró que la estimulación de CD5 en PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) lleva a un incremento en la movilización de Ca^{2+} intracelular en linfocitos T CD5+. Esta movilización es mayor en aquellos linfocitos T CD4+ que en los CD8+. Pero para esta movilización de Ca^{2+} es necesaria la presencia de este catión extracelular, ya que si no la hay, esta movilización inducida por ligación de CD5 es muy baja ⁹⁸. Pero curiosamente, esto solo ocurre con algunos anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD5 ⁹⁸⁻¹⁰⁰, y con algunas de ellas se encontró por primera vez que la estimulación de CD5 lleva al aumento de mRNA para IL-2 e IFN- γ ¹⁰⁰.

A raíz de esto, surgieron diversos artículos que evalúan la respuesta de los linfocitos T al ser estimulados utilizando un anticuerpo dirigido contra CD5. Ceuppens y cols.¹⁰¹ encuentran que al estimular linfocitos T en cultivo con un anticuerpo α -CD3 y α -CD5, hay una respuesta proliferativa mayor que únicamente estimulando con α -CD3, esto observado por un aumento en la expresión de CD25, así como aumento en la producción de IL-2, la cual se pudo inhibir tras adición de un anticuerpo α -CD25. Años más tarde, Verwilghen y cols. ¹⁰², al activar simultáneamente con CD28 y CD5, en ausencia de estimulación de TCR/CD3, observaron una activación policlonal de los linfocitos T dependiente de IL-2, encontrando una alta expresión de CD25 y alta producción de IL-2, y al bloquear CD25 se inhibió dicha respuesta proliferativa.

Estos incrementos en la producción de IL-2 se observan también tras estimular con anticuerpos dirigidos a CD3, CD28 y CD5, e incluso, la ligación de CD5 da un mayor tiempo de vida media (estabilidad) al mRNA de IL-2. Se encontró que una de las vías que lleva a los efectos observados por CD5 involucra a la cinasa CaMK tipo IV, cinasa dependiente de Ca^{2+} ¹⁰³, que concuerda con lo mencionado anteriormente del papel de CD5 en la movilización de Ca^{2+} intracelular ⁹⁸. CaMK IV regula la actividad del promotor *c-fos*, componente del factor de transcripción AP-1, que a su

vez, regula la expresión de IL-2, por lo que CD5 regula la expresión del gen de *IL2* a través de un mecanismo dado por CaMK IV y AP-1 ¹⁰³.

En un estudio posterior, tras seguir dilucidando el papel que tiene CD5 sobre la transducción de señales que llevan a la producción de IL-2, y conociendo que tras la ligación del TCR, CD5 es fosforilado por Lck ¹⁰⁴, Gringhuis y cols. ¹⁰⁵ encontraron que esta fosforilación crea sitios de unión para proteínas con dominios SH2 en CD5, que favorece la unión de PI3K a través de su subunidad p85, favoreciendo a su vez que Vav se asocie a PI3K. Y tras ligación de CD5, se lleva a la fosforilación y activación de Vav que es capaz de regular la actividad de Rac1, que se encuentra río arriba de CaMK IV, lo que puede llevar a la regulación de la expresión de IL-2 ¹⁰³.

Otros autores continuaron estudiando a CD5 como regulador de la activación del linfocito T y encontraron que en células Jurkat, tras la ligación de CD5, hay un incremento en la generación de DAG, que puede llevar a la activación sostenida de PKC, cinasa capaz de dar señales de proliferación. Confirmando así que CD5 es una molécula que es capaz de transducir señales tras su ligación, y que esta transducción es independiente a la dada por el TCR/CD3 ⁹⁹.

Tras la generación de un ratón deficiente de CD5 se comenzó a encontrar evidencia por la cual se le atribuye actualmente su papel como regulador negativo de las señales del TCR ⁷¹. En específico, tras la ligación del TCR, CD5 es fosforilado y recluta diversas proteínas o moléculas de señalización que le confieren su papel de regulador negativo.

En otro estudio, Gary-Gouy y cols. ¹⁰⁶ encontraron que moléculas como ZAP-70 y p21 (cadena ζ del complejo TCR/CD3) se pueden asociar espontáneamente a los residuos fosforilados de CD5 (dominio pseudo-ITIM), demostrando además que en ratones CD3^{-/-} no hay asociación de CD5 con ZAP-70, por lo tanto, la asociación de CD5 con ZAP70 es dependiente de la presencia de CD3. Para comprobar esto, Raab y cols. ¹⁰⁷ demuestran, por ensayos de co-inmunoprecipitación, que CD5 se

asocia con el complejo TCR/CD3, y también a la tirosín cinasa Lck, dependiente del dominio SH2 de ésta, además que dicha asociación aumenta diez veces la actividad de la cinasa. De manera adicional Burgess y cols.⁹⁷ demostraron que, en linfocitos T provenientes de sangre periférica, CD5 co-inmunoprecipita con Lck, Fyn, y TCR ζ .

Siguiendo sobre la investigación de las diferentes proteínas que se pueden unir a la región citoplasmática de CD5, se demostró que la fosfatasa SHP-1 (antes llamada PTP1C), asociada a la regulación a la baja los eventos de señalización del TCR, se une a CD5 en linfocitos T activados¹⁰⁸, siendo la Y378 el dominio responsable de la asociación de SHP-1 a través su dominio SH2^{67,109}. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la unión si ocurre tras ligación del TCR, pero esta asociación de SHP-1 no está relacionada con la actividad de regulador negativo de CD5 y tampoco CD5 es un sustrato de dicha proteína SHP-1¹¹⁰.

Posteriormente, la regulación negativa ejercida por CD5 fue demostrada por Dennehy y cols.⁹⁴, que hallaron en timocitos la asociación de c-Cbl y Ras-GAP con CD5. Se sabe que tras señales de activación del linfocito T, c-Cbl se fosforila, favoreciendo su actividad de ligasa de ubiquitina, teniendo como blancos proteínas relacionadas con la transducción de señales del TCR^{39,40}. c-Cbl interactúa con CD5 en células Jurkat induciendo su ubiquitinación y posterior degradación en lisosomas¹¹¹, lo que lleva a la disminución de su expresión en superficie. En células EL4 también se observó la interacción de c-Cbl y CD5 a través de su dominio carboxilo-terminal, además de encontrarse que esta interacción favorece que c-Cbl “ubiquitine” a Vav, apoyando el papel de regulador negativo de CD5 sobre la activación celular¹¹². Incluso, se ha encontrado recientemente que CD5 funciona como molécula de andamiaje para la unión de las ligasas de ubiquitina Cbl y Cbl-b tras la ligación del TCR, permitiendo así su localización para ejercer su actividad enzimática sobre diversos sustratos; además, y de manera interesante, CD5 es la única proteína membranal en linfocitos T CD4+ que puede unir a ambas -ligasas de ubiquitina¹¹³.

Además, en linfocitos T maduros, se ha observado la presencia de CD5 en balsas lipídicas, además de su asociación con proteínas como Lck, Fyn, LAT, entre otras ⁷⁷, y posterior a la activación celular mediada por los contactos TCR:pMHC, este reclutamiento contribuye a disminuir la señal dada por el TCR, indicando que puede influenciar una respuesta del linfocito ante antígenos extraños ¹¹⁴. Así mismo, se ha encontrado que CD5 es reclutado y colocaliza en la sinapsis inmunológica (**Figura 6**) y disminuye o inhibe la respuesta inmune dada por la presentación de antígeno al tener como blanco diversas moléculas de cascadas de señalización río abajo, sin afectar la formación de la sinapsis inmunológica ¹¹⁵.

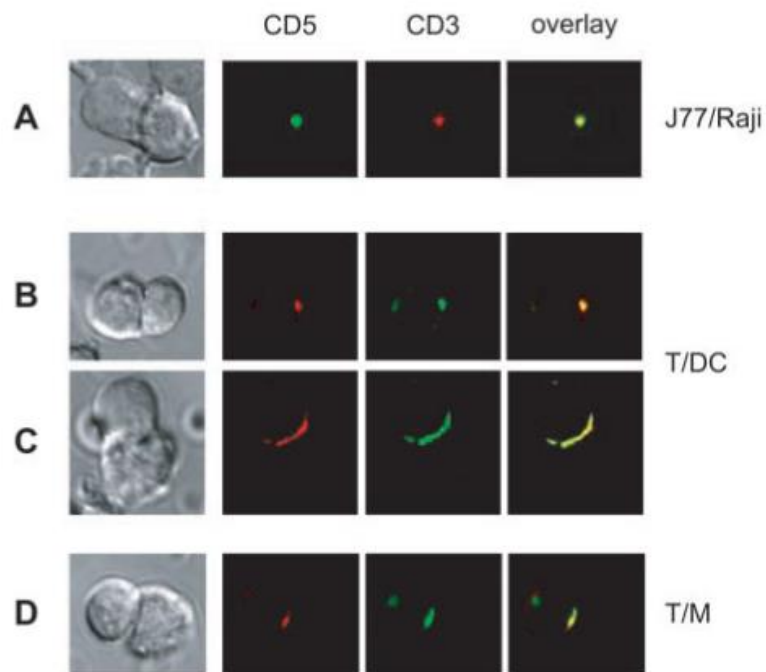


Figura 6: CD5 y CD3 se co-localizan en la sinapsis inmunológica de células humanas y de ratón. **A)** Imagen de microscopía confocal que muestra la sinapsis inmunológica formada entre linfocitos T Jurkat J77 (J77 transfectados con la proteína de fusión CD5-GFP) y linfocitos B Raji que presentan el superantígeno SEE. **B-D)** La sinapsis inmunológica formada entre linfocitos T de bazo con TCR transgénico P14 y células dendríticas de bazo de ratones C57/BL6 (**B y C**) o macrófagos (**D**), ambas células presentadoras de antígeno fueron pulsadas con 1 μ M de péptido gp33. Las células fueron teñidas con CD3 en rojos para la sinapsis con modelo humano, y en verde para modelo murino.

Modificado de Brossard, Cédric; et. al. (2003) ¹¹⁵.

CD5 y su relación con las interacciones entre el TCR y moléculas del MHC.

La generación del modelo de ratón deficiente de CD5 ayudó para comenzar a dilucidar el papel de CD5 en los timocitos y linfocitos T, demostrándose que los timocitos deficientes de CD5 son hiperresponsivos a estimulación por el TCR/CD3, además de mostrar un incremento en la movilización de Ca^{2+} , así como una hiperfosforilación de TCR ζ ⁶⁷, ZAP-70, LAT⁶⁶. Estos resultados sirvieron para apoyar el papel que tiene CD5 atenuando la señal del TCR y se cree que podría estar relacionado con el umbral de activación necesario para la selección negativa que ocurre en el timo.

La ausencia de CD5 lleva a la disminución del número de timocitos, principalmente de la población DP, indicando, en conjunto, cambios tanto en la selección positiva (supervivencia de células auto-restringidas, baja avidéz del TCR por moléculas del MHC cargadas con péptidos propios) como en la selección negativa (muerte de linfocitos autorreactivos, alta avidéz del TCR por moléculas del MHC con péptidos propios), volviéndose procesos más “eficientes”¹¹⁶, ya que la señal dada por el TCR es muy alta o mayor al no estar presente este regulador negativo. CD5 puede estar regulando el destino de los timocitos en desarrollo a través de deprimir la capacidad de respuesta de los DPs a las señales dadas por el TCR¹¹⁷, es decir, modulando los umbrales para la selección positiva y negativa como se planteó en una revisión de Soldevila y cols.⁷¹ (**Figura 7**).

En un experimento donde se administró α -CD3 a ratones deficientes de CD5, 24 horas después se encontró la población de timocitos DP depletada, demostrando también un aumento en la apoptosis de estas células. Los autores destacan que una de las más grandes contribuciones de CD5 es en la selección negativa de los timocitos, contrarrestando los efectos relacionados con coestimulación⁶⁴. Además, en estos ratones deficientes de CD5, se encontró en los timocitos una hiperfosforilación de proteínas señalizadoras tras activación con α -CD3, así como un incremento en la movilización de Ca^{2+} , consistente con un aumento en la fosforilación de PLC γ , respecto a ratones WT como controles¹¹⁷.

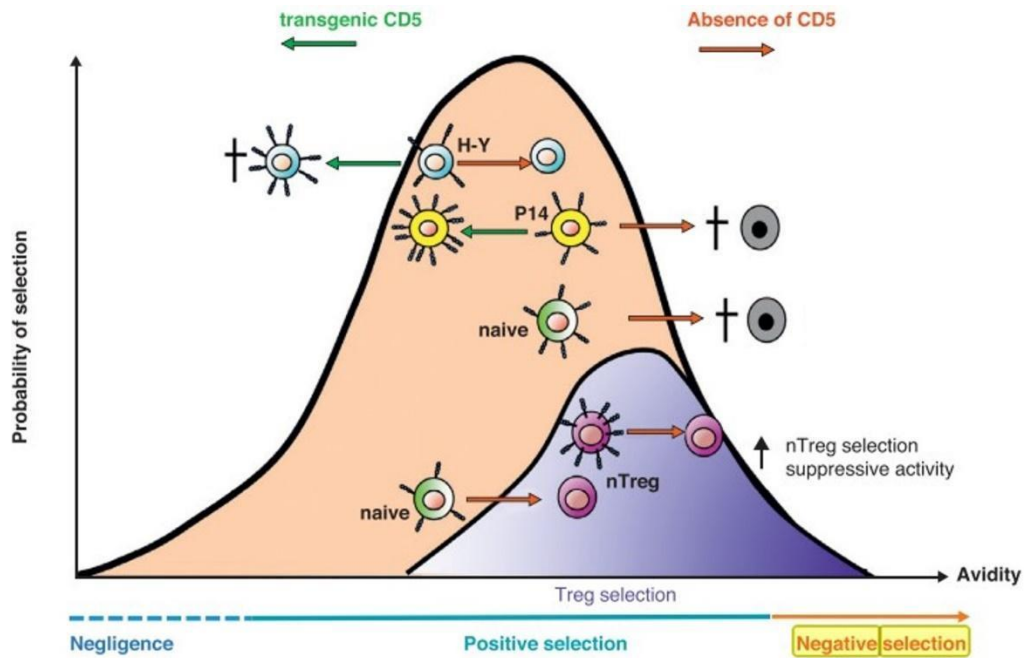


Figura 7: Efecto de CD5 como regulador negativo de la señal del TCR en la selección tímica y tolerancia central. La selección tímica es un proceso de suma importancia para el mantenimiento de la tolerancia central a través de la delección clonal e inactivación de clones autorreactivas. CD5 actúa como regulador negativo de la señal del TCR a través de la modulación de la selección positiva y negativa de los timocitos en desarrollo. La ausencia de CD5 lleva a un aumento en la selección negativa de timocitos con TCRs de alta afinidad (P14), pero no afecta la selección de aquellos timocitos con TCRs de baja afinidad (H-Y). Por otro lado, si se aumenta la expresión de CD5 a través de un transgén, disminuye la selección positiva de aquellos timocitos con TCRs de baja afinidad (H-Y) por regulación negativa de la señal, y estos timocitos no alcanzan el umbral necesario para la selección; mientras que la selección positiva de los TCRs de alta afinidad (P14) no se ve afectada por la sobre expresión de CD5. Incluso podemos observar que en ausencia de CD5 hay un aumento de la generación de Tregs, ya que disminuye el umbral necesario para la activación.

Modificado de Soldevila, G.; et. al. (2011) ⁷¹.

Con relación a los linfocitos T maduros, se ha reportado que al estimular con α -CD3 poblaciones linfocitarias de bazo y ganglio de ratones $CD5^{-/-}$, es decir, linfocitos T maduros, observaron 24 h después una disminución dramática en los números de estos. Al analizar marcadores de activación, 4 horas post-estimulación, todos los linfocitos T de los ratones $CD5^{-/-}$, pero no de los ratones WT, expresaron CD25 y CD69, activación que posteriormente llevó a muerte por apoptosis ⁶⁴.

Este tipo de consecuencias funcionales dadas por la presencia de CD5 pueden estar relacionadas con la señal de inhibición dada este receptor, ya que ésta disminuye cuando la avidéz del TCR por su ligando es baja; en cambio cuando la avidéz es alta, el nivel de expresión de CD5 es alto ⁶⁵, de esta manera CD5 juega un papel importante en la modulación del umbral de activación del linfocito T. Por otro lado, la expresión de CD5 es regulada por la intensidad de la señal del TCR y la avidéz de este por los complejos pMHC. Por lo tanto, una alta avidéz resulta en una mayor expresión de CD5, mientras que una baja avidéz resulta en menor expresión de este ¹¹⁶. Es por esto por lo que la selección tímica depende de la presencia y actividad de CD5, ya que aquellos TCRs con alta avidéz por su ligando se dirigen a selección negativa ¹¹⁸.

También se ha encontrado que la mayoría de los TCRs de alta avidéz, poseen mayor cantidad de reguladores negativos de la señal del TCR, entre ellos, CD5, que entre mayor sea la avidéz del TCR, mayores serán los niveles de esta glicoproteína en superficie (como se mencionó anteriormente), y al contrario, al poseer TCRs de baja avidéz, presentan menor densidad de este tipo de reguladores negativos, entre estos, menores niveles de CD5 en superficie ¹¹⁹. Se propone que la sobrevida, así como la expansión homeostática de los linfocitos T naive, podría predecirse al conocer los niveles de TCR y CD5 que la célula posea, ya que el linfocito T naive necesita de estas señales para su sobrevida y proliferación ¹¹⁹.

Como se mencionó anteriormente, estas señales de sobrevida son dadas por contactos constantes entre el TCR y spMHC, que dan lugar al mantenimiento de niveles de fosforilación basales de la cadena ζ del TCR, dando lugar a una señalización constante que es característica de cada clona de linfocitos T ¹. Estudios recientes encontraron que los niveles de esta señalización basal correlacionan con los niveles de CD5 ¹²⁰. De manera interesante, en este mismo trabajo se encontró que los niveles de CD5 correlacionan con los niveles de Nur77, y que ambos marcadores relacionan con los altos niveles de esta señalización basal dada por la fosforilación de la cadena ζ del TCR. Sin embargo, estos niveles elevados de

señalización también repercuten en la eficiencia de la respuesta inmune por parte del linfocito T, siendo deficiente en aquellos linfocitos T con menores niveles de dicha señal generada, esto en modelos *in vivo* e *in vitro* ¹²⁰.

La presencia de CD5 en los linfocitos T es regulada por las interacciones que ocurren entre el TCR y el pMHC, incluso se llega a mencionar que esta regulación es parte de un proceso de adaptación del linfocito T, ya que en ausencia de estos contactos, los niveles de CD5 decrecen significativamente ¹²¹. Los niveles de CD5 en superficie se establecen por los contactos/interacciones que ocurren entre el TCR del linfocito T y el pMHC de las células presentadoras de antígenos.

De igual manera, conociendo que el desarrollo de Tregs requiere de interacciones de alta avidéz entre el TCR y pMHC (cargado con péptidos propios), se ha encontrado que esta población celular, presente tanto en timo como en ganglios linfáticos, posee altas cantidades de CD5, y que en ratones deficientes de CD5, hay una mayor generación de Tregs derivadas de timo por lo que CD5 es necesario para la generación de este subtipo celular ¹¹⁸.

En otros modelos estudiados utilizando linfocitos T con la misma especificidad por un antígeno, que solo varían por los niveles de expresión de CD5, se encontró que aquellos con menores niveles de CD5 responden mejor ante una respuesta primaria, mientras que aquellos con mayores niveles de CD5 lo hacen ante una respuesta secundaria, argumentando que los linfocitos CD5^{hi} poseen una respuesta inicial “baja” o menos “eficiente” para proveer un mejor ambiente para una posterior respuesta ^{122,123}. Estos mismos autores, al saber que los flujos de calcio son importantes para la activación del linfocito T y posterior producción de IL-2, así como un gran número de otros procesos celulares, encontraron en este mismo modelo que linfocitos T con altos niveles de expresión de CD5 poseen mayor movilización de Ca²⁺ a tiempos cortos, respecto a su contraparte CD5^{lo}, sin embargo, decaen con el tiempo, así como los niveles de CD5 post activación ¹²⁴.

Inclusive estudios posteriores han encontrado que las poblaciones de linfocitos T con bajos niveles de CD5 producen una mayor cantidad de IFN γ tras la activación. Los linfocitos T CD4+CD5^{lo} confieren un balance a la población efectora o activada al contribuir con receptores de baja y mediana afinidad dándole una heterogeneidad a una respuesta policlonal ante una infección o reto ¹²⁵.

Por otro lado, un estudio realizado por Stamou y cols. ¹²⁶ demostró que los linfocitos T CD8+ anérgicos en periferia poseen altos niveles de CD5, sin embargo, al transferirlos a un ratón libre de antígeno, se revierte dicho estado anérgico, a la vez que los niveles de CD5 disminuyen, dándole un peso más a este papel de regulador negativo de la señal que tiene CD5, incrementando el umbral de activación del TCR. Sin embargo, este proceso de regulación controla que los linfocitos T sean autorreactivos, o incluso CD5 está involucrado en la diferenciación de estas clonas a linfocitos T reguladores ¹²⁷.

En estudios recientes, en modelos tumorales se ha encontrado que la ausencia de CD5 lleva a un incremento de la actividad antitumoral de los linfocitos T CD8+, a través de decrecer el reconocimiento del TCR a los antígenos tumorales, pero esto tendría el objetivo de evitar una activación constante del linfocito T que lo lleve al aumento de la sensibilidad del TCR para una posterior desarrollo de AICD (*activation-induced cell death*) ¹²⁸. Además, conociendo que el bloqueo de CD5 aumenta la actividad antitumoral, esta se vuelve un área interesante para el estudio de terapias contra el cáncer.

Dominios intracelulares de CD5 y su papel sobre la función de CD5.

A pesar de conocer todas estas interacciones que posee CD5 con un gran número de proteínas intracelulares, así como algunas funciones que resultan de esta integración de señales, se desconocía la relevancia o importancia de algunos de los dominios intracelulares presentes en su larga cola citoplasmática de 94 aminoácidos, que como se ha mencionado, carece de actividad enzimática.

Uno de los dominios más estudiados es el que comprende de la S458 a la S461 (458-SSDSD-462), localizado en el extremo carboxi-terminal de CD5. Estos aminoácidos de serinas pueden ser fosforiladas y ser sitio de unión para la cinasa CK2 (cinasa de serina y treonina), cinasa altamente conservada y conocida por regular gran número de procesos celulares ¹²⁹. Se ha encontrado que a pesar de que CK2 se una a esta región citoplasmática de CD5, permanece inactiva, pero en timocitos puede activarse tras ligación de CD5, pero no de CD3 ¹³⁰.

Para dilucidar la relevancia que el dominio de unión a CK2 presente en CD5 posee (CD5CK2BD), se generaron ratones con dicho dominio eliminado (CD5 Δ CK2BD) y, en un modelo de EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*), se encontró que la severidad de esta enfermedad disminuye en los ratones CD5 Δ CK2BD. No obstante, se encontró que a pesar de la activación de linfocitos T específicos para el autoantígeno en respuesta al reto con MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*), los linfocitos T no sobrevivían dado por una AICD incrementada ¹³¹, asociándose así una menor severidad de la enfermedad a una menor generación/sobrevida de las poblaciones de linfocitos Th1 y Th17.

Sin embargo, en el modelo anterior, el transgén con la delección del CD5CK2BD está bajo el control del promotor de CD2, por lo que el modelo no reproduce las condiciones fisiológicas de la expresión de CD5 por la activación del TCR. Por ello, se decidió generar un ratón *knock-in*, donde, mediante recombinación homóloga, se eliminan exclusivamente los 4 aminoácidos (S458-D-S-S461) esenciales para la unión de CK2 a CD5 ¹³².

En este modelo se encontró nuevamente la disminución en la severidad de la EAE en los ratones CD5 Δ CK2BD, siendo dosis dependiente de la cantidad de MOG administrado, además de encontrarse que la vía de señalización regulada por CD5-CK2 es importante para la diferenciación de linfocitos Th17 (y Th2 *in vitro*), además de regular vías de supervivencia del linfocito Th17. De igual forma se encontró que estos ratones CD5 Δ CK2BD hipoproliferan tras activación del TCR ¹³².

Otros estudios encontraron que en timocitos, la señalización dada por CD5-CK2 aumenta la activación de Akt inducida por la señalización del TCR, además de favorecer la translocación de ROR γ t al núcleo, siendo relevante para la generación de linfocitos Th17 ¹³³. Posteriormente, otros autores encontraron que en timocitos, la señalización dada por CD5-CK2 regula la fosforilación de Erk, rescatando a los timocitos de la apoptosis sin afectar las vías de señalización proximales al TCR. Sin embargo, la supervivencia del timocito es independiente de Akt ¹³⁴.

Otro dominio citoplasmático de CD5 de gran importancia es el dominio ITIM (o pseudo-ITIM, antes conocido como ITAM o pseudo-ITAM). Este comprende de la Y429 a la Y441, y como se mencionó previamente, es susceptible a fosforilación por cinasas de la familia Src ⁶⁷. Es importante recordar la importancia de los dominios ITAM (secuencia consenso: YXXL/I/X₍₆₋₈₎YXXL/I) e ITIM (secuencia consenso: [I/V/L/S]-XYXX-[L/V]), ya que estos regulan la calidad y magnitud de la respuesta y se encuentran en las porciones citoplasmáticas de un gran número de proteínas señalizadoras.

Conociendo que la fosforilación de CD5 ocurre tras la ligación del TCR, además de saber que esta fosforilación de tirosinas que están presentes en dominios ITIM son las que pueden conferir actividad o generar sitios de unión y anclaje de otras proteínas, Vilà y cols. ¹⁰⁴ encontraron que, tras estimulación con α CD3 en células Jurkat, la Y429 y Y463 de CD5 son los blancos preferenciales para ser fosforilados por la cinasa Lck. Además hallaron que existen niveles basales de CD5 fosforilado, mientras que la fosforilación es baja o no sucede en la Y378 y Y441. De igual manera se ha demostrado que, tanto en Y429 como en Y463, Lck puede reclutarse a CD5 ⁶³, lo que podría tener una consecuencia funcional aún desconocida. Y estudios posteriores demostraron que, aunque Fyn es capaz de fosforilar CD5, la principal cinasa encargada de la fosforilación de CD5 es Lck ⁷⁷.

Azzam y cols. ¹¹⁶, con el fin de encontrar qué dominios eran funcionales para el papel de CD5, reconstituyeron ratones CD5^{-/-} con un transgen de CD5 sin la región correspondiente al dominio ITIM (Y429-Y441) y sin el resto del extremo carboxilo-

terminal de CD5, encontrando una semejanza a lo observado en el ratón CD5^{-/-} (timocitos DP muestran ser hiperresponsivos), lo cual no sucede si se reconstituye con un transgén de CD5 WT ni con timocitos SP ni linfocitos T maduros. Los autores concluyen que esta región puede ser necesaria para la regulación negativa de la señal del TCR en el desarrollo tímico ¹¹⁶, sin embargo, este efecto no es necesariamente exclusivo del dominio ITIM, ya que también se eliminó el resto de la región carboxilo-terminal de CD5.

En linfocitos B donde también se considera a CD5 como un receptor inhibitorio, en este caso, del BCR, Gary-Gouy y cols. ¹³⁵ a través de ensayos con receptores quiméricos en células IIA.6, encontraron que la Y429 es de suma importancia para regular esta actividad inhibitoria sobre la señalización del BCR y las respuestas funcionales del mismo, e incluso dicho residuo es el encargado de mediar la fosforilación de CD5 tras la ligación del BCR. Asimismo, los linfocitos B-1a, en ausencia de CD5, son resistentes a la apoptosis y aumentan su proliferación ⁶⁷. También se ha demostrado que CD5 posee un papel inhibitorio sobre el BCR además de que CD5 co-precipita con este receptor de linfocitos B ⁶⁶.

Nuestro grupo de investigación, utilizando una línea de células EL-4 transfectadas establemente con mutantes de la región intracitoplásmica de CD5 conteniendo sustituciones puntuales de tirosina por alanina, demostró que estas tirosinas son necesarias para la supervivencia del timocito tanto en condiciones basales o tras el estímulo con α CD3 ⁷⁴. Además, un hallazgo muy importante de este trabajo fue la demostración de que el dominio Y429-Y441 de CD5, anteriormente conocido como pseudo-ITAM, es funcionalmente un dominio ITIM (o pseudo-ITIM), siendo además importante para la regulación negativa de la señalización del TCR.

JUSTIFICACIÓN

CD5 es un regulador negativo de la señal del TCR cuyos niveles se modulan de manera dependiente de las interacciones TCR:pMHC durante su ontogenia así como su activación en periferia, resaltando la importancia de esta molécula en la inmunobiología de los linfocitos T, desde su maduración, diferenciación funcional y muerte.

A pesar de que los primeros estudios sobre CD5 llevaron a proponer a este receptor como una molécula coestimuladora del TCR, la generación de un ratón CD5 KO contribuyó a entender su papel fisiológico como inmunomodulador de la respuesta inmune. En específico, se evidenció que los timocitos presentaban un perfil hiperresponsivo tras la activación del TCR, incluyendo una alta movilización de calcio intracelular e hiperfosforilación de proteínas relacionadas con la activación del linfocito T. Además, en linfocitos T maduros CD5 KO, la estimulación del complejo TCR/CD3 lleva a una sobreactivación celular y una mayor muerte inducida por la activación.

A partir de estos hallazgos, se comenzaron a diseccionar los diferentes dominios de la molécula para hallar los mecanismos moleculares involucrados en la función de CD5. Varios estudios han demostrado que el dominio CD5-CK2BD es importante para promover la supervivencia de timocitos y linfocitos T así como modular la diferenciación de linfocitos Th17. Sin embargo, la ausencia de este dominio (CD5-CK2BD) lleva a una hipoproliferación de los linfocitos T ante estimulación antigénica, de manera contraria a lo que ocurre en linfocitos T del ratón CD5 KO. Esto indicaría que podrían existir otro/s dominio/s que regulan otras funciones mediadas por CD5, ya que el fenotipo de CD5 Δ CK2BD no termina de asemejar por completo lo observado en el linfocito T CD5 KO. En este contexto, se ha sugerido que el dominio ITIM (Y429-Y441) sería importante para la regulación de la activación del linfocito T a través de regular las vías de señalización proximales al TCR.

Antecedentes del laboratorio (*Manuscrito en preparación [2022]*), sugieren que la ausencia del dominio ITIM de CD5 lleva a una selección tímica más eficiente y regula procesos de muerte celular durante el desarrollo tímico dado que su ausencia podría estar provocando una señalización exacerbada del TCR que tiene como consecuencia final la muerte de estas células inmaduras. Sin embargo, en la actualidad no existen estudios previos que demuestren la función del dominio ITIM de CD5 en linfocitos T periféricos. En este trabajo se propone dilucidar el papel del dominio ITIM de CD5 en la activación de linfocitos T periféricos.

HIPÓTESIS

El dominio ITIM participa en la regulación negativa de las señales del TCR dependientes de CD5, por lo que su ausencia incrementará la activación de los linfocitos T murinos *in vitro* e *in vivo*.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar el papel del dominio ITIM del receptor CD5 en la cantidad de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+, así como su efecto en la activación del linfocito T tras estimulación del TCR.

Objetivos Particulares

- Cuantificar las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ (naive, efectores/activados) *ex vivo*, así como los niveles de expresión de CD5 en ratones CD5 WT y CD5 ITIM-KI.
- Caracterizar las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ (naive, efectores/activados) *in vivo* tras estimulación con α -CD3 en ratones CD5 WT y CD5 ITIM-KI.
- Evaluar la proliferación y cinética de inducción de marcadores de activación (CD44, CD25 y CD62L), así como de CD5, *in vitro*, tras estimulación con α -CD3 y α -CD28 en linfocitos T naive provenientes de ratones CD5 WT y CD5 ITIM-KI.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación.

En este trabajo se utilizaron ratones con una mutación knock-in (KI) para el dominio ITIM de CD5 (*CD5 ITIM-KI*) en fondo C57/BL6, los cuales fueron generados por el Dr. Chander Raman en la University of Alabama at Birmingham.

Como controles se utilizaron ratones *C57/BL6*, adquiridos de *The Jackson Laboratory, USA*. Se utilizaron ratones macho de 8-10 semanas de edad y ambas cepas fueron retrocruzadas en el fondo FoxP3-eGFP, de manera que co-expresaban eGFP bajo el promotor del gen de FoxP3¹³⁶. Los ratones se mantuvieron en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM. El protocolo utilizado (#108) fue previamente aprobado por el Comité Interno de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del IIB, UNAM. Todos los procedimientos donde hubo animales de experimentación involucrados, fueron realizados siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Genotipificación de ratones por PCR

El genotipo de los ratones se determinó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando DNA extraído de un fragmento de cola del ratón, con posterior lectura del resultado de la reacción de PCR por electroforesis con geles de agarosa.

- *Obtención de DNA a partir de cola del ratón.*

Se obtuvieron fragmentos de la cola del ratón y se procesó el tejido colocándolo en 600 μ L de una solución de NaOH (50 mM) a 85-90°C durante 90 minutos aproximadamente (hasta que se observó la digestión completa del tejido). Posteriormente se incubó a 4°C durante 10 minutos, y posteriormente se

adicionaron 50 μ L de Tris-base (10 mM). A continuación se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se tomó (aprox. 300 μ L) y se almacenó a -20°C durante una noche.

- PCR de ratones para el transgén CD5 ITIM-KI.

Se realizó la genotipificación de los ratones para el gen modificado CD5 ITIM-KI utilizando los siguientes primers (cebadores) así como la siguiente mezcla de reacción para la reacción de PCR. La banda correspondiente al genotipo de los ratones WT tiene un peso de \approx 1700 pb; mientras que la correspondiente a ratones CD5 ITIM-KI de \approx 2000 pb.

Dirección 5' \rightarrow 3': CGGTGTGGAAGTGCTGACCT

Dirección 3' \rightarrow 5': TGTTGGGATGGCAGACTGGTT

Tabla 1: Mezcla de reacción de la PCR para genotipificación del transgén CD5 ITIM-KI.

Reactivo	Cantidad (μ L) (por reacción)
Agua	15.65
Buffer PCR 10X	2.0
MgCl ₂ (50 mM)	0.75
dNTPs (2.5 mM)	1.0
Forward primer	1.25
Reverse primer	1.25
DMSO	1.0
Taq polimerasa.	0.17
DNA molde	1.2

- PCR de ratones para el transgén FoxP3-eGFP.

Se realizó la genotipificación de los ratones para el gen modificado FoxP3-eGFP utilizando los siguientes primers (cebadores) así como la siguiente mezcla de reacción para la reacción de PCR. La banda correspondiente al genotipo de los

ratones WT, es decir, sin la proteína Foxp3-eGFP, tiene un peso de ≈ 750 pb; mientras que la correspondiente a ratones con dicha proteína FoxP3-eGFP, la banda tiene un peso de ≈ 1000 pb.

Dirección 5' \rightarrow 3': GCGTAAGCAGGGCAATAG

Dirección 3' \rightarrow 5': GCATGAGGTCAAGGGTGA

Tabla 2: Mezcla de reacción de la PCR para genotipificación del transgén FoxP3-eGFP.

Reactivo	Cantidad (μ L) (por reacción)
Agua	14.65
Buffer PCR 10X	2.0
MgCl ₂ (50 mM)	0.5
dNTPs (2.5 mM)	0.25
Mix primers (forward+reverse)	0.5
DMSO	1.0
Taq polimerasa.	0.15
DNA molde	2.0

- **Gel de electroforesis y análisis de bandas amplificadas por PCR.**

Se prepararon geles de agarosa al 1.5% para correr los productos de la PCR, utilizando controles positivos y negativos, control sin DNA, así como el marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA Ladder, Cat. 10787018, Invitrogen). Las bandas se revelaron con filtro UV utilizando el transiluminador Gel Doc™ EZ System (BioRad), con posterior análisis utilizando el software ImageLab™ 6.0 (BioRad).

Para el genotipo de los ratones CD5 ITIM-KI, se consideró como WT a aquella banda de un peso aproximado de 1700pb, como ITIM-KI alrededor de 2000pb; mientras que como genotipo Ht (heterocigota) a aquel producto de reacción que presentó ambas bandas (**Anexo 1**).

Para el genotipo de los ratones FoxP3-eGFP, se consideró como WT (es decir, FoxP3+) a aquella banda con un peso aproximado de 720-750 pb, como FoxP3-eGFP a aquella banda con un peso aproximado de 1000 pb; mientras que como genotipo Ht (heterocigoto) a aquel producto de reacción que presentó ambas bandas (**Anexo 1**).

Obtención de linfocitos T de órganos linfoides secundarios.

- *Obtención de linfocitos T provenientes de ganglios periféricos (PLNs) y ganglios mesentéricos (MLNs).*

Se obtuvieron los ganglios periféricos (axilares, inguinales y braquiales) y mesentéricos de los ratones. Posterior a su extracción, se colocaron en cajas Petri (35 mm x 10 mm) con medio RPMI-SFB 10%, y se maceraron para la extracción de linfocitos T. Se realizó una filtración posterior con una malla de nylon de 60 μ m y se recibieron en tubos cónicos para centrífuga de 15 mL. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 2 mL de medio RPMI-SFB 10% y se filtró nuevamente por la malla de 60 μ m. A continuación se realizó el conteo celular con el método de exclusión de azul de tripano. Se prepararon suspensiones celulares individuales con 2×10^6 células para la posterior tinción superficial con anticuerpos. La tinción se realizó en un volumen de 35 μ L, a 4°C durante 20 minutos, y protegidos de la oscuridad. Se realizó un lavado final adicionando 500 μ L de PBS y centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos. Finalmente, las muestras se fijaron con 500 μ L de paraformaldehído al 0.4% en PBS y se adquirieron en el citómetro de flujo.

- *Obtención de Linfocitos T de bazo.*

Se obtuvo el bazo del ratón y posterior a su extracción, se colocó en una caja Petri (35 mm x 10 mm) con medio RPMI-SFB 10%, se maceró para la extracción de linfocitos T con posterior filtración con una malla de 60 μ m y se recibieron en tubos cónicos para centrífuga de 15 mL. Se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se procedió a la lisis de los eritrocitos al resuspender el botón celular utilizando 2 mL de buffer ACK (amoníaco-cloruro-potasio). Un minuto después de la adición del buffer ACK, se inactivó adicionando 2 volúmenes

de RPMI-SFB 10% SFB (4 mL), y se realizó un lavado a 1,500 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se descartó y el botón celular se resuspendió en 2 mL de RPMI-SFB 10%. La suspensión celular se filtró nuevamente y se procedió al conteo celular por el método de exclusión de azul de tripano. Se prepararon suspensiones celulares individuales con 2×10^6 células para la posterior tinción superficial con anticuerpos. La tinción se realizó en un volumen de $35 \mu\text{L}$, a 4°C durante 20 minutos, y protegidos de la oscuridad. Se realizó un lavado final con PBS, centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos. Finalmente, las muestras se fijaron con paraformaldehído al 0.4% (en PBS) y se adquirieron en el citómetro de flujo.

Ensayo de activación celular *in vivo* con αCD3 soluble.

Se administró anticuerpo αCD3 (1 μg por ratón, resuspendido en 300 μL de SSI [solución salina isotónica]) o SSI a ratones WT y CD5 ITIM-KI por vía intraperitoneal (i.p.). A las 20 h post administración, se extrajeron los órganos linfoides (ganglios periféricos, ganglios mesentéricos y bazo). Se obtuvieron los linfocitos como se describió anteriormente. La tinción superficial, así como la tinción para evaluar muerte celular (Anexina V/7AAD) se realizó a temperatura ambiente. Las suspensiones celulares obtenidas al final no se fijaron con paraformaldehído y se adquirieron inmediatamente en el citómetro de flujo.

Ensayo de activación y proliferación celular *in vitro* con $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$.

Se obtuvieron linfocitos T de ganglios periféricos, mesentéricos y bazo de ratones WT o CD5 ITIM-KI. Se realizó la tinción superficial para la identificación de linfocitos T CD4^+ naive y se llevó a cabo la separación celular (sorting) en citómetro de flujo MoFlo XDP (*Beckman Coulter*) de la población $\text{CD4}^+\text{CD25}^-\text{CD62L}^+\text{CD44}^{\text{low}}$. Para evaluar la proliferación celular, las células obtenidas se tiñeron con CTV (Cell Trace Violet, Invitrogen) [5 mM] siguiendo el protocolo del manual del kit. Posteriormente, las células se cultivaron en placas de 96 pozos de fondo en U, previamente sensibilizadas con anticuerpos $\alpha\text{-CD3}$ y $\alpha\text{-CD28}$ (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ c/u). Se cultivaron 3×10^5 linfocitos T CD4^+ naive por pozo en medio RPMI-SFB 10% suplementado con piruvato de sodio, β -mercaptoetanol y aminoácidos no esenciales. Como control

positivo, se adicionó el estímulo de PMA/Ionomicina, y como control negativo se sembraron células en un pozo sin estímulo de activación.

Las células se recuperaron a las 0, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas y se tiñeron para evaluar la expresión de marcadores de activación CD25, CD44, CD69, y CD5. Además se evaluaron los ciclos de proliferación, por dilución de CFSE, utilizando la técnica de citometría de flujo.

Anticuerpos y citometría de flujo.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos para la tinción superficial y/o intracelular, así como los controles de compensación pertinentes. Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo *Attune NxT* (*ThermoFisher Scientific - Life Technologies*) del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LabNaCit) del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Se analizaron los datos utilizando el programa de análisis especializado *FlowJo V.10*.

Tabla 3: Panel de anticuerpos utilizados para la evaluación de poblaciones linfocitarias en el modelo ex vivo.

Antígeno	Fluorocromo	Clona	Marca
CD4	FITC	GK1.5	BioLegend
	APC	GK1.5	BioLegend
	PE-Cy5.5	RM4-5	eBioscience
	APC-Cy7	RM4-5	Tonbo Biosciences
CD8	PE-Cy7	53-6.7	BioLegend
CD25	PE-Cy5.5	PC61.5	Invitrogen
CD44	PE	IM7	BioLegend
CD62L	APC-Cy7	MEL-14	BioLegend
CD5	Alexa Fluor 594	53-7.3	BioLegend
Viabilidad	Aqua Zombie	-----	Biolegend

Tabla 4: Panel de anticuerpos utilizados para la evaluación de poblaciones linfocitarias y muerte celular en el modelo de activación in vivo.

Antígeno	Fluorocromo	Clona	Marca
CD4	FITC	GK1.5	BioLegend
	PE-CF594	RM4-5	BD Biosciences
	Pacific Blue	GK1.5	BioLegend
	APC-Cy7	RM4-5	Tonbo Biosciences
CD8	PE-Cy7	53-6.7	BioLegend
CD25	Pacific Blue	RM6028	BioLegend
CD44	PE	IM7	BioLegend
CD62L	APC-Cy7	MEL-14	BioLegend
Anexina V	APC	-----	BioLegend
-----	7AAD	-----	BioLegend

Para activación, se administró α CD3 soluble (Clona 145-2C11) de BioLegend.

Tabla 5: Panel de anticuerpos utilizados para los ensayos de activación y proliferación en el modelo de activación in vitro.

Antígeno	Fluorocromo	Clona	Marca
CD4	APC	GK1.5	BioLegend
	PE-Cy5.5	RM4-5	eBioscience
	APC-Cy7	RM4-5	Tonbo Biosciences
CD25	PE-Cy5.5	PC61.5	Invitrogen
CD44	PE	IM7	BioLegend
CD62L	APC-Cy7	MEL-14	BioLegend
CD5	Alexa Fluor 594	53-7.3	BioLegend
CD69	FITC	HM4001	Caltag
-----	CTV	-----	Invitrogen
Viabilidad	Aqua Zombie	-----	Biolegend

Para sensibilización de placa, se utilizó α CD3 soluble (Clona 145-2C11) de BioLegend, y α CD28 soluble (Clona 37.51) de Tonbo Biosciences.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando el software *GraphPad Prism 8*, utilizando la prueba de *t de Student* y ANOVA de dos vías (Tukey post-hoc). Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los datos de las gráficas mostradas son expresados como media \pm desviación estándar.

RESULTADOS

Determinación de poblaciones de linfocitos T en MLNs, PLNs y Bazo de ratones CD5 ITIM-KI *ex vivo*.

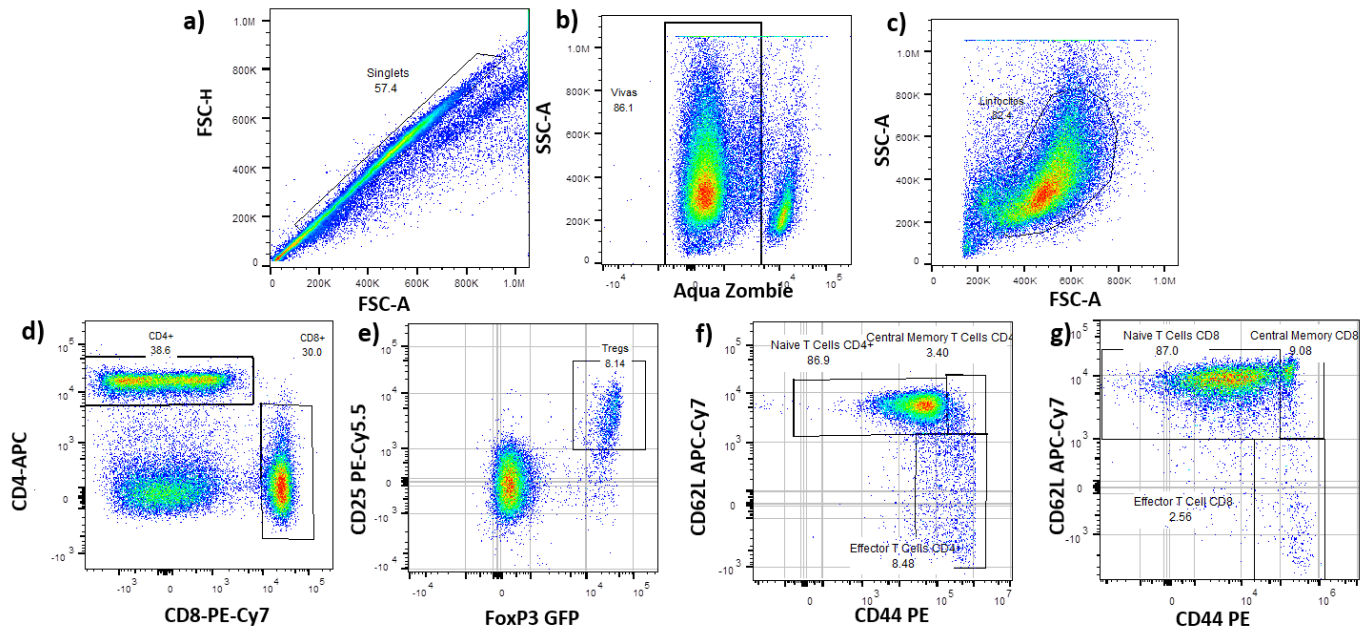


Figura 8: Estrategia de análisis para la selección de poblaciones linfocitarias en modelo *ex vivo*. Para el análisis de los linfocitos, se desarrolló la estrategia donde **(a)** se seleccionan inicialmente los eventos sencillos, **(b)** posteriormente con el uso de Aqua Zombie se seleccionan las células vivas (AZ-), excluyéndose las muertas (AZ+). **(c)** A continuación, se selecciona una región correspondiente a células o linfocitos utilizando una gráfica de tamaño (FSC) contra complejidad (SSC). **(d)** Para el estudio de las poblaciones, se seleccionaron los linfocitos T CD4+ y CD8+. **(e)** Para los linfocitos T CD4+ se analizaron las poblaciones de células T reguladoras (CD25+FoxP3+). **(f-g)** Finalmente, tanto para CD4+ **(f)** como CD8+ **(g)**, en una gráfica de CD62L contra CD44, se seleccionaron los linfocitos T naive (CD62L⁺CD44⁻ o CD62L⁺CD44^{low-dim}) y linfocitos T efectores o activados (CD62L⁻CD44⁺).

En la **Figura 8** se muestra el algoritmo de análisis utilizado para la determinación de las diferentes poblaciones celulares de linfocitos T en ganglios mesentéricos (MLNs) y periféricos (PLNs), así como aquellas que se encuentran en bazo. Al analizar las cuentas de cada órgano linfoide secundario en ratones WT y CD5 ITIM-KI, así como las frecuencias y números absolutos de las poblaciones CD4+ totales y CD8+ totales, se encontró que la ausencia del dominio ITIM de CD5 no repercute en la celularidad en los órganos, ni en las poblaciones CD4+ y CD8+ totales (**Figura 9**). Se procedió a analizar algunas subpoblaciones de linfocitos T CD4+: linfocitos T CD4+ naive (CD4+CD44⁻CD62L⁺ o CD4+CD44^{low-dim}CD62L⁺), linfocitos T CD4+ efectores o activados (CD4+CD44⁺CD62L⁻), así como linfocitos T reguladores (CD4+Foxp3⁺CD25⁺), sin embargo, estas subpoblaciones tampoco se ven afectadas por la ausencia del dominio ITIM de CD5, mostrando valores similares en frecuencias y números absolutos (**Figura 10**).

Lo mismo sucedió al analizar las subpoblaciones de linfocitos T CD8+: linfocitos T CD8+ naive (CD8+CD44⁻CD62L⁺ o CD8+CD44^{low-dim}CD62L⁺), linfocitos T CD8+ efectores o activados (CD8+CD44⁺CD62L⁻) [**Figura 11**]. De todas estas poblaciones se calcularon los incrementos relativos (para la normalización de los datos respecto al valor de los ratones silvestres) por experimento independiente, sin embargo, tampoco se encontraron diferencias significativas entre las diferentes poblaciones y subpoblaciones (**Datos no mostrados**).

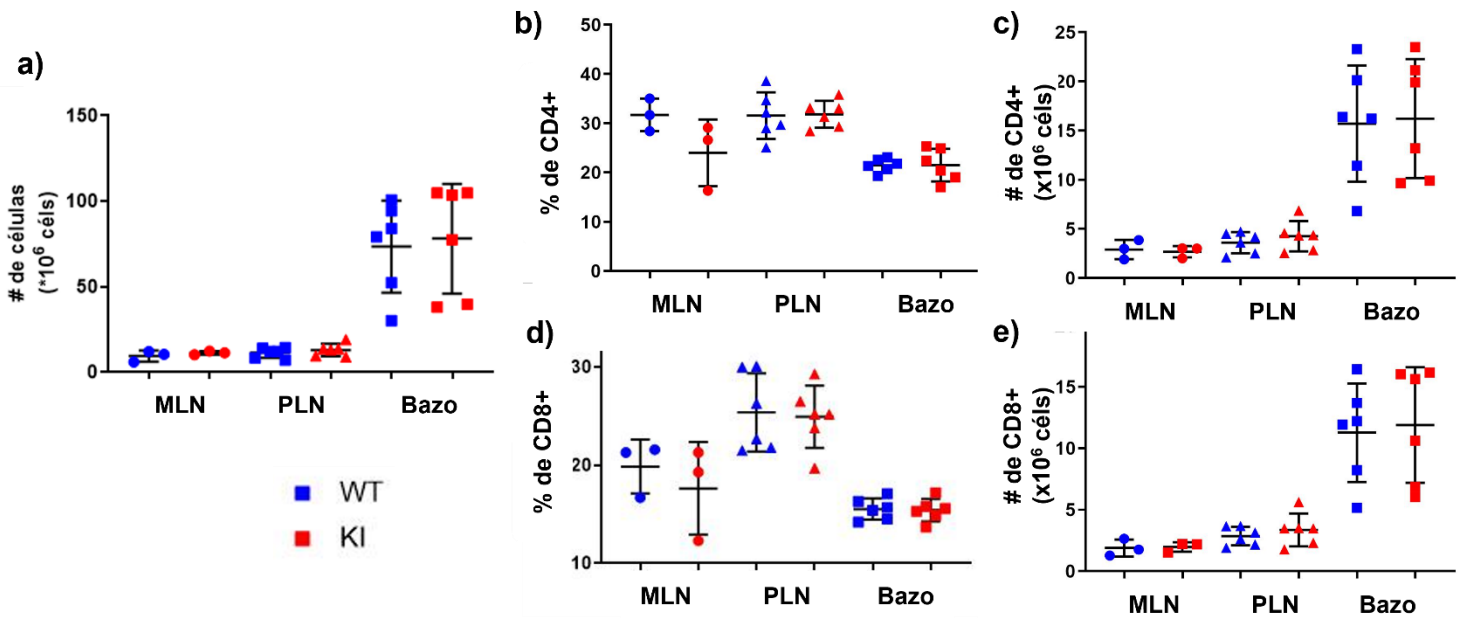


Figura 9: La celularidad total de órganos linfoides secundarios, así como frecuencias y números absolutos de linfocitos T CD4+ y CD8+ del ratón CD5 ITIM-KI se mantienen similares respecto al ratón WT. (a) La celularidad total de los diferentes órganos linfoides secundarios (MLN, PLN y Bazo) no varía entre el modelo WT y CD5 ITIM-KI (conteo por el método de Azul de tripano). Respecto a los linfocitos T CD4+ totales, los valores de frecuencias (b) y números absolutos (c) son similares entre los ratones WT y CD5 ITIM-KI. De igual manera, se encontró que las poblaciones de linfocitos T CD8+ totales entre ambos modelos eran similares (d, e). Se muestra la media ± SD. (n: MLN=3; PLN=6; Bazo=6). Resultados representativos de 2-4 experimentos independientes.

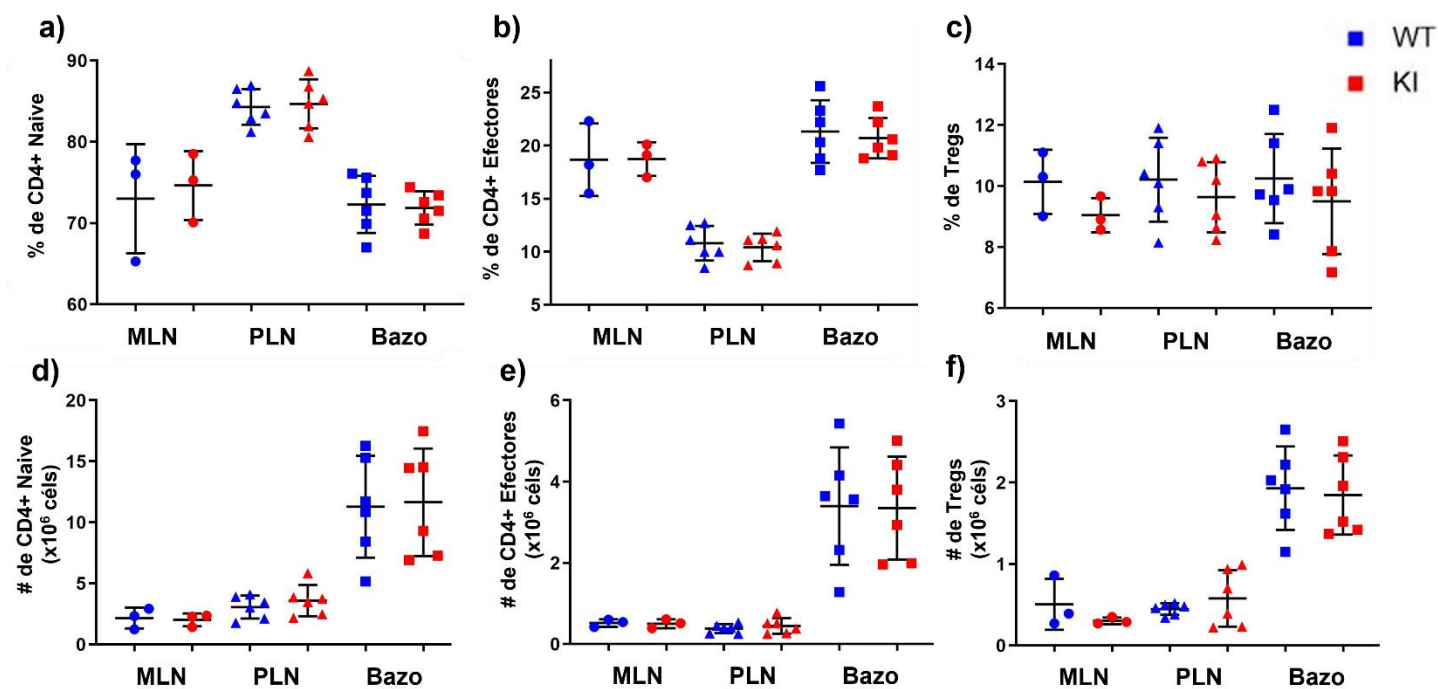


Figura 10: El dominio ITIM de CD5 no altera las poblaciones celulares de linfocitos T CD4+ en órganos linfoides secundarios ex vivo. Las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4+ (naive, efectores/activados y Tregs) provenientes de órganos linfoides secundarios (MLNs, PLNs y bazo) no se encontraron alteradas, en frecuencias (a-c) o en números absolutos (d-f). Se muestra la media \pm SD. (n: MLN=3; PLN=6; Bazo=6). Resultados representativos de 2-4 experimentos independientes.

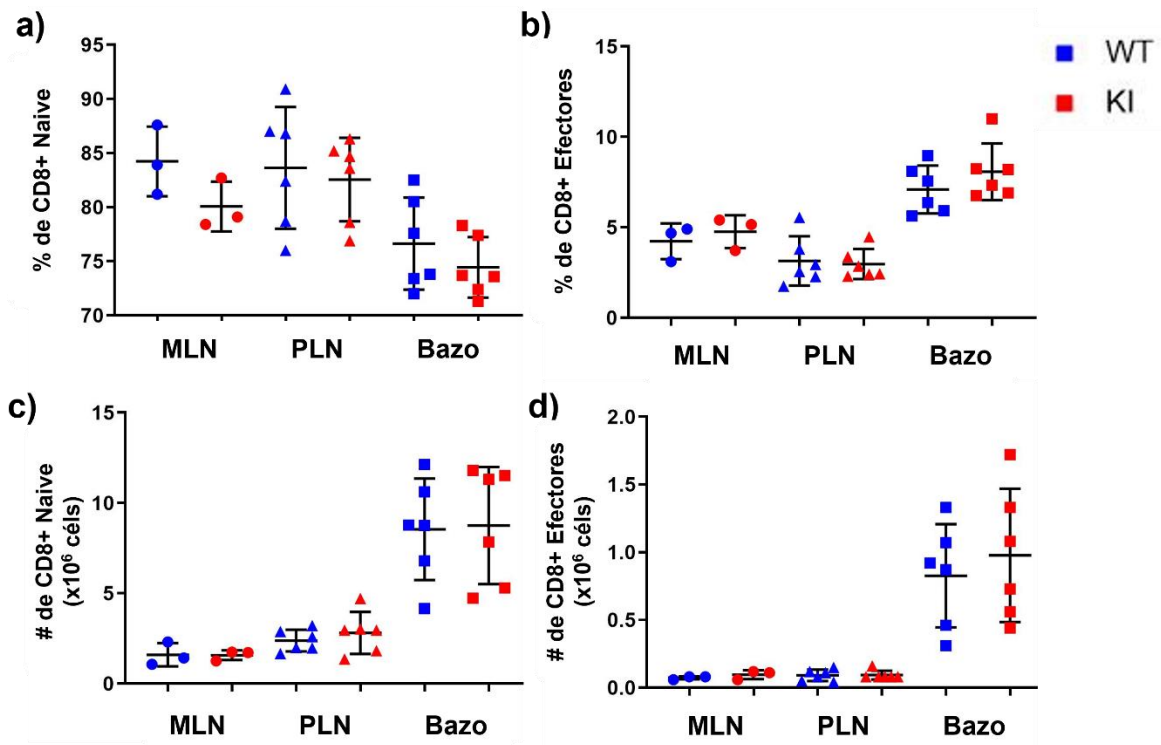


Figura 11: El dominio ITIM de CD5 no altera las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ en órganos linfoides secundarios en modelo ex vivo. Las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD8+ (naive, efectores/activados) provenientes de órganos linfoides secundarios (MLNs, PLNs y bazo) no se encontraron alteradas, en frecuencias (a-b) y números absolutos (c-d). Se muestra la media \pm SD. (n: MLN=3; PLN=6; Bazo=6). Resultados representativos de 2-4 experimentos independientes.

Expresión de CD5 en poblaciones de linfocitos T de ratones CD5 ITIM-KI ex vivo.

Se evaluaron los niveles de expresión de CD5 en las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+. Sorprendentemente, se encontró que en las poblaciones de linfocitos T CD4+ totales había una mayor expresión de CD5 en los linfocitos T provenientes de ratones CD5 ITIM-KI, respecto a su contraparte WT, en los tres órganos linfoides secundarios analizados (MLNs, PLNs y bazo) [Figura 12a]. Se procedió a analizar las subpoblaciones T naive, efectoras/activadas y de linfocitos T reguladores, encontrándose también elevados los niveles de expresión de CD5 en linfocitos T provenientes de ratones CD5 ITIM-KI (Figura 12b-d).

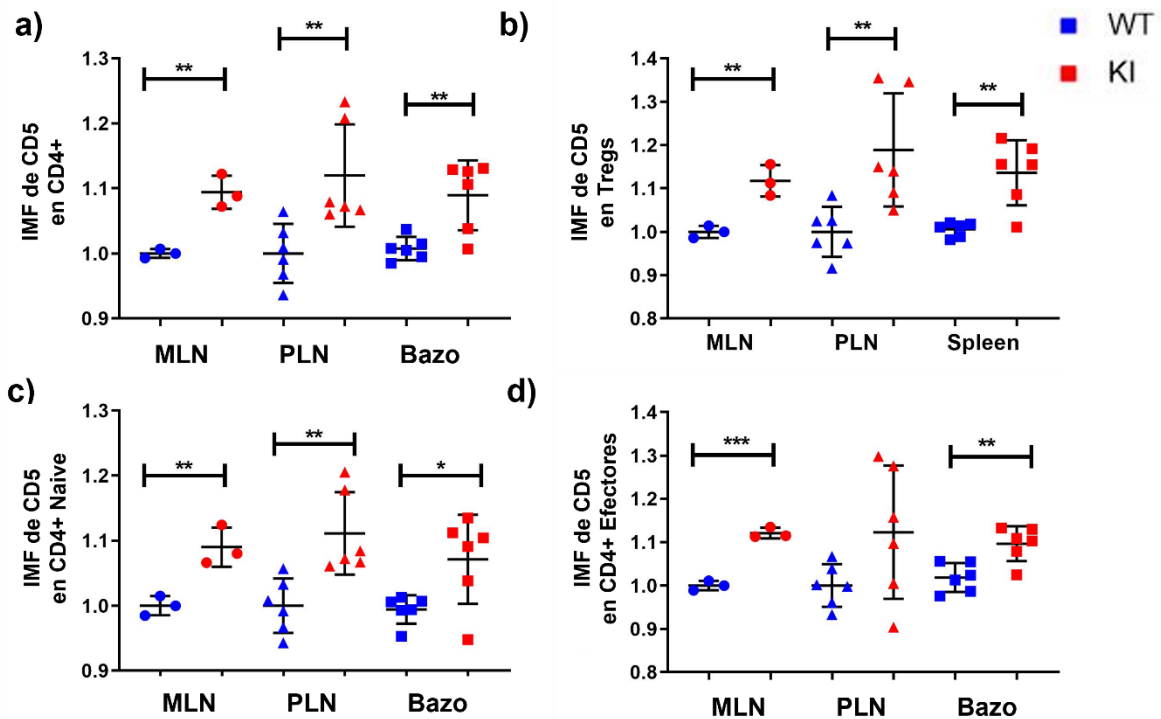


Figura 12: El dominio ITIM de CD5 regula los niveles de expresión de CD5 en linfocitos T CD4+.

En los ratones KI para el motivo ITIM de CD5, hay una mayor expresión de CD5 en las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4+: linfocitos T CD4+ totales (a), linfocitos T reguladores (b), linfocitos T CD4+ naive (c) y linfocitos T CD4+ efectores/activados (d). Se muestran graficados los incrementos relativos de la IMF (Intensidad Media de Fluorescencia) de los linfocitos T provenientes de ratones CD5 ITIM-KI, respecto al ratón WT. Se muestra media \pm SD. (n: MLN=3; PLN=6; Bazo=6). Resultados representativos de 2-4 experimentos independientes.

De manera similar, los niveles de CD5 también se encontraron significativamente elevados en linfocitos T CD8+ totales provenientes de ratones CD5 ITIM-KI, respecto a su contraparte WT en los tres órganos linfoides secundarios analizados (Figura 13a). Cuando se analizaron las subpoblaciones naive y efectoras/activadas, se encontraron niveles incrementados de CD5 únicamente en linfocitos T CD8+ naive provenientes de los tres órganos linfoides analizados (Figura 13b) de ratones CD5 ITIM-KI, mientras que en linfocitos T CD8+ efectoras/activadas este incremento en los niveles de CD5 solamente se evidenció en aquellos linfocitos T provenientes de bazo, respecto a su control WT.

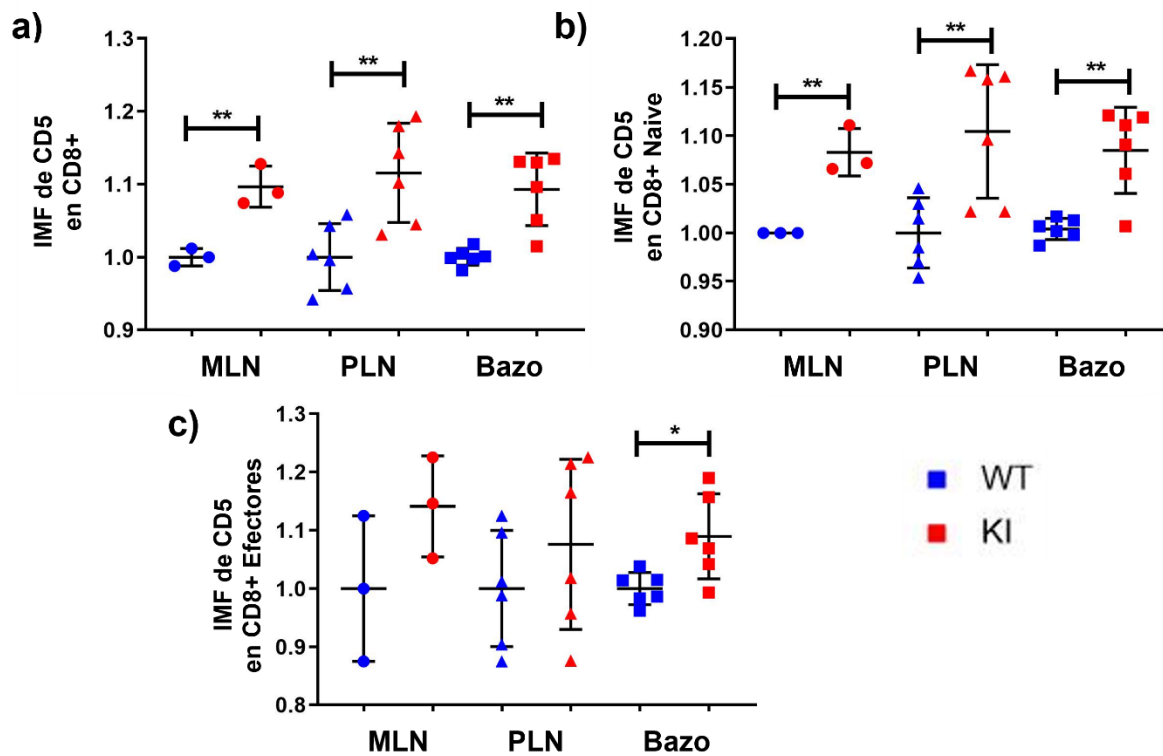


Figura 13: El dominio ITIM de CD5 regula los niveles de expresión de CD5 en linfocitos T CD8+.

En los ratones KI para el motivo ITIM de CD5, hay una mayor expresión de CD5 en las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD8+: linfocitos T CD8+ totales (a), linfocitos T CD8+ naive (b) y linfocitos T CD8+ efectores/activados (c). Se muestran graficados los incrementos relativos de la IMF (Intensidad Media de Fluorescencia) de los linfocitos T provenientes de ratones CD5 ITIM-KI, respecto al ratón WT. Se muestra la media \pm SD. (n: MLN=3; PLN=6; Bazo=6). Resultados representativos de 2-4 experimentos independientes.

Este incremento de expresión de los niveles de CD5 de los linfocitos T provenientes de ratones CD5 ITIM-KI nos podría estar indicando que este dominio regula negativamente la expresión de esta molécula (CD5), ya que su ausencia provoca una elevación en la expresión de estos de manera significativa en las principales subpoblaciones de linfocitos T.

Evaluación de la activación y muerte celular en ratones CD5 ITIM-KI tras administración de α -CD3 en un modelo *in vivo*.

CD5 regula la señalización río abajo del TCR, ya que la ausencia de CD5 en timocitos los hace hiperresponsivos, sugiriendo un papel para CD5 como atenuador de la señal del TCR ^{66,67}; mientras que a nivel periférico, se ha encontrado que la estimulación *in vivo* de ratones deficientes de CD5 con α -CD3 provoca una sobreactivación del linfocitos T que viene acompañado de un aumento en la expresión de marcadores de activación, hiperfosforilación de proteínas señalizadoras ¹⁰⁶ que los conducen a la muerte por apoptosis ⁶⁴. Lo que no se conoce es si alguna región específica de CD5 es la responsable de estos efectos o si contribuye a estos.

Para ello se evaluó la activación de linfocitos T *in vivo* al estimular ratones WT y CD5 ITIM-KI con 1 μ g de α -CD3, vía i.p., durante 20 h. Se procedió a la obtención de los linfocitos T provenientes de MLN, PLN y bazo para su posterior análisis utilizando el marcador de activación CD44+, caracterizando una población efectora o activada. Además, se analizó la tasa de muerte, ya sea por procesos de apoptosis (Anexina V+) o necrosis (7AAD+ Anexina V-).

En la **Figura 14** se muestra el algoritmo de análisis utilizado para la determinación de las poblaciones CD4+ y CD8+, así como el gráfico utilizado para la determinación de la muerte que sufrió cada población por el tratamiento. Como nota adicional, cabe resaltar que para la selección de eventos caracterizados como linfocitos (**Figura 14b**), se seleccionó una región de tamaño (FSC) versus complejidad (SSC) amplia, para incluir también a los linfocitos activados puesto que estos parámetros cambian tras activación celular ¹³⁷ o en procesos de muerte celular ¹³⁸.

Se utilizaron 4 grupos experimentales, como controles ratones WT de los cuáles se crearon dos grupos, uno con ratones administrados con solución salina (WT) y otro con ratones administrado con α CD3 vía i.p. (WT + α CD3), fungiendo como control positivo. Y como grupos experimentales ratones CD5 ITIM-KI administrados con solución salina isotónica (KI) y ratones administrados con α CD3 vía i.p. (KI + α CD3).

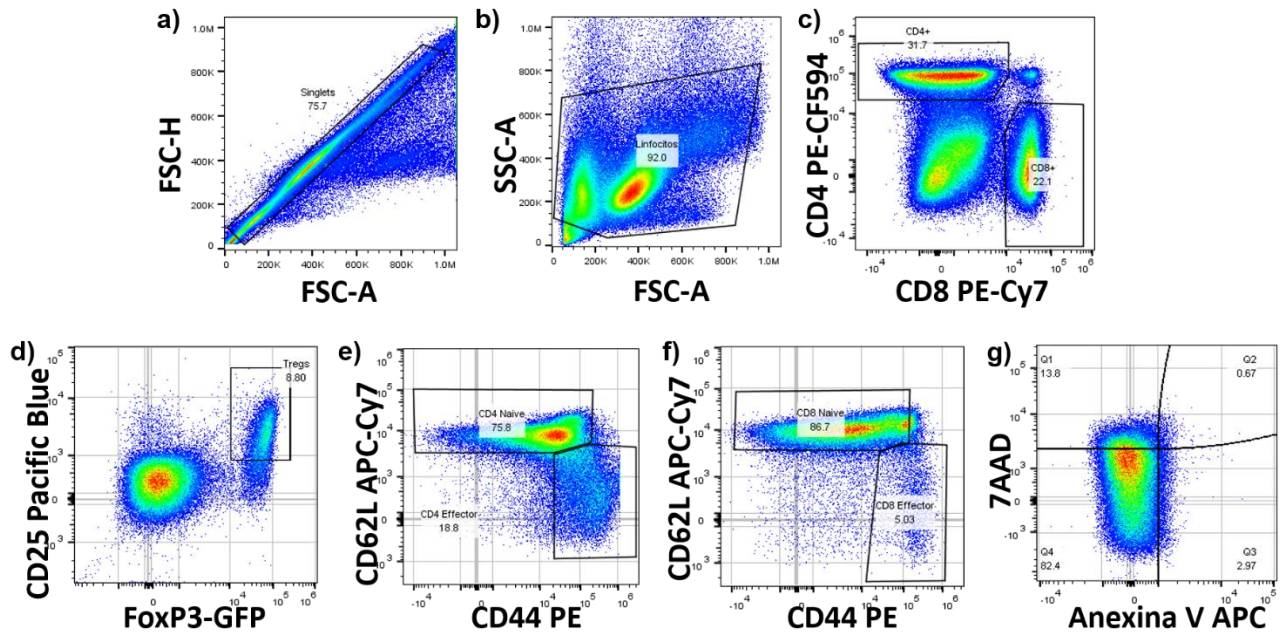


Figura 14: Estrategia de análisis para la selección de poblaciones linfocitarias para análisis de la activación y muerte celular de linfocitos T en un modelo de activación in vivo. Para el análisis de los linfocitos, se desarrolló un algoritmo de análisis donde **(a)** se seleccionan inicialmente los eventos sencillos, posteriormente **(b)** se seleccionan las células o linfocitos utilizando una gráfica de tamaño (FSC) contra complejidad (SSC), haciendo un gate más amplio para seleccionar aquellas células activadas y/o muertas; **(c)** a continuación se seleccionaron los linfocitos T CD4+ y CD8+. **(d)** Para los linfocitos T CD4+ se analizaron las poblaciones de células T reguladoras (CD25+FoxP3+). Además, tanto para CD4+ **(e)** como CD8+ **(f)**, en una gráfica de CD62L contra CD44, se seleccionaron los linfocitos T naive (CD62L⁺CD44⁻ o CD62L⁺CD44^{neg-dim}), linfocitos T efectores o de memoria efectora (CD62L⁻CD44⁺) y linfocitos T de memoria central (CD62L⁺CD44⁺). Finalmente, **(g)** se realizó un gráfico de 7AAD (molécula con alta afinidad de unión al DNA) vs Anexina V (proteína que se une a residuos de fosfatidilserina), para identificar los tipos de muerte celular, donde Anexina+ se clasificó como muerte por apoptosis, mientras que 7AAD+ como muerte por necrosis.

En la **Figura 15** se muestran los patrones observados (en un experimento independiente) donde se puede observar el efecto cualitativo o visual que tiene la administración de α CD3 en las poblaciones de linfocitos T en ganglios linfáticos mesentéricos (MLNs). Se ve la transición de un fenotipo de linfocito T naive (ya sea CD4+ o CD8+) a un fenotipo efector/activado, dado por la expresión del marcador de activación CD44, reflejándose en una disminución de la población de linfocitos T

naive ($CD44^{-/low}CD62L^{+}$) y como consecuencia, en un aumento de la población de linfocitos T efectores/activados ($CD44^{+}CD62L^{-}$). Sorprendentemente, en este análisis cualitativo, se observa que esta mayor activación o esta transición descrita, es mayor en aquellos ratones CD5 ITIM-KI que fueron administrados con $\alpha CD3$ respecto a aquellos WT que también fueron administrados. Esto se muestra tanto para linfocitos T $CD4^{+}$ como $CD8^{+}$. Este mismo patrón se observó en ganglios linfáticos periféricos y en bazo (**datos no mostrados**).

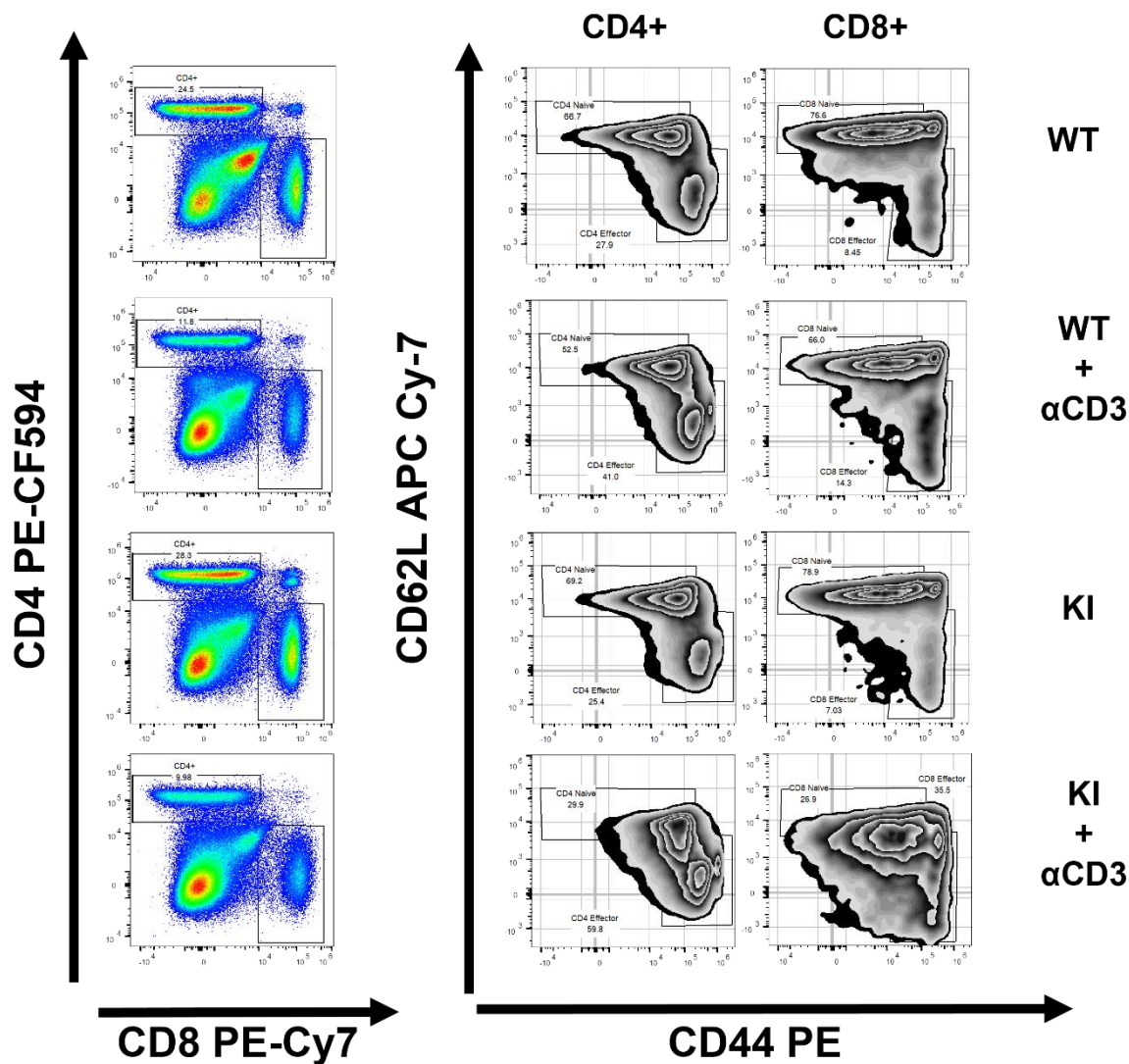


Figura 15: Activación de linfocitos T in vivo en MLNs tras el tratamiento con $\alpha CD3$. Se muestran imágenes representativas de poblaciones de linfocitos T $CD4^{+}$ y $CD8^{+}$ provenientes de ganglios mesentéricos (MLNs). Se puede observar el efecto que tiene la administración de $\alpha CD3$ en ratones WT y CD5 ITIM-KI, vía i.p., observando que hay una mayor activación o transición a un fenotipo activado dado por la expresión del marcador de activación $CD44^{+}$, es decir, la disminución de aquella

población de linfocitos T naive ($CD44^{low}CD62L+$) dado por un aumento de la población de linfocitos T efectores/activados ($CD44+CD62L-$).

Al analizar las poblaciones de linfocitos T $CD4+$ y $CD8+$ totales en los diferentes órganos linfoides, se observó que la administración de $\alpha CD3$ provoca la disminución de las frecuencias de ambas poblaciones en los diferentes órganos linfoides secundarios (**Figura 16**), tanto de ratones WT como aquellos $CD5$ ITIM-KI, en comparación con la administración de SSI.

Estas disminuciones no se replicaron en la población de linfocitos T $CD4+$ al analizar los números absolutos, descartando así la posibilidad de que la disminución observada en frecuencias de linfocitos T $CD4+$ estuviera dada por un incremento en la muerte de éstos. Por lo tanto, es posible que otra población pudiera estar incrementada, causando la disminución en las frecuencias de linfocitos T $CD4+$ totales. De manera opuesta en los linfocitos T $CD8+$ totales, se encontró una disminución en números absolutos en respuesta al tratamiento con $\alpha CD3$, abriendo la posibilidad de que esta disminución se deba a un aumento en la muerte de éstos.

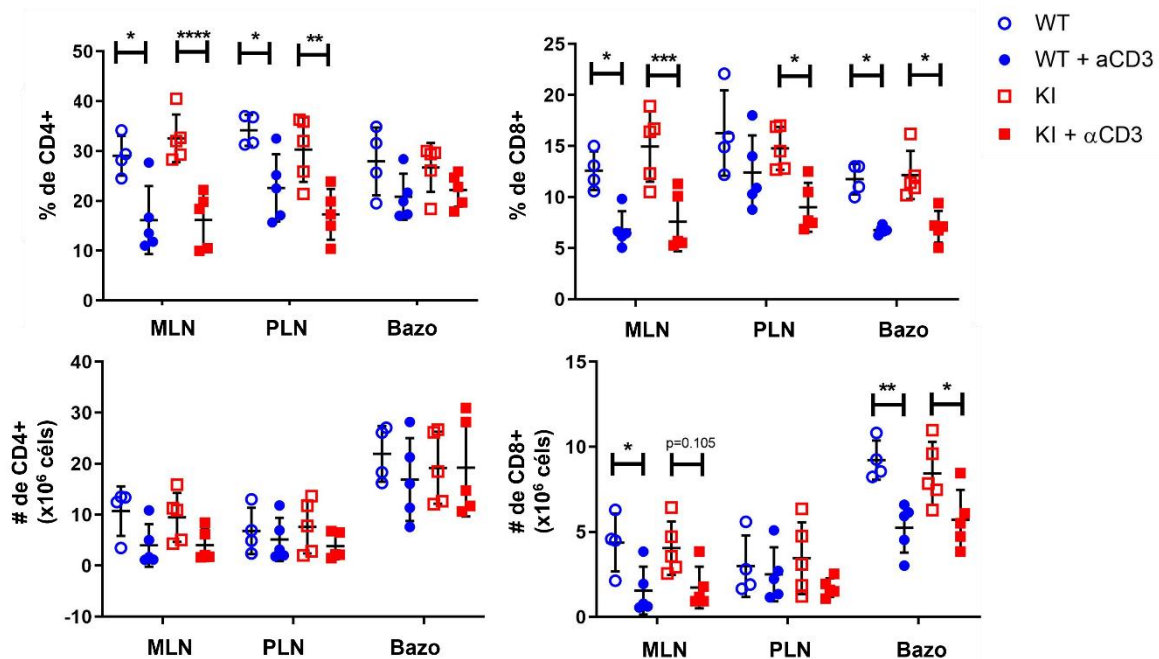


Figura 16: La administración de $\alpha CD3$ a los ratones, tanto WT como $CD5$ ITIM-KI provoca un decremento en linfocitos T $CD4+$ y $CD8+$. El análisis de las poblaciones de linfocitos T $CD4+$ y

CD8+ no mostró diferencias significativas entre el ratón WT o el ratón CD5 ITIM-KI, solo se puede observar que la administración de α CD3 lleva a una reducción de cada población, respecto a administrar SSI. Se muestra media \pm SD. (n: WT=4; WT+ α CD3=5; KI=5; KI+ α CD3=5). Se muestran dos experimentos independientes. Anova de dos vías, posthoc Tukey; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Se procedió a analizar las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+, con el fin de observar si la administración de α CD3 provocó la activación o algún cambio entre estas subpoblaciones. Al momento de analizar las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ se encontró en MLNs de manera similar a lo observado en la **Figura 15**, que los linfocitos T CD4+ provenientes de ratones CD5 ITIM-KI tienden a activarse más, lo cual se refleja en una disminución en las frecuencias de linfocitos T CD4+ naive y un aumento en las de linfocitos T CD4+ efectores/activados (**Figura 17a**). Sin embargo, la ausencia del motivo ITIM no evidenció diferente grado de activación en otros órganos linfoides ni se observó la misma tendencia al analizar los números absolutos de estas poblaciones en MLNs (**Figura 17b**).

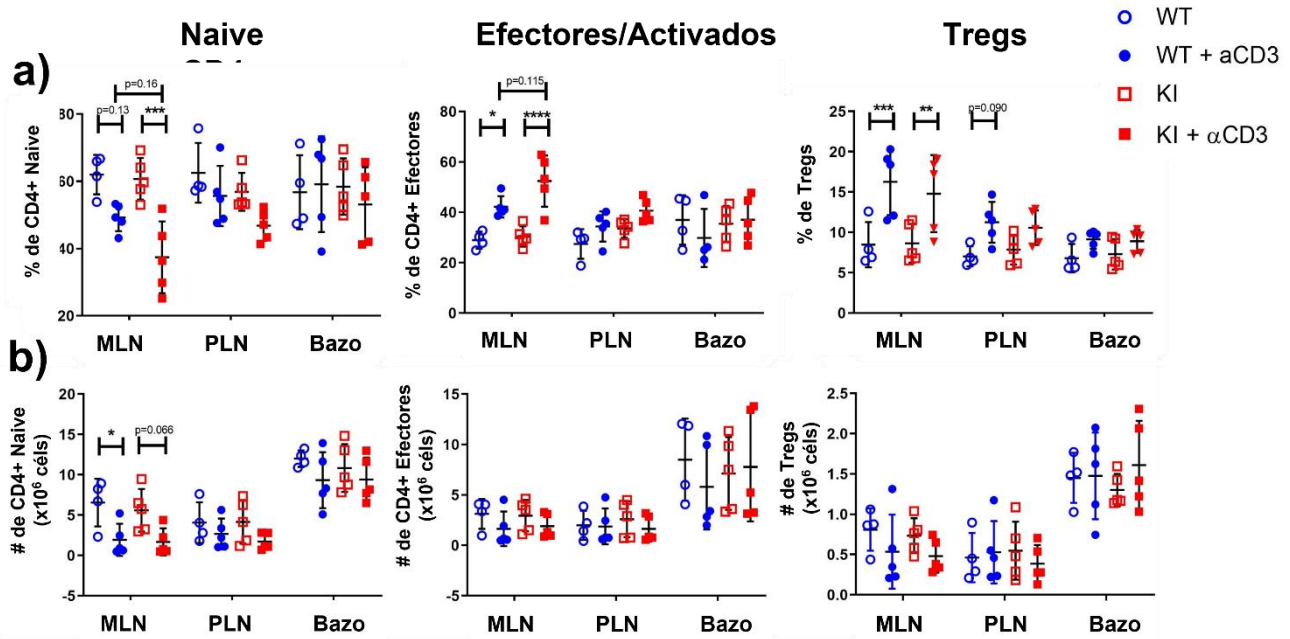


Figura 17: Los linfocitos T CD4+ del ratón CD5 ITIM-KI muestran una mayor activación tras administración de α CD3 respecto a los provenientes del ratón WT. Tras la administración ip de α CD3 a ratones CD5 ITIM-K, (a) se mostró una tendencia en estas células a sufrir una mayor activación que su contraparte WT, esto observado a través de la disminución de la frecuencia de la

población de linfocitos T CD4+ naive y un aumento de aquellos linfocitos T CD4+ efectores/activados, esto en MLNs. En los demás órganos linfoides secundarios (PLNs y bazo) no se encontraron resultados similares. En linfocitos T reguladores (Tregs) se encontró que la administración de α CD3 lleva al aumento en las frecuencias de estos en MLNs. **(b)** Respecto a números absolutos, en MLNs únicamente se encontró que la administración de α CD3, tanto en ratones WT como CD5 ITIM-KI, lleva a la disminución de linfocitos T CD4+ naive. Se muestra media \pm SD. (n: WT=4; WT+ α CD3=5; KI=5; KI+ α CD3=5). Dos experimentos independientes. Anova de dos vías, posthoc Tukey; * p <0.05, ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001.

A continuación se analizaron las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ para investigar si la administración de α CD3 provocaba una mayor activación en linfocitos T provenientes de ratones CD5 ITIM-KI, como lo observado en los linfocitos T CD4+ De manera similar, se encontró que los linfocitos T CD8+ provenientes de ratones CD5 ITIM-KI se activan más tras la administración de α CD3, respecto a su contraparte WT (**Figura 18**).

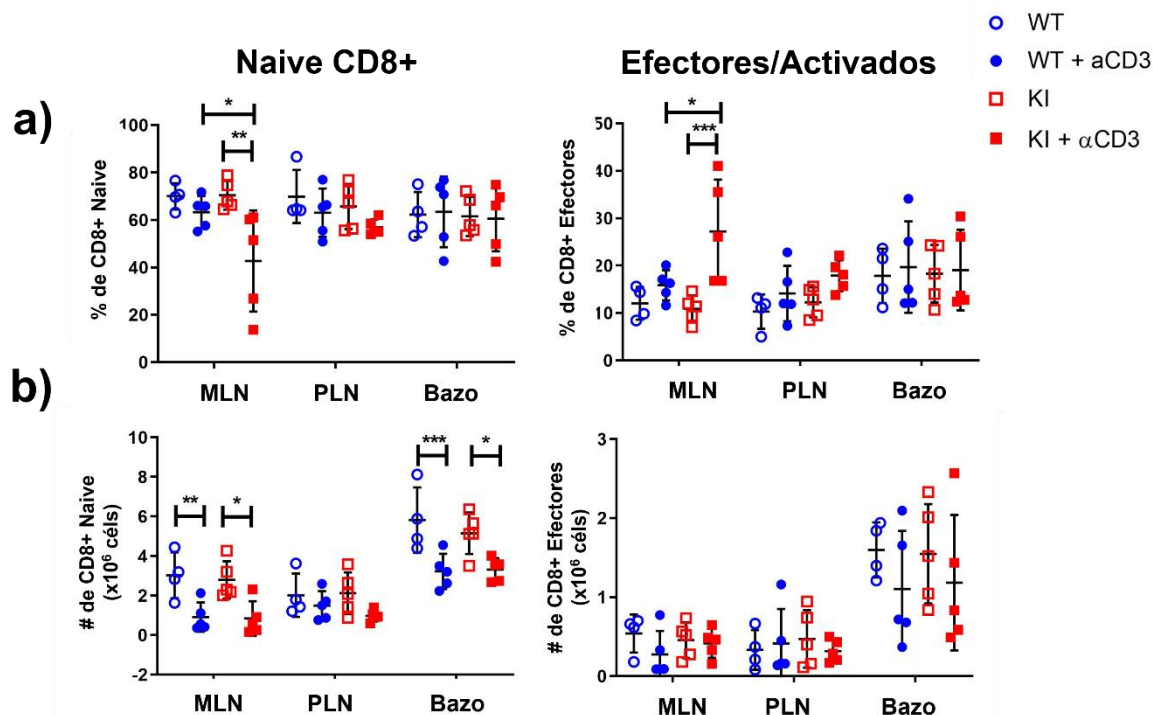


Figura 18: Los linfocitos T CD8+ del ratón CD5 ITIM-KI se activan más tras administración de α CD3 que los provenientes del ratón WT. Tras la administración de α CD3 se encontró que los linfocitos T CD8+ de los ratones CD5 ITIM-KI provenientes de ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) se activan más que los provenientes de su contraparte WT, esto al comparar frecuencias de estas subpoblaciones. **(a)** Se encontró la disminución significativa de las frecuencias de linfocitos T CD8+

naive y el aumento significativo de la subpoblación de linfocitos T CD8+ efectoras/activadas tras estimulación con α CD3, incluso aún más que lo observado en linfocitos T CD8+ provenientes de ratones WT. Para los otros dos órganos linfoides secundarios analizados (PLNs y bazo) no se encontró este efecto. **(b)** Al momento de analizar los números absolutos de estas subpoblaciones no se encontró esta mayor activación de los linfocitos T CD8+ CD5 ITIM-KI, sin embargo, si es posible observar para la subpoblación de linfocitos T CD8+ naive que, tanto linfocitos T provenientes de ratones WT como CD5 ITIM-KI, disminuye tras la administración de α CD3. Se muestra media \pm SD. (n: WT=4; WT+ α CD3=5; KI=5; KI+ α CD3=5). Dos experimentos independientes. Anova de dos vías, posthoc Tukey; * p <0.05, ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001.

Esta activación incrementada se refleja en una disminución de las frecuencias de linfocitos T CD8+ naive, a la par de un incremento en las frecuencias de linfocitos T CD8+ efectoras/activados de MLNs (**Figura 18a**). Sin embargo, al realizar el análisis utilizando números absolutos (**Figura 18b**), no se observaron diferencias significativas, ni tampoco en los otros órganos linfoides secundarios analizados.

El hecho de observar algunas diferencias entre las frecuencias y números absolutos entre experimentos provocó que se presentaran desviaciones estándar con valores altos, las cuáles podrían estar enmascarando cambios impidiendo que fueran observados. Por lo tanto, se procedió a la normalización de los datos mediante el cálculo de incrementos relativos, tanto de frecuencias, como de números absolutos, mostrando los resultados obtenidos a continuación.

Cuando se normalizaron los datos, al analizar las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ se encontró la disminución en las frecuencias de linfocitos T CD4+ naive significativa, mientras que para el aumento de linfocitos T CD4+ efectoras/activados se observó una tendencia más clara ($p=0.065$) [**Figura 19a**]. Respecto a las frecuencias de Tregs, tras normalizar, se encontró un aumento más evidente tras administrar α CD3, pero sin mostrar diferencias entre células provenientes de ratones WT y CD5 ITIM-KI. Además, se observó una disminución significativa en los números absolutos de linfocitos T CD4+ efectoras/activados provenientes de PLNs en el ratón CD5 ITIM-KI administrado con α CD3, a diferencia de su contraparte WT (**Figura 19b**). Y de manera contraria, en bazo se evidenció una mayor activación

dada por un incremento en los números absolutos de linfocitos T CD4+ efectores/activados provenientes de ratones CD5 ITIM-KI administrados con α CD3 (**Figura 19b**), reflejando una mayor activación de esta población en este órgano linfoide.

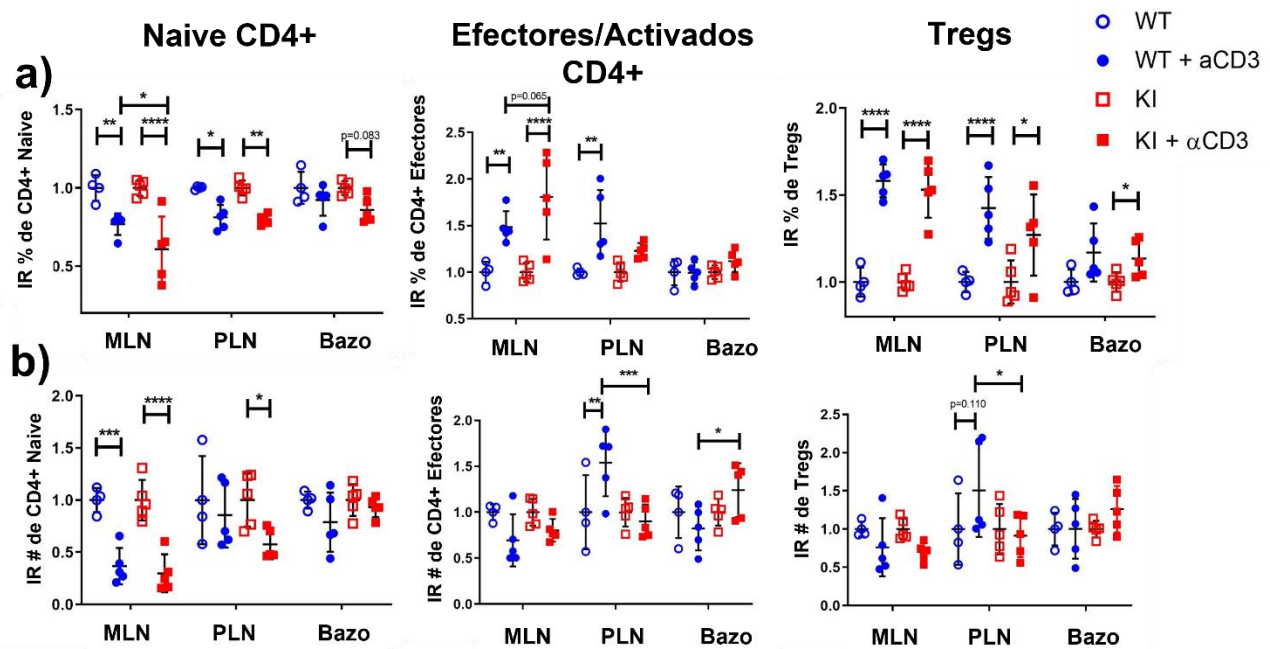


Figura 19: Incrementos relativos de las frecuencias de las poblaciones de linfocitos T CD4+ de MLN muestran mayor activación tras la administración de α CD3 en los provenientes de ratones CD5 ITIM-KI respecto a su contraparte WT. Los incrementos relativos de las diferentes poblaciones de linfocitos T CD4+ muestran el efecto del tratamiento tras la administración de α CD3 en el ratón WT o el ratón CD5 ITIM-KI, en frecuencias (**a**) o números absolutos (**b**). En cuanto a RI de las frecuencias, se ve una disminución y aumento entre el ratón WT y KI tras la administración de α CD3, en linfocitos T CD4+ naive y efectores de MLNs, respectivamente. Además, en cuanto a números absolutos, los PLNs mostraron un aumento de linfocitos T CD4+ efectores y de memoria central, así como disminución de Tregs, tras tratamiento de α CD3 en ratón CD5 ITIM-KI respecto a ratón WT. Se muestra media \pm SD. (n: WT=4; WT+ α CD3=5; KI=5; KI+ α CD3=5). Dos experimentos independientes. Anova de dos vías, posthoc Tukey; * p <0.05, ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001.

Mientras que para los datos normalizados (es decir, el cálculo de incrementos relativos) de los linfocitos T CD8+, se mantuvo el comportamiento previamente observado en la **Figura 18**. Se encontró una mayor activación tras estimulación con α CD3 de aquellos linfocitos T CD8+ de MLNs provenientes de ratones CD5 ITIM-KI

respecto a su contraparte WT, dado por una disminución significativa de linfocitos T CD8+ naive y un aumento de aquellos CD8+ efectores/activados (**Figura 20a**). De manera interesante, al momento de utilizar datos normalizados, encontramos que al analizar los números absolutos de las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ ahora se encontraron tendencias a un mayor número de linfocitos T CD8+ efectores/activados en ausencia del dominio ITIM de CD5 tras administración de α CD3, a comparación de aquellos con el dominio ITIM de CD5 intacto (**Figura 20b**).

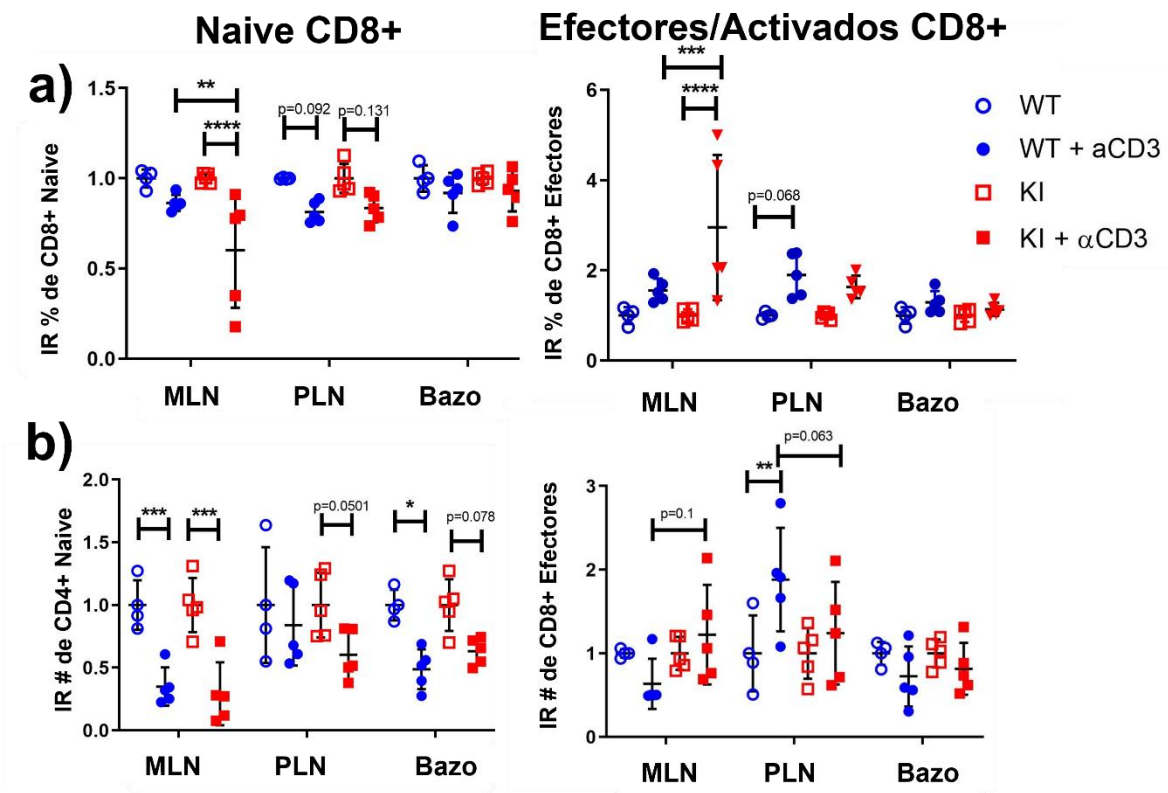


Figura 20: Incrementos relativos de las frecuencias de las poblaciones de linfocitos T CD8+ en ratones CD5 ITIM-KI versus WT. Se muestra un incremento en las frecuencias de linfocitos T activados y disminución en los números absolutos de linfocitos T naive de ratones CD5 ITIM-KI tras administración de α CD3, respecto a su contraparte WT. Los incrementos relativos de las diferentes poblaciones de linfocitos T CD8+ muestran el efecto del tratamiento tras la administración de α CD3 en el ratón WT o el ratón CD5 ITIM-KI, en frecuencias (**a**) o números absolutos (**b**). En cuanto a los incrementos relativos de las frecuencias, se observa un aumento de linfocitos T CD4+ efectores (provenientes de MLNs) entre el ratón WT y KI tras la administración de α CD3. Además, para los RI de números absolutos, los linfocitos T CD8+ naive y de memoria central de MLNs y PLNs, respectivamente, se encontraron disminuidos en el ratón CD5 ITIM-KI administrado con α CD3

respecto al WT administrado. Se muestra media \pm SD. (n: WT=4; WT+ α CD3=5; KI=5; KI+ α CD3=5). Dos experimentos independientes. Anova de dos vías, posthoc Tukey; * p <0.05, ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001.

A continuación, se evaluó la expresión del marcador CD25. Al evaluar su expresión tras activación de los linfocitos T obtenidos de ratones WT y CD5 ITIM-KI, se observó para linfocitos T CD4+, en MLNs y PLNs, que la estimulación provocó un aumento en la expresión de este marcador, sin encontrar diferencias entre ambos modelos de ratones (**Figura 21a**). Sin embargo, al analizar la expresión de CD25 en linfocitos T CD8+, se encontró que, tanto para aquellos provenientes de PLNs y de bazo, los linfocitos T carentes del dominio ITIM de CD5 presentaron mayores niveles de CD25 tras estimulación con α CD3, respecto a los provenientes de ratones WT igualmente administrados (**Figura 21b**). Este dato nos lleva una vez más a pensar que la ausencia de este dominio ITIM de la molécula CD5 puede estar teniendo parte del papel de regulador negativo de la señal del TCR que tiene CD5, comprobado ahora mediante la expresión de CD25.

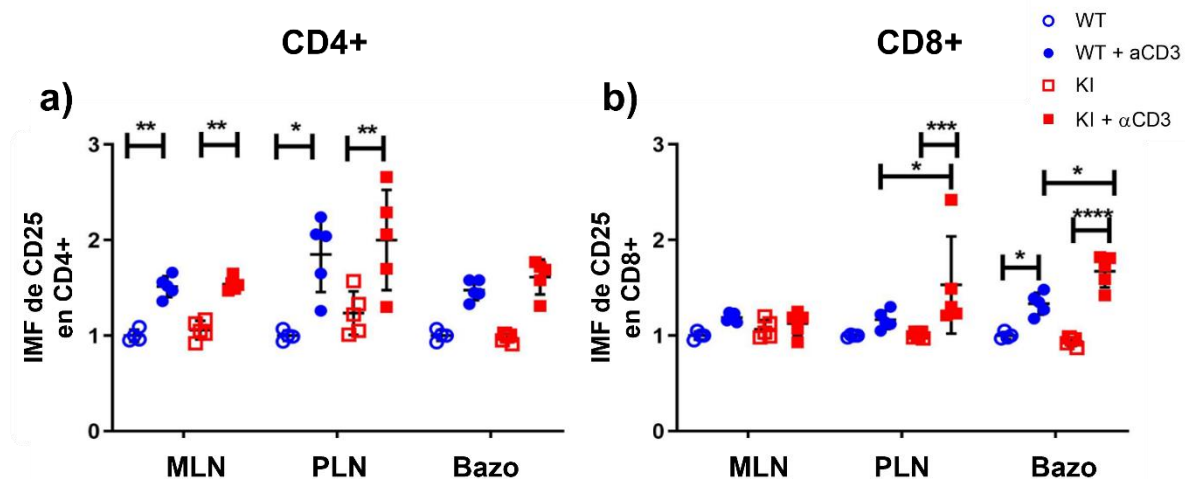


Figura 21: CD25 funciona como marcador de activación de linfocitos T, y los linfocitos T CD8+ de PLNs y bazo del ratón CD5-ITIM expresan mayores niveles de CD25 tras la administración de α CD3, respecto a su contraparte WT. Los linfocitos T CD4+ (a) muestran una mayor expresión de CD25 (marcador relacionado con la activación linfocitaria) en aquellos estimulados con α CD3, siendo consistente con la activación esperada, sin embargo no se mostró diferencia entre aquellos provenientes de ratones WT y CD5 ITIM-KI. Por otro lado, los linfocitos T CD8+ (b) muestran aumento en los niveles de expresión del marcador CD25 tras administración con α CD3, observándose diferencias significativas tras administración de α CD3 entre ratones WT y CD5-ITIM

en linfocitos provenientes de PLNs y bazo. Este incremento es mayor en aquellos linfocitos T CD8+ CD5 ITIM-KI, indicando una mayor activación respecto a aquellos proveniente de ratones WT. Se muestra media \pm SD. (n: WT=4; WT+ α CD3=5; KI=5; KI+ α CD3=5). Dos experimentos independientes. Anova de dos vías, posthoc Tukey; * p <0.05, ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001.

En resumen, los resultados anteriores nos sugieren que el dominio ITIM de CD5 posee un papel modulador de la activación de los linfocitos T CD4+ y CD8+, ya que en su ausencia, se muestra una mayor activación de estos tras estimulación del complejo TCR/CD3 por administración de α CD3 soluble, observado como la disminución de linfocitos T naive y aumento de linfocitos T efectores/activados. Todo esto parece sugerir que el dominio ITIM contribuye al papel de regulación negativa que ejerce CD5 sobre la señal del TCR.

De igual manera, estos resultados nos llevan a pensar si la disminución observada de linfocitos T CD4+ y CD8+ totales en la **Figura 16** o la disminución observada en las **Figuras 17-20** de linfocitos T naive pueda deberse también, en parte, a una sobreestimulación que pudiera llevar a la inducción de procesos de muerte celular inducida por activación (AICD).

Por lo tanto, se procedió a analizar la muerte celular de las diferentes poblaciones de linfocitos T mediante la técnica de tinción de Anexina V y 7AAD. Sin embargo, al analizar los diferentes datos experimentales, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de frecuencias de muerte de linfocitos T CD4+ o CD8+, ni sus diferentes subpoblaciones, ya sea en condiciones basales (control con SSI) o tras el tratamiento con α CD3 en ratones WT o CD5 ITIM-KI. Tampoco se encontraron diferencias en los patrones de muerte observados por la ausencia del dominio ITIM de CD5 respecto a su contraparte WT. En las **Figuras 22-24** se muestran las muertes de las diferentes poblaciones en MLN (**Figura 22**), en PLN (**Figura 23**), y en bazo (**Figura 24**). De manera interesante, en la **Figura 23** se observa que los linfocitos T CD4+ totales provenientes de PLNs del ratón CD5 ITIM-KI muestran una menor frecuencia de células vivas y una mayor frecuencia de muertas por necrosis respecto al ratón WT, esto de manera “basal”, ya que se observó solamente entre grupos sin administración de α CD3.

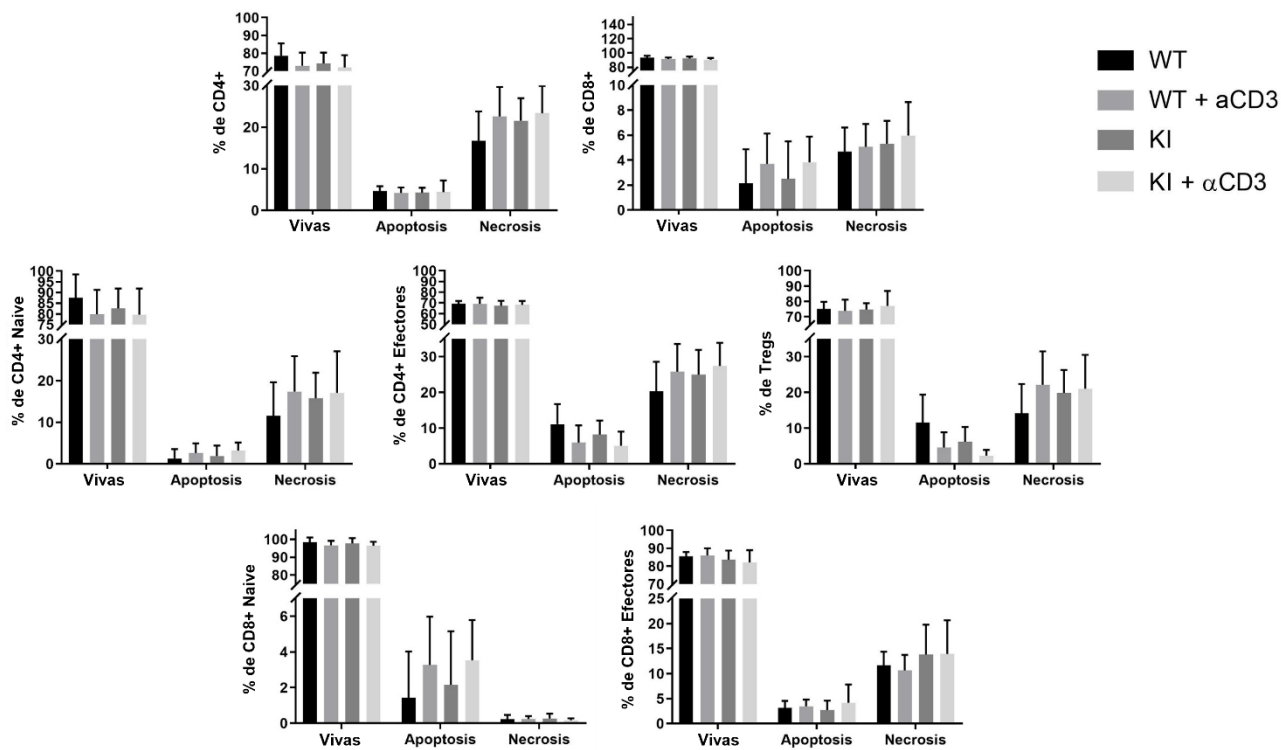


Figura 22: Los linfocitos T provenientes de ratones WT y de ratones CD5 ITIM-KI muestran el mismo patrón de muerte en MLNs tras administración de α CD3. Se analizó la tasa (frecuencia) de muerte de los 4 grupos experimentales (WT, WT+ α CD3, KI, KI α CD3) de las diferentes poblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ y sus subpoblaciones (naive, efectoras y Tregs) en MLNs. Los tipos de muerte celular de los linfocitos T estudiados fueron apoptosis y necrosis, el primero caracterizado por la marca/tinción positiva de Anexina V, y la segunda por la marca/tinción positiva de 7AAD; mientras que aquellas células dobles negativas a ambos marcadores se clasificaron como células vivas. No se observaron diferencias entre las células vivas o muertas (apoptosis y necrosis) de las diferentes poblaciones/subpoblaciones entre los 4 grupos experimentales. Se muestra media \pm SD. (n: WT=4; WT+ α CD3=5; KI=5; KI+ α CD3=5). Dos experimentos independientes. Anova de dos vías, posthoc Tukey.

También se realizó el análisis de los números absolutos de células vivas o muertas (por apoptosis o necrosis) de estas poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+, no obstante, tampoco se encontraron diferencias entre linfocitos T con el mismo fondo genético (WT o CD5 ITIM-KI) o comparando entre ambos fondos (WT vs CD5 ITIM-KI) [Datos no mostrados].

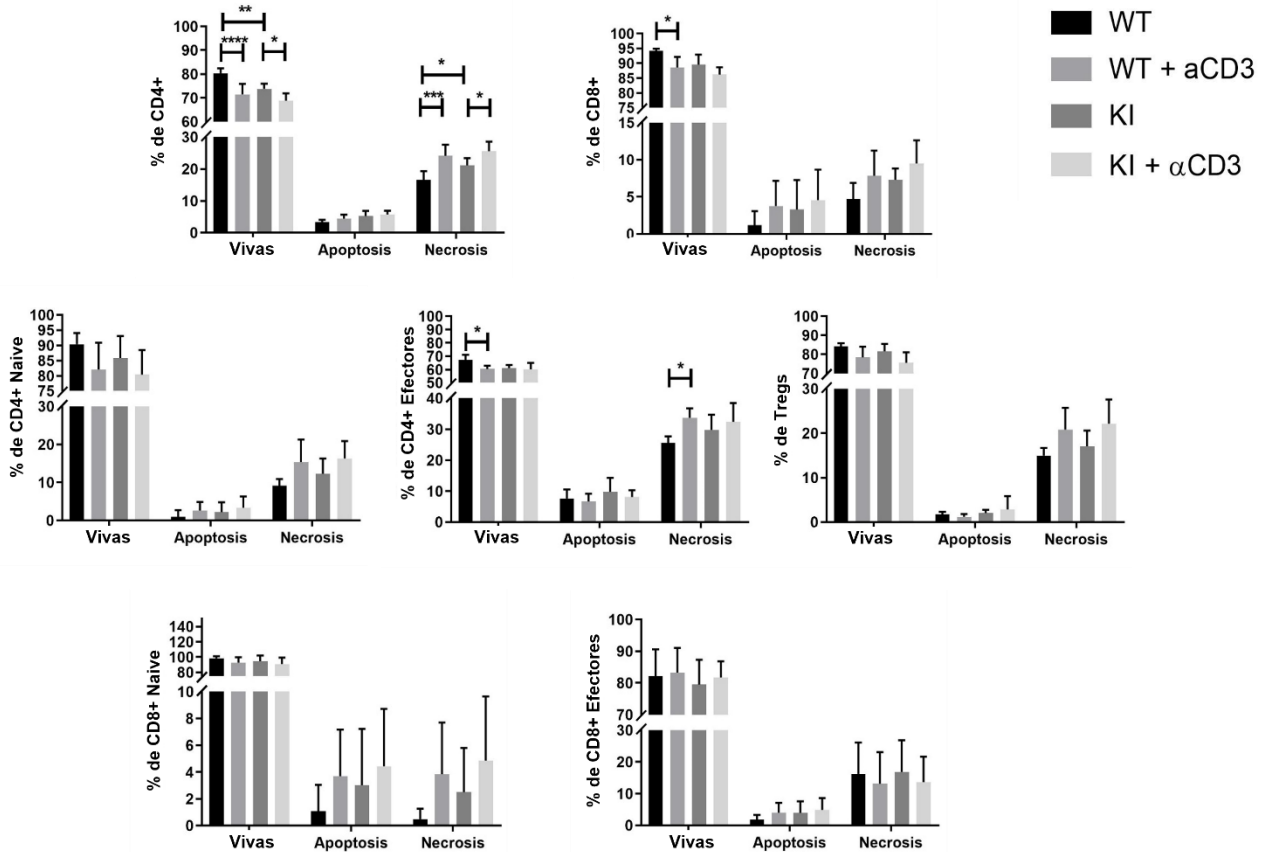


Figura 23: Los linfocitos T provenientes de ratones WT y de ratones CD5 ITIM-KI muestran el mismo patrón de muerte en PLNs tras administración de α CD3. Se analizó la tasa (frecuencia) de muerte de los 4 grupos experimentales (WT, WT+ α CD3, KI, KI α CD3) de las diferentes poblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ y sus subpoblaciones (naive, efectoras y Tregs) en PLNs. Los tipos de muerte celular de los linfocitos T estudiados fueron apoptosis y necrosis, el primero caracterizado por la marca/tinción positiva de Anexina V, y la segunda por la marca/tinción positiva de 7AAD; mientras que aquellas células dobles negativas a ambos marcadores se clasificaron como células vivas. No se observaron diferencias entre las células vivas o muertas (apoptosis y necrosis) de las diferentes poblaciones/subpoblaciones entre los 4 grupos experimentales, salvo entre aquellos linfocitos provenientes de ratones WT y CD5 ITIM-KI sin tratamiento, encontrándose menos células vivas en ratón CD5 ITIM-KI, y más muertas por necrosis. Se muestra media \pm SD. (n: WT=4;

WT+ α CD3=5; KI=5; KI+ α CD3=5). Se muestran los datos de dos experimentos independientes. Anova de dos vías, posthoc Tukey.

De igual manera para los datos de frecuencias y números absolutos se normalizaron los datos mediante el cálculo de incrementos relativos, pero en ninguno de los análisis mencionados se encontraron diferencias significativas relevantes en ratones WT o CD5 ITIM-KI o entre ellos (**datos no mostrados**). Estos resultados podrían indicarnos que el dominio ITIM de CD5 no contribuye a la regulación de procesos de muerte inducidos por activación, ya que su ausencia no muestra incremento o protección de muerte del linfocito T.

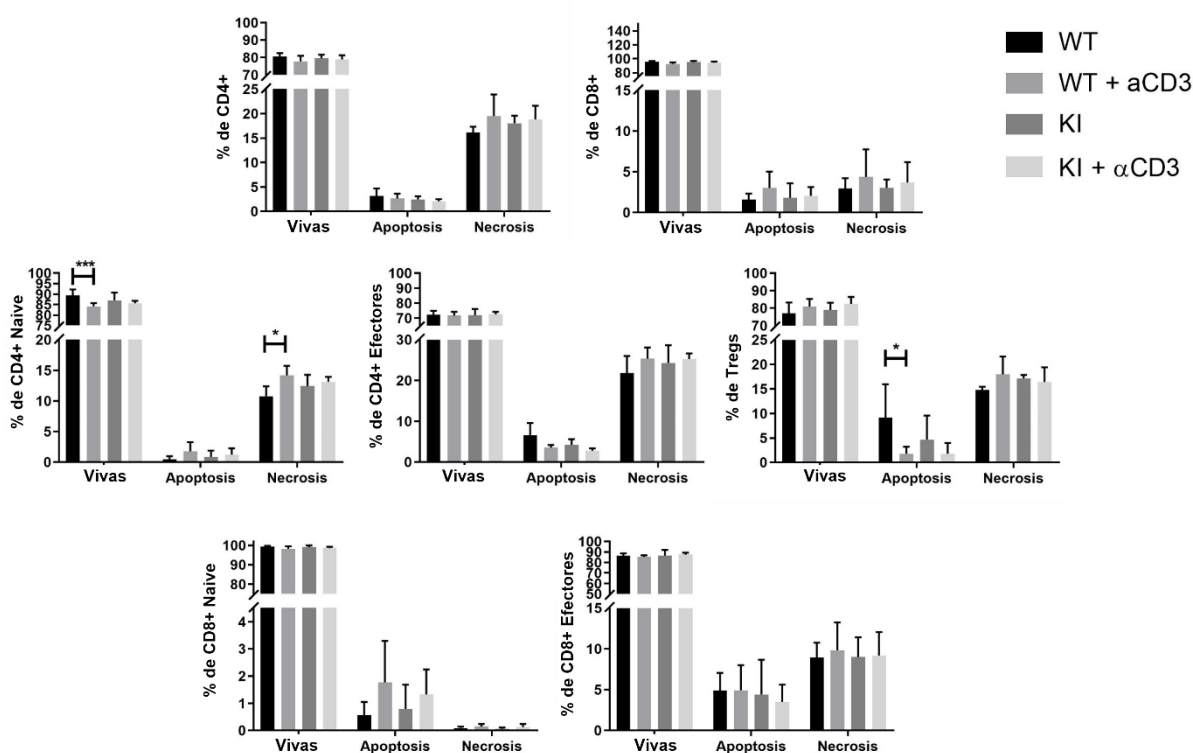


Figura 24: Los linfocitos T provenientes de ratones WT y de ratones CD5 ITIM-KI muestran el mismo patrón de muerte en bazo tras administración de α CD3. Se analizó la tasa (frecuencia) de muerte de los 4 grupos experimentales (WT, WT+ α CD3, KI, KI + α CD3) de las diferentes poblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ y en distintos estadios de diferenciación funcional (naive, efectoras y Tregs) en MLNs. Los tipos de muerte celular de los linfocitos T estudiados fueron apoptosis y necrosis, el primero caracterizado por la marca/tinción positiva de Anexina V, y la segunda por la marca/tinción positiva de 7AAD; mientras que aquellas células dobles negativas a ambos marcadores se clasificaron como células vivas. No se observaron diferencias entre las células

vivas o muertas (apoptosis y necrosis) de las diferentes poblaciones/subpoblaciones entre los 4 grupos experimentales. Se muestra media \pm SD. (n: WT=4; WT+ α CD3=5; KI=5; KI+ α CD3=5). Se muestran los datos de dos experimentos independientes. Anova de dos vías, posthoc Tukey.

Evaluación de la activación y proliferación celular de linfocitos T naive CD4+ tras estimulación con α CD3 y α CD28 *in vitro*.

Como los resultados anteriores indicaron una mayor activación de linfocitos T provenientes de ratones CD5 ITIM-KI, dado por la disminución de linfocitos T naive y aumento de aquellos con un fenotipo efector o activado, se llevó a cabo un modelo de activación *in vitro* a partir de linfocitos T naive, para evaluar una población más homogénea y en condiciones “más controladas” Estos linfocitos T naive son células que no han sido activadas previamente por un antígeno, a pesar de tener un nivel de estimulación basal por contactos constantes con moléculas del MHC cargadas con péptidos propios¹³⁹. De esta manera, al usar esta población de linfocitos T se busca tener un modelo con una respuesta más homogénea donde no interfieran células más sensibles a la activación, como lo pueden ser linfocitos T efectores o de memoria, o los mismos linfocitos T CD8+^{25,27}. Para este modelo, también fue necesario adicionar un coestímulo debido a la ausencia de células presentadoras de antígeno que lo pudiesen proveer (APCs), por lo que los linfocitos T naive CD4+ se estimularon con α CD3 y α CD28.

Se aislaron por sorting celular linfocitos T CD4+ naive de ratones WT y CD5-ITIM con base a la combinación de marcadores CD4+CD25-CD62L+CD44^{-/lo}. Se activaron 3×10^5 linfocitos T naive *in vitro* utilizando α CD3 y α CD28 (1 μ g/mL), para evaluar la expresión de diferentes marcadores de activación CD69, CD44, CD25 y CD5 durante la cinética de activación (0-120 h).

En paralelo, para evaluar la proliferación celular, se evaluó la dilución del colorante CTV durante el tiempo de activación. Al igual que en el algoritmo de análisis utilizado para la evaluación del modelo de activación *in vitro*, se realizó una selección más permisiva con los parámetros de tamaño y complejidad (**figura 25**), ya que estos

parámetros se ven alterados en procesos de activación celular ¹³⁷ o de muerte celular ¹³⁸.

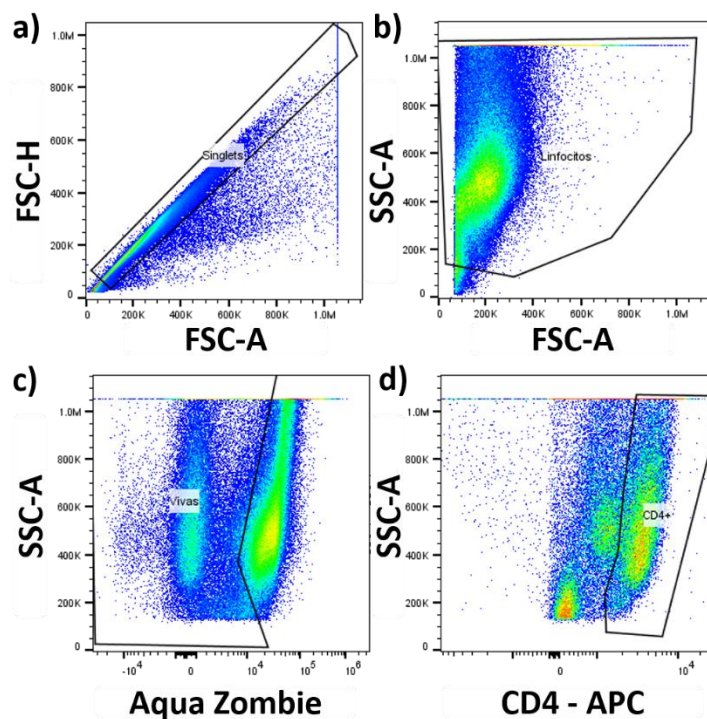


Figura 25: Estrategia para el análisis de marcadores de activación y proliferación de linfocitos T naive CD4+ tras activación *in vitro*. Para el análisis de los marcadores de activación (CD69, CD44, CD25 y CD5), así como la proliferación (CTV) de los linfocitos T CD4 naive (CD4+CD25-CD62L+CD44^{-/lo}). **(a)** Se seleccionan inicialmente los eventos sencillos, posteriormente **(b)** las células correspondientes a los linfocitos utilizando una gráfica de tamaño (FSC) contra complejidad (SSC), **(c)** y aquellas células vivas (AZ-) a través de una selección negativa del marcador de viabilidad Aqua Zombie. **(d)** Se procedió a seleccionar los linfocitos T CD4+, y es importante recalcar que a partir de las 48h, se seleccionó la población de linfocitos con mayor expresión de CD4. Las figuras son representativas de linfocitos T naive CD4 de un ratón WT a las 96 post-estimulación.

Los resultados presentados son preliminares, ya que corresponden únicamente a un experimento independiente con $n = 1$. En la **Figura 26** se muestra la gMFI para los marcadores CD69, CD44, CD25 y CD5. Se encontró que los linfocitos T CD4+ naive del ratón CD5-ITIM se activan menos a tiempos largos, o que la cinética de expresión de estos marcadores disminuye más rápido que aquellos linfocitos T naive CD4 del ratón WT. Esto sucede para los cuatro marcadores de activación evaluados. Dichos resultados contrastan con lo encontrado en el modelo *in vivo*,

que indican que tras la activación con α CD3 (como estímulo del complejo TCR/CD3), existe una mayor activación en el ratón CD5 ITIM-KI.

Esto podría suceder porque se llevó a cabo el análisis mencionado a un tiempo corto (20 h), mientras que este análisis *in vitro* se realizó un seguimiento a través del tiempo de dicha activación, encontrándose esta menor activación a tiempos largos de estímulo (>48 h). Estos experimentos nos podrían ayudar a dilucidar que sucede en la activación de estos ratones transgénicos (CD5 ITIM-KI) a tiempos largos y poder comprender mejor el papel del dominio ITIM de CD5 en estos procesos de activación linfocitaria.

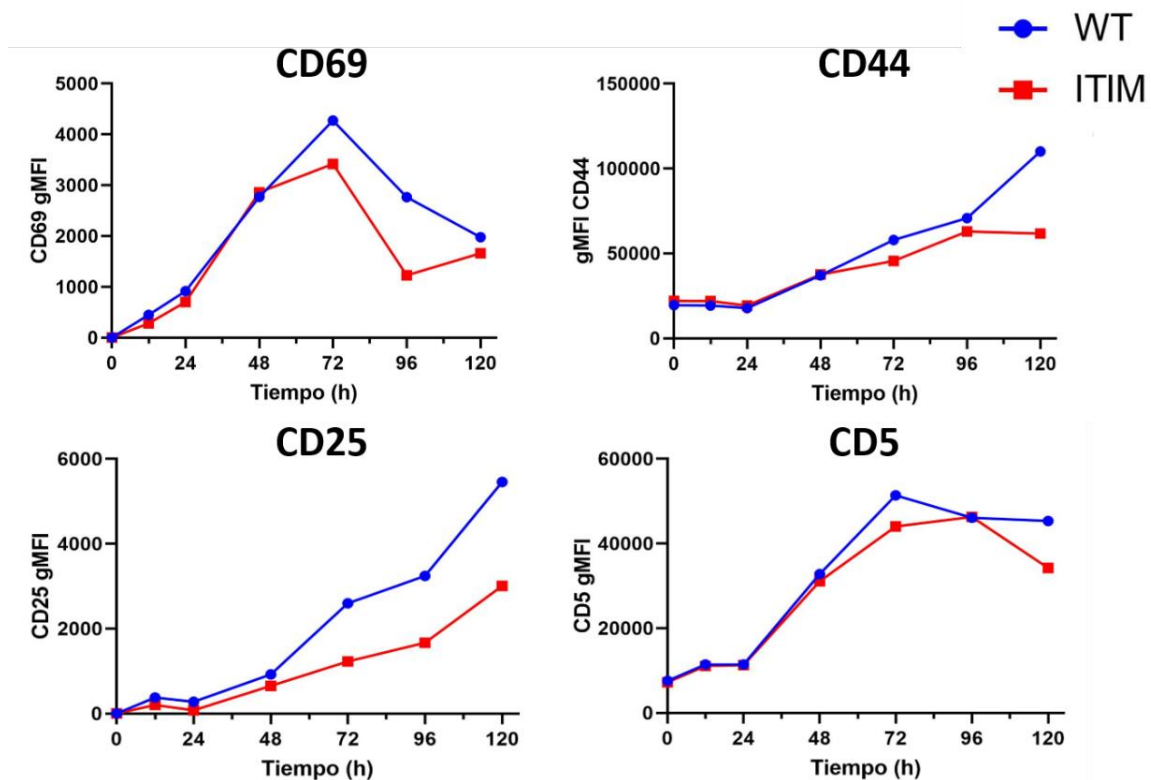


Figura 26: Análisis de la cinética de activación de linfocitos T CD4+ naive del ratón CD5 ITIM-KI y WT. tras activación *in vitro* con α CD3/ α CD28. Los linfocitos T naive (CD4+CD25-CD62L+CD44^{lo}) se estimularon *in vitro* con α CD3/ α CD28 y se evaluó la expresión de marcadores relacionados con la activación linfocitaria (CD69, CD44, CD25 y CD5) a través del tiempo (0, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h). Se halló que a tiempos de activación largos, >48 h, los marcadores de activación de linfocitos T CD4+ naive provenientes de ratones CD5 ITIM-KI disminuyen más rápidamente o no se alcanzan los mismos niveles que aquellos linfocitos T CD4+ naive provenientes de ratones WT. Se muestra la media geométrica de la MFI. n = 1.

Se procedió a analizar la proliferación celular de estos linfocitos T CD4+ naive tras esta estimulación del complejo TCR/CD3 calculando el índice de proliferación, índice de división y frecuencia precursora. Estos parámetros fueron evaluados a partir de las 48 h post estimulación, debido a que a tiempos menores, no se observó proliferación celular por dilución del colorante CTV utilizado. Cabe señalar que este colorante funciona de manera comparable al CFSE, asegurando la medición de 8-10 divisiones celulares ¹⁴⁰.

Al evaluar la proliferación de los linfocitos T CD4+ naive tras el estímulo con α CD3 y α CD28 (**Figura 27**), no se encontraron diferencias entre los linfocitos T CD4+ naive provenientes de ratones WT o CD5 ITIM-KI entre 48 y 96h. Sin embargo, en el último tiempo evaluado (120 h), se observó una menor proliferación en los linfocitos T naive del ratón CD5-ITIM respecto al ratón WT, aunque este dato debe ser considerado como preliminar.

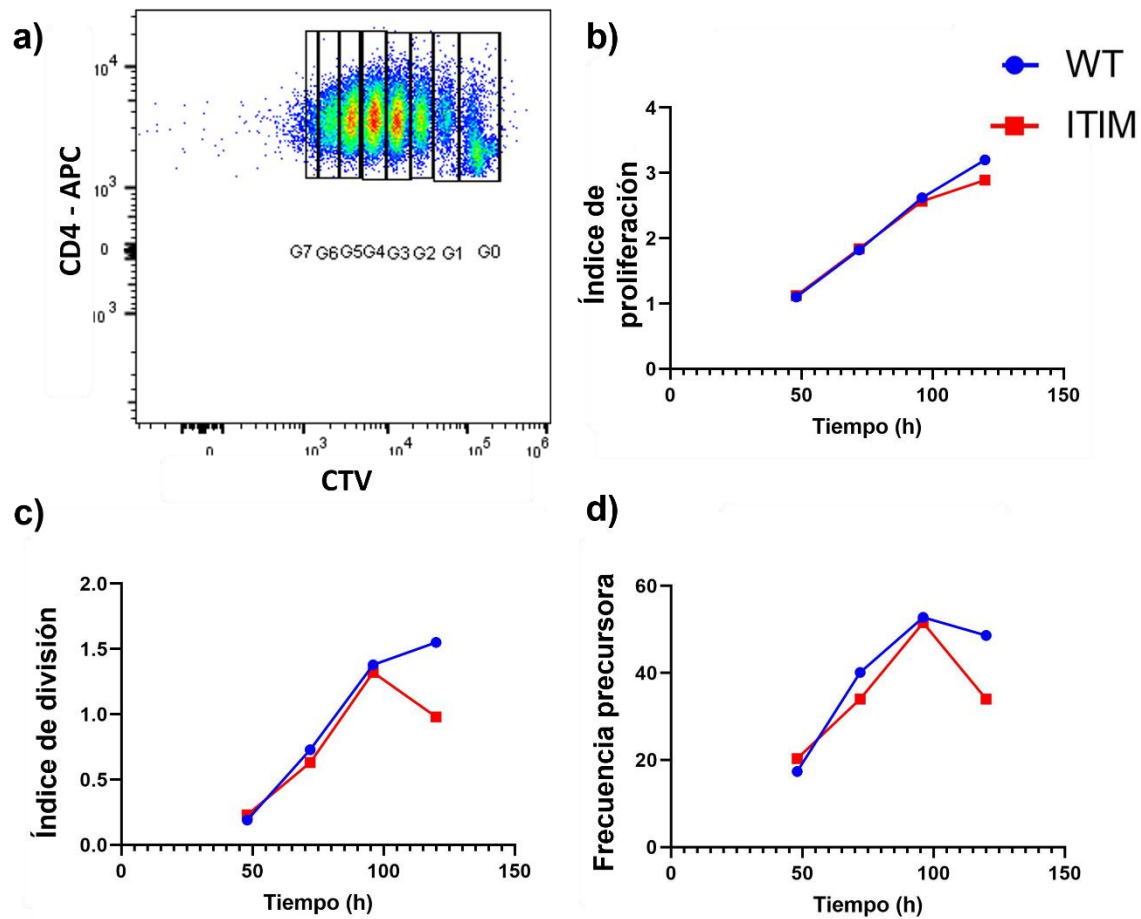


Figura 27: Los linfocitos T CD4+ naive provenientes de ratones CD5 ITIM-KI presentan menor proliferación celular tras 120 h de activación in vitro con α CD3/ α CD28. a) Se midió la proliferación de los linfocitos T CD4+ naive a través del tiempo por la dilución del CTV (*Cell Trace Violet*), se muestra una gráfica de puntos representativa de 7 ciclos de proliferación de un ratón WT a las 96 h. **b-d)** Al realizar los cálculos para analizar los diferentes índices relacionados con proliferación celular (índice de proliferación, índice de división y frecuencia precursora), se observó que aquellos linfocitos T CD4+ naive provenientes del ratón CD5-ITIM presentan menor proliferación a las 120 h de activación, en comparación con los linfocitos T naive CD4+ provenientes del ratón WT. La gráfica representa un experimento independiente (n = 1).

DISCUSIÓN

En este estudio se utiliza por primera vez un modelo *in vivo* dirigido a dilucidar el papel del dominio ITIM de CD5 como regulador negativo de la señal del TCR. El ratón CD5-ITIM es un ratón *knock-in*, ya que a diferencia de ratones *knock-out* donde se elimina el gen completo, en éste se sustituye por recombinación homóloga el DNA original por una secuencia mutada en la cual, las tirosinas dentro del dominio ITIM (Y429-Y441) de CD5 se mutaron por alaninas. Este tipo de modelos murinos permite evaluar la función de un receptor específico, o de una parte de la estructura de un receptor específico, de una manera más fisiológica, ya que el gen mantiene sus elementos transcripcionales reguladores endógenos, lo que evita algunos de los artefactos que pueden derivarse de la expresión transgénica o de la eliminación del gen de interés, como el caso de los modelos *knock-out*.

Se ha postulado a CD5 como un regulador negativo de la señal del TCR, con un papel importante durante la ontogenia del linfocito T, desde su desarrollo en el timo, hasta su activación y diferenciación en célula efectora en los diferentes tejidos periféricos⁶⁵. Como se ha mencionado, CD5 ejerce una modulación de la señal del TCR en linfocitos T periféricos evitando una sobreactivación de éstos tras la estimulación antigénica⁶⁴. Para dilucidar los mecanismos moleculares por los que actúa, se han empezado a estudiar distintos dominios funcionales dentro de la región intracitoplasmática de CD5 que se podrían asociar a estos efectos. Diversos estudios han evaluado el papel del dominio de unión a CK2 (CD5-CK2BD)^{129–132,134}, sin embargo, a la fecha no existe ningún estudio reportado sobre el papel del dominio ITIM *in vivo*.

Algunos trabajos le atribuyen cierta importancia a este dominio, ya que se ha observado que la Y429 (junto con la Y463) es uno de los sitios preferenciales de fosforilación de CD5 tras activación del TCR en células Jurkat^{63,104}. Un trabajo que tuvo un acercamiento indirecto sobre el dominio ITIM encontró que al reconstituir ratones CD5 KO con un transgén que carece de una porción de la cola citoplasmática de CD5 (que ahora sabemos que incluía al dominio ITIM), asemeja

a los efectos de regulación de la señal del TCR observados en ausencia de CD5¹¹⁶. Sin embargo, este modelo no representa lo que podría estar ocurriendo de manera fisiológica ya que este transgén reconstituido se encuentra bajo el control del promotor del gen de CD2. Por eso la importancia de la construcción del ratón utilizado y la relevancia de los hallazgos descritos en este trabajo.

En antecedentes directos del laboratorio, al estudiar timocitos, se encontró que en el ratón CD5 ITIM-KI hay un aumento en la celularidad total del timo, así como de otras poblaciones que indican alteraciones en la selección positiva haciéndola más eficiente (*Manuscrito en preparación [2022]*). Bajo esta premisa, se analizaron las frecuencias y números absolutos de las diferentes poblaciones celulares de linfocitos T en órganos linfoides periféricos (ganglios linfáticos mesentéricos y periféricos, y bazo), pero estas poblaciones no se encontraron afectadas (**Figura 9-11**). Se sabe que no necesariamente lo que sucede en timo se refleja en periferia, ya que se conoce que la alimentación del nicho periférico por parte del timo ocurre bajo un control homeostático de manera que se mantenga un número constante de linfocitos T¹⁴¹ a pesar de que hay un reemplazo continuo y de la salida de más de 1×10^6 timocitos diarios¹⁴².

En los timocitos de estos ratones CD5 ITIM-KI se encontró que hay una expresión de CD5 mayor que su contraparte WT (*Manuscrito en preparación [2022]*). Cuando analizamos los linfocitos T periféricos el hallazgo fue el mismo (**Figura 12-13**). Una posible explicación podría ser que la ausencia de este dominio afecte de alguna forma la interacción con c-Cbl, ya que se sabe que c-Cbl se une a CD5 a través de la unión de Fyn a la región carboxi-terminal de CD5, para su posterior ubiquitinación y degradación^{111,112}, adicionando así otro nivel de regulación. Además, esto podría afectar también la misma regulación por c-Cbl, ya que se sabe que su “unión” a CD5 la posiciona para ubiquitinar otras moléculas asociadas a la señalización del TCR, como lo es *Vav*¹¹², favoreciendo una mayor activación del linfocito T. Por lo tanto, la posible falta de esta “unión” para la posterior degradación de CD5 puede resultar en niveles elevados de CD5 en la superficie de los linfocitos T, aunque la interacción

CD5-Fyn-c-Cbl no sea directamente al dominio ITIM, pero el cambio en la proteína (CD5 ITIM-KI) podría repercutir en esta interacción.

Adicionalmente, se sabe que los niveles de CD5 son establecidos desde la maduración tímica como consecuencia de las interacciones entre TCR:spMHC ¹²¹, y se sabe que altos niveles de CD5 relacionan con interacciones de alta avidéz ¹¹⁶, ayudando así al establecimiento de un umbral de activación necesario para el proceso de selección ⁶⁵. Esto podría sugerir que los niveles incrementados de CD5 permiten la selección de timocitos con alta avidéz, lo cual permitiría regular negativamente las señales del TCR. De esta manera, el dominio ITIM de CD5, al dar lugar a mayores niveles de expresión de CD5 en los linfocitos T, podría estar contribuyendo a la regulación negativa de la señal el TCR, por lo que su ausencia permitiría al linfocito T desencadenar una señal más fuerte y por lo tanto, una mayor activación celular.

Lo anterior nos llevó a la realización de un modelo de activación *in vivo* tras la administración de α CD3, como se ha reportado anteriormente ^{143,144}. Nuestros datos mostraron que el dominio ITIM de CD5 regula la activación del linfocito T, como se mostró en las **figuras 17-21**, donde aquellos ratones con ausencia del dominio ITIM de CD5 administrados con α CD3 muestran una mayor activación respecto a aquellos WT, al observar una disminución de las subpoblaciones naive, pero un incremento en las subpoblaciones efectoras/activadas.

Además se evaluó CD25, un marcador de activación (cadena α del receptor de IL-2), el cuál conforma el receptor de alta afinidad para la IL-2, controlando procesos de sobrevida y expansión clonal ⁵⁵. Se encontró que en la población de linfocitos T CD8+ totales presentes en PLNs, los linfocitos T CD5 ITIM-KI presentaron mayores niveles de expresión de CD25 tras estimulación con α CD3, a comparación de su contraparte WT (**Figura 21**); mientras que para los linfocitos T CD4+ no se encontró este aumento. Posiblemente esto suceda porque se ha encontrado que los linfocitos T CD8+ suelen activarse más rápido que los linfocitos T CD4+, es decir, son más sensibles a la estimulación ¹⁴⁵. Esto sugiere que el dominio ITIM de CD5 regula la

activación del linfocito T, siendo necesaria su presencia para evitar una sobre activación del linfocito T tras estimulación. De manera contraria en el modelo *ex vivo*, la ausencia del ITIM de CD5 parece no afectar la muerte inducida por activación, aunque es necesario hacer más estudios para evaluar su funcionalidad en condiciones homeostáticas.

Cabe mencionar que en estos experimentos de activación *in vivo*, el diseño del panel multiparamétrico utilizado el análisis de citometría de flujo no permitió medir los niveles de expresión de CD5, aunque en la literatura se ha descrito que el entrecruzamiento con α CD3 lleva al aumento de la expresión de CD5^{65,92}. De manera interesante, el análisis de subpoblaciones tímicas ha mostrado que todas las subpoblaciones de timocitos presentan niveles incrementados de CD5 (*Manuscrito en preparación [2022]*), lo que sugiere una mayor señal dada por el TCR durante el proceso de selección tímica. De esta manera se podría esperar que los niveles de CD5 tras la activación antigénica en la periferia también fueran mayores en ratones ITIM que en WT buscando de alguna manera el compensar la ausencia de esta señal de inhibición; sin embargo, no se evaluó y sería interesante a futuro evaluarlo en este modelo si esto ocurre.

Adicionalmente, hay evidencias de que en ratones deficientes de CD5 esta mayor activación se ve reflejada por una hiperfosforilación de proteínas señaladoras¹⁰⁶, por lo que también es necesario evaluar este fenotipo en los linfocitos T deficientes del dominio ITIM de CD5 con el fin de averiguar si este dominio es el que provee (o contribuye en) esta función de regulación de los procesos de fosforilación de proteínas a CD5.

La utilización de α CD3 para estimular directamente el complejo TCR/CD3 ha sido previamente utilizado como modelo de activación *in vivo*^{143,144}. Sin embargo, este modelo de activación a comparación de la activación provocada tras el reconocimiento del péptido específico en moléculas del MHC por el TCR (representando procesos fisiológicos normales), puede que induzca un ensamblaje distinto del receptor o señales diferentes que puedan repercutir en el efecto final

observado ¹³². Por lo tanto, es necesario que más adelante se evalúe esta activación *in vivo* en modelos con TCRs transgénicos (por ejemplo, OT-II) donde se pueda tener un acercamiento más representativo a lo que sucede fisiológicamente.

El modelo utilizado analiza un proceso de activación policlonal, puesto que todos los linfocitos T se activan de manera simultánea e inespecífica. Sin embargo, muchos grupos de investigación, incluido el nuestro, han utilizado modelos de activación *in vivo* en modelos con TCRs transgénicos, como el OT-II, en el que los TCR de los linfocitos T CD4+ son específicos para el péptido de ovoalbúmina ^{133,134}. Esto tiene la ventaja de poder analizar con más detalle una respuesta antígeno específica que podría quedar enmascarada en el desarrollo de una respuesta policlonal. No obstante, debido a que el efecto de CD5 ha mostrado tener un impacto diferencial en la selección tímica dependiendo del TCR utilizado (por ej. P14, OT2, H-Y, etc.) ^{65,116}, sería necesario evaluar distintos TCR con distinta afinidad por sus ligandos respectivos para poder tener un mejor panorama del papel del dominio ITIM en respuestas más específicas en linfocitos T maduros.

Se sabe que los dominios de tirosina en los dominios ITIM en general, al ser fosforilados, crean sitios de anclaje a dominios SH2 contenidos en una gran cantidad de proteínas, entre ellas, distintas fosfatasas ⁷⁷. Por lo tanto, una explicación a esta mayor activación podría recaer sobre la ausencia del dominio ITIM de CD5 que pudiera estar impidiendo la unión o reclutamiento de fosfatasas u otras moléculas necesarias para la regulación negativa de la señalización encendida por el TCR. De manera interesante, Roa y cols. (Roa; et. al. (2022) *Manuscrito en preparación*) reportan datos preliminares que indican una asociación directa de RasGAP con Y441, e indirecta con Y429 y Y463. Sin embargo, aún no hay estudios publicados que demuestren unión específica de alguna proteína a este dominio ITIM en CD5, abriendo las puertas a continuar dilucidando la relevancia de esta secuencia ITIM en CD5.

Así mismo, se ha encontrado que la estimulación *in vivo* de ratones deficientes de CD5 con α -CD3 provoca una sobrestimulación de linfocitos T que sobreexpresan

los marcadores de activación CD25 y CD69 cuyo destino final es la muerte por apoptosis ⁶⁴. También se ha observado que tras activación de linfocitos T, la ausencia de CD5 los hace más susceptibles a sufrir AICD en un modelo de EAE ¹³⁰. Estos trabajos postulan a CD5 como una molécula que regula procesos relacionados con la supervivencia. Aunado a esto, el dominio CD5-CK2BD ha demostrado ser importante para el control de la sobrevida de timocitos ¹³⁴, pero se desconoce si es el único dominio responsable de estas señales de sobrevida en CD5, o si otro dominio, como lo es el dominio ITIM, contribuye a este papel.

En este mismo modelo de ratón CD5 ITIM-KI, se ha encontrado que la ausencia de este dominio conduce a una mayor muerte en timocitos, sugiriendo que si puede estar involucrado en la regulación de procesos de muerte celular durante el desarrollo tímico, los cuáles pueden deberse a una señalización alta o exacerbada del TCR. Por lo tanto, el dominio ITIM de CD5 estaría favoreciendo, de alguna forma, la sobrevida de los timocitos (*Manuscrito en preparación [2022]*).

Esto nos llevó a evaluar la muerte de linfocitos T periféricos tras la activación *in vivo* por administración de α CD3, para evaluar si esta “sobreactivación” llevaría a la muerte inducida por activación (AICD). Nuestros resultados mostraron que los linfocitos T no morían más en ausencia del dominio ITIM de CD5, sin encontrar diferencias en una muerte “basal” en los ratones sin estímulo, ni en aquellos estimulados con α CD3, a comparación de los linfocitos T provenientes de ratones WT. Esto se observó en los tres diferentes órganos linfoides evaluados (**Figura 22-24**), a pesar de haber encontrado previamente una mayor activación de los linfocitos T cuando estos carecían del dominio ITIM de CD5, lo que sugiere que dicho dominio no regula procesos de muerte celular en linfocitos T periféricos, a pesar de haberse encontrado en resultados previos del laboratorio que en timo sí ocurre esta regulación. Esto sucedió en particular en el modelo desarrollado y a los tiempos evaluados, sin embargo, podría estar afectando o controlando otras respuestas funcionales como la producción de citocinas, por ejemplo. Todo esto podría apuntar a que en periferia el dominio más relevante para la regulación de la supervivencia del linfocito T es el dominio de unión a CK2, como se ha descrito anteriormente ¹³¹.

A continuación, se realizó un modelo *in vitro* de activación celular donde se evaluaron diferentes marcadores relacionados con la activación del linfocito T (CD69, CD44, CD25 y CD69), así como la proliferación tras activación. Se sabe que la ausencia de CD5 produce una hiperproliferación celular y se ha comprobado que en este papel de regulación de la proliferación celular que tiene CD5 también se encuentra involucrado el dominio CD5-CK2BD, ya que se ha encontrado que los linfocitos T carentes de este hiperproliferan a tiempos cortos ¹³¹, y, a tiempos largos, hipoproliferan (72 h de estímulo con aCD3) ¹³² e incluso muestran AICD incrementada ¹³¹.

Por lo tanto, puede ser que el dominio ITIM de CD5 además de regular procesos involucrados en la señalización proximal del TCR, pueda también estar regulando procesos de proliferación de los linfocitos T. El objetivo de este modelo *in vitro* fue, principalmente, obtener una respuesta más homogénea utilizando una única población de linfocitos T CD4+ naive sin contaminación de poblaciones efectoras o activadas, o incluso de la misma población de linfocitos T CD8+ ^{25,27}. Además, la utilización de la población naive, la cuál es más dependiente de la coestimulación y es menos sensible a la activación, nos permite monitorear de una mejor manera la cinética de respuesta, ya que los tiempos de respuesta son más largos que aquellos de una población efectora ²⁷. Cabe resaltar que los resultados obtenidos son preliminares pues corresponden únicamente a una n=1.

Se sabe que tras la activación del linfocito T, hay genes que se expresan de manera rápida o inmediata, aquellos que se expresan de manera temprana, y aquellos que se expresan de manera tardía post-activación. Uno de estos es el gen que codifica a la proteína CD69 (glicoproteína 69 kDa), que es conocida como un marcador temprano de activación del linfocito T, expresándose 1-2 h después de estimulación del TCR, y puede permanecer hasta tres días ¹⁴. Otro marcador de gran importancia tras la activación celular es CD5, que se ha reportado que posterior a la activación, se lleva a cabo la síntesis *de novo* de CD5 dependiente de PKC (que es inducida por el estímulo a CD28 ⁴³), encontrándose este incremento desde las 3-6 h con un

pico de máxima expresión de CD5 a las 72 h post-activación ^{90,92}. Estos dos ejemplos de la expresión de marcadores coinciden con lo obtenido en la **Figura 26**, demostrando que el modelo se desarrolló correctamente.

Al realizar el análisis por citometría de flujo, a partir de las 48 h se encontró un alza en la expresión de CD4 en los linfocitos T activados. Esto coincide parcialmente con lo descrito por Wieggers y cols. ³³ que encuentran que tras la estimulación del TCR por un anticuerpo dirigido a CD3 pegado a placa, o algún activador soluble, hay un aumento máximo en la expresión de CD4 entre 72 y 120 h, contrastando con otros estudios que este se puede observar desde las 48 h ³³, ya que en este trabajo se encontró este aumento significativo a partir de las 48 h.

Es importante recalcar que este aumento en la expresión de CD4 coincide con el tiempo donde se observó el primer ciclo de proliferación. Sabemos que para que se desarrolle una respuesta inmune es necesaria una rápida proliferación de los linfocitos específicos para un antígeno, lo que en nuestro modelo se puede “imitar” con el estímulo con α CD3. En el resultado obtenido respecto a los parámetros relacionados a la proliferación celular, se observa un comportamiento similar entre los linfocitos T CD4+ naive provenientes de ratones CD5 ITIM-KI y WT, sin embargo para poder dilucidar con mayor detalle la participación de este dominio en los procesos de proliferación sería necesario hacer una curva ‘dosis-respuesta’ con α CD3, ya que el uso de un estímulo policlonal “óptimo”, podría no permitir distinguir diferencias en el umbral de activación dependientes del ITIM de CD5 como se observó para el dominio CK2-BD ¹³². En efecto, se sabe que los linfocitos T CD4 necesitan alcanzar cierto umbral para activarse y proliferar ¹²⁰, el cual podría estar alterado por la ausencia del dominio ITIM.

Nuestros resultados demuestran que el dominio ITIM de CD5 si es importante en la activación celular, demostrado por el modelo de activación *in vivo*. Además de que los resultados del modelo *ex vivo* sugieren que este dominio puede estar involucrado en la regulación de los niveles de expresión de CD5 en condiciones basales, inclusive desde que se establecen estos niveles en el desarrollo tímico,

cómo se ha demostrado por antecedentes directos del laboratorio. Todo esto tiene su repercusión en la regulación de la señalización del TCR, por lo que es necesario el análisis de proteínas involucradas en esta para poder seguir esclareciendo cómo es que el dominio ITIM de CD5 actúa en el linfocito T.

También sería interesante evaluar el papel del dominio ITIM de CD5 en la población de diferentes subpoblaciones efectoras de linfocitos T CD4+, que pudiera cooperar con el dominio de unión a CK2 o tener una función totalmente diferente. Se podría sugerir que sería importante ya que el CD5-CK2BD ha estado relacionado con la generación de linfocitos Th17 ^{131,146}.

Recientemente, se han dilucidado nuevas funciones en las cuales CD5 está involucrado, como lo es la regulación del estado de señalización basal mediado por NFκB en timocitos y linfocitos. Se encontró que los altos niveles de CD5 en estas células se correlacionan directamente con los niveles del inhibidor IκBα de este factor de transcripción ¹⁴⁷. Por ello, resultaría interesante seguir estudiando cómo CD5 y sus diferentes dominios citoplasmáticos regulan distintos procesos celulares más allá de la señalización del TCR.

Es necesario seguir dilucidando cómo CD5 repercute sobre esta señalización del linfocito T tras activación, ya que aún hay muchas preguntas sin resolver y resulta interesante cómo este dominio de CD5 podría tener grandes repercusiones sobre la función celular del linfocito T.

CONCLUSIONES

- El dominio ITIM de CD5 regula los niveles de expresión de CD5 en condiciones de homeostasis en linfocitos T periféricos.
- La ausencia del dominio ITIM de CD5 no altera las frecuencias ni los números absolutos de las diferentes poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ de órganos linfoides periféricos *ex vivo*.
- Los linfocitos T que carecen del dominio ITIM de CD5 muestran una mayor activación tras la administración de α CD3 que se traduce en la disminución de las subpoblaciones naive y el aumento de las efectoras/activadas, evidenciado por una mayor expresión de CD25 en linfocitos T CD8+.
- El dominio ITIM de CD5 no parece estar involucrado en la supervivencia de linfocitos T periféricos tras la activación en el modelo *in vivo*.

PERSPECTIVAS

- Incrementar el número de experimentos de activación *in vitro* con linfocitos T naive CD4+ periféricos, utilizando α -CD3 y α -CD28 como estímulos. Así como realización de las curvas/cinéticas de los marcadores de activación y el análisis de la proliferación celular.
- Evaluar la señalización río abajo del TCR en linfocitos T periféricos carentes del dominio ITIM de CD5 (Erk, Akt, c-Cbl, ZAP70).
- Incrementar el número de experimentos de activación *in vivo* tras la administración de α -CD3 i.p. con el fin de consolidar el resultado del incremento en la activación en ratones CD5 ITIM-KI. Además de probar esta activación *in vivo* en modelos con un objetivo más fisiológico (modelos de infección, de inflamación, de autoinmunidad, entre otros).

REFERENCIAS

1. Dorfman, J. R., Štefanová, I., Yasutomo, K. & Germain, R. N. CD4⁺ T cell survival is not directly linked to self-MHC-induced TCR signaling. *Nat. Immunol.* **1**, 329–335 (2000).
2. Kim, H.-O. & Cho, J.-H. T Cell's Sense of Self: a Role of Self-Recognition in Shaping Functional Competence of Naïve T Cells. *Immune Netw.* **17**, 201–213 (2017).
3. Lee, M., Mandl, J. N., Germain, R. N. & Yates, A. J. The race for the prize: T-cell trafficking strategies for optimal surveillance. *Blood* **120**, 1432–1438 (2012).
4. Rock, K. L., Reits, E. & Neefjes, J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class I Molecules. *Trends Immunol.* **37**, 724–737 (2016).
5. Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A. & Amigorena, S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 557–569 (2012).
6. Girardi, E. & Zajonc, D. M. Molecular basis of lipid antigen presentation by CD1d and recognition by natural killer T cells. *Immunol. Rev.* **250**, 167–179 (2012).
7. Dustin, M. L. The Immunological Synapse. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 1023–1033 (2014).
8. Gasteiger, G., Ataide, M. & Kastenmüller, W. Lymph node - An organ for T-cell activation and pathogen defense. *Immunol. Rev.* **271**, 200–220 (2016).
9. Bousso, P. T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: Lessons from the movies. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 675–684 (2008).
10. Bellomo, A., Gentek, R., Bajénoff, M. & Baratin, M. Lymph node macrophages: Scavengers, immune sentinels and trophic effectors. *Cell. Immunol.* **330**, 168–174 (2018).
11. Grabowska, J., Lopez-Venegas, M. A., Affandi, A. J. & den Haan, J. M. M. CD169⁺ Macrophages Capture and Dendritic Cells Instruct: The Interplay of the Gatekeeper and the General of the Immune System. *Front. Immunol.* **9**, 1–14 (2018).
12. Masopust, D. & Schenkel, J. M. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 309–320 (2013).
13. Mandl, J. N. *et al.* Quantification of lymph node transit times reveals differences in antigen surveillance strategies of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 18036–18041 (2012).
14. Ziegler, S. F., Ramsdell, F. & Alderson, M. R. The activation antigen CD69. *Stem Cells* **12**, 456–465 (1994).
15. Cibrián, D. & Sánchez-Madrid, F. CD69: from activation marker to metabolic

- gatekeeper. *Eur. J. Immunol.* **47**, 946–953 (2017).
16. Jennrich, S., Ratsch, B. A., Hamann, A. & Syrbe, U. Long-Term Commitment to Inflammation-Seeking Homing in CD4+ Effector Cells. *J. Immunol.* **178**, 8073–8080 (2007).
 17. Ley, K. The role of selectins in inflammation and disease. *TRENDS Mol. Med.* **9**, 263–268 (2003).
 18. Walling, B. L. & Kim, M. LFA-1 in T Cell Migration and Differentiation. *Front. Immunol.* **9**, 1–10 (2018).
 19. Boyman, O., Létourneau, S., Krieg, C. & Sprent, J. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur. J. Immunol.* **39**, 2088–2094 (2009).
 20. Schumann, J., Stanko, K., Schliesser, U., Appelt, C. & Sawitzki, B. Differences in CD44 surface expression levels and function discriminates IL-17 and IFN- γ producing helper T cells. *PLoS One* **10**, 1–18 (2015).
 21. Graham, V. A., Marzo, A. L. & Tough, D. F. A role for CD44 in T cell development and function during direct competition between CD44+ and CD44- cells. *Eur. J. Immunol.* **37**, 925–934 (2007).
 22. Baaten, B. J. G. *et al.* CD44 Regulates Survival and Memory Development in Th1 Cells. *Immunity* **32**, 104–115 (2010).
 23. Gasper, D. J., Tejera, M. M. & Suresh, M. CD4 T-Cell Memory Generation and Maintenance. *Crit. Rev. Immunol.* **34**, 121–146 (2014).
 24. Appay, V., Van Lier, R. A. W., Sallusto, F. & Roederer, M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cytom. Part A* **73**, 975–983 (2008).
 25. Heinzl, S., Marchingo, J. M., Horton, M. B. & Hodgkin, P. D. The regulation of lymphocyte activation and proliferation. *Curr. Opin. Immunol.* **51**, 32–38 (2018).
 26. Courtney, A. H., Lo, W. L. & Weiss, A. TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation. *Trends Biochem. Sci.* **43**, 108–123 (2017).
 27. Kimachi, K., Sugie, K. & Grey, H. M. Effector T cells have a lower ligand affinity threshold for activation than naive T cells. *Int. Immunol.* **15**, 885–892 (2003).
 28. Kimachi, K., Croft, M. & Grey, H. M. The minimal number of antigen-major histocompatibility complex class II complexes required for activation of naive and primed T cells. *Eur. J. Immunol.* **27**, 3310–3317 (1997).
 29. Cho, Y. *et al.* TCR Signal Quality Modulates Fate Decisions of Single CD4+ T Cells in a Probabilistic Manner. *Cell Rep.* **20**, 806–818 (2017).
 30. Lo, W. L. *et al.* Lck promotes Zap70-dependent LAT phosphorylation by bridging Zap70 to LAT. *Nat. Immunol.* **19**, 733–741 (2018).

31. Apostolopoulos, V., Yuriev, E., Lazoura, E., Yu, M. & Ramsland, P. A. MHC and MHC-like molecules: Structural perspectives on the design of molecular vaccines. *Hum. Vaccin.* **4**, 400–409 (2008).
32. Claeys, E. & Vermeire, K. The CD4 Receptor: An Indispensable Protein in T Cell Activation and A Promising Target for Immunosuppression. *Arch Microbiol Immunol.* **3**, 133–150 (2019).
33. Wieggers, G. J., Stec, I. E. M., Klinkert, W. E. F. & Reul, J. M. H. M. Glucocorticoids Regulate TCR-Induced Elevation of CD4: Functional Implications. *J. Immunol.* **164**, 6213–6220 (2000).
34. Zamoyska, R. Why Is There so Much CD45 on T Cells? *Immunity* **27**, 421–423 (2007).
35. Bergman, M. *et al.* The human p50csk tyrosine kinase phosphorylates p56lck at Tyr-505 and down regulates its catalytic activity. *EMBO J.* **11**, 2919–2924 (1992).
36. Li, M. O. & Rudensky, A. Y. T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 220–233 (2016).
37. Katz, Z. B., Novotná, L., Blount, A. & Lillemeier, B. F. A cycle of Zap70 kinase activation and release from the TCR amplifies and disperses antigenic stimuli. *Nat. Immunol.* **18**, 86–95 (2016).
38. Balagopalan, L., Coussens, N. P., Sherman, E., Samelson, L. E. & Sommers, C. L. The LAT Story: A Tale of Cooperativity, Coordination, and Choreography. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, 1–21 (2010).
39. Rudd, C. E. & Schneider, H. Lymphocyte signaling: Cbl sets the threshold for autoimmunity. *Curr. Biol.* **10**, 344–347 (2000).
40. Huang, F. & Gu, H. Negative regulation of lymphocyte development and function by the Cbl family of proteins. *Immunol. Rev.* **224**, 229–238 (2008).
41. Yasuda, T. & Kurosaki, T. Regulation of lymphocyte fate by Ras/ERK signals. *Cell Cycle* **7**, 3634–3640 (2008).
42. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 227–242 (2013).
43. Hünig, T., Beyersdorf, N. & Kerkau, T. CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *ImmunoTargets Ther.* **4**, 111–122 (2015).
44. Laufer, J. M., Kindinger, I., Artinger, M., Pauli, A. & Legler, D. F. CCR7 Is Recruited to the Immunological Synapse, Acts as Co-stimulatory Molecule and Drives LFA-1 Clustering for Efficient T Cell Adhesion Through ZAP70. *Front. Immunol.* **10**, 1–15 (2019).
45. Bunnell, S. C. *et al.* T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *J. Cell Biol.* **158**, 1263–1275 (2002).

46. Yokosuka, T. *et al.* Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat. Immunol.* **6**, 1253–1262 (2005).
47. Mastrogiovanni, M., Juzans, M., Alcover, A. & Di Bartolo, V. Coordinating Cytoskeleton and Molecular Traffic in T Cell Migration, Activation, and Effector Functions. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 1–30 (2020).
48. Billadeau, D. D., Nolz, J. C. & Gomez, T. S. Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 131–143 (2007).
49. Alarcón, B., Mestre, D. & Martínez-Martín, N. The immunological synapse: A cause or consequence of T-cell receptor triggering? *Immunology* **133**, 420–425 (2011).
50. Monks, C. R. F., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N. & Kupfer, A. Three dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**, 82–86 (1998).
51. Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T. & Dustin, M. L. T Cell Receptor-Proximal Signals Are Sustained in Peripheral Microclusters and Terminated in the Central Supramolecular Activation Cluster. *Immunity* **25**, 117–127 (2006).
52. Lee, K. *et al.* T Cell Receptor Signaling Precedes Immunological Synapse Formation. *Science (80-.)*. **295**, (2002).
53. Johnson, K. G., LeRoy, F. G., Borysiewicz, L. K. & Matthews, R. J. TCR signaling thresholds regulating T cell development and activation are dependent upon SHP-1. *J. Immunol.* **162**, 3802–3813 (1999).
54. Appleman, L. J., Berezovskaya, A., Grass, I. & Boussiotis, V. A. CD28 Costimulation Mediates T Cell Expansion Via IL-2-Independent and IL-2-Dependent Regulation of Cell Cycle Progression. *J. Immunol.* **164**, 144–151 (2000).
55. Shatrova, A. N. *et al.* Time-dependent regulation of IL-2R α -chain (CD25) expression by TCR signal strength and IL-2-induced STAT5 signaling in activated human blood T lymphocytes. *PLoS One* **11**, 1–19 (2016).
56. Smith, K. A. Interleukin-2: Inception, Impact, and Implications. *Science (80-.)*. **240**, 1169–1176 (1988).
57. Brennan, P. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F. *Immunity* **7**, 679–689 (1997).
58. Colombetti, S., Basso, V., Mueller, D. L. & Mondino, A. Prolonged TCR/CD28 Engagement Drives IL-2-Independent T Cell Clonal Expansion through Signaling Mediated by the Mammalian Target of Rapamycin. *J. Immunol.* **176**, 2730–2738 (2006).
59. Lin, J. T. *et al.* Naive CD4 T Cell Proliferation Is Controlled by Mammalian Target of Rapamycin Regulation of GRAIL Expression. *J. Immunol.* **182**,

- 5919–5928 (2009).
60. Shapiro, M. J. *et al.* An Essential Role for the Transcription Factor Runx1 in T Cell Maturation. *Sci. Rep.* **6**, 1–15 (2016).
 61. Egawa, T. & Littman, D. R. ThPOK acts late in specification of the helper T cell lineage and suppresses Runx-mediated commitment to the cytotoxic T cell lineage. *Nat. Immunol.* **9**, 1131–1139 (2008).
 62. Luo, C. T. *et al.* Ets transcription factor GABP controls T cell homeostasis and immunity. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
 63. Dennehy, K. M. *et al.* Determination of the tyrosine phosphorylation sites in the T cell transmembrane glycoprotein CD5. *Int. Immunol.* **13**, 149–156 (2001).
 64. Raman, C. CD5, an important regulator of lymphocyte selection and immune tolerance. *Immunol. Res.* **26**, 255–263 (2002).
 65. Azzam, H. *et al.* CD5 Expression is Developmentally Regulated by T Cell Receptor (TCR) Signals and TCR Avidity. *J. Exp. Med.* **188**, 2301–2311 (1998).
 66. Dalloul, A. CD5: A safeguard against autoimmunity and a shield for cancer cells. *Autoimmun. Rev.* **8**, 349–353 (2009).
 67. Lozano, F. *et al.* CD5 Signal Transduction: Positive or Negative Modulation of Antigen Receptor Signaling. *Crit. Rev. Immunol.* **20**, 12 (2000).
 68. Davies, A. A., Ley, S. C. & Crumpton, M. J. CD5 is phosphorylated on tyrosine after stimulation of the T-cell antigen receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 6368–6372 (1992).
 69. Wood, G. S. & Freudenthal, P. S. CD5 Monoclonal Antibodies React with Human Peripheral Blood Dendritic Cells. *Am. J. Pathol.* **141**, 789–795 (1992).
 70. Li, H. *et al.* CD5 on dendritic cells regulates CD4 + and CD8 + T cell activation and induction of immune responses. *PLoS One* **14**, 1–19 (2019).
 71. Soldevila, G., Raman, C. & Lozano, F. The immunomodulatory properties of the CD5 lymphocyte receptor in health and disease. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 310–318 (2011).
 72. Resnick, D., Pearson, A. & Krieger, M. The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 5–8 (1994).
 73. Vera, J. *et al.* The CD5 ectodomain interacts with conserved fungal cell wall components and protects from zymosan-induced septic shock-like syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 1506–1511 (2009).
 74. Mier-Aguilar, C. A. *et al.* Functional requirement of tyrosine residue 429 within CD5 cytoplasmic domain for regulation of T cell activation and survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **466**, 381–387 (2015).

75. Consuegra-Fernandez, M. *et al.* CD5 as a Target for Immune-Based Therapies. *Crit. Rev. Immunol.* **35**, 85–115 (2015).
76. H., J. N. *et al.* Isolation of complementary DNA clones encoding human lymphocyte glycoprotein T1/Leu-1. *Nature* **323**, 346–349 (1986).
77. Bamberger, M. *et al.* A New Pathway of CD5 Glycoprotein-mediated T Cell Inhibition Dependent on Inhibitory Phosphorylation of Fyn Kinase. *J. Biol. Chem.* **286**, 30324–30336 (2011).
78. Van de Velde, H., von Hoegen, I., Luo, W., Parnes, J. R. & Thielemans, K. The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5. *Lett. to Nat.* **351**, 662–664 (1991).
79. Zheng, M. *et al.* Interaction of CD5 and CD72 is involved in regulatory T and B cell homeostasis. *Immunol. Invest.* **43**, 705–716 (2014).
80. Brown, M. H. & Lacey, E. A Ligand for CD5 Is CD5. *J. Immunol.* **185**, 6068–6074 (2010).
81. Mourglia-Ettlin, G. *et al.* The ectodomains of the lymphocyte scavenger receptors CD5 and CD6 interact with tegumental antigens from *Echinococcus granulosus sensu lato* and protect mice against secondary cystic echinococcosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, 1–24 (2018).
82. Sarhan, M. A., Pham, T. N. Q., Chen, A. Y. & Michalak, T. I. Hepatitis C Virus Infection of Human T Lymphocytes Is Mediated by CD5. *J. Virol.* **86**, 3723–3735 (2012).
83. Calvo, J. *et al.* Identification of a natural soluble form of human CD5. *Tissue Antigens* **54**, 128–137 (1999).
84. Calvo, J., Solé, J., Simarro, M., Vives, J. & Lozano, F. Evolutionarily conserved transcription regulatory elements within the 5'-flanking region of the human CD5 gene. *Tissue Antigens* **47**, 257–261 (1996).
85. Arman, M. *et al.* Transcriptional Regulation of Human CD5: Important Role of Ets Transcription Factors in CD5 Expression in T Cells. *J. Immunol.* **172**, 7519–7529 (2004).
86. Tung, J. W., Kunnavatana, S. S., Herzenberg, L. A. & Herzenberg, L. A. The regulation of CD5 expression in murine T cells. *BMC Mol. Biol.* **2**, (2001).
87. Yang, Y. *et al.* The E47 transcription factor negatively regulates CD5 expression during thymocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 3898–3902 (2004).
88. Jones, A. *et al.* Immunomodulatory Functions of BTLA and HVEM Govern Induction of Extrathymic Regulatory T Cells and Tolerance by Dendritic Cells. *Immunity* **45**, 1066–1077 (2016).
89. Ying-zl, C., Rabin, E. & Wortis, H. H. Treatment of murine CD5- B cells with anti-Ig, but not LPS, induces surface CD5: Two B-cell activation pathways. *Int. Immunol.* **3**, 467–476 (1991).

90. Carrera, A. C. *et al.* Activators of Protein Kinase C Up-regulate the Cell Surface Expression of CD2 and CD5 T Cell Glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **264**, 15650–15655 (1989).
91. Black, A. R. & Black, J. D. Protein kinase C signaling and cell cycle regulation. *Front. Immunol.* **3**, 1–17 (2013).
92. Lozano, F., Alberola-Ila, J., Places, L., Gallart, T. & Vives, J. Protein kinase C-dependent up-regulation of CD5 surface expression on normal and lymphoblastoid T cells. *Immunology* **70**, 434–439 (1990).
93. Burgueño-Bucio, E., Mier-Aguilar, C. A. & Soldevila, G. The multiple faces of CD5. *J. Leukoc. Biol.* 1–14 (2019). doi:10.1002/JLB.MR0618-226R
94. Dennehy, K. M., Broszeit, R., Ferris, W. F. & Beyers, A. D. Thymocyte activation induces the association of the proto-oncoprotein c-cbl and ras GTPase-activating protein with CD5. *Eur. J. Immunol.* **28**, 1617–1625 (1998).
95. Billadeau, D. D. & Leibson, P. J. ITAMs versus ITIMs: Striking a balance during cell regulation. *J. Clin. Invest.* **109**, 161–168 (2002).
96. Beyers, A. D., Spruyt, L. L. & Williams, A. F. Molecular associations between the T-lymphocyte antigen receptor complex and the surface antigens CD2, CD4, or CD8 and CD5. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 2945–2949 (1992).
97. Burgess, K. E., Yamamoto, M., Prasad, K. V. S. & Rudd, C. E. CD5 acts as a tyrosine kinase substrate within a receptor complex comprising T-cell receptor ζ chain/CD3 and protein-tyrosine kinases p56lck and p59fyn. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 9311–9315 (1992).
98. June, C. H., Rabinovitch, P. S. & Ledbetter, J. A. CD5 antibodies increase intracellular ionized calcium concentration in T cells. *J. Immunol.* **138**, 2782–2792 (1987).
99. Simarro, M. *et al.* The cytoplasmic domain of CD5 mediates both TCR/CD3-dependent and -independent diacylglycerol production. *J. Immunol.* **159**, 4307–4315 (1997).
100. Alberola-Ila, J., Plaves, L., Cantrell, D. A. & Lozano, F. Intracellular events involved in CD5-induced human T cell activation and proliferation. *J. Immunol.* **148**, 1287–1293 (1992).
101. Ceuppens, J. L. & Baroja, M. L. Monoclonal antibodies to the CD5 antigen can provide the necessary second signal for activation of isolated resting T cells by solid-phase-bound OKT3. *J. Immunol.* **137**, 1816–1821 (1986).
102. Verwilghen, J. *et al.* Simultaneous ligation of CD5 and CD28 on resting T lymphocytes induces T cell activation in the absence of T cell receptor/CD3 occupancy. *J. Immunol.* **150**, 835–846 (1993).
103. Gringhuis, S. I., Leij, L. F. M. H. De, Wayman, G. A., Tokumitsu, H. & Vellenga, E. The Ca²⁺/Calmodulin-dependent Kinase Type IV Is Involved in the CD5-mediated Signaling Pathway in Human T Lymphocytes. *J. Biol.*

- Chem.* **272**, 31809–31820 (1997).
104. Vilà, J. M. *et al.* Residues Y429 and Y463 of the human CD5 are targeted by protein tyrosine kinases. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1191–1198 (2001).
 105. Gringhuis, S. I., De Leij, L. F. M. H., Coffey, P. J. & Vellenga, E. Signaling through CD5 Activates a Pathway Involving Phosphatidylinositol 3-Kinase, Vav, and Rac1 in Human Mature T Lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1725–1735 (1998).
 106. Gary-Gouy, H., Lang, V., Sarun, S., Boumsell, L. & Bismuth, G. In vivo association of CD5 with tyrosine-phosphorylated ZAP-70 and p21 phospho-zeta molecules in human CD3+ thymocytes. *J. Immunol.* **159**, 3739–3747 (1997).
 107. Raab, M., Yamamoto, M. & Rudd, C. E. The T-Cell Antigen CD5 Acts as a Receptor and Substrate for the Protein-Tyrosine Kinase p56^{lck}. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2862–2870 (1994).
 108. Pani, G., Fischer, K. D., Mlinaric-Rascan, I. & Siminovitch, K. A. Signaling capacity of the T cell antigen receptor is negatively regulated by the PTP1C tyrosine phosphatase. *J. Exp. Med.* **184**, 839–52 (1996).
 109. Perez-Villar, J. J. *et al.* CD5 Negatively Regulates the T-Cell Antigen Receptor Signal Transduction Pathway: Involvement of SH2-Containing Phosphotyrosine Phosphatase SHP-1. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2903–2912 (1999).
 110. Dong, B. *et al.* CD5-mediated inhibition of TCR signaling proceeds normally in the absence of SHP-1. *Int. J. Mol. Med.* **38**, 45–56 (2016).
 111. Demydenko, D. c-Cbl mediated ubiquitylation and regulation of cell surface exposure of CD5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **392**, 500–504 (2010).
 112. Roa, N. S. *et al.* The carboxy-terminal region of CD5 is required for c-CBL mediated TCR signaling downmodulation in thymocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **432**, 52–59 (2013).
 113. Voisinne, G. *et al.* Co-recruitment analysis of the CBL and CBLB signalosomes in primary T cells identifies CD5 as a key regulator of TCR-induced ubiquitylation. *Mol. Syst. Biol.* **12**, 1–17 (2016).
 114. Freitas, C., Johnson, D. & Weber, K. T Cell Calcium Signaling Regulation by the Co-Receptor CD5. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1295 (2018).
 115. Brossard, C., Semichon, M., Trautmann, A. & Bismuth, G. CD5 Inhibits Signaling at the Immunological Synapse Without Impairing Its Formation. *J. Immunol.* **170**, 4623–4629 (2003).
 116. Azzam, H. S. *et al.* Fine Tuning of TCR Signaling by CD5. *J. Immunol.* **166**, 5464–5472 (2001).
 117. Tarakhovsky, A. *et al.* A Role for CD5 in TCR-Mediated Signal Transduction and Thymocyte Selection. *Science (80-.).* **269**, 535–537 (1995).

118. Ordoñez-Rueda, D. *et al.* Increased numbers of thymic and peripheral CD4+CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling. *Eur. J. Immunol.* **39**, 2233–2247 (2009).
119. Kassiotis, G., Zamoyska, R. & Stockinger, B. Involvement of Avidity for Major Histocompatibility Complex in Homeostasis of Naive and Memory T Cells. *J. Exp. Med.* **197**, 1007–1016 (2003).
120. Zinzow-Kramer, W. M., Weiss, A. & Au-Yeung, B. B. Adaptation by naïve CD4+ T cells to self-antigen–dependent TCR signaling induces functional heterogeneity and tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 15160–15169 (2019).
121. Smith, K. *et al.* Sensory adaptation in naive peripheral CD4 T cells. *J. Exp. Med.* **194**, 1253–1261 (2001).
122. Weber, K. S. *et al.* Distinct CD4 + helper T cells involved in primary and secondary responses to infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 9511–9516 (2012).
123. Milam, A. V. & Allen, P. M. Functional heterogeneity in CD4+ T cell responses against a bacterial pathogen. *Front. Immunol.* **6**, 1–6 (2015).
124. Freitas, C. M. T., Hamblin, G. J., Raymond, C. M. & Weber, K. S. Naïve helper T cells with high CD5 expression have increased calcium signaling. *PLoS One* **12**, 1–16 (2017).
125. Sood, A. *et al.* Differential interferon-gamma production potential among naive CD4+ T cells exists prior to antigen encounter. *Immunol. Cell Biol.* 1–10 (2019). doi:10.1111/imcb.12287
126. Stamou, P. *et al.* Chronic Exposure to Low Levels of Antigen in the Periphery Causes Reversible Functional Impairment Correlating with Changes in CD5 Levels in Monoclonal CD8 T Cells. *J. Immunol.* **171**, 1278–1284 (2014).
127. Jones, A., Gross, C., Opejin, A., Hawiger, D. & Henderson, J. G. CD5 Instructs Extrathymic Regulatory T Cell Development in Response to Self and Tolerizing Antigens. *Immunity* **42**, 471–483 (2015).
128. Alotaibi, F. *et al.* CD5 blockade enhances ex vivo CD8+ T cell activation and tumour cell cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* **50**, 695–704 (2020).
129. Calvo, J. *et al.* Human CD5 Signaling and Constitutive Phosphorylation of C-Terminal Serine Residues by Casein Kinase II. *J. Immunol.* **161**, 6022–6029 (1998).
130. Raman, C. & Kimberly, R. P. Cutting Edge: Differential CD5-Dependent Regulation of CD5-Associated CK2 Activity in Mature and Immature T Cells: Implication on TCR/CD3-Mediated Activation. *J. Immunol.* **161**, 5817–5820 (1998).
131. Axtell, R. C., Xu, L., Barnum, S. R. & Raman, C. CD5-CK2 Binding/Activation-Deficient Mice Are Resistant to Experimental Autoimmune

- Encephalomyelitis: Protection Is Associated with Diminished Populations of IL-17-Expressing T Cells in the Central Nervous System. *J. Immunol.* **177**, 8542–8549 (2006).
132. Sestero, C. M. *et al.* CD5-Dependent CK2 Activation Pathway Regulates Threshold for T Cell Anergy. *J. Immunol.* **189**, 2918–2930 (2012).
 133. McGuire, D. J. *et al.* CD5 enhances Th17-cell differentiation by regulating IFN- γ response and ROR γ t localization. *Eur. J. Immunol.* **44**, 1137–1142 (2014).
 134. Mier-Aguilar, C. A., Cashman, K. S., Raman, C. & Soldevila, G. CD5-CK2 signaling modulates ERK activation and thymocyte survival. *PLoS One* **11**, 1–19 (2016).
 135. Gary-Gouy, H., Harriague, J., Dalloul, A., Donnadieu, E. & Bismuth, G. CD5-Negative Regulation of B Cell Receptor Signaling Pathways Originates from Tyrosine Residue Y429 Outside an Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif. *J. Immunol.* **168**, 232–239 (2002).
 136. Haribhai, D. *et al.* Regulatory T Cells Dynamically Control the Primary Immune Response to Foreign Antigen. *J. Immunol.* **178**, 2961–2972 (2007).
 137. Iritani, B. M. *et al.* Modulation of T-lymphocyte development, growth and cell size by the Myc antagonist and transcriptional repressor Mad1. *EMBO J.* **21**, 4820–4830 (2002).
 138. Chrest, F. J., Buchholz, M. A., Kim, Y. H., Kwon, T. -K & Nordin, A. A. Identification and quantitation of apoptotic cells following anti-CD3 activation of murine G0 T cells. *Cytometry* **14**, 883–890 (1993).
 139. Persaud, S. P., Parker, C. R., Lo, W., Weber, K. S. & Allen, P. M. Intrinsic CD4+ T cell sensitivity and response to a pathogen are set and sustained by avidity for thymic and peripheral complexes of self peptide and MHC. *Nat. Immunol.* **15**, 266–274 (2014).
 140. Quah, B. J. C. & Parish, C. R. New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes. *J. Immunol. Methods* **379**, 1–14 (2012).
 141. Tanchot, C. & Rocha, B. Peripheral selection of T cell repertoires: The role of continuous thymus output. *J. Exp. Med.* **186**, 1099–1106 (1997).
 142. Houston, E. G. J., Higdon, L. E. & Fink, P. J. Recent thymic emigrants are preferentially incorporated only into the depleted T-cell pool. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 5366–5371 (2011).
 143. Hirschi, R., Gress, R. E., Pluznik, D. H., Eckhaus, M. & Bluestone, J. A. Effects of in vivo administration of anti-CD3 monoclonal antibody on T cell function in mice. II. In vivo activation of T cells. *J. Immunol.* **142**, 737–743 (1989).
 144. Neuman, C. M., Oughton, J. A. & Kerkvliet, N. I. Anti-CD3-Induced T-Cell

Activation In vivo -- I. Flow Cytometric Analysis of Dose-Responsive, Time-Dependent, and Cyclosporin A-Sensitive Parameters of CD4+ and CD8+ Cells From the Draining Lymph Nodes of C57BL/6 Mice. *Int. J. Immunopharmac.* **14**, 1295–1304 (1992).

145. Seder, R. A. & Ahmed, R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat. Immunol.* **4**, 835–842 (2003).
146. de Wit, J. *et al.* CD5 costimulation induces stable Th17 development by promoting IL-23R expression and sustained STAT3 activation. *Blood* **118**, 6107–6114 (2011).
147. Matson, C. A. *et al.* CD5 dynamically calibrates basal NF- κ B signaling in T cells during thymic development and peripheral activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 14342–14353 (2020).

ANEXO I

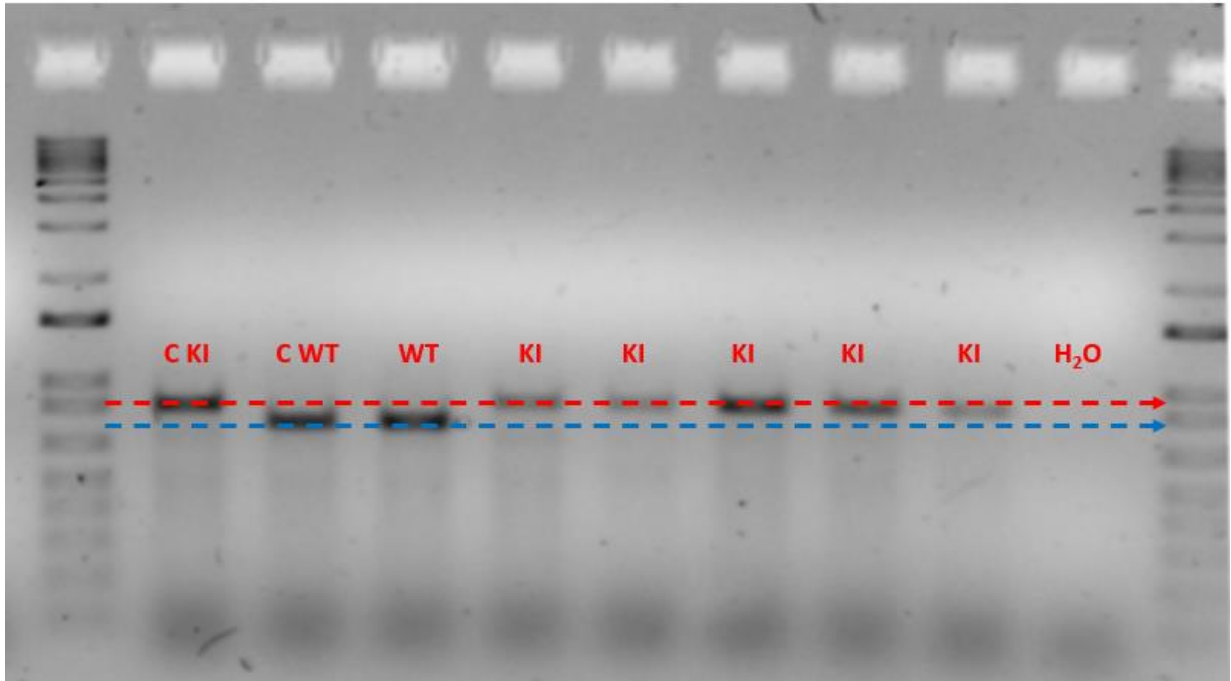


Figura 28: Tipaje para el gen de CD5 en el ratón CD5 ITIM-KI FoxP3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del DNA (imagen representativa) obtenido de 6 ratones. En la primera y última banda se muestran los controles de peso molecular. Se muestra en la línea azul las bandas correspondientes a los amplificadores CD5 WT, mientras que en la línea roja las bandas correspondientes a los amplificadores CD5 ITIM-KI. En el segundo y tercer carril se muestran los controles KI y WT, respectivamente. En el penúltimo carril (10), se muestra un control con H₂O.

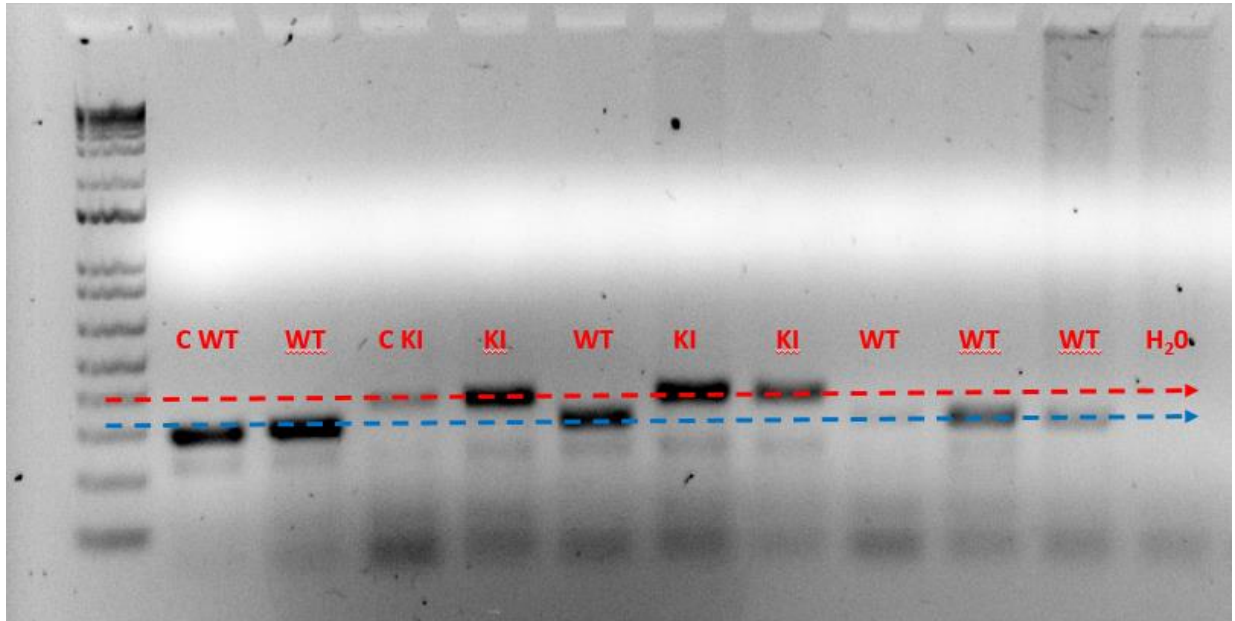


Figura 29: Tipaje para el gen de FoxP3-eGFP en el ratón CD5 ITIM-KI FoxP3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del DNA (imagen representativa) obtenido de 8 ratones. En la primera se muestra el control de peso molecular. Se muestra en la línea azul las bandas correspondientes a los amplificados FoxP3-eGFP WT, mientras que en la línea roja las bandas correspondientes a los amplificados FoxP3-eGFP KI. En el segundo y cuarto carril se muestran los controles WT y KI, respectivamente. En el penúltimo carril (11), se muestra un control con H₂O.