



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

PRESENTA LA TESIS

**PAPEL DE CD5 EN LA INDUCCIÓN DE CÉLULAS T  
REGULADORAS *IN VITRO***

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

PRESENTA

**Erica Paulina Burgueño Bucio**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**

**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Saturnino de León Chapa**

**VOCAL:**               **Profesor: Patricia Elvira Berrón Ruiz**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Maria Gloria Soldevila Melgarejo**

**1er SUPLENTE:**      **Profesor: Enrique Ortega Soto**

**2º SUPLENTE:**       **Profesor: Julio César Martínez Álvarez**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones  
Biomédicas**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. Maria Gloria Soldevila Melgarejo**

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

**Erica Paulina Burgueño Bucio**

\_\_\_\_\_

# ÍNDICE

.....

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Sistema inmune.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Sistema inmune innato .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2. Sistema Inmune Adaptativo .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Linfocitos.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Desarrollo de Linfocitos T en el Timo.....</b>	<b>5</b>
<b>1.4. Tolerancia inmunológica.....</b>	<b>8</b>
1.4.1. Tolerancia central.....	8
<b>1.4.2. Tolerancia Periférica .....</b>	<b>10</b>
<b>1.5. Linfocitos T reguladores.....</b>	<b>11</b>
1.5.1. Linfocitos T reguladores naturales .....	12
<b>1.5.2. Linfocitos T reguladores inducidos.....</b>	<b>15</b>
1.5.3. Mecanismos de supresión .....	19
1.5.4. Marcadores de los linfocitos T reguladores.....	21
<b>1.6. CD5.....</b>	<b>23</b>
1.6.1. Señalización mediada por CD5 y las señales del TCR .....	26
1.6.2. CD5 como regulador de las señales del TCR.....	29
1.6.3. CD5 y su función en la supervivencia de los linfocitos.....	30
1.6.4. CD5 y la tolerancia inmunológica .....	32
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>35</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>36</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
4.1. Objetivo general.....	36
4.2. Objetivos particulares .....	36
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
5.1 Materiales.....	37

5.1.1 Reactivos.....	37
5.1.2 Animales.....	37
5.2. Métodos.....	38
5.2.1 Tipaje de Ratones.....	38
5.2.2. Obtención de Células.....	39
5.2.3. Separación magnética de las células/Selección de Linfocitos T vírgenes.....	40
5.2.4. Cultivo/Inducción de Células T Reguladoras.....	40
5.2.4.1. Sensibilización de placas.....	40
5.2.4.2. Cultivo Celular.....	41
5.2.5. Tinción Intracelular de Foxp3.....	43
5.2.6. Tinción intracelular de c-Cbl fosforilado.....	44
5.2.7. Tinción intracelular de Erk fosforilado.....	48
5.2.8 Análisis Estadístico.....	49
5.2.9 Diagrama de flujo.....	49
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
6.1. Tipaje de Ratones.....	50
6.2. Selección de Linfocitos T vírgenes.....	51
6.3. Inducción de Células T reguladoras.....	52
6.4 Tinción intracelular de c-Cbl fosforilado.....	57
6.5. Tinción intracelular de Erk fosforilado.....	62
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
7.1. Selección de Linfocitos T vírgenes.....	67
7.2. Inducción de Células T reguladoras.....	68
7.3. Tinción intracelular de c-Cbl fosforilado.....	73
7.4 Tinción intracelular de Erk fosforilado.....	77
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>81</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>82</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>83</b>
<b>Anexo A.....</b>	<b>89</b>

A.1 Soluciones.....	89
<b>A.2 Reactivos</b> .....	91
<b>A.3 Reactivos Biológicos</b> .....	93

## ABREVIATURAS

**AICD** – Muerte Celular Inducida por Activación

**AIRE** - Regulador transcripcional “Autoimmune regulator”

**APC** - Alofocianina

**APECED** – Poliendocrinopatía autoinmune, candidiasis, distrofia ectodérmica

**BCR** – Receptor de Células B

**Breg** - Linfocito B Regulador

**CD** – GrupoCluster de Diferenciación

**CD5KO** – Deficiente de CD5

**CD5WT** – CD5 Silvestre

**CK2** – Cinasa de Caseína 2

**cTEC** – Célula Estromal Tímica cortical

**CTLA-4** - Antígeno 4 de Linfocito T Citotóxico

**Cy5** – BD Cy-Chrome™

**DC** – Célula Dendrítica

**DN** – Timocitos Doble Negativos

**DP** – Timocitos Doble Positivos

**EAE** – Encefalomielitis Autoinmune Experimental

**FITC** – Isocianato de Fluoresceína

**GITR** – gen relacionado a la familia TNFR inducido por Glucocorticoides

**gp** – glicoproteína

**IL** – Interleucina

**INF** - Interferón

**ITAM** - Motivo activador asociado a inmunoreceptores basado en tirosinas

**ITIM** – Motivo inhibitorio asociado a inmunoreceptores basado en tirosinas

**iTreg** – Linfocito T regulador inducido

**MHC** – Complejo Mayor de Histocompatibilidad

**mTEC** – Célula Estromal Tímica medular

**NK** – Célula Asesina Natural

**NP-1** – Neuropilina 1

**nTreg-** Linfocito T regulador natural

**PC-PLC** – fosfolipasa C específica para fosfatidilcolina

**PD-1-** Receptor de Muerte programada 1

**PE** – Ficoeritrina

**PKC** – fosfoquinasa C

**RA** – Ácido Retinoico

**rpm** - revoluciones por minuto

**rshCD5** – recombinante soluble humana CD5

**SH2** – dominio de homología a *src* 2

**SP** – Timocitos Simple Positivos

**SRCR** – Receptor “Scavenger” Rico en Cisteína

**TCR** – Receptor de Células T

**TGFβ** – Factor de Crecimiento Transformante β

**Th** – Linfocito T cooperador

**Treg** - Linfocito T regulador

**TSDR** – Región Desmetilada Específica de Tregs

**α-CD5** – anticuerpo anti-CD5

**α** - anti

# **1. MARCO TEÓRICO**

## **1.1. Sistema inmune**

El sistema inmune está constituido por un conjunto de moléculas solubles y células efectoras cuya función es proteger al organismo de agentes infecciosos y del daño que éstos pueden ocasionar. Este sistema debe ser capaz de montar una respuesta contra cualquiera de la amplia variedad de patógenos que un individuo puede encontrar a lo largo su vida. Para poder ejercer su función el sistema inmune debe ser capaz de reconocer cualquier agente extraño y eliminarlo, pero también tiene que poder regular su activación, ya que si esto falla puede conllevar eventos adversos como alergias o enfermedades autoinmunes. [2]

Todas las células del sistema inmune provienen de un precursor hematopoyético originado en la médula ósea (Fig1.) la cual constituye un nicho donde muchas de las células también se desarrollan y maduran. Una vez maduras migran hacia los tejidos (células residentes) o circulan en el torrente sanguíneo o el sistema linfático, el cual transporta células y fluidos extracelulares hacia los órganos linfoides secundarios. [3]

### **1.1.1. Sistema inmune innato**

El sistema inmune innato, también llamado natural o nativo, es la primera defensa del organismo hacia patógenos. Como lo dice su nombre, se encuentra en el organismo antes de que el patógeno infecte y no es específico. Los componentes del sistema inmune innato son las barreras físicas y químicas, como los epitelios y los compuestos antimicrobianos que se encuentran en ellos; proteínas de la sangre, como son el complemento y los mediadores inflamatorios; y las células fagocíticas que se encuentran en sangre (macrófagos, granulocitos, células dendríticas).[2]



El sistema inmune innato es capaz de montar una respuesta rápida hacia patrones estructurales compartidos por grupos de patógenos y por moléculas expresadas por células dañadas del propio organismo.

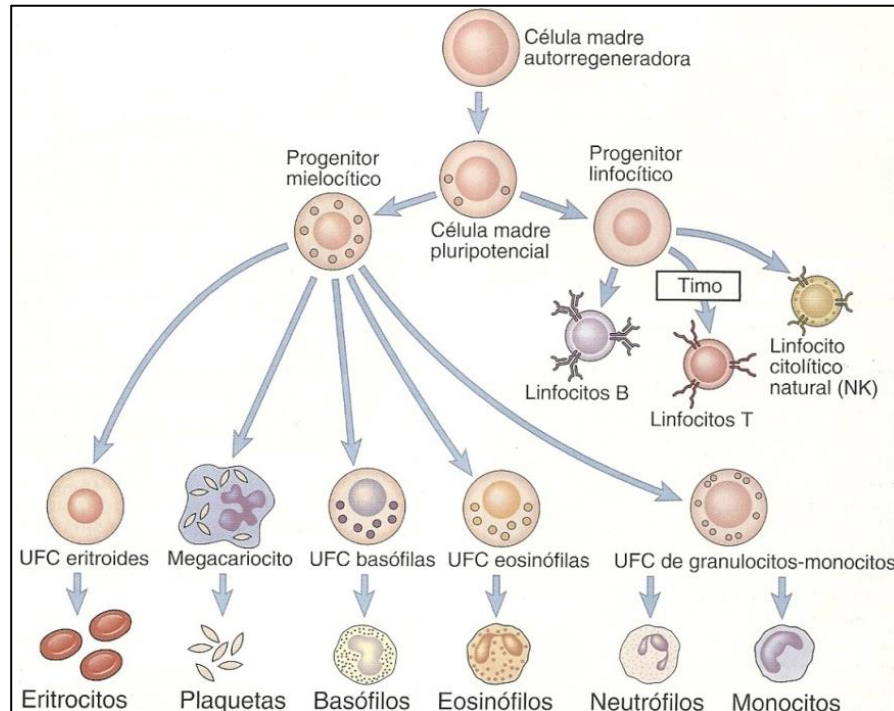


Fig1. Hematopoyesis. Las células del sistema inmune innato y adaptativo se generan a partir de un precursor hematopoyético de médula ósea.[4]

Las células del sistema inmune innato provienen del precursor mielóide que puede diferenciarse hacia granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), células cebadas, células dendríticas y monocitos, estos últimos se diferencian a macrófagos. Los macrófagos, células dendríticas y granulocitos, células fagocíticas del sistema inmune innato, permiten la conexión entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa ya que son capaces de presentar los antígenos a las células del sistema inmune adaptativo, y secretar citocinas necesarias para la activación de éstas [5].

### **1.1.2. Sistema Inmune Adaptativo**

El sistema inmune adaptativo responde unos cuantos días después que el innato, por lo que se dice que su respuesta es lenta, aunque más eficiente en la eliminación de patógenos. El sistema inmune adaptativo depende del reconocimiento de un antígeno específico. Los linfocitos activados y los anticuerpos que se producen durante este proceso son capaces de mantenerse en el cuerpo inclusive cuando el patógeno ha sido completamente eliminado; lo cual permite que cuando se dé un nuevo encuentro con el mismo patógeno la respuesta contra éste sea más rápida y eficaz. A esto se le conoce como memoria inmunológica y es una de las principales características de este sistema.

Las células del sistema inmune adaptativo provienen de un progenitor linfoide común que se origina en médula ósea, el cual se diferencia en linfocito T o B y durante su proceso de maduración adquiere la expresión de un receptor antígeno específico.

### **1.2. Linfocitos**

Los linfocitos son los principales efectores de la respuesta inmune adaptativa, cada uno de los linfocitos en su superficie presenta un receptor hacia un antígeno específico; la gran diversidad de receptores expresados por un individuo le permite montar una respuesta hacia prácticamente cualquier agente extraño que se presente.

Los linfocitos que aun no tienen un primer contacto con su antígeno, se denominan linfocitos "vírgenes"; una vez que tienen contacto con su antígeno, se activan, se diferencian y se vuelven totalmente funcionales; estos linfocitos reciben el nombre de "efectores".

Existen dos tipos de linfocitos: Los linfocitos B, que se activan por la unión del antígeno al Receptor de Células B (BCR o "B cell Receptor")

expresado en la superficie celular y se diferencian hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos, los cuales presentarán la misma especificidad antigénica, dando lugar a la inmunidad humoral [6].

La otra población de linfocitos, los linfocitos T, presentan un Receptor de Células T (TCR o "T Cell Receptor"), a través del cual reconocen a su antígeno específico para poder activarse y diferenciarse en diferentes tipos de linfocitos efectores dependiendo del microambiente en el cual se activen. Los linfocitos T efectores se pueden dividir en dos subtipos principales: los linfocitos T CD8+ o citotóxicos cuya función es eliminar las células infectadas por virus, patógenos intracelulares o células cancerígenas; y los linfocitos T CD4+ o cooperadores, que dan las señales adecuadas para la diferenciación/activación de otras células del sistema inmune por medio de la secreción de citocinas [5].

Los linfocitos se encuentran circulando en sangre o linfa, pero también se localizan en los órganos linfoides, que son agregados celulares organizados constituidos por linfocitos rodeados de células no linfoides o estromales. Estos órganos los podemos dividir en primarios donde se generan los linfocitos (médula ósea para linfocitos B y timo para linfocitos T), y órganos linfoides secundarios o periféricos, donde los linfocitos se activan manteniendo la respuesta adaptativa. Estos últimos comprenden el bazo donde se colectan antígenos de sangre, los ganglios que colectan antígenos de la linfa, y los tejidos linfoides asociados a mucosas donde se da el reconocimiento de antígenos de la flora, alimentos o medio ambiente (Fig2.) [6, 7].

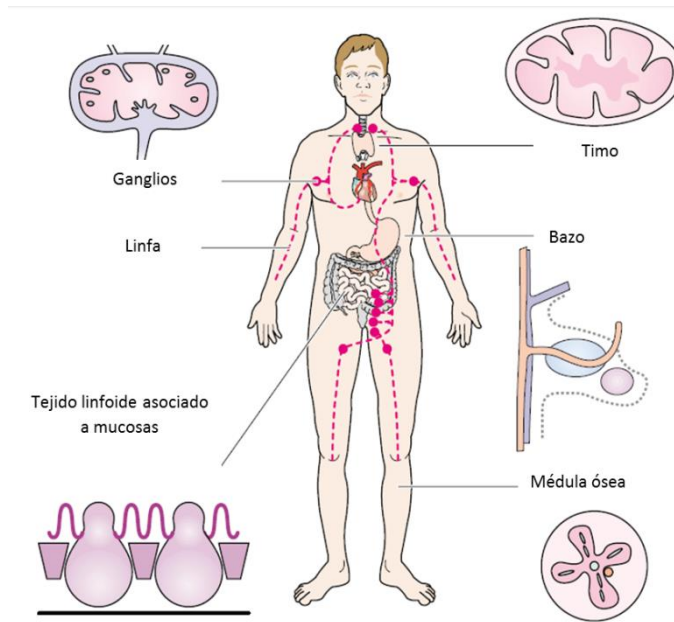


Fig2. Órganos linfoides. Tejidos en los cuales se generan y activan los linfocitos. Modificado de Reynolds et al. [7]

### 1.3. Desarrollo de Linfocitos T en el Timo

Los linfocitos T se desarrollan en el timo, un órgano linfóide localizado en la parte anterosuperior del corazón, conformado por dos lóbulos cada uno y dividido en dos regiones anatómicas: una externa, conocida como corteza; y una interna, conocida como médula.

El progenitor hematopoyético entra al timo por vénulas localizadas en la zona corticomedular del timo; el estadio más inmaduro de los timocitos (linfocitos T inmaduros en timo) es aquel que no expresa ninguno de los correceptores CD4 o CD8, llamado Doble Negativo (DN). Durante esta etapa pasan por varios estadios basados en la expresión de CD44, CD117 (c-kit) y CD25; durante el estadio DN1 el timocito expresa CD44 y CD117 pero no CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor para IL-2) y se da la primera proliferación de los timocitos. La expresión de CD25 marca el progreso al estadio DN2 (CD44+ CD117+ CD25+); durante estos dos primeros estadios aún es posible que estas células den origen a otros linajes como

NK o DCs. El compromiso irreversible hacia el linaje linfocito T se da en el estadio DN3 (CD44<sup>-</sup> CD117<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup>) durante el cual las recombinasas RAG-1 y RAG-2 dan pie a la recombinación de los genes V, D, J (región variable) y C (región constante) para la formación de la cadena  $\beta$  del TCR [8]. A pesar de que este proceso se inicia en el estadio DN2, ocurre preferencialmente en el estadio DN3, en el cual se da el primer punto de control ("checkpoint") en el que sólo aquellos timocitos que hayan rearrreglado una cadena  $\beta$  funcional podrán seguir con la diferenciación, proceso llamado selección  $\beta$ , o alternativamente mueren por apoptosis. Una vez que los timocitos pasan la selección  $\beta$  disminuyen la expresión de CD25 para convertirse en DN4, estadio en el que se vuelve a dar una proliferación de los timocitos (Fig3).

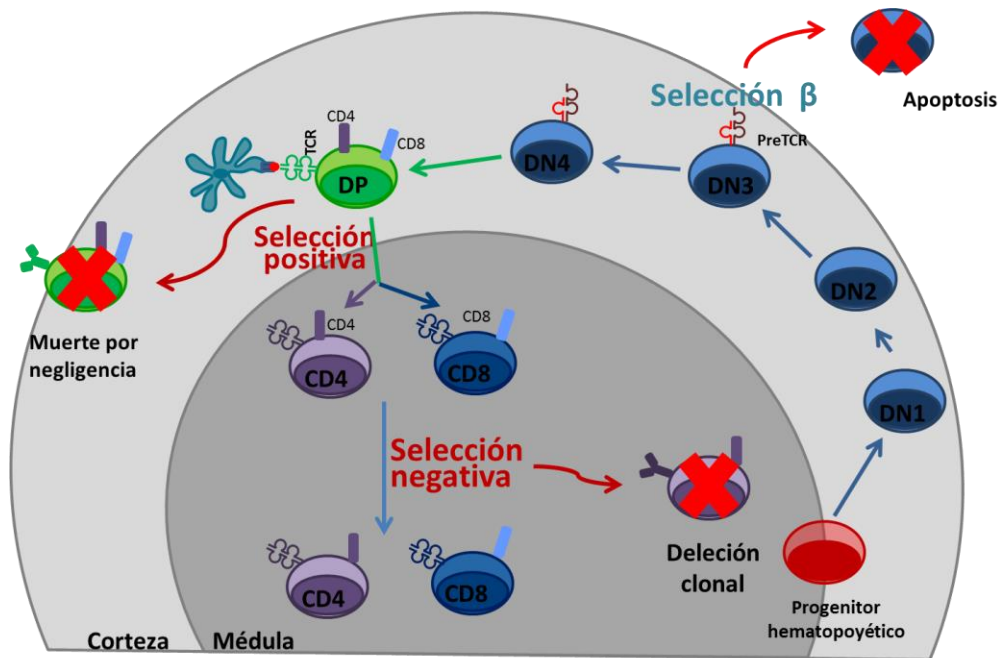


Fig3. Desarrollo de linfocitos T en el timo. Modificado de Ciofani et al.[9]

Posteriormente, los timocitos progresan hacia un estadio Doble Positivo (DP), en el que expresan tanto CD4 como CD8 así como un TCR totalmente funcional, ya que han rearrreglado la cadena  $\alpha$ . Durante este

estadio sufren el proceso de selección positiva, en el cual se seleccionan sólo aquellos timocitos capaces de interactuar con moléculas de Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) para posteriormente convertirse en timocitos Simples Positivos (SP), donde solo expresan CD4 o CD8. En este punto atraviesan por una selección negativa, donde se eliminarán la mayoría de timocitos autoreactivos mientras que el resto prosiguen con su maduración y salen a la periferia a través de vénulas presentes en la región cortico-medular [9-11].

La generación de células totalmente funcionales requiere de la respuesta del TCR hacia ligandos con diferente afinidad. Durante el proceso de selección positiva los timocitos, para poder desarrollarse y sobrevivir, deben reconocer péptidos propios en el contexto del MHC con baja avidéz y ser capaces de transducir señales de sobrevivencia a la células; aquellos que no lo hacen mueren por apoptosis en un proceso conocido como muerte por negligencia [12]. Pero durante la selección negativa, el reconocimiento de antígenos propios con alta avidéz lleva a los timocitos a la muerte, o a la selección de linfocitos con funciones reguladoras o supresoras, proceso conocido como selección agonista [13].

Durante el proceso de selección positiva también se da el proceso de elección del linaje CD4 o CD8; las principales células involucradas en este proceso son las células epiteliales de timo, las cuales dependiendo de su ubicación reciben el nombre de células epiteliales corticales (cTEC) o medulares (mTEC). Existe evidencia que indica que estas células presentan diferencias en la maquinaria de procesamiento y presentación de antígenos; las cTEC expresan  $\beta 5t$ , una unidad del proteosoma exclusiva de estas células tímicas, importante para la presentación antigénica en MHC I, sin la cual no se da una selección hacia linfocitos CD8. De similar manera, en las mTEC se activa una proteasa de serina

única para timo, catepsina L, la cual permite la selección hacia CD4 [14-16].

La selección negativa ocurre en la médula tímica mediante la presentación de antígenos propios principalmente por parte de las células dendríticas y de una población de mTEC que expresan el regulador transcripcional AIRE (“Autoimmune regulator”), el cual permite la expresión de antígenos órgano-específicos en estas células de manera exclusiva. De esta forma se eliminan aquellas clonas que presentan muy alta afinidad hacia estos antígenos, proceso fundamental para establecer la tolerancia central como lo evidencia el fenotipo autoinmune observado en ratones Aire<sup>-/-</sup> o en individuos con síndrome APECED [17] y que se ve complementado por la generación de Tregs naturales [18] (ver más adelante).

#### **1.4. Tolerancia inmunológica.**

Una propiedad fundamental del sistema inmune es la protección del organismo pero causando el menor daño posible al tejido. Se conoce como tolerancia inmunológica a la inhibición o reducción de la capacidad de montar una respuesta; se puede adquirir durante el desarrollo hacia antígenos propios o en etapas más tardías hacia antígenos exógenos.[19]

##### **1.4.1. Tolerancia central**

. Durante el desarrollo de los linfocitos T, el 95% de los timocitos mueren por apoptosis, ya sea por falta de señal (selección  $\beta$ ) o por negligencia (selección positiva), pero aquellos timocitos funcionales que reconocen autoantígenos son eliminados cuando reconocen su antígeno expresado en timo, el mecanismo por el cual esto ocurre se denomina delección clonal y es fundamental para la generación de tolerancia inmunológica. Todos estos procesos permiten que a la periferia sólo

salgan aquellas clonas totalmente funcionales y que reconocen antígenos exógenos.

El descubrimiento del factor nuclear AIRE, que permite la expresión de antígenos órgano-específicos de algunos tejidos periféricos en las mTEC, refleja los antígenos que podemos encontrar en la periferia y pone en evidencia que la selección negativa tiene un rol dominante en la eliminación de los timocitos cuyo TCR se une con alta avidéz hacia antígenos propios expresados en el contexto del MHC I y II de las mTEC [20]. Pero las mTEC no son las únicas células que pueden presentar antígenos propios en el timo, también encontramos células dendríticas, macrófagos y linfocitos B que pueden presentar péptidos propios traídos de la periferia o tomados por presentación cruzada de los péptidos que expresan las mTEC (Fig4) [11, 21].

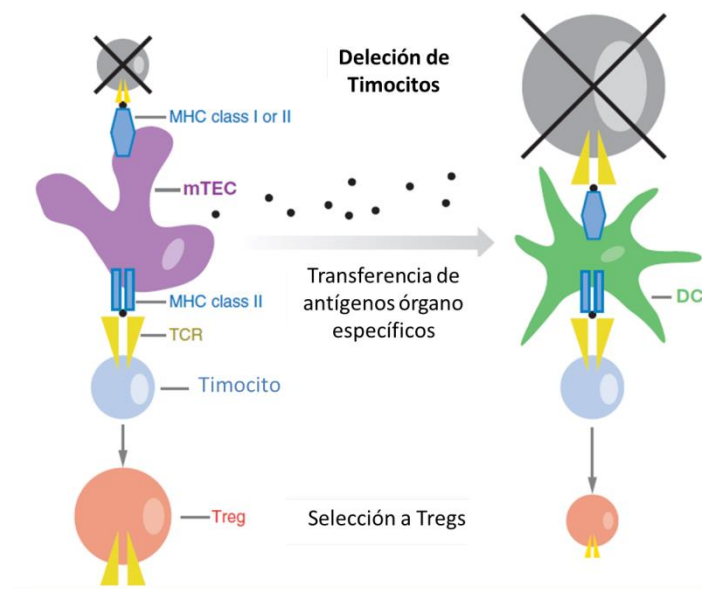


Fig4. Tolerancia central. La expresión de antígenos propios en las mTEC es más eficiente para la inducción de células Tregs, mientras que la expresión de antígenos propios por las DCs preferencialmente lleva a la depleción de los timocitos. Modificado de von Boehmer [11].

Existe evidencia de que no todas las interacciones de alta avidéz entre moléculas del MHC y el TCR en la corteza inducen muerte por apoptosis.



Se ha visto en modelos transgénicos que el reconocimiento de antígenos con alta avidéz induce la internalización del TCR, de esta manera el timocito tiene la posibilidad de rearreglar la cadena  $\alpha$  del TCR y editar la especificidad de su receptor, de manera que pueda evitar la selección negativa [22].

#### **1.4.2. Tolerancia Periférica**

Durante la selección negativa sólo son eliminados aquellos timocitos que reciben una señal de alta avidéz hacia antígenos propios, pero aquellos timocitos cuya avidéz por antígenos propios es baja o cuyo antígeno específico no se expresan en cantidades suficientes como para inducir su eliminación pueden llegar a salir del timo; por este motivo es importante que en periferia se tengan otros mecanismos para mantener la tolerancia inmunológica.

Uno de los mecanismos para mantener la tolerancia inmunológica hacia antígenos propios es la ignorancia inmunológica, basada en el concepto de que un linfocito que no ve su antígeno no es capaz de montar una respuesta. Los linfocitos vírgenes viajan de sangre a órganos linfoides secundarios donde las células dendríticas les presentan antígenos que han captado en la periferia; si un linfocito no tiene contacto con su antígeno vuelve a salir a la periferia, de esta manera un linfocito que no ha sido activado no migrara al tejido donde es más factible que encuentre al autoantígeno hacia el cual es específico. Por su parte, un linfocito activado cambia sus patrones de migración hacia el tejido, preferencialmente hacia los sitios de inflamación, de esta manera un linfocito activado incrementa las posibilidades de encontrar su autoantígeno y generar una respuesta hacia éste [23].

Otro mecanismo de tolerancia periférica es la inducción de anergia, en la cual las células anérgicas tras encontrar a su antígeno, no son capaces

de activarse, proliferar, ni producir citocinas. Tienen tiempos de vida cortos y un sistema de señalización diferencial, sin embargo esta anergia se puede revertir en presencia de altas concentraciones de IL-2. Estas células son generadas por una presentación antigénica en ausencia de inflamación o por células dendríticas inmaduras las cuales no presentan los niveles adecuados de moléculas co-estimuladoras o por presencia de moléculas co-inhibidoras [24, 25]. Además, el reconocimiento de un antígeno que se expresa abundantemente en contexto del MHC o por mucho tiempo eventualmente lleva a la pérdida de la función del TCR [19, 26].

La muerte inducida por activación antigénica (AICD o "Activation Induced Cell death") de células autorreactivas también es un importante mecanismo de tolerancia periférica, generalmente ocurre cuando el entrecruzamiento del TCR se da de manera fuerte o repetida y es mediada por Fas-FasL. [27]

### **1.5. Linfocitos T reguladores**

Los linfocitos T reguladores (Tregs) son parte importante de la tolerancia periférica, ya que suprimen la actividad de aquellas células que escaparon de los mecanismos de tolerancia central y periférica antes mencionados, a la vez que limitan la magnitud de la respuesta efectora.[28]. En un individuo podemos encontrar dos subpoblaciones de Tregs: aquellas que se desarrollan en el timo y aquellas que pueden ser inducidas en la periferia a partir de linfocitos vírgenes. Aún existe controversia acerca de si estas dos subpoblaciones de linfocitos reguladores tienen funciones redundantes o son totalmente diferentes, y del porqué sus requerimientos para desarrollarse son diferentes, por ello es importante estudiar ambos aspectos.

Esta población de linfocitos es importante para el control de enfermedades autoinmunes, alergias, en la tolerancia hacia trasplantes así como en la tolerancia feto-materna, pero también pueden suprimir la respuesta hacia tumores e inclusive hacia patógenos, es por ello que el balance de estas células es fundamental para mantener la homeostasis inmunológica.

### **1.5.1. Linfocitos T reguladores naturales**

Se denominan linfocitos T reguladores naturales (nTregs) a aquellos que se generan durante el desarrollo tímico, se caracterizan por la expresión de Foxp3 y por expresar de manera constitutiva la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 (CD25); constituyen de un 5-10% de los linfocitos CD4+ de periferia tanto en ratón como en humano (Fig5).

La importancia de las Tregs se observó cuando se depletaron linfocitos T CD4+ CD25+ del organismo, lo cual condujo a un fenotipo autoinmune, así como a una respuesta exacerbada hacia bacterias comensales del intestino. Posteriormente, se vio que esta población expresaba de manera única el factor transcripcional Foxp3, el cual se encuentra dentro de la familia de los factores de transcripción "forkhead", y que este es necesario para el desarrollo y función de las Tregs. La importancia de este factor de transcripción se descubrió en los ratones "scurfy", los cuales generan un síndrome linfoproliferativo con una producción de citocinas pro-inflamatorias excesiva por la presencia de una mutación en este gen, al igual que los humanos con síndrome linfoproliferativo asociado al cromosoma X (IPEX), quienes también presentan autoinmunidad órgano específica, alergias e inflamación crónica del intestino debida a la falta de Tregs.[29, 30]

La pérdida de funcionalidad de moléculas como LAT o Lck, importantes para la señalización del TCR, llevan a una disminución en la generación de

Tregs lo que indica que las señales del TCR son importantes para la generación de esta población en timo. De igual manera, los ratones deficientes de CD28 o CD80/CD86 presentan números disminuidos de nTregs, por lo que las señales del coestímulo también son fundamentales para su generación [31-33].

Para el desarrollo de las nTregs es importante la presencia de IL-2, ya que en ratones deficientes de esta citocinas los números de nTregs generados son mucho menores, aunque no se abaten por completo. Esto se debe a la presencia de otras citocinas de la  $\gamma_c$  común (subunidad del receptor a IL-2) como lo son IL-7 e IL-15, pero la depleción de la subunidad  $\gamma_c$  del receptor lleva a una ausencia completa de las nTregs; de esta manera demostrando la importancia de estas citocinas en la generación de nTregs. [34]

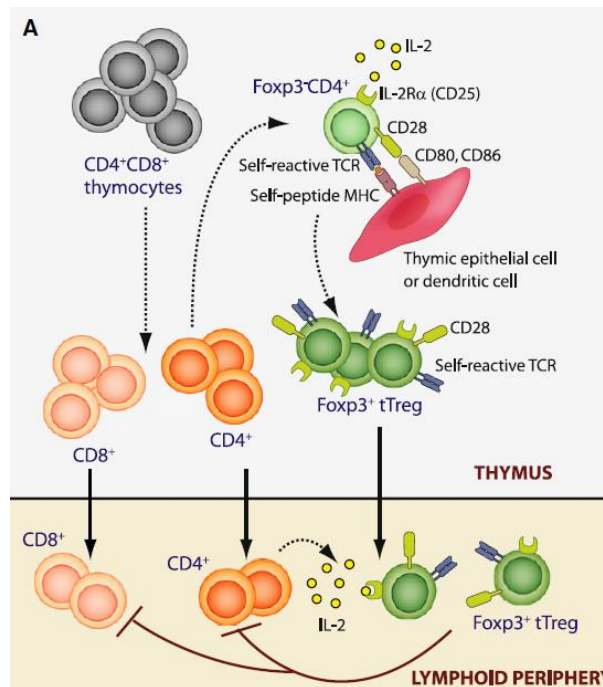


Fig5. La generación de nTregs necesita de las señales fuertes del TCR hacia antígenos propios, así como del coestímulo por CD28 y señales mediadas por la cadena  $\gamma_c$  para su generación [34] y la presencia de IL-2, para su mantenimiento. [35]

En la región 5' del gen de Foxp3 se encuentran varios sitios de unión a factores de transcripción como lo son AP-1, Smad3 y NFAT que favorecen la expresión de Foxp3 en respuesta al TCR. La inducción de Foxp3 por medio de IL-2 es dependiente de STAT5 que se une en el promotor proximal y regiones intrónicas de Foxp3 [36].

La expresión de Foxp3 regula positivamente la expresión de CD25, CTLA-4 y GITR, marcadores superficiales asociados a Tregs. En base a estos marcadores, se dice que las nTregs cuando salen a periferia presentan un fenotipo activado, pero reprimen la producción de IL-2, IL-4 e  $INF\gamma$ . Foxp3 también se puede unir a otros factores de transcripción para ayudar a las Treg a ejercer su función supresora, proteínas como NFAT o Runx1 que le permiten suprimir la expresión de IL-2, o ROR $\gamma$ t importante factor para la diferenciación hacia Th17 (fenotipo proinflamatorio) y de esta manera la interacción entre estos factores de transcripción permiten el equilibrio entre Treg/Th17. Foxp3 también se puede unir a Eos: esta interacción permite el silenciamiento de genes como IL-2 o  $INF\gamma$  por medio de modificaciones en la cromatina (Fig6). [37]

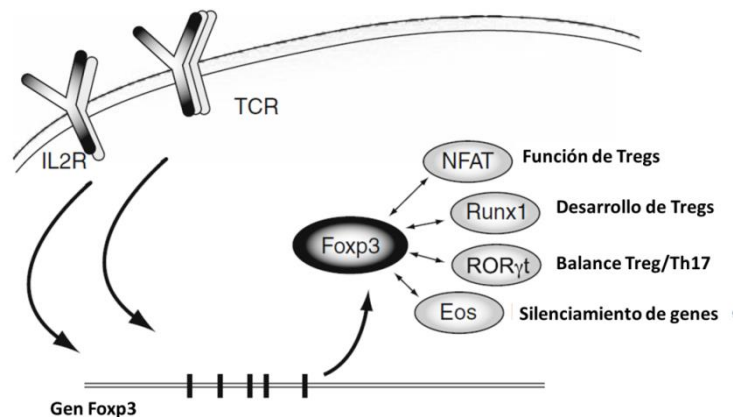


Fig6. Foxp3 requiere de la interacción con otros factores de transcripción para su desarrollo y función.

La especificidad del TCR hacia antígenos propios es importante para la selección de este subtipo celular, ya que en ratones que no son capaces

de recombinar la cadena  $\alpha$  del TCR no se desarrollan nTregs a menos que encuentren su antígeno propio durante el desarrollo tímico. También se ha visto que los repertorios de TCR de las células vírgenes y las nTreg no se sobrelapan [38]. La avidéz para la selección de nTregs también es importante: se necesita una alta avidéz por antígenos propios y se postula que se encontraría entre la necesaria para la selección positiva y aquella necesaria para la selección negativa (Fig7) [39]. Sin embargo aún existe controversia sobre la especificidad antigénica de las nTregs, puesto que podemos encontrar linfocitos vírgenes y Treg con la misma especificidad, al parecer la generación de nTregs no depende únicamente de la especificidad antigénica que presenten, sino también requiere que se encuentren en un “nicho” con un microambiente de citocinas y factores de crecimiento específico [40].

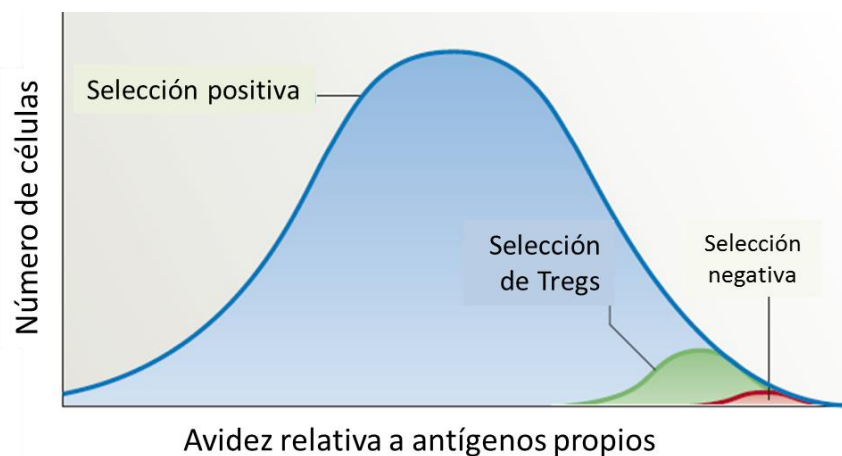


Fig7. La avidéz del TCR por antígenos propios favorece la selección hacia nTregs. Modificado de Hsieh et al. [39]

### 1.5.2. Linfocitos T reguladores inducidos

Los linfocitos reguladores inducidos (iTregs) son linfocitos T Foxp3+ generados fuera del timo. En un inicio se observó que la inducción de Tregs *in vitro* era favorecida por señales subóptimas de TCR, o bajo señales altas pero en presencia de altas concentraciones de TGF $\beta$ , aunque

su generación se ha visto mayoritariamente asociada a condiciones de activación en ausencia de inflamación y en tejido linfoide asociado a intestino (Fig8.).

La especificidad del TCR que presentan las iTregs es parcialmente diferente al de las células vírgenes y diferente en su mayoría al de las nTregs lo que sugiere que cierto tipo de antígenos favorecen la generación de Tregs en periferia [41].

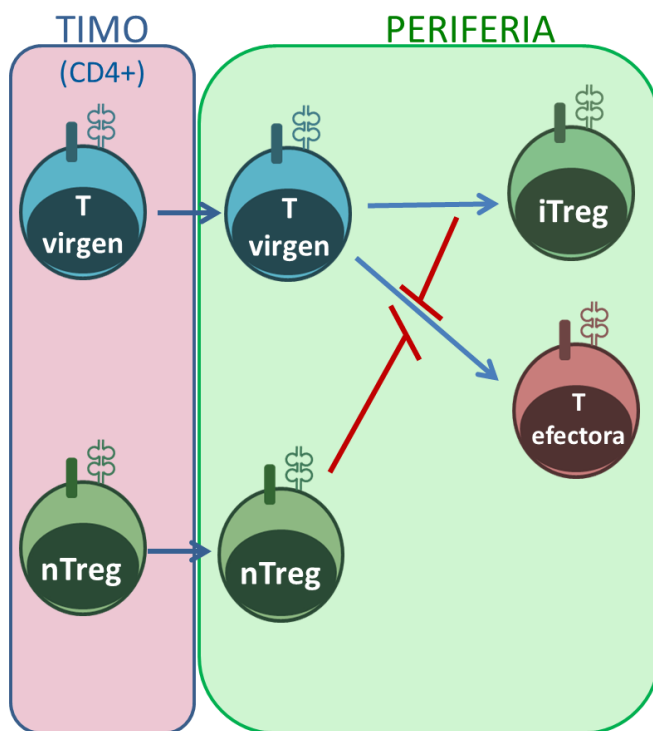


Tabla 1. Comparativo entre los requerimientos de generación de las Treg naturales e inducidas. [36, 38]

	nTreg	iTreg
Sitio de inducción	Timo	Periferia
Co-estímulo	CD28	CTLA-4
Citocinas	IL-2, TGFβ¿?	TGFβ, IL-2, RA
Especificidad	Ag propios	Ag propios y exógenos
Supresión	Contacto	Citocinas

Fig8. Generación de Tregs. Las nTregs son generadas en timo, mientras que las iTregs a partir de linfocitos vírgenes en periferia. Modificado de Curotto et al. [1]

Los requerimientos para la generación de iTregs son diferentes a aquellos necesarios para la generación de nTreg. Un ejemplo claro de ello es el tipo de coestímulo que necesitan: mientras que para la generación de nTregs es necesaria la interacción con CD28, en periferia esta interacción inhibe la generación de iTregs, por el contrario es necesario un

estímulo inhibitorio por medio de CTLA-4 para poder generarse en presencia de  $TGF\beta$ . Consistente con este punto, el bloqueo de la vía PI3K/mTOR favorecen la inducción de iTregs mientras que la sobre-expresión de Akt lo inhibe (Tabla 1) [42, 43].

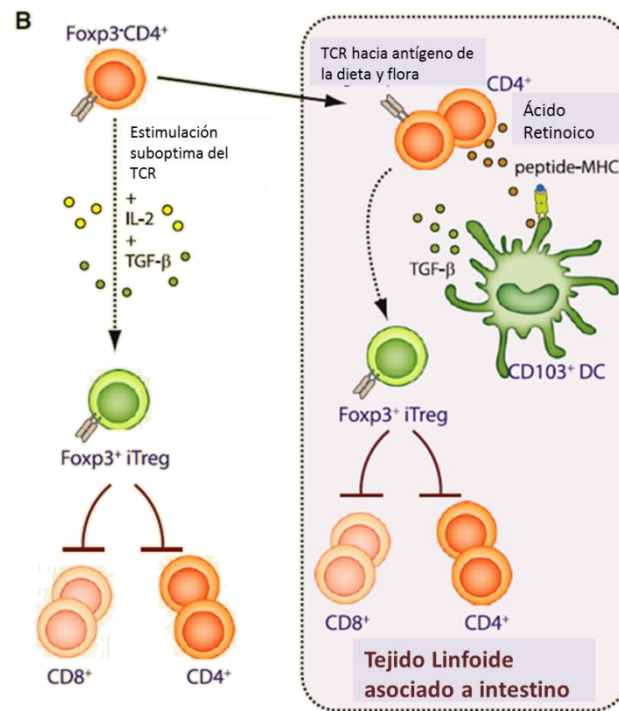


Fig9. Inducción de iTregs. La generación de linfocitos Fxp3+ a partir de células vírgenes se ve favorecida por el continua exposición a antígenos de la flora y dieta, así como por condiciones de estímulo subóptimas en presencia de  $TGF\beta$ , IL-2 y ácido retinoico.[35]

Citocinas como  $TGF\beta$  e IL-2 son necesarias para la inducción de iTregs. Estas citocinas ejercen su función mediante la unión de STAT5, Smad3 y NFAT al gen Fxp3 [44], el cual presenta una zona de desmetilación arriba del exón 1 conocida como TSDR (Región Desmetilada Específica de Tregs); de manera diferencial a las nTreg la desmetilación de este locus no es completa en las iTregs, lo que implica que la expresión es menos estable [1, 35].  $TGF\beta$  disminuye la metilación de las islas CpG con lo que incrementa la expresión de Fxp3 y cuando se une con ácido retinoico induce la acetilación de histonas en el locus de Fxp3, dicha acetilación



permite que este gen se exprese. Los requerimientos para la inducción de iTregs nos llevan a pensar que su generación sólo se da en ciertos ambientes.

Uno de los principales sitios de inducción es el tejido linfoide asociado a intestino. Se ha descrito que la administración de antígenos por vía oral es una mejor manera de inducir tolerancia que la administración por alguna otra vía. En lámina propia del intestino delgado podemos encontrar DCs CD103+ las cuales son productoras de TGF $\beta$  y ácido retinoico, lo cual favorece la expresión de Foxp3 en células vírgenes de periferia; en este sitio así como en los ganglios mesentéricos (intestinales) se induce la generación de Tregs por la exposición crónica a antígenos de la dieta y de la flora bacteriana (Fig9) [45].

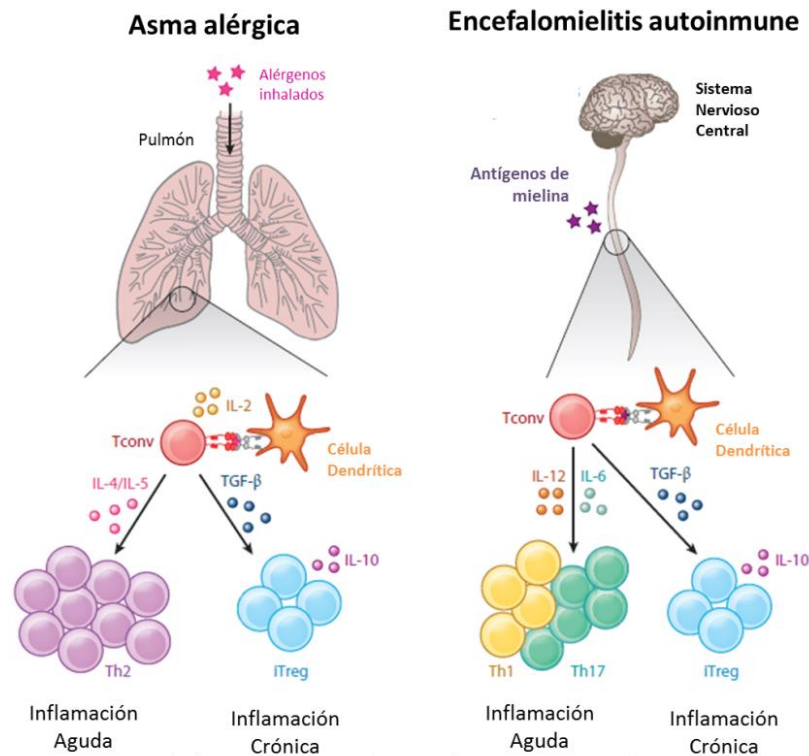


Fig10. Generación de iTregs en modelos de inflamación crónica. Modificado de Bilate et al. [45].

Las iTregs también pueden ser generadas en contexto de infección o inflamación crónica. Cuando una respuesta inmune hacia una infección baja, la cantidad de antígenos provenientes del patógeno son suficientes para mantener la alta expresión de MHC II y la migración hacia órganos linfoides de las DCs, pero el incremento en la fagocitosis de células apoptóticas inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias, lo cual lleva a un fenotipo más tolerogénico de las DCs maduras[46]. De igual manera, se ha observado que las células Th1 después de una respuesta fuerte generan IL-10 como un mecanismo de autocontrol y que el tejido dañado secreta TGF $\beta$ ; ambas citocinas favorecen la generación de iTregs en el sitio de inflamación [26]. También se ha observado que se generan iTregs una vez que se ha establecido un proceso asmático, así como en la inducción de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE, modelo murino de esclerosis múltiple) (Fig10).

### **1.5.3. Mecanismos de supresión**

Para poder ejercer su función supresora las Treg necesitan tener contacto con su antígeno específico por medio del TCR y una vez activadas ejercen su función de manera antígeno específica o inespecífica (Fig11).

Las nTregs suprimen mayoritariamente a través de mecanismos dependientes de contacto célula-célula: los ensayos *in vitro* mostraron que las Tregs eran incapaces de suprimir la proliferación de linfocitos T efectoras cuando se encontraban físicamente separadas, y el cultivo de células efectoras con el sobrenadante de las Tregs tampoco era suficiente para inhibir su proliferación. Se evidenció que las Tregs pueden suprimir de manera dependiente de contacto por medio de granzimas o perforinas induciendo citólisis de la célula T efectora[47].

Otro mecanismo por el cual las Tregs suprimen es por deprivación de citocinas; estas células no son capaces de producir IL-2, pero tienen

niveles más altos de CD25 que los linfocitos vírgenes o activados, por lo cual son más eficientes tomando la IL-2 del medio. De esta manera disminuyen la capacidad de activación y proliferación de las células activadas [48]. Las células Tregs también presentan dos ectoenzimas CD39 y CD73 capaces de inducir la secreción de nucleosidos de adenosina los cuales suprimen la función efectora, además de promover la generación de Tregs inhibiendo la secreción de IL-6 y favoreciendo la secreción de TGF $\beta$  [49].

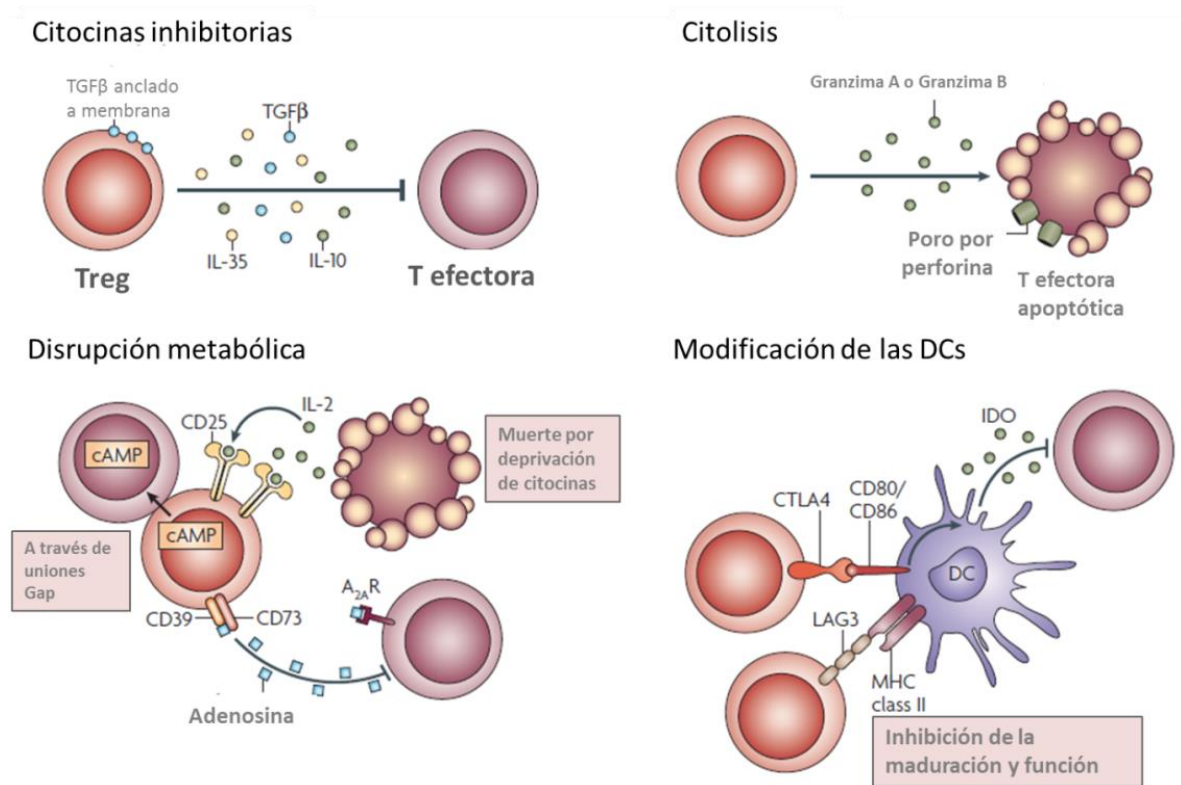


Fig11. Los mecanismos de supresión ejercidos por las Tregs hacia las células efectoras se pueden dividir en 4 grupos: citocinas inhibitorias, disrupción metabólica, citólisis y modificación directa de las células dendríticas. Modificado de Vignali et al. [50].

Además, las Tregs también ejercen un efecto directo sobre las DCs, ya que la producción de IL-10 por las Tregs inhibe el incremento en la expresión de CD80 y CD86, favoreciendo condiciones subóptimas de activación. Por otro lado, la interacción de CTLA-4 y CD80/CD86 favorece

la expresión deIDO (indolamina 2,3-dioxigenasa), enzima que favorece el catabolismo del triptófano hacia un producto tóxico para los linfocitos T [51]. Por otro lado, NP-1 promueve interacciones más prolongadas entre las Tregs y las DCs inmaduras, dado que NP-1 se expresa preferencialmente en las Tregs les da una ventaja sobre los linfocitos T vírgenes para modular la función de las DCs [52, 53]. Adicionalmente, LAG-3, molécula expresada constitutivamente en las nTreg se une a MHC Clase II en la DC afectando la capacidad presentadora de antígenos de ésta.

Las citocinas secretadas por las Tregs: IL-10, TGF $\beta$  o IL-35, también forman parte de sus mecanismos de supresión. La eliminación de Tregs productoras de IL-10 lleva a autoinmunidad, pero esta patología se ve aumentada en colon o pulmones, lo que indica que la función de esta citocina puede estar restringida a controlar la inflamación mediada por la flora intestinal o antígenos ambientales. TGF $\beta$  por su parte, anclada a membrana, puede ejercer su función supresora de manera dependiente de contacto. IL-35 es expresada preferencialmente por las Treg y se requiere para su máxima función supresora.[50, 54]

#### **1.5.4. Marcadores de los linfocitos T reguladores**

Existen ciertas diferencias en la expresión génica de las iTregs y de las nTreg: Helios es el principal marcador que diferencia estas células ya que sólo es expresado en las nTregs; la expresión de NP-1 es mucho más alta en las nTregs que las iTregs; la expresión de genes también es diferente en estas subpoblaciones ya que IL-10 se produce en mayor cantidad en la iTregs que en las nTregs, pero la granzima B es secretada preferencialmente por las nTregs [45].

CTLA-4 (Antígeno 4 de Linfocito T Citotóxico) es una proteína con una alta homología a CD28 y se une con una mayor avidéz a CD80 y CD86, se

expresa en etapas más tardías de la activación de linfocitos a diferencia de CD28 y no se expresa en linfocitos vírgenes. Los ratones deficientes de esta proteína desarrollan proliferación espontánea de linfocitos y autoinmunidad [55]. Se ha visto que su expresión es necesaria para llegar al estado anérgico ya que inhibe la producción de IL-2 y arrestan a las células del ciclo celular[56]. Como ya se mencionó anteriormente CTLA-4 es capaz de inducir la producción deIDO en las DCs y también afecta su potencial de adhesión al incrementar la expresión de ICAM [57].

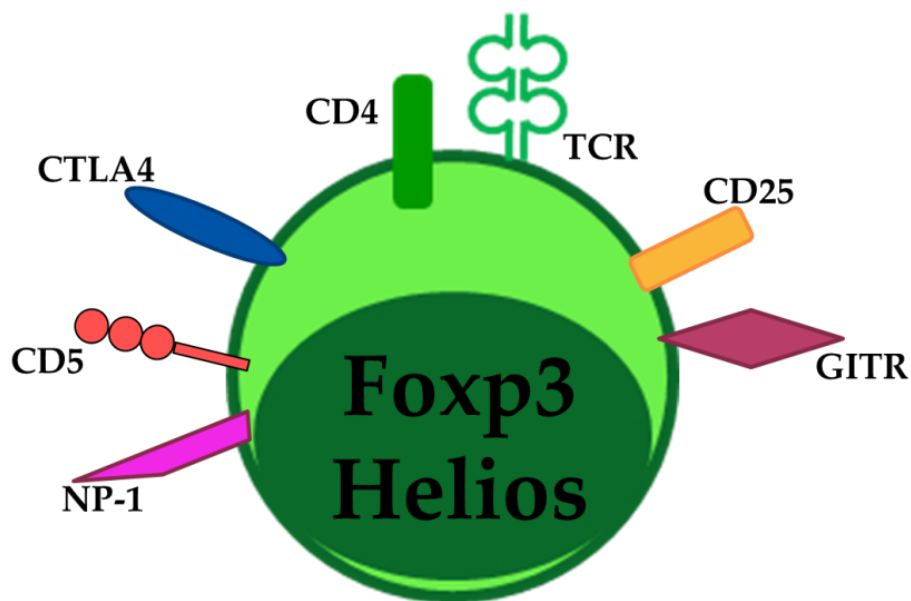


Fig12. Marcadores que nos permiten identificar las Tregs

NP-1 (neuropilina 1) es un receptor para semaforina III expresado preferencialmente por las Tregs y que posterior a la activación bajan su expresión en linfocitos vírgenes. La expresión ectópica de Foxp3 conduce a la mayor expresión en superficie de esta proteína, se ha asociado como correceptor de TGF $\beta$  y se ha visto que favorece la activación de su forma latente, así como la interacción entre las Tregs y las DCs inmaduras. Su función en la supresión mediada por la Tregs aún no es clara y su ausencia no tiene ningún efecto en la generación de estas [52, 58].

PD-1 tiene relación estructural con CD28 y CTLA-4; la deficiencia de éste, al igual que CTLA-4, conlleva a autoinmunidad, su función se ha visto relacionada con el mantenimiento de los linfocitos T en un estado anérgico ya que inhibe las interacciones estables entre APCs y linfocitos, evitando de esta manera la activación del TCR por reclutamiento de fosfatasa [59].

GITR (“glucocorticoid-induced TNFR family related gene”) pertenece a la superfamilia de los Receptores a Factor de Necrosis Tumoral (TNFR), su expresión se ve incrementada en las Treg, aunque también es expresado por las NK, los linfocitos activados, y otros tejidos. Una vez que encuentra su ligando puede inducir apoptosis, así como inhibir la proliferación, por eso se podría decir que GITR es un regulador negativo de la función de las Treg [60, 61].

CD5 tiene una alta expresión en este tipo celular, inclusive fue uno de los primeros marcadores detectados en las Treg, ya que si se depletaba la fracción tímica CD4+ CD5hi se generaba un fenotipo autoinmune, igual al que se observa con la ausencia de Foxp3 o CD25. Se ha observado que en ausencia de CD5 se generan más células T reguladoras en timo y periferia. La función de CD5 se describe posteriormente (Fig12).

## **1.6. CD5**

CD5 es un glicoproteína tipo I de 67KDa, perteneciente al grupo B de la superfamilia de los Receptores “Scavenger” Ricos en Cisteína (SRCR), familia caracterizada por contener 8 cisteínas en cada uno de sus dominios. CD5 está codificado en el cromosoma 11q12.2 en humanos y 19a en ratones; presenta 3 dominios SRCR (D1, D2, D3) y una cola citoplásmica en la cual existen 11 serinas, 4 treoninas y 4 tirosinas, posibles sitios de fosforilación. De manera interesante, CD5 presenta dentro de su cola citoplásmica un dominio pseudo ITIM, un dominio

pseudo ITAM, así como un sitio de unión a la Cinasa de Caseína II (CKII) (Fig13) [62].

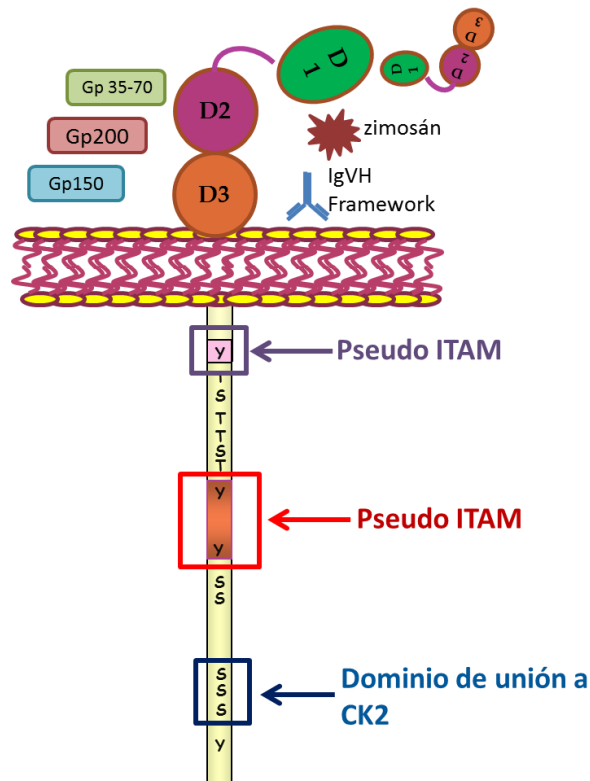


Fig13. CD5 presenta 3 dominios extracelulares y un dominio citoplásmico, sus Ligandos conocidos se muestran aquí. Modificado de Soldevila et al. [63]

CD5 se expresa en timocitos, células T maduras y una subpoblación de linfocitos B, los B1a, que se encuentran principalmente en las cavidades peritoneal y pleural, subpoblación caracterizada por la secreción de anticuerpos naturales polireactivos. Sus ligandos conocidos son CD72, glicoproteínas de diferentes pesos moleculares (gp35-40, gp150, gp200) y el segmento "framework" de la región variable de la cadena pesada (IgVH), así como el mismo CD5, aunque su ligando endógeno aún no se conoce. [63]

CD5 se expresa en etapas tempranas del desarrollo del linfocito T, su expresión está regulada por las señales del TCR y por la avidéz de éste hacia su ligando. Durante el estadio DN de los timocitos la expresión de

CD5 es baja, pero una vez que estos rearreglan la cadena  $\beta$  del TCR y sufren el proceso de selección  $\beta$  la expresión de CD5 en superficie incrementa, de tal manera que los timocitos DP tienen una expresión intermedia de esta proteína y su expresión es proporcional a los niveles de expresión del TCR, así como de su capacidad de señalización; los niveles de CD5 incrementan posterior a la interacción del TCR con su ligando durante la selección positiva. Aquellos timocitos que reciban señales de mayor intensidad presentarán una mayor expresión de CD5 que aquellos que reciban una señal de menor intensidad [64].

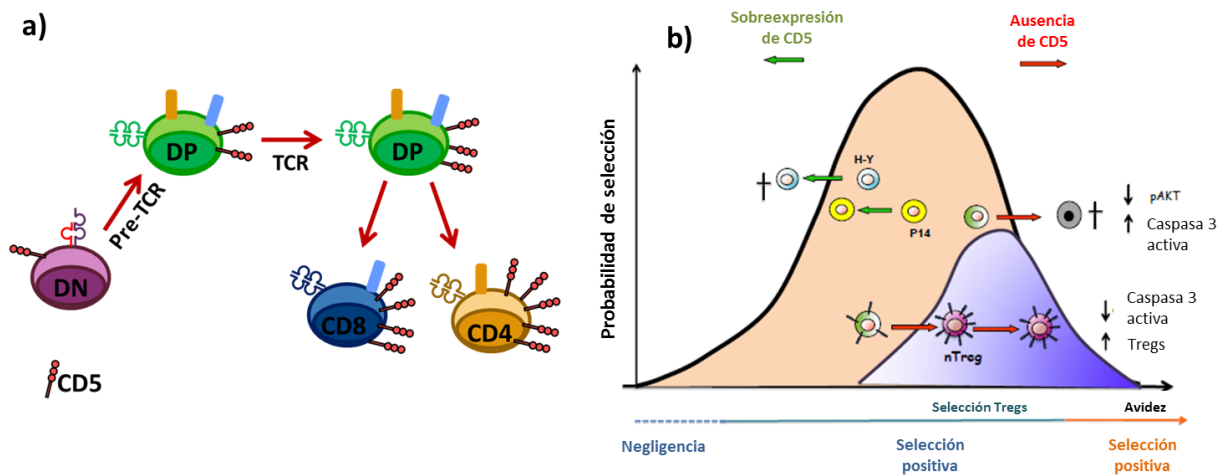


Fig14. CD5 en el desarrollo. a) La expresión de CD5 incrementa conforme incrementa la avididad del TCR por su antígeno. b) CD5 modula las señales del TCR. Modificado de Azzam et al. [64] y Soldevila et al. [65]

Sin embargo, al mismo tiempo que las señales del TCR modulan la expresión de CD5, esta proteína es capaz de regular las señales transducidas a través del TCR. Esto se ha demostrado a partir de modelos transgénicos en los que se sobreexpresaba CD5 o bien en modelos donde esta proteína estaba ausente. Bajo la expresión de TCR transgénicos (todos los TCR son específicos hacia un mismo antígeno), se observó que bajo un TCR de alta avididad (específico hacia P14, gp 33-41 del virus de coriomeningitis linfocítica) la ausencia de CD5 lleva a una selección negativa de la mayoría de los timocitos, ya que se encuentran pocos



timocitos SP; en cambio bajo la expresión de un TCR de baja avidéz (específico hacia H-Y, antígeno de histocompatibilidad masculino) la ausencia de CD5 permite el paso a través de la selección positiva, ya que se encuentran altos números de timocitos SP. Para esta regulación de las señales transducidas por el TCR es importante la cola citoplásmica de CD5, ya que en un modelo transgénico que sólo expresa la parte extracelular anclada a membrana se ve el mismo efecto que en ausencia de la proteína completa (Fig14) [65].

### **1.6.1. Señalización mediada por CD5 y las señales del TCR**

CD5 es fosforilado en tirosinas posterior a la activación del TCR [66], esta fosforilación puede ser mediada por miembros de la familia *Src* asociadas al complejo TCR/CD3, esta fosforilación sirve como sitio de unión para proteínas que contienen dominios de homología a *src* 2 (SH2). Se ha demostrado que p56<sup>lck</sup> es importante para la fosforilación de tirosinas, el dominio SH2 de esta proteína se une a las tirosinas de la posición 429 y 463, pertenecientes al dominio pseudo ITAM pero no a la tirosina 441 [67]. CD5 también es sustrato de cinasas de tirosina como la cadena  $\zeta$  del complejo CD3(CD3 $\zeta$ ), ZAP-70 y p59<sup>fyn</sup>, por su asociación con el TCR [68]. La subunidad p85 de PI3K, la cual también contiene un dominio SH2, se une a la tirosina 463 con mayor afinidad que a las tirosinas 429 o 441 posterior a la activación con pervanadato [69]. Por otro lado también se ha visto que CD5 es capaz de fosforilar a Fyn (una cinasa asociada a la activación mediada por el TCR) en la tirosina inhibitoria 531, lo que lleva a una marcada reducción de su actividad cinasa y a la inhibición de la activación de ZAP-70 [70].

c-Cbl, una proto-oncoproteína, se asocia a CD5 de manera constitutiva y su fosforilación se ve incrementa posterior al estímulo con  $\alpha$ -CD5 o pervanadato. La proteína GTP-asa activadora de ras (ras GAP) es

fosforilada por CD5 en respuesta al estímulo con pervanadato, su interacción con CD5 se da de manera dependiente al dominio SH2 con la tirosina 429 de la cola citoplásmica. Ambas moléculas se consideran reguladores negativos de la señal y pueden contribuir a la supresión de la respuesta del TCR o BCR asociada a CD5. La función de c-Cbl se ha relacionado a la ubiquitinización de receptores, proceso que los lleva a degradación proteosomal, así como al ensamblaje de complejos de internalización. CD5 es ubiquitinado por esta proteína, el co-estímulo de CD3 más CD5 incrementa la ubiquitinización de esta glicoproteína, así como su localización en lisosomas, de esta manera se regula su expresión en la superficie de los linfocitos T (Fig15) [71].

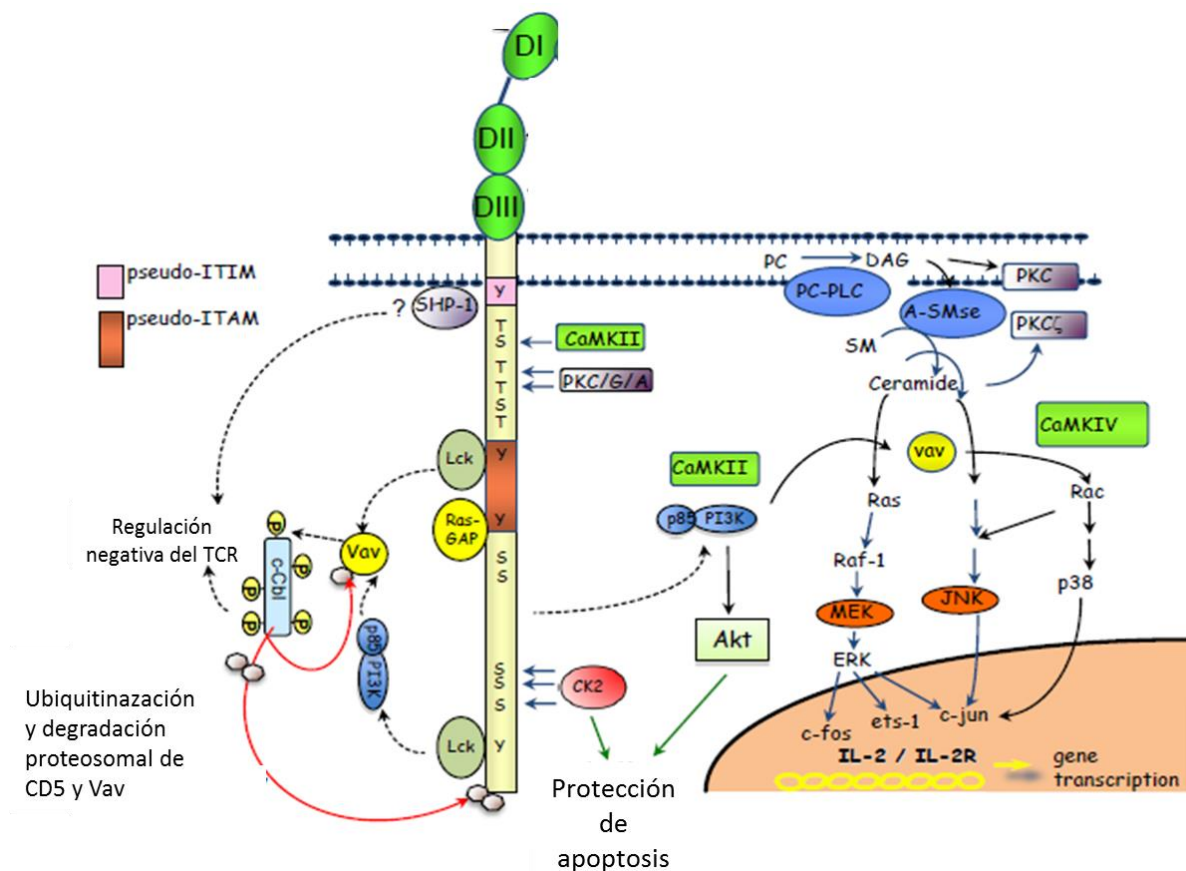


Fig.15. Cascada de señalización mediada por CD5. Modificado de Soldevila et al. [63]

La cinasa de serina/treonina CK2 se une de manera constitutiva a CD5, esto lleva a la fosforilación de los residuos distales de la cola citoplásmica S458, S459 y S461 y lo hiperfosforila en respuesta a la activación del TCR. Esta cinasa es inhibida en presencia de heparina. La unión de CK2 lleva a la generación de segundos mensajeros de carácter lipídico, por ejemplo fosfolipasa C específica para fosfatidilcolina (PC-PLC), formando parte de la señalización mediada por esta proteína. CK2 tiene varios sustratos conocidos, entre los que se encuentran el complejo AP2, el cual puede unir a la cola citoplásmica de CD5 vesículas cubiertas de clatrina, lo cual induce su internalización (Fig16) [72, 73].

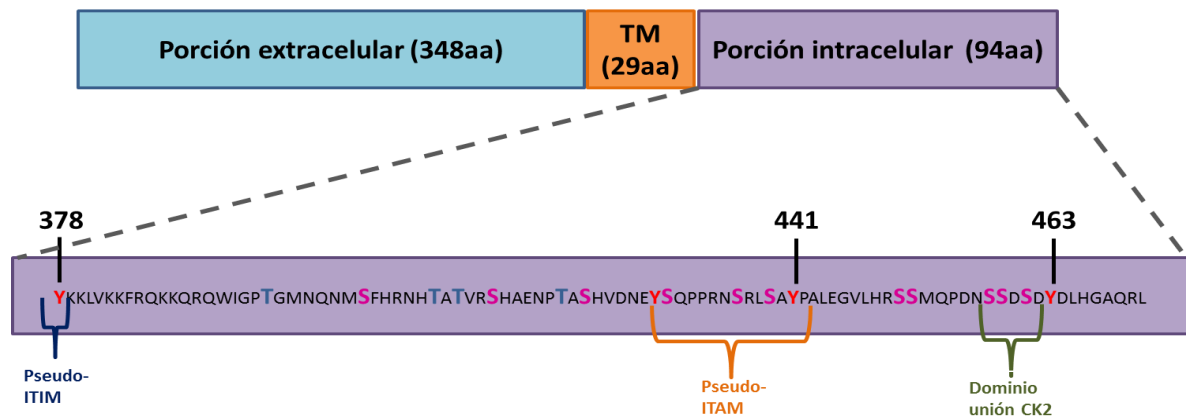


Fig16. Secuencia de aminoácidos de la cola citoplásmica de CD5. En rojo se marcan las tirosinas, en azul las treoninas, y en rosa las serinas, posibles de sitio de fosforilación, también se señalizan los motivos pseudo-ITIM, pseudo-ITAM y el motivo de unión a CK2. Modificado de Clavo et al. [72]

CD5 media la activación de PKC y la liberación de Calcio intracelular por la liberación de diacilglicerol (DAG) después de la activación de PC-PLC o de la síntesis de novo de fosfolípidos, este efecto se puede deber a la asociación de p56<sup>lck</sup> a la tirosina 463, lo cual permitiría la unión de otras proteínas con dominios SH2 y la asociación de PC-PLC a éstas. [72, 74]

La tirosina 378 de la cola citoplásmica de CD5 se encuentra muy próxima a la interfase con la membrana celular, por ello su fosforilación es difícil, en cambio esta tirosina, perteneciente al motivo pseudo ITIM de

CD5 une a la fosfatasa de tirosina SHP-1 por medio de su dominio SH2, lo cual refuerza la idea de que CD5 funciona como un regulador negativo de las señales del TCR, ya que entre sus posibles sustratos se encuentran CD3 $\zeta$ , CD19, CD22, PLC $\gamma$ 1 y proteínas intracelulares como p56<sup>lck</sup>, p59<sup>fyn</sup> o ZAP-70 [75]. La unión de SHP-1 a CD5 es controversial ya que no se ha logrado reproducir el dato *in vivo*, esto puede ser debido a que los experimentos realizados para probar la asociación con CD5 se hicieron en células Jurkat (linfocitos T humanos) las cuales habían sido transfectadas con quimeras que expresaban la parte extracelular de CD6 y la cola citoplásmica de CD5, lo que pudo afectar la conformación de la proteína y permitir la unión de SHP-1 (Fig15).

### **1.6.2. CD5 como regulador de las señales del TCR**

Como ya se mencionó anteriormente CD5 está asociado al TCR y BCR y modula su señalización.

CD5 en un inicio se consideró como una molécula co-estimuladora de las señales del TCR; cuando se estimulaba con anticuerpos anti-CD5 ( $\alpha$ -CD5) se veía un incremento en los niveles de calcio intracelular, activación de la proteína cinasa C (PKC), inducción de la secreción de IL-2 y proliferación, así como en la habilidad para hidrolizar el inositol [76-78]. También se propuso que CD5 co-estimulaba al TCR incrementando su asociación a balsas lipídicas [79]. Pero la función de CD5 como un regulador negativo de las señales del TCR se hizo evidente con la generación del ratón deficiente de CD5 (CD5KO).

Para poder estudiar la función de CD5 *in vivo* se generó, por recombinación homóloga en células embriónicas totipotenciales, un ratón deficiente de CD5 en el cual se reemplazó un fragmento del exón 7 por un "cassette" de resistencia a neomicina, lo que interrumpe la secuencia

que codifica para el dominio transmembranal, además de una mutación que modifica el marco de lectura en el exón 3 el cual codifica para la parte amino terminal del dominio rico en cisteína de CD5. En este ratón CD5 no se expresa en la superficie de linfocitos T ni B, los análisis iniciales de este ratón indicaron que las proporciones y los números totales presentes de las subpoblaciones tímicas y periféricas de estas células no se veían alteradas. Además, estos ratones eran capaces de montar una respuesta inmune efectiva [80]. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que los ratones adultos presentan una reducción en la celularidad del timo así como un incremento en las subpoblaciones de Tregs (ver más adelante).

Por otro lado, la ausencia de CD5 tiene un impacto en la respuesta de los linfocitos T, ya que los timocitos de un ratón deficiente de CD5 (CD5KO) cuando son estimulados con anticuerpos hacia CD3 ( $\alpha$ -CD3) proliferan en mayor medida, presentan una mayor movilización de calcio, y presentan una fosforilación incrementada de la fosfolipasa C- $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) en comparación con los timocitos provenientes de ratones que expresan CD5 (CD5WT). De igual manera, la fosforilación de la proteína Vav, importante para la proliferación de los linfocitos T se ve incrementada en los ratones CD5KO. [81]. Estos datos demuestran que CD5 actúa como una molécula que regula negativamente las señales del TCR.

### **1.6.3. CD5 y su función en la supervivencia de los linfocitos**

CD5 ha surgido como un regulador de la supervivencia de los linfocitos T y B-1a. *In vivo* la administración de  $\alpha$ -CD3, inclusive a bajas concentraciones (1 $\mu$ g/mL), ocasiona que un 95% de los timocitos DP de los ratones CD5KO sean deletados por apoptosis, a diferencia de los ratones CD5WT donde esto ocurre a concentraciones altas (10 $\mu$ g/mL). Por otro lado la administración de  $\alpha$ -CD3 lleva a una disminución importante

de los números de linfocitos T en periferia, esto debido a que las células sufren una muerte inducida por activación (AICD) [82].

Se ha visto que en ratones deficientes de CD5 el desarrollo de la enfermedad Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) se ve disminuido y el inicio de los síntomas se da a tiempos más tardíos comparado con ratones WT, esto debido a un incremento en AICD de las células T autoreactivas. Posteriormente se vio que este efecto era mediado por CK2, molécula importante en la regulación de la supervivencia celular y la inhibición de proteínas apoptóticas, ya que los ratones deficientes del sitio de unión de CK2 en la cola citoplásmica de CD5 presentan el mismo efecto que la ausencia de CD5 completo. Por otro lado, en estos ratones se vio una disminución de los linfocitos que co-expresan INF $\gamma$  e IL-17. Esto podría explicarse por el hecho de que la diferenciación hacia Th2 o Th17 es deficiente, lo cual también puede afectar el desarrollo de la enfermedad [83-85].

Otro mecanismo por el cual CD5 podría regular la supervivencia de los linfocitos es a través de la activación de Akt. Esta posibilidad se ve apoyada por datos recientes que demostraron que los timocitos de ratones CD5KO son incapaces de inducir la fosforilación de Akt en respuesta al estímulo con  $\alpha$ -CD3+ $\alpha$ -CD28, comparado con ratones silvestres. Akt se encuentra involucrado en la vía de PI3K el cual se ha visto asociado a CD5 posterior a la activación de los timocitos [86]. Además, se vio que en el ratón CD5KO los timocitos vírgenes presentan niveles más bajos de Akt, así como niveles más altos de Anexina V en su superficie y Caspasa 3 activa intracitoplásmica, lo cual correlaciona con una mayor apoptosis de éstos.

CD5 también se ha asociado con la protección de linfocitos T CD8 hacia AICD mediada por la presencia de tumor. Se observó que la

susceptibilidad a la muerte se correlaciona inversamente a la expresión de CD5 en superficie: la expresión de CD5 produce una disminución en la expresión de FasL, así como una inhibición de la activación de la Caspasa 8 [87]. Interesantemente, los linfocitos con menor expresión de CD5 eran los que presentaban mayor capacidad antitumoral, debido a una mayor movilización de calcio [88]. La incubación con citocinas como IL-7 e IL-21 inducen una disminución en la expresión de CD5 mediada por el represor transcripcional E47, lo cual conduce a un incremento en la capacidad de respuesta de los linfocitos CD8 y de esta manera adquieren la capacidad antitumoral [89].

Por otro lado la supervivencia de los linfocitos B1 está asociada a la producción de IL-10 dependiente de CD5, de manera que la expresión de esta glicoproteína induce una menor movilización de calcio posterior a la activación del BCR [90]. Por otro lado, la secreción de IL-10 mediada por CD5 se ha visto también en linfocitos B de pacientes con leucemia linfocítica crónica, cuya estimulación con  $\alpha$ -CD5 induce la fosforilación de PKC, lo cual lleva a un incremento en la expresión de Mcl-1 (molécula anti-apoptótica) proporcionando a estas células señales de supervivencia [91].

#### **1.6.4. CD5 y la tolerancia inmunológica**

Como ya se había mencionado anteriormente, las células Tregs son importantes para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica. Dichas células se caracterizan por la expresión de CD25 y Foxp3, pero en un inicio fueron identificadas por la alta expresión de CD5.

Para analizar si CD5 tenía un efecto en las Treg se observó la frecuencia de estas células en el ratón CD5KO, se vio que esta población celular se encuentra incrementada tanto en porcentaje como en números totales en el timo y periferia de estos ratones, y que a diferencia de lo observado en

los linfocitos vírgenes presentan niveles más altos de Akt y una disminución de la Caspasa 3 activa. Adicionalmente, se observó que estas células presentaban una mayor capacidad supresora *in vitro*, todo esto en comparación con las células provenientes del ratón CD5WT [86]. De igual manera se observó que en un modelo de colitis inducida por dextran, los ratones CD5KO presentan una menor severidad de la enfermedad y que esto se correlaciona con niveles más altos de Foxp3 por célula en las Tregs encontradas en el colon de estos ratones. Además, las Treg del ratón CD5KO mediaron su supresión por contacto dependiente de GITR y fueron capaces de movilizar calcio en mayor medida posterior a la activación del TCR [92].

De manera interesante, CD5 también está involucrado en la inducción de anergia, debido a que las células dendríticas inmaduras que presentan péptidos de mielina en el contexto del MHC, pueden inducir un incremento en la expresión de CD5 en los linfocitos T, ocasionando que los linfocitos no sean capaces de responder al estímulo con el péptido, pero sí de responder a la estimulación a través del TCR. Este tipo de "anergia selectiva" no se puede generar en los ratones CD5KO [93].

También se ha visto que CD5 es importante para el mantenimiento de la anergia en los linfocitos B, ya que las células anérgicas provenientes del ratón CD5KO presentan una proliferación incrementada, así como niveles altos de calcio intracelular. Por otro lado, cuando estas células anérgicas son transferidas a un ambiente deficiente de CD5 pierden la tolerancia [94]. En este contexto, se ha caracterizado una subpoblación dentro de los linfocitos B1a CD5+ que presentan la capacidad de secretar IL-10, y que se consideran B reguladoras, las cuales representan el 1-2% de los linfocitos B en bazo y son capaces de controlar la inflamación [95]. Estas células Breg con capacidades supresoras se han encontrado incrementadas en espondilartrosis [96] y EAE [97]. También se ha



observado otra población de linfocitos B reguladores con la capacidad de secretar TGF $\beta$  dentro de la población B1a, las cuales son capaces de inducir la generación de Tregs en ganglios hiliares pulmonares [98]. Recientemente, se encontró una población de células CD19+ CD5+ Foxp3+ dentro de las células mononucleares de sangre periférica en humanos, aunque las características y función de esta población aún no ha sido descrita [99].

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los linfocitos T reguladores son importantes para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica ya que están implicados en la tolerancia periférica hacia linfocitos autorreactivos, los cuales pueden ocasionar enfermedades autoinmunes, participar en la tolerancia materno-fetal, hacia trasplantes, hacia antígenos de la dieta y del ambiente, así como en la contracción de la respuesta inmune. En todos estos casos, la presencia de las Treg es benéfica, pero también su presencia puede ser perjudicial como lo es en la respuesta inmune hacia células cancerígenas en donde permiten el establecimiento del tumor, o durante la respuesta inmune esterilizante hacia algún patógeno en la que no permiten su eliminación del organismo. Es por ello que la manipulación de esta población celular puede ser de gran importancia clínica, ya que así estas células podrían ser usadas como terapia hacia diversos tipos de patologías, ya sea favoreciendo o inhibiendo su inducción, o por la modificación de su capacidad supresora (aumentándola o inhibiéndola).

CD5 es un regulador negativo de las señales del TCR y juega un papel importante en la supervivencia celular. De igual manera se ha observado que está implicado en diferentes mecanismos de tolerancia inmunológica. Con respecto a las Treg se sabe que en el ratón CD5KO hay un incremento de esta población en timo y periferia y que estas células presentan una mejor capacidad supresora; sin embargo, no se conoce el papel de CD5 en la inducción de Tregs. De manera interesante, el ratón deficiente de CD5 mostró un incremento en la población CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup> la cual pudiera tratarse de células T reguladoras inducidas, aunque no se profundizó en dicho aspecto. Es por ello, que el estudio del efecto que podría tener CD5 en la generación de Tregs inducidas es de gran relevancia para entender el papel que esta molécula puede tener en el mantenimiento de la tolerancia.

### **3. HIPÓTESIS**

El bloqueo de CD5 modificará la señalización transducida en respuesta a la activación del TCR, lo cual afectará la generación de linfocitos T reguladores *in vitro*.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general**

❖ Estudiar el efecto que tiene el bloqueo CD5 en la inducción de linfocitos T reguladores *in vitro*.

#### **4.2. Objetivos particulares**

❖ Analizar el efecto que tiene la proteína recombinante soluble humana de CD5 (rshCD5) sobre la inducción de linfocitos Tregs *in vitro*.

❖ Analizar el efecto que tiene el anticuerpo anti-CD5 ( $\alpha$ -CD5) sobre la inducción de linfocitos Tregs *in vitro*.

❖ Determinar los niveles de fosforilación de c-Cbl y Erk cuando se estimulan con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD5 linfocitos T en presencia de rshCD5.

❖ Determinar los niveles de fosforilación de c-Cbl y Erk cuando se estimulan con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD5 linfocitos T en presencia de  $\alpha$ -CD5.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Materiales**

#### **5.1.1 Reactivos**

Todos los reactivos y soluciones se encuentran en el Anexo A. Reactivos y soluciones.

#### **5.1.2 Animales**

Se utilizaron ratones Balb/c (cepa silvestre) y deficientes de CD5 (CD5KO) de 5-10 semanas. Todos los animales utilizados se mantuvieron en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, con acceso a alimento y agua *at libitum* hasta el día del sacrificio.

Los ratones deficientes de CD5 (CD5KO) fueron donados por el Dr. Chander Raman de la Universidad de Alabama en Birmingham, Los ratones Balb/c fueron comprados a la empresa Harlan.

Los experimentos realizados incluyen datos obtenidos de grupos de ratones de al menos 3 individuos.

En todos los procedimientos realizados, que involucraron la participación de animales de experimentación se siguió la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999

## **5.2. Métodos.**

### **5.2.1 Tipaje de Ratones**

Para la identificación de los ratones deficientes de CD5 se realizó una tinción con anticuerpos de superficie.

Una vez que los ratones fueron destetados (3-4 semanas de edad) se realizaron muescas en las orejas para su identificación y se obtuvieron de 3 a 5 gotas de sangre por vía intraocular.

A la sangre obtenida se le adicionó 1mL de PBS 1x, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 2000 revoluciones por minuto (rpm) por 5 min, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 500  $\mu$ L de ACT para la lisis de los eritrocitos, se incubaron por 10 min a temperatura ambiente (aprox. 25°C) y una vez transcurrido ese tiempo se centrifugó a 2000 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante, se resuspendieron en el volumen residual y se tomaron 50  $\mu$ L de la suspensión celular, los cuales se colocaron en una placa de 96 pozos (así para cada ratón).

La placa de 96 pozos se centrifugó a 3000 rpm por 1 min, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 50  $\mu$ L de la dilución de anticuerpos  $\alpha$ -CD4-APC,  $\alpha$ -CD5-PE (1/300 y 1/200 respectivamente, en Buffer de FACS).

Se incubó la placa por 20 minutos a 4°C en obscuridad, una vez terminado el tiempo de tinción, se adicionaron 100  $\mu$ L de Buffer de FACS, se centrifugó la placa de 96 pozos a 3000 rpm por 1min y se decantó el sobrenadante. Las células fueron fijadas en 200  $\mu$ L de paraformaldehído al 4%.

Las muestras se leyeron en el citómetro Attune (Life Technologies) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

### **5.2.2. Obtención de Células.**

Los ganglios inguinales, axilares, cervicales y el bazo de los ratones Balb/c de 5-10 semanas de edad, fueron extraídos quirúrgicamente y recuperados en cajas Petri de 35mmx10mm con 2 mL de RPMI 10% a 4°C. El tejido se disgregó mecánicamente utilizando 2 membranas de nylon de 50  $\mu$ m (sumergidas en RPMI 10%) con ayuda de un émbolo de jeringa.

Las células obtenidas de bazo, una vez disgregadas, se recuperaron en un tubo Falcon de 15 mL, la cajas Petri fueron lavadas con 1 mL de RPMI 10% y el volumen se adicionó al tubo Falcon; posteriormente fueron centrifugadas a 2000 rpm por 5 min y se aspiró el sobrenadante. Se adicionó 1 mL de ACT, se incubó por 8 min a T.A. Finalizado este tiempo se adicionaron 10 ml de PBS 1x y se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. Las células se lavaron una vez más con 10 mL de PBS1x. Una vez lavadas las células el botón celular se resuspendió en 500  $\mu$ L de la combinación de anticuerpos para realizar la separación magnética de las células (ver sección 5.2.3).

Por otro lado las células obtenidas de ganglio, una vez disgregadas, se recuperaron en un tubo Falcon de 15 mL, las cajas Petri se lavaron 2 veces con 1 mL de RPMI 10%, las células recuperadas en los lavados se adicionaron al tubo Falcon y se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min. El botón celular se resuspendió en 500  $\mu$ L de la combinación de anticuerpos para realizar la separación magnética de las células (ver sección 5.2.3).

### **5.2.3. Separación magnética de las células/Selección de Linfocitos T vírgenes**

Para separar los linfocitos vírgenes del resto de las células encontradas en bazo y ganglios, las células obtenidas de estos organos se resuspendieron en 500  $\mu$ L de la combinación de anticuerpos  $\alpha$ -CD4-APC,  $\alpha$ -CD25-FITC,  $\alpha$ -CD44-PE y  $\alpha$ -CD62L-biotina (previamente diluidos en RPMI 10%, diluciones 1/300, 1/100, 1/200 1/150 respectivamente). Se incubaron por 20 min a 4°C en oscuridad, una vez transcurrido este tiempo se adicionó 1 mL de RPMI 10% y se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante.

El botón celular se resuspendió en 500  $\mu$ L de steptavidina-Cy5 en RPMI 10%, se incubó por 20 min a 4°C en oscuridad, a continuación se adicionó 1 mL de RPMI 10% y se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. Se resuspendió el botón celular en 1 mL de PBS 1x y se filtró a través de una membrana de nylon de 50  $\mu$ m.

Las células vírgenes fueron separadas electromagnéticamente tomando como región las células CD4+ CD25- CD44<sup>lo</sup> y CD62L<sup>hi</sup>. Se recibieron en tubos Falcon de 15 mL con RPMI 10%. Para este proceso se utilizó el citómetro FACS Aria II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

### **5.2.4. Cultivo/Inducción de Células T Regulatoras.**

#### **5.2.4.1. Sensibilización de placas**

Para el estímulo de las células vírgenes separadas anteriormente, placas de cultivo de 48 pozos fueron sensibilizadas para el Control de activación óptima (Fig17) con 250  $\mu$ L de anticuerpo cabra anti-syrian hámster (10  $\mu$ g/mL) en Buffer de Carbonatos (pH9.0) a 37°C por 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo, los pozos se lavaron 2 veces con 300 $\mu$ L de PBS

1x y se adicionaron 250  $\mu$ L de una combinación de anticuerpos puros  $\alpha$ -CD3 (5  $\mu$ g/mL) y  $\alpha$ -CD28 (5  $\mu$ g/mL) diluidos en PBS 1x.

En el resto de los pozos, correspondientes a las diferentes condiciones de estimulación, se adicionaron 250  $\mu$ L de una dilución  $\alpha$ -CD3 (10 $\mu$ g/mL) en Buffer de Carbonatos. Se incubó la placa a 37°C por 1 h, transcurrido este tiempo los pozos se lavaron 2 veces con 300  $\mu$ L de PBS1x, se adicionaron 300  $\mu$ L de PBS 1x y se guardaron las placas a 4°C hasta su uso.

Nota: La sensibilización de las placas se realizó antes de obtener las células de ratón

#### **5.2.4.2. Cultivo Celular**

Una vez obtenidos los linfocitos vírgenes, se prepararon los estímulos con los cuales serían cultivadas las células.

Una vez preparados los estímulos, las células se centrifugaron a 2000 rpm por 5min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en la cantidad de RPMI 10% adecuada para obtener una densidad de 1.5-2 millones de células por mL.

Se colocaron 750 $\mu$ L de la suspensión celular en un tubo Eppendorf (así para cada estímulo) y se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular el 750  $\mu$ L del estímulo correspondiente. Se colocaron 250  $\mu$ L en el pozo correspondiente (placas de 48 pozos previamente sensibilizadas). Las células se incubaron por 5 días a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>



<b>Estímulo</b>	<b>Componentes</b>
Control de Activación	NA
Control Subóptimo	Anti-CD28 puro (2µg/mL)
TGFβ	Anti-CD28 puro (2µg/mL) TGFβ (5ng/mL)
rsh CD5 1µg/mL	Anti-CD28 puro (2µg/mL) TGFβ (5ng/mL) Proteína recombinante humana soluble CD5 (rshCD5) (1µg/mL)
rsh CD5 3µg/mL	Anti-CD28 puro (2µg/mL) TGFβ (5ng/mL) rshCD5 (3µg/mL)
rsh CD5 5µg/mL	Anti-CD28 puro (2µg/mL) TGFβ (5ng/mL) rshCD5 (5µg/mL)
anti-CD5	Anti-CD28 puro (2µg/mL) TGFβ (5ng/mL) Anti-CD5 puro (5µg/mL)

Tabla 2. Estímulos usados para la inducción de Células T reguladoras *in vitro*. \*Todos los estímulos se preparan en RPMI10%

Cada experimento se realizó con un "pool" de células de 3 ratones, con los cuales se puso triplicado de cada estímulo, según la Fig17.

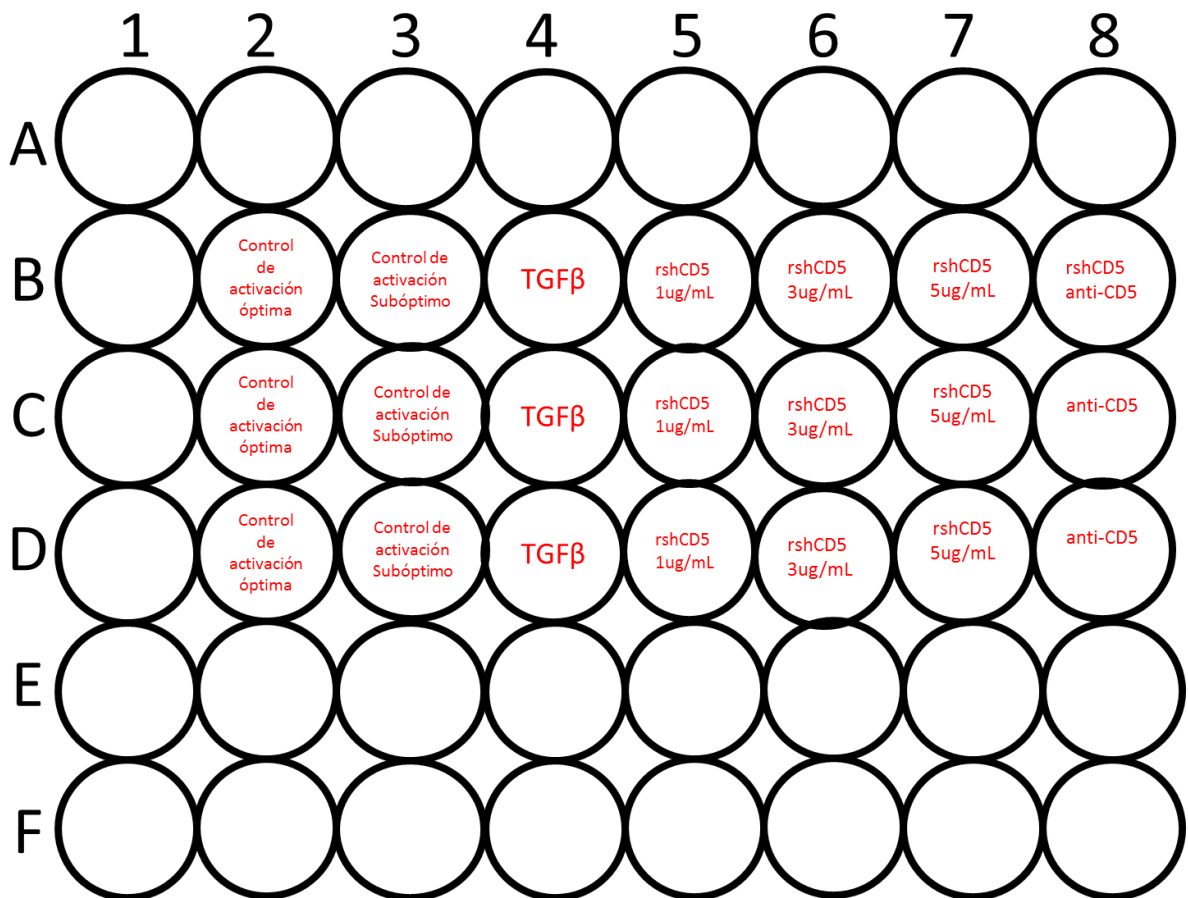


Fig17. Esquema de cultivo con los diferentes estímulos en placas de 48 pozos.

### 5.2.5. Tinción Intracelular de Foxp3.

Para evaluar la inducción de linfocitos T reguladores *in vitro*, una vez transcurridos los 5 días de cultivo las células fueron recuperadas de las placas de 48 pozos y fueron transferidas a placas de 96 pozos, asegurándose de despegar todas las células del fondo de la placa de 48 pozos. Fueron centrifugadas a 3000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante.

El botón celular se resuspendió en 50  $\mu$ L de una dilución de anticuerpos  $\alpha$ -CD4-PE y  $\alpha$ -CD25-FITC en RPMI 10% (1/200 y 1/100 respectivamente). Se incubaron por 20 min a 4°C en oscuridad. Una vez transcurrido ese tiempo se adicionaron 100  $\mu$ L de RPMI 10% y se centrifugaron a 3000 rpm

por 1min, se descartó el sobrenadante. Las células fueron lavadas con 150  $\mu$ L de Buffer de FACS, se centrifugaron a 3000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante.

El botón celular se resuspendió en 150  $\mu$ L de Fix/Perm Buffer 1x, y se incubaron por 2h a 4°C en oscuridad. Una vez terminada la incubación se centrifugaron las células a 3000 rpm por 1 min y descartó el sobrenadante. Las células se lavaron con 200  $\mu$ L de Buffer de FACS una vez y posteriormente se lavaron una vez con 150  $\mu$ L de Perm Buffer 1x.

El botón celular se resuspendió en 30  $\mu$ L de una dilución del anticuerpo  $\alpha$ -Foxp3-APC 1/50 en Perm Buffer 1x. Se incubaron por 30 min a 4°C en oscuridad, transcurrido el tiempo se adicionaron 150  $\mu$ L de Perm Buffer 1x, se centrifugaron a 3000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante.

Las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de PBS 1x y se leyeron en el citómetro Attune (Life Technologies) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

#### **5.2.6. Tinción intracelular de c-Cbl fosforilado**

Para evaluar el efecto que tenía el colocar rshCD5 o  $\alpha$ -CD5 en el cultivo, los ganglios inguinales, axilares y cervicales de ratones Balb/c o CD5KO de 5-10 semanas de edad, fueron extraídos quirúrgicamente y recuperados en cajas Petri de 35mmx10mm con 1 mL de RPMI 10% a 4°C. El tejido se disgregó mecánicamente utilizando 2 membranas de nylon de 50  $\mu$ m (sumergidas en RPMI 10%) con ayuda de un émbolo de jeringa.

Las células obtenidas de ganglio, una vez disgregadas, se recuperaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, las cajas Petri se lavaron con 500  $\mu$ L de RPMI 10% y se adicionaron al tubo Eppendorf, se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el

botón celular en 1 mL de RPMI 10%. Se contaron las células viables (método azul de tripano).

Se colocaron  $12 \times 10^6$  células provenientes de ratones Balb/c en 3 tubos y  $12 \times 10^6$  células provenientes de ratones CD5KO en 1 tubo Eppendorf, se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 500  $\mu$ L del estímulo correspondiente. Ver tabla 3.

<b>Tubo</b>	<b>Ratón</b>	<b>Estímulo</b>
<b>1</b>	Balb/c	RPMI10%
<b>2</b>	Balb/c	rshCD5 (5 $\mu$ g/mL)
<b>3</b>	Balb/c	$\alpha$ -CD5 (5 $\mu$ g/mL)
<b>4</b>	CD5KO	RPMI 10%

Tabla 3. Estímulos usados para la incubación de las células.

Una vez resuspendidas las células fueron transferidas a placas de 48 pozos y se cultivaron por 1h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se recuperaron las células a tubos Eppendorf, se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min para quitar los estímulos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 500  $\mu$ L de la dilución de tinción superficial  $\alpha$ -CD4 Cy5,  $\alpha$ -CD8 PE,  $\alpha$ -CD25 FITC (1/200, 1/200, 1/100 respectivamente, en RPMI al 0.2%).

Las células se incubaron por 20 min a 4°C en obscuridad una vez transcurrido el tiempo se adicionó 1 mL de RPMI 0.2%, se centrifugó a 2000 rpm y se descartó el sobrenadante, cada botón celular se resuspendió en 600  $\mu$ L de RPMI 0.2% y se transfirieron a tubos de FACS en el siguiente orden:

<b>Tubo Eppendorf</b>	<b>Tubo FACS</b>
<b>1→ Ratón Balb/c incubación RPMI 10%</b>	a) Sin Estímulo
	b) $\alpha$ -CD3 (10 $\mu$ g/mL)
	c) $\alpha$ -CD3 (10 $\mu$ g/mL) $\alpha$ -CD5 (10 $\mu$ g/mL)
	d) Pervanadato
<b>2→ Ratón Balb/c Incubación rshCD5 (5<math>\mu</math>g/mL)</b>	a) Sin Estímulo
	b) $\alpha$ -CD3 (10 $\mu$ g/mL)
	c) $\alpha$ -CD3 (10 $\mu$ g/mL) $\alpha$ -CD5 (10 $\mu$ g/mL)
	d) Pervanadato
<b>3→ Ratón Balb/c Incubación <math>\alpha</math>-CD5 (5<math>\mu</math>g/mL)</b>	a) Sin Estímulo
	b) $\alpha$ -CD3 (10 $\mu$ g/mL)
	c) $\alpha$ -CD3 (10 $\mu$ g/mL) $\alpha$ -CD5 (10 $\mu$ g/mL)
	d) Pervanadato
<b>4→ Ratón CD5KO Incubación RPMI 10%</b>	a) Sin Estímulo
	b) $\alpha$ -CD3 (10 $\mu$ g/mL)
	c) $\alpha$ -CD3 (10 $\mu$ g/mL) $\alpha$ -CD5 (10 $\mu$ g/mL)
	d) Pervanadato

Tabla4. Protocolo de estimulación para pc-Cbl.

Los tubos se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 100  $\mu$ L de los estímulos correspondientes (Tabla 5).

<b>Estímulo</b>	<b>Característica</b>
<b>a) Sin Estímulo</b>	100 $\mu$ L de RPMI 10%
<b>b) <math>\alpha</math>-CD3</b>	100 $\mu$ L de $\alpha$ CD3 10 $\mu$ g/mL en RPMI 0.2% + 2 $\mu$ L streptavidina (20 $\mu$ g/mL)
<b>c) <math>\alpha</math>CD3 + <math>\alpha</math>-CD5</b>	100 $\mu$ L de $\alpha$ CD3 10 $\mu$ g/mL y $\alpha$ -CD5 10 $\mu$ g/mL en RPMI 0.2% + 2 $\mu$ L streptavidina (20 $\mu$ g/mL)
<b>d) Pervanadato</b>	90 $\mu$ L de RPMI 0.2% + 10 $\mu$ L de Pervanadato 1mM

Tabla 5. Componentes de cada uno de los estímulos para el protocolo de estimulación de pc-Cbl.

Las células se estimularon a 37°C por 5 min. Transcurrido este tiempo se adicionaron 300  $\mu$ L de Lyse/Fix 1x y se incubaron por 10 min más, posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min, se descartó sobrenadante y se lavaron con 1mL de Buffer de FACS.

Los botones celulares se resuspendieron en 100  $\mu$ L de Perm Buffer y se incubaron a 4°C por 20 min. Una vez terminada la incubación se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min, las células se lavaron dos veces más con Buffer de FACS. Se descartó el sobrenadante, se resuspendieron en el volumen residual y se adicionaron 5  $\mu$ L de  $\alpha$ -pc-Cbl Alexa 647. Se incubó por 30 min a 4°C en oscuridad.

Posterior a la incubación se adicionó 1 mL de buffer de FACS a cada tubo y se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min. Las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de paraformaldehído al 0.5% y se leyeron en el citómetro Attune (Life Technologies) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

### **5.2.7. Tinción intracelular de Erk fosforilado**

La obtención de células y separación de linfocitos vírgenes se hizo como se menciona en los apartados 5.2, 5.3 y 5.4 a diferencia que el cultivo de las células sólo se hizo por 24 h.

Posterior a las 24 h las células se recuperaron y se pasaron a placas de 96 pozos, se centrifugaron a 3000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante, posteriormente se resuspendieron en 50  $\mu$ L de una dilución de anticuerpos  $\alpha$ -CD4 PE,  $\alpha$ -CD25 FITC (1/200 y 1/100 respectivamente en RPMI 0.2%), se incubaron por 20 min a 4°C en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se adicionaron 150  $\mu$ L de RPMI 0.2%, se centrifugó a 3000 rpm y se descartó el sobrenadante.

Las células se resuspendieron en 50  $\mu$ L de RPMI 0.2% a 37°C, se adicionaron 150  $\mu$ L de Lyse/Fix 1x y se incubaron por 10 min a 37°C. Terminada la incubación se centrifugaron a 3000 rpm por 1 min, se lavaron las células con Buffer de FACS y se resuspendieron en 100  $\mu$ L de Perm Buffer, se incubó por 20 min a 4°C, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante, las células se lavaron en 2 ocasiones con 200  $\mu$ L de buffer de FACS.

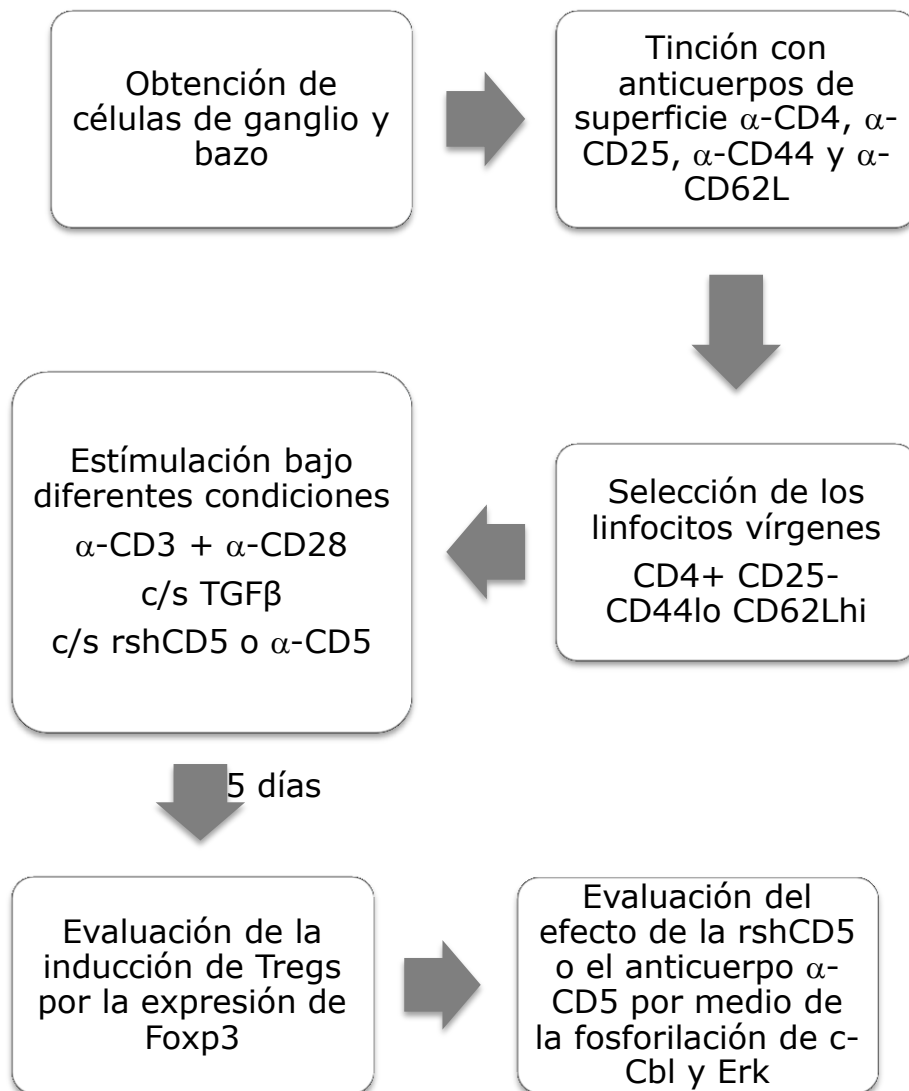
El botón celular se resuspendió en el volumen residual y se adicionaron 5  $\mu$ L del anticuerpo  $\alpha$ -pErk Alexa 647, se incubaron por 30 min a 4°C en oscuridad. Posterior a la incubación se adicionó 1 mL de buffer de FACS a cada tubo y se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min.

Las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de paraformaldehído al 0.5% y se leyeron en el citómetro Attune (Life Technologies) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

### 5.2.8 Análisis Estadístico

Los datos experimentales fueron expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Las diferencias estadísticas entre los grupos se calcularon de una prueba t de Student pareada de dos colas. Los valores menores a  $p \leq 0.05$  implicaron un rechazo de la hipótesis nula ( $H_0$ ) y por tanto, indican que existe una diferencia significativa estadísticamente entre los grupos con al menos un 95% de confianza.

### 5.2.9 Diagrama de flujo





## 6. RESULTADOS

### 6.1. Tipaje de Ratones

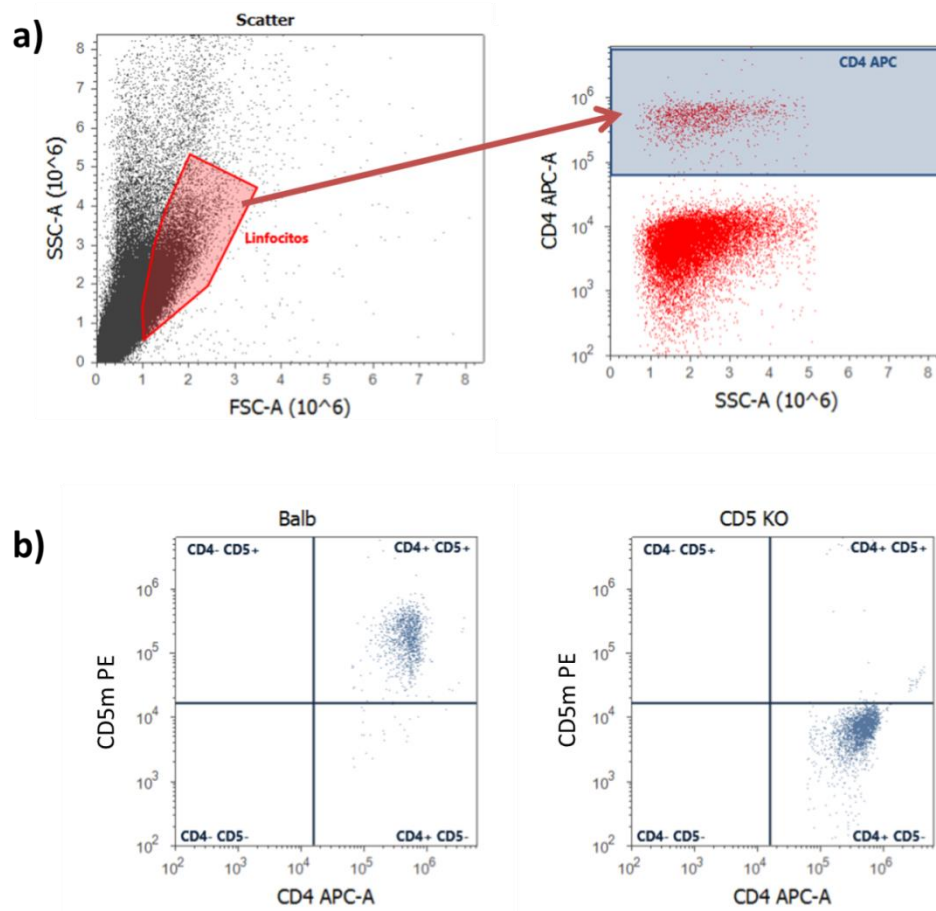


Fig18. Resultado del análisis por medio de citofluorometría del tipaje de ratones CD5 KO. **a)** Regiones utilizadas para el análisis **b)** Expresión de CD5.

En la figura 18a del lado izquierdo se muestra un diagrama de puntos en el cual se representa el tamaño de las células (FSC) contra la granularidad de las mismas (SSC). De esta gráfica se selecciona la población correspondiente a los linfocitos para posteriormente analizar la expresión de CD4 en estas células (lado derecho). El análisis de la expresión de la glicoproteína CD5 se hizo sobre la región de linfocitos T CD4+ (Fig18b). Debido a que las mutaciones realizadas para la

La primera gráfica de la Fig19. (superior izquierda) representa el tamaño y granularidad de las células, de donde se seleccionó la región de linfocitos vivos; posteriormente en un diagrama de puntos donde se grafica la presencia de CD25 contra la de CD4 se tomaron los linfocitos que expresaban CD4 pero no CD25 (CD4+ CD25-), a partir de esta población se analizó la expresión del marcador CD44, seleccionando sólo aquellos linfocitos que expresaban niveles bajos de esta proteína, para por último observar el marcador CD62L y tomar sólo aquellos que tuvieran altos niveles de expresión, por lo que la población separada tenía como característica ser CD4+ CD25- CD44lo CD62Lhi, lo cual nos garantiza que se están seleccionando linfocitos vírgenes, correspondiente a aproximadamente el 14% de la población encontrada en bazo y ganglio.

### **6.3. Inducción de Células T reguladoras**

La Figura 20 representa las células analizadas después de 5 días en cultivo bajo las condiciones mencionadas en la tabla 2. El inciso **a)** representa el control de activación óptimo ( $\alpha$ -CD3 5 $\mu$ g/mL +  $\alpha$ -CD28 5 $\mu$ g/mL), **b)** control de activación subóptimo ( $\alpha$ -CD3 10 $\mu$ g/mL +  $\alpha$ -CD28 2 $\mu$ g/mL), **c)** TGF $\beta$  ( $\alpha$ -CD3 10 $\mu$ g/mL +  $\alpha$ -CD28 2 $\mu$ g/mL + TGF $\beta$  5ng/mL), **d)** rshCD5 1 $\mu$ g/mL ( $\alpha$ -CD3 10 $\mu$ g/mL +  $\alpha$ -CD28 2 $\mu$ g/mL + TGF $\beta$  5ng/mL + rshCD5 1 $\mu$ g/mL), **e)** rshCD5 3 $\mu$ g/mL ( $\alpha$ -CD3 10 $\mu$ g/mL +  $\alpha$ -CD28 2 $\mu$ g/mL + TGF $\beta$  5ng/mL + rshCD5 3 $\mu$ g/mL), **f)** rshCD5 5 $\mu$ g/mL ( $\alpha$ -CD3 10 $\mu$ g/mL +  $\alpha$ -CD28 2 $\mu$ g/mL + TGF $\beta$  5ng/mL + rshCD5 5 $\mu$ g/mL), **g)**  $\alpha$ -CD5 ( $\alpha$ -CD3 10 $\mu$ g/mL +  $\alpha$ -CD28 2 $\mu$ g/mL + TGF $\beta$  5ng/mL +  $\alpha$ -CD5 5 $\mu$ g/mL).

Se utilizaron los anticuerpos  $\alpha$ -CD3 y  $\alpha$ -CD28 para simular la activación a través del TCR, Para favorecer la inducción de las Tregs en cultivo se adicionó TGF $\beta$  mientras que el rshCD5 así como el  $\alpha$ -CD5 se

agregaron al cultivo para investigar el efecto que tiene el bloqueo de CD5 en la inducción de las Tregs.

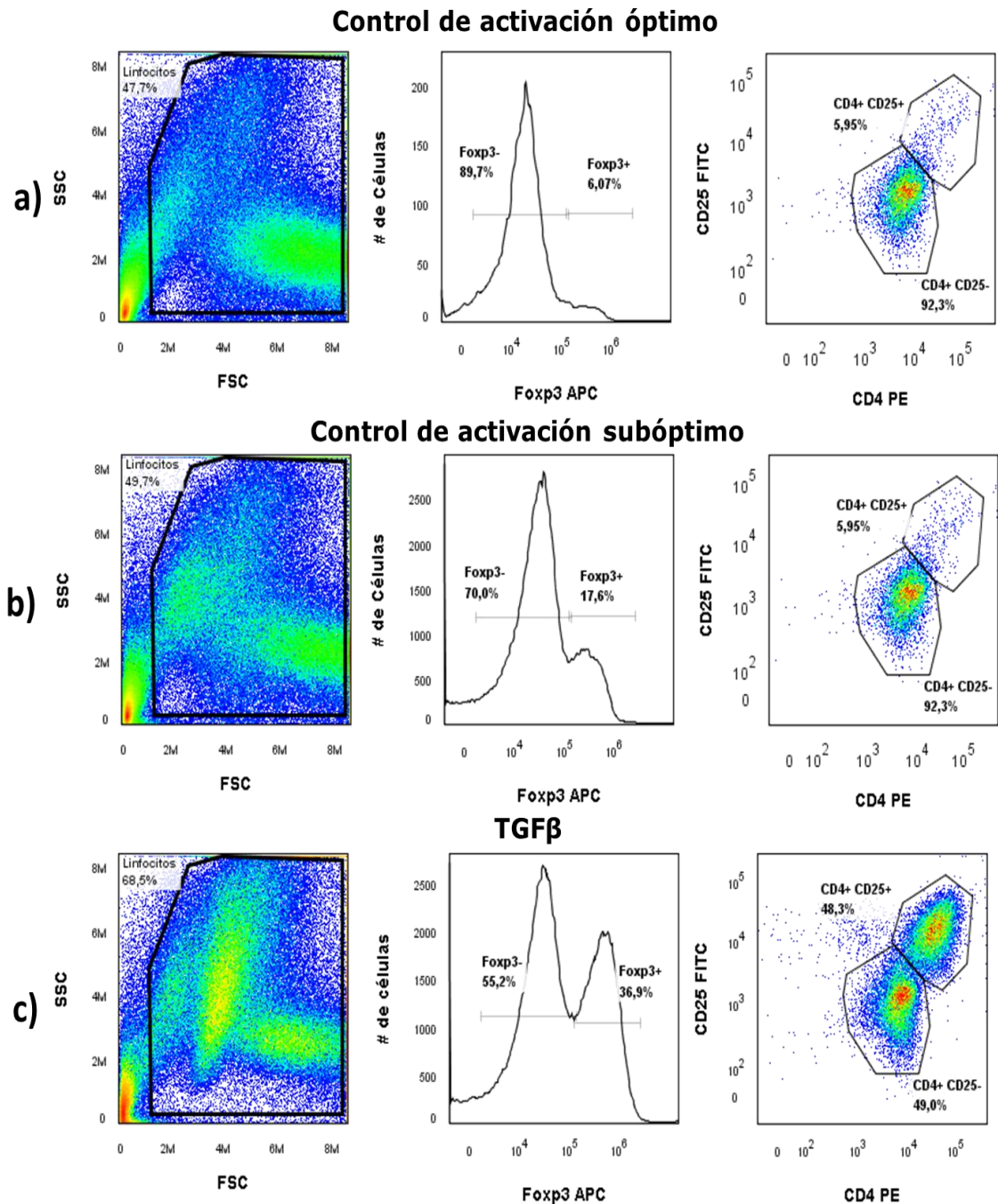


Fig20. Gráficas representativas que muestran la inducción de células T reguladoras in vitro. **a)** Control activación óptimo, **b)** Control de activación subóptimo, **c)** TGFβ, **d)** rshCD5 1µg/mL **e)** rshCD5 3µg/mL, **f)** rshCD5 5µg/mL **g)** α-CD5 5µg/mL.

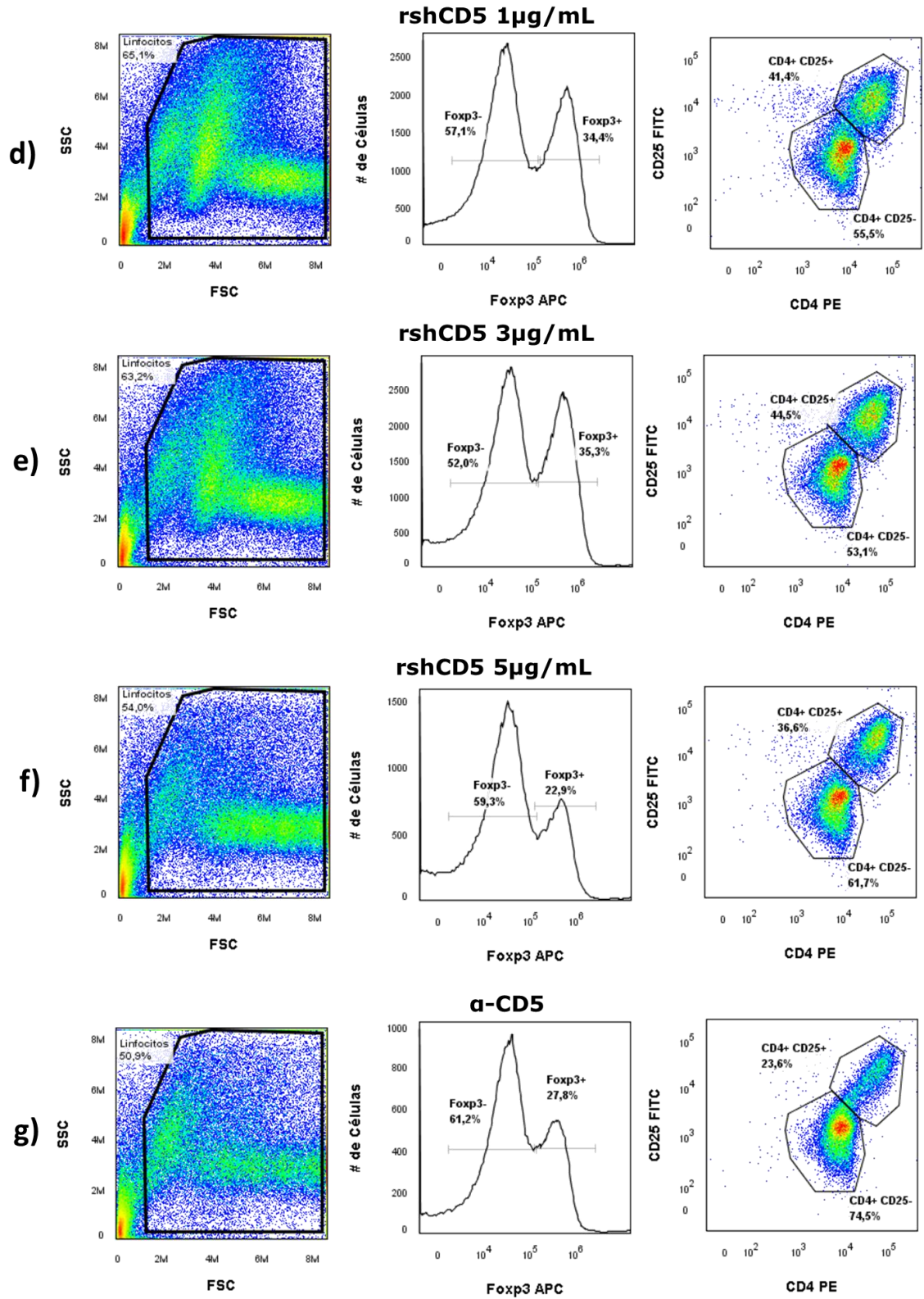


Fig20 (continuación). Conversión de células T reguladoras *in vitro*.

generación del ratón CD5KO no permiten su expresión, los anticuerpos  $\alpha$ -CD5 acoplados al fluorocromo PE no se unen a la parte extracelular del receptor y no emiten fluorescencia (lado derecho), a diferencia de los ratones Balb/c (lado izquierdo) en los que el anticuerpo se pega a CD5 y emite una fluorescencia, permitiéndonos distinguir ambos fenotipos.

## 6.2. Selección de Linfocitos T vírgenes.

Debido a que los linfocitos T reguladores inducidos se generan a partir de células vírgenes, se hizo una separación en base a marcadores de superficie para eliminar las células activadas de bazo y ganglios, así como las nTreg que se pudieran encontrar.

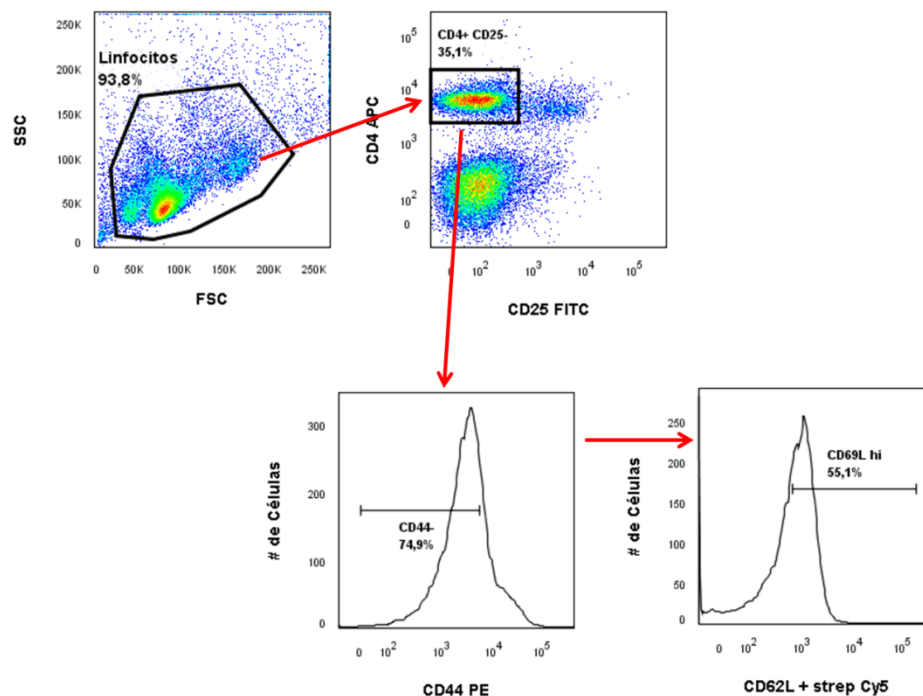


Fig19. Separación electromagnética de linfocitos vírgenes a partir de células de bazo y ganglios.

La gráfica de puntos de la izquierda (en cada estímulo) representa el tamaño y granularidad de las células en cultivo, de esta gráfica fueron seleccionados los linfocitos vivos. A partir de esta región se hizo el análisis de las células que expresaban el marcador Foxp3 por medio del anticuerpo específico acoplado al fluorocromo APC. En el histograma (imagen central de cada estímulo) se representa la intensidad de fluorescencia de Foxp3, que correlaciona con el nivel de expresión de esta molécula: el pico que se encuentra a la izquierda representa las células que no expresan este factor de transcripción, mientras que el pico del lado derecho a las que si lo hacen. Como se muestra en la figura, en los controles de activación existe un porcentaje bajo de células Foxp3+, el cual incrementa drásticamente en presencia de TGFβ. Estos porcentajes se mantienen cuando se adiciona rshCD5 a bajas concentraciones (1-3μg/mL), pero cuando se adiciona al cultivo rshCD5 5μg/mL o α-CD5 el porcentaje de células Foxp3+ disminuye significativamente.

Posteriormente se analizó la expresión de CD4 y CD25 dentro de los linfocitos Foxp3+, en la gráfica de puntos (derecha de cada estímulo) se observa que todas las células expresan CD4 y que la expresión de CD25 es variable dependiendo de las condiciones de cultivo, pero se identifican dos poblaciones mayoritarias: una con alta expresión (CD4+ CD25+) y otra con baja expresión (CD4+ CD25-). También se observa que la población CD4+ CD25+ incrementa en el cultivo con TGFβ, mientras que la población CD4+ CD25- lo hace en cultivos con rshCD5 5μg/mL o α-CD5.

La Figura 21 muestra el porcentaje de células a) Foxp3+ en la región correspondiente de linfocitos vivos, b) CD4+ CD25- y c) CD4+ CD25+, estos dos dentro de la región de linfocitos Foxp3+. Cada barra representa el promedio y el error estándar de cada una de las

condiciones de cultivo. El análisis es representativo de 6 experimentos de inducción a Treg. Como se puede apreciar en la figura, se observó una disminución significativa del porcentaje de linfocitos T Foxp3+ en los cultivos inducidos en presencia de TGFβ y rshCD5 μg/mL o α-CD5, respecto al control. De manera interesante el bloqueo de CD5 indujo una disminución de linfocitos T Foxp3 +CD4+ CD25+, pero un incremento de la población Foxp3+ CD4+ CD25- estadísticamente significativos comparados con el cultivo con TGFβ.

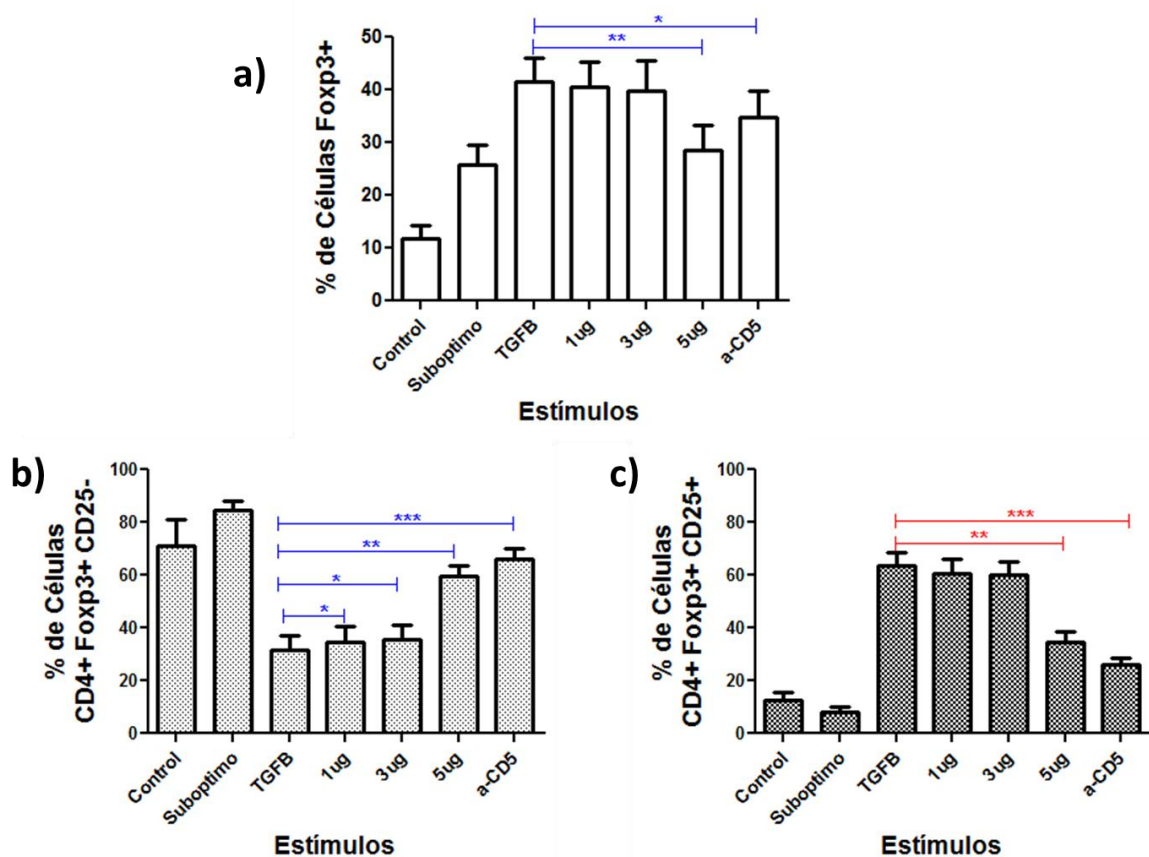


Fig21. Representación gráfica y análisis estadístico de la inducción a Tregs *in vitro*. **a)** Porcentaje de células Foxp3+ dentro de la región de linfocitos. Porcentaje de células **b)** CD4+ CD25- o **c)** CD4+ CD25+ dentro de la región Foxp3+.

## 6.4 Tinción intracelular de c-Cbl fosforilado.

Puesto que CD5 es un regulador de las señales del TCR, para poder analizar cuál es el mecanismo a través del cual la adición de rshCD5 o  $\alpha$ -CD5 a los cultivos causa un efecto en la inducción de Tregs *in vitro*, se analizó la fosforilación de c-Cbl, una molécula que se ha visto asociada a CD5 y que se postula podría estar involucrada en mediar la regulación negativa de las señales del TCR mediada por CD5

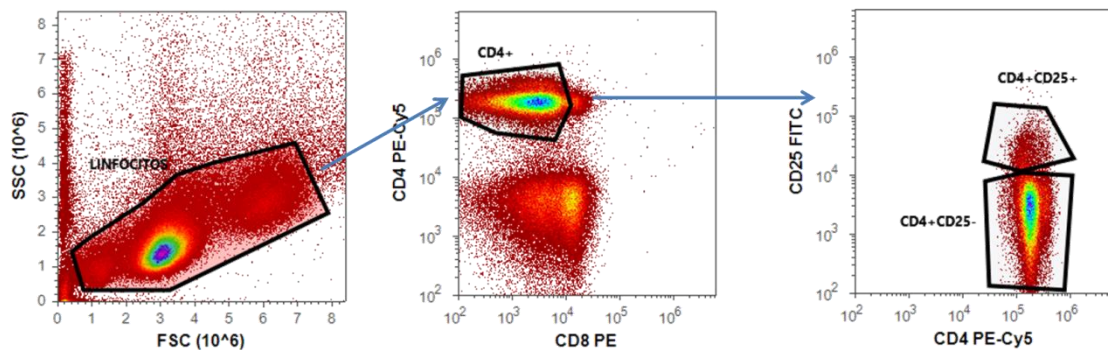


Fig22. Selección de las poblaciones en ganglios de ratones Balb/c y CD5KO

En la Figura 22 se muestra la selección de linfocitos vivos a partir de una gráfica de puntos de tamaño contra granularidad, de esta región se realizó otro diagrama de puntos de la expresión de CD4 contra CD8 acoplada a los fluorocromos PE-Cy5 y PE respectivamente. Como se puede ver en la figura (imagen central) la fluorescencia del fluorocromo PE es muy baja, sin embargo la población CD4, población de interés, puede ser identificada con facilidad. De la región CD4+ se analizó posteriormente la expresión de CD25 por medio del anticuerpo acoplado a FITC, lo cual permite diferenciar entre las subpoblaciones que expresan y las que no expresan CD25. El análisis de la fosforilación de c-Cbl (pc-Cbl) se hizo dentro de la población CD4 total, así como dentro de las dos subpoblaciones mencionadas.



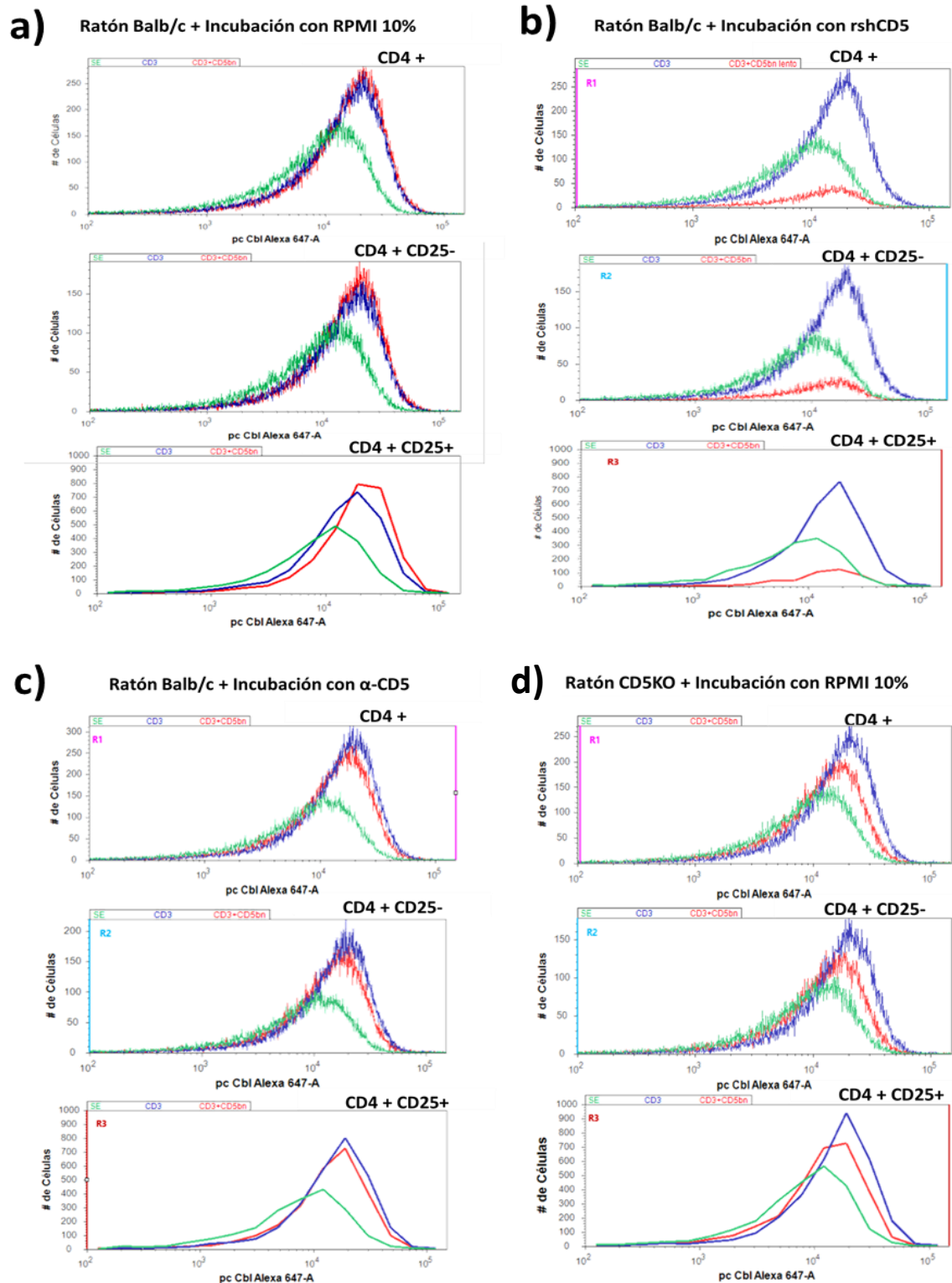


Fig23. Fosforilación de c-Cbl bajo distintas condiciones de cultivo, los histogramas verdes representan las células sin estímulo, azules el estímulo con  $\alpha$ -CD3 y los rojos el estímulo con  $\alpha$ -CD3+ $\alpha$ -CD5.

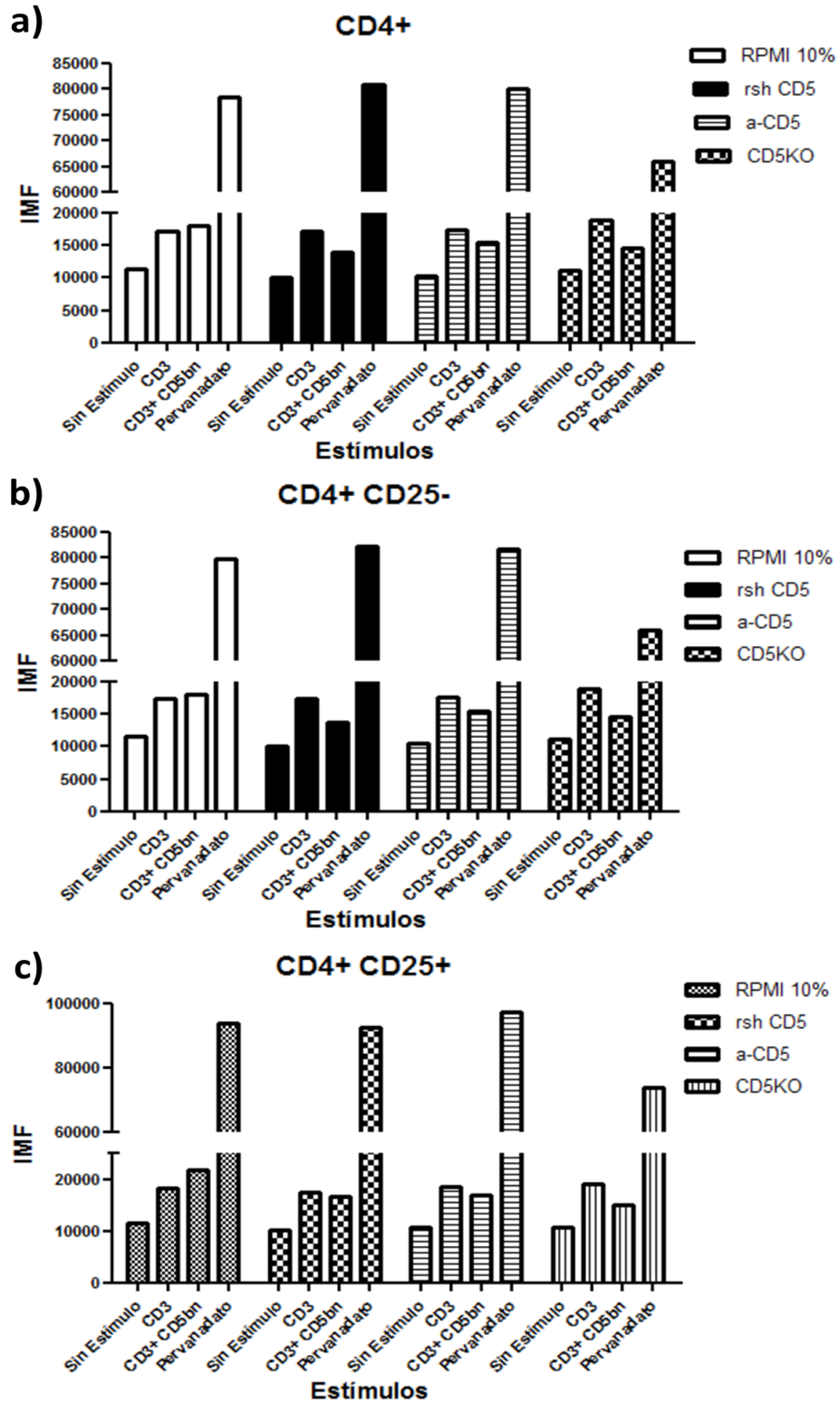


Fig24. Representación gráfica de la fosforilación de c-Cbl de la población **a) CD4+ b) CD4+ CD25- c) CD4+ CD25+**

En la Figura 23, se representa por medio de histogramas la detección de c-Cbl fosforilado por medio del anticuerpo acoplado al fluorocromo Alexa 647. Como control sin estímulo se utilizó RPMI 0.2% (histograma verde), el estímulo con  $\alpha$ -CD3 se realizó para simular la estimulación por el TCR (histograma azul), mientras que el estímulo con  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD5 se hizo para asemejar el reclutamiento de CD5 al TCR (histograma rojo). El corrimiento del histograma hacia la derecha representa un incremento en los niveles de c-Cbl fosforilado.

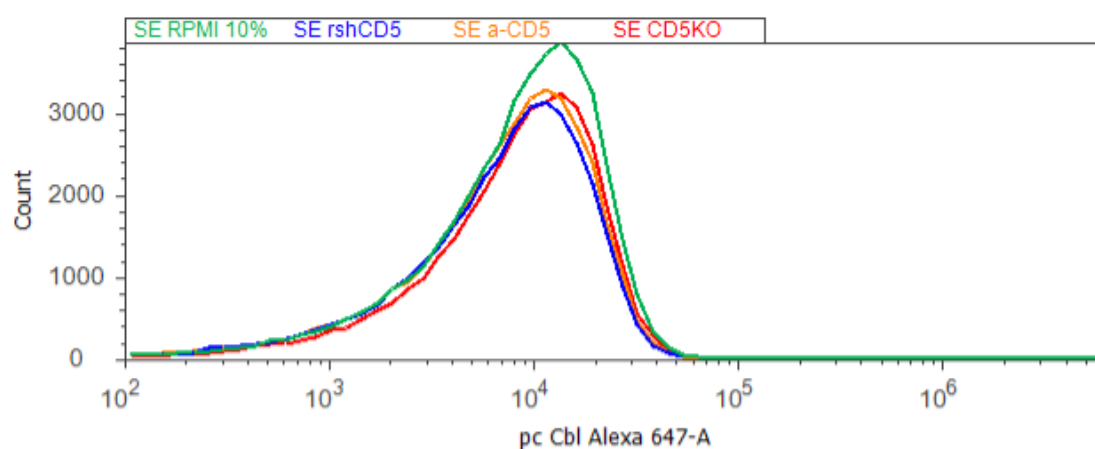


Fig25. Fosforilación basal de c-Cbl bajo las diferentes condiciones de cultivo. El histograma verde representa la incubación con RPMI10%, el azul con rshCD5, el amarillo con  $\alpha$ -CD5, mientras que el rojo representa al ratón CD5KO

En la Figura 24 se representa en forma de gráfica de barras la intensidad media de fluorescencia dada por el fluorocromo Alexa647, la cual se ve incrementada proporcionalmente a la cantidad de pc-Cbl presente. Como era de esperar en linfocitos T CD4+ y en células vírgenes (CD4+ CD25-) la coestimulación con CD5 incrementa ligeramente la fosforilación de c-Cbl, indicando que el entrecruzamiento con CD3 incrementa las señales del TCR. De manera interesante, el entrecruzamiento de CD3 + CD5 en presencia de rshCD5 o de  $\alpha$ -CD5 disminuye la fosforilación de cCbl comparado con  $\alpha$ -CD3 sólo, lo cual

sugiere que ambas moléculas solubles interfieren con la señalización mediada por CD5.

En la Figura 24 también se puede notar que la incubación tanto con rshCD5 así como con  $\alpha$ -CD5 disminuyen los niveles basales de pc-Cbl (representado en forma de histogramas en la Figura 25), así como que el estímulo con CD3 en todas las condiciones lleva a una fosforilación similar (misma intensidad de fluorescencia), mientras que el rshCD5 y el  $\alpha$ -CD5 ocasionan una disminución en los niveles de pc-Cbl cuando se estimula con  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD5 en comparación con el estímulo que se ve cuando las células son incubadas con RPMI 10%. También se puede observar que la incubación con rshCD5 o  $\alpha$ -CD5 semeja lo observado en el ratón CD5KO y que la población que más responde a los estímulos es la población CD4+ CD25+.

En la subpoblación CD4+ CD25+, que incluye células activadas y Tregs, el coestímulo  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD5 induce una mayor fosforilación de c-Cbl cuando se compara con  $\alpha$ -CD3 y el incremento en la fosforilación es mayor que el observado en células vírgenes. En esta subpoblación el bloqueo de CD5 con rshCD5 o  $\alpha$ -CD5, de manera similar a las células vírgenes, reduce el efecto coestimulador de CD5, lo cual también apoya que el bloqueo de CD5 inhibe la señalización mediada por esta glicoproteína.

De manera interesante se observó que en el ratón CD5KO el entrecruzamiento  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD5 reduce los niveles de c-Cbl fosforilado cuando se compara con el estímulo con  $\alpha$ -CD3 sólo, ya que este ratón no presenta una proteína a la cual se una el anticuerpo no se esperaba ningún efecto dado por este entrecruzamiento. El porque de este efecto se discute posteriormente.

## 6.5. Tinción intracelular de Erk fosforilado.

Con base a los resultados de la fosforilación de c-Cbl donde se vio que las condiciones de cultivo varían el estímulo que recibe la célula, se decidió analizar la fosforilación de Erk, una molécula de señalización que se activa en respuesta a las señales del TCR, pero ahora bajo las condiciones de cultivo utilizadas para la inducción de Tregs (sin TGF $\beta$ ). Los datos obtenidos para la separación de los linfocitos vírgenes se representan en la Figura 19.

La Figura 26a muestra la generación de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> a partir de linfocitos T vírgenes después de 24 horas de cultivo bajo las condiciones de inducción de Tregs. En esta figura se puede observar que el cultivo en condiciones de activación óptima incrementa la expresión de CD25 (marcador de activación temprana) en las células en alrededor de un 60% de los linfocitos T, mientras que el cultivo en condiciones de activación subóptima indujo solamente un incremento de CD25 en el 20% de los linfocitos. El bloqueo con rshCD5 o  $\alpha$ -CD5 en los cultivos logró un incremento de CD25 en alrededor del 25-27% de la población. Como era de esperarse las células que no tienen ningún estímulo no incrementan la expresión de este marcador de células activadas.

En la figura 26b se observa la representación gráfica del porcentaje de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>lo</sup> y CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> generadas tras 24 horas de cultivo bajo las condiciones de inducción de Tregs, pero en ausencia de TGF $\beta$ . Se puede observar que en el control de activación óptimo las células que predominan en el cultivo son CD25<sup>+</sup>, mientras que en las demás condiciones de cultivo lo hacen las CD25<sup>-</sup>; sin embargo, tanto con el cultivo con rshCD5 como con  $\alpha$ -CD5 se observa un ligero incremento de los linfocitos CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>.

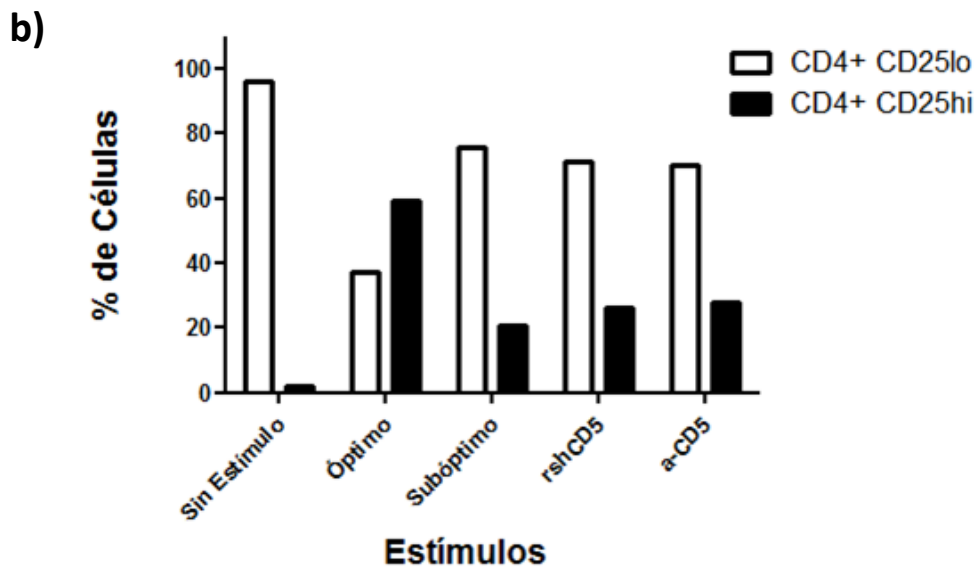
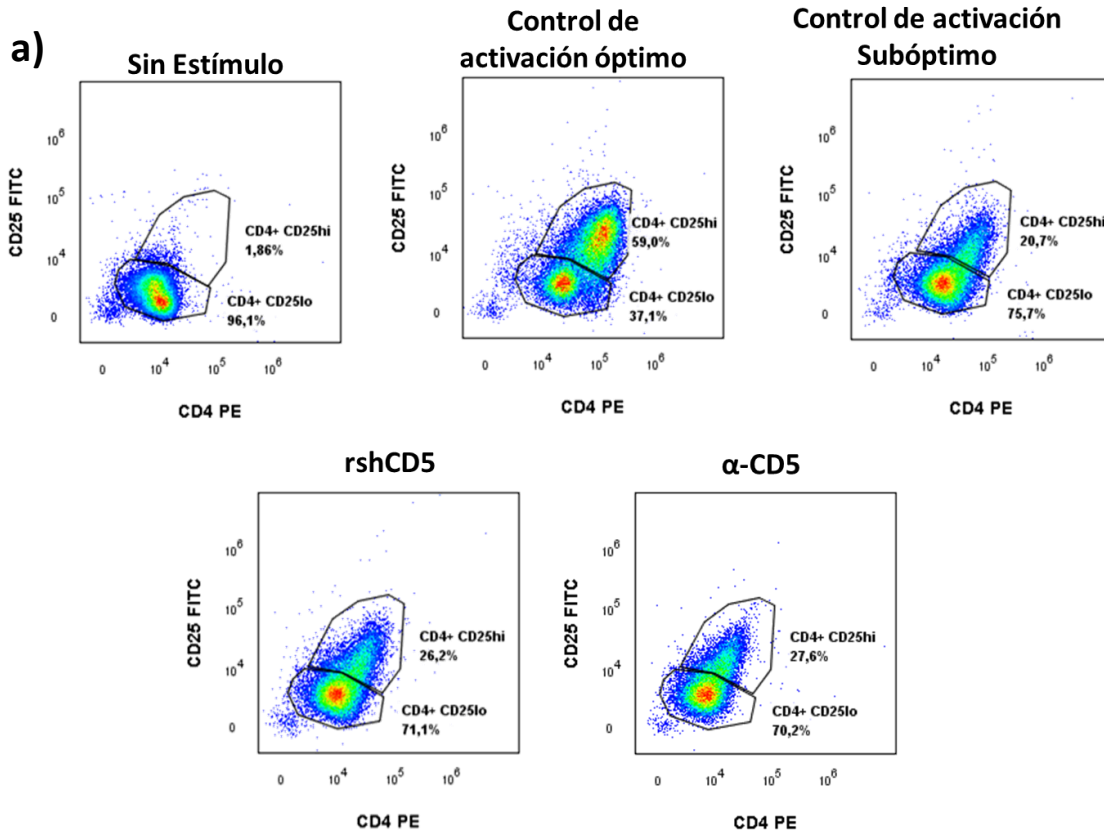


Fig26. Patrón de activación de linfocitos T vírgenes tras 24 horas de cultivo.

**a)** Gráfica de puntos de la expresión de CD4 contra la de CD25

**b)** Representación gráfica del patrón de activación de linfocitos vírgenes.

La figura 27 nos muestra los resultados de la fosforilación de Erk bajo las diferentes condiciones de cultivo, analizado en el total de linfocitos T CD4+ o por subpoblaciones CD4+ CD25hi o CD4+ CD25lo. Como se puede observar, en comparación con las células que fueron cultivadas en ausencia de estímulo (RPMI 10%) las células que fueron cultivadas bajo condiciones de activación óptima presentan un incremento significativo de la fosforilación de Erk, mientras que bajo condiciones de activación subóptima este incremento en la fosforilación no es tan grande. También se puede observar que cuando se adiciona el rshCD5 o  $\alpha$ -CD5 a condiciones subóptimas de activación la fosforilación de Erk se ve disminuida.

La presencia de dos picos en los histogramas de la figura 27 indican la existencia de dos poblaciones con niveles de fosforilación de Erk diferentes tanto en la población CD4+ como en la población CD4+ CD25lo, mientras que sólo se observa un pico en la población CD4+ CD25hi, lo que podría indicar que esta población es más homogénea. En la figura 27 no se graficó el histograma de la condición de cultivo sin estímulo en la población CD4+ CD25hi, puesto que en esta condición el porcentaje de esta población es casi imperceptible (figura 26a, extremo superior izquierdo).

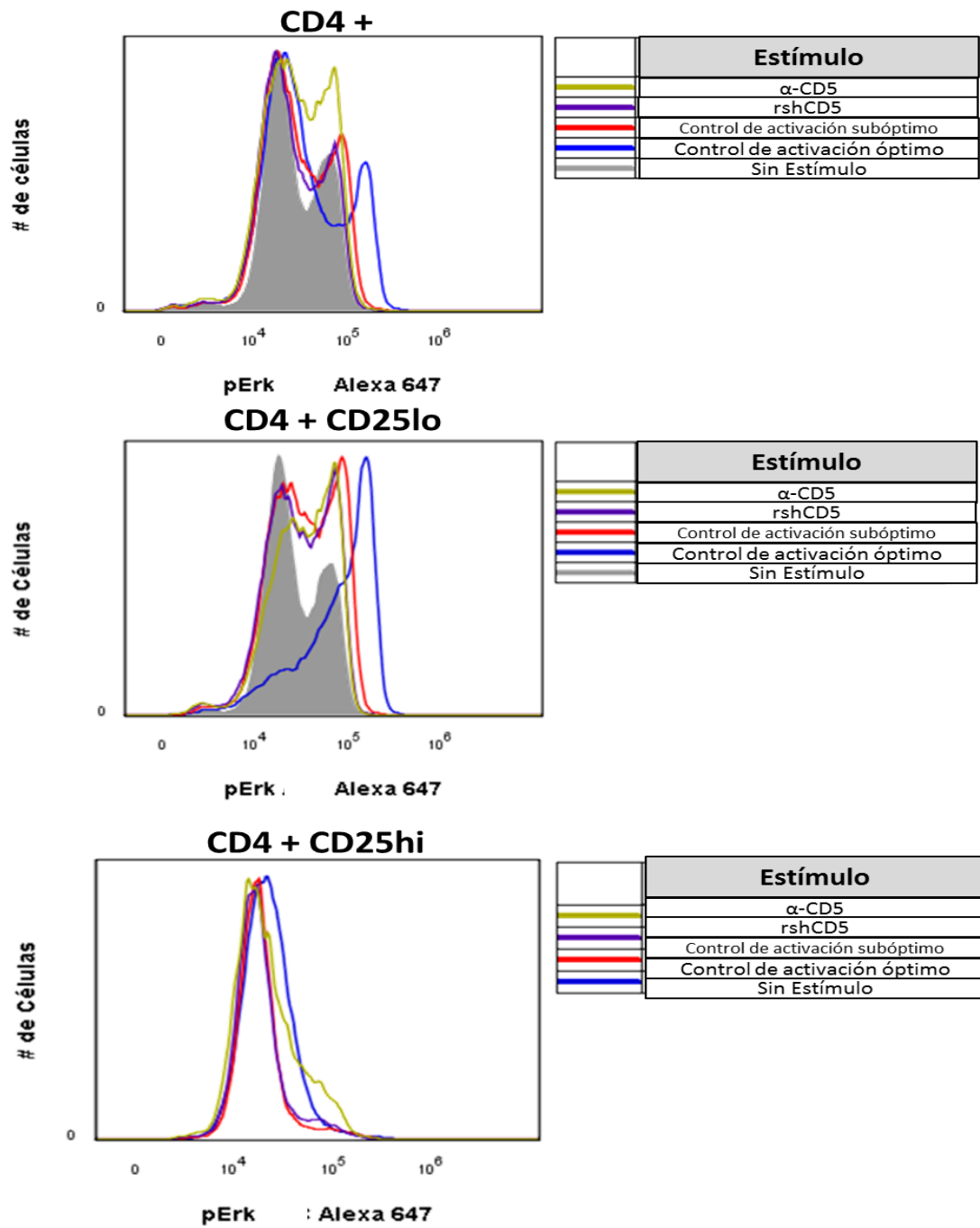


Fig27. Fosforilación de Erk después de 24 horas de cultivo bajo diferentes condiciones de estímulo. El cultivo sin estímulo se representa por histogramas grises, el control de activación óptimo de color rojo, el subóptimo azul, rshCD5 morado y  $\alpha$ -CD5 amarillo.



La Figura 28 nos muestra por medio de gráficas de barras la intensidad media de fluorescencia dada por la fosforilación de Erk. En esta gráfica, se puede observar que cuando se separa el análisis por subpoblaciones las células CD4+ CD25<sup>lo</sup> presentan una mayor incremento en los niveles de fosforilación de Erk, mientras que en la subpoblación CD4+ CD25<sup>hi</sup> los niveles de pErk son mucho más bajos y los incrementos no son tan notorios, pero que interesantemente dentro de esta población se ve un incremento de pErk cuando se adiciona al cultivo  $\alpha$ -CD5, incremento que es inclusive mayor que en el control de activación óptimo.

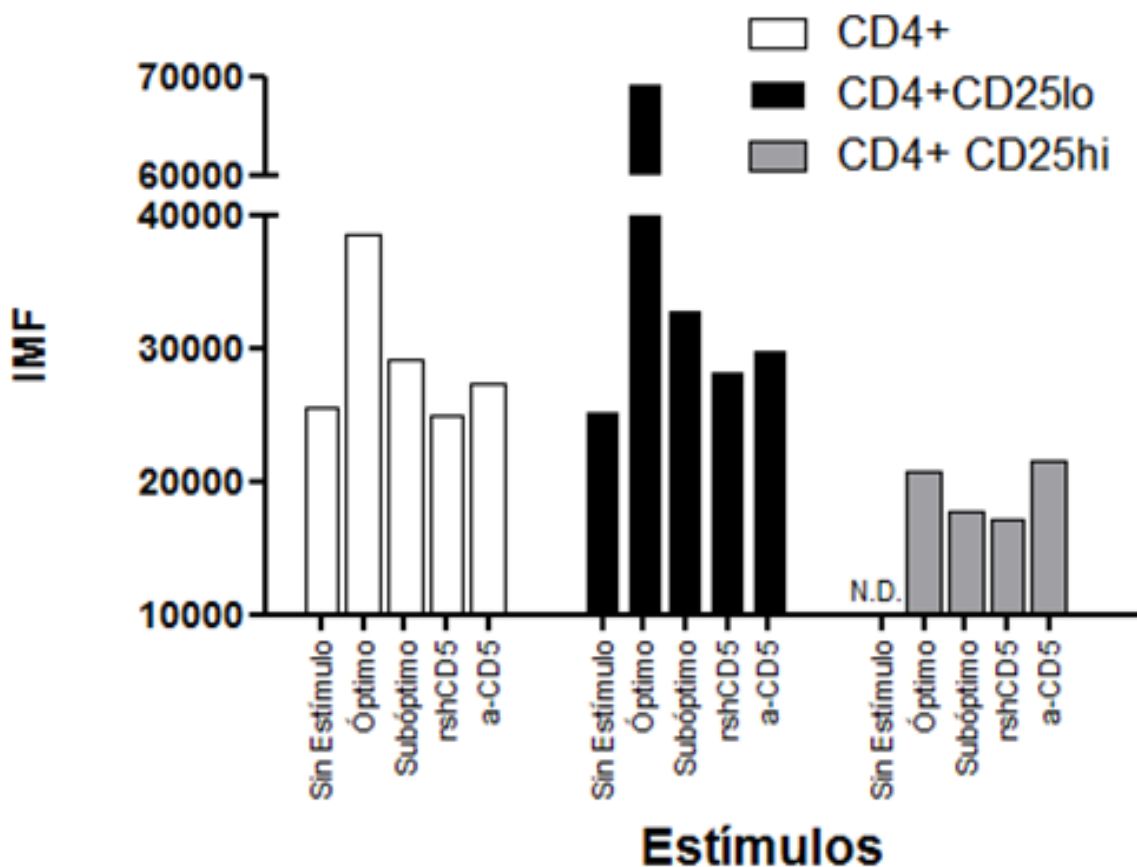


Fig28. Representación gráfica de la fosforilación de Erk.

## **7. DISCUSIÓN**

### **7.1. Selección de Linfocitos T vírgenes**

En la Figura 19 podemos ver cómo fue seleccionada la población de linfocitos T vírgenes. Como ya se había mencionado se denomina así a los linfocitos que no han tenido contacto con su antígeno. Estas células se pueden diferenciar por la expresión de ciertas proteínas como CD62L y CD44, ambas proteínas son importantes para la migración de los linfocitos hacia los ganglios. CD62L es una L-selectina que se debe encontrar altamente expresada para que los linfocitos una vez maduros salgan del timo y migren a los ganglios y al bazo, una vez que en este sitio encuentran su antígeno específico y se activan bajan los niveles de esta proteína para poder migrar al tejido inflamado. Por otro lado CD44, receptor para ácido hialurónico, se expresa en niveles bajos en células vírgenes, lo que les permite llegar a ganglio, en cambio se expresa en altos niveles en células activadas o de memoria.

Como se puede observar en la Figura 19 los niveles de expresión de CD62L y CD44 son bastante homogéneos (el pico de expresión es angosto), y esto se debe a que provienen de células que no expresan CD25, otro marcador de activación, las células una vez activadas secretan IL-2 y necesitan esta citocina para poder proliferar por lo que también incrementan la expresión del IL-2R, compuesto por las cadenas  $\alpha$  (CD25),  $\beta$  y  $\gamma$ . En la mayoría de las publicaciones la selección de linfocitos solo se hace a partir de este marcador (CD4+CD25-) sin embargo las células de memoria también bajan sus niveles de CD25, marcadores como CD62L y CD44 nos permiten seleccionar mejor la población de interés, ya que las células de memoria expresan niveles bajos de CD62L y niveles altos de CD44 [100], por ello en la selección

de los linfocitos T vírgenes para desarrollar este trabajo se excluyó la población CD44<sup>lo</sup> CD62L<sup>hi</sup>.

## **7.2. Inducción de Células T reguladoras**

La separación de linfocitos T vírgenes se realizó para poder analizar el efecto que tiene CD5 en la inducción de linfocitos T reguladores a partir de estas células, lo cual semejaría lo que ocurre en periferia *in vivo*.

Para determinar que las células eran capaces de responder a los estímulos y que al momento de la separación no se habían seleccionado linfocitos T reguladores, se cultivaron las células en condiciones de activación óptima, tanto el anticuerpo  $\alpha$ -CD3 como el  $\alpha$ -CD28 fueron pegados a placa, la cual previamente había sido sensibilizada con un anticuerpo cuya especificidad es hacia la fracción constante de las inmunoglobulinas de hámster (los anticuerpos  $\alpha$ -CD3 y  $\alpha$ -CD28 están hechos en hámster), esto permite que la fracción variable de dichos anticuerpos este orientada hacia arriba y que el contacto con la célula sea más eficiente, lo cual facilita que el linfocito reciba tanto las señales del TCR (CD3) como las del coestímulo (CD28), además de favorecer el reclutamiento de estas moléculas al mismo sitio de la membrana, lo cual tiene como efecto la activación total del linfocito llevándolo a un fenotipo efector. Como podemos ver en la Figura 20, en esta condición de cultivo sólo encontramos un muy bajo porcentaje de linfocitos Foxp3<sup>+</sup>, los cuales pudieron estar desde un inicio en el cultivo, ya que la separación no se hace a partir de células Foxp3<sup>-</sup>. Esta contaminación se podría evitar con el uso del ratón transgénico que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) una vez que este factor de transcripción se expresa. De manera alternativa, la activación "óptima" puede no haber sido suficientemente eficaz como para activar a todos los linfocitos T en cultivo, promoviendo de esta manera la conversión de una pequeña

proporción de Tregs. Además, en estas condiciones, la mayoría de las células Foxp3<sup>+</sup> son CD25<sup>-</sup>, lo cual también podría indicar una estimulación deficiente.

El control de activación subóptimo permite analizar cuál es el porcentaje de linfocitos Foxp3<sup>+</sup> que se generan por el simple hecho de estar cultivados bajo condiciones subóptimas de estimulación. Como ya se mencionó en la introducción, los linfocitos T reguladores requieren señales subóptimas del TCR o un coestímulo deficiente para generarse, por lo que el protocolo utilizado induce un menor entrecruzamiento de CD3 y CD28,  $\alpha$ -CD3 pegado directamente a placa y  $\alpha$ -CD28 (coestímulo) de manera soluble y en concentraciones bajas. Esta condición no permite que CD28 se reclute de manera tan eficiente en el complejo de activación junto al TCR y esto hace que las señales de coestímulo no sean las óptimas. Pero esto no es suficiente para que se induzcan linfocitos T reguladores Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (fenotipo convencional de las iTregs) en el cultivo, se requieren las citocinas TGF $\beta$  e IL-2 para este fin. Por ello se adicionó TGF $\beta$  recombinante al cultivo y la IL-2 es secretada por algunas células que puedan ser activadas bajo estas condiciones. Como se puede observar en la Figura 20, el hecho de tener condiciones subóptimas de cultivo es capaz de incrementar el porcentaje de linfocitos Foxp3<sup>+</sup>, pero este porcentaje solo incrementa 2.5 veces mientras que la adición de TGF $\beta$  lo incrementa en 5.3 veces comparado con el control de activación óptimo. Estos tres controles permiten decir que el sistema de inducción de Tregs *in vitro* es eficaz.

Para observar el efecto que tiene CD5 en la inducción de Tregs, a las condiciones de cultivo que nos permitían inducir esta población (TGF $\beta$ ) se adicionó la proteína recombinante de la forma soluble de CD5 (rshCD5). CD5 se ha encontrado en su forma soluble de manera natural en el suero humano en concentraciones bajas y se ha visto que no se

incrementa en enfermedades autoinmunes. Se demostró que esta molécula soluble puede ser generada por corte proteolítico tras la activación del linfocito T. Está constituida por los tres dominios "scavenger" de CD5, aunque la función que tiene esta forma soluble aún no se conoce, se cree que al igual que las formas solubles de receptores de citocinas u otras proteínas, su función es unirse a su ligando y bloquearlo de manera que no se de una señalización y un efecto en la célula. En específico rshCD5 se ha utilizado de manera eficaz para bloquear el choque séptico inducido por zymosan, utilizando la habilidad de esta molécula para reconocer  $\beta$ -glucanos presentes en la pared celular de los hongos [101]. Para generar la proteína recombinante se introdujo una mutación que produce un codón de paro en la región transmembranal de CD5 lo cual genera una proteína con el mismo peso molecular, patrón de glicosilación y reactividad a anticuerpos que la forma soluble encontrada naturalmente [102].

En datos no publicados (Soldevila, 2010) se vio que el adicionar  $1\mu\text{g/mL}$  de rshCD5 al cultivo de timo fetal, ocasiona que el desarrollo de linfocitos en timo se detenga en el estadio DN, por lo que se consideró que tenía un efecto bloqueante, aunque esto no ha sido demostrado. Para saber cuál era la concentración óptima a la cual se veía un efecto con la rshCD5 en la inducción de Tregs se utilizaron 3 concentraciones 1, 3 y  $5\mu\text{g/mL}$  y se observó que sólo a la concentración más alta se ve un efecto. De igual manera se adicionó al cultivo anticuerpo  $\alpha$ -CD5 para ver cuál era el efecto y si éste era igual al obtenido por la rshCD5, ya que al ponerlo de manera soluble y sin entrecruzamiento se postula que también genere un efecto bloqueante. El efecto tanto con el rshCD5 o  $\alpha$ -CD5 es el mismo: una disminución en el porcentaje de linfocitos Foxp3+.

En la actualidad se considera a CD5 como un regulador negativo de las señales del TCR y del BCR [80, 81] sobretodo se ha considerado en tiempos recientes, a partir de los estudios realizados en el ratón deficiente para esta proteína. Se hipotetizó que al bloquear CD5 con rshCD5 o  $\alpha$ -CD5, esta glicoproteína no sería capaz de regular negativamente las señales del TCR, por lo que las células en el cultivo recibirían una señal más alta, lo que no permitiría que adquirieran un fenotipo regulador. Esto es consistente con la disminución en el porcentaje de linfocitos Foxp3+ que se encuentra en el cultivo con estas proteínas; sin embargo, no podemos dejar de lado el hecho de que la mayoría de estos estudios se han realizado en timocitos y que en un principio esta proteína se consideró como un co-estimulador de la señal del TCR por estudios realizados en linfocitos, cuando se utiliza como entrecruzador extracelular (estimulación con anticuerpos) [76-78]. Por lo que se propuso que CD5 tiene un papel dual dependiendo del estado de maduración de las células. Sin embargo, a partir de la generación del ratón CD5KO se observó que tanto los timocitos como los linfocitos T maduros proliferan más y tienen una mayor fosforilación de varias moléculas, por lo que ahora se postula que dependiendo del tipo de estímulo realizado, entrecruzamiento con anticuerpos (experimentos iniciales) o el reclutamiento de CD5 a la sinapsis durante el reconocimiento antigénico (reconocimiento de su ligando en las células presentadoras de antígenos *in vivo*) CD5 actuara como regulador positivo o negativo, respectivamente. Si CD5 actuara como molécula coestimuladora el bloqueo generaría una disminución de las señales del TCR en el cultivo lo cual incrementaría la generación de iTregs. Sin embargo, si la adición del anticuerpo como la rshCD5 en vez de bloquear activaran (actuando como agonistas), las señales del TCR en el cultivo serían mayores y por lo tanto se generarían menos Tregs. Por

ello era importante determinar el efecto que tiene el adicionar el rshCD5 o  $\alpha$ -CD5 al cultivo.

En la Figura 20 la columna de la derecha representa, como gráfica de puntos, la expresión de CD4 y CD25 en los linfocitos Foxp3+, como se puede observar la inducción de Tregs con TGF $\beta$  induce células Foxp3+ CD25+, una población bien descrita de linfocitos reguladores, en cambio en el cultivo con rshCD5 la mayoría de las células Foxp3+ generadas son CD25- y este efecto es más marcado en el cultivo con  $\alpha$ -CD5. En el 2009 Ordoñez-Rueda et al [86] demostraron que el ratón CD5KO presenta un incremento en las nTregs y que este incremento se mantiene en periferia, pero en este trabajo no se demuestra que el incremento en periferia sea debido a la inducción de Tregs (Foxp3+ CD25+) o a una acumulación de éstas debida a la mayor resistencia a la apoptosis que presenta esta población en el ratón. También en este trabajo se observó que en periferia el ratón deficiente de CD5 presenta un incremento en la población Foxp3+ CD25-, esta población concuerda con la población generada en este trabajo, por lo que se postula que CD5 tiene un efecto preferencial sobre esta población. Dado que estas células son CD25- y la selección de linfocitos vírgenes se hace a partir de la región CD25-, es posible que el incremento que se ve en el cultivo sea dado por la proliferación de estas células y no por la generación de novo, para poder determinar si el incremento de esta población está dado por la expansión o la inducción, la selección de linfocitos debería hacerse a partir de la población Foxp3-, para evitar la contaminación del cultivo con la población Foxp3+ CD25-. También se podría seguir la proliferación de las células en cultivo con CFSE o algún otro marcador que nos permita ver la división celular y de esta manera poder determinar si estas células provienen de una proliferación o de una generación *de novo*.

Esta población poco común de linfocitos Tregs CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> se ha encontrado incrementada en pacientes con lupus eritematoso sistémico. Esta población presenta niveles de expresión similares a los de las Treg convencionales en marcadores como CD62L, CD95, GITR, CTLA-4, CD127 pero a diferencia de estas, son CD45RO<sup>+</sup> por lo que se consideran de "memoria"., Se ha descrito también que estas células no presentan una buena capacidad supresora ya que son capaces de inhibir la proliferación, pero no la producción de citocinas. Además, se ha propuesto que esta población celular es precursora de los linfocitos Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> y que se reclutan para intentar llegar al balance homeostático en estos pacientes [103-105]. Otro estudio demuestra que estas células CD25<sup>-</sup> son capaces de expresar este marcador en condiciones de proliferación homeostática, lo que concuerda con que esta población sea un precursor de la población CD25<sup>+</sup>. Por otro lado, en este estudio se observa que este marcador no es necesario para la función reguladora[106].

### **7.3. Tinción intracelular de c-Cbl fosforilado**

Como ya se mencionó anteriormente es importante saber cual es el efecto de la rshCD5 y del anticuerpo  $\alpha$ -CD5 para poder entender porque se ve una disminución en el porcentaje de células Foxp3<sup>+</sup> cuando estas proteínas se adicionan al cultivo en condiciones de inducción de Tregs. Por ello, se estimularon células de ganglio total que fueron incubadas con o sin la rshCD5 o el  $\alpha$ -CD5 para observar el efecto que esto tenía sobre la fosforilación de c-Cbl.

Cbl es un onco-proteína y una ligasa de ubiquitina que tiene un papel fundamental en la regulación negativa de las señales del TCR para evitar la activación de los linfocitos. En el ratón deficiente de Cbl-b se observó que la selección tímica no se ve afectada, pero que los linfocitos



maduros no requieren del coestímulo por CD28 para activarse y producir IL-2, además de que los linfocitos de este ratón no puede ser tolerizados y el ratón es altamente susceptible a presentar autoinmunidad; sin embargo, las Tregs generadas en este ratón se desarrollan de manera normal y presentan una función adecuada. Se ha reportado que la deficiencia de Cbl-b interfiere con la inducción de Tregs en presencia de TGF $\beta$  [107]. A diferencia del ratón Cbl-b KO, en el ratón c-Cbl (c-CblKO) se da una selección alterada de timocitos, ya que una gran proporción de los timocitos dobles positivos presentan niveles incrementados de CD3, TCR $\beta$ , TCR $\zeta$ , Lck y Fyn además de una actividad incrementada de las MAP cinasas y las proteínas Src.

Cbl puede ejercer su función una vez que la célula ha recibido las señales de activación, ya que esta ligasa de ubiquitina puede ser reclutada al TCR $\zeta$  y esto le permite interactuar con proteínas como LAT, ZAP70 y Syk. De esta manera Cbl es fosforilado, volviéndose activo, una vez activo puede unirse a ZAP70, Lck y TCR $\zeta$  y marcarlos para degradación proteosomal. Esta proteína también es capaz de unirse a Grb2, de esta manera compite con el intercambiador de guanil-nucleotidos SOS, y bloquea las señales de las MAP cinasas e inhibe la proliferación de las células[108].

Como ya se mencionó en la introducción, c-Cbl se asocia a CD5 y es capaz de ubiquitarlo para inducir su degradación, pero también el entrecruzamiento del TCR con CD5 en timocitos incrementa los niveles de fosforilación de c-Cbl, y además se recluta a la cola citoplásmica de CD5, lo cual sugiere que CD5 puede contribuir con la regulación negativa de las señales del TCR mediada por c-Cbl (datos no publicados, Roa 2012).

Una vez que se cultivaron por una hora las células de ganglio total, fueron teñidas con marcadores de superficie CD4, CD8 y CD25 para poder identificar las poblaciones de linfocitos, y hacer el análisis dentro de la población CD4+ o dentro de las subpoblaciones CD4+ CD25- (linfocitos vírgenes) o CD4+CD25+ (linfocitos activados), posteriormente fueron estimuladas con anticuerpos  $\alpha$ -CD3 sólo o  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD5, ambos anticuerpos se encuentran biotinilados y fue adicionada estreptavidina para inducir el entrecruzamiento de los anticuerpos sobre la membrana celular.

Como se puede observar en las figura 23 y 24 cuando las células se cultivan con RPMI 10% el estímulo con  $\alpha$ -CD3 incrementa la fosforilación de c-Cbl y esta fosforilación se ve incrementada con el coestímulo  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD5, concordante con que la activación del TCR es capaz de fosforilar a c-Cbl, que el estímulo con  $\alpha$ -CD5 incrementa esta fosforilación y con lo obtenido por el laboratorio (datos no publicados Roa, 2012).

Cuando las células se cultivan con la rshCD5 los niveles basales (sin estímulo) de pc-Cbl disminuyen como se puede ver en la Figura 25, sin embargo el estímulo con  $\alpha$ -CD3 es capaz de inducir la fosforilación de c-Cbl a niveles comparables con los vistos en las células que fueron cultivadas sin ningún estímulo; sin embargo, se puede observar que cuando las células se co-estimulan con  $\alpha$ -CD5 los niveles de pc-Cbl se ven disminuidos. Esto se puede deber a que la rshCD5 se una a su ligando, en este caso el mismo CD5 anclado a membrana, y no permita la unión del anticuerpo  $\alpha$ -CD5 por lo tanto el entrecruzamiento con el TCR no se lleva a cabo. Si este fuera el caso, la fosforilación debería mantenerse al nivel del estímulo con  $\alpha$ -CD3 mas no disminuir. Por ello la disminución de p-cCbl en respuesta a  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD5 en presencia del rshCD5 se podría deber a que a pesar de que el anticuerpo  $\alpha$ -CD5

biotina no es capaz de unirse a CD5 en la superficie celular e inducir su entrecruzamiento, este anticuerpo sí tiene la capacidad de unirse a la estreptavidina y "secuestrarla". Debido a que tanto para el estímulo con  $\alpha$ -CD3 como para el co-estímulo con  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD5 se utiliza la misma cantidad de estreptavidina, el "secuestro" de esta última por el  $\alpha$ -CD5 biotina podría afectar la intensidad de la señal inducida por el estímulo con  $\alpha$ -CD3 y por lo tanto las señales transducidas a través del TCR. Otra posibilidad sería que el bloqueo de CD5 no permite a éste reconocer a su ligando (que podría ser el mismo CD5 en el linfocito T) y que esto modifique las señales recibidas por el linfocito T. Si la rshCd5 se pega a CD5 y esto induce una regulación negativa de las señales en el linfocito T, entonces el linfocito podría ser menos responsivo a las señales dadas por el entrecruzamiento de CD3. Este mismo efecto se ve tanto en el cultivo con  $\alpha$ -CD5 como en las células provenientes del ratón CD5KO, ya sea analizando en la población CD4+ o por subpoblaciones.

El hecho de que en el cultivo con rshCD5 o con  $\alpha$ -CD5 se observe el mismo efecto que con las células provenientes del ratón CD5KO sugiere que ambas proteínas funcionan como bloqueantes de CD5, y que la disminución en la fosforilación de c-Cbl permite que las señales del TCR que recibe la célula sean de mayor intensidad. Pero dado que la activación por medio del TCR también es capaz de inducir la fosforilación de c-Cbl, y esta es proporcional a la señal que recibe el TCR, cabe la posibilidad de que la disminución en los niveles de esta proteína sean la consecuencia de una menor señalización del TCR. Por otro lado, al cultivo se adicionaron todas las células provenientes de ganglio, donde además de linfocitos T podemos encontrar otras células como linfocitos B, monocitos, macrófagos y células dendríticas las cuales pudieran estar afectando la activación de los linfocitos T. Por ello se decidió observar una proteína río abajo de las señales del TCR en células que se

encontraran en las mismas condiciones de cultivo que las utilizadas para la inducción de Tregs y de esta manera determinar si las señales del TCR que veían las células en cultivo eran de mayor o menor magnitud.

#### **7.4 Tinción intracelular de Erk fosforilado**

La activación del TCR lleva a la fosforilación de cinasas de tirosina las cuales se asocian a CD3, a la cadena TCR $\zeta$  y los correceptores CD4 o CD8 (parte del complejo de activación de los linfocitos). Este reclutamiento de las cinasas de tirosina lleva a la fosforilación de tirosinas en motivos de activación (ITAM), principalmente por proteínas de la familia Src, Lck y Fyn. Esto recluta a ZAP70 a través de su dominio SH2, el cual induce la fosforilación de la molécula adaptadora LAT que presenta sitios de unión a Grb2 o PLC $\gamma$ . Grb2 puede unirse al intercambiador de nucleósidos de guanina SOS, el cual activa a Ras-GTP, y éste a su vez activa Raf-1, principal activador de las vías de las MAP cinasas [108, 109].

La familia de las MAP cinasas consiste en cinasas de serina/treonina que se encuentran en el citoplasma y participan en la transducción de señales. Está compuesta por la familia de la cinasa regulada por señales extracelulares (Erk), la familia de la cinasa p38 y la familia de la cinasa N-terminal c-Jun (JNK). [110]

Erk está relacionado con la regulación de varios procesos celulares como la adhesión, migración, supervivencia, diferenciación, metabolismo, proliferación y progresión de ciclo celular. Esta proteína puede ser activada por medio de la fosforilación por MEK1/2 tras el encuentro de la célula con varios factores de crecimiento, citocinas o receptores de quimiocinas. Una vez activado Erk cataliza la fosforilación de factores de transcripción como c-Fos y c-Myc que promueven la supervivencia, división y motilidad de la célula, además de ser capaz de

regular la represión transcripcional de genes y el remodelamiento de la cromatina [111].

Los niveles de fosforilación de Erk nos permiten ver el estado de activación y la cantidad de señal que la célula recibe a través de la estimulación del TCR; a mayor fosforilación de Erk, mayor señal del TCR. Por eso, se decidió ver la fosforilación de esta molécula en respuesta a las condiciones de cultivo utilizadas para la inducción de Tregs.

Como se puede observar en la Figura 26, las diferentes condiciones de cultivo inducen diferentes niveles de activación de la célula, evidenciado por el aumento en la expresión de CD25 en superficie. Una vez que las células se activan se induce la expresión de IL-2 y de su receptor para que estas sean capaces de proliferar. La Figura 26 muestra que las células que no reciben un estímulo no son capaces de inducir la expresión de CD25, mientras que un 60% de las células que reciben un estímulo de activación óptimo pueden incrementar estos niveles de manera eficiente; de igual manera se puede ver que en las condiciones de activación subóptima sólo un 21% de las células fueron activadas y que el cultivo en condiciones subóptimas al cual se le adiciona rshCD5 o el  $\alpha$ -CD5 incrementan el porcentaje de células activadas comparado con las condiciones de activación subóptima. Estos datos podrían indicar que el las células cultivadas en las últimas dos condiciones mencionadas reciben una señal del TCR más fuerte que las células que se cultivan en condiciones subóptimas. Sin embargo, también podría representar un incremento en la generación de Tregs CD25+, por lo que es difícil evaluar el nivel de activación mediada por el TCR por medio de este marcador.

Por ello, se decidió evaluar la fosforilación de una molécula río abajo en la señalización del TCR. Así, si se analizan los niveles de pErk se puede observar que si bien las células que reciben un estímulo de activación óptimo presentan niveles de pErk más altos que las células estimuladas subóptimamente, las células que se cultivan en presencia de la rshCD5 o  $\alpha$ -CD5 presentan niveles más bajos que los vistos en el cultivo en condiciones subóptimas, lo que sugiere que las señales del TCR recibidas por las células cultivadas en condiciones bloqueantes son menores.

La vía de señalización de Erk regula la actividad y niveles de la familia de proteínas Bcl-2, como las proteínas anti-apoptóticas MCL-1, Bcl-2 y Bcl-x [109]. Erk es capaz de fosforilar BIM, proteína pro-apoptótica, lo cual promueve su ubiquitinización y degradación proteasomal, además de inhibir su asociación con proteínas de la familia Bcl-2, cuya unión es necesaria para inducir la muerte de las células. También se ha asociado la vía de Erk con un incremento en la expresión de las proteínas Bcl-2 puesto que la inhibición de Erk causa una disminución en Bcl-2, Bcl-x y MCL-1, así como un incremento en apoptosis [112]. Erk puede fosforilar a proteínas de la familia RSK, las cuales a su vez inactivan proteínas pro-apoptóticas como BAD (promotor de muerte asociado a Bcl-2) y DAPK (proteína cinasa asociada a la muerte). RSK promueve también la progresión del ciclo celular hacia G1 catalizando la inhibición del inhibidor de cinasas dependientes de ciclina [111].

En relación a CD5, en timocitos se ha visto que el entrecruzamiento con anticuerpo  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD5, incrementa la activación (fosforilación) de Erk, por medio del incremento en la fosforilación de LAT y una mayor asociación de esta con PCL $\gamma$  y Gbr2, esta activación favorece la diferenciación de timocitos DP hacia SP CD4+ y promueve la

supervivencia de los mismos por medio del incremento en la fosforilación de Bcl-2, la inhibición de Erk contrarresta el efecto [113].

Con base en estos antecedentes se puede inferir que las células que se encuentran en cultivo con la rshCD5 o con el  $\alpha$ -CD5, al tener niveles bajos de pErk están entrando a un proceso de apoptosis, pero esto no necesariamente refleja que las células que se convierten en Treg estén viendo señales bajas del TCR o estén entrando en un proceso de apoptosis. Cabe recordar que los niveles de fosforilación se midieron a las 24 horas de cultivo, mientras que la inducción de Tregs se evalúa a los 5 días. Por lo tanto, para analizar los niveles de pErk en las Tregs y saber si la señal que reciben del TCR es diferente en las diferentes condiciones de cultivo es necesario analizarlo cuando inicia la expresión de Foxp3 y para esto seguir la expresión de este marcador en el tiempo de cultivo, o una vez que las células ya expresan este factor de transcripción.

## 8. CONCLUSIONES

La presencia de rshCD5 o  $\alpha$ -CD5 en el cultivo de linfocitos vírgenes bajo condiciones de activación subóptima y en presencia de TGF $\beta$  disminuye (en porcentaje) la inducción de linfocitos T reguladores *in vitro* comparado con el cultivo sin estas proteínas; sin embargo, la presencia de estas, incrementa la generación de linfocitos CD4+ Foxp3+ CD25-, una población poco caracterizada de linfocitos Treg inducidos. Sin embargo, todavía falta investigar si el número total de cada una de estas subpoblaciones se encuentra incrementado o disminuido en los cultivos con rshCD5 o  $\alpha$ -CD5

Los resultados preliminares obtenidos de la fosforilación de c-Cbl y Erk sugieren que la proteína recombinante soluble humana de CD5 y el anticuerpo  $\alpha$ -CD5 ejercen una función como bloqueante de las señales de CD5. Sin embargo, estos experimentos se realizaron por medio de entrecruzamiento extracelular de los receptores con anticuerpos ( $\alpha$ -CD3 y  $\alpha$ -CD5) y puede que esto no refleje necesariamente lo que ocurre *in vivo*, por lo que es fundamental hacer el análisis de la generación de Tregs inducidas en el ratón CD5KO.



## 9. PERSPECTIVAS

- ❖ Inducir *in vitro* la generación de Tregs a partir de células T vírgenes provenientes de ratones deficientes de CD5.
- ❖ Investigar el fenotipo de las células Tregs generadas por medio de marcadores celulares como son CTLA-4, OX-40, GITR, CD25, Foxp3, TGF- $\beta$ , IL-10.
- ❖ Evaluar la funcionalidad de las células Treg generadas por medio de ensayos de supresión y proliferación.
- ❖ Evaluar la resistencia a la apoptosis de las iTregs generadas *in vitro*.
- ❖ Investigar los mecanismos de supresión que ejercen las células Tregs generadas sobre células efectoras.

## 10. REFERENCIAS

1. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor?* *Immunity*, 2009. **30**: p. 626-635.
2. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology*. 7th ed. 2012, Philadelphia: Elsevier/Saunders. x, 545 p.
3. Murphy, K., et al., *Janeway's immunobiology*. 8th ed. 2012, New York: Garland Science. xix, 868 p.
4. Abbas, A.K., *Cellular and molecular immunology*. 5th ed. 2003, Philadelphia: Saunders. 562 p.
5. Kindt, T.J., et al., *Kuby immunology*. 6th ed. 2007, New York: W.H. Freeman. xxii, 574, A-31, G-12, AN-27, I-27 p.
6. Davies, H., *Immune System*. The Encyclopedia of Life Sciences, 2008: p. 1-10.
7. Reynolds, J.D., D. Heng, and I. Sztukowski, *Lymphoid System*. The Encyclopedia of Life Sciences, 2001: p. 1-7.
8. Klaus, G., *Lymphocytes*. The Encyclopedia of Life Sciences, 2001: p. 1-8.
9. Ciofani, M. and J.C. Zuniga-Pflucker, *The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007. **23**: p. 463-93.
10. Zhang, Y., *Lymphocyte Development*. The Encyclopedia of Life Sciences, 2010: p. 1-10.
11. von Boehmer, H., et al., *Thymic selection revisited: how essential is it?* *Immunol Rev*, 2003. **191**: p. 62-78.
12. Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Positive and negative selection of T cells*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 139-76.
13. Moran, A.E. and K.A. Hogquist, *T-cell receptor affinity in thymic development*. *Immunology*, 2012. **135**(4): p. 261-7.
14. Murata, S., et al., *Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes*. *Science*, 2007. **316**(5829): p. 1349-53.
15. Nakagawa, T., et al., *Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus*. *Science*, 1998. **280**(5362): p. 450-3.
16. Gommeaux, J., et al., *Thymus-specific serine protease regulates positive selection of a subset of CD4+ thymocytes*. *Eur J Immunol*, 2009. **39**(4): p. 956-64.
17. Ramsey, C., et al., *Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response*. *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(4): p. 397-409.
18. Aschenbrenner, K., et al., *Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(4): p. 351-8.
19. Zouali, M., *Immunological Tolerance: Mechanisms*. The Encyclopedia of Life Sciences, 2007: p. 1-9.
20. Anderson, M.S., et al., *Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein*. *Science*, 2002. **298**(5597): p. 1395-401.
21. Klein, L. and B. Kyewski, *Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor*. *Curr Opin Immunol*, 2000. **12**(2): p. 179-86.
22. McGargill, M.A., J.M. Derbinski, and K.A. Hogquist, *Receptor editing in developing T cells*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(4): p. 336-41.
23. Mueller, D.L., *Mechanisms maintaining peripheral tolerance*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(1): p. 21-7.

24. Wells, A.D., et al., *Signaling through CD28 and CTLA-4 controls two distinct forms of T cell anergy*. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 895-903.
25. Perez, V.L., et al., *Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement*. Immunity, 1997. **6**(4): p. 411-7.
26. Schwartz, R.H., *Historical overview of immunological tolerance*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(4): p. a006908.
27. Marrack, P. and J. Kappler, *Control of T cell viability*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 765-87.
28. Sakaguchi, S., *Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 531-62.
29. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 68-73.
30. Ochs, H.D., S.F. Ziegler, and T.R. Torgerson, *FOXP3 acts as a rheostat of the immune response*. Immunol Rev, 2005. **203**: p. 156-64.
31. Koonpaew, S., et al., *LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development*. J Exp Med, 2006. **203**(1): p. 119-29.
32. Kim, J.K., et al., *Impact of the TCR signal on regulatory T cell homeostasis, function, and trafficking*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6580.
33. Tai, X., et al., *CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2*. Nat Immunol, 2005. **6**(2): p. 152-62.
34. Vang, K.B., et al., *IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3285-90.
35. Josefowicz, S.Z. and A. Rudensky, *Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 616-25.
36. Rudra, D., et al., *Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network*. Nat Immunol, 2012. **13**(10): p. 1010-1021.
37. Ohkura, N. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function*. Semin Immunopathol, 2010. **32**(2): p. 95-106.
38. Larkin, J., 3rd, et al., *CD4+CD25+ regulatory T cell repertoire formation shaped by differential presentation of peptides from a self-antigen*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2149-57.
39. Hsieh, C.S., H.M. Lee, and C.W. Lio, *Selection of regulatory T cells in the thymus*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(3): p. 157-67.
40. Watanabe, N., et al., *Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus*. Nature, 2005. **436**(7054): p. 1181-5.
41. Josefowicz, S.Z., L.F. Lu, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 531-64.
42. Kim, J.M. and A. Rudensky, *The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 86-98.
43. Sauer, S., et al., *T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(22): p. 7797-802.
44. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 114-30.
45. Bilate, A.M. and J.J. Lafaille, *Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 733-58.

46. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation*. *Immunity*, 2004. **21**(5): p. 733-41.
47. Gondek, D.C., et al., *Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism*. *J Immunol*, 2005. **174**(4): p. 1783-6.
48. Pandiyan, P., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(12): p. 1353-62.
49. Deaglio, S., et al., *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*. *J Exp Med*, 2007. **204**(6): p. 1257-65.
50. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(7): p. 523-32.
51. Grohmann, U., et al., *CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 1097-101.
52. Sarris, M., et al., *Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition*. *Immunity*, 2008. **28**(3): p. 402-13.
53. Wing, K. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(1): p. 7-13.
54. Shevach, E.M., *Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression*. *Immunity*, 2009. **30**(5): p. 636-45.
55. Tivol, E.A., et al., *Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4*. *Immunity*, 1995. **3**(5): p. 541-7.
56. Greenwald, R.J., et al., *CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo*. *Immunity*, 2001. **14**(2): p. 145-55.
57. Sansom, D.M. and L.S. Walker, *The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology*. *Immunol Rev*, 2006. **212**: p. 131-48.
58. Bruder, D., et al., *Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(3): p. 623-30.
59. Keir, M.E., et al., *Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance*. *J Exp Med*, 2006. **203**(4): p. 883-95.
60. Nocentini, G. and C. Riccardi, *GITR: a modulator of immune response and inflammation*. *Adv Exp Med Biol*, 2009. **647**: p. 156-73.
61. Nocentini, G. and C. Riccardi, *GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily*. *Eur J Immunol*, 2005. **35**(4): p. 1016-22.
62. Sarrias, M.R., et al., *The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system*. *Crit Rev Immunol*, 2004. **24**(1): p. 1-37.
63. Soldevila, G., C. Raman, and F. Lozano, *The immunomodulatory properties of the CD5 lymphocyte receptor in health and disease*. *Curr Opin Immunol*, 2011. **23**(3): p. 310-8.
64. Azzam, H.S., et al., *CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity*. *J Exp Med*, 1998. **188**(12): p. 2301-11.
65. Azzam, H.S., et al., *Fine tuning of TCR signaling by CD5*. *J Immunol*, 2001. **166**(9): p. 5464-72.
66. Davies, A.A., S.C. Ley, and M.J. Crumpton, *CD5 is phosphorylated on tyrosine after stimulation of the T-cell antigen receptor complex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(14): p. 6368-72.
67. Dennehy, K.M., et al., *Determination of the tyrosine phosphorylation sites in the T cell transmembrane glycoprotein CD5*. *Int Immunol*, 2001. **13**(2): p. 149-56.

68. Burgess, K.E., et al., *CD5 acts as a tyrosine kinase substrate within a receptor complex comprising T-cell receptor zeta chain/CD3 and protein-tyrosine kinases p56lck and p59fyn*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(19): p. 9311-5.
69. Dennehy, K.M., et al., *Thymocyte activation induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase and pp120 with CD5*. Eur J Immunol, 1997. **27**(3): p. 679-86.
70. Bamberger, M., et al., *A new pathway of CD5 glycoprotein-mediated T cell inhibition dependent on inhibitory phosphorylation of Fyn kinase*. J Biol Chem, 2011. **286**(35): p. 30324-36.
71. Demydenko, D., *c-Cbl mediated ubiquitylation and regulation of cell surface exposure of CD5*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **392**(4): p. 500-4.
72. Calvo, J., et al., *Human CD5 signaling and constitutive phosphorylation of C-terminal serine residues by casein kinase II*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 6022-9.
73. Dennehy, K.M., et al., *Thymocyte activation induces the association of the proto-oncoprotein c-cbl and ras GTPase-activating protein with CD5*. Eur J Immunol, 1998. **28**(5): p. 1617-25.
74. Simarro, M., et al., *The cytoplasmic domain of CD5 mediates both TCR/CD3-dependent and -independent diacylglycerol production*. J Immunol, 1997. **159**(9): p. 4307-15.
75. Perez-Villar, J.J., et al., *CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 2903-12.
76. Alberola-Ila, J., et al., *Intracellular events involved in CD5-induced human T cell activation and proliferation*. J Immunol, 1992. **148**(5): p. 1287-93.
77. Imboden, J.B., et al., *Stimulation of CD5 enhances signal transduction by the T cell antigen receptor*. J Clin Invest, 1990. **85**(1): p. 130-4.
78. Ceuppens, J.L. and M.L. Baroja, *Monoclonal antibodies to the CD5 antigen can provide the necessary second signal for activation of isolated resting T cells by solid-phase-bound OKT3*. J Immunol, 1986. **137**(6): p. 1816-21.
79. Lozano, F., et al., *CD5 signal transduction: positive or negative modulation of antigen receptor signaling*. Crit Rev Immunol, 2000. **20**(4): p. 347-58.
80. Tarakhovsky, A., W. Muller, and K. Rajewsky, *Lymphocyte populations and immune responses in CD5-deficient mice*. Eur J Immunol, 1994. **24**(7): p. 1678-84.
81. Tarakhovsky, A., et al., *A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection*. Science, 1995. **269**(5223): p. 535-7.
82. Raman, C., *CD5, an important regulator of lymphocyte selection and immune tolerance*. Immunol Res, 2002. **26**(1-3): p. 255-63.
83. Axtell, R.C., et al., *Cutting edge: critical role for CD5 in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of engagement reverses disease in mice*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 2928-32.
84. Axtell, R.C., et al., *CD5-CK2 binding/activation-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: protection is associated with diminished populations of IL-17-expressing T cells in the central nervous system*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8542-9.
85. Sestero, C.M., et al., *CD5-dependent CK2 activation pathway regulates threshold for T cell anergy*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 2918-30.
86. Ordonez-Rueda, D., et al., *Increased numbers of thymic and peripheral CD4+ CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling*. Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2233-47.
87. Friedlein, G., et al., *Human CD5 protects circulating tumor antigen-specific CTL from tumor-mediated activation-induced cell death*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6821-7.

88. Dorothee, G., et al., *In situ sensory adaptation of tumor-infiltrating T lymphocytes to peptide-MHC levels elicits strong antitumor reactivity.* J Immunol, 2005. **174**(11): p. 6888-97.
89. Gagnon, J., et al., *Increased antigen responsiveness of naive CD8 T cells exposed to IL-7 and IL-21 is associated with decreased CD5 expression.* Immunol Cell Biol, 2010. **88**(4): p. 451-60.
90. Gary-Gouy, H., et al., *Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production.* Blood, 2002. **100**(13): p. 4537-43.
91. Perez-Chacon, G., et al., *CD5 provides viability signals to B cells from a subset of B-CLL patients by a mechanism that involves PKC.* Leuk Res, 2007. **31**(2): p. 183-93.
92. Dasu, T., et al., *CD5 plays an inhibitory role in the suppressive function of murine CD4(+) CD25(+) T(reg) cells.* Immunol Lett, 2008. **119**(1-2): p. 103-13.
93. Hawiger, D., et al., *Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo.* Immunity, 2004. **20**(6): p. 695-705.
94. Hippen, K.L., L.E. Tze, and T.W. Behrens, *CD5 maintains tolerance in anergic B cells.* J Exp Med, 2000. **191**(5): p. 883-90.
95. Yanaba, K., et al., *A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses.* Immunity, 2008. **28**(5): p. 639-50.
96. Cantaert, T., et al., *Increased numbers of CD5+ B lymphocytes with a regulatory phenotype in spondylarthritis.* Arthritis Rheum, 2012. **64**(6): p. 1859-68.
97. Yoshizaki, A., et al., *Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions.* Nature, 2012. **491**(7423): p. 264-8.
98. Natarajan, P., et al., *Regulatory B cells from hilar lymph nodes of tolerant mice in a murine model of allergic airway disease are CD5(+), express TGF-beta, and co-localize with CD4(+)Foxp3(+) T cells.* Mucosal Immunol, 2012. **5**(6): p. 691-701.
99. Noh, J., et al., *Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) Regulatory B Cell (Breg).* Immune Netw, 2010. **10**(6): p. 247-9.
100. Gerberick, G.F., et al., *Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells following allergen and irritant treatment.* Toxicol Appl Pharmacol, 1997. **146**(1): p. 1-10.
101. Vera, J., et al., *The CD5 ectodomain interacts with conserved fungal cell wall components and protects from zymosan-induced septic shock-like syndrome.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(5): p. 1506-11.
102. Calvo, J., et al., *Identification of a natural soluble form of human CD5.* Tissue Antigens, 1999. **54**(2): p. 128-37.
103. Yan, B. and Y. Liu, *The Nature of Increased Circulating CD4CD25Foxp3 T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Novel Hypothesis.* Open Rheumatol J, 2009. **3**: p. 22-4.
104. Horwitz, D.A., *Identity of mysterious CD4+CD25-Foxp3+ cells in SLE.* Arthritis Res Ther, 2010. **12**(1): p. 101.
105. Bonelli, M., et al., *Phenotypic and functional analysis of CD4+ CD25- Foxp3+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus.* J Immunol, 2009. **182**(3): p. 1689-95.
106. Zelenay, S., et al., *Foxp3+ CD25- CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(11): p. 4091-6.

107. Paolino, M. and J.M. Penninger, *Cbl-b in T-cell activation*. Semin Immunopathol, 2010. **32**(2): p. 137-48.
108. Schmidt, M.H. and I. Dikic, *The Cbl interactome and its functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(12): p. 907-18.
109. Kim, E.K. and E.J. Choi, *Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1802**(4): p. 396-405.
110. Plotnikov, A., et al., *The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(9): p. 1619-33.
111. Roskoski, R., Jr., *ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation*. Pharmacol Res, 2012. **66**(2): p. 105-43.
112. Balmano, K. and S.J. Cook, *Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway*. Cell Death Differ, 2009. **16**(3): p. 368-77.
113. Zhou, X.Y., et al., *CD5 costimulation up-regulates the signaling to extracellular signal-regulated kinase activation in CD4+CD8+ thymocytes and supports their differentiation to the CD4 lineage*. J Immunol, 2000. **164**(3): p. 1260-8.

## **Anexo A**

### **A.1 Soluciones.**

❖ PBS 10x

Fosfato monobásico de Sodio Monohidratado	1.28g
Fosfato dibásico de Sodio Heptahidratado	5.97g
Agua Bidestilada	250mL

\*Ajustar pH 7.3

Cloruro de Sodio	43.83g
------------------	--------

\*Aforar a 500mL

❖ PBS 1x

PBS 10x	100mL
Agua Bidestilada	900mL

❖ ACT

Solución A:

Cloruro de Amonio	8.3g
Agua Bidestilada	1L

Solución B:

Tris base	2.06g
Agua Bidestilada	80mL

\*Ajustar pH 7.7 y aforar a 100mL



Para preparar el ACT se mezclan 9 partes de la solución A con una parte de la solución B

❖ Buffer de FACS

Suero Fetal Bovino	5mL
PBS 1x	95mL

❖ Paraformaldehído al 4%

Paraformaldehído	4g
PBS 1x	100mL

Paraformaldehído al 0.5%

Paraformaldehído 4%	12.5mL
PBS 1x	87.5mL

❖ RPMI 0%

RPMI Gibco	1 sobre
Antibiotico-Anrimicotico (100x)	10mL
L-Glutamina 200mM	10mL
Bicarbonato de Sodio	2g
Buffer HEPES (1M)	12.5mL
Agua bidestilada	1000mL

\*Para esterilizar se filtran por poros de 0.2µm.

❖ RPMI 10%

Suero Fetal Bovino	50mL
RPMI 0%	450mL

❖ RPMI 0.2%

Suero Fetal Bovino	200µL
RPMI 0%	100MI
❖ Buffer de Carbonatos	
Bicarbonato de Sodio	1.6g
Carbonato ácido de Sodio	2.9g
Agua Bidestilada	800mL
*Ajustar pH 9.5 y aforar a 1L	
❖ Fix Perm 1x	
Fix Perm (4x)	1 volumen
Fix Perm Diluent	3 volúmenes
❖ Perm Buffer 1x	
Perm Buffer 10x	1 volumen
Agua MiliQ	9 volúmenes
❖ Pervanadato	
o-vanadato 1mM	30µL
Agua oxigenada 30%	6µL
PBS 1x	64µL
*Incubar a temperatura ambiente por 10min	
Mezcla anterior	16.7µL
RPMI 0.2%	483.3µL

## A.2 Reactivos

a. Antibiótico-Antimicótico (100x) líquido (Cat. 15240-112, GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

- b. Bicarbonato de Sodio, Polvo (cat. 3506-01, J.T. Backer, Philisburg, NJ, EUA).
- c. Cloruro de Amonio/ NH<sub>4</sub>Cl (Cat. 0660.01, J.T. Backer, Philisburg, NJ, EUA).
- d. Fosfato Dibásico de Sodio Heptahidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O) (Cat. 3824, J.T. Backer, Philisburg, NJ, EUA).
- e. Fosfato Monobásico de Sodio Monohidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O) (Cat. 3818, J.T. Backer, Philisburg, NJ, EUA).
- f. HEPES Buffer (1M) (Cat. 15630-080, GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).
- g. L-Glutamina 200mM (100x) liquid (Cat. 25030-081, GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).
- h. Lyse/Fix Phosflow (Cat. 558049, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- i. Fixation/Permeabilization Concentrate (Fix Perm) (Cat. 00-5123-42, eBioscience, San Diego, CA, EUA).
- j. Fixation/Permeabilization Diluent (Cat. 00-5223-56, eBioscience, San Diego, CA, EUA).
- k. O-Vanadato de Sodio (Cat. S6508, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- l. Paraformaldehído (Cat. P6148-500G), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- m. Permeabilization Buffer 10x (Perm Buffer) (Cat. 00-8333-56, eBioscience, San Diego, CA, EUA).
- n. Perm Buffer II Phosflow (Cat. 558052, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- o. RPMI (Cat. 31800-022, GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).
- p. Suero Fetal Bovino/SFB (Cat. 16000-044, GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).
- q. Tris base (Cat. 161-0719, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

### **A.3 Reactivos Biológicos**

- a. Anticuerpo APC Rat anti-mouse CD4 (Cat. 553051, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- b. Anticuerpo PE anti-mouse CD5 (Cat. 553022, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- c. Anticuerpo FITC Rat anti-mouse CD25 (Cat. 553072, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- d. Anticuerpo PE Rat anti-mouse CD44 (Cat. 553134, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- e. Anticuerpo Biotin anti-mouse CD62L (Cat. 553149, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- f. Streptavidin Pe-Cy5 (Cat. 554062, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- g. Anticuerpo Goat anti-syrian hámster IgG (Cat. 31115, Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA)
- h. Anticuerpo Purified anti-mouse CD3 (Cat. 100302, Biolegend, San Diego, CA, EUA)
- i. Anticuerpo Purified anti-mouse CD28 (Cat 102102, Biolegend, San Diego, CA, EUA)
- j. TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor Beta 1) (Cat. 7666-MB-005/CF, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA)
- k. Proteína recombinante soluble humana CD5 (rshCD5) donada por el Dr. Paco Lozano. Center Esther Koplowitz, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, España.
- l. Anticuerpo Purified Rat anti-mouse CD5 (Cat.553017, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- m. Anticuerpo PE Rat anti-mouse CD4 (Cat. 553653, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).

- n. Anticuerpo APC Rat anti-mouse Foxp3 (Cat.17-5773-82, eBioscience, San Diego, CA, EUA)
- o. Anticuerpo Cy5 Rat anti-mouse CD4 (Cat. 553654, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- p. Anticuerpo PE Rat anti-mouse CD8a (Cat. 553033, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- q. Anticuerpo Biotin anti-mouse CD3 (Cat. 100304, Biolegend, San Diego, CA, EUA).
- r. Anticuerpo Biotin anti-mouse CD5 (Cat. 100605, Biolegend, San Diego, CA, EUA).
- s. Inmunopure Streptavidine (Cat.21122, Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA).
- t. Anticuerpo Alexa 647 Mouse anti-c-Cbl pY700 (Cat.558100, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- u. Anticuerpo Alexa 647 mouse anti-ERK1/2 pT202/pY204 (Cat. 612593, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).