



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de las Quimiocinas y sus Receptores en la
Expresión de CRTAM en Células T CD8⁺.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

JESSICA PATRICIA LEYVA RANGEL



TUTOR: DR. EDUARDO ALBERTO GARCÍA ZEPEDA
CO-TUTOR: DR. VIANNEY FRANCISCO ORTÍZ NAVARRETE



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.

CONTENIDO

INDICE:	Pág.
Índice de tablas, figuras y gráficas	
Resumen	
1.- Sistema Inmune	
2.- Desarrollo de linfocitos T	
3.- Receptor de linfocitos T (TCR)	
3.1 Señalización del TCR	
a)Vía de las MAPK	
b)Vía de movilización de calcio	
c)Vía de rearreglo del citoesqueleto	
4.- Linfocitos T CD8+	
5.- Las células dendríticas	
6.- Presentación antigénica	
6.1 Procesamiento antigénico en el contexto del MHCI	
7.- Quimiocinas	
7.1 Quimiocinas homeostáticas e inflamatorias	
7.2 CXCR4	
7.3 CCR5	
7.4 CXCR3	
7.5 CCR7	
8.- Señalización de los receptores de quimiocinas	
9.- Quimiocinas y el TCR	
10.- Migración y Transmigración celular	
11.- El endotelio	
11.1 Nectinas y Cadherinas	
11.2 Nectin-like	
12.- Las moléculas de adhesión	
13.- CRTAM	
14.- Planteamiento del Problema	
15.- Hipótesis	

16.- Objetivos

16.1 Objetivo general

16.2 Objetivos particulares

17.- Materiales y Métodos

18.- Resultados

19.- Discusión

20.- Conclusión

21.- Perspectivas

22.- Referencias consultadas

23.- Abreviaturas

Apéndice 1. Reactivos utilizados

Apéndice 2. Separación de células PBMC's a partir de sangre periférica

Apéndice 3. Tinción para determinar la expresión en superficie de CRTAM mediante el citómetro de flujo

Apéndice 4. Ensayo de estimulación

Apéndice 5. Moléculas accesorias a la señal del TCR

Apéndice 6. Clasificación de las quimiocinas y sus receptores

Apéndice 7. Sinapsis inmunológica

Índice de figuras, tablas y gráficas

Tabla 1. Respuesta innata y adquirida

Figura 1. Desarrollo de linfocitos T

Figura 2. Señalización del TCR

Figura 3. Respuestas efectoras a partir del reconocimiento antigénico

Figura 4. Procesamiento antigénico en el contexto de MHCI

Figura 5. Polarización celular

Figura 6. Proceso de trans migración

Figura 7. Gradiente de ficoll

Gráfica 1. Los linfocitos T CD8+ estimulados durante 18h con PMA y Ionomicina expresan CRTAM

Gráfica 2. Las quimiocinas CXCL12 y CXCL10 no inducen la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+

Gráfica 3. Gráfica de concentración-respuesta del anticuerpo anti-CD3 para determinar la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+

Gráfica 4. La expresión de CRTAM inducida con 5µg/µl del anticuerpo anti-CD3 disminuye en presencia de las quimiocinas CXCL12, CXCL10 y CCL5 en los linfocitos T CD8+

Gráfica 5. La expresión de CRTAM inducida con 1µg/µl del anticuerpo anti-CD3 aumenta en presencia de las quimiocinas CXCL12 y CCL5 en los linfocitos T CD8+

Resumen

Las quimiocinas son proteínas solubles de bajo peso molecular que participan en los procesos de migración celular. Al ser secretadas, las quimiocinas generan gradientes quimiotácticos que dirigen la migración (quimiotaxis) de diversos tipos celulares como es el caso de los linfocitos T. Además de las quimiocinas y sus receptores expresados en los linfocitos T, se requiere de la expresión de moléculas de adhesión para interactuar con el endotelio que expresa los ligandos. Se ha reportado que las quimiocinas pueden alterar la expresi afinidad de las moléculas de adhesión con sus ligandos, mediante un mecanismo conocido como “señalización adentro hacia fuera”; el cual consiste en la regulación de una molécula de superficie mediante la señalización proveniente de otro receptor. Algunas proteínas intracelulares que participan en este mecanismo de regulación son ZAP-70, las proteínas MAPK's (ERK1/2), así como SLP76; proteínas que participan en la vía de señalización del TCR. En los linfocitos T CD8+ se expresa una molécula de adhesión denominada CRTAM. Esta molécula únicamente se expresa bajo condiciones de activación y, su expresión promueve la producción de IFN γ en los linfocitos T CD8+ activados. Debido a que las quimiocinas regulan la señal del TCR y la expresión de las moléculas de adhesión, en este trabajo se evaluó el papel de las quimiocinas sobre la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+. Para ello se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica, a partir de un gradiente de ficoll, con diferentes concentraciones de las quimiocinas CXCL12, CCL5 y CXCL10 y se cultivaron durante 18h o en combinación con diferentes concentraciones (1 y 5 μ g/ μ l) de anticuerpo anti-CD3 humano (OKT3). Posteriormente se midió la expresión de CRTAM en las células que fueron seleccionadas usando los anticuerpos anti-CD3, anti-CD8, anti-CRTAM y anti-CD69, en un citómetro de flujo (FACS Scan). La presencia de las quimiocinas CXCL12 y CXCL10 no induce la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+. Por otro lado, en presencia del anticuerpo anti-CD3 las quimiocinas son capaces de regular la expresión de CRTAM. El efecto de las quimiocinas sobre la expresión de CRTAM depende del estado de activación celular, medido bajo diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CD3.

1.- Sistema Inmune

El sistema inmune permite a los organismos defenderse de los agentes infecciosos como son: bacterias, hongos y virus presentes en su entorno. Existen dos mecanismos por los cuales se lleva a cabo una respuesta inmune, denominados respuesta innata y respuesta adquirida. La respuesta innata es la primera en manifestarse en presencia de algún antígeno (cuerpo extraño) ó agente infeccioso, mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) presentes en los diferentes microorganismos. Existen diversos receptores que reconocen a los PAMPs, como son los receptores denominados tipo-Toll (Toll-like receptor [TLR]). Existen 11 receptores tipo Toll en el humano y cada receptor reconoce a un patrón molecular específico. Los TLRs reconocen RNA de doble cadena, RNA de cadena sencilla, DNA, componentes de la pared de las bacterias gram negativas (e.g. LPS) y gram positivas (proteoglicanos), así como fragmentos celulares provenientes de procesos apoptóticos y necróticos. Las células que participan dentro de la respuesta innata son las células cebadas, los macrófagos, las células asesinas naturales (NK), los neutrófilos, los eosinófilos y las células dendríticas. Cada una de ellas con un papel importante en la internalización y presentación del antígeno así como en la resolución de la infección^{1,2}.

Por otro lado, la respuesta de tipo adquirida se presenta a partir del grupo de los vertebrados, los cuales además de presentar una respuesta de tipo innata, han desarrollado un sistema capaz de responder de manera específica a los antígenos. El reconocimiento antigénico dentro de la respuesta adquirida se da mediante el procesamiento del antígeno en pequeños fragmentos peptídicos, los cuales son acoplados a moléculas de superficie de la familia denominada Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) y, presentados por las células presentadoras de antígeno (APC) a las células T, que expresan el receptor denominado TCR^{1,23}. Este mecanismo de reconocimiento antigénico favorece una respuesta específica debido a que se reconocen péptidos específicos para cada antígeno. Además, la respuesta adquirida presenta la característica de poseer una memoria inmunológica, es decir, al segundo reto con el mismo antígeno la célula previamente inmunizada tiene la capacidad de responder de una manera más rápida y eficiente en la resolución de la infección. Las células que participan dentro

de este tipo de respuesta son los linfocitos B, los linfocitos T y las células dendríticas. Estas últimas son consideradas como las APCs por excelencia debido a que son las únicas células capaces de activar a los linfocitos T vírgenes (naive), es decir, aquellos linfocitos que no han estado previamente en contacto con un antígeno³.

En el caso de que la respuesta innata sea ineficiente en resolver la señal de daño, la respuesta adquirida se hace presente. Sin embargo, la respuesta adquirida es también la responsable de generar las respuestas alérgicas, enfermedades autoinmunes y el rechazo de tejidos trasplantados^{3,4}. A manera general la Tabla 1 muestra las características que presentan las respuestas innata y adquirida.

PROPIEDADES	Respuesta Inmune Innata	Respuesta Inmune Adquirida
Distribución	No-clonal	Clonal
Reconocimiento	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (LPS, LTA, etc.)	Estructuras Moleculares Detalladas (Proteínas, Péptidos, Carbohidratos,)
Antígenos propios	Solo reacciona a antígenos extraños	Puede ocasionar respuestas autoinmunes, reaccionando contra antígenos propios
Tiempo de Respuesta	Activación Efectora Inmediata	Activación Efectora tardía
Respuesta Efectora	Expresión de moléculas co-estimuladoras Citocinas: IL-1 β , IL-6, TNF α Quimiocinas: IL-8	Expansión clonal ó anergia Citocinas: IL-4, INF γ Quimiocinas: CCL5, CCL-21 Producción de anticuerpos

Tabla.1 Respuesta inmune innata y adquirida. Se muestra las características específicas de las respuestas innata y adquirida, en cuanto al mecanismo de acción en contra de algún antígeno presente en el organismo.

Para que un linfocito T pueda reconocer a un antígeno de manera específica, debe atravesar por diferentes estadios de maduración. Esto permite el reconocimiento adecuado de auto-antígenos presentado por las células dendríticas sin desencadenar una respuesta efectora. La maduración del linfocito T tiene como objetivo principal la generación de linfocitos T con TCR's maduros y específicos que puedan reconocer, con una avidéz intermedia, a los antígenos propios para evitar la generación de clonas autoreactivas.

2.- Desarrollo de linfocitos T

Los progenitores de los linfocitos T provienen de la medula ósea y, mediante gradientes quimiotácticos, migran hacia el timo a través de las vénulas del alto endotelio (HEV), donde se concluye el proceso de maduración de los linfocitos T. El receptor de quimiocina CCR7 es considerado un receptor constitutivo para las células en reposo que se encuentran en los tejidos linfoides (receptor homing), es decir, su expresión se induce únicamente cuando las células migran hacia un tejido específico. La secreción de las quimiocinas CCL21 y CCL19 (ligandos de CCR7) son producidos abundantemente en timo. El desarrollo de los linfocitos T ocurre en el timo bajo los procesos que involucran la maduración del TCR y el reconocimiento de un MHC específico⁵.

Los linfocitos T se pueden diferenciar en 2 subpoblaciones que expresan a los co-receptores CD4 y CD8. La expresión de estos receptores determinan el estadio de diferenciación del timocito ó linfocito T inmaduro. Existen 3 estadios de diferenciación que se pueden distinguir mediante la expresión de co-receptores, denominados: dobles negativos ó DN ($CD4^-CD8^-$), dobles positivos ó DP ($CD4^+CD8^+$) y simples positivos ó SP ($CD4^+CD8^-$ ó $CD4^-CD8^+$). La subpoblación DN se divide a su vez en DN1, DN2, DN3 y DN4, estas subpoblaciones se identifican por la expresión de los marcadores CD44 y CD25. El fenotipo CD4 ó CD8 de los timocitos va a depender del tipo de MHC que reconozcan, así como del microambiente en el cual se encuentren. Los linfocitos TCD8⁺ reconocen un MHC de tipo I y los linfocitos TCD4⁺ un MHC de tipo II ^{5,6}.

Dentro del estadio DN3 se lleva a cabo la maduración del TCR, esto quiere decir que el TCR sufre un rearreglo en el locus de la cadena alfa (α), lo que trae como consecuencia la conformación de un TCR maduro el cual es expresado a partir de los timocitos DP. Mediante el TCR maduro, los timocitos DP reconocen diversos antígenos acoplados a un MHC específico expresados por las células epiteliales tímicas de la región medular (mTEC's), y por las células dendríticas^{5,6}.

El umbral de afinidad / avidéz con el cual un TCR reconoce un antígeno específico es determinante en establecer los procesos de muerte por negligencia (sin respuesta al antígeno), la selección negativa (alta afinidad al antígeno), la selección positiva (afinidad baja/intermedia al antígeno) y compromiso a un linaje específico CD4⁺ ó CD8⁺^{5,6}.

Una vez establecido el fenotipo del linfocito T (CD4+/CD8+), los linfocitos T migran hacia los órganos linfoides secundarios para ser activados por las APC's y de esa manera, llevar a cabo su función efectora. En el caso de los linfocitos T CD4+ ó células cooperadoras (Th), éstas secretan un patrón específico de citocinas que activan otros tipos celulares y que llevan a cabo respuestas celulares ó humorales, en el caso de los linfocitos T CD8+ ó linfocitos B, respectivamente⁶.

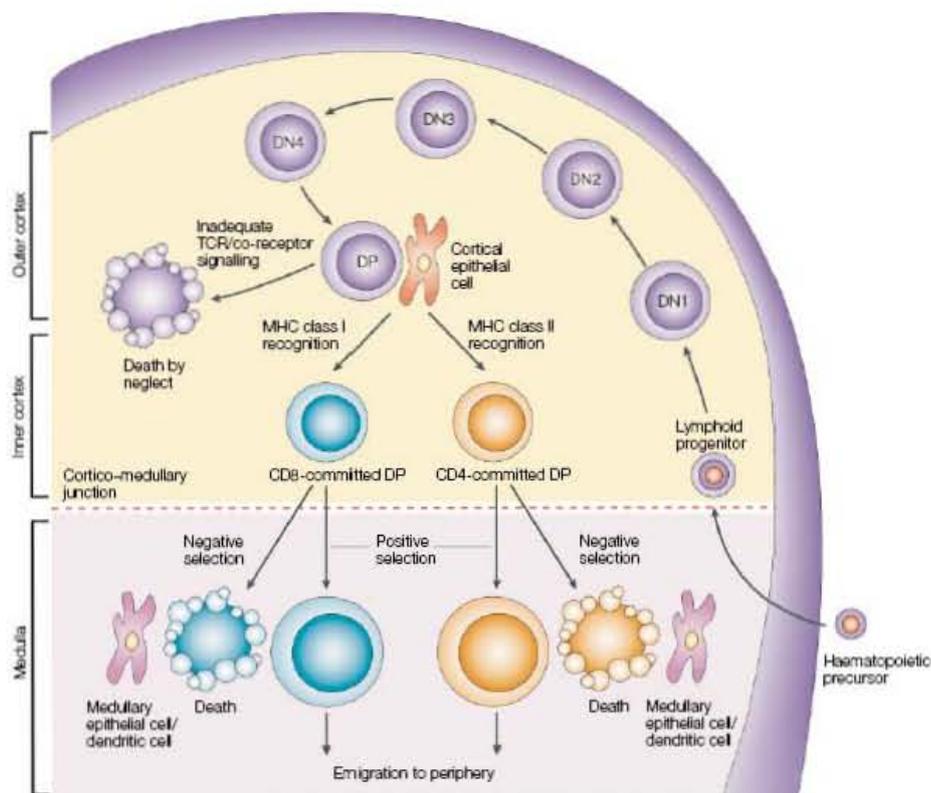


Fig 1. **Desarrollo de linfocitos T.** Esquema donde se muestra el desarrollo de linfocitos T en el Timo. El rearreglo de la cadena β del TCR se lleva a cabo en el estadio doble negativo (DN3). El compromiso a un linaje específico CD4/CD8 depende del reconocimiento del MHC que lo presenta, del antígeno que se presente y de la avidez con la que el linfocito T responde a dicho antígeno.

3.- Receptor de linfocitos T (TCR)

El TCR es un heterodímero que consiste de las cadenas alfa, beta, gama y delta cuya combinación permite identificar dos poblaciones de linfocitos T: los que expresan las cadenas α y β (linfocitos $T_{\alpha\beta}$) y los que expresan las cadenas γ δ (linfocitos $T_{\gamma\delta}$). Las cadenas se encuentran unidas de manera covalente a través de enlaces de disulfuro. Cada cadena consiste de una región variable (V) localizada en el extremo amino terminal (NH_3), un dominio constante (C), una porción transmembranal y un tallo citoplásmico corto. El sitio de unión del TCR con el MHC-antígeno se encuentra en la región variable, donde se localizan 6 regiones denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR)⁷. Cada cadena

del TCR se encuentra localizada en genes que presentan recombinación genética, generando una amplia variedad de re-arreglos de las cadenas, contribuyendo al reconocimiento específico de una amplia variedad de péptidos⁷.

El TCR no presenta en su tallo citoplásmico una función señalizadora debido a que no presenta dominios ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs), los cuales facilitan la unión de moléculas señalizadoras. Debido a ello, se requiere de la asociación del complejo CD3 mediante interacciones no covalentes en el reconocimiento antigénico⁸. El complejo CD3 consiste de 3 cadenas denominadas γ , ζ y ϵ , las cuales presentan una cadena tipo inmunoglobulina (Ig-like) con porciones citoplásmicas con dominios ITAM⁹.

Se ha reportado que algunos anticuerpos dirigidos contra las cadenas ζ y ϵ del CD3 promueven la estimulación de los linfocitos T de manera análoga a la activación mediante el reconocimiento antigénico¹⁰. Estos anticuerpos pueden ser usados como agonistas o activadores del receptor.

3.1 Señalización por el TCR

Los primeros eventos bioquímicos que se observan durante la activación del TCR son:

- 1) Activación de CD3 a través de una proteína con actividad de cinasa en tirosinas de la familia de Src, Lck, la cual se encuentra asociada al tallo citoplásmico de los co-receptores CD4/CD8.

- 2) La formación de los agregados del TCR, el complejo CD3 y los co-receptores. Esto facilita la fosforilación de los dominios ITAM de la cadena ζ mediante la activación de Lck, a través de su autofosforilación. Otra cinasa importante en la activación del TCR es ZAP-70 (ζ -associated protein of 70kDa), la cual reconoce sitios de fosfotirosina (es decir residuos de tirosina fosforilados). Los sitios fosforilados por Lck facilita el reconocimiento y reclutamiento de ZAP-70 a través sus dominios SH2 (Src homology 2). Al unirse Zap-70 es fosforilado por Lck, lo cual promueve su activación. La activación de ZAP-70 promueve el reclutamiento y la

fosforilación de diversas proteínas adaptadoras como LAT (Linker of Activated T cells), permitiendo así, la unión de moléculas señalizadoras que participan en los eventos río abajo de la activación del TCR¹¹.

Dentro de las principales vías que se encuentran activadas durante la señalización del TCR son: la vía de las MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), la vía de movilización de calcio y la vía que promueve el rearrreglo del citoesqueleto¹¹.

a) Vía de las MAPK:

Las MAPK son una familia de proteínas con actividad de cinasa en residuos de serina y treonina, las cuales se activan en respuesta a factores de crecimiento, citocinas y estrés celular. Los principales miembros de esta familia son: Erk1/2 (Extracellular Signal Regulated kinase), Erk3/4, Erk5, p38 y JNK (c-Jun N-terminal kinase)¹².

La activación de las MAPKs se da a través de la activación de la vía de Ras. Las MAPKs son activadas mediante la fosforilación de sus residuos de serina y treonina por las cinasas MKK's (cinasas de las MAP cinasas). La fosforilación de Erk (pERK) promueve la transcripción de Fos, componente del factor de transcripción AP-1 (Activator Protein-1). De manera paralela, las proteínas adaptadoras activan a Rac a través de Vav (intercambiador de GDP por GTP). La activación de Rac resulta en la activación de la cinasa JNK, la cual promueve la fosforilación de c-Jun (segundo componente de AP-1). También se activa p-38 mediante Rac. Rac-GTP induce de manera paralela el rearrreglo del citoesqueleto, lo cual permite la agregación de los TCRs durante el reconocimiento antigénico¹³.

b) Vía de movilización de calcio:

PLC γ 1 es una enzima citosólica específica para fosfolípidos. Su función principal es hidrolizar a fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP₂) para generar fosfatidil inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). IP₃ permite la liberación de calcio por parte del retículo endoplasmático, mediante la interacción con su receptor IP₃R (expresado en este organelo). La concentración de calcio citosólico aumenta entonces de

100nM a 600-1000nM. El incremento en la liberación de calcio así como la generación de DAG promueve la activación de la cinasa PKC (Protein Kinase C). Esta cinasa presenta 6 isoformas (α , β_1 , δ , θ , η y ζ ,) sin embargo, PKC θ es la única isoforma que se recluta a la zona de interacción TCR-MHC durante la sinapsis inmunológica. Además, se requiere de la participación de PKC θ para la activación de los factores de transcripción NF κ B y AP-1, para promover la síntesis de diversas citocinas como IL-2^{11,14}.

Tomando en cuenta lo anterior, activadores farmacológicos como PMA (Forbol miristato-acetato) y Ionomicina (ionóforo de calcio), los cuales promueven la activación de PKC y la liberación de calcio, pueden inducir una activación celular *in vitro* e independiente del TCR. Esta activación se refleja en la secreción de citocinas y en la proliferación celular.

c) Vía de rearrreglo de citoesqueleto:

El rearrreglo del citoesqueleto es fundamental durante el reconocimiento antigénico debido a que permite el reconocimiento adecuado del complejo MHC/péptido, así como de la interacción célula-célula mediante el reconocimiento de los receptores con sus ligandos. En la figura 2 se muestra de forma esquemática la vía de señalización del TCR. Esta vía se encuentra regulada por las GTPasas Rho, Rac y Cdc42, e involucra al proceso de polimerización y despolimerización de actina, proceso fundamental que permite los cambios morfológicos celulares. El intercambio de GDP por GTP está regulado por las proteínas GEFs (Guanine Exchange Factors), proteínas GAPs (GTPase Activating Proteins) que promueven la actividad de las GTPasas, y las proteínas GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) que mantienen el estado inactivo de las GTPasas¹¹.

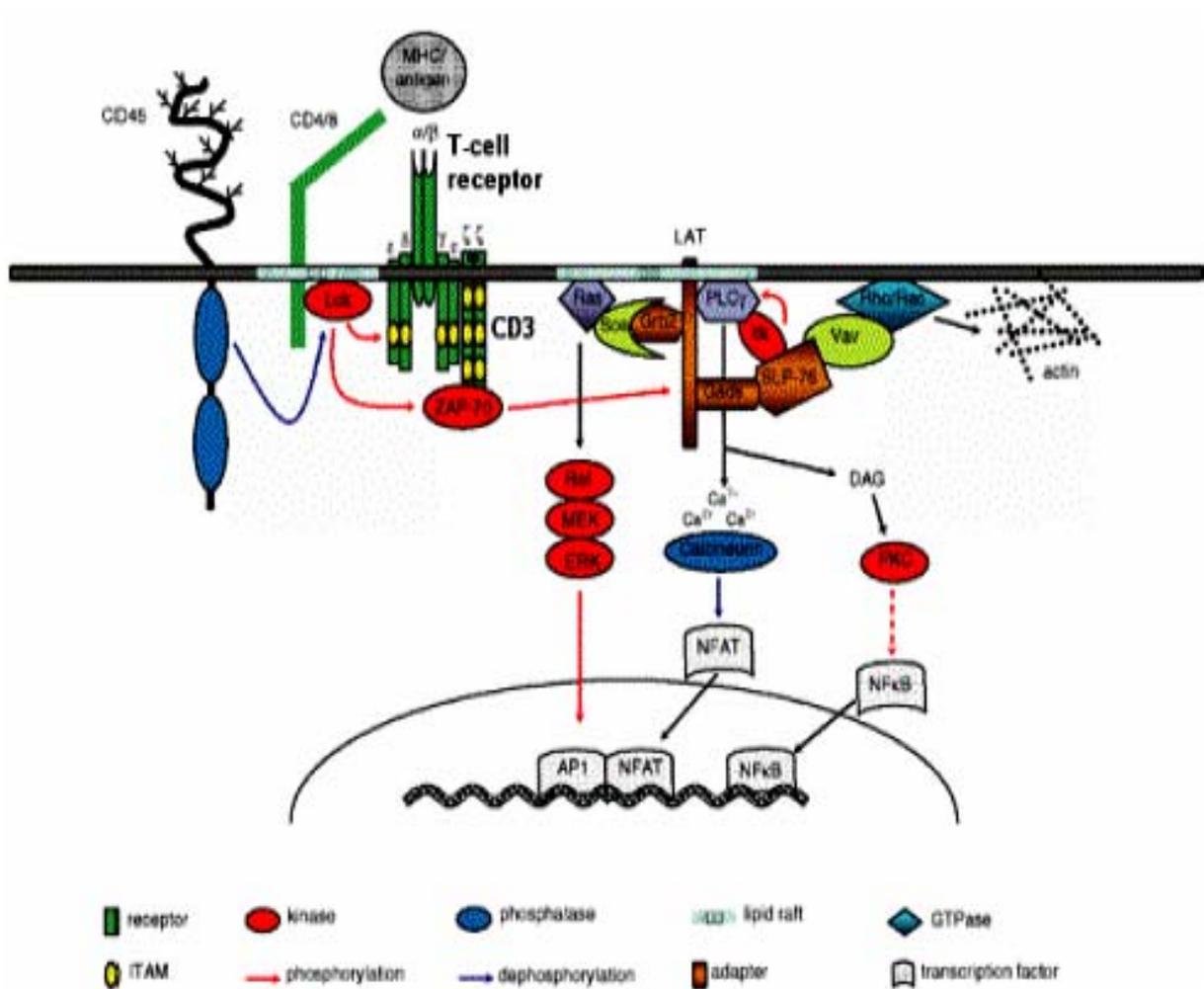


Fig 2. Señalización del TCR. Esquema donde se observa la vía de señalización del TCR, la activación de las proteínas intracelulares que participan, así como los factores de transcripción que se activan durante la activación celular y que además, son indispensables para que se promueva la función efectora.

Se ha propuesto un modelo de activación de linfocitos T donde se establece que se requieren dos señales durante el reconocimiento antigénico que favorezcan la activación celular. Dentro de este modelo se determina a la señal 1 como la señal inducida por el TCR. Mientras que la señal 2 es aquella inducida por las moléculas coestimuladoras e inhibitoras^{15,16}. En ausencia de la señal 2, los linfocitos no responden de forma efectiva ó presentan anergia^{16,17}. Mediante estudios *in vitro* se ha demostrado que con el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD3, se pueden estimular los linfocitos T, simulando una activación dependiente de antígeno¹⁰.

4.- Linfocitos T CD8⁺

Los linfocitos T CD8⁺ también son denominados linfocitos T citotóxicos (Tc), estos reconocen péptidos derivados de antígenos endógenos y presentados por el MHC de tipo I. Estos linfocitos T también pueden ser activados en respuesta a diversas citocinas como son IL-12 e IL-18, lo cual a su vez promueve la secreción de IFN γ . Otras citocinas como IL-21 e IL-15 promueven la proliferación de los linfocitos T CD8⁺¹⁸.

La respuesta efectora de los linfocitos T CD8⁺ se caracteriza por la inducción de apoptosis en células infectadas por patógenos intracelulares (virus) o de células tumorales. Esta respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ se puede llevar a cabo mediante 2 mecanismos o vías: la vía dependiente de perforinas y la vía dependiente de Fas (CD95)¹⁹.

La vía dependiente de la secreción de Perforinas depende de la liberación de calcio. Las perforinas son glicoproteínas que constan de 534 aminoácidos, presentan una secuencia homóloga al factor del complemento C9 y se encuentran almacenados en gránulos citoplásmicos. Una vez liberadas las perforinas a la matriz extracelular, se generan agregados de entre 12 y 18 monómeros dando como resultado la formación de poliperforinas. Las poliperforinas se integran a la membrana de la célula blanco, formando poros membranales con un diámetro aproximado entre 10 y 20nm^{1,19}.

La vía citotóxica dependiente de Fas, requiere de la interacción célula-célula. La molécula Fas pertenece a la familia de receptores de TNF (Factor de Necrosis Tumoral). Al expresarse FasL (ligando de Fas) en las células, les confiere un fenotipo susceptible al proceso de apoptosis¹⁹. La interacción de Fas-FasL activa a diversas caspasas como son: las caspasas 10, 8 y 3, lo cual permite la activación de proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bcl-X, que facilitan la muerte celular programada en la célula blanco. FasL también puede ser inducida en los linfocitos T, lo cual sugiere que los linfocitos T CD4⁺ podrían utilizar esta vía como mecanismo de regulación celular¹⁹.

El co-receptor CD8 presenta las subunidades alfa y beta que pueden asociarse en forma de homodímeros (CD8 $\alpha\alpha$) o heterodímeros CD8 $\alpha\beta$)²⁰. La interacción de CD8 con el complejo péptido-MHC es independiente de la interacción con el TCR, y promueve mayor estabilidad a la interacción^{20,21}. En presencia de un péptido que induce una fuerte activación del linfocito T, no se requiere de la participación del co-receptor CD8, mientras que en una activación débil es necesaria su presencia²¹.

Los linfocitos T CD8+, al igual que los linfocitos T CD4+, producen diferentes tipos de citocinas (tipo 1 ó tipo 2). Las citocinas de tipo 1 son IFN γ e IL-2, mientras que las citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 son de tipo 2^{22,23}. Ambos fenotipos de linfocitos T CD8+ son citotóxicos (Tc1 y Tc2), sin embargo, bajo ciertas condiciones de cultivo, los linfocitos Tc2 pierden su capacidad citolítica²⁴.

5.- Las células dendríticas

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno (APC) residentes principalmente en los tejidos linfoides primarios (timo y medula ósea) y secundarios (nódulos linfáticos, placas de Peyer y bazo). Su función es reconocer, procesar y presentar antígenos extraños a los linfocitos T, los cuales se encuentran frecuentemente en recirculación a través de estos tejidos²⁵.

Para que una célula dendrítica sea capaz de procesar y presentar antígenos dentro del contexto de un MHC específico, es necesario que ésta atraviese por un proceso de maduración que le permita la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80/86, integrinas como ICAM-1/2 y el aumento en la expresión de la molécula MHCII^{25,26}. Las señales asociadas con el desarrollo de una enfermedad así como el reconocimiento de PAMPs, promueve el cambio fenotípico inmaduro-maduro de las células dendríticas²⁷.

Las células dendríticas inmaduras presentan una alta capacidad fagocítica y endocítica, lo cual les facilita la internalización de los antígenos en compartimentos intracelulares denominados endosomas; estas capacidades disminuyen conforme se da el proceso de maduración. Además, durante el proceso de maduración, las células dendríticas sufren procesos de elongación de sus dendritas e inducción de

receptores de quimiocinas que facilitan la migración hacia los diferentes tejidos linfoides^{27,28}. Las células dendríticas inmaduras no expresan el receptor de quimiocina, CCR7, necesario para la migración hacia los tejidos linfoides. Sin embargo, en condiciones de estimulación con LPS, se observa la expresión de CCR7 en las células dendríticas²⁹. Además de la expresión de CCR7, se requiere que las células dendríticas secreten los ligandos, CCL19 y CCL21, para guiar a los linfocitos T al sitio de interacción celular³⁰.

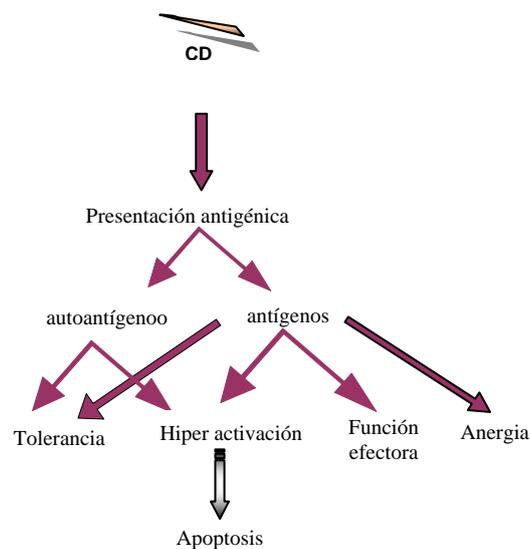


Fig 3. Respuestas efectoras a partir del reconocimiento antigénico. Diagrama que representa los diferentes tipos de respuestas que promueven las células dendríticas (CD) en los linfocitos T, al presentar un antígeno acoplado a un MHC específico. En el caso de un linfocito T CD4+, reconoce un MHC tipo I y el linfocito T CD8+ un MHCII.

6.- Presentación antigénica

El antígeno requiere ser procesado en pequeños fragmentos peptídicos y acoplados a moléculas específicas de MHC para que pueda ser reconocido por los linfocitos T a través de su TCR^{31,32}. Al ser internalizado un antígeno por los diversos receptores expresados en la superficie de las células dendríticas, es almacenado en vesículas intracelulares denominadas fagosomas, las cuales además de presentar enzimas hidrolíticas y proteasas, sufren un cambio de pH (de 5.5 a 4.5) al fusionarse con los lisosomas. Es necesario hacer notar que las células

dendríticas mantienen un pH alcalino en sus fagosomas para evitar la total degradación del antígeno³³.

El procesamiento antigénico varía dependiendo del MHC que lo presente. Sin embargo, a manera general, la unión de los péptidos a las moléculas de MHC se da mediante proteínas denominadas chaperonas como la oxidoreductasa Erp57 y la tapasina. Esta última regula el complejo de asociación con los transportadores asociados al procesamiento antigénico. El ratón deficiente para Erp57 (Erp57^{-/-}) presenta reducciones en el reclutamiento de las moléculas de MHC hacia los complejos de unión de péptidos (PLC) y además presenta niveles bajos de MHC en superficie. Una vez establecido el complejo MHC-péptido es transportado a través de vesículas exocíticas hacia la membrana³⁴.

6.1 Procesamiento antigénico en el contexto del MHC I.

La molécula MHC I consiste de 3 cadenas asociadas de forma no covalente, denominadas cadena pesada (HC) de 45kDa, cadena ligera de 12kDa y la cadena β_2 -microglobulina. Además, presenta una región extracelular con 3 dominios denominados $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ y también se han observado entre 1 y 3 sitios de N-glicosilación^{35,36}. El complejo MHC I está conformado por una región transmembranal y un tallo citoplásmico de 30 residuos de aa. El dominio $\alpha 3$ contiene el sitio de unión del co-receptor CD8 y los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ interactúan con el TCR³⁶.

Los antígenos presentados por las moléculas de MHC I derivan de patógenos intracelulares como son las bacterias y virus aunque también presentan fragmentos de proteínas celulares tumorales. La expresión del MHC I es constitutiva en las células somáticas, a diferencia de la expresión del MHC II, la cual se observa en los macrófagos, linfocitos B y células dendríticas. Además, las moléculas de MHC II presentan péptidos que se encuentran en la matriz extracelular^{35,37}.

Una vez generados los péptidos antigénicos mediante enzimas hidrolíticas, es transportado al retículo endoplásmico a través de la proteína transportadora TAP (Transporter associated with Antigen Presentation). A su vez, la cadena pesada y β_2 -microglobulina son translocados al retículo endoplásmico, donde su ensamblaje requiere de la participación de las proteínas chaperonas Bip y calnexina^{37,38}. El complejo MHC se une y reconoce el péptido a través de la unión con TAP. Una vez establecido el complejo MHC-péptido, este es liberado mediante exocitosis a la membrana celular para que pueda ser reconocido por los linfocitos T citotóxicos³⁸. En la figura 4 se muestra de forma esquemática el procesamiento antigénico en las células que expresan un MHC de tipo I.

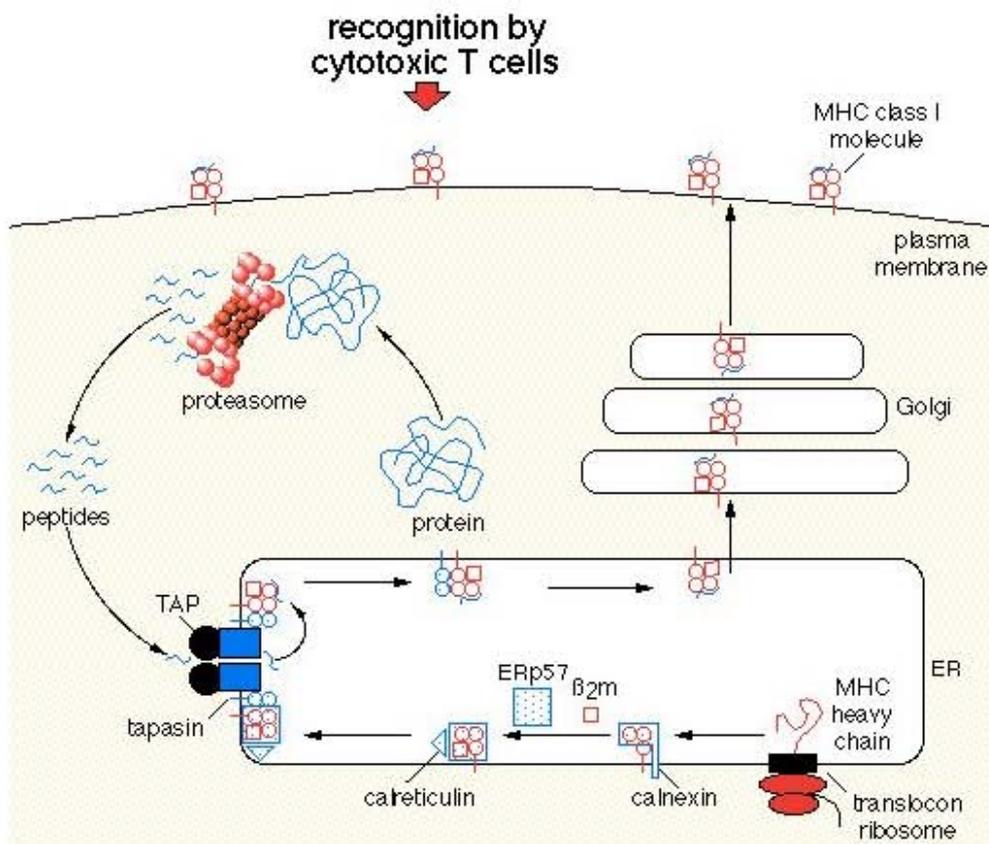


Fig 4. Reconocimiento antigénico en el contexto de MHC I. Representación esquemática del mecanismo de procesamiento antigénico dentro de una célula que expresa un MHC tipo I. De esta manera se obtiene al péptido que va a ser reconocido por los linfocitos T CD8+ para que éstas puedan ser activadas y llevar a cabo su función efectora citotóxica.

Es necesario mencionar que además de la interacción TCR-MHC/péptido, se requiere de la interacción de las moléculas accesorias del TCR (discutido en el apéndice 5) así como de un microambiente que favorezca la unión celular entre una célula APC y un linfocito T para promover una activación celular. También existen otros factores que determinan el tipo de respuesta que se va a desencadenar durante la activación como son la concentración del antígeno, la duración del estímulo, la activación de las proteínas intracelulares durante la señalización y los factores de transcripción presentes.

Es muy importante tomar en cuenta que el microambiente dentro del cual se está llevando a cabo la presentación antigénica, también participa en la activación celular como es el caso de IL-2, IFN γ . Recientemente se han identificado a las quimiocinas y a sus receptores como parte del conjunto de moléculas reguladoras de la señal del TCR durante la activación celular. En el caso de las quimiocinas CCL5 y CXCL12, estas participan en la maduración de las células dendríticas y en la regulación de la señal del TCR, respectivamente ^{53,54}.

7.- Quimiocinas

Las quimiocinas son proteínas solubles que tienen un peso molecular aproximado de 8 a 12kDa. Las quimiocinas son secretadas por diversos tipos celulares para generar gradientes quimiotácticos que permitan el reclutamiento celular a través de la quimiotaxis (migración celular dirigida) hacia otros tipos celulares ó hacia diversos tejidos. Su estructura comprende una región amino terminal (NH₃) y una secuencia de aminoácidos formada por 4 cisteínas; cuya clasificación está determinada por la posición en la que éstas se encuentren, dando origen así, a las quimiocinas alfa (CXC), a las beta (CC), a las gama (C), y a las delta (CX3C)^{55,56}.

Los receptores para las quimiocinas constan de una sola cadena polipeptídica de 7 dominios transmembranales que en la región citoplásmica se encuentra asociada a las proteínas G. Algunas de las quimiocinas y sus receptores están involucradas en diferentes enfermedades como cáncer, VIH, enfermedades autoinmunes e inflamación^{56,57,58}. Un receptor puede ser activado mediante diferentes quimiocinas así como también, una sola quimiocina puede activar a

diferentes receptores. El patrón de expresión de los receptores de quimiocinas depende del tipo celular además del estado de activación^{55,59,60}. En el apéndice 6 se muestra la clasificación de las quimiocinas y sus receptores.

7.1 Quimiocinas Homeostáticas e Inflamatorias.

Se ha intentado también clasificar a los receptores de quimiocinas con respecto a su expresión en las células durante las condiciones homeostáticas (es decir, en estado de reposo celular) y en condiciones de activación celular. A diferencia de los receptores de quimiocinas de tipo inflamatorio, los cuales se inducen por citocinas inflamatorias como IL-1, TNF α o INF γ , y por la activación celular; los receptores homeostáticos mantienen una expresión constitutiva o basal en los órganos, tejidos y en los diferentes tipos celulares en ausencia de algún estímulo inflamatorio⁶¹.

La expresión de los receptores de quimiocinas, dependiendo del estado de activación celular, está relacionada con la función de las quimiocinas, por ejemplo: el receptor CCR7 que dirige a las células hacia tejidos específicos. A estos receptores se les ha denominado receptores “homing”^{62,63,64}.

7.2 CXCR4.

El receptor CXCR4 tiene un único ligando reportado, CXCL12. El ratón deficiente para CXCR4 (CXCR4^{-/-}) presenta defectos en el desarrollo del corazón, cerebro y vénulas. Como resultado de lo anterior, los embriones deficientes en CXCR4 y CXCL12 no son viables⁶⁵. En el humano, no se ha observado alguna deficiencia relacionada a la ausencia de CXCR4/CXCL12. La función principal de la interacción de CXCR4-CXCL12 es retener a las células hematopoyéticas en la médula ósea, por lo cual se considera un receptor de homing⁶⁶.

La expresión y función de CXCR4 está regulada a diferentes niveles. Se ha observado que el factor de inducción de hipoxia-1 (HIF-1 α), en conjunto con Nf κ B, aumentan la expresión de CXCR4^{67,68}. Además, reportes indican que CXCR4 sufre procesos de degradación mediante proteasas secretadas en microambientes hematopoyéticos, entre los que se encuentran catepsinaG, dipeptidilpeptidasa y elastasa⁶⁹. La unión de CXCL12 al receptor, promueve su dimerización lo cual lleva

a su activación, y, una vez desencadenada la cascada de señalización, es internalizado en endosomas mediante la unión con β -arrestina. La internalización del receptor permite su reciclamiento y/o degradación⁷⁰.

El ligando de CXCR4 es expresado por las células dendríticas, células del estroma, células endoteliales, médula ósea, corazón, músculo esquelético, hígado, cerebro y riñón⁷¹. CXCR4 se expresa en los linfocitos T, macrófagos y monocitos. La señalización de CXCR4 promueve la migración celular, adhesión y secreción de metaloproteínas así como factores angiopoiéticos como es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Por otro lado, CXCL12 incrementa la adhesión de los macrófagos y linfocitos T, mediante el incremento de la afinidad de VCAM-1 e ICAM-1⁷². También se ha observado su participación en los procesos de proliferación y sobrevivencia celular.

Las vías de señalización que se activan a través del receptor CXCR4 involucran los procesos de movilización de calcio, componentes de adhesión focal como la cinasa Pyk-2 (proline-rich kinase-2), paxilina, PKC- γ (fosfolipasa C- γ), las MAPK, Jak2, Jak3 y Tyk-2. Reportes recientes indican que CXCR4 puede activar a Ras, Src, Lyn, Fyn, Lck, ZAP-70 y Vav, proteínas involucradas en la vía de señalización del TCR⁷³.

7.3 CCR5.

CCR5 es un receptor con un peso molecular aproximado de 40.6 kDa y comparte un 17% de homología con CCR2. Su expresión se observa en los linfocitos T con fenotipo de memoria/activado, en monocitos, macrófagos y células dendríticas inmaduras⁷⁴. La señalización a través de las proteínas G, inducido por CCR5, induce la movilización de calcio intracelular, así como la formación de inositol-1,4,5 trifosfato (InsP₃). La activación de PLC β (fosfolipasa C β) vía CCR5 permite la formación de diacilglicerol (DAG) y la subsecuente activación de las proteínas PKC's⁵⁵.

CCL5 es uno de los ligandos de CCR5, que induce la activación de PI3K, así como de la proteína Rho lo que permite a su vez la activación de cinasas de adhesión focal (FAK y Pyk2), las cuales presentan papeles importantes en la migración celular⁷⁵.

7.4 CXCR3.

La expresión de CXCR3 se observa en los linfocitos T humanos y en células NKs, y sus ligandos son CXCL9, CXCL10 y CXCL11. Estas quimiocinas son secretadas preferencialmente en sitios de inflamación. CXCL9 y CXCL11 son secretados por macrófagos y astrocitos. Se ha observado una alta producción de CXCL10 proveniente de células T en enfermedades como encefalomiелitis y en el rechazo de órganos transplantados. Por otra parte, en los linfocitos T CD8+ sin activar, también se ha observado la expresión del receptor CXCR3⁷⁶.

7.5 CCR7.

La expresión del receptor CCR7, se ha observado en los linfocitos T vírgenes (naive), los cuales se encuentran en los tejidos linfoides. La expresión de CCR7 facilita la entrada de las células dendríticas y linfocitos T a los tejidos linfoides. Se ha reportado que los ratones deficientes en CCR7 presentan bajos niveles de células dendríticas en los nodos linfáticos. Los ligandos de CCR7 (CCL19 y CCL21) son expresados por el endotelio linfático, células estromales, células endoteliales y por las mismas células dendríticas bajo condiciones de activación⁷⁷.

Sin embargo la expresión de los receptores de quimiocinas no es suficiente para inducir la migración celular, se requiere también de las moléculas de adhesión para promover, además de un fenotipo, una capacidad migratoria⁷⁸. Reportes anteriores muestran que las quimiocinas pueden inducir la expresión de las moléculas de adhesión y regular su afinidad por su ligando⁷⁹. A este mecanismo de regulación se le conoce como señalización de adentro hacia fuera (*inside-out signalling*), debido a que la señal que se induce repercute sobre una molécula que se encuentra en la superficie, pero no mediante la interacción ligando-receptor⁸⁰.

Las quimiocinas no solo funcionan como factores solubles, también tienen la capacidad de unirse a proteoglicanos como es heparan sulfato mediante la interacción con los glucosaminoglicanos (GAG) presentes en las proteínas de la matriz extracelular. Esto además de permitir mayor adhesión celular, tiene como consecuencia el incremento de los niveles de quimiocina local⁵⁵.

8.- Señalización de los receptores de quimiocinas

La superfamilia de las proteínas G monoméricas incluye a dos subfamilias denominadas Ras y Rho. Dentro de la subfamilia de Ras se ubican los miembros Ras, Rho, Rab, Ran y Arf. En la subfamilia de Rho sólo se ubican tres miembros: Rho, Rac y Cdc42. Las GTPasas Rho presentan un papel importante en la progresión hacia el ciclo celular, en procesos de morfogénesis, polarización y migración celular⁸³.

La GTPasa Cdc42, al igual que Rac, induce la polimerización de actina. Por otro lado, Cdc42 está relacionada con la formación del lamelipodio y Rac con la formación del urópodo (figura 5), durante el proceso de polarización celular. La regulación de la polimerización de actina se da mediante la activación de las proteínas SCAR y Wasp. Las GTPasas Rho regulan la formación y estabilidad de los microtúbulos, mediante la activación de PAK⁸³.

La capacidad de responder a un gradiente quimiotáctico depende de una reorganización espacial de los componentes extra e intracelulares, lo cual resulta en la formación del lamelipodio (parte posterior de la célula) y de la formación del urópodo (parte anterior de la célula). Este proceso se denomina polarización celular⁸⁴. En la figura 5 se muestra el cambio fenotípico de una célula polarizada a favor de un gradiente quimiotáctico generado. Al tratar a los linfocitos T con CCL5, CCL2 o algún otro agente quimotáctico, se observa una reorganización de los receptores CCR2 y CCR5 hacia el lamelipodio. De igual manera, como parte de la reorganización de los receptores en la membrana, se ha observado la colocalización de CCR5 con el co-receptor CD4²⁸.

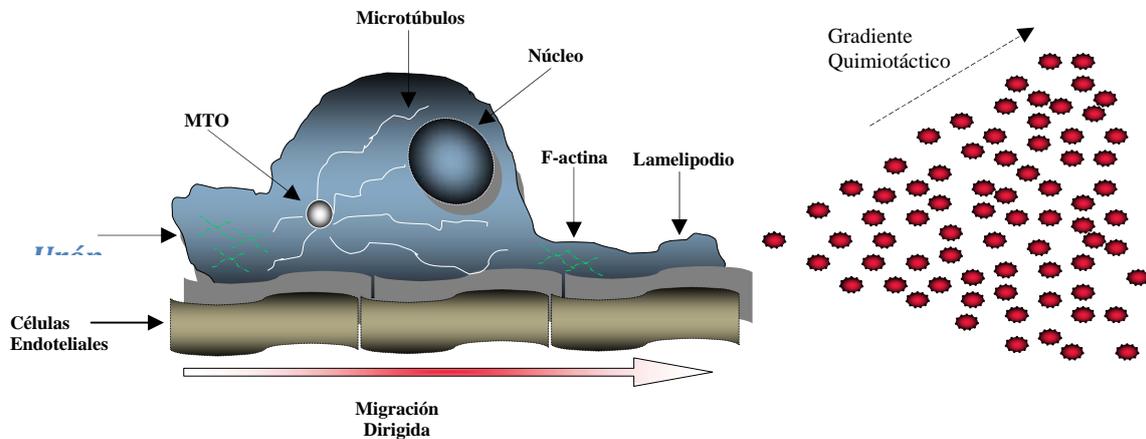


Fig 5. Polarización celular. Esquema donde se muestra a una célula polarizada que se mueve a favor de un gradiente quimiotáctico. La formación del lamelipodio en la parte posterior de la célula, se da mediante la activación de la GTPasa Cdc42, la cual facilita la polimerización de actina. Mientras que el urópodo se encuentra enriquecido con miosina y, su formación depende de la activación de la GTPasa Rac. El centro organizador de microtúbulos (MTOC), sitio donde convergen los extremos de los Microtúbulos, se dispone detrás del núcleo durante la polarización celular.

9.- Quimiocinas y el TCR

La primera manifestación de un reconocimiento antigénico, durante la sinapsis inmunológica, es la inhibición de la migración celular. Se ha reportado que las quimiocinas compiten con la señal del TCR durante el proceso de migración en presencia de antígeno^{108,109}. Mediante ensayos de quimiotaxis utilizando filtros de policarbonato, previamente inmunizadas con un superantígeno, se observó que los linfocitos T no migran en respuesta a CXCL12, CCL5, CCL22, CCL2 o CCL3. Sin embargo, en presencia de CXCL10, CCL21 y CCL19, el linfocito T es capaz de evadir la señal de paro que induce el TCR en presencia de un antígeno¹⁰⁹.

Tomando en cuenta estos resultados, se propuso la clasificación de algunas quimiocinas con respecto a su papel en la activación del TCR; se denominaron a las quimiocinas CCL5, CCL22, CCL2 y CCL3 como subordinadas y a las quimiocinas CXCL10, CCL21 y CCL19 como dominantes¹⁰⁹. Las quimiocinas dominantes son aquellas que tienen la capacidad de interrumpir la formación de la sinápsis inmunológica, evitando el contacto entre un linfocito T y una célula APC. Las quimiocinas subordinadas son aquellas que no evitan la formación de la sinápsis inmunológica, debido a que la señal del TCR es más fuerte que la señal inducida por los diferentes gradientes quimiotácticos presentes en el microambiente.

El análisis de ratones deficientes para una de estas quimiocinas subordinadas, CCL5, demostró que los linfocitos T presentan defectos en su proliferación y en la producción de citocinas como IL-2 e IFN γ , al ser estimuladas con el anticuerpo anti-CD3 o con un antígeno⁷⁵. De esta forma se sugiere que la quimiocina CCL5 participa en la regulación de la activación de los linfocitos T.

Por otra parte, los receptores de quimiocinas también participan en procesos de apoptosis, como es el caso del receptor CXCR4. Se ha observado que al estimular durante 3 días con CXCL12 a la línea celular Jurkat, después de aumentar la proliferación en presencia del anticuerpo anti-CD3, se induce apoptosis. Esta apoptosis depende de la expresión de Fas, sugiriendo que la inducción de la apoptosis mediada por CXCL12 es un mecanismo de regulación en ausencia de estímulos que promuevan una activación¹¹⁰.

Por otro lado, se ha reportado que el receptor CXCR4 se asocia con el TCR; ésta asociación da como resultado una fosforilación prolongada de la cinasa ERK1/2¹¹¹, mayor a la que se observa sólo con el TCR.

Además, utilizando una línea celular de linfocitos T CD4+ (Jurkat) se observó que las respuestas inducidas por CCL5, dependen de la expresión del co-receptor CD3⁷⁵. Esto sugiere que los receptores de quimiocinas pueden utilizar la vía de señalización del TCR para potenciar la activación celular.

Las interacciones quimiocina-receptor han sido implicadas en la activación de p38 y ERK1/2. En timocitos humanos, CCL4 activa a Erk2, posiblemente vía su receptor CCR5. La implicación de la activación de p38 mediada por CCL5 aún no está definida, sin embargo, debido a que la activación de p38 es crucial para las funciones coestimuladoras de CD28, es probable que p38 participe en las funciones coestimuladoras provenientes de CCR5⁷⁵.

Recientemente, se ha reportado que durante la sinapsis inmunológica, los receptores CXCR4 y CCR5 son reclutados en la zona de interacción entre un linfocito T CD4+ y una célula APC¹¹², pero su papel aún no está claramente descrito. Sin embargo, se ha postulado que el reclutamiento de estos receptores promueve una mayor estabilidad mediante la secreción local de quimiocina por parte de la célula APC al linfocito, aunque se puede considerar también el papel regulador en la señal del TCR durante la activación celular¹¹².

10.- Migración y Transmigración Celular

La capacidad de movimiento que presentan las células favorece a la comunicación celular. En condiciones homeostáticas, las células del sistema inmune viajan a lo largo de los diversos tejidos del cuerpo en busca de un antígeno. Durante el proceso de reclutamiento celular hacia el sitio de inflamación, las quimiocinas y sus receptores dirigen la migración y transmigración celular. Como se mencionó previamente, la expresión de los receptores de quimiocinas depende del tipo celular y de su estado de activación. Para que una célula adquiera la capacidad de migrar requiere de un fenotipo polarizado, interacción con el endotelio mediante las moléculas de adhesión y gradientes quimiotácticos que dirijan el movimiento (e.g. quimiocinas, leucotrienos)⁸⁵.

La entrada de los linfocitos a los nodos linfáticos periféricos, a través de las vénulas del alto endotelio (HEV), se lleva a cabo en 4 pasos secuenciales: 1) rodamiento y anclaje, 2) activación de moléculas de adhesión, 3) adhesión firme y 4) diapedesis⁸⁵.

Durante el primer paso, la interacción de los linfocitos T al endotelio se promueve mediante la interacción de ICAM-1/2, VCAM-1, PECAM-1, con sus respectivos ligandos, así como la activación de miembros de la familia de las JAMs como E-selectina. La activación de éstas moléculas trae como consecuencia un cambio morfológico en las células endoteliales, formando sitios de trans migración ricos en filamentos de actina (paso 2).

Para promover la adhesión firme se requiere, dentro de estos sitios ricos en f-actina, la presencia de integrinas como ICAM-1 y VCAM-1 así como de la presencia de moléculas adaptadoras como las proteínas ERM (e.g. ezrina, radixina y moesina), talinas y vinculinas que faciliten la unión al endotelio para permitir la trans migración. La diapedesis hace mención a la interacción del linfocito T con la región lateral de las células endoteliales, mediante la unión con miembros de la familia de las cadherinas y nectinas.

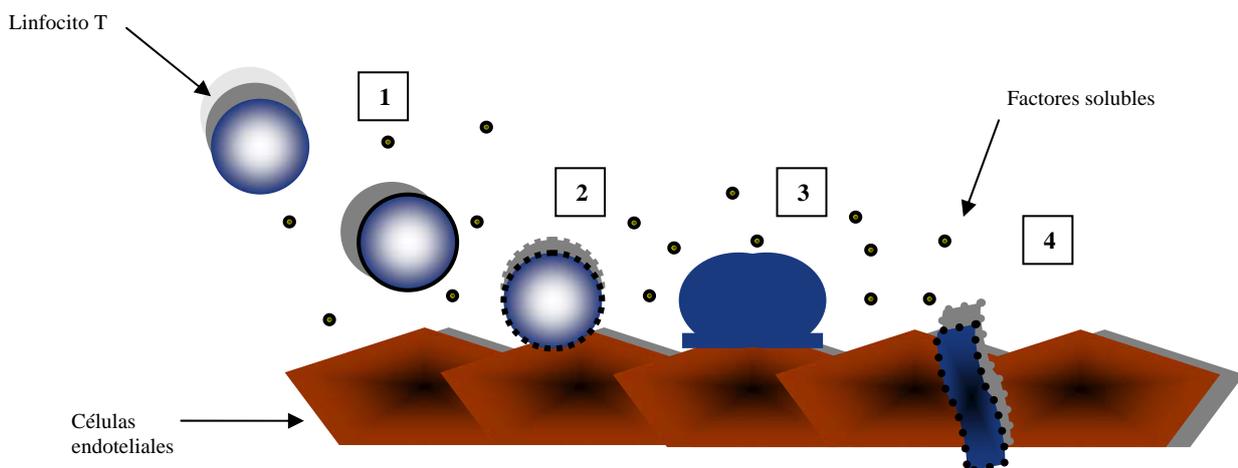


Fig 6. Proceso de trans migración. Esquema donde se ilustra el proceso de trans migración de los linfocitos T hacia el sitio de infección. Inicia con el reconocimiento de las moléculas de adhesión como E-selectina con su ligando expresado en el endotelio. El reconocimiento inicial requiere de una mayor interacción para promover la trans migración. Para ello, se requiere de la participación de las integrinas como ICAM-1/2 y VCAM-1, así como de moléculas adaptadoras que faciliten la unión con el citoesqueleto. El proceso de trans migración es dependiente de calcio.

11.- El Endotelio

La interacción de las células del endotelio entre sí, está mediada por las uniones intercelulares que regulan el paso de moléculas circulantes. Las tres uniones intercelulares del endotelio son: las uniones adherentes (AJ), uniones estrechas (TJ) y los desmosomas. Estas uniones se encuentran a lo largo de la región basolateral de las células endoteliales y epiteliales. La formación de las uniones estrechas y de los desmosomas depende de la formación de las uniones adherentes⁸⁶. Las uniones adherentes están conformadas por moléculas denominadas CAM (Cellular Adhesión Molecule). Las Cadherinas y las Nectinas son miembros de ésta familia⁸⁶.

11.1 Nectinas y Cadherinas.

La familia de las nectinas está conformada por 4 miembros (nectina 1 - 4), cada miembro presenta 2 ó 3 variantes, como resultado del proceso transcripcional denominado "splicing" (corte y empalme). A excepción de nectina-1, la cual es una proteína secretada, todas las nectinas presentan una región extracelular con 3 dominios tipo inmunoglobulina (Ig-like), una región transmembranal y un tallo citoplásmico⁸⁷. Las nectinas, exceptuando nectina-1 β , nectina-3 γ y nectina-4, presentan una secuencia conservada en el carboxilo terminal conformada por 4 residuos de aminoácidos (Glu/Ala-X-Tyr-Val). Este motivo permite la unión de la proteína de unión de filamentos de actina (F-actina) denominada Afadin. La unión con afadin trae como consecuencia la unión al citoesqueleto^{87,88}.

Las nectinas participan en las uniones adherentes independientes de calcio a través de la formación de homo y hetero- *trans*- dimeros en la región extracelular. La interacción homotípica es referida a la interacción con la misma molécula expresada en otra célula, a diferencia de la interacción heterotípica, la cual involucra la interacción de dos moléculas diferentes. Las nectinas también pueden unir, a través de su tallo citoplásmico, a Pals-3, proteína que participa en la polaridad celular. Esta unión permite la formación de los complejos con PKC y Par-

6. También pueden inducir la activación de las GTPasas Rac y Cdc42, a diferencia de las cadherinas, las cuales solamente pueden activar a la GTPasa⁸⁸.

Por otro lado, las E-cadherinas son miembros de la familia de las cadherinas y su expresión se da en las células epiteliales. Las E-cadherinas son dependientes de calcio y están asociadas con la actina del citoesqueleto a través de las proteínas periféricas denominadas β -cateninas y las α -actininas^{89,90}.

Las nectinas y las E-cadherinas de manera independiente forman dímeros cis lo cual a su vez permite la formación de dímeros trans, facilitando así la agregación de moléculas en los sitios de contacto célula-célula. Las nectinas y las E-cadherinas están asociadas dentro de estos agregados a través de Afadin y de cateninas. La fusión entre éstos agregados genera las uniones adherentes maduras⁹¹.

Una vez generado las uniones adherentes se lleva a cabo la formación de las uniones fuertes (TJ), con la participación de las moléculas JAM (Junctional Adhesion Molecule), claudinas y ocludinas⁹¹. Las JAMs son las primeras moléculas en ser reclutadas al sitio de unión celular formado por las nectinas y las E-cadherinas seguido de las claudinas y las ocludinas⁹². Las JAMs reclutan el complejo de polaridad celular previamente formado por las nectinas a través de la unión directa de Pals-3⁹².

11.2 Nectin-like.

Se han identificado 5 moléculas con dominios estructurales similares a las nectinas, denominadas moléculas tipo-nectina 1-5 (nectin-like 1-5). De manera homóloga a las nectinas, las proteínas nectin-like presentan una región extracelular con 3 dominios tipo Ig, una región transmembranal y un tallo citoplásmico. Sin embargo, estas moléculas no tienen la habilidad de unirse directamente a Afadin. Las nectin-like interactúan con las nectinas y están involucradas en procesos de adhesión celular, migración y proliferación, participando de forma conjunta o independiente de las nectinas⁹³.

Necl-1: Participa en el proceso de adhesión celular independiente de calcio, presenta interacciones homotípicas y heterotípicas con Necl-2, nectina-1 y nectina-3. Necl-1 está expresada específicamente en tejido neural⁹³.

Necl-2: Es una molécula que contiene un peso molecular de 92kDa. Presenta una actividad de adhesión celular independiente de calcio con interacciones homotípicas y heterotípicas con nectina-3 y con la molécula de adhesión denominada CRTAM, la cual está expresada en los linfocitos T CD8+ y en las células NKTs activadas^{93,94}.

La expresión de necl-2 es ubicua; se ha detectado por Western Blot a la proteína en cerebro, pulmón, testículo, corazón bazo e hígado de ratón y, mediante microscopia de fluorescencia se observó su expresión en hígado y páncreas de ratón. En las células epiteliales necl-2 se localiza en la región basolateral de la membrana plasmática. La participación de Necl-2 en procesos de tumorigénesis ha sido ampliamente estudiada. En estudios realizados con células de cáncer de pulmón, se determinó el papel de Necl-2 como un gen supresor de tumores⁹⁴.

Necl-5: Presenta una actividad de adhesión celular independiente de calcio, sus interacciones heterotípicas son exclusivamente con nectina-3. Necl-5 se encuentra físicamente asociada con CD44, una proteína transmembranal involucrada en la migración celular y en procesos de metástasis de algunas células tumorales⁹⁵.

Las propiedades de Necl-3 y Necl-4 no se han descrito.

12.- Las Moléculas de adhesión.

Las integrinas son moléculas de adhesión que promueven la interacción entre las células, la matriz extracelular y algunos componentes del plasma. Cada integrina está compuesta por dos cadenas, α y β y en los mamíferos se han identificado 24 pares $\alpha\beta$. Las integrinas LFA1, VLA4 y la integrina $\alpha_4\beta_7$ son importantes en el funcionamiento adecuado de las células que participan en la respuesta inmune^{96,97}.

Las interacciones de LFA1 con su ligando denominado ICAM1/2 facilita el tráfico leucocitario hacia los órganos linfoides secundarios y permite la interacción con la

APC. Por otra parte, las interacciones de $\alpha_4\beta_7$ con MADCAM1 y VLA4 con VCAM1 participan en la migración de los linfocitos hacia los órganos linfoides de la mucosa y hacia los tejidos inflamados, respectivamente⁹⁶.

Una molécula involucrada en la adhesión celular es la Talina. Esta es una proteína del citoesqueleto con un peso de 250kDa y, permite la unión de las integrinas con la actina. Talina se encuentra en la región del urópodo en los linfocitos T polarizados. La unión de Talina con las integrinas se lleva a cabo en la cadena β gracias al dominio ERM, (proteína 4.1, ezrina, radixina, y moesina) localizado en el extremo amino terminal; en el extremo carboxilo se localiza Talina unida a la f-actina⁹⁷. Utilizando el ratón deficiente para Talina (tal^{-/-}), se inhibe la afinidad de diversas intergrinas, incluyendo a $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_5\beta_1$ ⁹⁸.

Por otra parte, las quimiocinas tienen un papel importante en la activación de diversas moléculas de adhesión e integrinas como LFA-1 e ICAM-1. Estudios de linfocitos T realizados mediante ensayos de adhesión han demostrado que, diversas quimiocinas promueven el arresto celular mediante la sobre-expresión de la integrina β_2 ⁹⁹.

La avidéz, entendida como la fuerza con la cual se promueve una respuesta durante la interacción entre las moléculas de adhesión y su ligando, puede ser alterada por la afinidad y la agregación de los receptores (cluster). La afinidad se refiere a la fuerza con la cual interacciona el receptor y su ligando. El balance entre la afinidad y agregación determina la activación de las integrinas⁹⁹.

En general, los linfocitos no estimulados con antígeno no son adherentes; sin embargo, en respuesta a un antígeno se adhieren a otras células y a la matriz extracelular en un periodo de minutos.

Bajo condiciones homeostáticas, la migración de los linfocitos T está mediada por L-selectina (CD62L) y con una contribución mínima de LFA1 y α_4 . En cambio, LFA1 y $\alpha_4\beta_7$ presentan un papel importante en la adhesión de los linfocitos a las HEV de los nodos linfáticos y de las placas de Peyer⁹⁶.

La regulación de la expresión de las moléculas de adhesión no está del todo descrita, sin embargo, se ha observado la participación de la cinasa PI3K y de las proteínas G. Experimentos realizados con inhibidores de PI3K han demostrado que, la inhibición de PI3K bloquea la agregación de LFA-1 inducido por quimiocinas¹⁰⁰. En cambio, la GTPasa Rho regula diferencialmente la afinidad y las uniones multivalentes de LFA1. La cinasa PKC ζ , por otro lado, está involucrada en la formación de agregados de LFA-1, inducido por las quimiocinas.

13.- CRTAM.

CRTAM (Class-I-restricted T cell associated molecule) ha sido identificada recientemente como una molécula perteneciente a la familia de las Inmunoglobulinas. Se localiza en el cromosoma 11 en el humano. Presenta 2 dominios tipo Ig uno variable y otro constante. En la región extracelular presenta 5 sitios posibles de glucosilación y en la región intracelular 3 sitios posibles de fosforilación así como un dominio de unión a PDZ^{101,102}.

CRTAM presenta un 30% de identidad con las nectinas y un 55% con las nectin-like. Su expresión se ha observado en células NKTs y en linfocitos T CD8+ estimulados con PMA y Ionomicina. Además, mediante ensayos de inmunohistoquímica se observó la expresión de CRTAM en las neuronas de Purkinje^{102,103}.

La expresión de la proteína CRTAM se observa en los linfocitos T CD8+ a partir de las 12 y 36 horas post-activación con PMA y Ionomicina, aunque se ha detectado el RNAm de CRTAM a partir de las 4 horas post-activación. El ligando identificado para CRTAM es Necl-2¹⁰². La unión de CRTAM con Necl-2 promueve la citotoxicidad de las células CD56+ y, en los linfocitos T CD8+, promueve la secreción de IFN γ .

Por otra parte, se ha identificado a una pequeña subpoblación de células dendríticas que expresan Necl-2, estas células son identificadas por la expresión de BDCA3⁺ lo cual sugiere que la interacción Necl-2 y CRTAM pudiera estar

participando en la sinapsis inmunológica¹⁰⁴. No obstante, es necesario determinar si Necl-2 y/o CRTAM participan en el proceso de sinapsis inmunológica.

La expresión de CRTAM se ha observado bajo los estímulos con PMA, Ionomicina y con anticuerpos anti-CD3 en células NKTs y linfocitos T CD8+, sin embargo se desconoce si alguna otra molécula induce o regula su expresión.

14.- Planteamiento del problema

CRTAM es una molécula que se expresa durante la fase de activación temprana de linfocitos T CD8+ y células NKT. En linfocitos T CD8+ la interacción de CRTAM con su ligando Necl-2 incrementa la liberación de IFN γ y su actividad citotóxica. Otros experimentos indican que CRTAM también pudiera tener actividad de adhesión con las células endoteliales y células APC. Por otro lado las quimiocinas modulan la expresión y afinidad de las moléculas de adhesión y también participan durante la activación vía TCR, por lo tanto es necesario determinar el papel de las quimiocinas sobre la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+.

El resolver este problema nos daría una mejor idea acerca del papel de CRTAM en los linfocitos T CD8+ activados.

15.- Hipótesis

Las quimiocinas participan en la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+.

16.- Objetivos

16.1 Objetivo general.

Evaluar el papel de las quimiocinas sobre la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+.

16.2 Objetivos particulares.

1.- Evaluar el efecto de la estimulación con diferentes concentraciones de quimiocina, sobre la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+.

2.- Evaluar el efecto de la coestimulación de las quimiocinas sobre la expresión de CRTAM, en los linfocitos T CD8+ con diferentes estados de activación vía TCR.

17.- Materiales y métodos

Obtención de células Mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Las células mononucleares de sangre periférica, se obtuvieron a partir de paquetes leucocitarios de donadores sanos, del banco de sangre del Hospital Central Norte de Pemex. La purificación de PBMCs se realizó mediante la técnica del gradiente de Ficoll. Esta técnica permite separar por densidad a los eritrocitos y a las células polimorfonucleares de los monocitos y linfocitos. Para ello se tomaron 15ml de sangre y se mezclaron con 15ml de Buffer de Solución de Fosfatos 1x (PBS 1x), previamente esterilizado. De manera paralela se colocaron 10ml de ficoll hystopaque 1077 (Sigma) en un tubo falcon de 50ml. y, se adicionó cuidadosamente la mezcla de sangre con PBS, evitando que se mezclara con el ficoll. Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 30min. a una velocidad de 1600 rpm a temperatura ambiente. Al término, se recuperó la fase que contenía a las células mononucleares. Esta fase se localiza entre el ficoll y el PBS 1x estéril. Una vez obtenidas las células se lavaron 3 veces con PBS 1x estéril a 4°C con centrifugaciones a 1200rpm durante 5 min, entre cada lavado.

En el caso donde después del primer lavado se observaron eritrocitos, se adicionó 5 ml de cloruro de amonio, y se incubaron durante 10 min. a 37°C. Esto se hizo para lisar a los eritrocitos. Al término de la incubación, las células se lavaron 2 veces con PBS 1x estéril a 4°C con centrifugaciones a 1200rpm durante 5 min, entre cada lavado. En la figura 10 se muestran los diferentes gradientes formados durante la separación de células PBMC`s, mediante la técnica de gradiente de ficoll. En el apéndice 2 se explica de manera mas detallada el protocolo de separación de células PBMC´´s mediante la técnica de gradiente de ficoll.

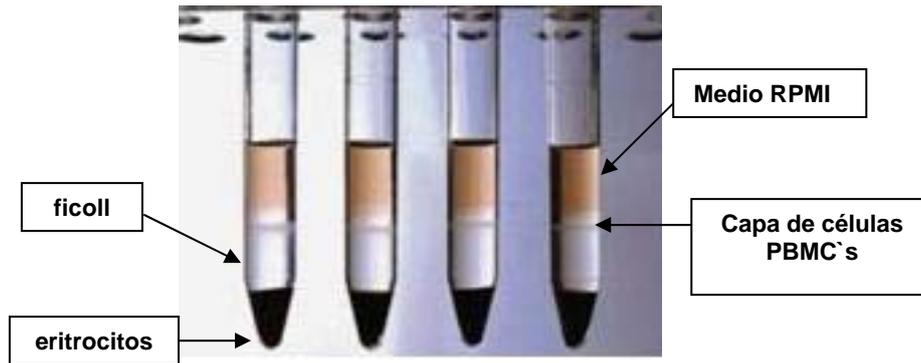


Fig 7. Gradiente de ficoll. Se muestra los diferentes gradientes formados durante la técnica de separación de células mononucleares de sangre periférica mediante el gradiente de ficoll 1077. Siendo los eritrocitos las células que presentan mayor densidad, debido a la alta concentración de hierro que presentan.

Ensayo de Estimulación

Una vez obtenidas las células mononucleares de sangre periférica se determinó la viabilidad celular mediante la tinción con azul tripano. Se cultivaron 5×10^6 células/ml en placas de 24 pozos en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino y los antibióticos estreptomycin y penicilina; para evitar el crecimiento bacteriano. Posteriormente fueron estimuladas con 2 ng/ml de forbol miristato acetato (PMA) y 200 ng/ml de Ionomycin. El tiempo de estimulación fue de 18hrs. a 37°C.

En el caso de la estimulación con las quimiocinas CXCL12, CXCL10 y CCL5, se utilizaron las concentraciones de 100, 200 y 500 ng/ml. El tiempo de estimulación fue de 18 hrs. a 37°C.

La estimulación de PBMCs con el anticuerpo anti-CD3 se realizó en placas de cultivo. Inicialmente, se incubó la placa con estreptavidina en las concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 37°C durante 1hr. Al término de la incubación, se lavó la placa con 1ml de PBS 1x estéril y se agregó el anticuerpo anti-CD3 humano biotinilado a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ó 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La incubación del anticuerpo fue a 37°C durante 1hr.

Una vez sensibilizada la placa, se cultivan 5×10^6 células/ml en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino y 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina, durante 18hrs. a 37°C .

Para los ensayos de coestimulación, se cultivaron 5×10^6 células/ml en medio RPMI, en placas previamente sensibilizadas y, se adicionaron las quimiocinas CXCL12, CCL5 y CXCL10 en las concentraciones de 100, 200 y 500ng/ml. Se incubaron a las células a 37°C durante 18hrs. En el apéndice 4 se muestra de manera mas detallada el protocolo para los ensayos de estimulación.

Ensayo de Tinción Extracelular

Una vez concluidas las 18hrs. de incubación con los diferentes estímulos, se lavaron las placas con 5ml de PBS 1x no estéril, para recuperar a las células estimuladas. Se excluyeron a las células adherentes debido a que la población de interés son los linfocitos los cuales, a diferencia de los monocitos, no se adhieren a la placa. Se centrifugaron las células a 1500rpm durante 5 min. a 4°C . Las células recuperadas fueron sometidas a 2 lavados con 15ml de PBS 1x no estéril.

Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a otros receptores, se bloquearon los receptores Fc con inmunoglobulinas durante 30 min a 4°C . Una vez concluido el tiempo de incubación, se lavaron las células con un buffer de tinción (PBS 1x 90% y SFB 10%) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. Se realizó la tinción extracelular, para los diferentes estímulos, para determinar a los marcadores CD3, CD8, CD69 y CRTAM. Los fluorocromos acoplados a estos anticuerpos fueron: FITC, Pe, APC y Cy5, respectivamente.

En el caso de la tinción para medir a CRTAM se realizó una tinción indirecta, es decir, debido a que el anticuerpo anti-CRTAM no se encuentra acoplado directamente a un fluorocromo, se utilizó un anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo Cy5. La incubación de los anticuerpos fue durante media hora a 4°C . Al término de la tinción, se lavaron las células con 1 ml de buffer de tinción y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. Se resuspende el pellet en 200 μl de

paraformaldehído al 4% para su posterior análisis en el citómetro de flujo. En el apéndice 3 se explica de manera más detallada el protocolo de tinción extracelular.

Captura y análisis de resultados mediante la técnica de Citofluorometría

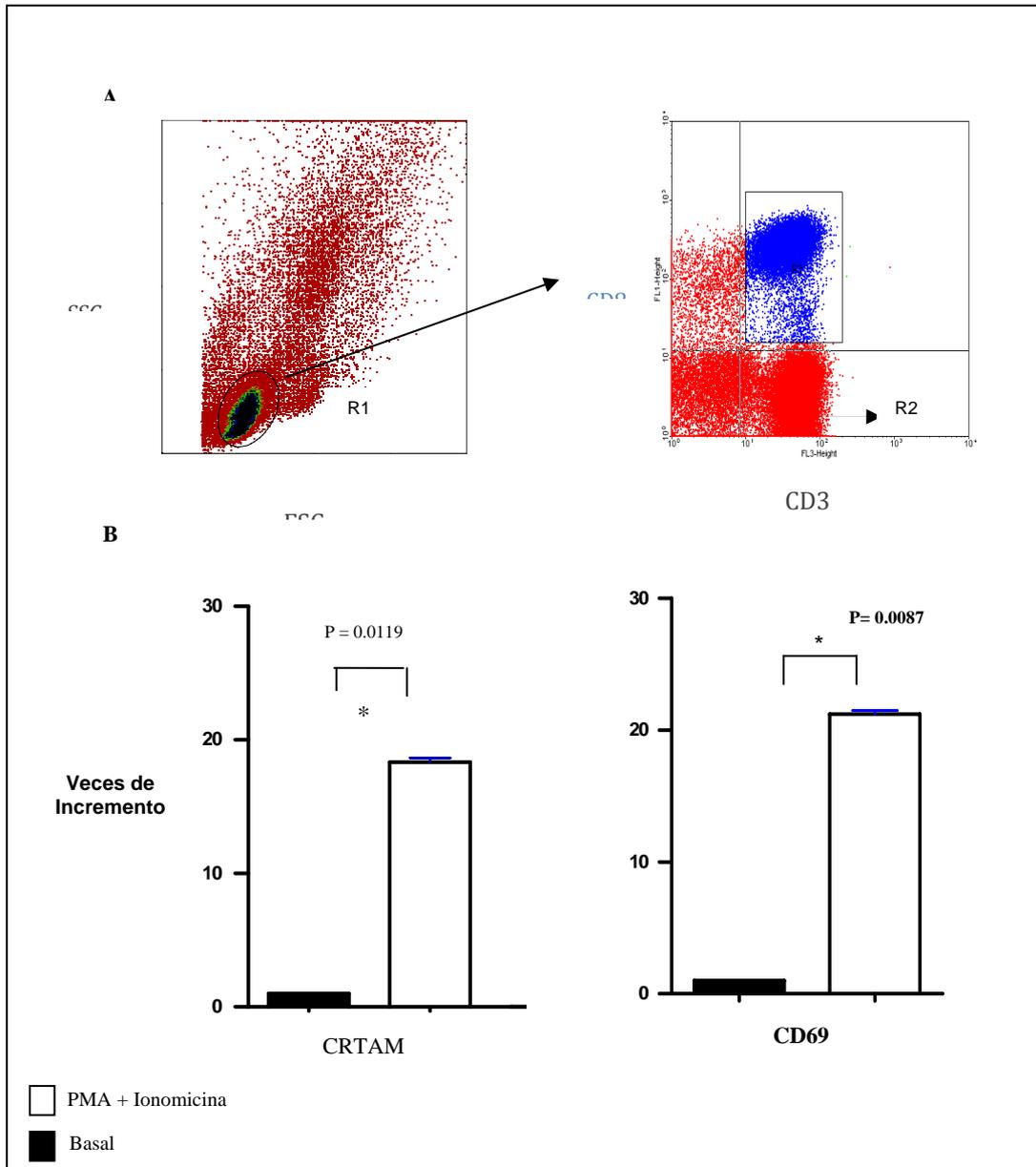
Las muestras estimuladas, teñidas y fijadas fueron capturadas en un citómetro de flujo (FACS Scan. BD), se capturaban 200,000 células para el análisis de cada muestra. Dependiendo del tamaño y la granularidad que presentan las células, se identificó a la población de interés para determinar la expresión de CRTAM mediante el programa de análisis de datos WINMDI. Los linfocitos presentan un tamaño y una granularidad baja en comparación con los macrófagos. Sin embargo, en estados de activación, los linfocitos T incrementan tanto su tamaño como su granularidad, debido al incremento de vesículas intracelulares observadas durante este proceso. El análisis de la expresión de CRTAM se evaluó mediante el porcentaje de células positivas y los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF); este valor hace referencia de la intensidad de la expresión del receptor en una sola célula. El análisis estadístico se realizó en el programa GraphPad Prism y prueba estadística utilizada fué ANOVA.

18.- Resultados

La regulación de las quimiocinas sobre la expresión de las moléculas de adhesión ha sido previamente reportada en los linfocitos T. Sin embargo se desconoce si la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+ activados puede ser regulada por las quimiocinas. Para poder abordar el problema fue necesario determinar la expresión máxima de CRTAM en los linfocitos T CD8 inducido con PMA y Ionomicina, fármacos que inducen la activación celular *in vitro*. Para ello, estimulamos a 5×10^6 cel/ml con 2 ng/ml de PMA y 200 ng/ml de Ionomicina durante 18 horas (h) y medimos la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD3⁺, CD8⁺, CRTAM⁺. Como control de activación usamos al marcador de activación temprana CD69. La expresión de CD69, se observa a partir de las primeras 4h y hasta 48h después de la activación de los linfocitos T.

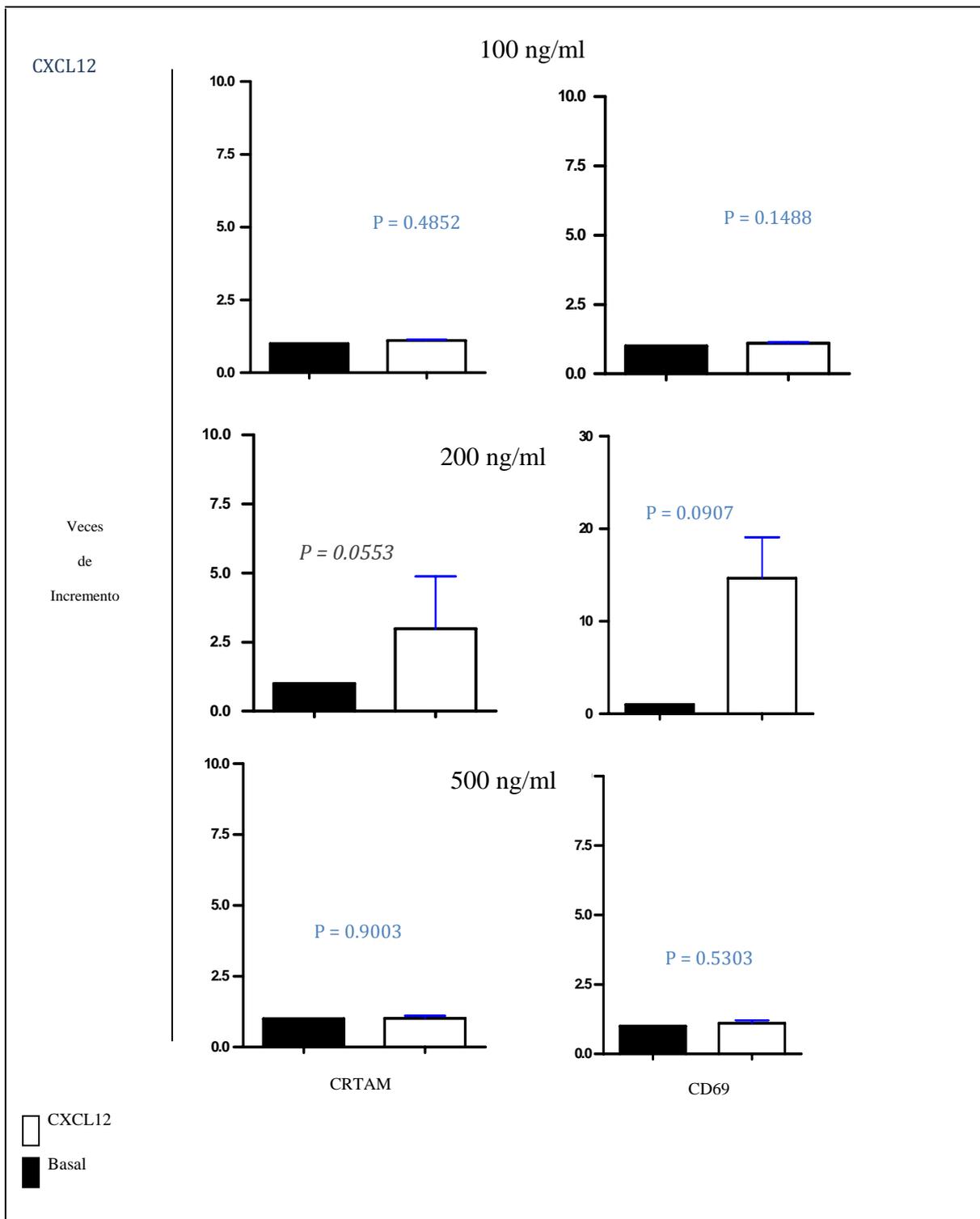
Para el análisis de los resultados, se determinó a la subpoblación de los linfocitos T mediante su tamaño y granularidad (Gráfica 1) ya que las células mononucleares de sangre periférica no solamente incluyen a los linfocitos T y B, sino además se encuentran presentes monocitos, macrófagos y células dendríticas (los granulocitos no se encuentran presentes en las PBMCs). El tamaño y la granularidad de estas células varían dependiendo del tipo celular y de su estado de activación. En el caso de los linfocitos T y B, estos presentan un tamaño pequeño, y la granularidad, mediada en términos de vesículas intracelulares, es menor en comparación a los macrófagos y células dendríticas. El marcador CD3 permite distinguir a los linfocitos T de los linfocitos B. Debido a ello, se realizó tinción para determinar la expresión del co-receptor CD3; el co-receptor CD8 fue determinado además, para excluir a los linfocitos T CD4+. La expresión de CRTAM fue medida en porcentaje de células que expresan el marcador, así como la intensidad de esa expresión. La gráfica 1A muestra la región establecida para los linfocitos T así como a la subpoblación CD3+CD8+. En la gráfica 1B se muestra la expresión de CRTAM y CD69 inducido por los estímulos de PMA y Ionomicina. La expresión de CRTAM observado a las 18h post activación se incrementó 17 veces con respecto a su expresión basal. En cuanto a la expresión de CD69, el efecto de PMA y Ionomicina incrementó hasta más de 20 veces con respecto a su basal. Una vez determinada

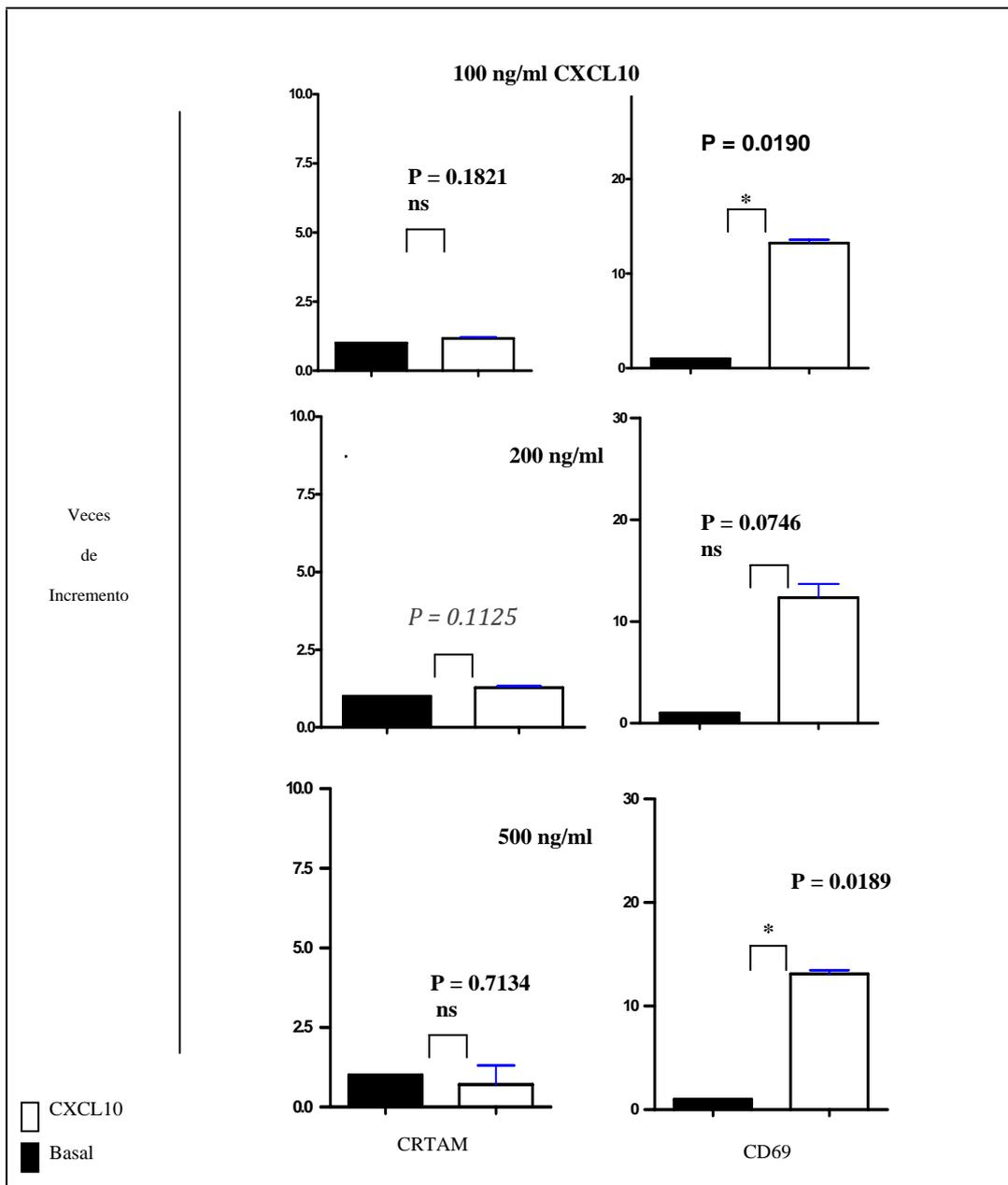
la expresión máxima de CRTAM, fue necesario determinar si el estímulo de las quimiocinas inducía la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+.



Gráfica 1. **Los linfocitos T CD8+ estimulados durante 18h con PMA y Ionomicina expresan CRTAM.** A) Se muestra una gráfica de puntos de la distribución de células mononucleares con base en su tamaño y granularidad. La región 1(R1) incluye a las células que presentan el menor tamaño y granularidad, que corresponde a los linfocitos T y B. A partir de R1 se analizó la expresión de CRTAM en la subpoblación CD3⁺CD8⁺ (R2). B) Se muestra la expresión de CRTAM inducido por los estímulos de PMA (2ng/ml) + Ionomicina (200ng/ml). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA. n=2.

Para ello se estimularon a las células PBMCs con diferentes concentraciones (100, 200 y 500 ng/ml) de las quimiocinas CXCL12 y CXCL10, durante 18 h y se midió la expresión de CRTAM. Los linfocitos T CD8⁺ en estado basal, expresan los receptores CXCR4 (receptor para CXCL12) y CXCR3 (receptor para CXCL10). La gráfica 2 muestra la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8⁺, bajo el estímulo de las quimiocinas CXCL12 y CXCL10.





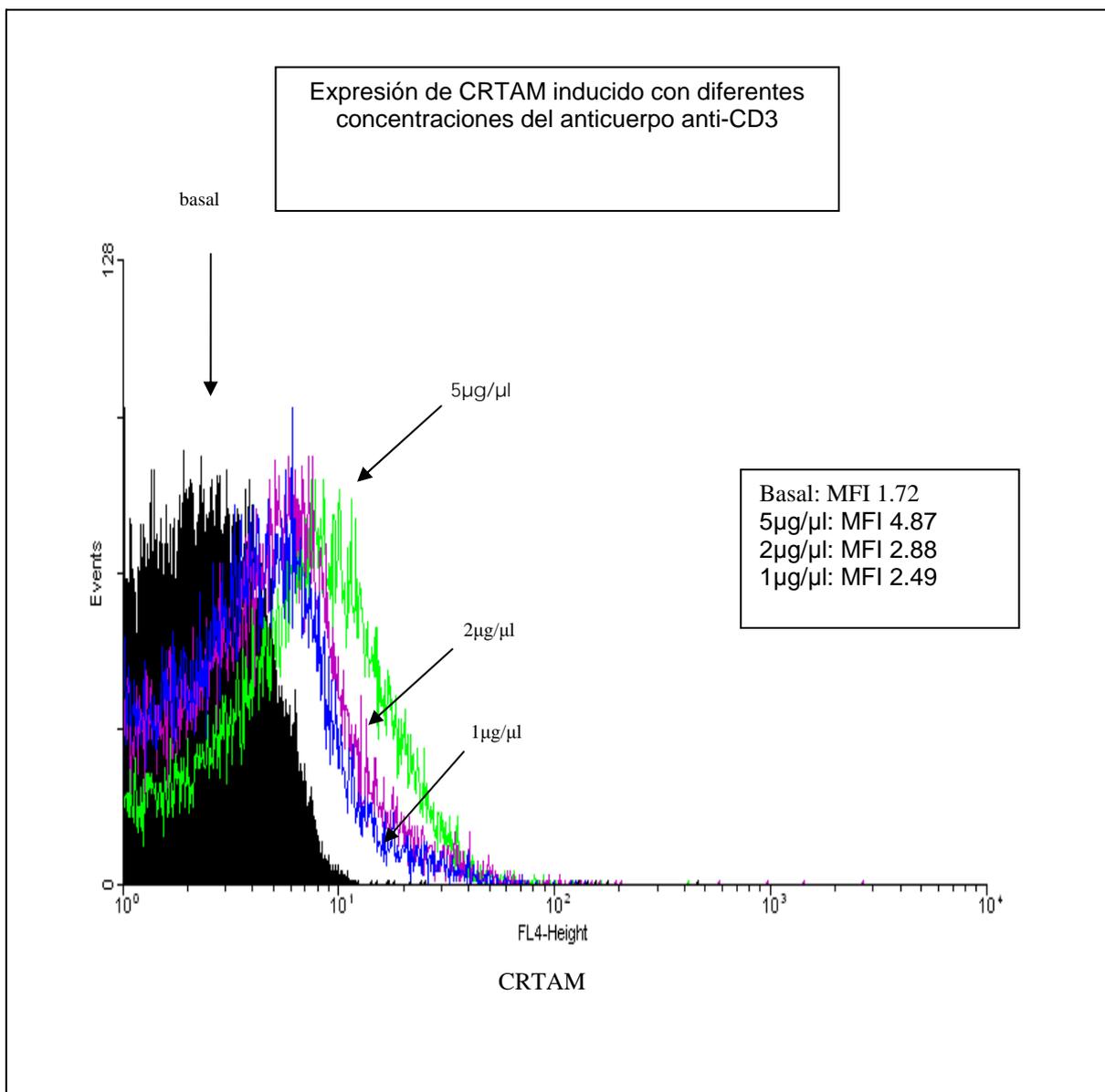
Gráfica 2. **Las quimiocinas CXCL12 y CXCL10 no inducen la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+.** Expresión de CRTAM bajo el estímulo de las quimiocinas CXCL12 y CXCL10. A) Curva de concentración-respuesta de la quimiocina CXCL12 sobre la expresión de CRTAM. B) Curva de concentración-respuesta de la quimiocina CXCL10 sobre la expresión de CRTAM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA. ns (no es significativo). n=2.

Las quimiocinas no inducen la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+.

La presencia de las diferentes concentraciones de las quimiocinas CXCL12 y CXCL10 no indujo la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+. La falta de respuesta en la expresión de CRTAM en presencia de las quimiocinas CXCL12 y CXCL10 sugieren dos cosas: la primera es que las quimiocinas y sus receptores no

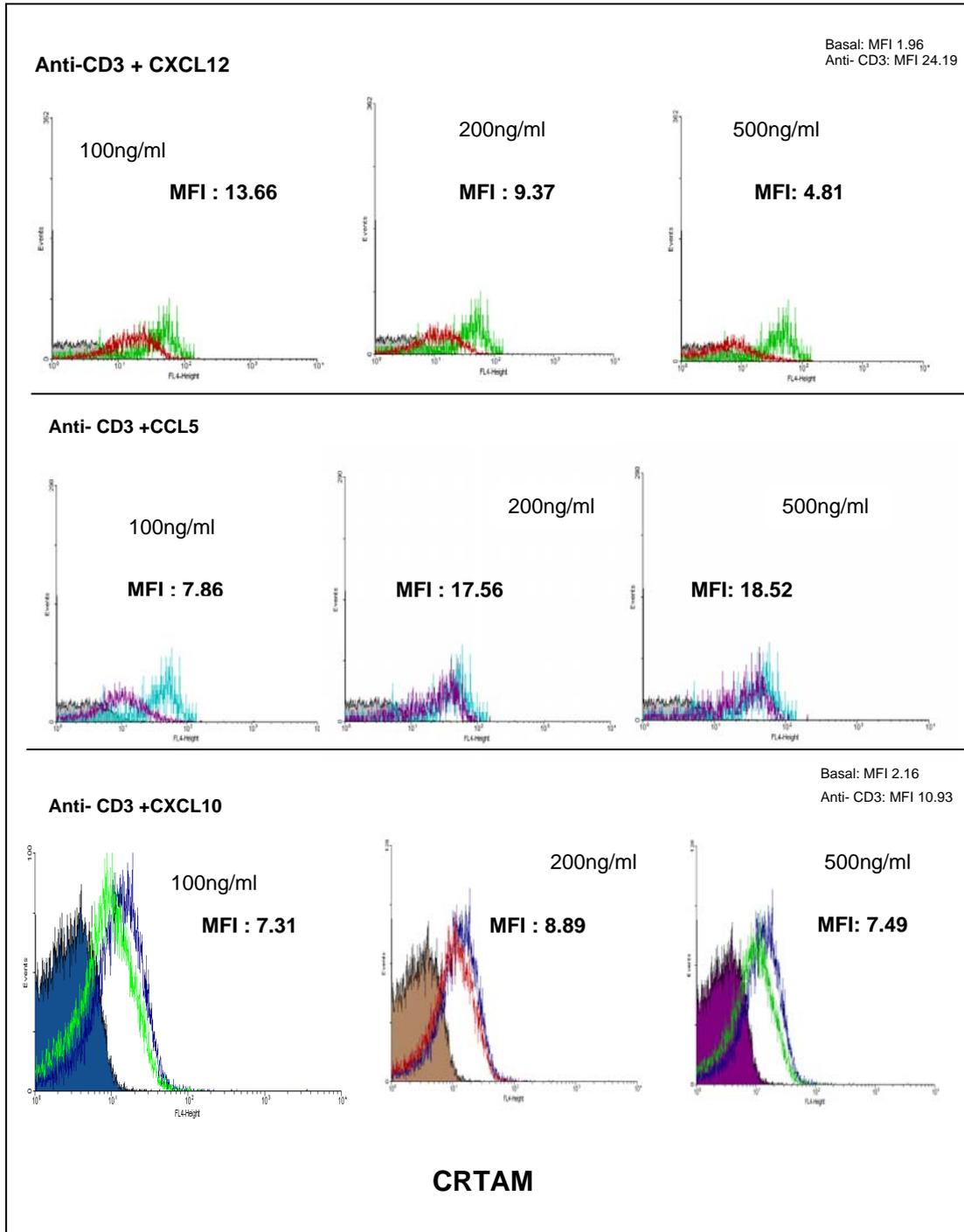
participan en el aumento en la síntesis de CRTAM y la segunda es que las señales inducidas por las quimiocinas no es suficiente para promover una activación celular que permita la expresión de CRTAM. Para determinar el efecto de las quimiocinas sobre la expresión de CRTAM se estimularon a las células mononucleares con el anticuerpo anti-CD3 y se agregaron las diferentes concentraciones de las quimiocinas CXCL12, CXCL10 y CCL5.

Previo a los ensayos de coestimulación se determinó la expresión de CRTAM bajo diferentes estadios de activación celular, obtenidos mediante diferentes concentraciones del anticuerpo anti-CD3. En la gráfica 3 se muestra la expresión de CRTAM inducida con diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CD3. Para la curva de concentración, se estimularon a los linfocitos T CD8+ con 1, 2 ó 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del anticuerpo anti-CD3 y 18h después se midió la expresión de CRTAM.



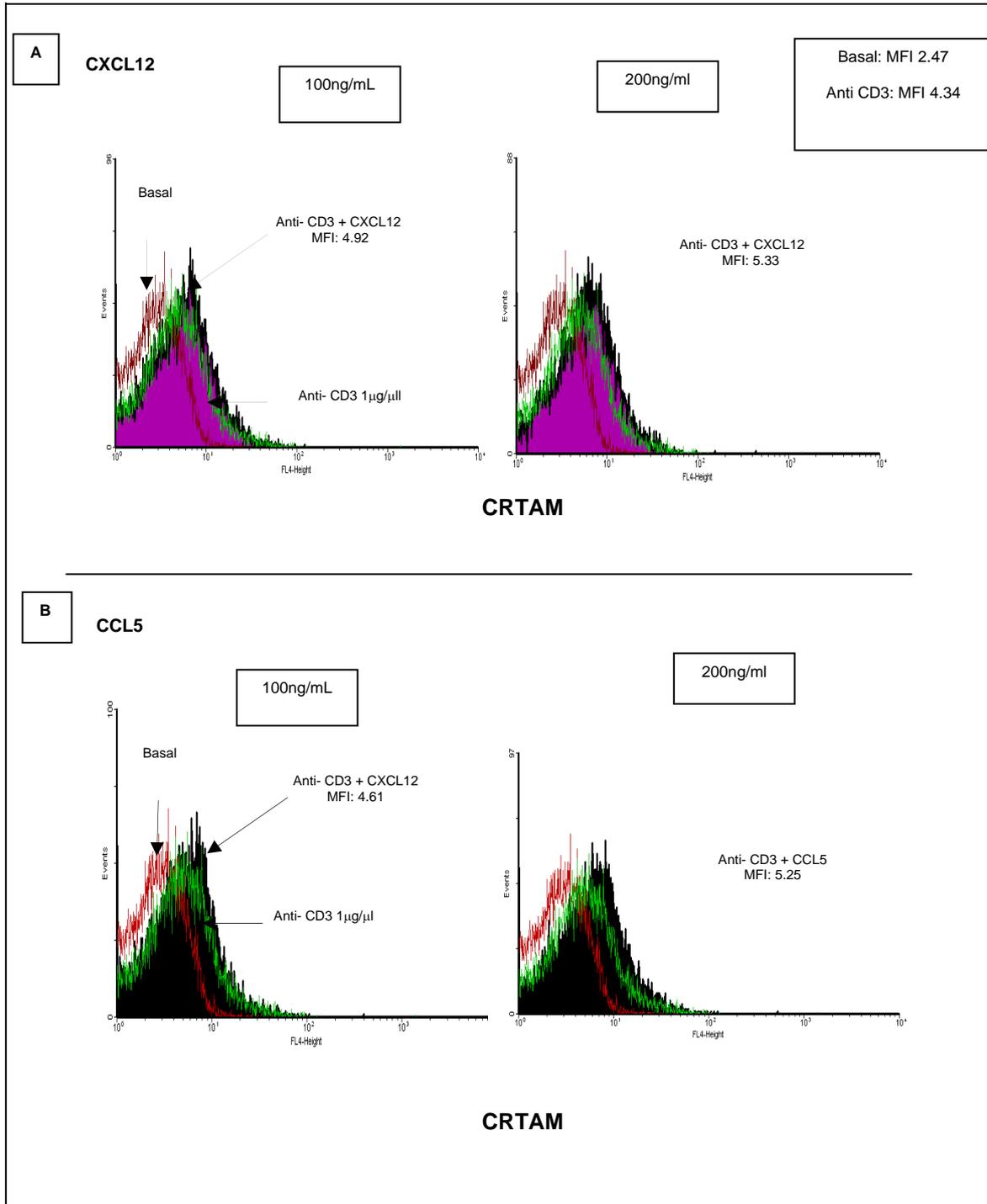
Gráfica 3. **Gráfica de concentración-respuesta del anticuerpo anti-CD3 para determinar la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+.** Histograma donde se muestra la expresión de CRTAM con 1, 2 y 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de anticuerpo anti-CD3 humano (OKT3). Se utilizó la concentración más alta y más baja del anticuerpo anti-CD3 para los ensayos de coestimulación con las quimiocinas CXCL12, CXCL10 y CCL5. El incremento de la MFI se tomó con respecto al basal.

La expresión de CRTAM inducida con 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del anticuerpo anti-CD3 disminuye en presencia de las quimiocinas CXCL12, CXCL10 y CCL5 en los linfocitos T CD8+. Reportes previos han mostrado que las quimiocinas y sus receptores participan en la regulación de la señal del TCR durante los procesos de activación celular. Tomando en cuenta que, CRTAM se induce durante el proceso de activación, decidimos evaluar el papel de las quimiocinas sobre la expresión de CRTAM inducido por el TCR. Para ello, estimulamos a las PBMCs con 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de anticuerpo anti-CD3 y se añadieron diferentes concentraciones de las quimiocinas CXCL12, CXCL10 y CCL5 (100, 200 y 500 ng/ml) y se midió la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+ activados. En la gráfica 4 muestra la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+ activados de manera simultánea con el anticuerpo anti-CD3 y las quimiocinas CXCL12, CCL5 ó CXCL10. Los resultados obtenidos de estos ensayos mostraron que la presencia de las quimiocinas CXCL12, CXCL10 y CCL5 disminuye la expresión de CRTAM. Estos resultados nos indican que las quimiocinas participan en la regulación de la expresión de CRTAM, inducida por el TCR. Sin embargo, es probable también que la concentración del anticuerpo anti-CD3 promueva una alta expresión de CRTAM, inhabilitando un aumento en la expresión en presencia de las quimiocinas. Cabe hacer notar que la disminución de CRTAM por efecto de las quimiocinas no llega a un nivel basal de la proteína, es decir, no hay una inhibición de la expresión de CRTAM por efecto de las quimiocinas.



Gráfica 4. La expresión de CRTAM inducida con $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del anticuerpo anti-CD3 disminuye en presencia de las quimiocinas CXCL12, CXCL10 y CCL5 en los linfocitos T CD8+. Gráficas representativas de la expresión de CRTAM al estimular a 5×10^6 cel/ml con $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 100,200 y 500ng/ml de las quimiocinas CXCL12, CCL5 y CXCL10. Los resultados son expresados como la intensidad media de fluorescencia (MFI).

La expresión de CRTAM inducida con $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del anticuerpo anti-CD3 aumenta en presencia de las quimiocinas CXCL12 y CCL5 en los linfocitos T CD8+. La disminución de la concentración del anticuerpo anti- CD3, resultó en el aumento de la expresión de CRTAM en presencia de las quimiocinas CXCL12 y CCL5.



Gráfica 5. La expresión de CRTAM inducida con $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del anticuerpo anti-CD3 aumenta en presencia de las quimiocinas CXCL12 y CCL5 en los linfocitos T CD8+. La concentración subóptima utilizada para el anticuerpo anti-CD3 durante los ensayos de coestimulación fue de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$. A) Se muestra el efecto de la quimiocina CXCL12, a dos concentraciones diferentes, sobre la expresión de CRTAM inducido por el anticuerpo anti-CD3 en los linfocitos T CD8+. Las concentraciones de las quimiocinas utilizadas fueron de 100 y 200ng/ml. B) Histogramas que muestran el aumento en la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+ activados por efecto de CCL5. Los valores fueron obtenidos mediante los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF).

Ambas quimiocinas indujeron un efecto similar sobre CRTAM, el cual fue dependiente de la concentración utilizada. A pesar de observar un incremento modesto en la expresión, el efecto observado con $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del anticuerpo anti-CD3 se revierte.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que, las quimiocinas regulan la expresión de CRTAM en linfocitos T CD8+ activados y además, ésta regulación depende del estado de activación celular.

19.- DISCUSIÓN

Una respuesta inmune de tipo adquirida se inicia con el reconocimiento de antígenos procesados y presentados por el MHC expresado en las células APCs, al TCR. Las quimiocinas secretadas por las APCs, inhiben la migración de los linfocitos T durante el reconocimiento antigénico, probablemente para promover una interacción estable entre ambas células²⁸.

La respuesta al gradiente quimiotáctico depende de la expresión de los receptores de quimiocinas en los linfocitos T. En el caso de los linfocitos T CD8+, CXCR4 y CXCR3 se expresan principalmente en condiciones homeostáticas, mientras que el receptor CCR5, lo hace en condiciones inflamatorias⁵⁵. Reportes recientes han demostrado que las quimiocinas también participan en los procesos de proliferación y apoptosis, además de regular la señal del TCR durante el proceso de activación¹⁰⁹.

Por otro lado, las moléculas de adhesión participan en los procesos que involucran interacciones celulares, como son: el reconocimiento antigénico y la transmigración. Las quimiocinas regulan tanto la expresión como la afinidad de las moléculas de adhesión, mediante un mecanismo conocido como “signaling inside out” (señalización de adentro hacia fuera)^{78,80}. La señalización inducida durante este mecanismo, a diferencia de la señalización generada mediante la interacción ligando-receptor (señal de afuera hacia adentro), regula la expresión de una molécula que se encuentra en la superficie. Es necesario estudiar con más detalle la(s) vía(s) que participa(n) en este mecanismo, sin embargo, se han propuesto algunas proteínas que pudieran estar participando en esta señalización entre las que resaltan ZAP-70, SLP-76 y la proteína adaptadora LAT⁸⁰.

En el caso de los linfocitos T CD8+, se expresa una molécula de adhesión, durante las primeras 36 h post activación, denominada CRTAM. Esta expresión no es exclusiva de estos linfocitos, ya que su expresión se observa también en las células NKTs así como en otros tipos celulares¹⁰³. En los linfocitos T CD8+, CRTAM participa en la producción de IFN γ y en el caso de las células NK, aumenta su citotoxicidad¹⁰². La activación del TCR induce la expresión de CRTAM, sin

embargo, no se ha descrito la participación de otras moléculas en la regulación de la expresión de CRTAM. Tomando en cuenta que las quimiocinas regulan la expresión de las moléculas de adhesión y que además modulan la señal del TCR, se decidió evaluar el papel de las quimiocinas sobre la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+. Para lograr nuestro objetivo, estimulamos células PBMCs con diferentes concentraciones de CXCL12, CXCL10 y CCL5, en presencia o ausencia del anticuerpo anti-CD3. Los resultados obtenidos muestran que el sólo estímulo de las quimiocinas no promueve la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+. Sin embargo, en presencia del anticuerpo anti-CD3, la expresión de CRTAM es regulado por las quimiocinas. Además, el efecto regulador de las quimiocinas sobre CRTAM depende del estado de activación celular medido con diferentes concentraciones del anticuerpo anti-CD3 y además con el marcador de activación CD69.

Una posible explicación al porqué las quimiocinas no inducen la síntesis de CRTAM, puede deberse a que CRTAM se expresa en condiciones de activación, y la señal inducida por los receptores CXCR4 y CXCR3 no es suficiente para promover una activación celular. En cuanto al marcador de activación CD69 utilizado como control de activación, tampoco fue inducido en presencia de las quimiocinas CXCL12 y CXCL10. Estos datos concuerdan con reportes anteriores donde se muestra que la coestimulación de CXCL12 aumenta la expresión de CD69, sin embargo, el sólo estímulo con la quimiocina, no es capaz de inducir su expresión¹¹⁰. En el caso de CXCL10, la expresión de CD69 observada bajo las concentraciones de 100 y 500 ng/ml de quimiocina, resultó ser estadísticamente significativo.

Debido a la falta de expresión de CRTAM en células estimuladas únicamente con quimiocinas a diferentes concentraciones, se evaluó su papel coestimulador sobre la expresión de CRTAM, inducido por el TCR.

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de estimulación de las células mononucleares con las diferentes concentraciones del anticuerpo anti-CD3, demostraron que las quimiocinas CXCL12, CXCL10 y CCL5 participan en la

regulación de la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+. La adición de las diferentes concentraciones de CXCL12, CXCL10 y CCL5 resultó en una disminución de la expresión de CRTAM, inducida por el TCR a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en los linfocitos T CD8+. Estos resultados sugieren que la concentración de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de anticuerpo anti- CD3 indujo un nivel de expresión de CRTAM donde no puede ser aumentado en presencia de las quimiocinas.

Por otro lado, además de regular la señal del TCR, los receptores de quimiocinas tienen la capacidad de regular la expresión de moléculas de adhesión. Por lo que la disminución observada de CRTAM en los linfocitos T CD8+, en presencia de las quimiocinas, puede reflejar un mecanismo de regulación de la activación de los linfocitos T CD8+. Sin embargo, es necesario que se realicen ensayos donde se muestre que el aumento o la disminución de CRTAM por efecto de las quimiocinas, altera el proceso de activación.

Para determinar si las quimiocinas pueden, además de disminuir la expresión de CRTAM, aumentarla, fue necesario disminuir la concentración de anticuerpo anti-CD3. Mediante una curva de concentración se determinó la concentración subóptima a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de anticuerpo. Esta concentración nos permite observar la expresión de CRTAM sin llegar a los niveles inducidos con 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de anticuerpo anti-CD3. Los datos obtenidos en los ensayos de coestimulación bajo estas condiciones de activación, muestran que las quimiocinas CXCL12 y CCL5 aumentan la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+. Tomando en cuenta los resultados obtenidos con las 2 diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CD3, se concluye que el efecto regulador de las quimiocinas sobre la expresión de CRTAM, depende del estado de activación celular.

Los diferentes estadios de activación que se observan *in vitro* con el anticuerpo anti-CD3, reflejan en gran medida, el proceso de activación inducida por la presencia de un antígeno. La activación de los linfocitos T depende de diversos factores como el MHC que se asocie, el tipo de antígeno que se esté presentando,

la presencia de moléculas accesorias y del microambiente donde se esté llevando a cabo la sinapsis inmunológica⁷.

Las proteínas intracelulares que pudieran estar participando en el mecanismo de regulación de CRTAM por efecto de las quimiocinas son ZAP-70, SLP76, LAT, las cinasas PI3K y PKC así como la GTPasa Rho. Esto es debido a que son proteínas que se activan durante la señal del TCR y la activación de los receptores de quimiocinas; además, éstas proteínas participan en el mecanismo de señalización "inside out signaling". Por otro lado, se ha observado que la señal de CXCR4 promueve la fosforilación de ZAP-70 y SLP-76, así como de las cinasas MAPKs.

El mecanismo por el cual se induce la expresión de CRTAM, aún no está descrita. Sin embargo a nivel transcripcional, los posibles factores de transcripción que pudieran estar participando en la expresión de CRTAM son NFκB, NFAT y AP-1, debido a que son factores de transcripción que participan durante la activación celular y en respuesta a la señal inducida por los receptores de quimiocinas. Sin embargo se requieren de estudios más detallados para definir las proteínas que están participando en el entrecruzamiento de las vías del TCR, receptores de quimiocinas y CRTAM.

La regulación de CRTAM por las quimiocinas, pudiera alterar, además del proceso de activación, el reconocimiento antigénico y la transmigración endotelial. La expresión de Necl-2 (ligando de CRTAM) se observa en la región basolateral de las células endoteliales, así como en células dendríticas BDCA3+. Debido a esto, la regulación de CRTAM por quimiocinas podría tener un papel importante en la estabilidad de la interacción entre un linfocito T CD8+ y una célula APC (sinapsis inmunológica). En el caso del proceso de transmigración, las quimiocinas pudieran regular la expresión de CRTAM, dependiendo de la región donde se localice el ligando.

En cuanto a la activación de los linfocitos T CD8+, es necesario que se encuentre altamente regulada, debido a que estos linfocitos T promueven una respuesta citotóxica, es decir, inducen la apoptosis de células infectadas por un patógeno intracelular o de células tumorales. Existen 2 mecanismos por los cuales

los linfocitos TCD8+ pueden inducir la muerte celular: a) mediante la secreción de proteasas como las perforinas y las granzimas, las cuales atraviesan la membrana de la célula blanco mediante la formación de poros, lo que trae como consecuencia la disrupción de la membrana, induciendo un choque osmótico que resulta en la apoptosis. El otro mecanismo es b) mediante la interacción del receptor Fas con su ligando Fas-L, lo cual induce la activación de diversas caspasas, como la caspasa 3, que inducen la activación de proteínas pro-apoptóticas¹⁹. Los linfocitos T CD8+ activados, también producen grandes cantidades de IFN γ . Ensayos de co-estimulación con el anticuerpo anti-CD3 y las quimiocinas CXCL12 y CCL5, muestran que la producción de IFN γ es aumentada en presencia de las quimiocinas. Tomando en cuenta que la expresión de CRTAM promueve la producción de IFN γ en los linfocitos T CD8+ y que la expresión de CRTAM está regulada por las quimiocinas, es posible que las quimiocinas regulen la secreción de IFN γ en los linfocitos T CD8+, a través de la expresión de CRTAM.

Por otro lado, la internalización de receptores de membrana es un mecanismo que permite la degradación y reciclamiento de los mismos una vez concluida su señalización. Esta internalización se lleva a cabo mediante la unión de las proteínas denominadas arrestinas, las cuales transportan los receptores internalizados hacia los endosomas¹¹³. En el caso de los receptores de quimiocinas, se ha observado que la activación del TCR promueve la internalización de CXCL12 y CCL5¹¹⁴. La disminución de CRTAM en presencia de quimiocinas pudiera atribuirse también a una internalización del receptor mediada por la activación de las arrestinas. Sin embargo, es necesario realizar ensayos que permitan determinar si la activación de los receptores de quimiocinas pueden disminuir la expresión de CRTAM mediante la activación de las arrestinas.

Recientemente se reportó el reclutamiento de los receptores CXCR4 y CCR5 a la zona de interacción entre una célula APC y un linfocito T durante la sinapsis inmunológica. La consecuencia del reclutamiento de estos receptores no está claramente descrita, sin embargo, se ha postulado que los receptores de quimiocinas participan en la estabilidad de la interacción celular mediante la secreción local de quimiocinas, lo que evita que otros quimioatrayentes presentes

en el microambiente, irrumpen la interacción celular¹¹². Un mecanismo por el cual los receptores de quimiocinas podrían regular esta estabilidad, es mediante la expresión de CRTAM. Sin embargo, es necesario determinar si CRTAM es reclutada en la zona de interacción entre un linfocito T CD8+ y una célula APC.

20.- CONCLUSIONES

- 1.- Las quimiocinas CXCL12 y CXCL10 no inducen la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8+.
- 2.- La expresión de CRTAM, inducida vía el TCR, es regulada por las quimiocinas CXCL12, CXCL10 y CCL5.
- 3.- La regulación de las quimiocinas sobre la expresión de CRTAM, depende del estado de activación celular, considerando que se utilizaron diferentes concentraciones del anticuerpo anti-CD3.
- 4.- En presencia de altas concentraciones del anticuerpo anti- CD3 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), las quimiocinas disminuyen la expresión de CRTAM.
- 5.- Bajas concentraciones del anticuerpo anti- CD3 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), permite que las quimiocinas aumenten la expresión de CRTAM.

Se concluye que las quimiocinas participan en la regulación de la expresión de CRTAM durante el proceso de activación celular en los linfocitos T CD8+. Tomando en cuenta que las quimiocinas están involucradas en el proceso de migración y en el proceso de activación celular, es posible que uno de los mecanismos de regulación de las quimiocinas durante este proceso sea mediante la expresión de CRTAM. Al aumentar la expresión de CRTAM se promueve la adhesión celular, favoreciendo el reconocimiento antigénico y la transmigración, en cambio, si el estado de activación es mayor al óptimo, la expresión de CRTAM disminuye en presencia de las quimiocinas, evitando así la migración de linfocitos T CD8+ autoreactivos.

21.- PERSPECTIVAS

- 1.- Es necesario purificar a los linfocitos T CD8+ de las PBMCs para determinar si la regulación de las quimiocinas sobre la expresión de CRTAM es un efecto directo en la señal del TCR o requiere de la cooperación de otros factores solubles presentes en la mezcla celular.
- 2.- Determinar a nivel del RNAm el efecto de las quimiocinas sobre CRTAM para identificar si el mecanismo de regulación se da a nivel de transcripción o solo a nivel de expresión en membrana.
- 3.- Determinar si la presencia de 2 ó más quimiocinas inducen la expresión de CRTAM así como la regulación de su expresión inducida por el TCR.
- 4.- Realizar ensayos de trans migración para determinar si la regulación en la expresión de CRTAM afecta a este proceso en los linfocitos T CD8+.
- 5.- Medir posibles proteínas intracelulares que pudieran estar participando en el mecanismo de regulación de las quimiocinas, como ejemplo: ZAP-70, SLP-76, LAT, PI3K y la GTPasa Rho, mediante diferentes técnicas que permitan evaluar el estado de activación de estas proteínas durante la inducción de CRTAM.

22.- Referencias consultadas.

- 1.- Alberts, B., D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. Molecular Biology of the Cell, (Garland Publishing, Inc. 1994).
- 2.- Charles A. Janeway, Jr. & Ruslan Medzhitov. Innate Immune Recognition. *Annu Rev. Immunol* **20**, 197, 216 (2002).
- 3.- Delves, P. J. & Roitt, I. M. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* **343**, 37-49 (2000).
- 4.- Delves, P. J. & Roitt, I. M. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* **343**, 108-17 (2000)
- 5.- Germain, R.N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* **2**, 309-22 (2002).
- 6.- Bommhardt, U., Beyer, M., Hunig, T. & Reichardt, H.M. Molecular and cellular mechanisms of T cell development . *Cell Mol Life Sci* **61**, 263-80 (2004).
- 7.- K. Christopher García & Erin J. Adams. How the T cell receptor sees antigen-a structure view. *Cell* **122**, 333-36 (2005).
- 8.- Robert T. Abraham & Arthur Weiss. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev* **4**, 301-08 (2004).
- 9.- Arthur Weiss & John C. Cambier. Lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* **16**, 285-87.
- 10.- Silvia Valensin, Silvia Rossi Paccani, Cristina Ulivieri, David Mercati, Sonia Pacini, Laura Patrussi, Tim Hirst, Pietro Lupetti & Cosima T. Baldari. F-actin dynamics control segregation of the TCR signaling cascade to clustered lipid rafts. *Eur J Immunol* **32**, 435-46 (2002).
- 11.- Nava K. & Soldevila, G. Molecular signals involved in CD4 versus CD8 T cell commitment. *Inmunología* **23**, 313- 27 (2004).
- 12.- Qi, M. & Elion, E.A. MAP kinases pathway. *J Cell Sci* **118**, 3569-72 (2005).
- 13.- Kolch, W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 827-37 (2005).
- 14.- Winslow, M.M, Neilson J. R. & Crabtree, G.R. Calcium signalling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **7**, 299-307 (2003).
- 15.- Giandomenica Iezzi, Klaus Karjalainen & Antonio Lanzavecchia. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* **8**, 89-95 (1998).

- 16.- Arlene H. Shape & Gordon J. Freeman. The B7-CD28 Superfamily. *Nat Rev Immunol* **2**, 116-26.
- 17.- Robert S. Liwski, Jennifer C. Chase, William H. Baldrige, Irene Sadek, Geoffrey Rowden & Kenneth A. West. Prolonged costimulation is required for naive T cell activation. *Immunol Lett*, 1-9 (2006).
- 18.- Rance E, Berg & James Forman. The role of CD8 T cells in innate immunity and in antigen non-specific protection. *Curr Opin Immunol* **18**, 338-43 (2006).
- 19.- David Kägi, Birgit Lederman, Kurt Bürki, Rolf M. Zinkernagel & Hans Hengartner. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol* **14**, 207-32 (1996).
- 20.- Israel Pecht & Dmitry M. Gakamsky. Spatial coordination of CD8 and TCR molecules controls antigen recognition by CD8+ cells. *FEBS Letters* **579**, 3336-41 (2005).
- 21.- Kerry, S. E., Buslepp, J., Cramer, L. A., Maile, R., Hensley, L. L., Nielsen, A. I., Kavathas, P., Vilen B.J., Collins, E. J. & Frelinger, J.A. Interplay between TCR affinity and necessity of coreceptor ligation: high-affinity peptide-MHC/TCR interaction overcomes lack of CD8 engagement. *J Immunol* **171**, 4493-03 (2003).
- 22.- Adelheid Cerwenka, Laura L. Carter, Joyce B. Reome, Susan L. Swain & Richard W. Dutton. In vivo persistence of CD8 polarized T cell subsets producing type 1 or type 2 cytokines. *J Immunol* **161**, 97-105 (1998).
- 23.- Laura Carter & Richard W Dutton. Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T cell subsets. *Curr Opin Immunol* **8**, 336-42 (1996).
- 24.- Erard, F., M. T. Wild, J. A. Garcia-Sanz & G. Le Gros. Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4- cells that make TH2 cytokines and help B cells. *Science* **260**. 1802 (1993).
- 25.- Roberto Bonasio & Ulrich H Von Andrian. Generation, migration and function of circulating dendritic cells. *Curr Opin Immunol* **18**, 1-9 (2006).
- 26.- Tsvetelina Pentcheva-Hoang, Jackson G. Egen, Kathleen Wojnooski & James P. Alisson. B7-1 and B7-2 Selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* **21**, 401-13 (2004).
- 27.- Granucci F, Foti & Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell biology. *Adv Immunol* **88**, 193-33 (2005).

- 28.- Maria Foti, Francesca Granucci, Diego Aggujaro, Elio Liboi, Walter Luini, Simone Minardi, Alberto Mantovani, Silvano Sozzani & Paola Ricciardi-Castagnoli. Upon dendritic cell (DC) activation chemokines and chemokine receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of DC at the inflammatory site. *Int Immunol* **11**, 979-86 (1999).
- 29.- Thorsten R. Mempel, Sarah E. Henrickson & Ulrich H. Von Andrian. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* **427**, 154-59 (2004).
- 30.- Andrew Kaiser, Emmanuel Donnadieu, Jean-Pierre Abastado, Alain Trautmann & Alessandra Nardin. CC chemokine ligand 19 secreted by mature dendritic cells increases naive T cell scanning behavior and their response to rare cognate antigen. *J Immunol* **175**, 2349-56 (2005).
- 31.- Antonio Lanzavecchia. Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr Opin Immunol* **8**, 348-54 (1996).
- 32.- Peter van Endert & José A Villadangos. Antigen processing and recognition. *Curr Opin Immunol* **19**, 63-65 (2007).
- 33.- Sallusto F, Cella M, Danieli C & Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment:downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182**, 389-00 (1995).
- 34.- Goldberg AL, Rock KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* **357**, 375-79 (1992).
- 35.- Ian A. York & Kenneth L. Rock. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* **14**, 369-96 (1996).
- 36.- Shawar SM, Vyas JM, Rodgers JR, Rich RR. Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules. *Annu Rev Immunol* **12**, 839-80 (1994).
- 37.- Cresswell P, Bangia N, Dick T & Diedrich G. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol Rev* **172**, 21-28 (1999).
- 38.- Hammond SA, Johnson RP, Kalams SA, Walker BD, Takiguchi M, Safrit JT, Koup RA & Siliciano RF. An epitope-selective, transporter associated with antigen presentation (TAP)-1/2-independent pathway and a more general TAP-1/2-dependent antigen –processing pathway allow HIV –1 envelope glycoprotein by CD8+CTL. *J Immunol* **154**, 6140-56 (1995).

- 39.- Lieping Chen. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev* **4**, 336-45 (2004).
- 40.- Su-Ti Tseng & Michael L Dustin. T-cell activation: a multidimensional signaling network. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 575-80 (2002).
- 41.- Alessandro Moretta & Cristina Bottino. Regulated equilibrium between opposite signals: a general paradigm for T cell function. *Eur J Immunol* **34**, 2084-88 (2004).
- 42.- Richard A Kroczek, Hans Werner Mages & Andreas Hutloff. Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. *Curr Opin Immunol* **16**, 321-27 (2004).
- 43.- Hunig T & Dennehy K. CD28 superagonists: mode of action and therapeutic potential. *Immunol Lett* **100**, 21-8 (2005).
- 44.- Regina Tavano, Giorgia Gri, Barbara Molon, Barbara Marinari, Christopher E. Rudd, Loretta Tuosto & Antonella Viola. CD28 and lipid rafts coordinate recruitment of Lck to the Immunological synapse of human T lymphocytes. *J Immunol* **173**, 5392-97 (2004).
- 45.- Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA & Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* **3**, 541-47 (1995).
- 46.- Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB & Griesser H, Mak Tw: Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science* **270**, 985-88 (1995).
- 47.- Mariette A Oosterwegel, Rebecca J Greenwald, Didier A Mandelbrot, Robert B Lersbach & Arlene H Shape. CTLA-4 and T cell activation. *Curr Opin Immunol* **11**, 294-00 (1999).
- 48.- Andreas Hutloff, Anna M. Dittrich, Katja C. Beier, Barbara Eliaschewitsch, Regine Kraft, Ionnis Anagnostopoulos & Richard A. Kroczek. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nat Lett* **397**, 263-70 (1999).
- 49.- Gordon Freeman, Andrew J. Long, Yoshiko Iwai, Karen Bourque, Tatyana Chernova, Hiroyuki Nishimura, Lori J. Fitz, Nelly Malenkovich, Taku Okazaki, Michael C. Byrne, Michael C. Byrne, Heidi F. Horton, Lynette Fouser, Laura Carter, Vincent Ling, Michael R. Bowman, Beatriz M. Carreno, Mary Collins, Clive R. Wood & Tasuku Honjo. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7

family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* **192**, 1027-34 (2000).

50.- Paul J Leibson. The regulation of lymphocyte activation by inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol* **16**, 328-36 (2004).

51.- Rebecca J Greenwals, Yvette E Latchman & Arlene H Sharpe. Negative co-receptors on lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **14**, 391-96 (2002).

52.- Nishimura, H., M. Nose, H. Hiai, N. Minato & T. Honjo. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141-51 (1999).

53.- Falko R. Fischer, Yi Luo, Moli Luo, Laura Santambrogio & Martin E. Dorf. RANTES-induced chemokine cascade in dendritic cells. *J Immunol* **167**, 1637-43 (2001).

54.- James W. Peacock & Frank R. Jirik. TCR activation inhibits chemotaxis toward stromal cell-derived factor-1: evidence for reciprocal regulation between CXCR4 and the TCR. *J Immunol* **162**, 215-23 (1999).

55.- Devora Rossi & Albert Zlotnik. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* **18**, 217-42 (2000).

56.- Elias J. Fernández & Elias Lolis. Structure, function and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 469-99 (2002).

57.- Conrad C. Bleul, Lijun Wu, James A. Hoxie, Timothy A. Springer & Charles R. Mackay. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci* **94**, 1925-30 (1997).

58.- Noriko Ohtani, Haruo Ohtani, Takashi Nakayama, Hiroshi Naganuma, Eiichi Sato, Toshio Imai, Hiroshi Nagura & Osamu Yoshie. Infiltration of CD8 T cells containing RANTES/CCL5+ cytoplasmic granules in actively inflammatory lesions of human chronic gastritis. *Lab Invest* **84**, 368-75 (2004).

59.- Anneline Nansen, Ole Marker, Christina Bartholdy & Allan Randrup Thomsen. CCR2+ and CCR5+ CD8+ T cells increase during viral infection and migrate to sites of infection. *Eur J Immunol* **30**, 1797-1806 (2000).

60.- B Moser & K Willmann. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis* **63**, 84-89 (2004).

61.- Mantovani, A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol* **20**, 254-57 (1999).

- 62.- Federica Sallusto, Elisabeth Kremme, Belinda Palermo, Andre Ponath, Shixin Qin, Reinhold Förster, Martin Lipp & Antonio Lanzavecchia. Switch in chemokine receptor expressing upon TCR stimulation reveals novel homin potential for recently activated T cells. *Eur J Immunol* **29**, 2037-45 (1999).
- 63.- James HJ. Campbell, Junliang Pan & Eugene C. Butcher. Cutting edge: development switches in chemokine responses during T cell maturation. *J Immunol* **163**, 2353-57 (1999).
- 64.- Federica Sallusto, Danielle Lenig, Reinhold Förster, Martin Lipp & Antonio Lanzavecchia. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials end effector functions. *Nat Lett* **401**, 708-12 (1999).
- 65.- Lazarani F, Tham TN, Casanova P, Arezana-Seisdedos F, Dubois-Dalcq M. Role of the alfa-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Eur J Immunol* **42**, 139-48 (2003).
- 66.- MZ Ratajczak, E. Zuba-Surma, M Kucia, R Reca, W Wojakowski & J Ratajczak. The pleiotropic effects of the SDF-1- CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia* **20**, 1915-24 (2006).
- 67.- Schioppa T, Uranchimeg B, Sacconi A, Biswas SK, Doni A & Rapisarda A. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hipoxia. *J Exp Med* **198**, 1391-02 (2003).
- 68.- Helbig G, Christopherson II KW, Bhat-Nakshatri P, Kumar S, Kishimoto H & Miller KD. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem* **278**, 1631-38 (2003).
- 69.- Papayannopoulou T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood* **103**, 1580-85 (2004).
- 70.- Bodduluri Haribabu, Ricardo M. Richardson, Ian Fischer, Silvano Sozzani, Stephen C. Peiper, Richard Horuk, Hydar Ali & Ralph Snyderman. Regulation of human chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem* **272**, 28726-31 (1997).
- 71.- Ratajczak MZ. Kucia M, Reca R, Majika M, Janowska-Wieczoreka & Ratajczak J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neuronal cells "hide out" in the bone marrow. *Leukemia* **18**, 29-40 (2004).

- 72.- Campbell, J.J., Hedrick J., Zlotnik A., Siani M.A., Thompson. D. A., & Burcher E.C. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* **279**, 381-84. (1998).
- 73.- Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y & Qin S. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor 1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* **273**, 23169-75 (1998).
- 74.- Martin Oppermann. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function and regulation, *J Cell Sig* **16**, 1201-10 (2004).
- 75.- T.J. Cridge, K.M.Horowitz, M.N Mrinucci, K. M. Rose, M. Wells, M.T Werner & Robert A. Kurt. Functional and molecular alterations in T cells induced by CCL5. *Immunol Inves* **35**, 115-132 (2006).
- 76.- Dennis D. Andrew R. Lloyd, Kevin Conlon, Ji Ming Wang, John R. Ortaldo, Akihisha Harada, Kouji Matsushima, David J. Kelvin & Joost J. Oppenheim. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* **177**, 1809-14 (1993).
- 77.- Forster, R. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* **99**, 23-33 (1999).
- 78.- Constantin, G. Chemokines trigger immediate β_2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* **13**, 759-69 (2000).
- 79.- Chan, J. R., Hyduk, S. J. & Cybulsky, M.I. Chemoattractants induce a rapid transient upregulation of monocytes α_4 integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration. *J Exp Med* **193**, 1149-58 (2001).
- 80.- Tatsuo Kinashi. Intracellular signaling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev* **5**, 546-59 (2005).
- 81.- Leo Lefrançois, John D. Altman, Kristina Williams & Sara Olson. Soluble Antigen and CD40 triggering are sufficient to induce primary and memory cytotoxic T cells. *J Immunol* **164**, 725-32 (2000).
- 82.- Melissa E. Munroe & Gail A. Bishop. A costimulatory function for T cell CD40. *J Immunol* **178**, 671-82 (2007).

- 83.- Chensue, S W. Molecular machinations, chemokine signals in host-pathogen interactions. *Clin Microbiol. Rev* **14**, 821-35 (2001).
- 84.- Del Pozo, M.A., Sanchez-Mateos, P., Nieto, M., & Sanchez-Madrid, F. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor distribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix: involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol* **131**, 495-08 (1995).
- 85.- William A. Muller. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* **24**, 326-33 (2003).
- 86.- Gumbiner BM. Cell adhesion:the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-57 (1996).
- 87.- Kenji Irie, Kazuya Shimizu, Toshiaki Sakisaka, Wataru Ikeda & Yoshimi Takai. Role and modes of action of nectins in cell-cell adhesion. *J Sem Cell Dev Biol* **15**, 643-56 (2004).
- 88.- Takai Y. Nakanishi H. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci* **116**, 17-27 (2003).
- 89.- Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptor as a morphogenetic regulator. *Science* **251**, 1451-5 (1991).
- 90.- Yagi T, Takeichi M. Cadherin suprefamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev* **14**, 1169-80 (2003).
- 91.- Tsukita S. Furuse M: Ocludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players?. *Trends Cell Biol* **9**, 268-73 (1999).
- 92.- Christian Weber, Line Fraemohs & Elisabeth Dejana. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev* **7**, 467-74 (2007).
- 93.-Takai Y, Irie K, Shimzu K, Sakisaka T & Ikeda W. Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration and polymerization. *Cancer Sci* **94**, 655-67 (2003).
- 94.- Shingai T, Ikeda W. Kakunaga S. Moritomo K, Takekuni K & Itoh S. Implications of nectin-like molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSf/TSLC1/SynCAM in cell adhesion and transmembrane protein localization in epithelila cells. *J Biol Chem* **278**, 35421-7 (2003).
- 95.- Ikeda W, Kakunaga S, Itoh S, Shingai T, Takekuni K & Satoh K. TAGE4/nectin-like molecule-5 heterophilically trans-interacts with cell adhesion molecule nectin-3 and enhances cell migration. *J Biol Chem* **278**, 28167-72 (2003).

- 96.- Sigai, A. The LFA-1 integrin supports rolling adhesions on ICAM-1 under physiological shear flow in permissive cellular environment. *J Immunol* **165**, 442-52 (2000).
- 97.- Kate L. Wegener, Anthony W. Partidge, Jeawon Han, Andrew R. Pickford, Robert C. Liddington, Mark H. Ginsberg & Lain D. Campbell. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* **128**, 171-82 (2007).
- 98.- Tadokoro S. Talin binding to integrin β tails: a final common step in integrin activation. *Science* **302**, 103-06 (2003).
- 99.- Laudanna, C. Kim, J. Y., Constantin, G. & Butcher, E. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev* **186**, 37-46 (2002).
- 100.- Vicente Manzanares M. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 α binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *Immunol Rev* **177**, 217-35 (2000).
- 101.- Jacqueline Kennedy, Alain P. Vicari, Vicky Saylor, Sandra M. Zurawski, Neal G. Copeland, Debra J. Gilbert, Nancy A. Jenkins & Albert Zlotnik. A molecular analysis of NKT cells: identification of class I restricted T cell-associated molecule (CRTAM). *J Leu Biol* **67**, 725-34 (2000).
- 102.- Anja Fuchs & Marco Colonna. The role of NK cell recognition of nectin and nectin-like proteins in tumor immunosurveillance. *Semin Cancer Biol* **16**, 359-66. (2006).
- 103.- Genaro Patiño- López, Peter Hevezi, Jerry Lee, Dorian Willhite, Gail M. Verge, Sandra M. Lechner, Vianney Ortíz -Navarrete & Albert Zlotnik. Human class-I restricted T cell associated molecule is highly expressed in cerebellum and is a marker for activated NKT and CD8⁺ T lymphocytes. *J Neuro Immunol* **171**, 145-55 (2006).
- 104.- Laurent Galibert, Geoffrey S. Diemer, Zhi Liu, Richard S. Johnson, Jeffrey L. Smith, Thierry Walzer, Michael R. Comeau, Charles T Rauch, Martin F. Wolfson, Rick A. Sorensen, Anne- Renée Van der Vuurst de Vries, Daniel G. Branstetter, Raymond M. Koelling, John Scholler, William C. Fanslow, Peter R. Baum, Jonathan M. Derry & Wei Yan. Nectin-like 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I restricted T cell associated molecules. *J Biol Chem* **280**, 21955-64 (2005).

- 105.- Peter Friedl, Annemieke Th. Den Boer & Matthias Gunzer. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev* **5**, 532-45 (2005).
- 106.- Colin R.F Monks, Benjamin A. Freiberg, Hannah Kupfer, Noah Sciaky & Abraham Kupfer. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**, 82-86 (1998).
- 107.- Wild MK, Cambiaggi A, Brown MH, Davies EA, Ohno H, Saito T, van der Merwe PA. Dependence of T cell antigen recognition on the dimensions of an accessory receptor-ligand complex. *J Exp Med* **190**, 31-41 (1999).
- 108.- Flora Castellino, Alex Y. Huang, Grégoire Altan-Bonnet, Sabine Stoll, Clemens Scheinecker & Ronald N. Germain. Chemokines enhance immunity by guiding naïve CD8⁺ T cell to sites of CD4⁺ T cell-dendritic cell interaction. *Nat Rev* **440**, 890-95 (2006).
- 109.- Shannon K. Bromley, Daniel A. Peterson, Michael D. Gunn & Michael L. Dustin. Cutting edge: hierarchy of chemokine receptor and TCR signals regulating T cell migration and proliferation. *J Immunol* **165**, 15-19 (2000).
- 110.- Toshihiro nanki & Peter E. Lispy. Cutting edge: Stromal cell derived factor-1 is a costimulator for CD4⁺ T cell activation. *J Immunol* **164**, 5010-14 (2000).
- 111.- Ashok Kumar, Troy D. Humphreys, Kimberly N. Kremer, Patricia S. Bramati, Lavone Bradfield, Contessa E. Edgar & Karen E. Hedin. CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cell. *Immunity* **25**, 213-24 (2006).
112. Barbara Molen, Giorgia Gri, Monica Bettella, Concepción Gómez-Mouton, Antonio Lanzavecchia, Carlos Martínez, Santos Mañes & Antonella Viola. T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* **6**, 465-71 (2005).
- 113.- Anja Muller, eamon Kelly & Philip G. Strange. Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5. *Blood* **99**, 785-91 (2002).
- 114.- James W. Peacock & Frank R. Jirik. TCR activation inhibits chemotaxis toward stromal cell-derived factor-1: evidence for reciprocal regulation between CXCR4 and the TCR. *J Immunol* **162**, 215-23 (1999).

23.- Abreviaturas

APC.....	Antigen Presenting Cell
AP-1.....	Activator Protein-1
Bax.....	Bcl-associated partner containing six exons
CAM.....	Cellular Adhesion Molecule
Cdc42.....	Cell Division Cycle42
CRTAM.....	Class-I-restricted T cell Associated Molecule
CTLA-4.....	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
ERK.....	Extracelullar signal-Regulated Kinase
FAK.....	Focal Adhesion Kinase
GAP.....	GTPase Activating Protein
GDI.....	Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors
GEF.....	Guanine Exchange Factors
HEV.....	High Endothelial Venule
ICAM.....	Inter-Cellular Adhesion Molecule-1
ICOS.....	Inducible T-cell co-stimulator
ITAM.....	Immuno-receptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM.....	Immuno-receptor Tyrosine-based Inhibition Motif
Jak.....	Janus kinase
JAM.....	Junctional Adhesion Molecule
JNK.....	c-Jun N-terminal Kinase
LAT.....	Linker for Activated T cells
LFA-1.....	Lymphocyte Function Associated Antigen-1
MAPK.....	Mitogen-Activated Protein Kinase
MFI.....	Mean Fluorescence Intensity
MHC.....	Mayor Histocompatibility Complex
MTOC.....	Microtubule Organizing Center
NFAT.....	Nuclear Factor of Activated T cells
NF-kB.....	Nuclear Factor- kB
PD1.....	Programed Death Molecule-1
PECAM.....	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PI3K.....	Phosphatidylinositide 3-kinase

PKC.....Protein Kinase C
PLC.....Phospholipase C
PMA.....Phorbol Myristate Acetate
Pyk2..... Proline-rich kinase-2
SCAR.....Supresor of cAMP receptor
SH2.....Src Homology 2
SMAC.....Supramolecular Activation Cluster
SOS.....Son of Sevenless
STAT.....Signal Transducer and Activator of Transcription
TAP.....Transporter Associated with Antigen Presentation
TCR.....T Cell Receptor
TLR.....Toll like-Receptor
TNF αTumor Necrosis Factor α
VCAM.....Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF.....Vascular Endothelial Growth Factor
VLA-4.....Very Late Antigen-4
ZAP-70.....Zeta-Associated Protein of 70kDa

Apéndice 1.

Reactivos utilizados

1.- Solución Amortiguadora de Fosfatos 10x (PBS 10x):

NaCl: Cloruro de Sodio 80gr.

KCl: Cloruro de Potasio 4gr.

Na₂HPO₄: Fosfato de sodio 23gr.

KH₂PO₄: Fosfato de potasio 4gr.

2.- Medio RPMI suplementado con 10% de SFB:

Agua estéril 1litro.

NaHCO₃: Bicarbonato de sodio 1.5gr

Streptomicina 10,000µg/ml

Penicilina 10,000 Unidades/ml

Hepes 1M

Piruvato 100mM

Suero fetal bovino (SFB) 10%

3.- Buffer de tinción:

PBS 1x 90%

Suero Fetal Bovino (SFB) 10%

4.- Buffer de fijación

Paraformaldehido 4%

PBS 1x 96%

Apéndice 2.

Separación de células PBMCs a partir de sangre periférica

1. Tomar 20 ml de sangre, diluirlo en 20 ml de PBS 1x estéril
2. En 2 tubos de 50ml agregar 10ml de ficoll, realizar el gradiente de ficoll con la sangre diluida con PBS

*Colocar 2 partes de sangre por 1 parte de ficoll

*La dilución de la sangre con PBS es 1:1

3. Centrifugar 1700rpm durante ½ hora sin freno y a temperatura ambiente.
4. Recuperar la interfase donde se ubican las células mononucleares.
5. Agregar PBS 1x estéril a un volumen máximo de 50ml. Centrifugar a 1700rpm durante 7 minutos
6. Eliminar el sobrenadante por inversión y agregar PBS1x estéril + EDTA 2mM + BSA 0.5%, hasta un volumen de 50 ml
7. Centrifugar a 1700rpm durante 7 minutos a 14°C
8. Eliminar el sobrenadante y agregar PBS 1x (hasta 30ml), centrifugar a 1700rpm durante 7 minutos
9. Eliminar el sobrenadante y agregar PBS 1x estéril (dependiendo del tamaño del pellet)
10. Tomar 90 µl de azul tripano y 10 µl de células (dilución 1:10) y, utilizar 10µl de esa mezcla para colocarlo en la cámara de Neubauer y contar la viabilidad celular.

*Para obtener el número de células totales, se multiplica el número de células obtenidas por 10 (dilución) por el volumen en el que están resuspendidas las células por 10000 que es el volumen que le cabe a la cámara.

11. Centrifugar las células a 1700rpm durante 7 minutos. Eliminar el sobrenadante y agregar la cantidad de medio RPMI + 10%SFB necesaria para tener 5×10^6 células por mililitro

Apéndice 3.

Tinción para determinar la expresión en superficie de CRTAM mediante el citómetro de flujo.

- 1.- Colocar las células cultivadas con las diferentes condiciones en un tubo de 15 ml, lavar el pozo con 1ml de PBS. Llevar hasta 14 ml con PBS.
- 2.- Centrifugar 1500rpm durante 5 minutos.
- 3.- Eliminar el sobrenadante, agregar 500µl de PBS
- 4.- Agregar 100 µg de gamaglobulina por cada 1×10^6 células. Mezclar el vortex.
- 5.- Incubar por media hora en hielo.
- 6.- Agregar PBS + SFB 2% hasta 14ml
- 7.- Centrifugar 1600 rpm durante 5 minutos.
- 8.- Eliminar el sobrenadante, agregar 500µl de PBS y dividirlo en 6 tubos falcon
- 9.- Agregar el control de Isotipo (IgG2b) 1µl
- 10.- Agregar anti CRTAM 1µl
- 11.- Incubar por media hora a 4°C
- 12.- Lavar con 3 ml de PBS + SFB 1%
- 13.- Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.

14.- Teñir con el 2º anticuerpo acoplado al fluorocromo Cy5 (1mg/ml) se necesita 300ng (1:300)

15.- Incubar por media hora a 4°C.

16.- Lavar con 3ml de PBS + SFB 1%

17.- Centrifugar a 1500rpm durante 5 minutos

18.- Teñir los anticuerpos directos

anti CD8 + anti CD3 (4microlitros)

anti CD69 (10 microlitros)

Isotipo PE (4 microlitros)

19.- Incubar durante media hora a 4°C

20.- Lavar con 3 ml de PBS + SFB 1%

21.- Centrifugar a 1500rpm durante 5 minutos

22.- Agregar el fijador (formaldehido al 2%) 200 µl

NOTA:

*El PBS debe ser al 1x y el SFB inactivado, también se puede usar albumina pero al 2%.

Apéndice 4.

Ensayo de estimulación

1.- Una vez obtenidas las PBMCs, colocar 5×10^6 cel. por cada condición en 1ml de medio RPMI suplementado con 10% de SFB, en una placa de 24 pozos.

2.- Las concentraciones de los estímulos utilizados son:

2ng/ml de PMA

200ng/ml de Ionomicina

100, 200 y 500ng/ml de las quimiocinas CXCL12, CXCL10 y CCL5

1 y 5 μ g/ μ l de anticuerpo anti-CD3

3.- Agregar 100 μ g/ml de ampicilina

4.- Agitar la placa en círculos e incubar durante 18hrs a 37°C

Estimulación en placa con el anticuerpo anti-CD3

1.- Se coloca 1 ó 5 μ g/ μ l de streptavidina resuspendido en PBS 1x. en la placa de 24 pozos.

2.- Se incuba a 37°C durante 1hr.

3.- Se lava **una sola vez** con 1ml de PBS 1x.

4.- Se agrega 1 ó 5 μ g/ μ l de anticuerpo anti-CD3 humano biotinilado resuspendido en PBS 1x.

5.- Se repiten los pasos 2 y 3.

Apéndice 5.

Moléculas accesorias a la señal del TCR

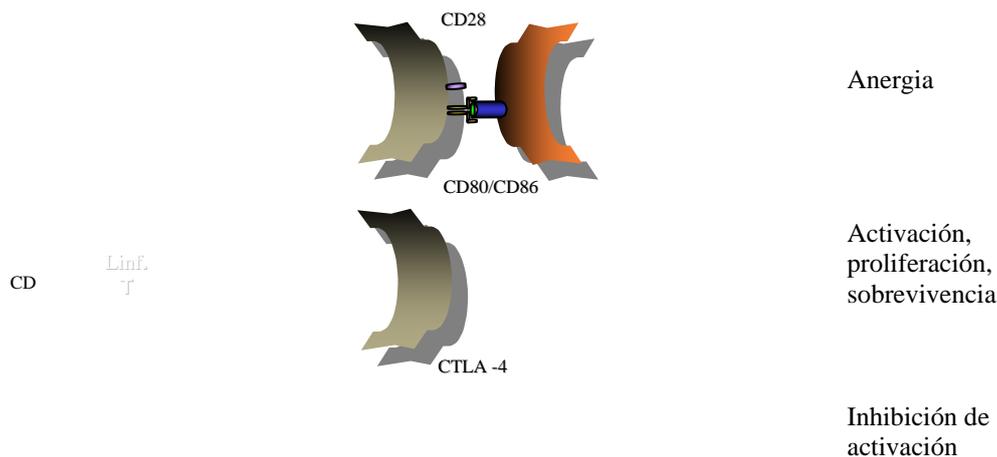
La activación de los linfocitos T es un mecanismo altamente regulado, además del reconocimiento del TCR al complejo péptido-MHC, por moléculas accesorias. La función de estas moléculas accesorias es regular la señal inducida por el TCR, aunque también inducen señales independientes del TCR y que son cruciales para la activación celular; como es el caso de la secreción de IL-2. Las moléculas que regulan la señal del TCR se denominan co-estimuladoras en caso de que amplifiquen la señal y co-inhibidoras cuando dicha señal es inhibida^{39,40,41,42}.

Las moléculas co-estimuladoras desencadenan señales intracelulares que promueven los procesos de proliferación y supervivencia, favoreciendo de esta manera la activación celular. Las moléculas co-estimuladoras/inhibidoras más caracterizadas son los miembros de la superfamilia de CD28/CTLA-4 – B7.1/B7.2 (CD80, CD86)^{16,39}.

La activación celular requiere de la presencia de la molécula co-estimuladora CD28, su expresión se da de manera constitutiva en los linfocitos T y promueve la secreción de IL-2; interacciona con los receptores CD80 y CD86 los cuales se encuentran expresados en las células dendríticas, aunque cabe destacar que la expresión de CD86 es constitutiva mientras que CD80 es inducible^{16,39}. Además, en presencia de la interacción de CD28 con CD80/CD86 se requiere de un menor número de complejos de TCR/MHC-péptido para promover una activación celular⁴³. Esto es debido a que la señal inducida por la interacción CD28-CD80/86, además de amplificar la señal inducida por el TCR, promueve la secreción de citocinas importantes, como IL-2, durante el proceso de activación celular³⁹. La señal de CD28 induce el reclutamiento de la cinasa Lck al TCR, mediante la activación de la proteína Vav-1⁴⁴.

Por otro lado, la molécula CTLA-4 inhibe la señal del TCR mediante la unión con los receptores CD80/CD86; antagonizando así las funciones de CD28. Como ejemplo de lo anterior, CTLA-4 inhibe la síntesis de IL-2 evitando la proliferación celular. El ratón deficiente de CTLA-4 (CTLA-4^{-/-}) desarrolla desórdenes

linfoproliferativos fatales. Además, la inhibición de CTLA-4 resulta en una respuesta exacerbada en contra de autoantígenos^{45,46}. La afinidad de CTLA-4 con los receptores CD80 y CD86 es mayor que CD28 y, su expresión se da una vez activada la célula. El balance de la interacción CD28/CTLA4–CD80/CD86 determina el estado de activación ó inactivación (anergia)^{39,47}.



Esquema 1. La interacción de CD28 con sus ligandos CD80/CD86 favorece la activación celular. En presencia de CTLA-4, la señal inducida por el TCR es inhibida, evitando así la activación celular. La señal inducida por el TCR (señal 1) requiere ser acompañada de la señal de las moléculas coestimuladoras e inhibitoras (señal 2) para promover una respuesta efectora eficiente.

Otra molécula coestimuladora inducida durante la activación es ICOS (Inducible T-cell co-stimulator). Esta molécula participa en el proceso de proliferación así como en la producción de citocinas como IL-15^{41,48}. El ligando de ICOS es B7-H2 (ICOS-L), el cual está expresado en las células dendríticas, los linfocitos B y en los monocitos. La producción de IFN γ induce la expresión de ICOS-L en los linfocitos B. La participación de ICOS está relacionada con el desarrollo de la inmunidad humoral mediada por los linfocitos B^{41,48}.

Por otro lado, PD-1 (molécula programadora de muerte), es una molécula co-inhibidora que interactúa con B7-H1, su expresión se da en los linfocitos T y B activados y, la expresión de B7-H1 es dependiente de la secreción de IFN γ ^{41,49}. La molécula PD-1 presenta un dominio tipo inmunoglobulina, y su tallo citoplásmico

contiene dominios ITIM^{49,50,51}. El ratón deficiente en PD-1 (PD-1^{-/-}) muestra esplenomegalia, además de un número reducido de células mieloides y un incremento ligero en la población de los linfocitos B^{41,52}.

En el caso de la molécula CD40, en general es una molécula coestimuladora sin embargo, dependiendo de la intensidad y duración de la señal que se induzca al interactuar con su ligando (CD40L) puede llevar a cabo funciones de molécula co-inhibidora^{81,82}.

Apéndice 6.

Clasificación de las quimiocinas y sus receptores

Chemokine receptors	Human chemokine ligands
CXCR1	IL-8, GCP-2
CXCR2	IL-8, GCP-2, Gro α , Gro β , Gro γ , ENA-78, PBP
CXCR3	MIG, IP-10, I-TAC
CXCR4	SDF-1/PBSF
CXCR5	BLC/BCA-1
CCR1	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, HCC-1, 2, 3, and 4
CCR2	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4
CCR3	eotaxin-1, eotaxin-2, MCP-3
CCR4	TARC, MDC, MIP-1 α , RANTES
CCR5	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES
CCR6	MIP-3 α /LARC
CCR7	MIP-3 β /ELC, 6Ckine/LC
CCR8	I-309
CCR9	TECK
XCR1	Lymphotactin
CX3CR1	Fractalkine/neurotactin

Apéndice 7. Sinapsis inmunológica

La interacción del TCR con el MHC presenta una alta especificidad. Sin embargo, carece de una baja afinidad (10^{-4} - 10^{-6} M⁻¹). Además, el TCR presenta una alta reactividad cruzada; debido a la recombinación genética somática que presenta, por lo que una sola clona de linfocito T tiene la capacidad de reconocer a diferentes péptidos los cuales difieren en su estructura primaria^{1,20}. Debido a esto se requiere de la participación de los co-receptores CD4/CD8. La interacción del complejo péptido-MHC con el co-receptor CD8 se da de forma independiente al antígeno; el co-receptor CD8 reconoce los dominios constantes del TCR y el MHC. La interacción de CD8 con el complejo TCR/pMHC presenta baja afinidad (aprox. 10^{-4} M⁻¹)²⁰.

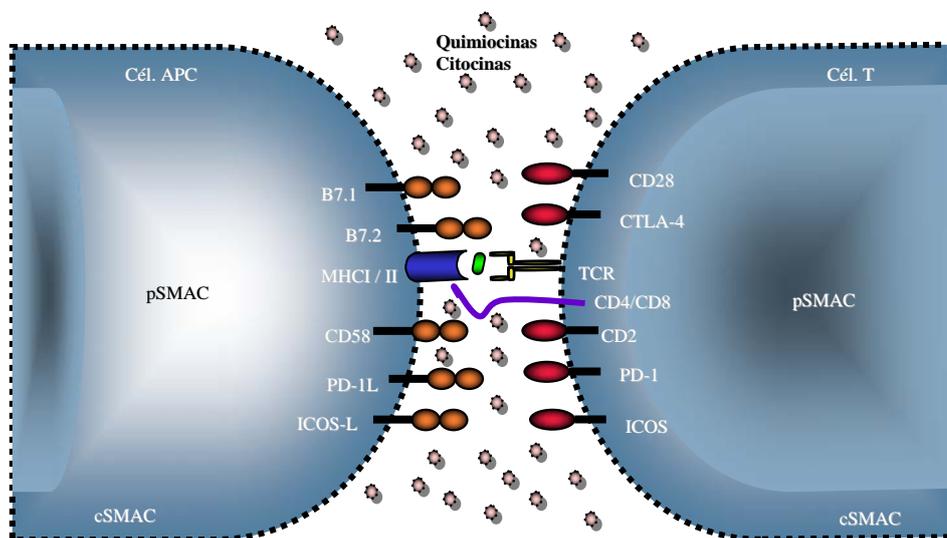
A consecuencia de lo anterior, se requiere de la intervención de las moléculas accesorias para que se aumente la estabilidad entre ambas células y la señal del TCR sea regulada. A La interacción del complejo TCR-MHC/péptido así como de las moléculas accesorias con sus ligandos, se denomina sinapsis inmunológica (SI)¹⁰⁵. Aunque algunos autores establecen que; se puede definir como sinapsis inmunológica a la interacción TCR-MHC/péptido, aún en ausencia de las moléculas accesorias. La formación de la sinapsis inmunológica luego entonces, resulta en una adhesión firme, liberación de los flujos de calcio, la fosforilación de tirosinas y la agregación de los TCR`s al sitio de contacto con la célula APC¹⁰⁵.

Durante la formación de la SI se pueden observar la formación de 2 zonas específicas donde se reclutan receptores y proteínas señalizadoras. A estas zonas se les denomina Agregado Supramolecular de Activación ó SMAC (Supramolecular Activation Cluster)¹⁰⁶. La zona central (cSMAC) se define como el sitio de interacción del TCR con el complejo MHC/péptido donde además, co-localiza a nivel intracelular con las proteínas PKC θ , Lck y Fyn. También se localiza en esta zona a los co-receptores CD4/CD8, así como a las moléculas CD2 y CD28¹⁰⁶.

El cúmulo central del TCR-péptido/MHC depende de la polimerización de los filamentos de actina del citoesqueleto. Las dinámicas de la polimerización de actina se encuentran reguladas por las vías dependientes de Rac1 y Rho así como por la

reorientación del complejo MTOC; el cual y en conjunto con el aparato de Golgi y las vesículas citoplásmicas, translocan al sitio de unión. El reclutamiento de CD2 trae como consecuencia la exclusión de la fosfatasa CD45 y CD43 de la zona de la sinápsis inmunológica¹⁰⁷.

Por otro lado, en la región periférica (pSMAC) se localiza la molécula de adhesión LFA-1, la cual se está unida al citoesqueleto a través de la unión con la proteína Talina¹⁰⁶. El esquema 2 representa a la sinápsis inmunológica, donde se observan las 2 zonas SMAC (cSMAC y pSMAC).



Esquema 2. Representación esquemática de la sinápsis inmunológica donde se muestra la interacción del TCR-antígeno-MHC así como de las moléculas que participan y los factores solubles, los cuales en su conjunto promueven una sinápsis inmunológica madura.