



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

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA FORSKOLINA SOBRE LA
ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LOS LINFOCITOS B Y T.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

MARLEN CRUZ MARIN

CDMX

2023





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Ortega Soto Enrique
VOCAL: Profesor: Julio Cesar Martínez Álvarez
SECRETARIO: Profesor: López Herrera Gabriela
1er. SUPLENTE: Profesor: Castro Escamilla Octavio
2° SUPLENTE: Profesor: García Lozano Alberto

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: TORRE DE INVESTIGACIÓN.
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN INMUNODEFICIENCIAS, INSTITUTO NACIONAL DE
PEDIATRÍA, CDMX.**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Gabriela López Herrera

SUSTENTANTE:

Marlen Cruz Marin

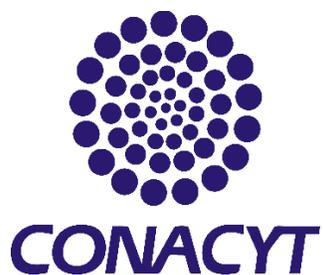


Este proyecto se realizó en la Unidad de Investigación de Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría.

Agradecimiento a los recursos fiscales del Instituto Nacional de Pediatría.

Con financiamiento CONAHCyT con registro de proyecto A1-S-26657

Gracias a la facultad de química y a la Universidad Nacional Autónoma de México.



INDICE GENERAL	
ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	4
INDICE DE ECUACIONES	5
RESUMEN	6
1. Sistema inmune	7
1.1 LINFOCITOS.....	9
1.1.1 LINFOCITOS B.....	9
1.1.1.2 ESTRUCTURA DEL BCR.....	10
1.1.1.5 INTERACCIÓN ENTRE LINFOCITOS B Y T.....	14
1.1.2 LINFOCITOS T.....	18
1.1.2.1 LINFOCITOS T CITOTÓXICOS (T _c).....	19
1.1.2.2 LINFOCITOS T COOPERADORES (T _H).....	19
1.1.2.3 ACTIVACIÓN DE LA CÉLULA T.....	19
1.1.2.4 ESTRUCTURA DEL TCR.....	19
1.1.2.5 SEÑALIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DEL TCR.....	20
1.2 PARTICIPACIÓN DE PKA-I EN LA SEÑALIZACIÓN DE BCR Y TCR.....	23
2. Forskolina y sistema inmune	24
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS PARTICULARES	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCS).....	27
2. DETERMINACIÓN DE MHC CLASE I, CLASE II Y EXPRESIÓN DE CD86.....	28
3. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD71.....	29
4. ENSAYO PARA DETERMINAR LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS B Y T.....	31
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
RESULTADOS	34
1. EXPRESIÓN DE MHC CLASE I Y II.....	34
2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA FORSKOLINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE CD71 EN LINFOCITOS B Y T.....	38
3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS B: EXPRESIÓN DE CD86.....	41
4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA FORSKOLINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS B Y T.....	44

DISCUSIÓN	48
PERSPECTIVAS	53
REFERENCIAS.....	54

ABREVIATURAS

°C: grados Celsius

µg: microgramo

µL: microlitro

ng: nanogramo

AKT=PKB: Proteína cinasa B

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

APC: Aloficocianina

BCR: Receptor de células B

BLNK: Proteína enlazadora de células B

BTK: Tirosina Cinasa de Bruton

CD: Cluster de diferenciación

CFSE: Ester de succinimidil-carboxifluoresceína

CREB: Proteína de unión al elemento AMPc

DAG: Diacilglicerol

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño

ERK: Cinasa regulada por señal extracelular

FIT-C: Isotiocianato de fluoresceína

FSK: Forskolina

HLA: Antígeno leucocitario humano

Ig: Inmunoglobulina

ITAM: Motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina.

IP3: Inositol trifosfato

LPS: lipopolisacárido

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

ml: mililitro

mTOR: proteína diana de rapamicina en células de mamífero

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

NFAT: Factor nuclear de células T activadas

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica

PCA: Célula presentadora de antígeno

PBS: Tampón fosfato salino

PE: Ficoeritrina

PHA: fitohemaglutinina

PI3K: Fosfoinositida 3 cinasa

PKA-I: proteína cinasa dependiente de AMPc tipo I

PKC: Proteína cinasa C

PLC- γ 2: Fosfolipasa C gamma 2

PRR: Receptor de reconocimiento de patrón

PKD1: quinasa-1 dependiente de fosfoinositido

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute

SFB: Suero fetal bovino

SSE: Solución salina estéril

TCR: Receptor de células T

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del receptor de células B (BCR).	10
Figura 2. Vías de señalización activadas posterior al entrecruzamiento del antígeno con el BCR.....	13
Figura 3. Interacción de la molécula de MHC clase II con el TCR de un linfocito T CD4.	15
Figura 4. Interacción de las moléculas coestimuladoras/coinhibidoras con sus respectivos ligandos presentes en el linfocito B.	16
Figura 5. Estructura del TCR.	20
Figura 6. Vías de activación del linfocito T posterior a la interacción MHC-TCR..	22
Figura 7. Estructura química de la Forskolina.	24
Figura 8. Método utilizado para determinar la expresión de MHC y CD86. .	29
Figura 9. Estimulación de PBMCs para activar a los linfocitos B y T.	31
Figura 10. Procedimiento para la determinación de la proliferación de linfocitos B y T.....	33
Figura 11. Análisis de la población de linfocitos para determinar la expresión de MHC.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 12. Representación de los histogramas de MHC clase I y II	37
Figura 13. Expresión de MHC clase I y Expresión de MHC clase II	38
Figura 14. Estrategia de análisis para la determinación de la expresión de CD71.	39
Figura 15. Representación de los histogramas obtenidos con el programa Flowjo para la determinación del porcentaje de expresión de CD71	40
Figura 16. Resultados obtenidos para la expresión CD71 en linfocitos B y linfocitos T	41
Figura 17. Análisis para determinar la expresión de CD86.	42
Figura 18. Representación de los histogramas obtenidos con sus respectivos porcentajes de expresión mediante el programa Flowjo para las diferentes condiciones de estímulo.	43
Figura 19. Resultados obtenidos para la expresión CD86 en linfocitos B.	44
Figura 20. Estrategia de análisis para la determinación de la proliferación de linfocitos B y T.	45
Figura 21. Representación de los histogramas obtenidos con el programa Flowjo para la determinación del porcentaje de proliferación de linfocitos B Y T.....	46
Figura 22. Porcentaje de proliferación de los linfocitos B y T	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.	8
Tabla 2. Ejemplos de moléculas estimuladoras/inhibidoras que participan en la interacción TCR-MHC y las células en las que se expresan.....	17

Tabla 3. Diferentes marcadores de activación que se expresan en linfocitos y otros tipos celulares y su función.18

Tabla 4. Valores obtenidos a partir del cálculo de factor utilizando la IMF. .. **¡Error! Marcador no definido.**

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1.Cálculo de linfocitos en sangre periférica por ml27

Ecuación 2.Cálculo del volumen de muestra requerido para cada ensayo28

RESUMEN

La Forskolina se ha reportado en varios estudios como un importante potenciador de AMPc, en los linfocitos T. Su actividad se centra en la interacción que tiene con la proteína cinasa dependiente de AMPc de clase I (PKA-I), la cual es capaz de regular la activación de moléculas de señalización expresadas en los linfocitos T (CREB, NFAT y NF- κ B) (Torgersen.et.al.2002), provocando la disminución en la proliferación de los linfocitos T. El efecto de la Forskolina sobre la activación de los linfocitos B no se ha descrito, por lo que en este trabajo se propuso determinar esta característica.

El efecto de la Forskolina sobre PKA en vías de señalización de los linfocitos B, aun es desconocido, pero se ha descrito que el factor de transcripción NF- κ B tiene sitios de activación para PKA (Pérez, Pérez.2019). Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar si PKA influye sobre la activación y proliferación mediada por receptores de antígeno de los linfocitos B, utilizando un agonista de AMPc, como lo es la Forskolina. Para lograr dicho objetivo, se realizaron cultivos de PBMCs y se estimularon con distintos anticuerpos agonistas dirigidos contra IgM y CD3 en presencia o ausencia de Forskolina. Las células se analizaron mediante citometría de flujo utilizando diferentes marcadores celulares para seleccionar las poblaciones de interés y determinar su activación y proliferación. Finalmente, se realizó un análisis estadístico utilizando una prueba U Mann Whitney, encontrándose una diferencia significativa tanto en la expresión de HLA clase I como en clase II en presencia de Forskolina. Se encontró que CD71 es un buen marcador de activación de linfocitos T mientras que para los linfocitos B el mejor marcador de activación fue CD86, aunque no se encontraron diferencias significativas al agregar la forskolina. Se logró inducir la proliferación de los linfocitos T utilizando anti- CD3 en combinación con anti-CD28, pero no se obtuvieron diferencias significativas al agregar la forskolina. No se logró inducir la proliferación de los linfocitos B utilizando anti-IgM en combinación con IL-4.

ANTECEDENTES

1. Sistema inmune

El sistema inmunológico es una red compleja de células, tejidos y órganos que defienden al cuerpo de sustancias extrañas, principalmente bacterias, virus, parásitos y hongos, aunque también son capaces de detectar y eliminar células tumorales, células dañadas y muertas (Pavón,2016).

De manera general el sistema inmunológico se divide en dos ramas: respuesta inmunológica innata y respuesta inmunológica adaptativa. La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa y se encarga del reconocimiento rápido de los agentes infecciosos, así como de la liberación de citocinas y quimiocinas para favorecer la eliminación de los patógenos (Pavón, 2016). Los principales componentes de la inmunidad innata son: barreras físicas y químicas, células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), proteínas del complemento y otros mediadores de la inflamación (Kindt, T.J. ,2007). Este sistema de protección detecta moléculas comunes presentes en los microorganismos, así como células dañadas (Kindt, T.J. 2007). Estas moléculas se conocen como *patrones moleculares asociados con patógenos* (PAMP) y *patrones moleculares asociados a daño* (DAMP) y son reconocidos por medio de receptores llamados *receptores de reconocimiento de patrones* (PRR). Entre los PRR se encuentran los TLR (receptores tipo toll), RLR (receptores tipo RIG-1), NOD (receptores tipo NOD), CLR (receptores de lectina tipo C), entre otros (Pavón, 2016).

Muchas veces la primera defensa es suficiente para mantener la homeostasis del organismo, pero cuando el patógeno logra atravesar estas barreras, se activa un segundo mecanismo de defensa llamado inmunidad adaptativa, y cuyos principales componentes celulares son los linfocitos T y B (Pavón, 2016). Algunas características que distinguen a la inmunidad adaptativa de la inmunidad innata se muestran en la tabla 1.

	INMUNIDAD INNATA	INMUNIDAD ADAPTATIVA
COMPONENTES	Barreras físicas y químicas (piel, mucosas, etc.) Neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas, etc. Anticuerpos y proteínas del sistema del complemento.	Linfocitos T (T_h y T_c) y linfocitos B principalmente.
Especificidad	Frente a moléculas presentes en los microorganismos (PAMP) o moléculas presentes en células dañadas (DAMP)	Muy específica frente a diferentes moléculas microbianas o no microbianas mediante el TCR O BCR.
Diversidad	Limitada	Recombinación genética para generar una mayor variedad de receptores.
Tolerancia	Sí, no se reconocen las células propias (herencia genética)	Si, los linfocitos T y B sufren un proceso de selección positiva y negativa para eliminar clones autorreactivos.
Memoria	No genera memoria	Capacidad de responder más rápido a un antígeno frente a repetidas exposiciones.
Tiempo de respuesta	Inmediata	semanas

Tabla 1. Diferencias entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.

La inmunidad adaptativa a su vez se divide en dos subtipos: la inmunidad humoral y la inmunidad celular. La primera cuenta con proteínas que se encuentran en la sangre y en secreciones llamadas inmunoglobulinas o anticuerpos y son producidos por los linfocitos B una vez que se activan y se diferencian en células plasmáticas. (Abbas, 2015). Los anticuerpos son capaces de unirse a virus y toxinas microbianas para inactivarlos o bloquearlos y evitar que lleguen a la célula diana. Esta acción provoca el reclutamiento de varios tipos de glóbulos blancos y otro tipo de proteínas

que, en conjunto, se conocen como sistema del complemento, todo esto con el objetivo de eliminar al patógeno. La inmunidad celular queda a cargo de los linfocitos T, los cuales sólo pueden detectar antígenos procesados y presentados en el contexto molecular del MHC. (Pavón, 2016). Además, los linfocitos T favorecen la producción de anticuerpos así como la activación de otras células presentadoras de antígeno mediante la producción de citocinas.

1.1 LINFOCITOS

Los linfocitos también se conocen como leucocitos agranulares y miden alrededor de 6 a 14µm. En estado de reposo suelen poseer grandes núcleos redondeados con cromatina muy compactada y escaso citoplasma. En condiciones fisiológicas, en la sangre periférica de un adulto humano se cuantifican entre 1.1 y 3.7 x10⁶ linfocitos/mL, de manera que los linfocitos representan de 20 a 50% de los leucocitos totales en circulación. (Pavón, 2016)

Existen tres grupos principales de linfocitos; los linfocitos T, los linfocitos B y las células asesinas naturales (NK). Los más numerosos son los linfocitos T que representan hasta el 90% de linfocitos, mientras que los linfocitos B y los NKs representan entre el 5 y 10% de los linfocitos, respectivamente. (Pavón, 2016). Para el propósito del presente trabajo nos enfocaremos en los Linfocitos B y T.

1.1.1 LINFOCITOS B

Los linfocitos B son células que participan en la respuesta inmune adaptativa, están encargados de la producción de anticuerpos y se les ha dado un papel regulador en la respuesta inmune ya que son capaces de producir citocinas. Además, actúan como células presentadoras de antígeno lo que resulta en un vínculo entre la respuesta humoral y la respuesta mediada por células (Maddaly.et.al.2010).

Los linfocitos B se originan e inician su proceso de maduración en la médula ósea y después migran hacia el bazo hasta su maduración final (Althwaiqeb, 2022). Durante su maduración, el linfocito B pasa por una serie de reordenamientos genéticos que tienen como objetivo el ensamblaje y la expresión de la inmunoglobulina de membrana, IgM, que al unirse con los heterodímeros Igα e Igβ

darán origen al receptor del linfocito B (BCR) inmaduro. (Shahaf, 2016) Una vez que salen a la periferia, las células B pueden activarse mediante la unión del antígeno con el BCR.

1.1.1.2 ESTRUCTURA DEL BCR

El BCR está compuesto por inmunoglobulina de membrana (mIg) que consta de dos cadenas pesadas (IgH), dos cadenas ligeras (IgL) y dos subunidades de señalización Ig α /Ig β (Matsuuchi, 2001). Los heterodímeros Ig α /Ig β también se denominan CD79a y CD79b respectivamente, las cuales son glicoproteínas de membrana pertenecientes a la superfamilia de inmunoglobulinas (Wen, Y. 2019) cuya función, es la traducción de señales posterior a la interacción BCR- antígeno mediante motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM), (Treanor, B.2012).

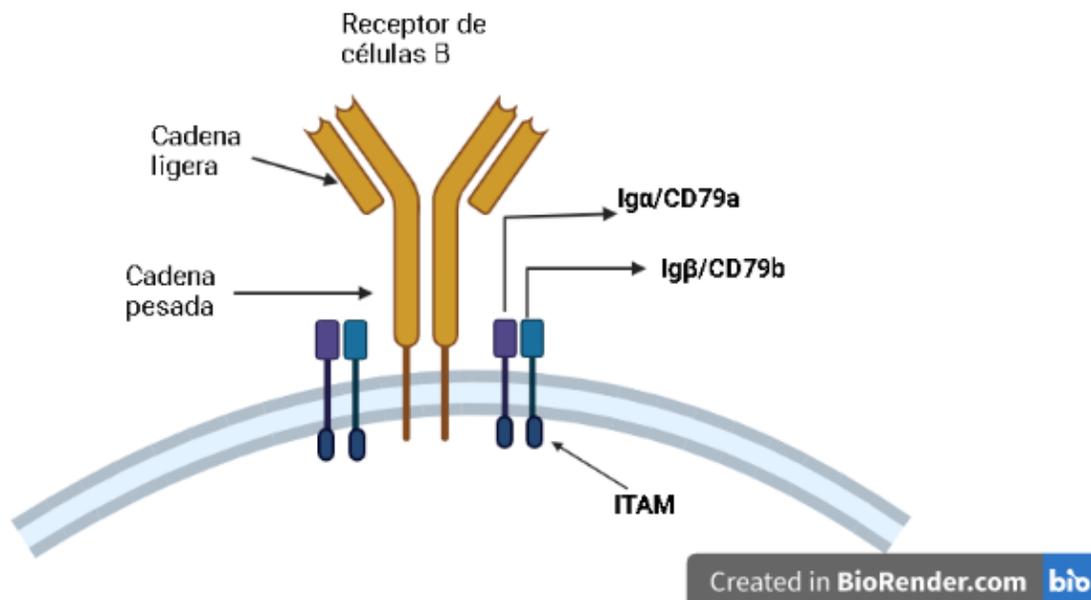


Figura 1. Estructura del receptor de células B (BCR). Se observan las cadenas ligeras y las cadenas pesadas unidas al heterodímero Ig α /Ig β

1.1.1.3 ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS VÍA BCR

Los linfocitos B dependen de su receptor de antígeno (BCR) para diferenciarse, activarse y proliferar, además de otras señales que son necesarias para llevar a

cabo estos procesos, como son la activación mediante PAMPs y/o citocinas, entre otras.

El receptor de células B inicia tres vías principales de señalización que se activan de manera dependiente de PLC- γ 2 (Kurosaki, 2011); la vía de PKC, la vía AKT y la vía RAS (ERK) (Jacob.A.et.al.2002)

1.1.1.3.1 Vía PKC

Tras la estimulación de BCR con el antígeno, los dos residuos de tirosina dentro de los motivos ITAMs de Ig α se fosforilan por las cinasas LYN (Wen, Y. et.al.2019). Los ITAM fosforilados reclutan la tirosina cinasa SYK favoreciendo su activación dando inicio a la formación de un señalosoma en donde se ensamblan moléculas como PLC- γ 2, PI3K, tirosina cinasa de Bruton (BTK) y moléculas adaptadoras como el adaptador de células B (BLNK) (Scupoli, Pizzolo.2015). La activación de PLC- γ 2, BTK y BLNK da como resultado la producción del segundo mensajero, inositol-1,4,5 trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) induciendo la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplasmático (RE) (Wen, Y.2019). Las concentraciones elevadas de Ca²⁺ activan la proteína calmodulina que a su vez activa a la calcineurina, y termina con la activación transcripcional del factor nuclear de células T activadas (NFAT). (Wen, Y.2019).

El DAG induce la liberación de Ca²⁺ intracelular y activa la proteína cinasa C (PKC β) que a su vez induce la activación de factores de transcripción, incluido el factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Stevenson, 2011).

1.1.1.3.2 La vía AKT

Las cinasas PI3K son heterodímeros que consisten en una subunidad catalítica (p110 α , β , δ) y una subunidad reguladora (p50, p55, p85). (Jellusova, J.2016). Después de que el BCR se entrecruza, la activación de la subunidad catalítica p110 de PI3K desencadena una cascada de fosforilaciones en la que se produce fosfatidilinositol-3, 4,5-trifosfato (PIP3) a partir de PIP2. PIP3 actúa como un sitio de acoplamiento al unirse a proteínas que contienen dominios de homología pleckstrina (PH), de manera que interactúa con las proteínas efectoras PKD1 y AKT.

Finalmente, la activación de AKT activa a mTORC2 (proteína blanco de rapamicina en células de mamífero) mediante su fosforilación, lo que da como resultado la síntesis de proteínas relacionadas con el crecimiento, proliferación y supervivencia celular mediante la activación de factores de transcripción como NFAT y FOXO1. (Ebru.et.al.2021)

1.1.1.3.3. Vía Ras

En esta vía el DAG, activa a la proteína RasGRP (proteína Ras liberadora de guanil nucleótidos) que a su vez activa a la proteína RAS transformándola a Ras-GTP. Ras-GTP recluta a la proteína Raf la cual se activa por fosforilación para posteriormente activar a MAPKK (MEK2). A continuación, ERK2 fosforila factores de transcripción como c-Myc y ELK. (Wen, Y.2019) que son importantes para la proliferación y diferenciación celular. La figura 2, esquematiza las tres vías de señalización posterior a la interacción BCR-antígeno. Es importante mencionar que esta figura es una representación muy sencilla de lo que ocurre tras la activación del BCR, ya que las vías de señalización son redes mucho más complejas, pero este esquema nos ayuda a enfatizar los principales factores de transcripción descritos en este trabajo.

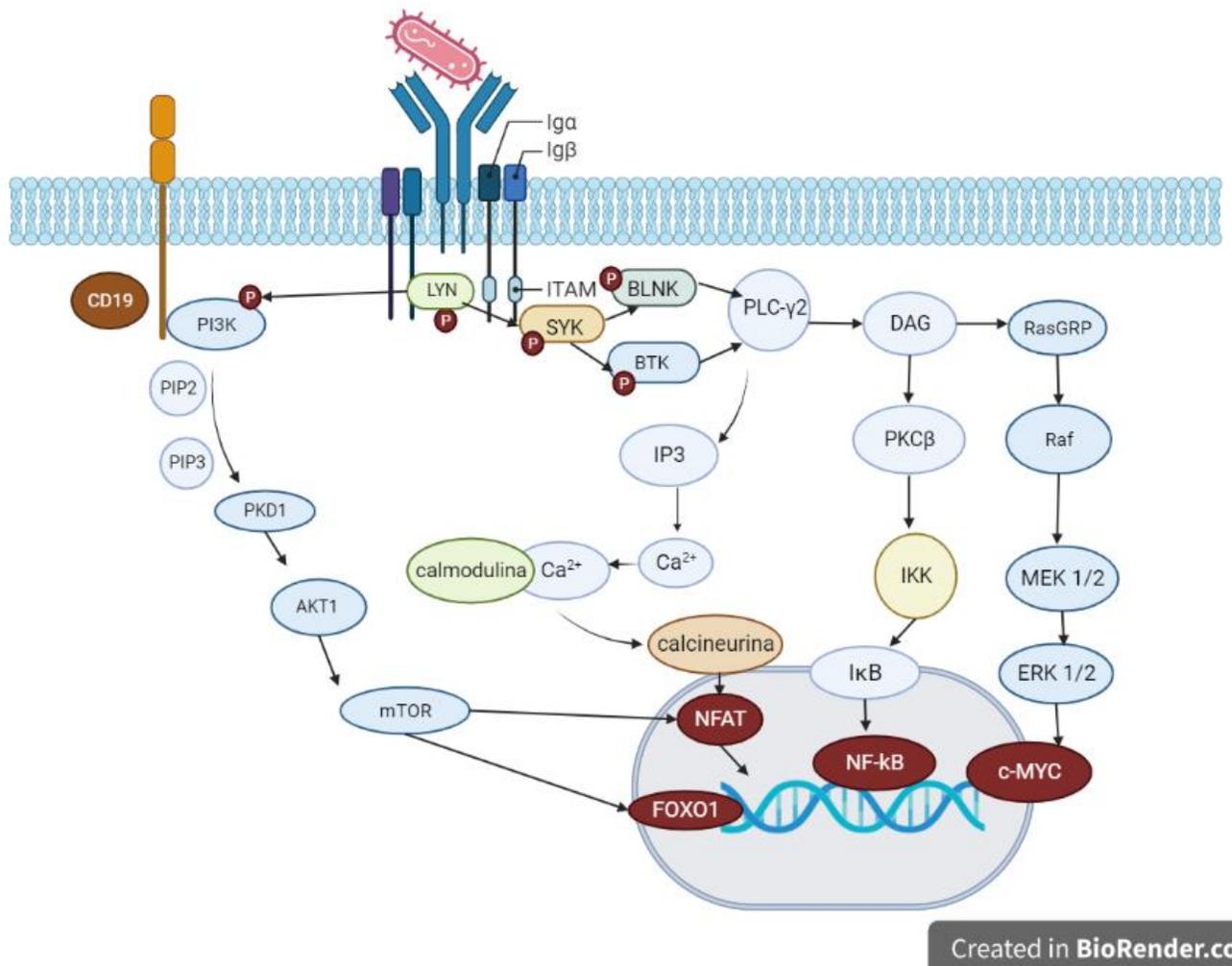


Figura 2. Vías de señalización activadas posterior al entrecruzamiento del antígeno con el BCR. El BCR es capaz de reconocer por sí mismo un antígeno, iniciando una cascada de fosforilaciones que finalizan en la activación de genes de factores de transcripción necesarios para la supervivencia de la célula B.

1.1.1.4 LOS LINFOCITOS B COMO CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO (CPA)

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) es un complejo de genes que codifican glicoproteínas presentes en la membrana de las células del sistema inmune encargado de presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T. En los humanos, el MHC se denomina HLA y existen dos tipos: clase I y clase II. Las moléculas de clase I se expresan en todas las células nucleadas y plaquetas,

mientras que las moléculas de clase II se expresan en las CPA como linfocitos B, células dendríticas, macrófagos y monocitos (Cruz-Tapia.2013).

Los linfocitos B interactúan con los linfocitos TCD4+ por medio del HLA clase II favoreciendo su activación, proliferación y diferenciación, los linfocitos T CD4+ activados favorecen a su vez la coestimulación de los linfocitos B para favorecer su diferenciación y una mejor respuesta de anticuerpos (Katikaneni, 2019). La expresión de HLA-II en los linfocitos B se incrementa en respuesta a la estimulación a través del BCR y la activación de la vía PI3K/AKT participa en dicha inducción (Marshal-Clarke, 2003). Por otro lado, la expresión de moléculas HLA-I depende de la activación de NFκB (Pick, 2012).

1.1.1.5 INTERACCIÓN ENTRE LINFOCITOS B Y T

Una vez que el BCR reconoce el antígeno, éste se internaliza, se procesa y los péptidos derivados del antígeno se cargan en la molécula de clase II para después expresarse en la membrana celular. De esta manera, el TCR es capaz de reconocer al péptido derivado del antígeno y se forma un complejo MHC II-TCR que favorece la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos T (Katikaneni, 2018). (Figura 3).

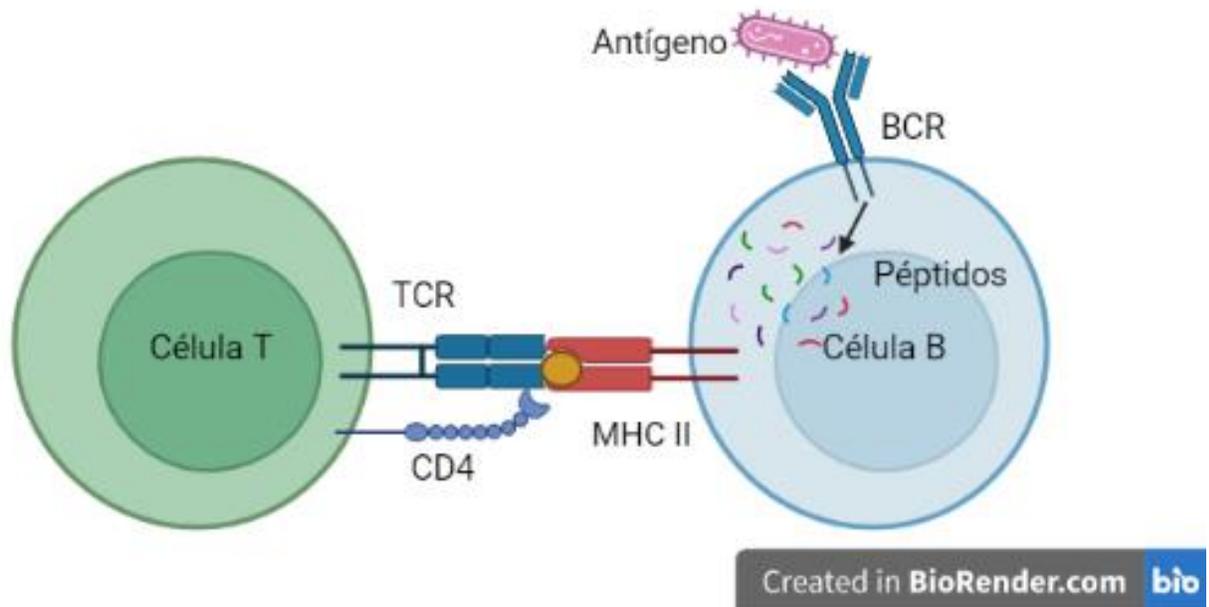


Figura 3. Interacción de la molécula de MHC clase II con el TCR de un linfocito T CD4. Los linfocitos B son capaces de presentar antígeno a los linfocitos T, para esto, debe ocurrir el reconocimiento de dicho antígeno por medio de su BCR, internalizarlo, procesarlo y presentarlo por MHC-clase II.

1.1.1.6 MOLÉCULAS COESTIMULADORAS

Además de la unión del MHC con el TCR se requieren de señales extras para que se produzca una interacción eficaz. Estas señalizaciones se producen por proteínas que se conocen como moléculas coestimuladoras y provienen tanto de las CPA como de la célula T.

Un ejemplo es la molécula coestimuladora CD28 que al unirse con su ligando B7-1 (CD80) o B7-2 (CD86) presente en la célula B y otras CPAs, genera una respuesta positiva, es decir, potencia la respuesta del TCR con el antígeno. Sin embargo, CD80/CD86 también se pueden unir a CTLA-4 y esto genera una respuesta negativa (Tai Yu, 2018). Las moléculas coestimuladoras no solo son capaces de potenciar la activación sino también de inhibir a la célula T o bien provocar un estado de anergia.

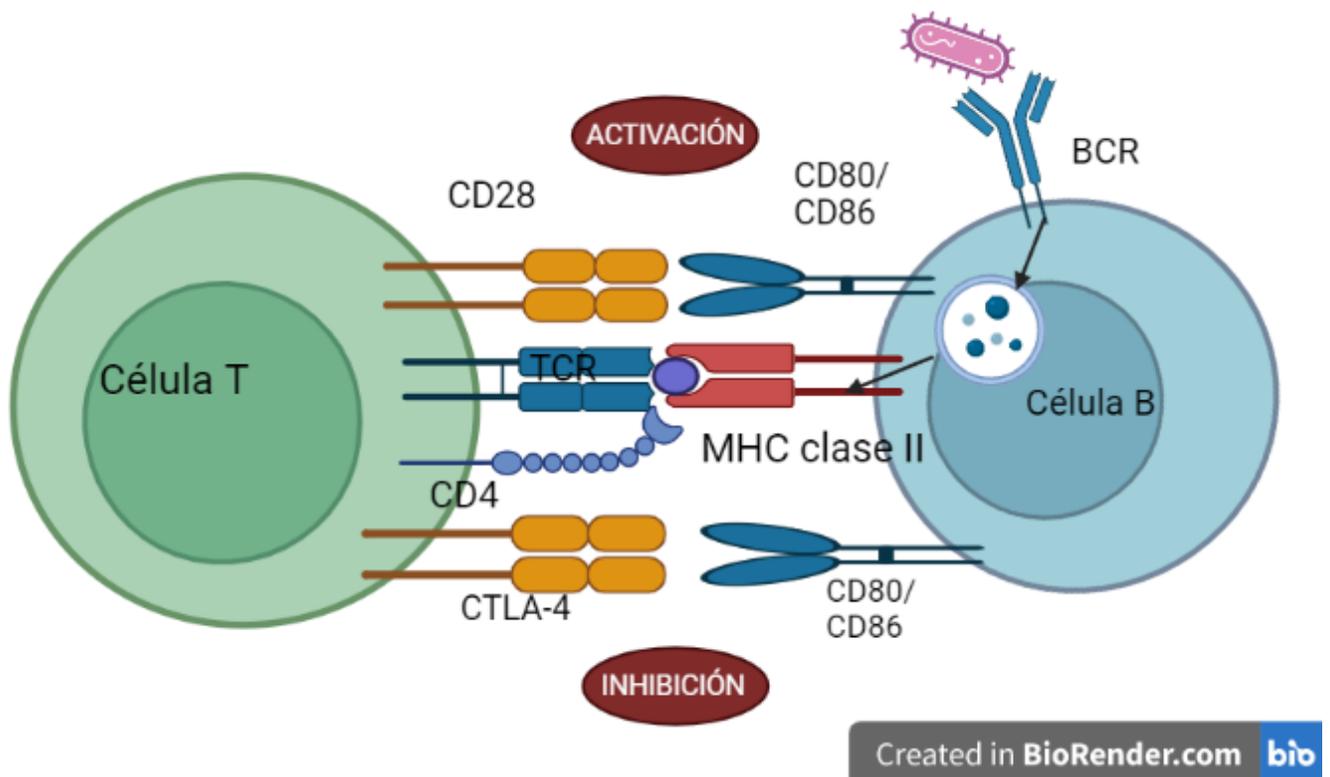


Figura 4. Interacción de las moléculas coestimuladoras/coinhibidoras con sus respectivos ligandos presentes en el linfocito B. Cuando CD86 se une a CD28 la célula se activa mientras que se inhibe cuando interactúa con CTLA-4.

Existen distintas moléculas coestimuladoras, de las cuales no se hablará a detalle ya que no es el objetivo de este trabajo, pero es importante mencionarlas dada la importancia que tienen dentro de la respuesta inmunológica. En la tabla 2 se muestran algunas de estas proteínas y sus ligandos.

Molécula coestimuladora/coinhibidora	Ligando	Células que expresan la molécula coestimuladora/coinhibidora
CD28	B7-1 (CD80) B7-2 (CD86)	Células T CD4 Y CD8 naïve
CTLA-4	B7-1 (CD80) B7-2 (CD86)	Células Treg y T activadas
ICOS	ICOS-L	Células T
PD-1	PDL-1 PDL-2	Células CD4/CD8, NK, macrófagos.
CD27	CD70	Células T y NK
CD40L	CD40	Células T. NK, eosinófilos
OX40	OX40L	Células T

Tabla 2. Ejemplos de moléculas estimuladoras/inhibidoras que participan en la interacción célula B-Célula T favoreciendo la unión TCR-MHC.

1.1.1.7 MARCADORES DE SUPERFICIE DE ACTIVACIÓN EN LOS LINFOCITOS B Y T

Al igual que las moléculas coestimuladoras existen otras proteínas cuya expresión se induce y es muy representativo de la activación de los linfocitos. Esta característica resulta ser de mucha utilidad, ya que con ello es posible determinar si hubo o no activación de las células e inclusive determinar su expresión durante un curso de tiempo (Motamedi, 2016).

Se han descrito diferentes proteínas cuya expresión se mantienen a la alza en los linfocitos B activados, tal es el caso de CD86 que también se induce en respuesta a la estimulación vía BCR y, de manera similar al MHC, la vía PI3K/AKT está involucrada en esta inducción (Marshall-Clarke, 2003); los linfocitos T activados inducen la expresión del receptor de IL-2 (CD25), el antígeno de activación

temprana (CD69), el antígeno Ki24 (CD70), el receptor de transferrina (CD71) y el receptor de Fas (CD95), entre otros (Shipkova,2012). En la tabla 3 se muestran algunas características de estos receptores.

Receptor	Otros nombres	Células en que se expresa	Función
CD25	Receptor de IL-2/ IL-2R	Células B y T activadas, monocitos/macrófagos	Cadena alfa del receptor trimérico IL-2, potencia la capacidad de respuesta de IL-2 lo que da como resultado la activación de los linfocitos.
CD69	Antígeno de activación temprana	Células T activadas, células B, células NK, neutrófilos, eosinófilos, células epidérmicas de Langerhans y plaquetas	Funciona como un receptor de transmisión de señales en linfocitos, células asesinas naturales (NK) y plaquetas.
CD70	Ligando CD27/antígeno Ki24	Linfocitos B y T activados	Participa en la activación, proliferación y generación de células T citolíticas; regulación de la activación de las células B, función citotóxica de las células NK y síntesis de inmunoglobulinas.
CD71	Proteína receptora de transferrina/Receptor de transferrina	Todas las células en proliferación	Requerido para la homeostasis del hierro
CD95	Antígeno de superficie mediador de la apoptosis Fas	Linfocitos B y T activados	Mediador de señales que inducen apoptosis, transducción de señales de proliferación en linfocitos T.

Tabla 3. Diferentes marcadores de activación que se expresan en linfocitos y otros tipos celulares y su función.

1.1.2 LINFOCITOS T

A diferencia de los linfocitos B, los linfocitos T no son capaces de reconocer por sí mismos a los antígenos, sino que necesitan que estos sean procesados y

presentados por las moléculas de MHC (Abbas, 2015). Los linfocitos T constan de dos poblaciones con funciones diferentes, las células T helper (Th, CD4+) y las células T citotóxicas (Tc, CD8+).

1.1.2.1 LINFOCITOS T CITOTÓXICOS (T_c)

Los linfocitos T_c expresan una proteína llamada CD8, lo que les permite unirse al MHC de clase I. Estas células tienen la función de detectar y eliminar células dañadas, tumorales, infectadas por virus y otros microorganismos intracelulares (Abbas, 2015).

1.1.2.2 LINFOCITOS T COOPERADORES (T_H)

Los linfocitos T_H expresan una proteína llamada CD4 que les permite unirse al MHC de clase II y favorecer una interacción estable con el receptor de la célula T (TCR) (Magee, 2012). Después de la interacción con el antígeno, los linfocitos CD4+ pueden diferenciarse en diferentes linajes incluidos los T_{H1}, los T_{H2}, Th17, T foliculares (T_{fh}), los Treg entre otros y tienen la característica de que producen citocinas con funciones diversas (Hwang, JR.et.al.2020).

1.1.2.3 ACTIVACIÓN DE LA CÉLULA T.

La activación de las células T se inicia por la presentación de antígenos exógenos o endógenos, por parte de las células CPA a través del MHC, en donde se presentan péptidos de diferente longitud y que es reconocido por las células T a través de su TCR (Téllez Castillo.et.al.2018).

Es importante recordar que, para que ocurra una activación eficaz de la célula T son necesarias las señales producidas por moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas.

1.1.2.4 ESTRUCTURA DEL TCR

El TCR es un heterodímero compuesto por una cadena alfa y una cadena beta parecida a la estructura de las inmunoglobulinas (Figura 5). El complejo CD3 se encuentra acoplado al heterodímero de TCR y es el encargado de llevar a cabo el proceso de transducción de señales debido a que contienen motivos de fosforilación o ITAMs. (Téllez Castillo.et.al.2018).

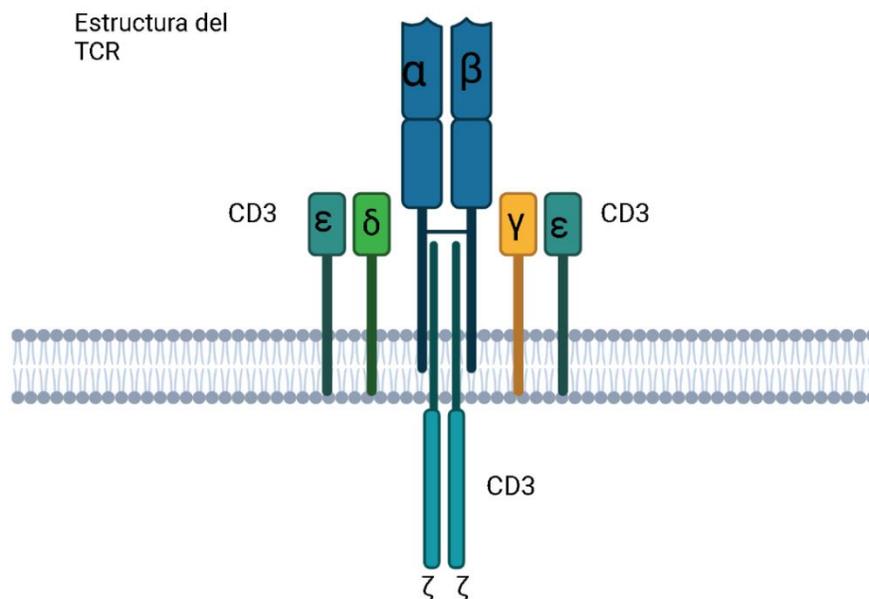


Figura 5. Estructura del TCR. Se observan las cadenas α y β unidas al complejo CD3.

1.1.2.5 SEÑALIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DEL TCR

La unión del complejo péptido-MHC (pMHC) con el TCR genera una primera señal en la que se fosforilan los dominios ITAM del correceptor CD3 por parte de las cinasas SRC. Luego ZAP-70 se une a los ITAM fosforilados para ser fosforilado por LCK (Shah, K.2021).

Seguido de ello la PLC- γ 1 se encarga de activar varias cascadas de señalización muy similares a las descritas anteriormente en el linfocito B. PLC- γ 1 produce IP3 y DAG como segundos mensajeros. El IP3 activa los canales de calcio formándose el complejo calcio calmodulina que a su vez activa a la calcineurina y culmina en la activación del factor de transcripción NFAT. Este factor induce la expresión de genes como la IL-2 importante en la activación de la célula T. (Shah, K.2021) Por otro lado el DAG activa las vías mediadas por PKC θ y RASGRP.

La activación de PKC θ , induce un complejo de proteínas conformado por CARMA1, BCL10 y MALT1. Este complejo induce la degradación de I κ B γ y se produce la

fosforilación de I κ B. Finalmente NF- κ B es liberado de I κ B para trasladarse al núcleo y regular su expresión. (Keith, R.2008)

El DAG también activa la proteína RASGRP, que al unirse con GTP activa a la cinasa Raf1. Luego Raf1 fosforila y activa a MEK1/2 que a su vez activa a ERK1/2. (Huse, 2009). Esta proteína activa a Elk, encargada de inducir la expresión del factor de transcripción c-FOS importante en la activación de los linfocitos T y la producción de citocinas (Shah, K.2021)

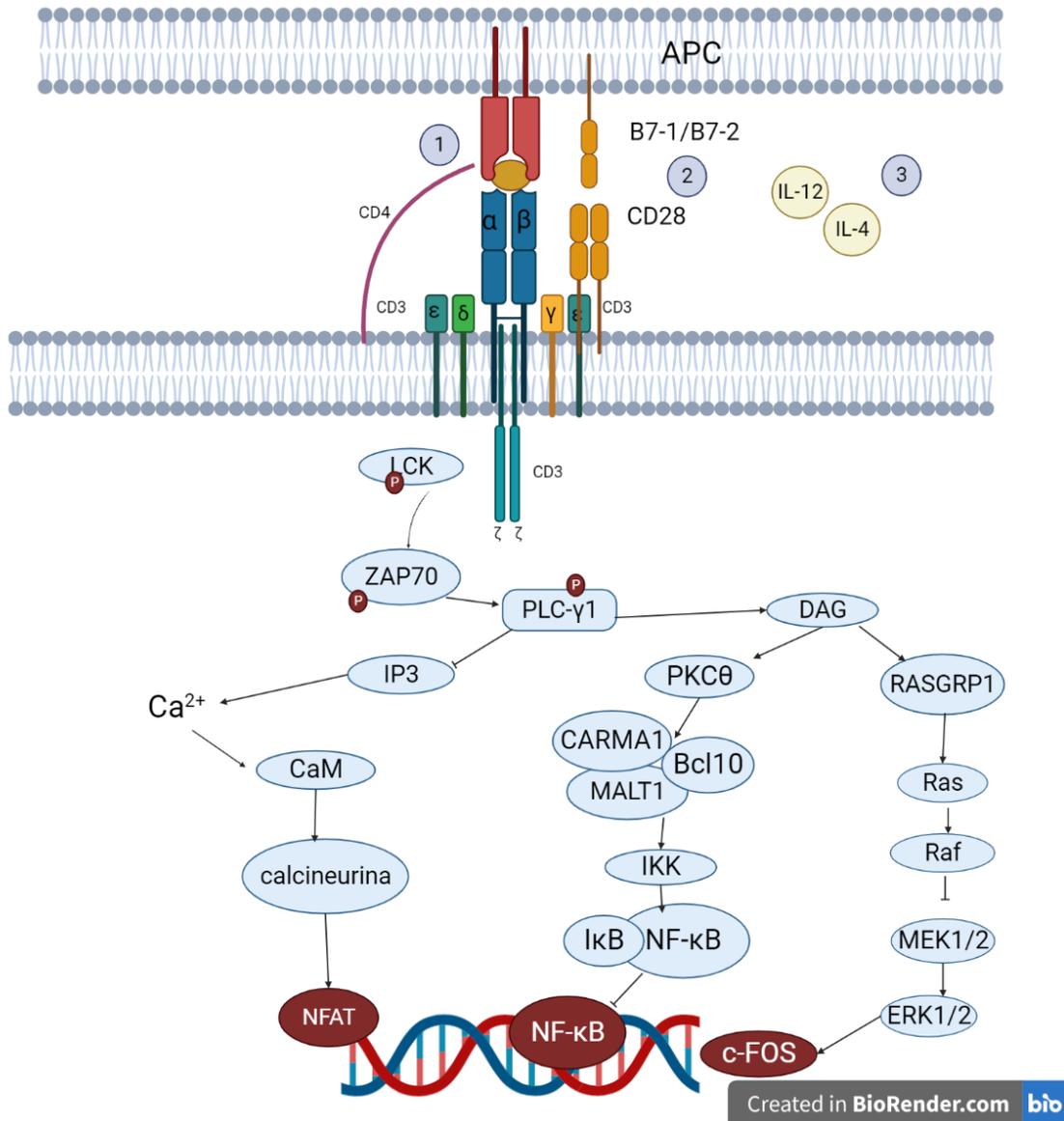


Figura 6. Vías de activación del linfocito T posterior a la interacción MHC-TCR. La unión MHC-TCR junto con la estimulación de CD4 inician una serie de fosforilaciones a través de las cadenas ζ del complejo CD3 que dan origen a la expresión de factores de transcripción como NFAT, NF- κ B y c-FOS.

Durante la activación y proliferación de los linfocitos B y T también se encienden mecanismos de regulación de la respuesta. Esto genera un equilibrio y evita que se genere una reacción fuera de control, resultando perjudicial en lugar de benéfico.

Para ello existen diferentes proteínas encargadas de regular todo el mecanismo una vez que el peligro ha sido controlado. En el caso de los linfocitos T la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) ha sido muy bien descrita como una cinasa reguladora en diferentes puntos dentro de las vías de señalización.

1.2 PARTICIPACIÓN DE PKA-I EN LA SEÑALIZACIÓN DE BCR Y TCR

El AMPc inhibe la señalización activada por el TCR mediante la fosforilación mediada por PKA. Se sabe que PKA se dirige al complejo TCR-CD3 durante la activación de las células T a través de una proteína de anclaje de la cinasa A (AKAP). Se sabe que PKA lleva a cabo la fosforilación en la ser-43 de Raf-1, inhibiendo la activación adecuada de ERK2 lo que causa una baja producción de IL-2 porque disminuye la expresión de la cadena α del receptor de IL-2 (IL-2R) (Ramstad, 2000). Esto se traduce en la inhibición de la proliferación de las células T. También se ha descrito que PKA tiene la capacidad de acoplarse al complejo de I κ B- NF- κ B, de manera que una vez que I κ B se degrada, la subunidad catalítica de PKA se libera, fosforilando a NF- κ B y aumenta su transactivación en el núcleo (Torgersen, 2002). De manera adicional se ha reportado que PKA participa en la vía de las fosfolipasas, ya que en algunos ensayos han mostrado que PKA fosforila PLC- γ 1/2 interrumpiendo el flujo de Ca²⁺ y evitando la formación de los segundos mensajeros como IP3, lo que conlleva a un bloqueo en la cascada de señalización río abajo (Torgersen, 2002).

En los linfocitos B aún no se sabe con exactitud en donde participa PKA en la señalización, ya que se han hecho pocos estudios en estas células. Lo poco que se ha descrito es que el aumento de los niveles de AMPc inhibe la activación de las células B in vitro y además induce su muerte celular (Lømo J. et.al, 1995). También se ha demostrado que el aumento de AMPc reduce la actividad de NF- κ B inducido por BCR. (Minguet, S. et.al.2005)

Dado que PKA tiene participación en el control de la activación de los linfocitos a diferentes niveles, es importante que su funcionamiento sea adecuado. Si por alguna razón su actividad se ve inhibida o por el contrario se exagera, esto trae

consigo una serie de irregularidades dentro de la vía de señalización causando problemas de autoinmunidad o en su defecto de inmunodeficiencia.

2. Forskolina y sistema inmune

La Forskolina es un diterpeno producido por la planta *Coleus forskolii* bien caracterizado por ser un agonista de PKA.

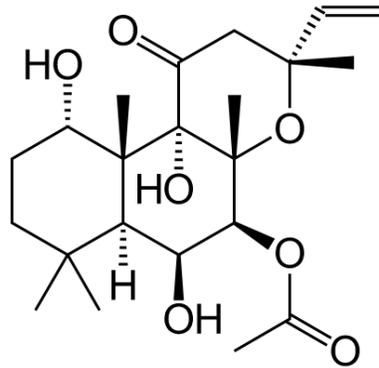


Figura 7. Estructura química de la Forskolina. (Imagen obtenida de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Forskolin>)

La Forskolina activa la enzima adenilato ciclasa, enzima que se encarga de la producción de AMPc, y su activación provoca un aumento importante en los niveles de AMPc intracelular. (Seamon, 1981). Este aumento activa la subunidad catalítica de PKA e inhibe la fosforilación de tirosina de las proteínas involucradas en la señalización de TCR (Torgersen.2002, Klausner, 1987).

En algunos artículos publicados se han realizado ensayos con Forskolina utilizando células Jurkat en donde se tratan con Forskolina previamente a la estimulación con anti.CD3 y aumentan las concentraciones intracelulares de AMPc impidiendo la fosforilación de PLC- γ 1 y la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato. (Park, 1992)

En los linfocitos B se desconoce todavía un mecanismo mediante el cual la Forskolina actúe sobre PKA. Lo que si se ha reportado es que cuando los linfocitos B son estimulados vía BCR con anticuerpos anti-IgM en combinación con Forskolina, los niveles de AMPc provocan la inhibición de la progresión del ciclo celular en la etapa de G1 a S, y se inhibe la síntesis de DNA. Adicionalmente, se

han realizado ensayos estimulando linfocitos B con factor de crecimiento de células B (BCGF) más Forskolina en los cuales se bloquea la progresión del ciclo G1 a S inhibiendo la proliferación de las células B (Kammer,1988),

También se han realizado otros ensayos utilizando linfocitos de sangre periférica en los que, al agregar la Forskolina se induce un aumento en la concentración de AMPc alterando la activación de los linfocitos, cuando estos se estimulan con diferentes mitógenos como la concavalina A, fitohemaglutinina (PHA) y algunos antígenos como la estreptocinasa. De igual forma se informa acerca del revertimiento del efecto de la forskolina si se agrega un éster de forbol como el 13-acetato de 12 - O - tetradecanoil forbol o un ionóforo como la ionomicina. (Shenker, 1987)

JUSTIFICACIÓN

La participación de PKA y su mecanismo de señalización en la proliferación de los linfocitos T ha sido documentada por diversos autores, sin embargo, el efecto de esta proteína sobre los linfocitos B aún no se define claramente por lo que se sigue investigando. Los estudios realizados en ambos tipos celulares se han limitado a determinar efectos en su proliferación y en la expresión de citocinas, pero al momento no se ha explorado el efecto que se pueda tener en la activación y en la expresión de moléculas coestimuladoras. Dado que PKA está implicada en la regulación de procesos inmunológicos, la alteración en su funcionamiento contribuye con la aparición de algunos fenómenos de autoinmunidad e inmunodeficiencia, por lo que, en un futuro estos ensayos podrían emplearse para evaluar la vía de señalización en pacientes con alguna alteración inmunológica.

HIPÓTESIS

La forskolina afectará negativamente la activación y/o proliferación de los linfocitos B inducida por el BCR.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar si la Forskolina tiene efecto en la activación y proliferación de los linfocitos B y T mediante ensayos de citometría de flujo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar cultivos de PBMCs bajo diferentes condiciones para inducir la activación y proliferación de los linfocitos B y T.
- Determinar la expresión de MHC clase I y clase II bajo el efecto de la Forskolina.
- Determinar la expresión de CD71 como marcador de activación en los linfocitos B y T bajo el efecto de la Forskolina.
- Determinar la expresión de CD86 como marcador de activación en los linfocitos B bajo el efecto de la Forskolina.
- Determinar la proliferación de los linfocitos B y T bajo el efecto de la Forskolina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCS)

En tubos estériles de centrifuga de 15 ml se colocó la solución de Ficoll (Lymphoprep®). Enseguida se colocó la sangre obtenida de controles sanos en presencia de ACD como anticoagulante, dejándola resbalar sobre la pared del tubo muy lentamente, evitando que la sangre cayera hasta el fondo. La proporción de sangre con respecto al Ficoll que se utilizó fue de 3:1. Se centrifugó a 1500 rpm durante 30 min con una aceleración y desaceleración lenta. Después se recuperó la capa de células mononucleares en un tubo nuevo y se realizaron lavados con solución salina estéril (SSE) centrifugando a 1500 rpm durante 5 min y decantando los sobrenadantes.

El botón que se obtuvo en el último lavado se resuspendió en 1ml de SSE y se realizó el conteo celular en una cámara de Neubauer haciendo una dilución 1:20 con azul de tripano, la cual se preparó con 38 µl de solución de azul de tripano y 2 µl de muestra. La cuenta se realizó colocando la cámara en el microscopio seleccionando los cuadrantes correspondientes. El número de células por mL se obtuvo mediante la ecuación 1 donde FD es el factor de dilución y 10000 es un factor para obtener las células en 1 ml.

$$\frac{cel}{ml} = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{número de cuadrantes}} \times FD \times 10000$$

Ecuación 1. Cálculo de la concentración de células mononucleares obtenidas a partir de muestras de sangre periférica por mililitro.

Después de obtener el número de células totales se realizó otro cálculo para obtener el volumen de muestra necesario para cada ensayo. (Ecuación 2).

$$\text{Volumen de muestra} = \frac{500,000 \times 1\text{ml}}{CT} \times \# \text{ de pozos}$$

Ecuación 2. Cálculo del volumen de muestra requerido para cada ensayo, donde 500,000 es la cantidad necesaria para cada pozo y CT es el número de células totales calculadas con la ecuación 1.

2. DETERMINACIÓN DE MHC CLASE I, CLASE II Y EXPRESIÓN DE CD86.

Se colocaron aproximadamente 3×10^6 PBMCs (Ecuación 2) con 1200 μl de medio RPMI suplementado en un tubo estéril para centrifuga. Las células se sembraron en placas de 96 pozos con fondo en U colocando 200 μl de muestra en cada pozo. Tanto para el ensayo de expresión de MHC como para el de CD86 se sembraron 3 pozos, con aproximadamente 500,000 células cada uno. Luego se añadieron simultáneamente los diferentes estímulos como se describe a continuación. El pozo 1 representa nuestro control, al cual no se le colocó ningún estímulo; en el pozo 2 se colocó IL-4 (Biolegend, 0.01 ng/ml) y αlgM (SouthernBiotech, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); en el tercer pozo se agregó nuevamente IL-4, αlgM y además FSK (Sigma-aldrich, 30 μM). La placa se incubó en la estufa a 37°C y 5% CO₂ durante 48 horas.

Después del tiempo de incubación se realizó una tinción para su lectura en el citómetro de flujo. Para ello, se utilizaron los siguientes anticuerpos: 1 μl de anti CD19- APC (Biolegend), 1 μl de anti HLA I- FITC (Biolegend), en una dilución 1:2 y 1 μl de HLA II PE (Beckman coulter). Para la expresión de CD86 se utilizó 1 μl anti CD19 -APC y 1 μl de anti CD86- PE (Biolegend). Una vez que se agregaron los anticuerpos, los tubos se incubaron durante 15 minutos protegidos de la luz y después las células se lavaron con 2 ml de PBS. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Finalmente se añadieron 200 μl de PBS a cada tubo y se leyeron 50,000 eventos aproximadamente en el citómetro de flujo Guava EasyCyte (Luminex). (Figura 9). Los resultados fueron analizados utilizando el programa FlowJo (Treestar) en donde se identificó a los linfocitos B por medio de la expresión de CD19 para después obtener la expresión de MHC clase I, clase II y expresión de CD86 mediante un cálculo de factores que se detallará más

adelante utilizando los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) para el caso de MHC y porcentaje de expresión en el caso de CD86.

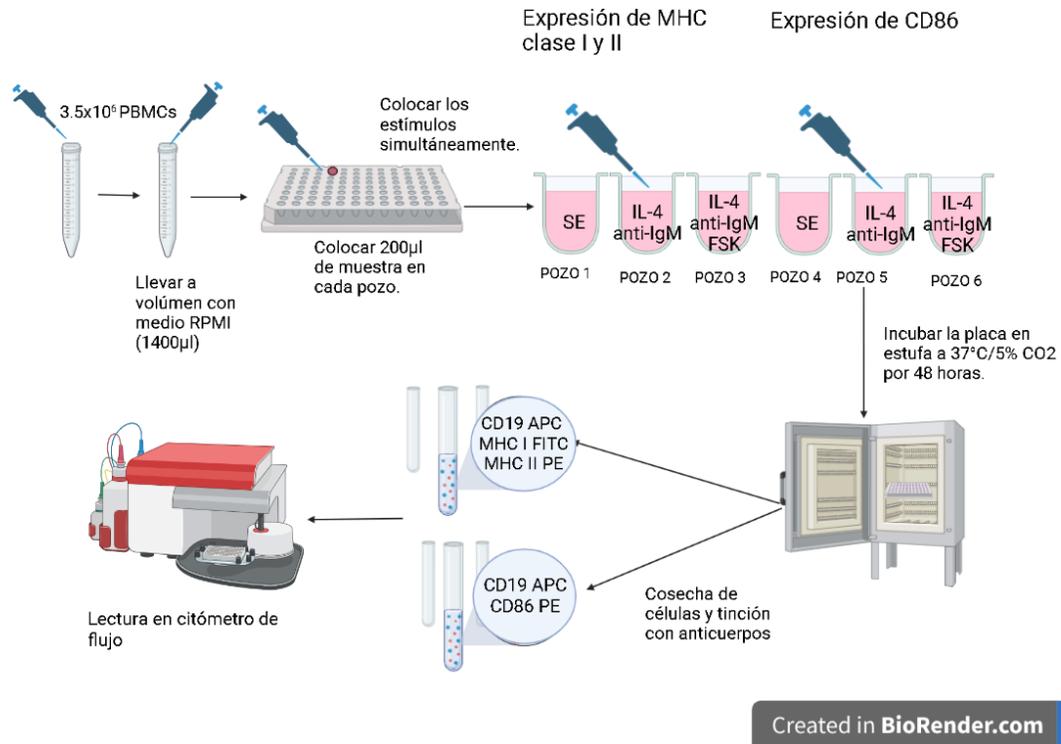


Figura 8. Método utilizado para determinar la expresión de MHC y CD86. Las PBMCs obtenidas se estimulan con anticuerpos y citocinas para activar a los linfocitos B mediante su BCR. Posterior al tiempo de incubación, se analiza la expresión de estos receptores mediante citometría de flujo.

3. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD71

Se colocaron 1.5×10^6 PBMCs (Ecuación 2) con 600 µl de medio RPMI suplementado en un tubo estéril para centrifuga y se sembraron en tres pozos diferentes para linfocitos B y T colocando un volumen de 200 µl en cada uno. Posteriormente se agregaron los estímulos como se describe a continuación. Para el caso de los linfocitos T: Pozo 1, control; pozo 2, αCD3 (Biolegend, 2µg/ml) y αCD28 (Biolegend ,2µg/ml) y pozo 3, αCD3/CD28 a las concentraciones mencionadas y FSK (ThermoFisher 30 µM). Para los linfocitos B: pozo 1 sin estímulo; pozo 2, IL-4 (Biolegend, 0.01 ng/ml) y αIgM (SoutherBiotech, 0.5 µg/µl);

pozo 3 IL-4, α lgM y FSK (Sigma-aldrich, 50 ng/ml). La placa se incubó durante 48 horas a 37°C y 5% CO₂.

Después del tiempo de incubación se realizó una tinción para su lectura en el citómetro de flujo con los siguientes anticuerpos: 1 μ l de anti-CD4 APC (Biolegend) y 1 μ l de CD71 FITC (Beckman Coulter), para linfocitos T y 1 μ l de anti CD19 -APC y 1 μ l de anti CD71 FITC para linfocitos B. Después los tubos se incubaron durante 15 minutos protegidos de la luz y posteriormente se lavaron con 2 ml de PBS. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Finalmente se añadieron 200 μ l de PBS a cada tubo y se leyeron 50,000 eventos aproximadamente en el citómetro de flujo Guava Easycyte (Luminex). (Figura 9). Los resultados fueron analizados en Flowjo seleccionando a los linfocitos T mediante la expresión de CD4 y a los linfocitos B mediante la expresión de CD19 para obtener la expresión de CD71 mediante un cálculo de factores que se explicará más adelante.

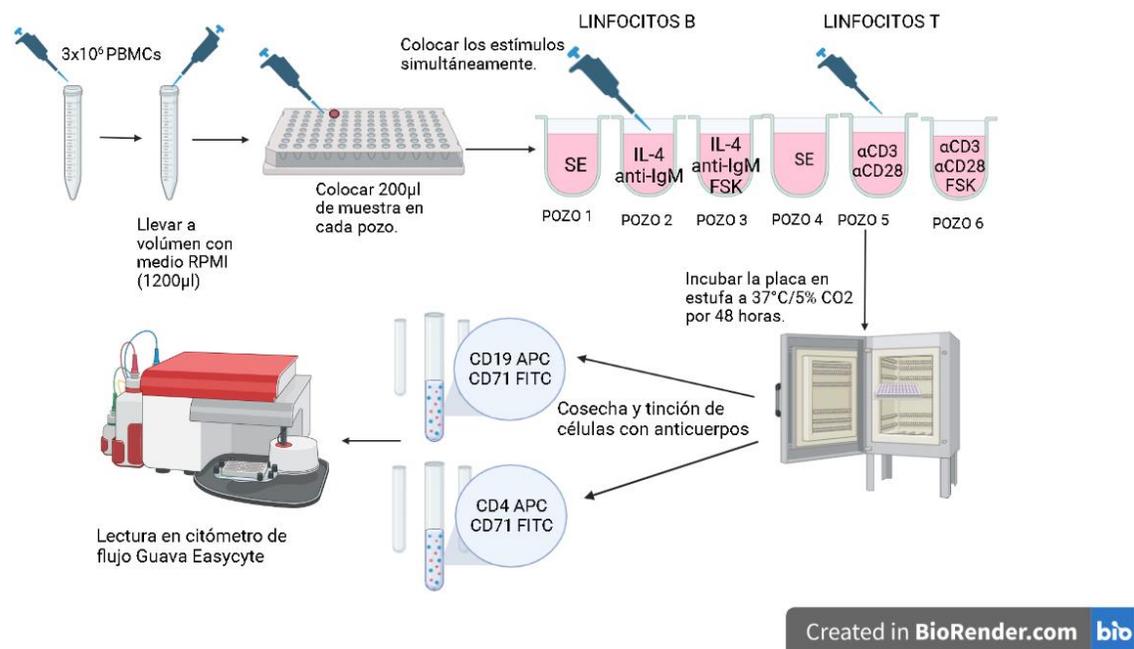


Figura 9. Estimulación de PBMCs para activar a los linfocitos B y T. Las PBMCs obtenidas se colocan con distintos estímulos para inducir su activación. Posterior al tiempo de incubación se analiza la expresión de este receptor mediante citometría de flujo.

4. ENSAYO PARA DETERMINAR LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS B Y T

Se colocaron 3.5×10^6 PBMCs en un tubo estéril para centrifuga y se tiñeron con CFSE (Termo Fisher, $9 \mu\text{M}$) durante 3 minutos a 37°C , agitando cada minuto. Una vez pasado el tiempo se realizó un lavado con SFB al 8%. Se centrifugó a 1500 rpm 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Se realizaron 3 lavados más con SFB al 2%, decantando cada vez. Al finalizar el marcaje, las células se colocaron en medio RPMI suplementado y se cultivaron en placas de 96 pozos de fondo en U. Las células se estimularon como se menciona a continuación: Pozo 1 control; pozo 2, IL-4 (0.01 ng/ml) y αIgM ($0.5 \mu\text{g/ml}$); pozo 3, IL-4 y αIgM a las concentraciones mencionadas y FSK ($30 \mu\text{M}$); pozo 4, sin estímulo; pozo 5, αCD3 ($2 \mu\text{g/ml}$) y αCD28 ($2 \mu\text{g/ml}$); pozo 6 αCD3 , αCD28 y FSK ($30 \mu\text{M}$) y pozo 7, PHA (SigmaAldrich). La placa se incubó durante 5 días a 37°C .

Una vez pasado el tiempo de incubación las células se cosecharon en un tubo de citometría y se centrifugaron 1500 rpm durante 5 minutos. Después, se realizó una tinción con 1 μ l de anti-CD19 (APC) para los linfocitos B y con 1 μ l de anti CD4 (APC,) para los linfocitos T. Una vez que se agregaron los anticuerpos, los tubos se incubaron durante 15 minutos protegidos de la luz y después las células se lavaron con 2 ml de PBS. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Finalmente se añadieron 200 μ l de PBS a cada tubo y se leyeron aproximadamente 50,000 eventos en el citómetro de flujo Guava Easycyte (Luminex). (Figura 10)

El análisis de los resultados obtenidos se realizó mediante el programa FlowJo, iniciando por seleccionar la región de linfocitos a partir del cual se seleccionan a los CD19+ para obtener la proliferación de los linfocitos B mediante la dilución de CFSE. Así mismo se selecciona a los CD4+ para obtener la proliferación de los linfocitos T mediante la dilución de CFSE.

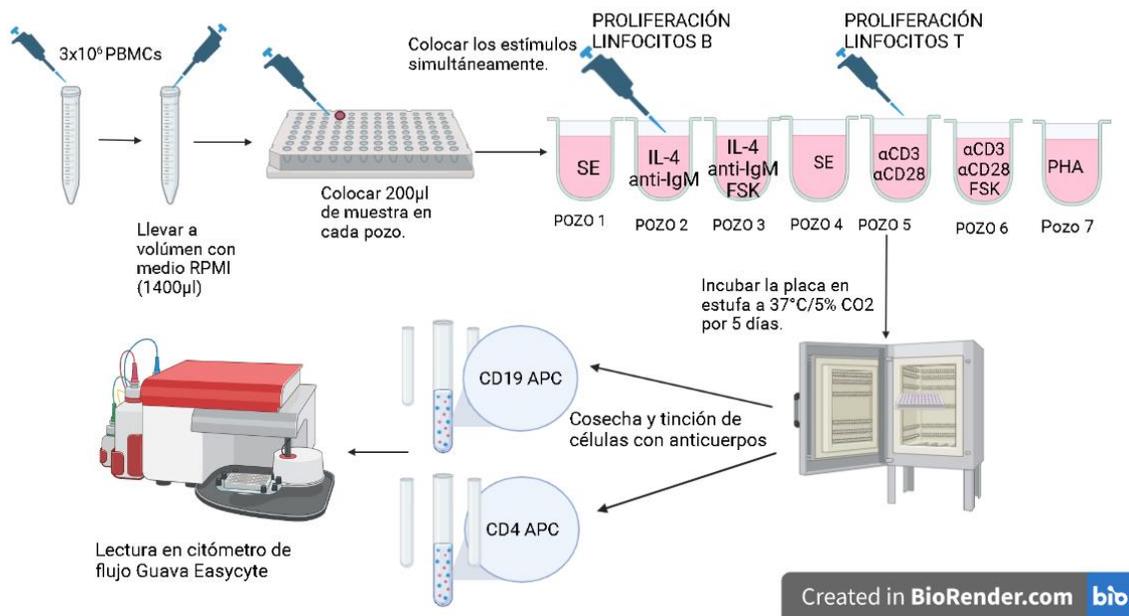


Figura 10. Procedimiento para la determinación de la proliferación de linfocitos B y T. Las PBMCs se tiñeron con CFSE y se colocaron en cultivo con diferentes anticuerpos y citocinas para inducir su proliferación. Posterior al tiempo de incubación, las células se analizaron mediante citometría de flujo.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante una U- Mann- Whitney ya que se tienen datos no pareados. Para la determinación de la expresión de MHC los datos comparados fueron los factores calculados a partir de los valores de IMF, para CD71 y CD86 se utilizaron los factores calculados a partir de los datos de porcentaje de expresión arrojados de Flowjo y, por último, los datos de proliferación se tomaron del porcentaje de proliferación que se muestra en el histograma. En cada uno de los ensayos se realizó la comparación de los resultados obtenidos sin añadir FSK y al agregar FSK utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0.

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DE MHC CLASE I Y II.

Para determinar el porcentaje de expresión de MHC clase I y II, se realizó un análisis con el programa FlowJo seleccionando la región de linfocitos al graficar tamaño (FSC) contra granularidad (SSC). A partir de esta región, se identificó a los linfocitos B de acuerdo con su expresión de CD19 y se obtuvo la IMF mediante el histograma. (Figura 11)

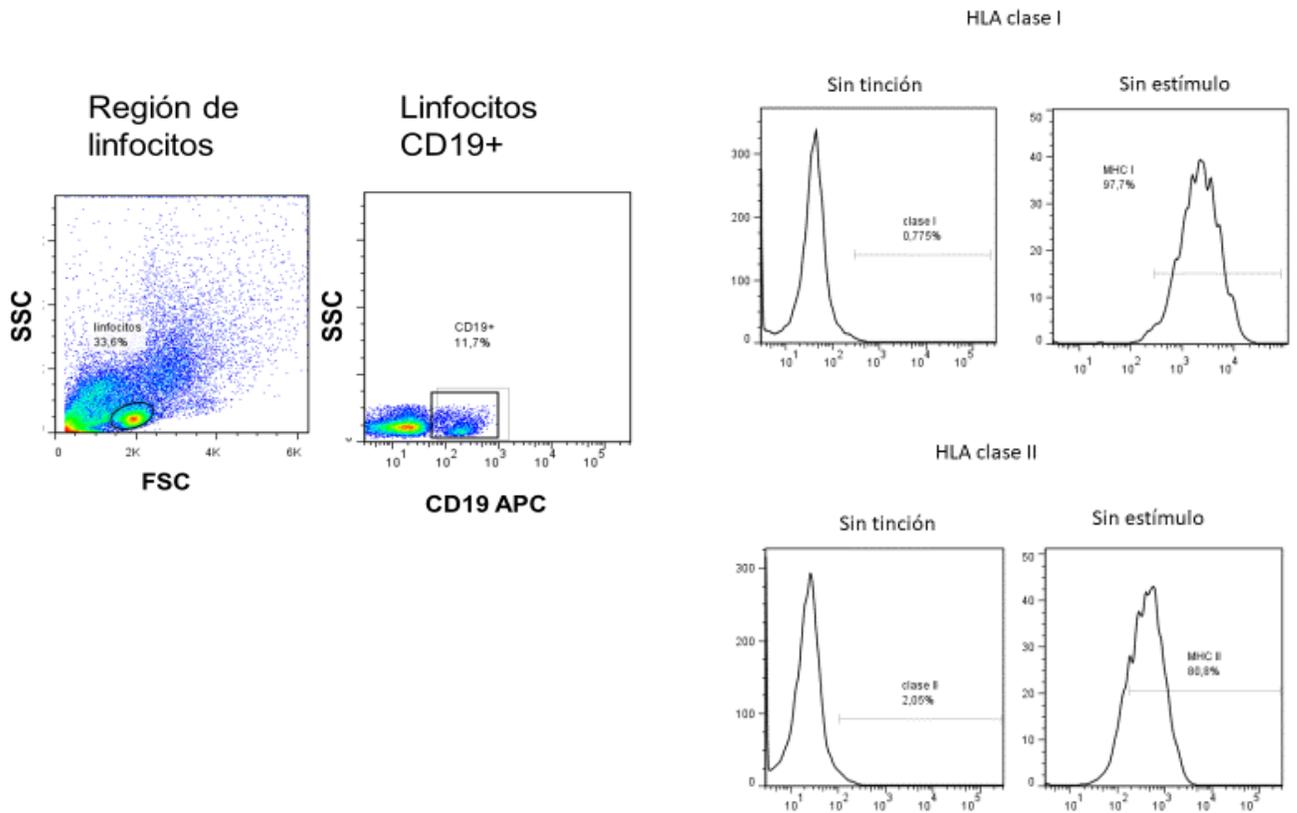


Figura 11. Análisis de la población de linfocitos para determinar la expresión de HLA clase I y II. De izquierda a derecha el primer y tercer histograma muestran una muestra sin tinción, con los cuales se delimitaron los valores positivos. El segundo y cuarto histograma representan la expresión basal de las moléculas de clase I y II. De acuerdo con la escala, se considera un valor positivo a partir de 102.

Se determinó la IMF de 10 muestras para MHC I y 9 muestras para MHC II, bajo tres diferentes condiciones, las cuales se mencionan a continuación: sin estímulo (SE), estimulado con IgM / IL-4 y con IgM/IL-4/FSK. Se obtuvieron los histogramas y a partir de ellos se obtuvo la intensidad media de Fluorescencia (IMF). (Figura 12). Para interpretar los resultados obtenidos, se decidió calcular un factor que nos permitiera saber cuántas veces más se expresa la molécula en ausencia y presencia de FSK comparado con un control. Para ello se realizó el cálculo de un factor, como se muestra en el siguiente ejemplo.

$$SE(control) = \frac{2844}{2844} = 1$$

$$IgM = \frac{3429}{2844} = 1.205$$

$$FSK = \frac{2887}{2844} = 1.015$$

Muestra	IMF (Valores obtenidos de FlowJo)			Factor IMF (valores obtenidos con el cálculo)		
	SE	IgM/IL-4	IgM/IL-4/FSK	SE	IgM/IL-4	IgM/IL-4/FSK
Control 1	2844	3429	2887	1	1.205	1.015

Tabla 4. Factores obtenidos para la muestra 1 a partir del cálculo utilizando los valores de IMF

El cálculo anterior se aplicó en cada una de las muestras para cada uno de los estímulos utilizados tanto para clase I como para clase II y se realizó una base de datos con los cuales se realizó la prueba estadística. (Tabla 5 y 6)

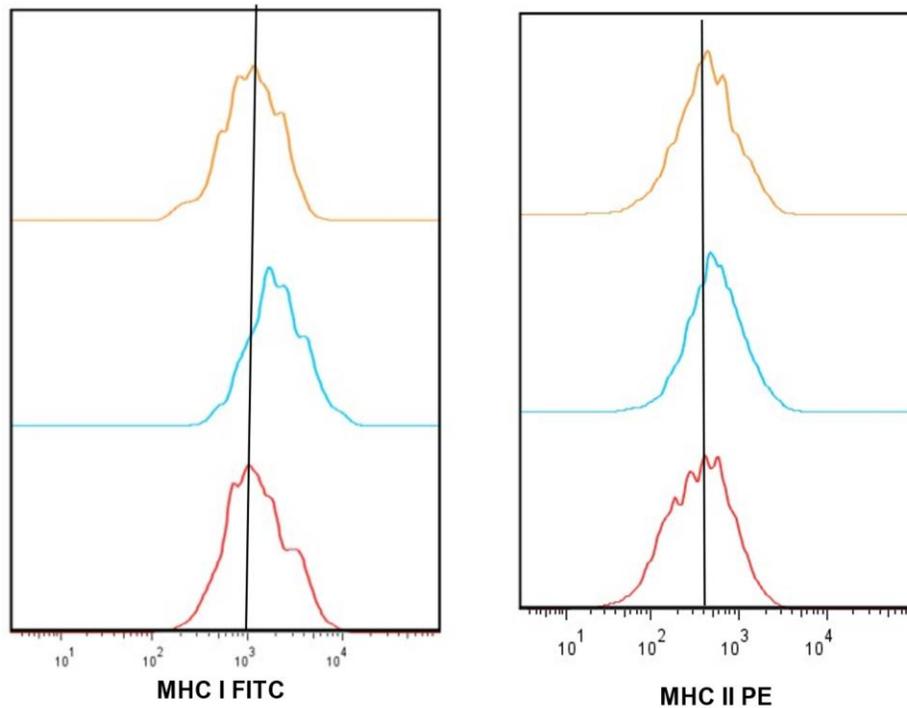
--	--

Control	SE	anti-IgM/ IL-4	anti-IgM/ IL-4/FSK
1	1	1.049	1.181
2	1	1.205	1.015
3	1	1.525	0.806
4	1	0.923	0.775
5	1	0.780	0.938
6	1	1.612	0.818
7	1	1.415	1.074
8	1	1.708	1.046
9	1	1.156	0.930
10	1	1.004	0.914

Tabla 5. Factores obtenidos a partir de los valores de IMF de las 10 muestras analizadas para determinar la expresión de HLA clase I.

Control	SE	anti-IgM/ IL-4	anti-IgM/ IL-4/FSK
1	1	1.146	1.128
2	1	1.202	0.994
3	1	1.362	0.672
4	1	0.866	0.693
5	1	0.894	1.077
6	1	0.928	0.795
7	1	1.216	0.394
8	1	1.111	0.595
9	1	1.048	0.615

Tabla 6. Factores obtenidos a partir de los valores de IMF de las 10 muestras analizadas para determinar la expresión de HLA clase II.



		IMF	
ESTÍMULO		MHC clase I	MHC clase II
■	SE	1602	469
■	Anti- IgM	2244	657
■	Anti-IgM/ FSK	1292	545

Figura 12. Representación de los histogramas obtenidos mediante el programa flowjo a partir de una muestra bajo las tres diferentes condiciones, se observan las pequeñas diferencias en los valores de la IMF cuando se agrega la FSK. Los gráficos que se muestran fueron obtenidos para cada una de las muestras.

Una vez que se obtuvieron los histogramas y se calcularon los factores se realizó el análisis estadístico, el cual consistió en realizar una prueba U Mann-Whitney ya que se tenían datos no pareados, con la finalidad de conocer si había una diferencia significativa en la expresión de MHC tanto de clase I como de clase II en presencia o ausencia de FSK. En la figura 13 A se puede observar que la expresión de MHC clase I tiende a inhibirse cuando se agrega la FSK, y que la diferencia resulta ser

estadísticamente significativa ($p=0.0355$). La expresión de MHC clase II también muestra una tendencia a la baja cuando se agrega FSK, obteniéndose una diferencia significativa. ($p=0.0106$)

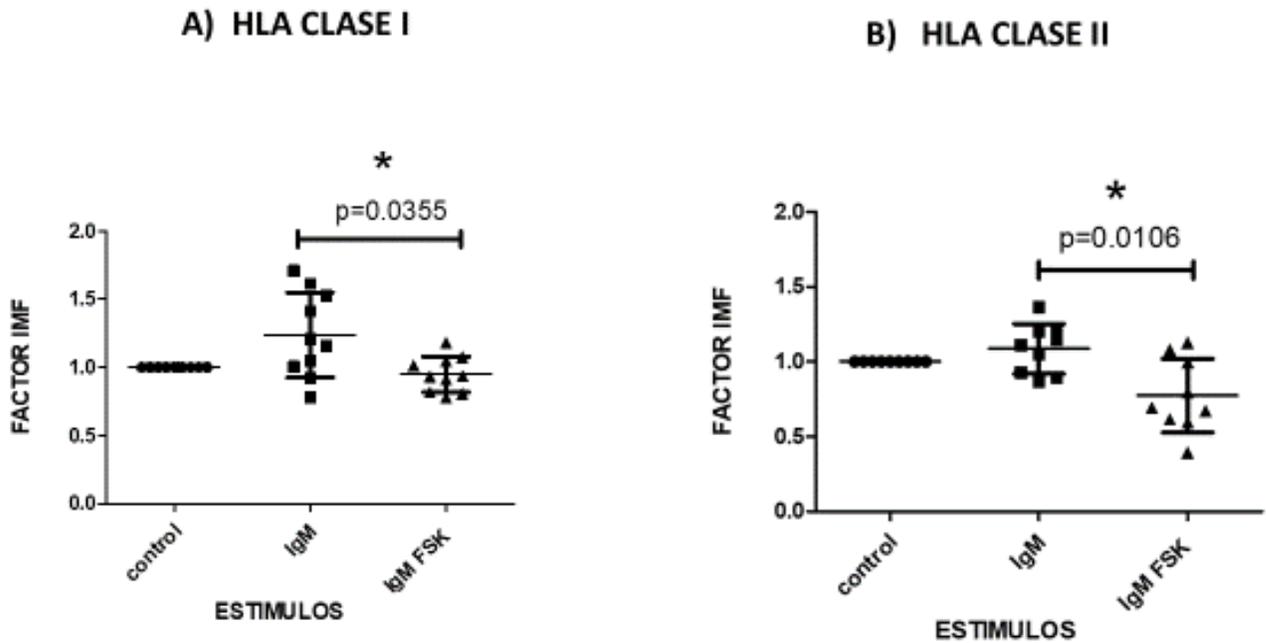


Figura 13. A) Expresión de MHC clase I ($n=10$) y B) Expresión de MHC clase II ($n=9$). Los datos mostrados se obtuvieron al graficar los factores de IMF contra los diferentes estímulos utilizados. En ambos casos se obtuvieron diferencias significativas.

2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA FORSKOLINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE CD71 EN LINFOCITOS B Y T

Uno de los primeros marcadores utilizados para observar el efecto de la Forskolina sobre la activación de los linfocitos B y T fue el CD71. Con el análisis de citometría se seleccionó la población de linfocitos T mediante la expresión de CD4. De este análisis se obtuvieron los histogramas y los respectivos porcentajes de expresión. Los linfocitos B se seleccionaron a partir de la expresión de CD19 y a partir de aquí se obtuvo el porcentaje de expresión de CD71. (Figura 14)

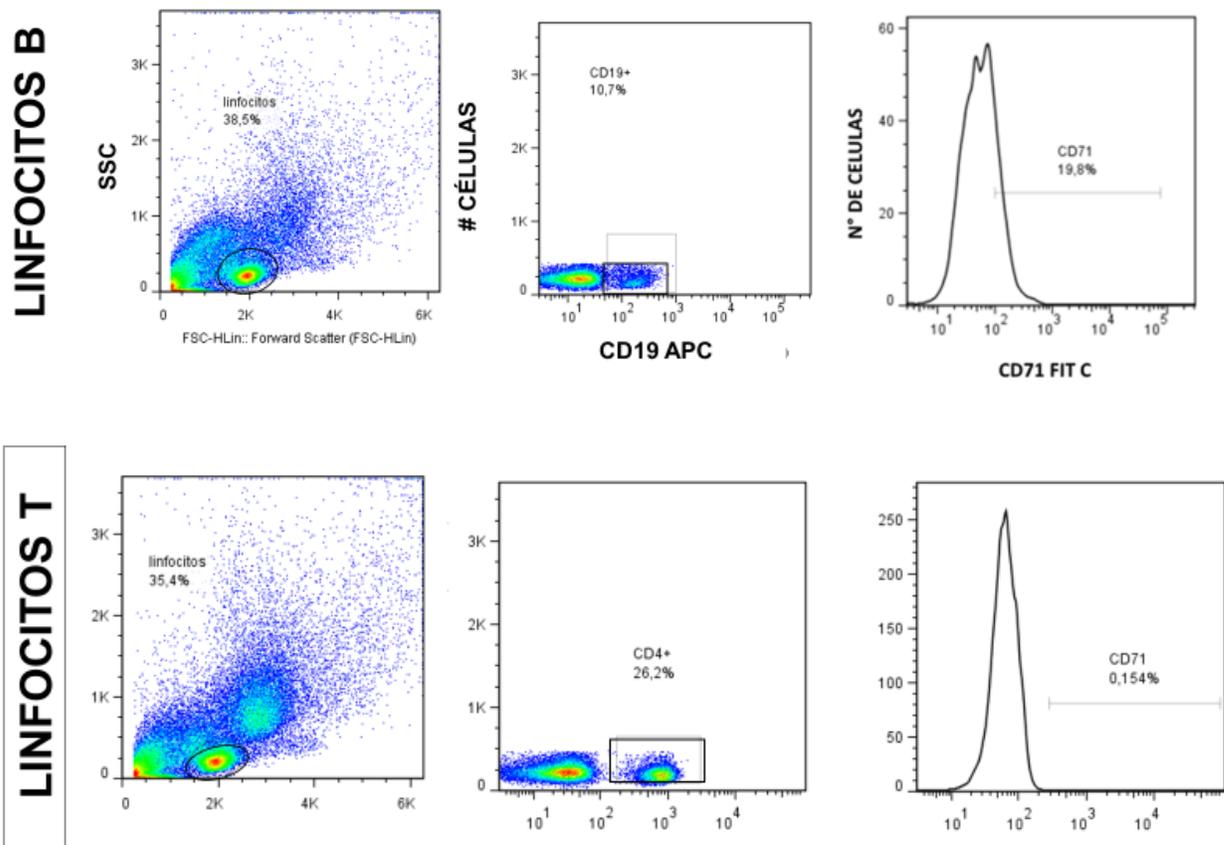
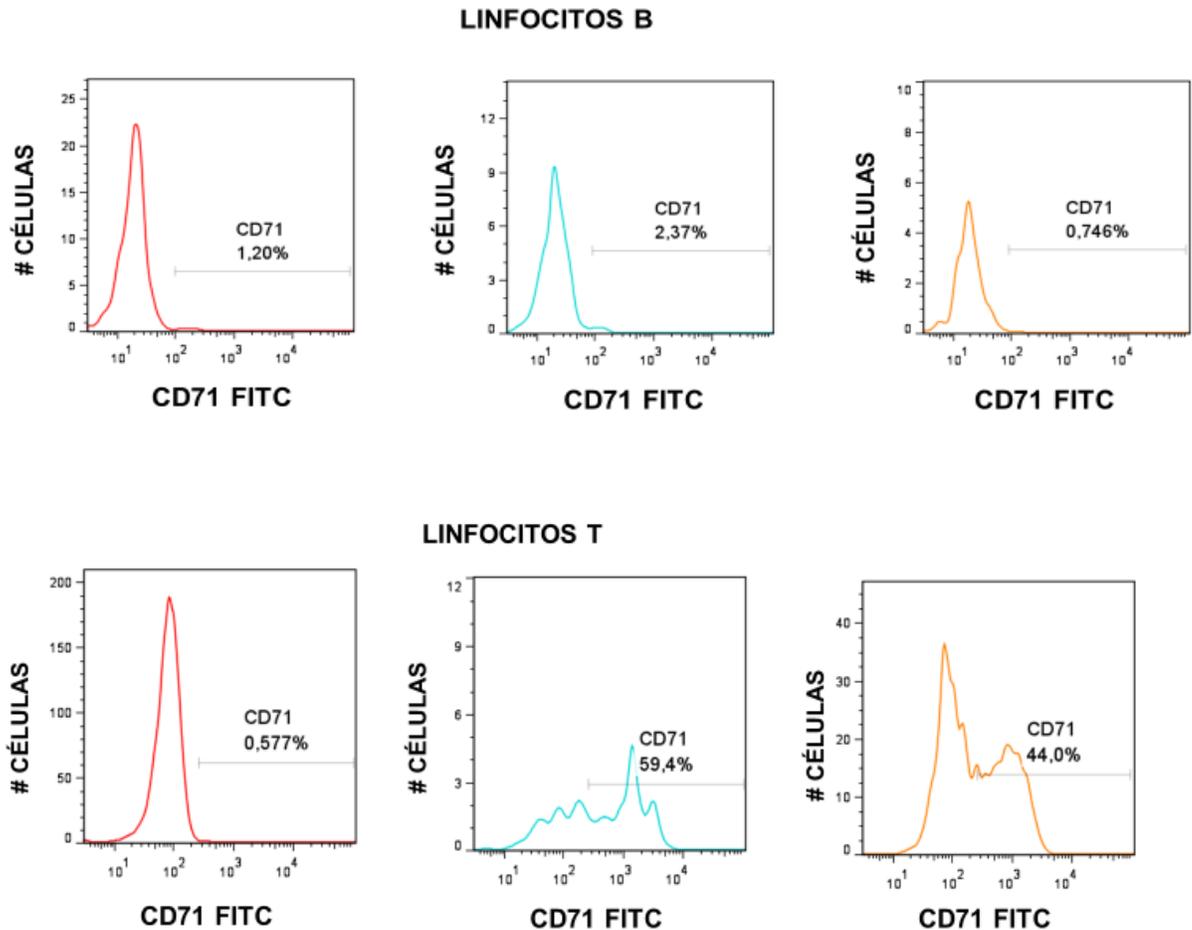


Figura 14. Estrategia de análisis para la determinación de la expresión de CD71. Los linfocitos T se seleccionaron mediante la expresión de CD4 mientras que los linfocitos B mediante la expresión de CD19. A partir de estas regiones se obtuvo el histograma junto con el porcentaje de expresión de CD71. El punto de corte se definió con la expresión del receptor de la muestra sin estimular. Gráficamente los valores positivos se tomaron a partir de 10^2 .

Del análisis anterior se obtuvieron los histogramas para cada una de las diferentes condiciones: SE, IgM/IL-4 e IgM/IL-4/FSK para los linfocitos B y en el caso de los linfocitos T: Sin estímulo, anti-CD3/ anti-CD28 y anti-CD3/anti-CD28/FSK (Figura 15). Una vez que se obtuvieron los porcentajes de expresión, se calcularon los factores correspondientes, de manera muy similar a lo que se hizo con la expresión de MHC y se realizó el análisis estadístico. Para ello, se realizó una prueba U Mann-Whitney para comparar los resultados obtenidos entre el grupo estimulado sin FSK

y el grupo al que se le agregó la FSK. Se consideraron diferencias significativas con un valor de $p > 0.05$. (Figura 16).



	LINFOCITOS B	% DE EXPRESIÓN	LINFOCITOS T	% DE EXPRESIÓN
	ESTÍMULO		ESTÍMULO	
■	SE	1.20	SE	0.577
■	Anti-IgM	2.37	Anti-CD3/anti-CD28	59.4
■	Anti-IgM/FSK	0.746	Anti-CD3/anti-CD28/FSK	44.0

Figura 15. Representación de los histogramas obtenidos con el programa Flowjo para la determinación del porcentaje de expresión de CD71 para linfocitos B (A) y linfocitos T (B). Se muestran los histogramas bajo las tres diferentes condiciones.

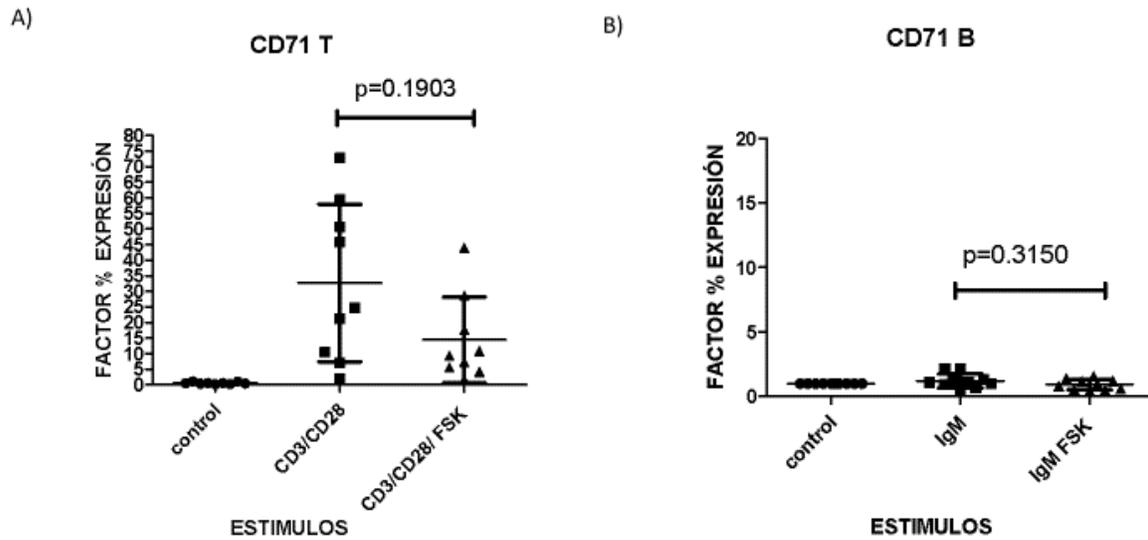


Figura 16. Resultados obtenidos para la expresión CD71 en linfocitos B (n=9) y linfocitos T(n=9). Los datos se presentan como los factores de porcentaje de expresión con respecto a las diferentes condiciones. No se observan diferencias significativas en ambos casos.

3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS B: EXPRESIÓN DE CD86

Al observar que CD71 no era un buen marcador para observar la activación de los linfocitos B se decidió utilizar CD86 con el objetivo de obtener mejores resultados, ya que, como se mencionó anteriormente, CD86 es una proteína transmembrana importante durante la sinapsis inmunológica entre linfocitos B y linfocitos T.

Para ello, se seleccionó la región de linfocitos a partir de los cuales se seleccionaron a los linfocitos B (CD19+). A partir de aquí se obtuvo el porcentaje de CD86 de acuerdo con el histograma. El tratamiento de los datos fue similar al descrito anteriormente para determinar la expresión de MHC. (Revisar tabla 1)

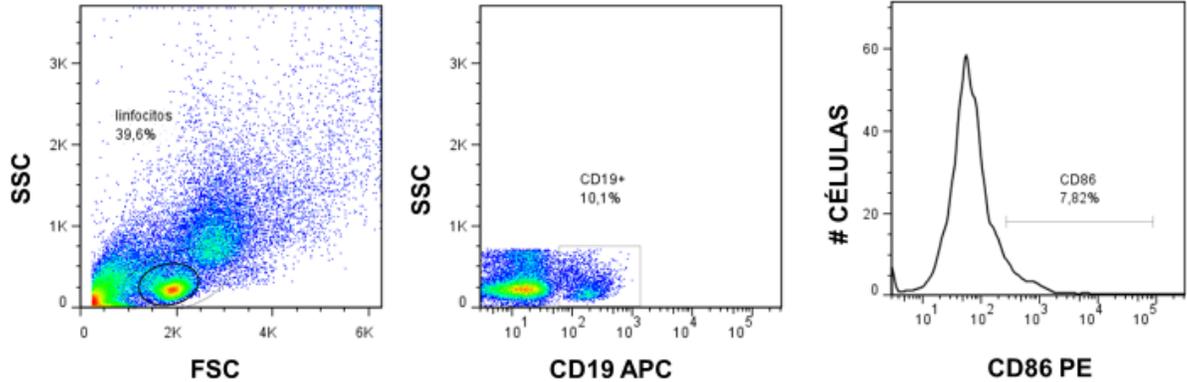


Figura 17. Análisis de la población de linfocitos para determinar la expresión de CD86. El análisis se realizó en la región de linfocitos. A partir de ahí se seleccionaron los linfocitos B (CD19+) y finalmente se obtuvo el porcentaje de CD86.

Debido a que el ensayo se realizó al final del trabajo experimental, solo se pudieron analizar 5 muestras bajo las siguientes condiciones: Sin estímulo, IgM/IL-4 e IgM/IL-4/FSK. Se obtuvieron los histogramas de cada muestra con sus respectivos porcentajes de expresión bajo las tres diferentes condiciones (Figura 18) y posteriormente se realizó el cálculo de los factores para realizar el análisis estadístico.

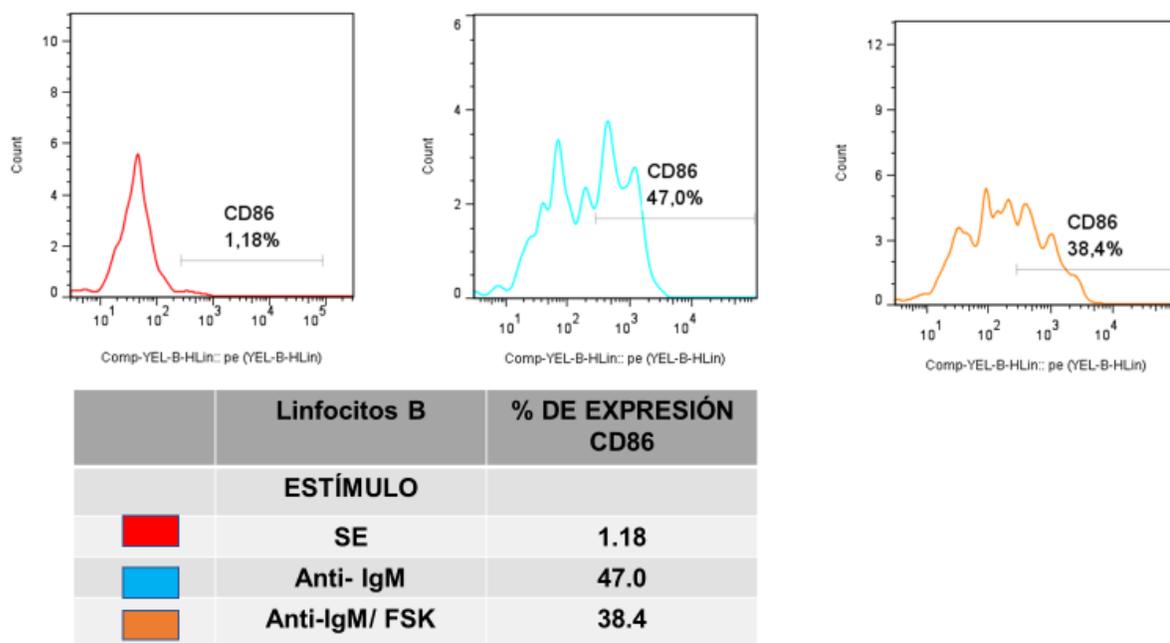


Figura 18. Representación de los histogramas obtenidos con sus respectivos porcentajes de expresión mediante el programa Flowjo para las diferentes condiciones de estímulo.

Finalmente se realizó una prueba estadística U Mann-Whitney para saber si había diferencias significativas entre el grupo estimulado sin FSK y el grupo al que se le añadió FSK. No se obtuvieron diferencias significativas entre ambos grupos. (p=0.6905)

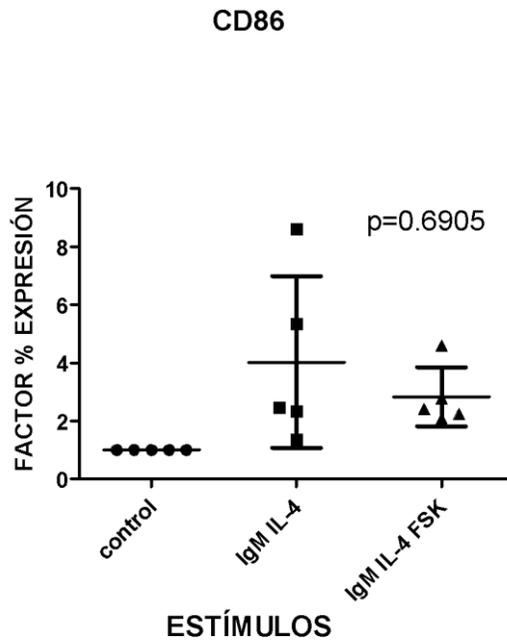


Figura 19. Resultados obtenidos para la expresión CD86 en linfocitos B. (n=5). Los datos se presentan como los factores de porcentaje de expresión con respecto a las diferentes condiciones. No se observan diferencias significativas ($p=0.6905$)

4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA FORSKOLINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS B Y T

Se determinó la proliferación de los linfocitos B bajo el efecto de la FSK. Para ello se realizó un análisis mediante citometría de flujo en la cual se seleccionaron a los linfocitos B mediante la expresión de CD19 y a partir de aquí se obtuvieron los histogramas correspondientes para cada una de las condiciones: SE, IgM/IL-4 e IgM/IL-4/FSK. El mismo análisis se realizó para determinar la proliferación de los linfocitos T, seleccionando la población que expresara CD4. (Figura 20)

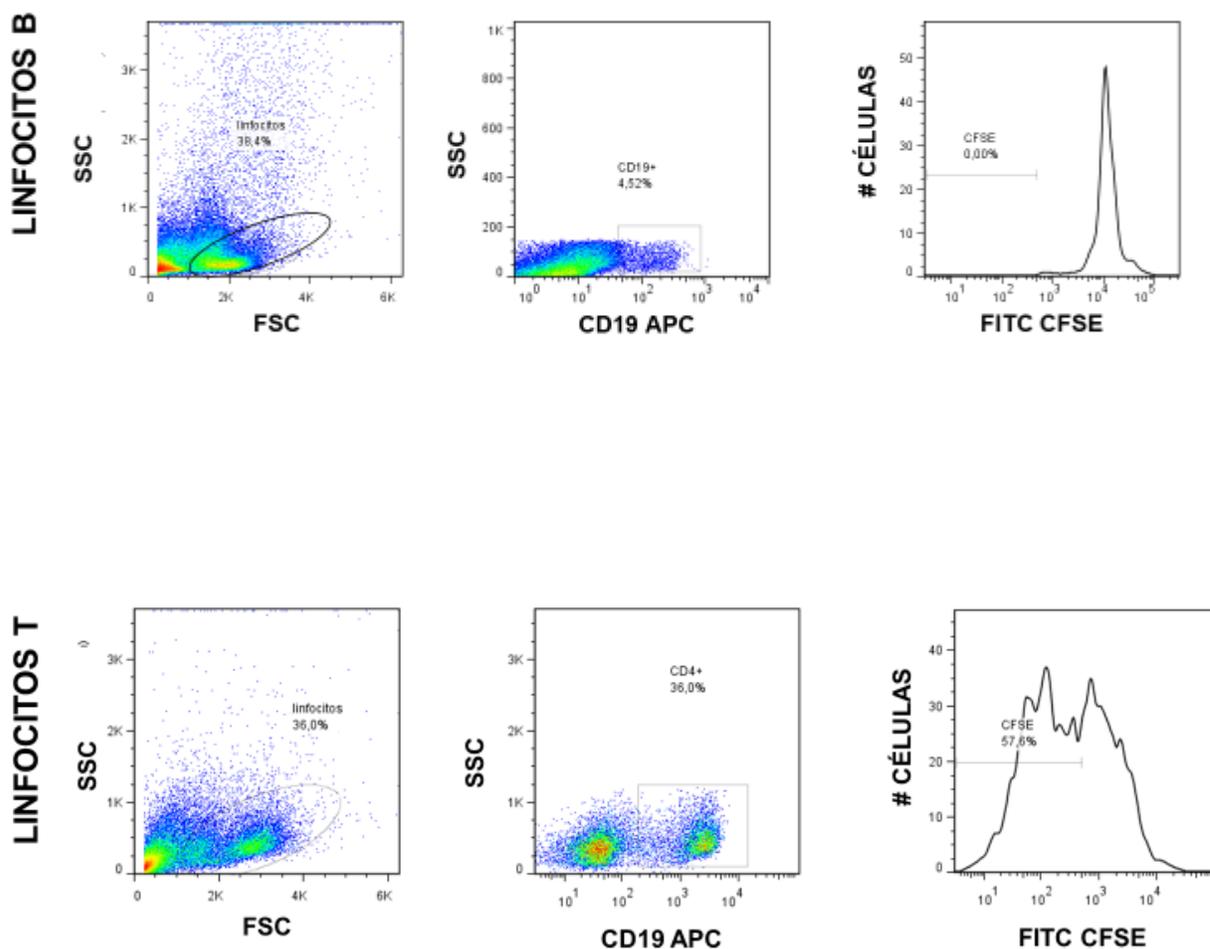


Figura 20. Estrategia de análisis para la determinación de la proliferación de linfocitos B y T. Las poblaciones de interés se seleccionaron mediante la expresión de CD4 y CD19 para los linfocitos T y B respectivamente. A partir de estas regiones se obtuvieron los histogramas correspondientes a las diferentes condiciones con sus respectivos porcentajes de expresión.

Se realizó el análisis anterior para obtener los porcentajes de proliferación en presencia y ausencia de FSK para 8 muestras de linfocitos B y 7 muestras para linfocitos T. Se obtuvieron los histogramas en las diferentes condiciones para los dos tipos celulares (Figura 21) y se realizó el análisis estadístico utilizando una

prueba U Mann Whitney con la finalidad de conocer si existía alguna diferencia significativa en el porcentaje de proliferación cuando se agrega la FSK. Los valores se tomaron como significativos cuando $p > 0.05$ por lo que podemos ver que no obtuvimos ninguna diferencia significativa en ambos tipos celulares. (Figura 22).

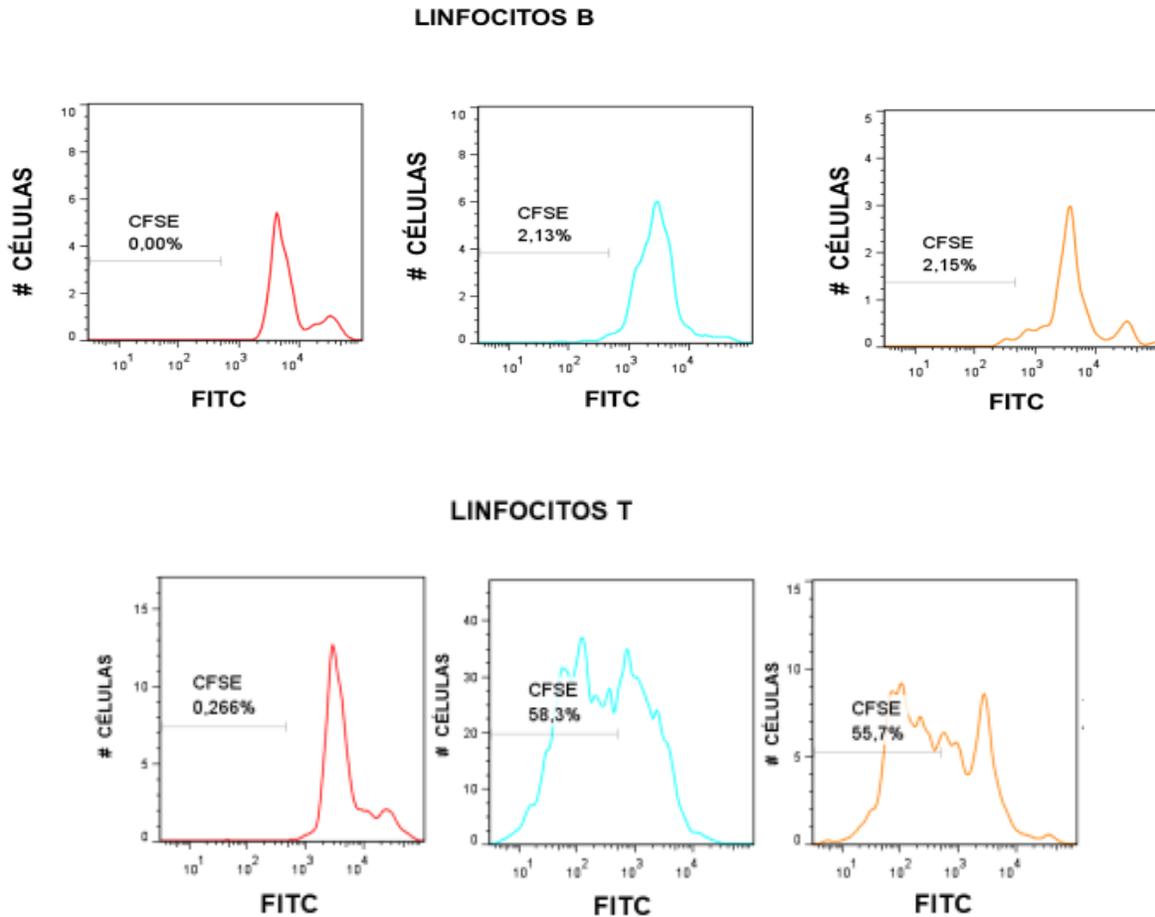
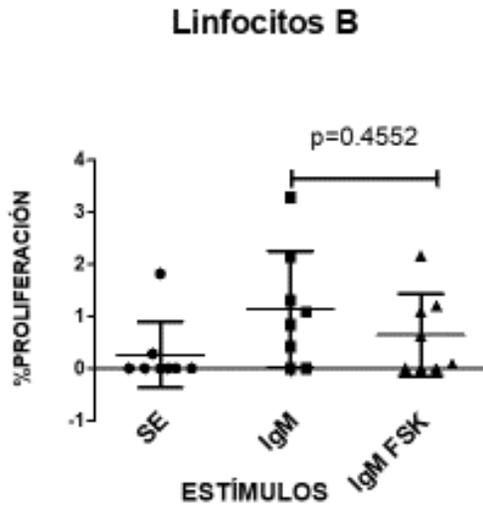


Figura 21. Representación de los histogramas obtenidos con el programa Flowjo para la determinación del porcentaje de proliferación de linfocitos B (A) y linfocitos T (B), bajo las diferentes condiciones.

A)



B)

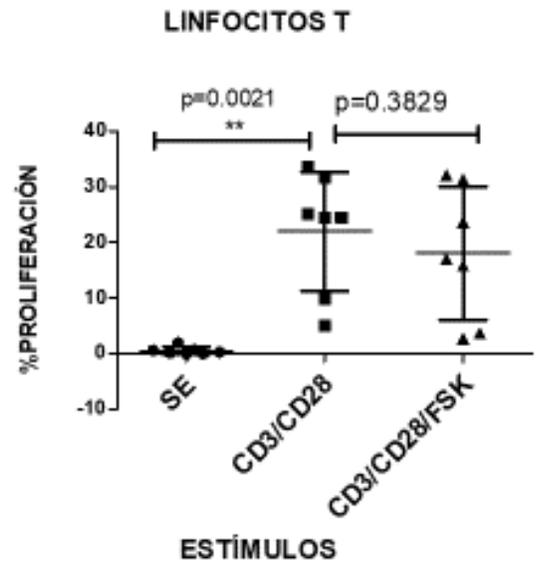


Figura 22. A) Porcentaje de proliferación de los linfocitos B bajo tres diferentes estímulos ($n=8$), no se observan diferencias significativas $p=0.3428$. B) porcentaje de proliferación de los linfocitos T ($n=7$), no se observan diferencias significativas $p=0.3829$.

DISCUSIÓN

La Forskolina ha sido bien caracterizada por ser una molécula capaz de inhibir la proliferación de los linfocitos T a través de bloquear las señalizaciones vía TCR mediante la interacción con PKA. Debido a que PKA también podría estar implicado en las vías de señalización de los linfocitos B, se plantearon ensayos para determinar la proliferación y la expresión de marcadores de activación en los linfocitos B ya que hasta el momento no hay información al respecto. Para inducir la activación de las células B se utilizó anti-IgM a concentraciones recomendadas por la marca comercial para el caso de células humanas, además también se decidió agregar IL-4 a una concentración subóptima, para evitar un efecto de esta citocina sobre la activación de las células B. Dado que la activación mediada por BCR induce la expresión de marcadores y moléculas en la superficie de la célula necesarios para su activación, proliferación y supervivencia, incluyendo las moléculas de MHC clase I y clase II, resultó de interés determinar su expresión bajo el efecto de la forskolina. (Haylett, Koch y Rink. 2009). Nuestros resultados obtenidos muestran que la FSK disminuye la expresión tanto de HLA clase I como de HLA clase II y que hay una diferencia estadísticamente significativa en ambos casos $p=0.0355$ y $p=0.016$, respectivamente (Figura 13). En este caso el uso de los factores nos permitió homogeneizar los datos obtenidos e interpretarlos como las veces que se expresa o se inhibe la expresión del receptor en cada una de las condiciones. Con estos resultados podemos sugerir que PKA participa en la activación de los linfocitos B después de la estimulación del BCR y este efecto lo podemos observar en la inhibición de la expresión de las moléculas de HLA. Es probable que PKA inhiba la activación de los linfocitos B mediante la actividad sobre la vía de señalización de NF- κ B ya que este factor de transcripción regula la expresión de HLA clase I (Pick, 2012), aunque también podría estar actuando en algún otro nivel dentro de la cascada de señalización. Así mismo se sabe que PKA puede inhibir la capacidad de CIITA para activar la transcripción de HLA II en células presentadoras de antígeno lo que se traduce en la disminución de la expresión de HLA clase II (Li.G, 2001).

Al observar que las condiciones implementadas fueron adecuadas para inducir la activación de los linfocitos B, se continuó a determinar la expresión de CD71 una molécula de activación expresada no sólo en linfocitos B sino también en linfocitos T. CD71 es una molécula conocida como receptor de transferrina (TF) que se expresa cuando las células se encuentran en división celular. (Ponka, 1999). De acuerdo con la literatura, el gen *TF*, se encuentra apagado mientras los linfocitos se encuentran en estado de reposo, pero cuando estas células se estimulan, la expresión de *TF* se induce de manera rápida y transitoria durante su activación. (Kronke.et.al.1985), por lo que el número de moléculas de CD71 es mayor en células con alta tasa de proliferación (Smilevska, 2006). En la figura 15 (B) se muestran los resultados que se obtuvieron al estimular las células B con anti-IgM e IL-4, donde se puede observar que no fue posible inducir la expresión de CD71 en los linfocitos B. Este resultado es congruente ya que, como veremos más adelante no fue posible inducir la proliferación de los linfocitos y de acuerdo con Smilevska existe una relación directamente proporcional entre la proliferación y la expresión de CD71, por lo que al no haber proliferación tampoco habría expresión del receptor. En este sentido podemos decir que CD71 es un buen marcador de activación tardío pero también un buen marcador de proliferación. Por otra parte, tras la estimulación del TCR con anti-CD3 y anti-CD28, los linfocitos T si presentaron un aumento en la expresión de CD71 y una disminución importante al agregar la FSK. Al realizar el análisis estadístico no se obtuvieron diferencias significativas ($p=0.0973$). Con estos resultados podemos discutir dos cosas: la primera es que probablemente al agregar el anti-CD28 a nuestros ensayos para estimular a los linfocitos T, se haya inducido una activación adicional mediante otra vía de señalización que no se ve afectada por PKA y haya ocasionado una sobreexpresión de CD71 que no se vio inhibida lo suficiente por la concentración FSK (Figura 16A). La segunda es que el mecanismo por el cual se regula la expresión de TF no se tiene claro, y lo único que se sabe es que los niveles altos de AMPc inhiben la expresión de este receptor en linfocitos T. (Neckers.et.al.1984) Por lo que el efecto de inhibición observado se debe al aumento del AMPc inducido por la FSK, aunque este efecto no haya sido significativo podemos ver una tendencia.

Observando que CD71 no fue un buen marcador de activación para los linfocitos B bajo las condiciones empleadas en este proyecto, se prosiguió a buscar otra molécula involucrada en la activación. En este caso se decidió determinar la expresión de CD86, ya que como se mencionó en los antecedentes la activación de los linfocitos B vía BCR induce la expresión de moléculas coestimuladoras como CD86.

La figura 18 muestra el nivel de expresión de CD86 en células B bajo las tres diferentes condiciones de estímulo. Como se puede observar en dicha figura, fue posible inducir la expresión de este receptor en algunas muestras y en algunas otras la expresión se mantiene a la baja. Dados estos resultados tan variables entre cada una de las muestras se decidió nuevamente realizar el cálculo de los factores para homogeneizar nuestros resultados. La figura 19 muestra los resultados donde no se observan diferencias significativas al comparar el grupo estimulado en ausencia de FSK con el grupo estimulado en presencia de FSK ($p=0.6905$). A pesar de no obtener diferencias significativas, podemos decir que CD86 resultó ser un mejor marcador de activación en los linfocitos B, ya que al estimular a las células bajo nuestras condiciones se logró inducir su expresión, aunque debido a la poca cantidad de muestras analizadas no es posible tener una conclusión sobre el efecto de la FSK sobre este receptor. Es importante mencionar que la expresión de CD86 de acuerdo con algunos artículos sigue siendo buena a las 48 horas solo estimulando BCR (Adam P.2002) por lo que no se utilizaron otros estímulos, además de que el haberlos utilizado activaría vías de señalización que no son de interés en este trabajo. El motivo de activar el BCR es que se activa la vía de señalización de NF- κ B, la cual, se ha descrito regula la expresión de CD86 (Podojil, 2004). Dado lo anterior es importante mencionar dos cosas, la primera de ellas es que se sabe que existe una vía canónica de NF κ B, activada vía el BCR, así como una vía no canónica que es activada por otros receptores como lo son los PRRs, por lo que es posible que, la expresión de CD86 se vea influenciada en mayor medida por la vía no canónica que no se exploró en este trabajo. Y la segunda de ellas es que la vía de PI3K también regula la expresión de CD86 (Kin, 2006, Marshall-Clarke 2003), pero dado que en este trabajo no utilizamos estímulos para

activar esta vía de señalización, no es posible saber si PKA tiene o no efecto sobre la activación de los linfocitos B mediante esta vía.

Finalmente para nuestro ensayo de proliferación, los linfocitos T y B se tiñeron con CFSE a la concentración y tiempo de incubación indicada por la marca comercial.

En el caso de los linfocitos B, se obtuvieron los histogramas y los porcentajes de proliferación mediante el programa Flowjo después de realizar el análisis de las poblaciones (Figura 20). La representación de los histogramas obtenidos para la proliferación de los linfocitos B se muestran en la figura 21A donde gráficamente podemos observar que no fue posible inducir su proliferación utilizando IL-4 en combinación con anti-IgM a las concentraciones de 0.01 ng/ml y 0.5 µg/ml respectivamente. Los porcentajes de proliferación obtenidos se analizaron estadísticamente realizando una prueba U Mann Whitney donde no se encontró diferencia significativa entre el grupo estimulado sin FSK y el grupo estimulado en presencia de FSK. (Figura 22).

Con estos resultados, podemos concluir que las condiciones de cultivo no fueron suficientes para inducir la proliferación in vitro de los linfocitos B humanos ya que se requiere de estímulos adicionales a los empleados, como es la adición de un ligando de TLR o la adición de un agonista de moléculas estimuladoras (Ruprecht, 2006; Xinian, 2010). Pero, el haber utilizado este tipo de estímulos adicionales para activar a las células B, desviaba el objetivo principal de este proyecto, que era, determinar el efecto de la FSK en la respuesta de la señalización inducida por BCR, por lo que se decidió no utilizarlos. Actualmente, se encuentra poca información descrita para el papel que desempeña PKA en la vía de señalización de los linfocitos B, por lo que no sabemos si habrá un efecto o no en su proliferación. Lo poco que se ha reportado, es que un aumento en los niveles de AMPc inducido por FSK o por otro fármaco como la adenosina disminuyen la actividad de NF-κB inducida por la activación de BCR (Minguet, 2005).

En el caso de los linfocitos T, aunque el efecto que tiene la FSK sobre la activación del TCR ya ha sido muy bien documentado, los trabajos que se han realizado

implican cultivos con células murinas y líneas celulares, pero no en células de sangre periférica humana como los ensayos planteados en este trabajo. Por lo que nuestra idea fue intentar replicar lo que ya se sabe en células diferentes con estímulos diferentes como el anti-CD28 y a una concentración de FSK similar a la reportada en los artículos.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 21B donde podemos observar que si se logró inducir la proliferación de las células utilizando anti-CD3 (2µg/ml), anti-CD28 (2µg/ml), pero no fue posible observar un efecto inhibitorio utilizando FSK 30 µM.

Estos resultados nos llevan a sugerir varios puntos. Uno de ellos es que en los ensayos reportados utilizan únicamente anti-CD3 para inducir la fosforilación de la cadena ζ del TCR e iniciar la cascada de señalización (Torkel, et.al.2001). Esto sugiere que la señalización que induce el anti-CD3 es afectada por PKA, sin embargo el utilizar el anti-CD28 no nos permitió observar un efecto inhibitorio puesto que induce una mayor proliferación o posiblemente este anticuerpo activa vías de señalización que no se ven afectadas por PKA. Un segundo punto es que estos ensayos también sugieren una preincubación de las células con FSK a una concentración de 5 µM durante una hora antes de la estimulación con IL-2 y anti-CD3 para observar un efecto (Rodríguez, 2013). En otro trabajo, Park describe también una incubación con FSK antes de estimular con anti-CD3 (Park, 1992) De manera que este detalle resulta interesante ya que nosotros decidimos agregar los estímulos simultáneamente incluyendo a la FSK. Por lo que nuestros resultados quizá se vieron diferentes por esta circunstancia. Un tercer punto de analizar es que las células con las que se trabaja en estos ensayos pertenecen a líneas celulares como son las células Jurkat o MT-2 y no células de sangre periférica como en nuestro caso, por lo que los resultados pueden variar ya que las células de líneas celulares muchas veces ya están modificadas genéticamente y no reaccionan de la misma forma en que lo haría una célula en estado nativo.

CONCLUSIONES

- PKA tiene un efecto sobre la activación de los linfocitos B reflejado en la expresión de HLA después de la estimulación de BCR.
- La vía de señalización inducida por anti-CD28 no es afectada por PKA por lo que no se inhibe la activación ni la proliferación de los linfocitos T
- No fue posible determinar el efecto de la FSK sobre la proliferación de los linfocitos B ya que es necesario de otros estímulos para lograr la proliferación.

PERSPECTIVAS

Resulta de interés plantear los ensayos de activación y proliferación de los linfocitos T utilizando únicamente anti-CD3 para ver cómo se comportan nuestros resultados. Además de optar por una pre incubación con FSK antes de la estimulación del TCR. Para el caso de los linfocitos B, incrementar el número de muestras para determinar el efecto de la FSK y dado que no es posible inducir su proliferación con anti-IgM una opción para determinar si PKA tiene algún efecto se podría estudiar la fosforilación de proteínas específicas en la vía de señalización.

REFERENCIAS

1. Abbas, A. K. (2015). *Inmunología celular y molecular*. Barcelona.España. Elsevier.
2. Adam P. Kohm, Afsaneh Mozaffarian, Virginia M. Sanders; B Cell Receptor- and β_2 -Adrenergic Receptor-Induced Regulation of B7-2 (CD86) Expression in B Cells¹. *J Immunol* 15 June 2002; 168 (12): 6314–6322. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.12.6314>
3. Althwaiqeb SA, Bordoni B. (2022).Histology, B Cell Lymphocyte. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560905/>
4. Aribi, Mourad. "Introductory Chapter: B-Cells" In Normal and Malignant B-Cell, edited by Mourad Aribi. London: IntechOpen, 2020. 10.5772/intechopen.90636
5. Arthur R, Valle-Argos B, Steele AJ, Packham G. Development of PROTACs to address clinical limitations associated with BTK-targeted kinase inhibitors. (2020). *Explor Target Antitumor Ther.* 1:131-52. <https://doi.org/10.37349/etat.2020.00009>
6. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "helper T cell". Encyclopedia Britannica, 12 Dec. 2021, <https://www.britannica.com/science/helper-T-cell>. Accessed 14 December 2022.
7. Cruz-Tapias Paola, Castiblanco J,Anaya JM.(2013). Major histocompatibility complex: Antigen processing and presentation. El Rosario university press.chapter 10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459467/>

8. Ebru, Aydin.Faehling Sebastian.et.al. (2021).Phosphoinositide 3-kinase signaling in the tumor microenvironment: what do we need to consider when treating chronic lymphocytic leukemia with PI3K inhibitors? *Frontiers in immunology*. DOI=10.3389/fimmu.2020.595818

9. Girard, Tanya, Denis Gaucher.et.al. (2014). CD80 and CD86 IgC domains are important for quaternary structure, receptor binding and co-signaling function. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.05.002>.

10. Haylett, RS, Koch, N y Rink, L. (2009). MHC class II molecules activate NFAT and the ERK group of MAPK through distinct signaling pathways in B cells.*Eur.J.Immunol*.1947-1955. <https://doi.org/10.1002/eji.200838992>

11. Huse Morgan. (2009). The T cell-receptor signaling network. *J Cell Sci* 1 May 2009; 122 (9): 1269–1273. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.042762>

12. Hwang, JR., Byeon, Y., Kim, D. et al. Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Exp Mol Med* 52, 750–761 (2020). <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0435-8>

13. Jacob Anand,Damon Cooney.et.al.(2002). Convergence of signaling pathway on the activation of ERK in b cells. *The journal of biological chemistry*. Volume 277.Issue 26. DOI:<https://doi.org/10.1074/jbc.M202485200>

14. Jellusova J, Rickert RC. (2016).The PI3K pathway in B cell metabolism. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. doi: 10.1080/10409238.2016.1215288

15. Kammer, Gary. (1988). The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase pathway and regulation of the immune response. *Immunology today*. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(88\)91220-0k](https://doi.org/10.1016/0167-5699(88)91220-0k)
16. Katikaneni, D. S., & Jin, L. (2019). B cell MHC class II signaling: A story of life and death. *Human immunology*, 80(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.04.013>
17. Keith R. Jerome. (2008). Viral modulation of T cell receptor signaling. *ASM journals*. doi: 10.1128/JVI.00059-08
18. Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Osborne, B. A. (2007). *Inmunología de kuby (6a. ed.)*. McGraw-Hill Interamericana.
19. Klausner, R. D., O'Shea, J. J., Luong, H., Ross, P., Bluestone, J. A., & Samelson, L. E. (1987). T cell receptor tyrosine phosphorylation. variable coupling for different activating ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 262(26), 12654-12659. Retrieved from www.scopus.com
20. Kurosaki, Tomohiro. (2011). Regulation of BCR signaling. *Molecular Immunology*. Pages 1287-1291. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.12.007>
21. Li, G., Harton, J. A., Zhu, X., & Ting, J. P. (2001). Downregulation of CIITA function by protein kinase a (PKA)-mediated phosphorylation: mechanism of prostaglandin E, cyclic AMP, and PKA inhibition of class II major histocompatibility complex expression in monocytic lines. *Molecular and cellular biology*, 21(14), 4626–4635. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.14.4626-4635.2001>

22. Lømo J, Blomhoff HK, Beiske K, Stokke T, Smeland EB. TGF-beta 1 and cyclic AMP promote apoptosis in resting human B lymphocytes. *J Immunol.* 1995 Feb 15;154(4):1634-43. PMID: 7836748.
23. Maddaly, Govind Pai.et.al. Receptors in signaling mechanisms for B-lymphocyte activation, proliferation and differentiation. Insights form both in vivo and in vitro approaches. (2010).Pages 4883-4894. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.08.022>.
24. Magee CN, Boenisch O, Najafian N. The role of costimulatory molecules in directing the functional differentiation of alloreactive T helper cells. *Am J Transplant.* 2012 Oct;12(10):2588-600. doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04180.x.
25. Marshall-Clarke, S., Tasker, L., Heaton, M. P., & Parkhouse, R. M. (2003). A differential requirement for phosphoinositide 3-kinase reveals two pathways for inducible upregulation of major histocompatibility complex class II molecules and CD86 expression by murine B lymphocytes. *Immunology*, 109(1), 102–108. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01638.x>
26. Matsuuchi, Linda. Michael R Gold. (2001).New views of BCR structure and organization. *Current opinion in immunology.* Volume 13.Issue 3. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00215-6](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00215-6).
27. Minguet, S., Huber, M., Rosenkranz, L., Schamel, W. ., Reth, M. and Brummer, T. (2005), Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-κB pathway downstream of immunoreceptors. *Eur. J. Immunol.*, 35: 31-41. <https://doi.org/10.1002/eji.200425524>

28. Motamedi, Melika, Lai Xu, Shokrollan Elahi. (2016). Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers. *Journal of Immunological Methods*. Volume 437. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.08.002>.
29. Muntjewerff, Elke.M.et.al. (2020). Reverse signaling by MHC-I molecules in immune and non-immune cell types. *Frontiers in immunology*. DOI=10.3389/fimmu.2020.605958
30. Muraguchi A, Miyazaki K, Kehrl JH, Fauci AS. Inhibition of human B cell activation by diterpine forskolin: interference with B cell growth factor-induced G1 to S transition of the B cell cycle. *J Immunol*. 1984 Sep;133(3):1283-7. PMID: 6086754.
31. Murphy, K. *Inmunología de Janeway*, (2019). New York. El manual moderno.
32. National Research Council (US) Subcommittee on Immunotoxicology. *Biologic Markers in Immunotoxicology*. Washington (DC): National Academies Press (US); 1992. 2, The Structure and Function Of the Immune System And Mechanisms of Immunotoxicity. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK235674/>
33. Neckers LM, Yenokida G, James SP. The role of the transferrin receptor in human B lymphocyte activation. *J Immunol*. 1984 Nov;133(5):2437-41. PMID: 6090534.

34. Nicholas W. Kin, Virginia M. Sanders; CD86 Stimulation on a B Cell Activates the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and Phospholipase C γ 2/Protein Kinase C $\alpha\beta$ Signaling Pathways¹. *J Immunol* 1 June 2006; 176 (11): 6727–6735. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.11.6727>
35. Owen Judith A, Jenni punt, Sharon A stanford (2014).Kuby.Inmunologia.7°Ed. McGrawHill. Pp 1-46.
36. Pan Yun Ting Jenny. (2002).Genetic control of MHC class II expression.A Cell Press Journal.521-533. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00696-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00696-7)
37. Park, D. J., Min, H. K., & Rhee, S. G. (1992). Inhibition of CD3-linked phospholipase C by phorbol ester and by cAMP is associated with decreased phosphotyrosine and increased phosphoserine contents of PLC- γ 1. *Journal of Biological Chemistry*, 267(3), 1496-1501. Retrieved from www.scopus.com
38. Pavón Romero, Lennin. *Inmunología molecular, celular y traslacional*. (2016) USA. Wolkers Kluwer.
39. Pick Marjorie, Daniel Ronen, Ofra Yanuka, Nissim Benvenisty, Reprogramming of the MHC-I and Its Regulation by NF κ B in Human-Induced Pluripotent Stem Cells. (2012). *Stem Cells*, Volume 30. Pages 2700–2708, <https://doi.org/10.1002/stem.1242>
40. Ponka Prem, Chun Nam Lok. (1999). The transferrin receptor: role in health and disease. *The international Journal of Biochemistry & cell Biology*, 1111-1137. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00070-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00070-9).

41. Podojil, Joseph R. Nicholas W. Kin. Virginia M Sanders. (2004). CD86 and β_2 -Adrenergic Receptor Signaling Pathways, Respectively, Increase Oct-2 and OCA-B Expression and binding to the 3'-IgH Enhancer in B cells. *Journal of biological chemistry*. Vol.279. Issue 22. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M313096200>
42. Ramstad, Charlotte. Vibeke Sundvold, Heidi K. Johansen, Tor Lea. (2000). cAMP-dependent protein kinase (PKA) inhibits T cell activation by phosphorylating Ser-43 of Raf-1 in the MAPK/ERK pathway- *Cellular Signalling*. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(00\)00097-8](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(00)00097-8).
43. Reddy Manjula, Edward Eirikis, Cuc Davis, Hugh M. Davis, Uma Prabhakar. (2004). Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *Journal of Immunological Methods*. Volume 293, Issues 1–2 <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.07.006>.
44. Reem Al-Daccak, Nula Mooney, Dominique Charron. (2004). MHC signaling in antigen-presenting cells. *Current Opinion in immunology*. 108-113. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.11.006>.
45. Rodriguez G, Ross JA, Nagy ZS, Kirken RA. Forskolin-inducible cAMP pathway negatively regulates T-cell proliferation by uncoupling the interleukin-2 receptor complex. *J Biol Chem*. 2013 Mar 8; 288(10):7137-46. Doi: 10.1074/jbc.M112.408765. Epub 2013 Jan 22. PMID: 23341462; PMCID: PMC3591623
46. Ruprecht, C. and Lanzavecchia, A. (2006), Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur. J. Immunol.*, 36: 810-816. <https://doi.org/10.1002/eji.200535744>

47. Seamon KB, Daly JW. Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems. *J Cyclic Nucleotide Res.* 1981;7(4):201-24. PMID: 6278005.
48. Scupoli Maria Teresa, Giovanni Pizzolo. (2015) Signaling Pathways Activated by the B cell receptor in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Expert Rev Hematol.* 2012;5(3):341-348.
<https://www.medscape.com/viewarticle/767515>
49. Shah, K., Al-Haidari, A., Sun, J. et al. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Sig Transduct Target Ther* 6, 412 (2021).
<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00823-w>
50. Shahaf Gitit.et.al. (2016).B cell development in the bone marrow is regulated by homeostatic feedback exerted by mature B cells.*Frontier in immunology.* DOI=10.3389/fimmu.2016.00077
51. Shenker, Bruce J.Wendy C. Matt. (1987). Suppression of human lymphocyte responsiveness by forskolin: reversal by 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate, diacylglycerol and ionomycin. *Immunopharmacology.*
[https://doi.org/10.1016/0162-3109\(87\)90028-2](https://doi.org/10.1016/0162-3109(87)90028-2).
52. Shipkova Maria, Eberhard Wieland. (2012). Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica Chimica Acta.*Volume 413.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.11.006>.
53. Stevenson Freda, K. et.al. (2011). B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.*118 (16): 4313–4320.DOI 10.1182/blood-2011-06-338855.

54. Smilevska, Tatjana. Et.al. (2006). Transferrin receptor-1 and 2 expression in chronic lymphocytic leukemia, *Leukemia Research*, Volume 30, Issue 2, Pages 183-189. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2005.06.006>
55. Tai Yu, Wang Quintong, Korner Heinrich, Zhang Lingling, Wei. (2018). Molecular Mechanisms of T cells activation by dendritic cells in autoimmune diseases. *Frontiers in pharmacology*. DOI=10.3389/fphar.2018.00642
56. Téllez Castillo, Nicolás. José Julián Jara, Juan Sebastián Jara. et.al (2018). Activación de la célula T, alteraciones en el lupus eritematoso sistémico, una revision narrative. DOI: 10.1016/j.rcreu.2017.07.002
57. Torgersen, Knut Marti. et.al. (2002). Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function. *Cellular Signalling*. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(01\)00214-5](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(01)00214-5).
58. Treanor B. (2012). B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology*. May; 136(1):21-7. doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03564.x. PMID: 22269039; PMCID: PMC3372753.
59. Van den Elsen Peter. (2011). Expression Regulation of Major Histocompatibility Complex Class I and Class II Encoding Genes. *Frontiers in Immunology*. DOI=10.3389/fimmu.2011.00048
60. Vang, T., Torgersen, K.M., Sundvold, V., Saxena, M., Levy, F.O., Skålhegg, B.S., Hansson, V., (...), Taskén, K. (2001). Activation of the COOH-terminal Src kinase (Csk) by cAMP-dependent protein kinase inhibits signaling through the T cell receptor *Journal of Experimental Medicine*, (4), 497-507
61. Villaruel Dorrego Mariana, Speight Paul M, Barrett A William. (2005) Expresión de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II y moléculas co-estimuladoras en carcinomas orales in vitro. 10(3): 188-195. ISSN 1698-4447.

62. Wen Y, Jing Y, Yang L, Kang D, Jiang P, Li N, Cheng J, Li J, Li X, Peng Z, Sun X, Miller H, Sui Z, Gong Q, Ren B, Yin W, Liu C. (2019).The regulators of BCR signaling during B cell activation. *Blood Sci.*;1(2):119-129. doi: 10.1097/BS9.0000000000000026
63. Wehbi Vanessa L., Taskén Kjetil, Molecular Mechanisms for cAMP-Mediated Immunoregulation in T cells – Role of Anchored Protein Kinase A Signaling Units. *Frontiers in Immunology*.Volume 7. 2016. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2016.00222>
64. Xinian Li, Song Jiang, Richard I. Tapping. (2010).Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival, cytokine. Volume 49, Issue 1.<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.08.010>.